



36
29
Universidad Nacional Autónoma de México

Escuela Nacional de Estudios Profesionales "ZARAGOZA"

ESTUDIO DE COMPETENCIA DE DIFERENTES CEPAS DE
Rhizobium leguminosarum biovar *phaseoli*
PROVENIENTES DE LAS ZONAS ÁRIDAS DE MÉXICO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A
MARIA LUZ VEGA SEGOVIA



MEXICO, D. F.

1990

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

página

INDICE DE CUADROS.	X
INDICE DE FIGURAS.	XX
RESUMEN.	XXI
INTRODUCCION	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
- Frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).	3
- Hábitos de crecimiento.	4
- <i>Rhizobium</i>	5
- Selección de cepas de <i>Rhizobium</i>	6
- Competencia en <i>Rhizobium</i>	7
- Métodos de identificación empleados en estudios de competencia.	12
I. Resistencia a Antibióticos Inducida.	12
II. Resistencia Intrínseca a Antibióticos.	20
III. Serología	23
A) Aglutinación	25
B) Inmunodifusión	28
C) Inmunofluorescencia y Ensayo Inmunoenzimático, ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).	30
OBJETIVOS.	43
HIPÓTESIS.	44
MATERIALES Y MÉTODOS	45

- Material biológico. 45
- Marcaje de la cepa CP 163 con estreptonomicina. 46
- Prueba de estabilidad del marcaje de la cepa CP 163_{10000est} 48
- Marcaje de la cepa CP 163_{10000est} con espectinomicina. 48
- Evaluación de la nodulación del mutante CP 163_{10000 10000est/esp.} 49
- Experimento I. Selección de cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* por su capacidad competitiva en sustrato estéril 50
 - Preparación de las unidades experimentales 50
 - Preparación de las cepas según el Método de Graham (comun. pers.) 51
 - Separación y esterilización de nódulos 52
 - Plaqueo de nódulos 53
- Experimento II. Competencia en suelo entre cepas introducidas y nativas de *Rhizobium* 54
 - Marcaje de las cepas con kanamicina. 54
 - Prueba de estabilidad de los mutantes resistentes a 1000 µg de kanamicina. 56
 - Prueba de nodulación de las cepas resistentes a 1000 µg de kanamicina. 56
 - Preparación de las unidades experimentales 57
 - Preparación del inoculante 58
- RESULTADOS Y DISCUSION 61
- Experimento I. Selección de cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. 61
 - Marcaje de la cepa CP 163 61
 - Competencia entre cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* en sustrato estéril 62
 - Peso seco de la parte aérea de *Phaseolus vulgaris* L. en el estudio de competencia en sustrato estéril. 71
 - Peso seco de raíz de *Phaseolus vulgaris* L. variedad Bayo Iacatecas en el estudio de competencia en sustrato estéril 79
 - Número de nódulos rojos de *Phaseolus*

vulgaris L. variedad Bayo Iacatecas en el estudio de competencia en sustrato estéril.	80
- Número de nódulos verdes de Phaseolus vulgaris L. variedad Bayo Iacatecas en el estudio de competencia en sustrato estéril.	85
- Número de nódulos blancos de Phaseolus vulgaris L. variedad Bayo Iacatecas en el estudio de competencia en sustrato estéril.	86
- Número de nódulos totales de Phaseolus vulgaris L. variedad Bayo Iacatecas en el estudio de competencia en sustrato estéril.	87
- Peso seco de nódulos rojos (eficientes) de Phaseolus vulgaris L. en el estudio de competencia en sustrato estéril.	91
- Peso seco de nódulos verdes (ineficientes) de Phaseolus vulgaris L. en el estudio de competencia en sustrato estéril.	96
- Peso seco de nódulos blancos (ineficientes) de Phaseolus vulgaris L. variedad Bayo Iacatecas en el estudio de competencia en sustrato estéril.	98
- Peso seco de nódulos totales de Phaseolus vulgaris L. variedad Bayo Iacatecas en el estudio de competencia en sustrato estéril.	102
- Experimento II. Competencia en suelo entre cepas introducidas y nativas de Rhizobium.	104
- Marcaje de las cepas con kanamicina.	104
- Prueba de nodulación de los mutantes resistentes a 1000 µg de kanamicina.	105
- Competencia en suelo con cepas nativas de Rhizobium.	111
- Peso seco de la parte aérea de Phaseolus vulgaris L. variedad Bayo Iacatecas inoculado con mutantes resistentes a antibióticos en suelo sin esterilizar.	113
- Número y peso seco de nódulos de Phaseolus vulgaris L. variedad Bayo Iacatecas inoculado con mutantes resistentes a antibióticos en suelo sin esterilizar.	115
CONCLUSIONES	119
BIBLIOGRAFIA	122
APENDICE I	132
APENDICE II.	133

ÍNDICE DE CUADROS

	página
1.- Cepas de <i>Rhizobium leguminosarum</i> biovar <i>phaseoli</i> de efectividad y sobrevivencia comprobada empleadas en la selección por capacidad competitiva.	47
2.- Tratamientos del estudio de competencia de los mutantes CPHE1 155 ₁₀₀₀₀ kan y CP 163 ₁₀₀₀₀ 1200est/esp de <i>Rhizobium leguminosarum</i> biovar <i>phaseoli</i> en suelo conteniendo cepas nativas	59
3.- Porcentaje de nódulos formados por las cepas de <i>Rhizobium leguminosarum</i> biovar <i>phaseoli</i> al ser inoculadas junto con el mutante CP 163 ₁₀₀₀₀ 1200est/esp, en una relación 1:1.	63
4.- Medias del peso seco de la parte aérea y raíz de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. inoculado con diferentes cepas de <i>Rhizobium leguminosarum</i> biovar <i>phaseoli</i> más el mutante CP163 1000 1200 est/esp en una relación 1:1	74
5.- Medias del número de nódulos rojos y verdes de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. variedad Bayo Zacatecas inoculado con diferentes cepas de <i>Rhizobium leguminosarum</i> biovar <i>phaseoli</i> más el mutante CP 163 ₁₀₀₀₀ 1200est/esp en una relación 1:1.	83
6.- Medias del número de nódulos blancos y totales de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. variedad Bayo Zacatecas inoculado	

con diferentes cepas de <i>Rhizobium leguminosarum</i> biovar <i>phaseoli</i> más el mutante CP 163 ₁₀₀₀₀ 1200 ^{est} /esp en una relación 1:1.	88
7.- Medias del peso seco de los nódulos rojos y verdes de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. inoculados con diferentes cepas de <i>Rhizobium leguminosarum</i> biovar <i>phaseoli</i> más el mutante CP 163 ₁₀₀₀₀ 1200 ^{est} /esp en una relación 1:1.	92
8.- Medias del peso seco de los nódulos blancos y totales de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. inoculados con diferentes cepas de <i>Rhizobium leguminosarum</i> biovar <i>phaseoli</i> más el mutante CP 163 ₁₀₀₀₀ 1200 ^{est} /esp en una relación 1:1.	99
9.- Medias del peso seco de la parte aérea y raíz de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. variedad Bayo Iacatecas de la prueba de nodulación de cinco mutantes resistentes a 1000 µg de kanamicina.	106
10.- Medias del peso seco y número de nódulos de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. variedad Bayo Iacatecas de la prueba de nodulación de cinco mutantes resistentes a 1000 µg de kanamicina	109
11.- Medias del peso seco de la parte aérea, raíz y nódulos totales y número de nódulos de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. variedad Bayo Iacatecas inoculado con mutantes resistentes a antibióticos, en suelo conteniendo cepas nativas de <i>Rhizobium</i>	117

ÍNDICE DE FIGURAS

	página
1.- Relación entre el peso seco de la parte aérea de frijol Bayo Zacatecas y la capacidad competitiva de cepas efectivas de <i>Rhizobium leguminosarum</i> biovar <i>phaseoli</i> inoculadas en concentraciones equivalentes (1:1) con el mutante CP 163,000 (100%) est/esp (altamente competitivo e inefectivo)	77
2.- Efecto de la interacción entre la inoculación y la fertilización fosfatada en la capacidad competitiva de <i>Rhizobium</i> en frijol Bayo Zacatecas	112
3.- Efecto de la inoculación con <i>Rhizobium leguminosarum</i> biovar <i>phaseoli</i> y la fertilización nitrogenada y fosfatada en el peso seco de la parte aérea de frijol Bayo Zacatecas	114

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivos: 1) Evaluar 39 cepas efectivas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* por su capacidad competitiva frente a la cepa patrón CP 143,000, 12000 est/esp. la cual es altamente competitiva pero inefectiva, al inocular plantas de frijol Bayo Zacatecas en proporción 1:1 (cepa patrón: cepa problema) y 2) Estudiar el comportamiento en suelo no esterilizado de la mejor cepa seleccionada por su habilidad competitiva frente a cepas nativas de *Rhizobium* bajo diferentes dosis de fertilización nitrogenada (0, 20, 40, 60 y 80 ppa de N) y fosfatada (0 y 40 ppa de P). Ambos experimentos se llevaron a cabo bajo condiciones de invernadero con un diseño experimental completamente al azar. En el primer ensayo se utilizaron vasos de unicel con una capacidad de 1 Kg de tezontle fino estéril. En el segundo, se usaron macetas con capacidad de 4 Kg de suelo. Se encontró que 15 cepas forjaron más del 50% de los nódulos totales de la planta, siendo la CPHE135 la

única que logró desplazar completamente a la cepa patrón al forear el 100% de estos. Dichas cepas forearon la mayor cantidad de nódulos rojos (de 967 a 51.67 nódulos rojos por 2 plantas), esto se vio reflejado en los valores más altos de peso seco de la parte aérea (de 2.413 a 1.797 g por 2 plantas). Para el experimento en suelo se empleó la cepa CPHEX155₁₀₀₀kan (resistente a 1000 µg de kanamicina), que fue inoculada junto con la cepa CP163₁₀₀₀ant/esp en una proporción 1:1. Los resultados más sobresalientes se obtuvieron cuando se aplicaron 40 ppm de P + O ppm de N + la inoculación con ambos mutantes, en donde las cepas CPHEX155₁₀₀₀kan, patrón y nativas forearon el 48.96, 8.34 y 42.7% de los nódulos, respectivamente, en las plantas de frijol Bayo Zacatecas. La selección de cepas por su capacidad competitiva es una herramienta adicional que ayuda a determinar si una cepa puede ser recomendada como un buen inoculante; sin embargo, es necesario corroborar su comportamiento en suelo no esterilizado o en condiciones de campo.

INTRODUCCIÓN

La producción de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) actualmente no satisface las necesidades de la población mundial, esto es así marcado en los países del tercer mundo, entre ellos México. En nuestro país, la mayor parte de las áreas cultivadas con esta leguminosa se localizan en regiones que presentan precipitaciones escasas, y suelos con bajos contenidos de nitrógeno; así, ambos factores son considerados como los principales limitantes en el rendimiento de este cultivo.

La simbiosis *Rhizobium*-leguminosa es factible de utilizarse como una alternativa en la producción de frijol, para lograr aumentos en el rendimiento del cultivo. Así, debe llevarse a cabo la selección de cepas de *Rhizobium* para obtener un buen inoculante. Entre los criterios más importantes que se han tomado como base para este fin son: una alta capacidad de fijar nitrógeno (efectividad),

habilidad competitiva para la formación de los nódulos, la cual debe ser superior a la de las cepas nativas del suelo y la persistencia en el suelo, tanto en presencia como en ausencia de su hospedero, lo que implica que deben estar adaptadas a las condiciones bióticas y abióticas del suelo.

Se han introducido cepas de *Rhizobium* para comparar su habilidad competitiva en la formación de nódulos, ya que la competencia por los sitios de infección es una limitante en la mayoría de los casos en que se pretende aumentar el rendimiento del cultivo, debido a que el suelo contiene rizobias nativas altamente competitivas pero ineficientes.

Se han desarrollado diferentes técnicas para la identificación de cepas de *Rhizobium* que son introducidas en suelos que contienen rizobias nativas. Entre las más utilizadas se pueden mencionar las técnicas serológicas (aglutinación, inmunodifusión, inmunofluorescencia y el inmunoensayo enzimático ELISA) y las técnicas de resistencia a antibióticos (inducida e intrínseca).

El presente trabajo tuvo como objetivo seleccionar cepas de *Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli* (de efectividad y sobrevivencia probada) por su habilidad competitiva en la formación de nódulos, a nivel de invernadero.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Frijol Común (*Phaseolus vulgaris* L.).

El frijol común (*P. vulgaris* L.) es una leguminosa cultivada frecuentemente en la mayoría de las áreas agrícolas del mundo, siendo un producto alimenticio primario para la mayor parte de la población de los países del tercer mundo, especialmente los de América Latina (Bazan, 1975; Pinchinat, 1977); la producción de frijol en estas áreas es, por lo general, más baja que la producción potencial (FAO, 1980; Hernández-Bravo, 1973; Graham, 1978).

El frijol común, además, es un producto importante económicamente, por lo que está clasificado directamente después de la soya y el cacahuete en la producción de granos de leguminosas a nivel mundial (FAO, 1980).

En México, de los 10 primeros cultivos, el frijol ocupa el segundo lugar en superficie cultivada. En 1980, se

seabron un total de 1,763,347 ha, representando esta cantidad el 70% más que en 1977 (Banco de México, 1982). En tanto que en 1985, la superficie cultivada con frijol solo y asociado fue de 2,100,047 ha, de las cuales 1,950,638 ha se encuentran bajo condiciones de temporal (Dirección General de Política y Desarrollo Agropecuario y Forestal, 1986). Así, más de la mitad de esta superficie se encuentra en zonas áridas y semiáridas (precipitaciones escasas), además de que los suelos presentan bajos contenidos de nitrógeno, considerándoseles, por lo tanto, como los principales factores limitantes que influyen en el rendimiento de este cultivo, que es alrededor de 500 kg/ha (Almaraz, 1988).

Hábitos de Crecimiento.

En México se encuentran de 50 a 70 especies del género *Phaseolus*. Dentro de éstas, las más importantes son *Phaseolus vulgaris*, *P. coccineus*, *P. lunatus* y *P. acutifolius* (Hernández et al., 1979). Dichas especies están representadas por diferentes variedades que se han clasificado de acuerdo a su hábito de crecimiento, el cual se refiere a la presentación de la planta en el espacio como una consecuencia de su crecimiento, que a su vez es el resultado de la interacción entre caracteres internos más constantes (genotipos) y los factores externos que varían en

el tiempo y en el espacio (Kohachi-Shibata, 1990). El frijol común (*P. vulgaris* L.), con base en su hábito de crecimiento, se ha clasificado en cuatro grandes grupos (I, II, III (a, b y c) y IV), de los cuales, el primero presenta un hábito de crecimiento determinado, el segundo semideterminado y a los restantes se les ha clasificado como de hábito de crecimiento indeterminado (Soldrezano, 1982).

Rhizobium.

Las bacterias del género *Rhizobium* son bacilos Gram-negativos y no esporulantes, que miden de 0.5 a 0.9 micras de ancho y de 1.2 a 3.0 micras de largo. Los representantes de este género son típicamente móviles y utilizan algunos carbohidratos acumulados y a veces ácidos, pero nunca gases. Frecuentemente contienen gránulos de poly- β -hidroxibutirato, los cuales se refractan bajo el microscopio de contraste de fases. La temperatura óptima de crecimiento es de 25 a 30°C a pH que varía entre 6 y 7 (Somasagarani y Hoben, 1985).

Tiene la capacidad de colonizar los pelos radicales de las leguminosas y formar estructuras denominadas nódulos, en donde se lleva a cabo la transformación del nitrógeno atmosférico (N_2) en amonio (NH_4^+) por la acción de la enzima nitrogenasa. Por medio de esta asociación simbiótica se fija

la mayor cantidad de N_2 (Alexander, 1980; Jordan y Allen, 1975; López, 1982).

Selección de Cepas de *Rhizobium*.

La selección de cepas para su uso como inoculante en estudios a nivel de invernadero o de campo, así como para escala comercial, es de primordial importancia, ya que cada cepa de *Rhizobium* se comporta de diferente manera en un ambiente determinado. Se han propuesto algunos criterios (Date, 1976; Burton, 1979) que pueden ser útiles para llevar a cabo la selección de cepas:

(i) Deben formar nódulos capaces de fijar nitrógeno en la planta hospedero proporcionando de esta manera un suministro adecuado de nitrógeno.

(ii) Tienen que ser competitivas para la colonización de los pelos radicales y nodular en presencia de otras cepas de *Rhizobium* altamente infectivas (nativas o introducidas).

(iii) La nodulación debe presentarse en un amplio rango de temperatura bajo el cual la planta tiene un buen desarrollo.

(iv) La cepa de *Rhizobium* debe ser capaz de crecer bien en el medio de cultivo, en el medio de soporte seleccionado y en el suelo después de sembrada la semilla.

(v) La rizobia debe ser capaz de sobrevivir en el suelo

de una estación a otra.

Competencia de *Rhizobium*.

La competencia es el fenómeno en el cual un organismo es indirectamente perjudicial para otro, por tener demandas similares de los recursos del ambiente (Daubenaire, 1968). Dentro de una comunidad la competencia ocurre entre los individuos de la misma o de diferente especie, siempre que los mismos requerimientos empleados por las poblaciones estén disponibles en cantidades insuficientes para abastecer todas las demandas adecuadamente. La introducción de nuevas especies en una comunidad por el hombre u otro agente, por lo general es un fracaso, debido a que dichos organismos no pueden contrarrestar la habilidad competitiva de las especies naturales, las cuales se encuentran adaptadas a su medio. Sin embargo, en algunas ocasiones los nuevos organismos pueden establecerse como parte de la comunidad, aunque frecuentemente producen algunos cambios que pueden ser favorables para esa comunidad (Coating, 1956).

La competencia por los sitios de infección en las leguminosas es usualmente medida al comparar la habilidad de cepas de *Rhizobium* introducidas en la formación de nódulos en el hospedero respectivo. Esto implica que la competencia está limitada por los eventos que se presentan fuera del

microambiente y del huésped. Sin embargo, se sabe que el genoma de la rizobia contribuye sustancialmente en la competencia y que también los factores ecológicos afectan directamente a la rizobia y al crecimiento de la planta (Dowling y Broughton, 1986).

La mayoría de las semillas de leguminosas inoculadas son sembradas en suelos que contienen poblaciones establecidas de *Rhizobium*, en algunos casos se ha reportado que la cepa introducida induce la formación de la mayoría de los nódulos en el primer año, pero que desaparece progresivamente y es reemplazada por las rizobias nativas en años sucesivos (Dadeau y Brockwell, 1968; Boughley et al., 1976; Jensen van Rensburg y Strijdon, 1982).

Los suelos frecuentemente contienen rizobias que son altamente competitivas, más que aquellas que son introducidas como inoculante (Kremer y Peterson, 1983). Diatloff y Langford (1975) y Van der Merwe et al. (1974), usando cepas de *Rhizobium* que nodulan cacahuete (*Arachis hypogaea*), seleccionadas en presencia de poblaciones altas de rizobias nativas, fracasaron en su intento de incrementar la producción. Nelson et al. (1978) aplicaron inoculantes comerciales de soya (*Glycine max* L. Merr.), y no lograron aumentar la producción de semillas en suelos donde se cultivaba rutinariamente la soya. Estos resultados indican que las rizobias nativas pueden ser inefectivas en la

fijación del nitrógeno atmosférico (N_2) y presentar la característica de ser altamente competitivas (Kroemer y Peterson, 1983; Martensson et al., 1987). También Guar et al. (1974) reportaron un rendimiento bajo en cacahuete en la India, lo cual atribuyeron a la presencia de una población alta de rizobias inefectivas del grupo "compea" en el suelo. En general, no se ha logrado obtener aumento en el rendimiento del cacahuete, debido principalmente a la pobre habilidad competitiva de las rizobias introducidas con respecto a las nativas. A las rizobias nativas se les puede considerar como una barrera para la introducción exitosa de cepas que nodulan satisfactoriamente, por lo que se requiere de más conocimientos acerca de la naturaleza de la población nativa de *Rhizobium*, de los factores que afectan su distribución y dinámica, y de su papel en la competencia con las cepas introducidas, además de su persistencia en el suelo (Bromfield et al., 1986).

Un objetivo en la investigación de la inoculación es la selección de cepas altamente efectivas de rizobias para una leguminosa particular. Tales cepas deben ser capaces de establecerse en la rizosfera y competir satisfactoriamente por los sitios de infección con las rizobias nativas del suelo, las cuales también incluyen cepas inefectivas y altamente competitivas (Hay y Bohlool, 1983). De ahí que la competencia entre cepas de *Rhizobium* por la nodulación de su

hospedero sea un aspecto muy importante en la ecología de las bacterias que forman los nódulos en la raíz. Esto puede ser también de gran interés agronómico, sobre todo en regiones donde la inoculación con cepas altamente efectivas no produce aumentos en el rendimiento del cultivo (Ham et al., 1971; Kvien et al., 1981). La inoculación en suelos que contienen poblaciones de rizobias nativas no ha dado resultados satisfactorios en la mayoría de los casos, es decir, la cepa introducida sólo ha formado una proporción muy pequeña de los nódulos (Roughley et al., 1976; Vincent, 1975), por lo que se hace necesario seleccionar cepas de *Rhizobium* tomando como criterio la capacidad competitiva (Broefield et al., 1983). La cepa introducida, además de competir con otras rizobias por los sitios de infección y por el sustrato, debe también competir con otros organismos del suelo (Vidór, 1981).

Por otra parte, una de las propiedades considerada como esencial para que una cepa de *Rhizobium* sea utilizada como inóculo es la capacidad de persistir en el suelo, tanto en presencia como en ausencia del hospedero. Es bien conocido que, en el suelo las cepas introducidas están sujetas a los efectos de numerosos factores bióticos y abióticos, que pueden actuar como una presión selectiva induciendo cambios genéticos en la población modificando la efectividad simbiótica (Jensen van Rensburg y Strijdom,

1965; Bushby, 1962; Diatloff, 1977). Un problema adicional común para las cepas introducidas es que, por lo general, en el suelo suecan (Miller, 1979), ya que es difícil para estas nuevas poblaciones adaptarse a las condiciones adversas del suelo (Wolkowski y Kelling, 1984).

Graham (1981) menciona que *R. l. biovar phaseoli* se encuentra ampliamente distribuida en los suelos, por lo que el problema de la competencia es muy importante en la mayoría de las regiones productoras de frijol en todo el mundo. Así, la competencia por los sitios de infección es muy común en México, en donde las plantas no inoculadas en campo producen entre 145 y 278 nódulos/planta. Debido a que existen pocos trabajos relacionados con la competencia por los sitios de infección, son necesarios más estudios que coadyuven al conocimiento de las poblaciones de *R. l. biovar phaseoli* en los suelos de la mayoría de las regiones que producen frijol, para determinar la frecuencia del fracaso de la inoculación en suelos con grandes poblaciones naturales de *R. l. biovar phaseoli*, y para identificar cepas eficientes y competitivas, susceptibles de ser empleados en los inoculantes.

Métodos de Identificación Empleados en Estudios de Competencia.

La identificación de las cepas de *Rhizobium* que ocupan los nódulos, es obligada en estudios que tienen por objeto evaluar la competitividad y el efecto de cepas específicas sobre el desarrollo de leguminosas (Kremer y Peterson, 1982). Los métodos más comúnmente empleados en estudios relacionados con la competencia son de resistencia a antibióticos ("inducida" e intrínseca) y los serológicos (aglutinación, inmunodifusión, inmunofluorescencia y ELISA).

I. Resistencia a Antibióticos "Inducida".

La resistencia a antibióticos "inducida" se logra al someter a las bacterias a diferentes concentraciones de antibióticos hasta obtener mutantes espontáneos con un alto grado de resistencia (Bushby, 1982; Kuykendall, 1987). La resistencia se debe a la aparición de mutaciones espontáneas, en condiciones normales una de cada 10^8 bacterias muta y se convierte en resistente a un antibiótico; la acción de 2 antibióticos provoca que sólo una bacteria de un billón muta y sea resistente (Anabile, 1988). Actualmente se sabe que en las cepas resistentes, además de existir una pequeña cantidad de mutantes, la mayor

parte de los organismos adquieren la información genética adicional de resistencia a antibióticos por medio de moléculas de ADN extracromosomal denominadas plásmidos.

El término "inducir" se refiere a que no es el antibiótico el que convierte a una cepa resistente, sino que actúa como una presión selectiva que hace que se expresen los mutantes espontáneos.

Es importante verificar la estabilidad de la cepa de *Rhizobium* cuando se le induce resistencia a uno o más antibióticos, así como su infectividad y efectividad (Buckby, 1982).

El empleo de las cepas de *Rhizobium* resistentes a altos niveles de antibióticos para llevar a cabo estudios sobre ecología de *Rhizobium* fue propuesta por Obalon (1971) y usada por Danse et al. (1973), Brockwell et al. (1977) y Kuykendall y Weber (1978). El método para el conteo de cepas resistentes tiene la ventaja de la alta selectividad al medio con antibiótico. Además, la detección de cepas resistentes en los nódulos, comprende las técnicas de nódulos triturados y estrizados, introducidas por Fred y Waksman (1928), excepto que los antibióticos selectivos son incluidos en el medio de cultivo. La más obvia aplicación de la técnica de mutantes resistentes a antibióticos se da en los estudios de sobrevivencia, colonización y competitividad, que son procesos asociados con la

introducción de cepas al suelo (Cooper, 1979).

Jones y Bronfield (1978) estudiaron la efectividad simbiótica y la habilidad competitiva de mutantes de *Rhizobium trifolii* resistentes a estreptomocina y espectinomicina, en adición al uso de la técnica de anticuerpos fluorescentes y la absorción óptica del rojo congo por una cepa inefectiva sobre medio sólido. Los mutantes resistentes a estreptomocina (str) y a espectinomicina (spc), doblemente marcados, simbióticamente efectivos, fueron obtenidos de 3 cepas efectivas de *R. trifolii*: 52, A₁₃1111 y 7A. Los mutantes fueron marcados en la secuencia spc/str o str/spc, siendo resistentes cada uno a 125/125 mg ml⁻¹ de spc/str o str/spc. La inoculación se lleve a cabo con una mezcla que contenía la cepa progenitora y/o mutante y una cepa inefectiva (Coryn), la cual fue incluida como un factor competitivo en una relación de 10:1 en favor de esta última. Los resultados obtenidos indicaron que todos los mutantes fueron menos efectivos simbióticamente que sus cepas progenitoras, aunque solamente dos mutantes, A₁₃1111 spc/str y 7A str/spc difirieron significativamente (P >0.01). Los mutantes fueron también menos competitivos en términos de formación de nódulos.

Bronfield y Jones (1980) llevaron a cabo una investigación sobre la doble ocupación de cepas en los nódulos y sobre la habilidad competitiva de dos cepas de

Rhizobium trifolii, 7A Str^r y 32 Spc^r, en variedades de trébol rojo y blanco cultivados en agar y suelo que contenía cepas nativas del trébol. La cepa 32 Spc^r resultó ser más competitiva por lo sitios de infección que la cepa 7A Str^r, tanto en suelo como en agar. Además observaron que las cepas residentes fueron altamente competitivas para la ocupación de los nódulos. También encontraron que al aumentar la densidad del inóculo incrementaba la proporción de nódulos ocupados por las cepas introducidas. No se presentó la doble ocupación.

Amerger (1961a) obtuvo mutantes inefectivos de 4 cepas efectivas de *Rhizobium serratii* resistentes a 50 µg/ml de neomicina, los cuales fueron probados por su capacidad competitiva respecto a sus cepas parentales efectivas o con otros mutantes resistentes a 500 µg/ml de estreptomicina, 200 µg/ml de kanamicina y 100 µg/ml de vancicina, en la formación de nódulos en *Medicago sativa*. En 5 de 6 casos estudiados, los mutantes inefectivos no difirieron de las cepas efectivas en su habilidad competitiva. Se observó una diferencia de selección para la infección por el hospedero entre cepas igualmente efectivas así como entre mutantes inefectivas. A excepción de un par de cepas, las cepas efectivas más competitivas dieron origen a los mutantes inefectivos, más competitivos. Por último, la competitividad fue independiente de la efectividad, y fue retenida durante

la mutación.

Amarger (1981a) estableció que el peso seco de la parte aérea de alfalfa (*Medicago sativa*) inoculada con cepas efectivas de *Rhizobium meliloti* en una mezcla con una cepa inefectiva en diferentes relaciones fue directamente proporcional al logaritmo del número de nódulos efectivos. Consecuentemente, la comparación entre el peso seco de la parte aérea de las plantas inoculadas con la mezcla de las cepas efectivas e inefectivas con el de las plantas inoculadas con la cepa efectiva permitió la estimación de la competitividad relativa de las cepas efectivas. También evaluó la competitividad de 14 cepas de *R. leguminosarum* resistentes a antibióticos (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de estreptomicina, 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de kanamicina y 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de espectinomicina) con la misma finalidad, comparando además la habilidad de dichas cepas para formar nódulos cuando se inocularon en semillas de *Vicia faba* en un experimento en un suelo con cepas nativas de *R. leguminosarum*. El porcentaje de recuperación de las cepas inoculadas de los nódulos de haba fue correlacionado positivamente con la competitividad de las cepas con la obtenida en condiciones controladas. Esta simple ruta para la evaluación de la competitividad en la formación de los nódulos de cepas de rizobias indicó que su conducta competitiva con rizobias nativas en el campo podría ser útil para evaluar un gran número de cepas por

competitividad.

Jensen van Rensburg y Strijdom (1982) consideraron 24 cepas de *Rhizobium meliloti* para la producción de inoculantes, las cuales fueron agrupadas en pares y probadas por su habilidad para competir en la nodulación de *Medicago sativa*, *M. truncatula* y *M. littoralis*. Al principio, cada par de cepas que estuvo forzada por un tipo silvestre y una mutante seleccionada resistente a estreptomicina de otra cepa, fueron probadas en suelo estéril (libre de rizobias) y posteriormente en un experimento de campo en un suelo que contenía cepas nativas. Los resultados indicaron que no todas las cepas identificadas como buenos competidores sobre una o más especies de *Medicago* en el suelo estéril, fueron capaces de nodular estas plantas satisfactoriamente en un suelo con poblaciones establecidas de *R. meliloti*.

Mathieu (1982) evaluó la colonización y nodulación de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) usando cepas de *Rhizobium phaseoli* resistentes a estreptomicina, las cuales mostraron diferencias en su habilidad para nodular la planta hospedera. Además, reportó que una colonización de la raíz por *Rhizobium* durante los primeros días del desarrollo de la planta conduce a una mayor nodulación.

Espinosa-Victoria et al. (1985) llevó a cabo un experimento en condiciones de invernadero con el fin de determinar la sobrevivencia y competitividad de dos mutantes

de *Rhizobium phaseoli* resistentes a antibióticos (CPMEX 1a:150 y CPMEX 22:epc200) cuando el hospedero fue sometido a condiciones restrictas de humedad. Uso tres genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.): Negro 150G3, Michoacán 12-A-3 y Bayo Durango (con hábitos de crecimiento IV, II y III, respectivamente) los dos primeros considerados como genotipos resistentes a sequia. Sus resultados indicaron que los potenciales de agua (Ψ_w) del suelo menores de -15 barías, redujeron el número de mutantes de *R. phaseoli* viables, presentándose siempre una caída drástica durante el estado vegetativo y una posterior disminución paulatina a lo largo de la floración y llenado de vaina. En general, el rango de abatimiento de las poblaciones de mutantes introducidos fue del orden de 2 a 5 unidades logarítmicas. Los porcentajes de nodulación bajo sequia dados por las cepas introducidas fueron altos, medios y bajos en los estados vegetativos, floración y llenado de vaina, respectivamente, en los tres genotipos de frijol.

Turco et al. (1986) probaron la eficiencia en la fijación de nitrógeno y la habilidad competitiva de 13 cepas de *Rhizobium leguminosarum* resistentes a dos antibióticos. Sus resultados indicaron que el 93% de los mutantes fueron menos competitivos en la formación de los nódulos, que sus progenitores. Además, el 38% de las cepas de *R. leguminosarum* presentaron una reducción en la eficiencia en

la fijación de nitrógeno cuando se les comparó con sus progenitores.

Ramos et al. (1987) realizaron un ensayo con una cepa de *Rhizobium phaseoli* con el fin de determinar su tolerancia al encalado, acidez y a 7 antibióticos. Las plantas fueron inoculadas con una cepa aislada después de 2 años de haber sido introducida en condiciones de campo (5 cultivos sucesivos de frijol, en donde fue inoculado sólo el primer cultivo). La cepa aislada CDS presentó propiedades similares a la cepa original (inoculada) en su tolerancia a la acidez y resistencia a los 7 antibióticos. Sin embargo, el aislamiento del suelo no encalado fue más tolerante a la acidez y de baja tolerancia a kanamicina y clorafenicol. Además, encontraron algunas diferencias macroscópicas en las colonias que provenían del suelo encalado y no encalado. También indican que en ocasiones la alta resistencia a antibióticos puede ser producida por el sometimiento de la cepa de *Rhizobium* a altas concentraciones de metales pesados o suelos salinos.

Almaraz (1988) realizó una investigación con la finalidad de estudiar la efectividad en la fijación de nitrógeno, la sobrevivencia a sequía de cepas de *Rhizobium phaseoli* resistente a espectinomicina y estreptomicina, así como las relaciones de competencia que se establecen por los sitios de infección entre humedad-población de

rizobias-fijación de nitrógeno, cuando una parte del sistema radical de *Phaseolus vulgaris* es sometido a ciclos de sequía. Encontró que 31 de 87 cepas fueron las más eficientes en fijar nitrógeno. En relación a la capacidad competitiva, observó que en riego y en sequía cíclica, la mayor parte de los nódulos fueron formados por las cepas nativas del suelo, ya que sólo el 20 y 18% correspondió a la cepa introducida, respectivamente.

III. Resistencia Intrínseca a Antibióticos.

La resistencia intrínseca a antibióticos (RIA) se refiere a la resistencia natural que poseen las bacterias a determinados antibióticos, de ahí que se haya utilizado esta característica para realizar estudios ecológicos. Esta resistencia se atribuye a la existencia de microorganismos que producen antibióticos en el suelo (Eaglesham, 1987). En un principio se demostró que existía una gran heterogeneidad en los patrones de resistencia intrínseca a antibióticos entre cepas de *R. leguminosarum*, *R. phaseoli*, *R. meliloti* y en *Rhizobium* del grupo *coepae*, utilizándose esta técnica en estudios de competencia en *R. meliloti* y en ensayos de eficiencia nodular en cepas de *R. phaseoli*, *R. leguminosarum*, *Rhizobium* spp. y *Rhizobium* del cacahuate (*Arachis hypogaea*). Sin embargo, el método ha sido

questionado sobre todo por la variabilidad en los patrones de resistencia a antibióticos encontrados dentro de *Rhizobium* de *Lotononis*, *Rhizobium* de *Cicer*, *R. phaseoli* y *R. trifolii* (Kremer y Peterson, 1982; Stein et al. 1982; Chawey y Hall, 1986).

Bromfield et al. (1982) describieron una modificación de la técnica de resistencia a antibióticos (RIA), la cual involucra el uso de una placa de gradientes de concentraciones de antibióticos, que permitió la identificación de varios cultivos de *Rhizobium phaseoli* y *Rhizobium* spp. (aisladas de *Cicer arctivum*). Dos de los cultivos que exhibieron patrones similares fueron considerados como la misma cepa obtenida de diferentes aislamientos. Este método, sin embargo, fue menos susceptible para la caracterización de cultivos de *Rhizobium* spp. de lento crecimiento, ya que en varios antibióticos se produjo crecimiento, no obteniéndose una diferencia definida entre resistencia y susceptibilidad. Aunque 15 de 16 cultivos de *Rhizobium* spp. fueron distinguidos sólo por la diferencia en un antibiótico.

Kremer y Peterson (1982) usaron la técnica de resistencia intrínseca a antibióticos y la susceptibilidad a diferentes niveles de antibióticos para la determinación de cepas de rápido y lento crecimiento. Dichos patrones fueron útiles en la identificación de cepas de *Rhizobium* en

suspensiones de nódulos o en nódulos. También encontraron otros patrones de resistencia, durante la identificación de los aislados de cepas nativas, estos patrones pudieron ser resultado de resistencia adquirida para ciertos antibióticos o de la doble ocupación de cepas por nódulo. Concluyeron que la presencia de patrones de resistencia idénticos entre cepas introducidas y nativas estaba relacionado directamente con el tamaño de la población de rizobias del suelo.

Stein et al. (1982) usaron la técnica de resistencia intrínseca a antibióticos (RIA) para estudios de competencia entre 6 cepas de *Rhizobium phaseoli*, en un suelo deficiente en rizobias nativas de esta especie; establecieron que existió un mayor número de patrones de resistencia intrínseca a antibióticos que los de las 6 cepas introducidas originalmente, de manera constante. Además, reportaron que el método es poco satisfactorio para la identificación de cepas de *R. phaseoli* y cepas aisladas de *Cicer arietinum* (*Rhizobium* spp.).

Sadowsky et al. (1987) examinaron la diversidad genética de 20 cepas de *Bradyrhizobium japonicum* del serogrupo 123 aislados en el campo mediante las técnicas de digestión con endonucleasa de restricción, electroforesis unidimensional en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio de proteínas totales de células, análisis de hibridación austral de los genes «nif» y «nod» y con

patrones de resistencia intrínseca a antibióticos. Todos los aislados fueron separados previamente en 3 clases amplias de nodulación (baja, media y alta) con base en su habilidad para formar simbiosis con genotipos de soya específicos. Los resultados de su estudio indicaron que existe una relación entre estas 3 clases de nodulación de genotipos específicos y los grupos que se han formado con base en sus patrones genómicos de ADN, perfiles de proteínas en PAGE-SDS y la hibridización austral de una prueba del gen «nifHD». Los patrones de resistencia intrínseca a antibióticos y la hibridización del gen «nodAB» no fueron útiles en la determinación de la interrelación entre los aislados y las clases de nodulación.

III. Serología.

La serología es una parte de la Bioquímica que se encarga del estudio de las reacciones antígeno-anticuerpo. La serología de *Rhizobium* ha sido útil en la elucidación de las relaciones taxonómicas entre especies y en su identificación rápida, cuando se aislan de los nódulos (Dazzo y Hubbell, 1975). En general, se ha considerado que las técnicas serológicas son confiables en la identificación de *Rhizobium*; sin embargo, Espinosa-Victoria (1989) reportó que con la técnica de aglutinación se ponen de manifiesto

una gran cantidad de reacciones cruzadas en *R. l. biovar phaseoli*, lo que indica la existencia de un alto número de antígenos compartidos entre las cepas de esta especie.

La mayoría de los estudios ecológicos ha utilizado pruebas de aglutinación, inmunodifusión e inmunofluorescencia, no obstante la introducción de la técnica de ELISA (ensayo inmunoenzimático) para el estudio de *Rhizobium* (Kishinevsky y Bar-Joseph, 1978) de nódulos de *Arachis hypogaea* ha dado mejores resultados al ser más sensitiva (4 a 6 veces más) en comparación con las pruebas de aglutinación e inmunodifusión. Sin embargo, Olsen et al. (1983) mencionan la presencia de reacciones cruzadas entre las diferentes especies de *Rhizobium* debido a la utilización de anticuerpos policlonales, de ahí que estas técnicas no sean del todo confiables. De igual forma, Espinosa-Victoria et al. (1989) encontraron que la técnica convencional de ELISA, usando anticuerpos policlonales, no es recomendable para la identificación de *R. l. biovar phaseoli*, ya que las cepas comparten en menor o mayor frecuencia un alto número de antígenos con PH entre 10 y 167 Kd. Por lo que no detectaron bandas antigénicas con características deseables, es decir, especificidad por cepa y alta concentración que se tomaran como base para identificar una cepa de otra. Finalmente, recomiendan para fines de identificación el uso de técnicas alternativas tales como la inclusión de

anticuerpos monoclonales en ELISA y sondas de ADN complementario (cADN).

Las mayores limitaciones de estos métodos serológicos son el tiempo y los recursos involucrados en la producción de los antisueros específicos, la falta de propiedades antigénicas estables, y los antígenos no específicos compartidos que presentan reacción cruzada durante el análisis (Kremer y Peterson, 1982; Espinosa-Victoria et al., 1989).

A). Aglutinación.

La reacción de aglutinación se basa en la agregación de células bacterianas o partículas de antígenos como resultado de la unión de sus superficies con las moléculas del anticuerpo debido a que la superficie de la célula bacteriana es portadora de antígenos que pueden reconocerse por su capacidad para producir anticuerpos en un animal de sangre caliente. Por lo que, los anticuerpos producidos pueden emplearse para determinar la presencia o ausencia de antígenos específicos en una suspensión de la misma bacteria o de otra. La reacción de aglutinación puede llevarse a cabo en: portaobjetos, tubos de ensayo y en placa de microtitulación (Vincent, 1975; Espinosa-Victoria, no publicado).

La prueba de aglutinación es una de las técnicas serológicas usadas más extensivamente en la determinación de las rizobias de los nódulos; los problemas se presentan cuando se trata de identificar rizobias introducidas en los nódulos de las plantas que se desarrollan en suelos que contienen rizobias nativas del mismo serogrupo. En estos casos la técnica de aglutinación puede menospreciar la proporción de los nódulos forados por las cepas introducidas (Kuykendall y Weber, 1978).

Weaver y Frederick (1974a) estudiaron la competencia entre rizobias introducidas y nativas del suelo que forsan nódulos en soya (*Glycine max* (L.) Merr.), determinando el efecto de la población rizobial del suelo, de la cepa inculada y del tamaño del inóculo sobre la nodulación bajo condiciones controladas (invernadero), en 22 distintos suelos que contenían poblaciones de *Rhizobium japonicum* en un rango de un millón a menos de dos millones por gramo de suelo. Encontraron que al incrementar la proporción del inóculo, aumentaba la cantidad de nódulos ocupados por la cepa inculada, lo que indicó que la competencia por la nodulación de la cepa introducida aumentó cuando el número de células bacterianas en el inóculo fue mayor. Utilizaron la técnica de microaglutinación para la identificación de los nódulos.

Weaver y Frederick (1974b) para poder proporcionar una

base científica para pronosticar la nodulación competitiva exitosa en soya por *Rhizobium japonicum*, determinaron en estudios de campo las relaciones cuantitativas entre las rizobias del suelo y las cepas introducidas en la formación de los nódulos. El experimento se llevó a cabo en 6 diferentes suelos que contenían una población de rizobias de $1.2 \cdot 10^4$ a $2.3 \cdot 10^5$ g de suelo⁻¹. Sus resultados indicaron que para poder predecir si las rizobias inoculadas forman el 50% o más de los nódulos, debe ser usada una proporción del inóculo de por lo menos 1000 veces el de la población del suelo (por gramo de suelo). La técnica de microtitulación fue empleada para identificar a las cepas.

Boonkerd et al. (1978) realizaron un estudio con la finalidad de comparar dos métodos de inoculación en soya, con tres cepas de *Rhizobium japonicum* de competitividad variable clasificadas en distinto serogrupo. El experimento lo llevaron a cabo bajo condiciones de campo, con el objetivo principal de determinar si las cepas aplicadas podrían competir con las rizobias nativas, por los sitios de infección y aumentar la fijación de nitrógeno. Utilizando la técnica de aglutinación en tubo para la identificación de las cepas de *R. japonicum*. Los resultados mostraron que los métodos de inoculación, la proporción de células bacterianas en el inóculo y la cepa introducida no presentaron ningún efecto sobre la nodulación o el crecimiento de la planta de

soya.

B1. Inmunodifusión.

Es una técnica que nos permite comparar directamente los antígenos, ya que se lleva a cabo en placas de agarosa y/o agar, en donde se realizan perforaciones circulares, una en el centro, donde se coloca el anticuerpo y ó alrededor, en donde van los antígenos que se desean comparar. Por lo tanto, los antígenos solubles de la suspensión bacteriana y los anticuerpos del antisuero se difunden en el gel de agarosa y/o agar y en los lugares donde se encuentran en concentraciones óptimas, precipitan en forma de líneas o bandas, formándose una banda de precipitina por cada antígeno (Vincent, 1975; Espinosa-Victoria, no publicado).

La técnica serológica de inmunodifusión ha sido utilizada en algunos estudios de campo y ha mostrado ser más exacta que la prueba de aglutinación en la identificación de cepas de *Rhizobium* (Kramer y Peterson, 1982).

Dazzo y Hubbell (1975) emplearon la técnica de inmunodifusión y la de inmunoelectroforesis para la identificación de cepas de *Rhizobium trifolii* con el fin de observar diferencias antigénicas entre cepas infectivas y no infectivas. Sus resultados indicaron la presencia de antígenos solubles en preparaciones zonizadas de 4 cepas

infectivas, los cuales no se encontraron en preparaciones similares de sustratos no infectivos relacionados (derivados de las cepas infectivas).

Jansen van Rensburg y Strijdom (1985) tuvieron como propósito comparar la efectividad de cepas introducidas en el suelo y después aisladas a cabo de 4 a 8 años, con cultivos de las mismas cepas que fueron mantenidos en forma liofilizada. Para la identificación de las cepas hicieron uso de la técnica de inmunodifusión. Sus resultados indicaron que la efectividad de las cepas no fue diferente.

Ramos y Boddey (1987) investigaron el efecto del encalado y una cubierta de paja y estiércol sobre la nodulación y el rendimiento de la planta, y la competitividad por la ocupación de los nódulos por una cepa introducida de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. El terreno fue cultivado 5 veces durante un periodo de 2 años; en el primer cultivo, las semillas fueron inoculadas con la cepa COS (como soporte usaron turba); en los cultivos subsiguientes las semillas fueron inoculadas con nódulos macerados tomados de la planta de la cosecha previa del mismo tratamiento. En el cultivo final, el terreno fue subdividido e inoculado de la siguiente manera; con la cepa original COS; con la cepa COS aclimatada (aislada de la cuarta cosecha e identificada como COS, usando inmunodifusión) o con nódulos macerados tomados de la planta

de la cosecha previa del mismo tratamiento. A lo largo del experimento no hubo efectos significativos con ningún inóculo sobre la nodulación y el rendimiento de la planta del frijol. Esto se debió posiblemente a la baja competitividad de la cepa introducida, la cual ocupó un máximo del 31% de los nódulos en el terreno no encalado y menos del 19% en el terreno encalado. En la cosecha final, la cepa COS fue identificada haciendo uso de la técnica de inmunodifusión, ocupando un máximo del 24% de los nódulos en el terreno sin cubierta de paja y estiércol, y una proporción más baja (0-2%) en el terreno encalado. La cepa aclimatada mostró una tendencia consistente (estadísticamente significativa) para ser más competitiva por los sitios de nodulación que la cepa COS original.

C). Inmunofluorescencia y Ensayo Inmunoenzimático (ELISA [Enzyme-Linked Immunosorbent Assay]).

La técnica de inmunofluorescencia es la que nos permite determinar los antígenos sobre células individuales, lo que hace posible estudios serológicos de bacterias de nódulos de tamaño muy pequeño (disecados), y llevar a cabo estudios autoecológicos *in situ* de microorganismos del suelo. Las moléculas del anticuerpo son covalentemente etiquetadas con un compuesto fluorescente, de tal forma que

su presencia, en cualquier sitio en el cual se acoplen, pueda ser detectada con un microscopio equipado con luz ultravioleta. Esta se puede llevar a cabo de dos maneras: directa e indirecta. En la forma directa, los anticuerpos antibacterianos son etiquetados, por lo que es necesario tener anticuerpos fluorescentes para cada cepa de *Rhizobium* que se va a estudiar. En tanto que en la forma indirecta, se usa un segundo antisuero preparado en un animal diferente al que es usado para la preparación de los anticuerpos bacterianos; a este segundo antisuero se le marca con el compuesto fluorescente (Vincent, 1975; Espinosa-Victoria, no publicado).

La técnica de anticuerpos fluorescentes (AF) permite la identificación y enumeración de cepas específicas de *Rhizobium* directamente en el ambiente, además de ser única para el estudio de cambios poblacionales de *Rhizobium phaseoli* en el suelo y en la rizosfera (Robert y Schmidt, 1983). También ha hecho posible el examen de las interacciones competitivas de cepas introducidas y las nativas, en la rizosfera del hospedero antes de la nodulación, además de ser útil en estudios autecológicos de serogrupos individuales de *Rhizobium japonicum* directamente en suelo y en rizosfera natural (Moamad et al., 1984).

El ensayo inmunoenzimático (ELISA) es la técnica que ha permitido detectar la unión de cantidades mínimas de

anticuerpos con cantidades extraordinariamente pequeñas de antígenos, debido a la formación de coloración a partir de sustratos incoloros por la acción de una enzima conjugada con el anticuerpo, que es uno de los pasos de la técnica más tardado y un poco complicado, aunque estos anticuerpos conjugados ya se pueden obtener comercialmente. También puede ser directa o indirecta, la primera, es cuando la enzima se acopla con el anticuerpo que reacciona directamente con el antígeno y en la otra cuando se acopla con un segundo anticuerpo capaz de reaccionar con el anticuerpo mencionado primeramente (Espínosa-Victoria, no publicado).

La técnica de ELISA presenta la desventaja de que siempre que se trabaja con anticuerpos policlonales se presentan reacciones cruzadas. Aunque puede ser factible su utilización con ciertas restricciones. Olsen et al. (1983) sugieren el uso de antisueros absorbidos, los cuales sirven para identificar cepas de *Rhizobium* que formen parte del grupo de cepas en donde se haya llevado a cabo las absorciones masivas. Pero existe el riesgo de que con los antisueros absorbidos se obtengan reacciones cruzadas o que no muestren reactividad, como consecuencia de la pérdida de los anticuerpos útiles para la identificación durante las absorciones masivas (Olsen y Rice, 1984). Además, dichos antisueros absorbidos sólo se pueden usar para identificar

exitosamente a sus antígenos respectivos bajo condiciones que garanticen la inexistencia de cepas nativas, evitando de esta manera la presencia de las reacciones cruzadas. Esto último, indica que el sustrato o soporte que se use debe ser estéril.

Ambas técnicas se consideran como métodos serológicos útiles en la identificación de cepas específicas de *Rhizobium* (Kremer y Peterson, 1982). Sin embargo, a pesar de haber sido ampliamente usadas, han sido apropiadas solamente para la identificación de un número limitado de cepas (Bromfield et al., 1982; Stein et al., 1982).

Berger et al. (1979) describieron un método colorimétrico para la identificación de cepas de *Rhizobium* en cultivos puros y en nódulos de lenteja, basado en un ensayo indirecto de ELISA, que puede usarse en células de nódulos frescos y congelados, obtenidos de plantas desarrolladas en cámaras de crecimiento o en el campo. Los resultados fueron confirmados con la técnica de inmunofluorescencia. Además, puede usarse en estudios de campo y requiere menos antisuero que las otras técnicas serológicas.

Kosslack et al. (1983) usaron inoculación retardada con cepas específicas para poder señalar con mayor precisión el periodo en el proceso de nodulación más crítico en la competencia entre cepas. Sus resultados indicaron que las

raíces que fueron preexpuestas a cepas de *Rhizobium leguminosarum*, pobremente competitivas, produjeron un aumento significativo en la ocupación de los nódulos. Las cepas fueron identificadas por inmunofluorescencia con anticuerpos fluorescentes específicos para las cepas.

May y Bohicool (1983) analizaron la habilidad competitiva de cepas efectivas de *Rhizobium leguminosarum* para la nodulación de las raíces de lenteja (*Lens esculenta*). Evaluaron la competitividad en ausencia de factores bióticos y abióticos, y bajo condiciones de campo, en dos suelos con propiedades diferentes. La técnica de anticuerpos fluorescentes fue usada para la identificación de las cepas en los nódulos. Los anticuerpos fluorescentes preparados contra tres cepas más eficientes (Hawaii 5-0, Nitragin 92A3 y Nitragin 128A12) exhibieron un alto grado de especificidad; los anticuerpos reaccionaron fuertemente con sus rizobias homólogas en cultivos y en bacteroides de los nódulos. No presentaron reacción cruzada con ningún otro. En los estudios de competencia en cámaras de crecimiento, siempre que la cepa Nitragin 92A3 fue incluida en la mezcla del inóculo, ocupó consistentemente la mayoría de los nódulos en los cuatro cultivos usados (aunque no siempre significativamente ($P=0.05$)). Sin embargo, de manera aparente se presentó alguna interacción de la cepa X en el cultivo. La cepa Hawaii 5-0 fue de competitividad igual ($P=0.05$) que

la Nitragin 92A3 en tres de las cuatro variedades de soya (Comercial, Tekoa y Benwah), pero inferior ($P=0.01$) en la variedad Chilean. La cepa Nitragin 92A3 fue dominada completamente ($P=0.01$) por la cepa Nitragin 128A12 en todos los cultivos. La cepa Hawaii 5-0 fue de competitividad igual ($P=0.05$) que la cepa Nitragin 128A12 en la variedad Chilean, y más competitiva ($P=0.01$) en la variedad Comercial, y menos que sobre las otras dos variedades. En el experimento de campo, la cepa Hawaii 5-0 fue de igual competitividad ($P=0.01$) que la cepa Nitragin 92A3 en el suelo Inceptisol, y superior ($P=0.05$) en el suelo Oxisol.

Robert y Schmidt (1983) investigaron el impacto de la rizosfera de la leguminosa sobre el desarrollo de una cepa introducida y las cepas residentes de *Rhizobium phaseoli* durante la estación de crecimiento, además de la persistencia de la cepa inculada, así como de su habilidad competitiva con respecto a la población nativa para ocupar los nódulos. Las cepas fueron identificadas por medio de la técnica de anticuerpos fluorescentes de cepas específicas reportaron que la cepa introducida (Viking 1) fue la que ocupó virtualmente el 100% de los nódulos en todos los experimentos, por lo que es un excelente competidor.

Mowad y Bohlool (1984) evaluaron la habilidad competitiva de 6 cepas de rizobias de *Leucaena*, aplicadas como inóculo simple o una mezcla, en dos suelos tropicales

que contenían rizobias nativas que nodulan a *Leucaena*. Para su identificación fueron empleados anticuerpos fluorescentes de cepas específicas. Ninguna de las cepas en inóculo simple o multicepa fue capaz de vencer completamente las rizobias nativas, las cuales formaron de 4 a 70% del total de nódulos en el suelo Oxisol y de 12 a 72% en el suelo Molisol.

Maowad et al. (1984) estudiaron la respuesta rizosférica como un factor que influye en la competencia entre serogrupos nativos de *Rhizobium japonicum*, para la nodulación de soya en condiciones de campo. Siguieron la dinámica de la población del serogrupo 123 y dos serogrupos más que compitieron con él dentro de la misma rizosfera, por lo que examinaron las relaciones competitivas entre los tres serogrupos en el suelo y en la rizosfera, durante dos estaciones de crecimiento con varios cultivos del hospedero, con y sin inoculación, y en leguminosa y no leguminosa. El conteo de cada uno de los competidores fue llevado a cabo en suelo rizosférico por inmunofluorescencia. Observaron que la población de cada serogrupo incrementó gradualmente en la rizosfera del hospedero, no excediendo 10^6 células/g de suelo rizosférico durante las primeras semanas después de la siembra, mientras que en el suelo persistieron en el nivel inicial (10^4 a 10^5 células/g de suelo⁻¹). Por lo que el efecto rizosférico fue menor durante este periodo del inicio de la nodulación siendo casi el mismo para los tres

serogrupos. Aunque el serogrupo que dominó en la formación de los nódulos fue el 123, el cual ocupó desde el 60 hasta el 100% del total de los nódulos.

Martensson y Gustafsson (1985) presentan una modificación de la prueba de ELISA, además de la ya reportada por Martensson et al. (1984) para la identificación de *Rhizobium trifolii* en un estudio de competencia llevado a cabo en tres diferentes ambientes: rizosfera, suelo y medio líquido. Investigaron a las cepas obtenidas de nódulos que fueron formados por una mezcla de cepas de composición relativamente diferente, además de incluir un estudio de la doble ocupación de los nódulos (dos cepas por nódulo). La cepa 7612 compitió satisfactoriamente con la cepa 285 en suelo, pero la cepa 285 dominó cuando se desarrolló con la cepa 7612 en medio líquido en un fermentador. No se presentó la doble ocupación de los nódulos.

Cregan y Keyser (1986) investigaron el papel de la planta hospedera como factor de restricción de la nodulación por un serogrupo nativo, permitiendo de este modo la nodulación por una cepa introducida más efectiva. El experimento lo llevaron a cabo en condiciones controladas, con 1278 diferentes cultivos de soya (*Glycine max.* (L) Merr.) introducidos (I1) y de cultivo. Los nódulos fueron identificados usando la técnica de anticuerpos

fluorescentes. La cepa empleada fue la USDA 123 de *Bradyrhizobium japonicum*. Del total de los genotipos, 13 mostraron nodulación restringida con la cepa USDA 123 y cuando la compararon con 5 cultivos estándar; dos de estos genotipos, P1371607 y P1377978, fueron sembrados junto con el cultivar "Williams" (comercial) en un suelo libre de *B. japonicum* e inoculados con la cepa USDA 123 y cualquiera de las siguientes: USDA 110, 122 ó 138. En cada tratamiento de competencia, más del 75% de los nódulos de la variedad "Williams" fueron ocupados por la cepa USDA 123, mientras que, en todos los casos, menos del 10% de los nódulos de los genotipos de las plantas introducidas contenían la cepa USDA 123. Los genotipos PI excluyeron a la cepa USDA 123 en favor de la cepa inoculada. En otro experimento, dos genotipos de PI y la variedad "Williams" fueron inoculados con cualquiera de las cepas USDA 123 ó 110. Con la USDA 123 la nodulación y la acumulación de nitrógeno fue significativamente menor en los genotipos PI que en la variedad "Williams"; en contraste, con la USDA 110 que fueron similares a los de la variedad "Williams". Así, mientras los genotipos PI nodularon y fijaron nitrógeno pobremente con la USDA 123, la nodulación y la fijación de nitrógeno con una cepa eficiente, tal como la USDA 110 fue normal. Sus resultados sugieren que el adiestramiento de la identidad en los genotipos PI podría impactar positivamente la productividad

de la soya, por la exclusión de las poblaciones del serogrupo 123 nativas en favor de cepas más efectivas de *B. japonicum*.

Soasegaran y Martín (1984) utilizaron 3 cepas de *Rhizobium* para inocular un híbrido de *Leucaena leucocephala* x *Leucaena diversifolia* y sus genotipos progenitores. Los inoculos fueron preparados con cepas simples o una mezcla de las tres, para estudiar la competencia por la nodulación. Las cepas fueron identificadas con anticuerpos fluorescentes. A los 56 días las plantas de *Leucaena leucocephala* y su híbrido con *L. diversifolia* mostraron 100% más del contenido total de nitrógeno que la variedad *L. diversifolia*. La interacción de inoculación-hospedera en el total de nitrógeno explica el 14.4% ($P < 0.01$) del total de variación fenotípica. La especie de *Rhizobium* más efectiva y competitiva para las leucaenas fue la TAL 1145. La mezcla de las 3 cepas en la inoculación fue inferior a la TAL 1145 sola.

Keyser y Cregan (1987) trabajaron con 20 cepas obtenidas de *B. japonicum* serogrupo 123, las cuales fueron probadas para la producción de masa de los nódulos en soya comercial estándar (*Glycine max* L. Merr. cv. Williams) y en dos plantas introducidas (PI) que fueron genotipos que restringieron la nodulación con la cepa USDA 123. De los cultivos aislados, 4 mostraron una nodulación restringida

similar en los dos genotipos, mientras que las 20 cepas produjeron una cantidad normal de nódulos. El análisis serológico con anticuerpos fluorescentes mostró que los miembros del serotipo 123 tuvieron un bajo grado de nodulación en las dos Fie, en contraste con los miembros de los serotipos 127 y 129. Los estudios de competencia con las plantas introducidas indicaron que las cepas aisladas que fueron restringidas, no fueron competitivas para la formación de los nódulos, contra la cepa USDA 110; sin embargo, las cepas no restringidas del serogrupo 123 fueron muy competitivas. En la variedad "Williams", todas las cepas del serogrupo 123 probados, fueron muy competitivas contra la cepa USDA 110.

Martensson et al. (1987) emplearon la técnica de ELISA para estudiar la habilidad de dos cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (7612 y 285) para competir por los sitios de nodulación en trébol rojo, en un suelo que contenía cepas de *R. l.* bv. *trifolii* efectivas e inefectivas. El experimento en invernadero mostró que sólo una de las cepas utilizadas, la 285, fue capaz de formar nódulos en el trébol rojo. En tanto que el experimento a nivel de campo, ambas cepas inoculadas formaron una menor cantidad de nódulos que los establecidos en condiciones controladas. Además, las cepas inoculadas sobrevivieron en el suelo durante toda la estación del cultivo. Por último,

la producción de materia seca no se incrementó debido a que las cepas nativas fueron efectivas.

Somasegaran et al. (1988) investigaron la fijación de nitrógeno y la competencia de tres cepas de *Rhizobium* del garbanzo (TAL 480, 620 y 1140) sobre los genotipos "Desi" y "Kabuli" de garbanzo que se desarrollaron en vermiculita y en dos suelos (Ultisol y Oxisol) libres de rizobias de garbanzo. Las plantas desarrolladas en vermiculita fueron inoculadas con cepas simples y con una mezcla de las tres cepas. La inoculación en el suelo fue con una mezcla de las tres cepas a diferentes concentraciones (10^1 , 10^2 , 10^4 , 10^6 y 10^8 rizobias semilla⁻¹). Los parámetros de nodulación y fijación de nitrógeno fueron diferentes significativamente ($P<0.001$ y $P<0.01$, respectivamente) para los genotipos del garbanzo y la rizobia. La cepa TAL 620 fue la más competitiva en ambos genotipos. La fijación de nitrógeno máxima en ambos genotipos se dio con los inóculos de 10^4 y 10^8 rizobias semilla⁻¹, en los suelos Ultisol y Oxisol, respectivamente. Las tres cepas de *Rhizobium* compitieron diferentemente en los dos suelos. La diferente concentración del inóculo no influyó en la competencia entre cepas. En general, el genotipo "Kabuli" tuvo un potencial mayor de fijación de nitrógeno que el genotipo "Desi". Por lo que la competencia entre rizobias del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) estuvo influenciada por el medio de crecimiento, el genotipo

y las diferentes cepas pero no por la tasa de inoculación.

De acuerdo a lo anterior, se observa que no se tienen trabajos en nuestro país sobre la competencia de las cepas *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*, tanto introducidas como nativas, salvo los citados. De ahí que en el presente trabajo se pretende llevar a cabo una selección de cepas de *R. l.* biovar *phaseoli* por su capacidad competitiva en la formación de los nódulos en frijol común, a partir de una colección de cepas que han sido catalogadas como altamente fijadoras de nitrógeno (N_2), y de excelente sobrevivencia (Almaraz y Ferrera-Cerrato, 1987; Almaraz, 1988). Por lo que es de primordial importancia obtener cepas eficientes que puedan sobrevivir en el suelo y de alta competitividad, ya que con dicha información se puede tener una mayor probabilidad de obtener resultados satisfactorios en la nodulación por una cepa introducida, que tiene como finalidad aumentar el rendimiento del cultivo, en este caso el del frijol, que es una leguminosa importante desde el punto de vista alimentario y económico, sobre todo en los países del tercer mundo, entre ellos México.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Seleccionar cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* de alta capacidad competitiva colectadas en las zonas Áridas (Aguascalientes, Durango y Zacatecas) de México.

OBJETIVOS PARTICULARES

—Seleccionar en invernadero cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* por habilidad competitiva en el genotipo *Phaseolus vulgaris* L. Bayo Zacatecas desarrollado en sustrato estéril al enfrentarlas en el mismo inculante con una cepa patrón, la cual es altamente competitiva pero inefectiva.

—Estudiar el fenómeno de competencia entre poblaciones de rizobias introducidas altamente competitivas y las nativas del suelo.

HIPÓTESIS

Las cepas seleccionadas como las de mayor capacidad competitiva tendrán la habilidad de desplazar a las ricrobias nativas de un suelo no estéril.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico.

Las cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* empleadas en la selección por capacidad competitiva (CUADERO 1), pertenecen a la Colección Microbiana del Laboratorio de Fijación Biológica de Nitrógeno de la Sección de Microbiología de Suelos del Centro de Edafología, Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. Estas cepas han sido catalogadas como eficientes en la fijación de nitrógeno, y de alta sobrevivencia saprofítica (Aizaraz y Ferrera-Cerrato, 1987; Aizaraz, 1988). La cepa CP 163 (altamente competitiva pero inefectiva) fue proporcionada por el Dr. P. H. Graham de la Universidad de Minnesota, fue usada como patrón para evaluar la competitividad. La variedad de frijol empleada en el presente trabajo fue Mayo Icaotecas, proveniente de la zona frijolera del Estado de

Durango, la cual fue facilitada por el Centro de Investigaciones Forestales y Agropecuarias del Estado de Durango (CIFAP-DURANGO).

Marcaje de la cepa CP 163 con estreptomícina.

La cepa CP 163 se marcó con estreptomícina (est) de la siguiente manera: la cepa se puso a crecer en caldo de extracto de levadura manitol (CELM, APENDICE I) durante 3 días, después se sembró 0.1 ml de este cultivo en placas con extracto de levadura manitol agar rojo congo (ELMARC, APENDICE I) con 20, 40, 60, 80, y 100 μg de estreptomícina. De las placas con 100 μg de est, se tomó una asada y se puso a crecer en CELM sin antibiótico, posteriormente, se sembró 0.1 ml del cultivo en placas de ELMARC con concentraciones más altas de antibiótico, a intervalos de 20 μg , hasta 240 μg de est. Las colonias desarrolladas en las placas de 240 μg de est se pusieron a crecer en CELM sin antibiótico y después de 3 días se volvieron a sembrar en placas de ELMARC con una concentración superior, sólo que ahora a intervalos de 40 μg , hasta 500 μg . Debido a que no hubo ningún problema en el desarrollo de la cepa a estas concentraciones, se aplicó el mismo procedimiento, incrementando la concentración del antibiótico a intervalos de 100 μg de est, hasta 1000 μg .

CUADRO 1. Copas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* de efectividad y sobrevivencia comprobada empleadas en la selección por capacidad competitiva.

CLAVE ACTUAL	CLAVE ORIGINAL	CLAVE ACTUAL	CLAVE ORIGINAL
CPHEX 1	EL-63	CPHEX 125	D-293-20
CPHEX 70	Z-688-5	CPHEX 126	D-410-37
CPHEX 73	Z-788-6	CPHEX 127	Z-203A-20
CPHEX 78	Z-39-4	CPHEX 130	D-396-35
CPHEX 80	Z-125-13	CPHEX 131	Z-232-24
CPHEX 82	Z-51-4	CPHEX 134	A-473-45
CPHEX 84	Z-52-4	CPHEX 137	Z-167-18
CPHEX 85	Z-44-4	CPHEX 138	D-294-29
CPHEX 90	Z-78A-4	CPHEX 139	Z-221-23
CPHEX 93	Z-5-1	CPHEX 140	Z-220-23
CPHEX 99	Z-17-1	CPHEX 141	D-300-29
CPHEX 100	Z-118-11	CPHEX 155	A-465-44
CPHEX 101	Z-70-6	CPHEX 158	A-527-48
CPHEX 103	Z-156-16	CPHEX 162	A-572-52
CPHEX 105	Z-68A-5	CPHEX 165	A-616-56
CPHEX 107	Z-103-10	CP 162	UMR 1899
CPHEX 111	Z-162-16	CP 163	UMR 1116
CPHEX 118	A-473-45		
CPHEX 119	A-458-42		
CPHEX 120	D-416-37		
CPHEX 122	A-508-53		
CPHEX 123	D-386-35		
CPHEX 124	A-457-42		

A = Aguascalientes

D = Durango

Z = Zacatecas

UMR = Minnesota

Prueba de estabilidad del marcaje de la cepa CP 163₁₀₀₀₀ est.

El mutante CP 163₁₀₀₀₀est fue sembrado en CELM sin antibiótico, de este cultivo se tomó un ml y se hicieron diluciones (10¹, 10², 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸, 10⁹) en placas de ELMARC con 1000 µg de est y sin el antibiótico, con 3 repeticiones para cada dilución. La estabilidad de la marca se estableció cuando de la cepa bacteriana se desarrolló la misma cantidad de colonias en una determinada dilución en placas con y sin antibiótico (Espínosa-Victoria, 1986).

Marcaje de la cepa CP 163₁₀₀₀₀est con espectinomicina.

El cultivo que se utilizó para la prueba de estabilidad del marcaje con estreptomicina fue el que se usó para continuar el marcaje con espectinomicina. Se sembró 0.1 ml del cultivo en placas que contenían 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 8.0 y 10.0 µg ml⁻¹ de espectinomicina (esp). Al cabo de 3 días se recogieron las colonias desarrolladas de las placas con 10.0 µg y se pusieron en CELM sin antibiótico. Del cultivo resultante se volvió a sembrar 0.1 ml en placas con concentraciones superiores de esp, hasta 100 µg. A partir de los mutantes resistentes a 100 µg ml⁻¹ de espectinomicina se decidió continuar con el marcaje, sólo

que en esta ocasión se incluyeron en el medio de cultivo ambos antibióticos de la siguiente manera (μg est/esp): 1000/100, 1000/140, 1000/180, 1000/180 y 1000/200. Por último, el mutante obtenido en las placas con 1000/200 μg de est/esp se puso a crecer en CELM y posteriormente se indujo resistencia a concentraciones superiores de espectinomicina: 1000/300, 1000/400, 1000/500, 1000/600, 1000/700, 1000/800, 1000/1000 hasta 1000/1200 μg de est/esp. Como no se presentó ningún problema en el desarrollo de resistencia, se continuó con la prueba de estabilidad, siguiendo la misma secuencia descrita anteriormente.

Evaluación de la modulación del mutante CP 163₁₀₀₀ 1000 est/esp.

Con el fin de evaluar la modulación del mutante obtenido de la cepa original CP 163, se llevó a cabo un experimento en unidades de crecimiento CP (Guzmán, et al., 1983), usando la variedad de frijol Michoacán 12-A-3. Las semillas se desinfectaron superficialmente con alcohol al 95% durante 3 min, se enjuagaron con agua destilada estéril; después se sumergieron en una solución de bicloruro de mercurio acidificada (1 g HgCl_2 , 5 ml HCl , 1000 ml H_2O) durante 3 min y por último se aplicaron 5 lavados con agua destilada estéril (CIAT, 1988). Una vez esterilizadas, las

semillas fueron puestas a germinar en placas de agar-agua. El trasplante se realizó en las unidades de crecimiento CP, conteniendo 100 ml de solución Sandean (APÉNDICE II) a la mitad de su concentración, y después de haber sido esterilizadas, aplicando solución nutritiva según los requerimientos de las plantas. Se dejaron dos plántulas por unidad experimental con 4 repeticiones. Seis días después, se inoculó con el mutante doblemente marcado, con el mutante resistente a 1000 μ g de est y con la cepa original, aplicando 1.0 ml del cultivo a cada una de las plántulas.

EXPERIMENTO I. Selección de cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* por su capacidad competitiva en sustrato estéril.

Preparación de las unidades experimentales.

Para llevar a cabo la selección de las cepas por su capacidad competitiva, se montó un experimento a nivel invernadero, usando vasos de unicel con capacidad para 1.0 kg de tezontle fino estéril. Previamente, cada unidad fue desinfectada con formaldehído al 2% y, después de 2 h, con alcohol al 95%, cubriéndose finalmente con papel manila. Para facilitar el riego, se les adaptó un tubo de vidrio con tapón de baquelita. Las semillas de frijol variedad Bayo

Iacatecas fueron desinfectadas superficialmente (CIAT, 1988) y puestas a germinar en placas de agar-agua. Se realizó el trasplante, dejando 2 plántulas por cada unidad experimental. Se aplicaron 250 ml de solución Sandman (APENDICE 11) a la mitad de su concentración normal estéril, regando con la misma cantidad una vez a la semana. Se montaron 3 repeticiones para cada tratamiento (cepa eficiente + CP $1\pm 2_{10000}$ 10000 est/esp). Al sexto día del trasplante, se efectuó la inoculación; un día después, las unidades experimentales fueron trasladadas al invernadero, debido a que todo el trabajo se llevó a cabo en el laboratorio bajo condiciones asépticas (cajones de flujo laminar).

Preparación de las cepas según el Método de Graham (Conus. Pars. I).

Cada cepa, tanto las eficientes a evaluar como la mutante CP $1\pm 2_{10000}$ 1000 est/esp se pusieron a crecer en placas de extracto de levadura manitol agar, ELNA (APENDICE 1) durante 3 días o hasta que se obtuvo un crecimiento uniforme en toda la placa, después el cultivo se removió con 10 ml de solución salina estéril (0.85% de NaCl) con la ayuda de una pipeta Pasteur estéril y se transfirió a una botella de dilución conteniendo 30 ml de CELN; se dejó

incubar durante 3 días. Transcurrido este tiempo, se tomó 1 ml del cultivo y se transfirió a un matraz que contenía 100 ml de CELM y se incubó durante 24 h. De este cultivo se tomó 1 ml y se colocó en una botella de dilución que contenía 99 ml de solución salina estéril; se procedió a mezclar vigorosamente y se tomó una alícuota con una pipeta Pasteur, para realizar el conteo en una Cámara de Petroff-Hausser, determinándose así la cantidad de rizobias ml^{-1} . De esta forma se obtuvo la concentración de bacterias en el cultivo de 24 h de desarrollo, con el cual se preparó el inoculante-sezcla de una cepa eficiente (problema) y el mutante de la cepa CP 163 en una relación 1:1 con una concentración de 10^7 células ml^{-1} de cada una, empleándose 30 ml de solución salina estéril como vehículo, con el fin de aplicar más de 5 ml de inóculo por plántula.

Separación y esterilización de nódulos.

Las plantas se cosecharon de 38-42 días después de la inoculación. Se procedió a la separación de la parte aérea de la raíz, la primera fue secada en la estufa (70° durante 72 h) para determinar el peso seco; la segunda fue lavada con agua para eliminar los restos del tezonite y de cada una de estas, fueron separados 15 nódulos al azar para sembrarse uniéndose lo de dos raíces, por lo que para cada tratamiento

se plaquearon 90 nódulos. Los nódulos se desinfectaron superficialmente con alcohol al 75% durante 2 min., después se lavaron con agua destilada estéril y se pasaron a una solución de bicloruro de mercurio acidificada durante 3 min; por último fueron lavados 5 veces con agua destilada estéril (CIAT, 1988).

Plaqueo de nódulos.

Para obtener el porcentaje de competencia de cada una de las cepas probadas se procedió al plaqueo de los nódulos (30 por repetición) ya desinfectados superficialmente. En una placa de microtitulación se colocaron los 30 nódulos en forma individual agregándoles a cada uno una gota de agua destilada estéril con una pipeta Pasteur para su posterior trituración e inoculación usando un Triturador-Inoculador Múltiple (Beattie y Handelsman, 1989). Con este mismo se procedió a sembrar primero en las placas de ELMARC sin antibiótico y después en las que contenían una concentración de 1000/1200 µg de est/esp. El porcentaje de nódulos formados por el mutante CP 143_{1000 1200}est/esp, correspondió al número de colonias desarrolladas en las placas con antibiótico, teniendo como base que 30 nódulos representaban el 100%; el porcentaje de los nódulos restantes correspondió a la cepa eficiente probada.

Se determinaron además peso seco de raíz y nódulos, así como el número de nódulos, esto último se llevó a cabo con el contador de Colonias de Bacterias BIOTRAN (New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, N.Y., U.S.A.).

EXPERIMENTO II. Competencia en suelo con cepas introducidas y nativas de *Rhizobium*.

Para llevar a cabo el experimento de competencia en suelo con cepas de *Rhizobium* nativas, se tomaron las 5 mejores cepas eficientes seleccionadas como altamente competitivas con más del 90% de nódulos formados en el frijol variedad Bayo Iacatecas, éstas fueron: CPHEX 84 (92.23%), CPHEX 111 (96.67%), CPHEX 120 (92.77%), CPHEX 131 (97.78%) y CPHEX 155 (100%), posteriormente, fueron seleccionadas las células resistentes a kanamicina de cada una de estas cepas que conservaron tanto su capacidad competitiva como su eficiencia en la fijación del nitrógeno.

Marcaje de las cepas con kanamicina.

Para el marcaje de las 5 cepas seleccionadas, se tomó como base lo realizado con la cepa CP 163, sólo que en este

caso se seleccionó resistencia con concentraciones del antibiótico diferentes a las utilizadas en el marcaje anterior. Se inició con el crecimiento de cada una de las cepas en CELM, para posteriormente sembrar 0.1 ml del cultivo en placas de ELMARC con 20 μ g y 40 μ g de kanamicina (kan), dejándose el tiempo necesario para el desarrollo de la bacteria. Sin embargo, al no obtenerse indicio de la bacteria, se decidió disminuir la concentración del antibiótico y aumentar la cantidad del cultivo, es decir, que en lugar de sembrar 0.1 ml se sembró 0.3 ml, con la finalidad de tener una mayor probabilidad de obtener el mutante. Por lo tanto, se volvió a cultivar a las rizobias en placas con 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0 y 10.0 μ g de kan. En este caso solo se mencionará lo realizado con CPHEX 155, puesto que las otras cuatro cepas siguieron un patrón similar. El primer mutante que se obtuvo se desarrolló en placas con una concentración de 3.0 μ g de kan, de donde se tomaron las colonias y se sembraron en CELM para proseguir con el marcaje. Después, se prepararon placas con 5, 6, 8 y 10 μ g del antibiótico, observándose crecimiento en las placas con 5 μ g, de la cual se tomaron colonias para crecerlas en CELM. Se continuó con las concentraciones de: 10, 15, 20, 25 y 30 μ g de kan; observándose desarrollo de colonias en las placas con 25 μ g. Sucesivamente, se procedió de la misma forma para seleccionar cepas con resistencia a

concentraciones mayores: 50, 80 y 100 μg del antibiótico. Como ya no se observó ningún problema en el crecimiento de las rizobias, se decidió aumentar la concentración del antibiótico hasta obtener mutantes resistentes a 1000 μg de kan.

Prueba de Estabilidad de los mutantes resistentes a 1000 μg de kanamicina.

Para llevar a cabo la prueba de estabilidad de las 5 cepas resistentes a 1000 μg de kan, se pusieron a crecer en CELM sin antibiótico y de este cultivo se realizaron diluciones (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8), sembrándose 0.1 ml en placas sin antibiótico y en placas con 1000 μg de kan con 3 repeticiones para cada dilución. Cuando se observó crecimiento de igual cantidad de colonias en placas con y sin antibiótico, se consideró estabilizada la marca genética.

Prueba de Modulación de las Cepas resistentes a 1000 μg de kanamicina.

Con el propósito de evaluar la modulación de los mutantes de las cepas CPHEX 84, CPHEX 111, CPHEX 120, CPHEX 131 y CPHEX 155, se llevó a cabo un experimento en unidades

de crecimiento CP (Guzmán et al., 1983), usándose la variedad de frijol Bayo Zacatecas, que fue la misma en la que se les evaluó su capacidad competitiva. Las semillas fueron esterilizadas superficialmente (CIAT, 1988), y germinadas en placas de agar-agua; se trasplantaron 2 plántulas por cada unidad de crecimiento, montándose 4 repeticiones por tratamiento. La inoculación se realizó 4 días después del trasplante (cuando las hojas cotiledonaras quedaron completamente expuestas) con 1 ml de cultivo para cada plántula. Los tres inoculantes probados fueron: la cepa original, el mutante resistente a 1000 µg de kan y el mutante + CP 167,000 1200est/esp.

Preparación de las unidades experimentales.

Se utilizaron macetas de plástico del No. 8, las cuales se limpiaron con alcohol al 75%. Posteriormente se les adicionó 4 kg de suelo tamizado y secado al aire de la localidad Lomas de San Juan, Chapingo, México, el cual está considerado como un suelo pobre en nitrógeno y fósforo (Espínosa-Victoria, 1986). Se prepararon 4 unidades experimentales por tratamiento (CUADRO 2). Las semillas de frijol variedad Bayo Zacatecas se pusieron a germinar en placas de agar-agua durante 4 días, después de haber sido esterilizadas superficialmente (CIAT, 1988). El trasplante

se llevo a cabo en el invernadero dejando 2 plántulas por unidad experimental; se aplicó fertilizante nitrogenado y fosfatado en forma de sulfato de amonio $[(NH_4)_2SO_4]$ y superfosfato simple $[P_2O_5]$, respectivamente, al momento del trasplante; el primer riego fue a capacidad de campo (500 ml por saceta aproximadamente), aplicando esta misma cantidad cada semana.

Preparación del inoculante.

Los inoculantes de los mutantes CPMEK 155₁₀₀₀₀kan y CP 16C₁₀₀₀₀ 3300est/esp, se prepararon de la misma manera que en el Experimento 1, según el método de Graham (comun. pers.), sólo que en este caso la mezcla de ambos mutantes se diluyó en 80 ml de solución salina estéril (0.85 NaCl) con el fin de poder aplicar más de 10 ml por plántula y así cubrir una mayor superficie del suelo en el momento de inocular. La inoculación se llevó a cabo durante el trasplante, para no dar ninguna ventaja a las cepas nativas, con una suspensión bacteriana conteniendo 10^8 células ml^{-1} . Dicha concentración se determinó mediante la Cámara de Conteo de Petroff-Hauser.

El examen de los nódulos, así como las otras determinaciones (peso seco de parte aérea, raíz, nódulos y

CUADRO 2. Tratamientos del estudio de competencia de los sulantes CPNEX 155₁₀₀₀ kan y CP 163₁₀₀₀ 1200 est/esp de *Rhizobium leguminosorum* biovar *phaseoli* en suelo conteniendo cepas nativas

TRATAMIENTO	POSPORO	NITROGENO	CEPA EFICIENTE	CEPA INEFICIENTE
1	0	0	CPNEX155*	CP 163*
2	0	20	CPNEX155*	CP 163*
3	0	40	CPNEX155*	CP 163*
4	0	60	CPNEX155*	CP 163*
5	0	80	CPNEX155*	CP 163*
6	40	0	CPNEX155*	CP 163*
7	40	20	CPNEX155*	CP 163*
8	40	40	CPNEX155*	CP 163*
9	40	60	CPNEX155*	CP 163*
10	40	80	CPNEX155*	CP 163*
11	0	0	-----	-----
12	0	0	CPNEX155*	-----
13	0	0	-----	CP 163*

CPNEX155* = CPNEX155₁₀₀₀kan

CP 163* = CP 163₁₀₀₀ 1200est/esp

numero de nodulos) se realizo de la misma manera que en el Experimento 1, cuando el 50% de las plantas presentaron floración (32 dias).

Todos los experimentos realizados en el presente trabajo tuvieron un diseño experimental completamente al azar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

EXPERIMENTO I: Selección de cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*.

Marcaje de la cepa CP 163.

La obtención del mutante CP 163₁₀₀₀ 1200^{est/esp} se llevó a cabo en un periodo de aproximadamente 4 meses. Al momento de realizar la prueba de estabilidad se observó que la bacteria no se desarrollaba en las placas con el antibiótico de la misma manera que en las placas sin antibiótico, tanto en la prueba de estabilidad del marcaje con uno como con los dos antibióticos. Por lo que en ambos casos se decidió mantenerlos por más tiempo en placas y en CELM con las respectivas concentraciones, hasta que se obtuvo crecimiento de la misma cantidad de colonias en las

placas con los antibióticos y sin ellos. Por último, la prueba de nodulación resultó ser positiva, es decir, las plantas inoculadas con el mutante presentaron una gran cantidad de nódulos blancos, que a simple vista no presentaron diferencias con los nódulos formados por la cepa original, lo que nos indicó que ésta había conservado su capacidad competitiva y su carácter de ineficiencia en la fijación de nitrógeno, ya que las plantas presentaron clorosis y permanecieron casi del mismo tamaño que el control sin inocular.

Competencia entre cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* en sustrato estéril.

Las cepas que formaron más del 90% del total de nódulos fueron: CPME1 155, CPME1 131, CPME1 111, CPME1 120, CPME1 100, CPME1 84, CPME1 85 y CPME1 142, que representan el 20.5% del total de cepas seleccionadas (CUADRO 3).

La cepa CPME1 155 fue la única que logró desplazar totalmente a la cepa altamente competitiva e ineficiente, formando el 100% de los nódulos en la variedad de frijol Bayo Iacatecas, pudiendo considerársele como una cepa excelente en capacidad competitiva, además de ser eficiente en la fijación de nitrógeno y ser de buena sobrevivencia

CUADRO 3. Porcentaje de nódulos formados por las cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseolii* al ser inoculadas junto con el mutante CP 163_{1000 1200 est/esp}, en una relación 1:1

TRATAMIENTO	% DE NÓDULOS FORMADOS	
	CEPA PROBLEMA	CEPA PATRON
EXCELENTES COMPETIDORES		
CPNEX 135+CP 163*	100.00	0.00
MUY BUENOS COMPETIDORES		
CPNEX 131+CP 163*	97.70	2.22
CPNEX 111+CP 163*	96.67	3.33
CPNEX 120+CP 163**	92.23	7.77
CPNEX 100+CP 163*	92.23	7.77
CPNEX 84+CP 163*	92.23	7.77
CPNEX 85+CP 163**	92.22	7.78
CPNEX 162+CP 163*	92.22	7.78
BUENOS COMPETIDORES		
CPNEX 70+CP 163*	88.89	11.11
CPNEX 101+CP 163*	85.67	13.33
CP 162+CP 163*	85.55	14.45

* CP 163 = mutante resistente a antibióticos CP163_{1000 1200 est/esp}

** = tratamientos evaluados en dos ocasiones (se reportan promedios)

CUADRO 3. CONTINUACION

TRATAMIENTO	% DE MÓDULOS FORMADOS	
	CEPA PROBLEMA	CEPA PATRON
CPNEX 14+CP 163* ²	85.33	16.67
CPNEX 163+CP 163*	73.33	26.67
CPNEX 119+CP 163*	70.00	30.00
CPNEX 123+CP 163*	61.11	38.89
CPNEX 122+CP 163*	60.00	40.00
CPNEX 99+CP 163* ²	56.64	43.35
REGULARES COMPETIDORES		
CPNEX 93+CP 163*	47.78	52.22
CPNEX 80+CP 163*	47.78	52.22
CPNEX 134+CP 163*	45.55	54.45
CPNEX 90+CP 163*	41.11	58.89
CPNEX 128+CP 163*	40.00	60.00
CPNEX 78+CP 163*	35.56	64.44
CPNEX 137+CP 163*	35.35	64.45
CPNEX 158+CP 163*	34.44	65.56
CPNEX 140+CP 163*	32.22	67.78
CPNEX 130+CP 163*	31.12	68.88

* CP 163 = mutante resistente a antibióticos CP163₁₀₀₀₀ (100 est./esp)

² = tratamientos evaluados en dos ocasiones (se reportan promedios)

CUADRO 3. CONTINUACION

TRATAMIENTO	% DE MÓDULOS	
	CEPA PROBLEMA	FORMADOS CEPA PATRON
MALOS COMPETIDORES		
CPNEX 73+CP 163*	27.77	72.23
CPNEX 139+CP 163*	26.67	73.33
CP 82+CP 163*	26.67	73.33
CPNEX 126+CP 163*	25.55	74.45
CPNEX 103+CP 163*	23.34	76.66
CPNEX 105+CP 163*	23.34	76.66
CPNEX 124+CP 163*	22.23	77.77
MUY MALOS COMPETIDORES		
CPNEX 118+CP 163*	14.45	85.55
CPNEX 127+CP 163**	14.45	85.55
CPNEX 107+CP 163*	4.44	95.56
CPNEX 139+CP 163*	3.34	96.66
CPNEX 141+CP 163*	3.34	96.66
CP 163*	0.00	100.00

* CP 163 = mutante resistente a antibióticos CP163_{10000 12000}
est/esp

** = tratamientos evaluados en dos ocasiones (se reportan promedios)

saprotífica. Los resultados satisfactorios obtenidos al ser probada en suelo con cepas nativas de *Rhizobium* dan la posibilidad de considerarla como una cepa excelente para la preparación del inoculante destinado a la región de donde fue aislada (zona frijolera de Aguascalientes).

Las cepas CPHEX 131 y CPHEX 111 formaron el 97.78 y el 96.67% del total de los nódulos, respectivamente, siendo las que más se acercaron al 100%, además de que se comportaron de manera similar frente al mutante CP 163,000 1000 est/esp. Tales resultados indican que ambas cepas pueden desplazar a otras que tengan la característica de ser competitivas si las condiciones nutrimentales y ambientales son apropiadas. También estas dos cepas pueden ser consideradas como apropiadas para la preparación de inoculante para la zona frijolera de Ixcatecas.

Las cepas CPHEX 162, CPHEX 85, CPHEX 84 y CPHEX 120 formaron el 92.22, 92.22, 92.23 y 92.23% del total de los nódulos, respectivamente. De éstas, la CPHEX 85 y CPHEX 120 fueron evaluadas en dos ocasiones, reportándose por lo tanto un promedio de ambas determinaciones. En general, no se observaron grandes diferencias entre la primera y la segunda evaluación, corroborándose que se trata de cepas altamente competitivas y eficientes en la fijación del nitrógeno. Lo anterior también nos confirma que el método de selección utilizado permitió llevar a cabo una selección confiable de

cepas de *R. l. biovar phaseoli*, ya que al evaluar en dos ocasiones a otras tres cepas (CPHEX 1, CPHEX 99 y CPHEX 127) se obtuvieron resultados similares en ambos casos (se reportan promedios).

En general, se puede decir que las 4 cepas mencionadas anteriormente presentaron un comportamiento similar frente a la cepa patrón (altamente competitivo e ineficiente), manifestándose como superiores en capacidad competitiva. Sin embargo, debe considerarse que en condiciones naturales, interactúan no sólo con cepas de la misma especie (eficientes e ineficientes altamente competitivas), sino con una gran gama de organismos. Así, el hecho de haber sido seleccionadas como altamente competitivas en condiciones de invernadero, no garantiza que se comporten de la misma forma al ser introducidas en campo.

Deben realizarse investigaciones tendientes a considerar los factores que influyen en la simbiosis *Rhizobium-leguminosa*, tales como temperatura, altitud, tipo de suelo, nitrógeno y fósforo disponibles, humedad y pH; de esta manera será factible incrementar el rendimiento del cultivo en las zonas frías de nuestro país, al emplear cepas que además de haber sido seleccionadas como eficientes en la fijación de nitrógeno y de alta competitividad sean de buena sobrevivencia bajo condiciones adversas. Por ejemplo, se sabe que una cepa es eficiente en un tipo de suelo, sobre

todo en aquél del que fue aislada debido a que ésta se halla adaptada a las condiciones prevaletientes, sobre todo pH y materia orgánica del mismo.

Finalmente, de este bloque de cepas, la CPNEX 100 formó el 92.66% de los nódulos, sin embargo, fue totalmente ineficiente en la fijación de nitrógeno (CUADRO 4). Probablemente, este fenómeno aún desconocido en el que seguramente el hospedero debe estar involucrado, sea una de las causas por las cuales no se obtenga respuesta a la inoculación cuando se introducen al campo cepas previamente seleccionadas.

El siguiente grupo de cepas, colocadas en orden decreciente en cuanto a capacidad competitiva, pueden considerarse como buenos competidores, ya que formaron frente a la cepa patrón más del 50% del total de nódulos en la variedad de frijol Bayo Zacatecas: CPNEX 70, CPNEX 101, CP 142, CPNEX 1, CPNEX 143, CPNEX 119, CPNEX 123, CPNEX 122 y CPNEX 99. La característica que se tomó como base para este agrupamiento fue la ausencia de clorosis en las plantas inoculadas con estas cepas, además del vigor de la parte aérea reflejado en una mayor biomasa, en contraste con el inducido por las cepas menos competitivas.

La CPNEX 93, cuyo efecto en la producción de peso seco de la parte aérea fue el más alto, fue catalogada como una competidora regular pues formó el 47.70% de los nódulos

totales de la planta. Esto indica que no necesariamente una cepa que forme el 100% de nódulos tendrá que reflejar la más alta eficiencia en la fijación de nitrógeno; de hecho, la capacidad para fijar nitrógeno estará determinada por la eficiencia nodular.

Un 25.6% del total de cepas seleccionadas por su capacidad competitiva fueron clasificadas como competidores regulares, formando entre el 30 y el 50% de los nódulos cuando fueron inoculadas en una relación 1:1 con la cepa patrón, éstas son en orden decreciente en relación a su capacidad competitiva: CPNEX 93, CPNEX 80, CPNEX 134, CPNEX 90, CPNEX 125, CPNEX 78, CPNEX 137, CPNEX 158, CPNEX 140 y CPNEX 130 (CUADRO 3). En este grupo de cepas sólo la CPNEX 93 presentó plantas verdes (no cloróticas) a pesar de haber formado sólo el 47.78% de los nódulos, dicho efecto tiene su explicación en el hecho de que fue la cepa que produjo el mayor peso seco de nódulos rojos (efectivos).

Otro aspecto que se observó en este grupo, fue la presencia de plantas cloróticas con nódulos rojos formados por las cepas CPNEX 80, CPNEX 90, CPNEX 134 y CPNEX 158. Esto puede explicarse por el hecho de que la cantidad de nódulos rojos (de 32.33 a 20.00 nódulos 2 plantas⁻¹) formados no fueron suficientes para la aportación del nitrógeno requerido por la planta.

El 17.9% del total de cepas evaluadas fueron consideradas como malas competidoras frente a la cepa patrón, ya que formaron entre el 20 y el 30% del total de nódulos en la variedad de frijol empleada, éstas fueron: CPNEX 73 (27.71%), CPNEX 138 (26.67%), CPNEX 82 (26.67%), CPNEX 126 (25.55%), CPNEX 103 (23.34%), CPNEX 105 (23.34%) Y CPNEX 124 (22.23%). Todas las plantas inoculadas con estas cepas, presentaron clorosis y ausencia total de nódulos rojos; así, es factible inferir que la presencia de cepas altamente competitivas e inefectivas en el suelo influye directamente en la expresión de las cepas eficientes introducidas, abatiendo su nodulación.

El último grupo de cepas seleccionada por su capacidad competitiva fueron clasificadas como muy malas competidoras, el cual estuvo integrado por: CPNEX 118 (14.45%), CPNEX 127 (14.45%), CPNEX 107 (4.44%), CPNEX 139 (3.34%) y CPNEX 141 (3.34%); representando el 15% del total de las cepas seleccionadas. También en este caso, la ausencia total de nódulos rojos fue la característica más sobresaliente, manifestándose por lo tanto clorosis en todas las plantas inoculadas con estas cepas (CUADRO 3).

Estos resultados nos indican que la afinidad de las cepas de *Rhizobium* por el hospedero es de gran importancia cuando se lleva a cabo una evaluación bajo condiciones de invernadero; sin embargo, es uno de los aspectos que no se

ha considerado en la mayoría de los casos en que se han seleccionado cepas para su uso como inoculante en condiciones de campo. Gardezi (1986) reportó que la cepa EL-57 que había sido evaluada como inefectiva bajo condiciones controladas, se comportó como altamente efectiva con los genotipos Chis., 1458 (hábito de crecimiento III) y Bayo Jaspeado de San Andrés (hábito de crecimiento IIib). En la presente investigación, las cepas evaluadas como efectivas en la variedad de frijol Bayo Durango, se comportaron como inefectivas en la variedad Bayo Iacatecas.

Graham (1987) reportó que cuando inoculó 10 genotipos de frijol con una mezcla de la UMR 1116, con 4 cepas diferentes de *R. l. biovar phaseoli*, en una proporción 1:1, no se presentaron evidencias claras de la variación hospedero-cepa, como respuesta a la inoculación o selección de cepa a los 30 días, aunque las plantas inoculadas con la mezcla que contenía a las cepas UMR 1125 o UMR 1378 fueron superiores en vigor y peso seco de la parte aérea (g planta⁻¹) con los 10 genotipos de frijol probados.

Peso seco de la parte aérea de *Phaseolus vulgaris* L. en el estado de competencia en sustrato estéril

La cepa que produjo el máximo peso seco de la parte aérea fue la CPMEY 93 (2.413 g 2 plantas⁻¹); sin embargo,

presento valores estadísticamente iguales ($\alpha=0.05$) a los de las cepas CPHEX 85 (2.143 g 2 plantas⁻¹), CPHEX 111 (1.997 g 2 plantas⁻¹) y CPHEX 120 (1.880 g 2 plantas⁻¹), que fueron consideradas como muy buenos competidores por haber formado más del 90% de los nódulos totales en la planta, al ser inoculadas en una relación 1:1 con la cepa patrón. La cepa CPHEX 93 formó el 47.76% de los nódulos de la planta, pero como se mencionó antes, esta cepa presentó el mayor peso de nódulos rojos, de ahí que esta ganancia de materia seca de la parte aérea sea atribuible a la eficiencia de dichos nódulos.

La cepa CPHEX 155, que presentó la más alta capacidad competitiva (100%), produjo un valor de peso seco de parte aérea de 1.803 g 2 plantas⁻¹, siendo menor al de la CPHEX 84 (1.913 g 2 plantas⁻¹) la cual formó el 92.93% de los nódulos de la planta, lo que indica que a pesar de ser cepas altamente competitivas y evaluadas como eficientes, no son necesariamente las mejores en la producción de biomasa aérea. Sin embargo, no hay que descartar la posibilidad que el beneficio de esa capacidad se vea reflejada en el rendimiento de grano, que en este caso no se determinó debido a que el objetivo del trabajo fue seleccionar cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*, por lo que la cosecha de las plantas se llevó a cabo en la etapa de floración, que es cuando los nódulos se encuentran más

activos.

La CPNEX 1c (testigo eficiente en la fijación de nitrógeno) se encuentra dentro del grupo de cepas que presentaron valores estadísticamente iguales ($\alpha=0.05$) al de la cepa que tuvo el máximo peso seco de la parte aérea, así como dentro del grupo de las cepas consideradas como altamente competitivas, por lo que puede usarse como referencia para evaluar la eficiencia de las cepas en relación a la fijación de nitrógeno cuando éstas se hallan frente a una cepa altamente competitiva.

En general, se puede decir que las cepas que resultaron con la más baja capacidad competitiva, presentaron valores de peso seco de la parte aérea menores (1.513 ± 0.813 g 2 planta⁻¹) con diferencias significativas ($\alpha=0.05$) en relación a las cepas consideradas como altamente competitivas (con más del 50% de nódulos totales formados), lo cual se atribuye a la presencia de una menor cantidad de nódulos rojos (32.33 ± 0.00 nódulos rojos por 2 plantas) eficientes o a la ausencia de éstos; esto, finalmente es el resultado también de la especificidad de las cepas por el hospedero. Estas cepas fueron seleccionadas como efectivas en la variedad de frijol Bayo Durango (Almaraz, 1988). Los resultados obtenidos explican los bajos rendimientos del cultivo de frijol, cuando se lleva a cabo una inoculación bajo condiciones de campo con cepas que han

CUADRO 4. Medias del peso seco de parte aérea y de raíz de *Phaseolus vulgaris* L. inoculado con diferentes cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli más el mutante CP 153_{10000 1200} est/exp en una relación 1:1.

TRATAMIENTO	PESO SECO g 2 PLANTAS ⁻¹	
	PARTE AEREA	RAIZ
CPMEX 93+CP 163*	2.413 a	0.6633 abcdef
CPMEX 70+CP 163*	2.213 ab	0.7700 abcd
CPMEX 85+CP 163**	2.143 abc	0.6267 abcdef
CPMEX 162+CP 163*	2.120 abc	0.7167 abcde
CPMEX 101+CP 163*	2.083 abcd	0.8600 a
CPMEX 80+CP 163*	2.073 abcd	0.7467 abcde
CPMEX 1c	1.987 abcd	0.7367 abcde
CPMEX 119+CP 163*	1.980 abcd	0.8233 ab
CPMEX 131+CP 163*	1.973 abcd	0.6067 abcdef
CPMEX 99+CP 163**	1.903 abcde	0.6467 abcdef
CPMEX 111+CP 163*	1.887 abcde	0.6700 abcdef
CPMEX 120+CP 163**	1.880 abcde	0.6033 abcdef
CPMEX 124+CP 163*	1.840 abcde	0.7833 abc
CPMEX 84+CP 163*	1.813 bcdef	0.6033 abcdef
CPMEX 155+CP 163*	1.803 bcdefg	0.6067 abcdef
CPMEX 123+CP 163*	1.797 bcdefg	0.6833 abcdef
CPMEX 103+CP 163*	1.653 bcdefgh	0.6267 abcdef
CPMEX 1+CP 163**	1.637 bcdefghi	0.7000 abcdef
CPMEX 78+CP 163*	1.610 cdefghi	0.5300 cdef
CPMEX 130+CP 163*	1.557 cdefghi	0.7800 abc
CP 162+CP 163*	1.520 defghij	0.5467 cdef
CPMEX 122+CP 163*	1.517 defghij	0.5800 bcdef

CUADRO 4. CONTINUACION

TRATAMIENTO	PESO SECO g 8 PLANTAS ⁻¹			
	PARTE AEREA		RAIZ	
CPNEX 118+CP 163*	1.513	defghij	0.7367	abcde
CPNEX 107+CP 163*	1.377	efghijk	0.6100	abcdef
CPNEX 127+CP 163* ^o	1.373	efghijk	0.6467	abcdef
CPNEX 163+CP 163*	1.370	efghijk	0.5933	bcdef
CPNEX 100+CP 163*	1.327	efghijk	0.5667	bcdef
CPNEX 158+CP 163*	1.313	efghijk	0.6033	abcdef
CPNEX 90+CP 163*	1.223	fghijk	0.5167	def
CPNEX 105+CP 163*	1.210	ghijk	0.5433	cdef
CPNEX 134+CP 163*	1.197	hijk	0.6167	abcdef
CPNEX 137+CP 163*	1.193	hijk	0.5467	cdef
CPNEX 82+CP 163*	1.190	hijk	0.5833	bcdef
CPNEX 139+CP 163*	1.160	hijk	0.6167	abcdef
CPNEX 141+CP 163*	1.153	hijk	0.5433	cdef
CPNEX 73+CP 163*	1.137	hijk	0.6000	bcdef
TEST100	1.067	hijk	0.5200	cdef
CPNEX 125+CP 163*	1.060	hijk	0.5500	cdef
CPNEX 140+CP 163*	1.047	ijk	0.5467	cdef
CP 163*	0.950	jk	0.5100	ef
CPNEX 138+CP 163*	0.893	k	0.5400	cdef
CPNEX 126+CP 163*	0.813	k	0.4467	f

Las medias de las variables con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0.05$).

CP 163* = mutante resistente a antibióticos CPNEX 163₍₁₀₀₀₎ 1000 est/esp.

CPNEX 1c = testigo altamente efectivo.

^o = tratamiento evaluado en dos ocasiones (se reportan promedios).

sido evaluadas en condiciones controladas en una sola variedad de frijol.

Otro aspecto importante observado, fue que el testigo absoluto (sin inoculación) presentó una biomasa de la parte aérea mayor ($1.067 \text{ g } 2 \text{ plantas}^{-1}$) que 4 de las cepas evaluadas (CPMEX 125, CPMEX 140, CPMEX 138 y CPMEX 126), además, el mutante CP 163,000 1200 est/esp produjo un peso seco de la parte aérea mayor ($0.750 \text{ g } 2 \text{ plantas}^{-1}$) al de dos de las cepas que produjeron los valores más bajos de biomasa aérea, aunque sin diferencia significativa ($\alpha=0.05$) (CUADRO 4).

En la figura 1, se muestra una relación del peso seco de la parte aérea del frijol Bayo Zacatecas y la capacidad competitiva de las cepas que resultaron con más del 60% de nodulación, así como de aquéllas que tuvieron menos del 35% de nódulos formados por 2 plantas. Las cepas que resultaron con una alta habilidad competitiva, presentaron una biomasa de la parte aérea mayor en relación a las cepas de baja capacidad competitiva. En esta misma figura, se tiene una visión más clara de la efectividad de las cepas altamente competitivas al tener como referencia a la CPMEX 1c (testigo eficiente en la fijación de nitrógeno) que es altamente efectiva y de amplio espectro de especificidad ya que ha nodulado a los cuatro hábitos de crecimiento del frijol (I, II, III y IV) descritos (Rodríguez y Ferrera-Cernato, 1984).

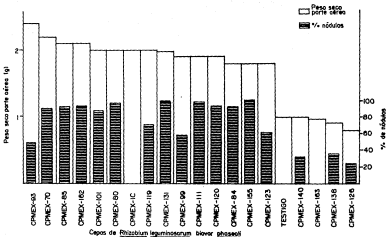


Figura 1. Relación entre el peso seco de la parte aérea de frijol Boye Zacatecas y la capacidad competitiva de cepas efectivas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* inoculadas en concentraciones equivalentes (1:1) con el mutante resistente a antibióticos CP 163, *lcc::cat* *cat::Tet^r* (altamente competitivo e inefectivo).

También en la figura 1, se observa la gran diferencia que existe entre el peso seco de la parte aérea del testigo absoluto (1.067 g 2 plantas⁻¹) y el máximo valor obtenido (2.413 g 2 plantas⁻¹) por la cepa DMEX 93. En adición, el mutante CP 163_{1000 1200} est/esp está dentro de los valores más bajos de peso seco de parte aérea, confirmando su característica de ser inefectivo, no presentando diferencias significativas ($\alpha=0.05$) con el testigo absoluto (sin inoculación).

En general, la presencia del mutante CP 163_{1000 1200} est/esp, altamente competitivo e inefectivo, influyó abatiendo la expresión de la capacidad competitiva de las cepas efectivas evaluadas, y esto se vio reflejado en la producción de biomasa de la parte aérea. Graham (1987), al evaluar 9 cepas de *R. l. biovar phaseoli* seleccionadas por su capacidad competitiva frente a la cepa UMR 1116 (CP 163) en 3 variedades de frijol (Jasapa, UMPV 0047 y UMPV 4013), encontró que las cepas UMR 1165, UMR 1125 y UMR 1102 fueron superiores en capacidad competitiva, ya que el peso seco de la parte aérea por planta como resultado de la inoculación con estas cepas excedió 4.00 g planta⁻¹, a los 30 días, en comparación al producido por la UMR 1116 que fue de 1.49 g planta⁻¹ en los 3 genotipos, en este experimento, se tomó como base el peso seco de la parte aérea para determinar si una cepa se comportaba como altamente competitiva. Este

trabajo reporta resultados en los cuales se adicionan los porcentajes de nodulación de las cepas efectivas evaluadas, como una confirmación de la habilidad en la formación de nódulos de una cepa determinada.

Peso seco de raíz de *Phaseolus vulgaris* L. variedad Bayo Zacatecas en el estado de competencia en sustrato estéril.

En general, se observaron diferencias significativas ($\alpha=0.05$) en el peso seco de raíz entre las cepas seleccionadas, aunque se detectaron grupos con valores estadísticamente iguales. En el primero de los casos, podemos agrupar a 25 cepas, dentro de las cuales se encuentran nuevamente las cepas que formaron más del 70% de los nódulos totales de la planta. Sin embargo, el peso seco de raíz no tuvo relación con la eficiencia de las cepas altamente competitivas, dado que la heterogeneidad de los datos fue muy marcada; por ejemplo, la cepa que produjo el máximo peso seco de raíz fue la CPHEX 101 (0.8600 g 2 plantas⁻¹) ubicada en décimo lugar en cuanto a capacidad competitiva (86.67%), en tanto que la segunda mejor cepa en producción de peso seco de raíz fue la CPHEX 119 (0.8233 g 2 plantas⁻¹) ubicada en catorceavo lugar en cuanto a capacidad competitiva (79%). En octavo lugar, aparece la CPHEX 10 con 0.7347 g 2 plantas⁻¹ y en noveno la primera de las cepas

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

altamente competitivas (CPMEX 1&2) que produjo 0.71&7 g 2 plantas⁻¹ de biomasa de raíz.

También, en este caso se encontraron cepas que produjeron un peso seco de raíz menor al del testigo absoluto (0.5200 g 2 plantas⁻¹), aunque con valores estadísticamente iguales ($\alpha=0.05$). De ahí que esta variable no es recomendable para diferenciar el efecto de cada tratamiento (cepa eficiente + mutante resistente a antibióticos ineficiente) (CUADRO 4).

Número de nódulos rojos de *Phaseolus vulgaris* L. variedad Bayo Zacatecas en el estudio de competencia en sustrato estéril.

La cepa que formó el máximo número de nódulos eficientes (rojos) fue la CPMEX 93 con 9&7 nódulos rojos 2 plantas⁻¹, con diferencias significativas ($\alpha=0.05$) con respecto al resto de los tratamientos. La actividad de este número máximo de nódulos rojos formados por la cepa CPMEX 93 se reflejó en el máximo valor en peso seco de parte aérea encontrado. Es probable que este fenómeno ocurra como resultado de la especificidad por la variedad Bayo Zacatecas.

La cepa CPMEX 04 formó 54& nódulos rojos 2 plantas⁻¹, lo que la ubicó en el segundo sitio en lo que se refiere al

número de nódulos rojos, no presentando diferencias significativas ($\alpha=0.05$) con las cepas CPNEX 85 (494.33 nódulos rojos 2 plantas⁻¹), CPNEX 99 (343.67 nódulos rojos 2 plantas⁻¹) y CPNEX 1c (testigo eficiente) que formó 267.67 nódulos rojos 2 plantas⁻¹. Esta última cepa presentó diferencias significativas con el resto de los tratamientos; sin embargo, estas diferencias son obvias debido a que 17 de los tratamientos no produjeron nódulos eficientes (rojos), lo que las hace definitivamente distintas a las que si los presentaron en menor o mayor cantidad. Graham (1987) reportó que de 20 cepas evaluadas por su efectividad en competencia con la UMR 111b (CP 163), 8 de ellas no formaron nódulos rojos, sino solamente nódulos blancos. Del presente experimento, es importante señalar que las cepas CPNEX 155, CP 162, CPNEX 131, CPNEX 120, CPNEX 162, CPNEX 123, CPNEX 1, CPNEX 70, CPNEX 111, CPNEX 165, CPNEX 101 y CPNEX 119, que formaron más del 50% en nódulos totales, presentaron de 223.67 a 51.67 nódulos rojos 2 plantas⁻¹, de ahí que se les pueda considerar como buenas, muy buenas y excelentes competidoras. Esto indica que la formación de nódulos eficientes en la variedad Bayo Iacatecas estuvo relacionada con la capacidad competitiva de las cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseolici (CUADRO 5).

De las 5 cepas restantes, que si formaron nódulos rojos, 4 están clasificadas como competidoras regulares,

éstas son: la CPNEX 80, que formó tan sólo 32.33 nódulos rojos 2 plantas⁻¹; la CPNEX 158, con 22.27 nódulos rojos 2 plantas⁻¹; la CPNEX 134, que formó 21.67 nódulos rojos 2 plantas⁻¹ y la CPNEX 90, con 20.00 nódulos rojos 2 plantas⁻¹. En tanto que de las 2 restantes, la CPNEX 103 con 5.33 nódulos rojos 2 plantas⁻¹ está dentro del grupo de cepas consideradas como competidores malos, además de ser la cepa que formó el número más bajo de nódulos eficientes en la fijación de nitrógeno. Por último la CPNEX 118 ya forma parte de los competidores muy malos, debido a que sólo formó el 14.45% de nódulos de la planta; sin embargo, tuvo la capacidad de formar 20.33 nódulos rojos 2 plantas⁻¹ (CUADRO 5).

Graham (1987) probó 20 cepas de la colección de Tacatecas, por su eficiencia en la fijación de nitrógeno usando como factor competitivo a la cepa UMR 1116 (CP 163) en dos variedades de frijol (Jaaapa y Nep 2). En la variedad Jaaapa, las cepas que resultaron ser más competitivas fueron la UMR 1305, UMR 1279, UMR 1286 y UMR 1320, debido a que formaron 269, 301, 139 y 167 nódulos rojos planta⁻¹, lo cual se reflejó en los valores máximos de parte aérea (de 0.457 a 0.276 g planta⁻¹) en comparación a la cepa UMR 1318, (21 nódulos rojos planta⁻¹) que produjo un peso seco de parte aérea de 0.041 g planta⁻¹. En la variedad Nep 2, la UMR 1305 y UMR 1279 formaron la mayor cantidad de nódulos rojos por

CUADRO 5. Medias del número de nódulos rojos y verdes de *Phaseolus vulgaris* L. variedad Bayo Zacatecas inoculado con diferentes cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli más el mutante CP 183, con un est/cep en una relación 1:1.

TRATAMIENTO	NUMERO DE NODULOS 2 PLANTAS ⁻¹	
	ROJOS	VERDES
CPMEX 93+CP 163*	967.00 a	214.0 abcd
CPMEX 84+CP 163*	546.00 b	342.7 abcd
CPMEX 85+CP 163* ^A	494.33 bc	154.0 d
CPMEX 99+CP 163* ^A	343.67 bcd	70.7 d
CPMEX 1c	267.67 bcde	72.7 d
CPMEX 155+CP 163*	223.67 cde	185.7 cd
CP 162+CP 163*	222.00 cde	133.7 d
CPMEX 131+CP 163*	197.67 cde	219.0 abcd
CPMEX 120+CP 163* ^A	194.00 cde	112.3 d
CPMEX 162+CP 163*	146.67 de	222.0 abcd
CPMEX 122+CP 163*	119.00 de	407.0 abcd
CPMEX 123+CP 163*	103.33 de	350.7 abcd
CPMEX 1+CP 163* ^A	98.67 de	349.0 abcd
CPMEX 70+CP 163*	80.33 de	182.3 cd
CPMEX 111+CP 163*	60.00 de	126.3 d
CPMEX 165+CP 163*	59.67 de	201.0 abcd
CPMEX 101+CP 163*	53.00 de	176.0 cd
CPMEX 119+CP 163*	51.67 de	85.3 d
CPMEX 80+CP 163*	32.33 de	163.7 cd
CPMEX 158+CP 163*	22.67 e	196.7 abcd
CPMEX 134+CP 163*	21.67 e	317.0 abcd
CPMEX 118+CP 163*	20.33 e	191.3 bcd

CUADRO 5. CONTINUACION

TRATAMIENTO	NUMERO DE NODULOS 2 PLANTAS ⁻¹	
	ROJOS	VERDES
CPHEX 99+CP 163*	20.00	e 148.0 d
CPHEX 103+CP 163*	5.33	e 81.3 d
CPHEX 139+CP 163*	0.00	e 320.7 abcd
CPHEX 127+CP 163* ^a	0.00	e 39.7 d
CPHEX 100+CP 163*	0.00	e 45.0 d
CPHEX 141+CP 163*	0.00	e 335.0 abcd
CPHEX 138+CP 163*	0.00	e 607.3 ab
CPHEX 125+CP 163*	0.00	e 614.7 a
CPHEX 126+CP 163*	0.00	e 395.3 abcd
CPHEX 78+CP 163*	0.00	e 70.3 d
CPHEX 124+CP 163*	0.00	e 48.3 d
CPHEX 82+CP 163*	0.00	e 185.3 cd
CPHEX 73+CP 163*	0.00	e 80.7 d
CPHEX 137+CP 163*	0.00	e 344.0 abcd
CPHEX 105+CP 163*	0.00	e 153.7 d
CPHEX 107+CP 163*	0.00	e 188.3 bcd
CPHEX 140+CP 163*	0.00	e 581.7 abc
CP 163*	0.00	e 331.3 abcd
CPHEX 130+CP 163*	0.00	e 91.0 d
TESTIGO	0.00	e 0.0 d

Las medias de las variables con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0.05$).

*CP 163= mutante resistente a 1000 y 1200 μg de estreptomicina y espectinomicina, respectivamente.

CPHEX 1c = testigo altamente efectivo.

^a = tratamiento evaluado en dos ocasiones (se reportan promedios).

planta (328 y 121, respectivamente), siendo también las que presentaron los valores más altos de peso seco de la parte aérea.

Número de nodulos verdes de *Phaseolus vulgaris* L. variedad Bayo Zacatecas en el estudio de competencia en sustrato estéril.

En relación al número de nodulos verdes, se puede decir que si se presentaron diferencias significativas ($\alpha=0.05$) entre tratamientos; sin embargo, si queremos tomar otra variable de referencia para explicar el comportamiento de cada una de las cepas en la formación de estos nodulos, no es posible debido a que los valores presentados son muy heterogéneos, pero se puede mencionar que en general las cepas consideradas como malas y muy malas competidoras son las que dominaron en la producción de los mínimos valores de número de nodulos verdes, con algunas excepciones, tales como las cepas: CPNEX 122, CPNEX 125, CPNEX 1, CPNEX 84, CPNEX 142, CPNEX 131, CPNEX 93 y CPNEX 145, que están dentro de los buenos y muy buenos competidores, de un total de 17 cepas que presentan valores estadísticamente iguales al mínimo valor obtenido (414.7 nodulos verdes 2 plantas⁻¹) que corresponden a la cepa CPNEX 125. Dentro de este grupo se encuentra el mutante patrón CP 143_{1000 1200 est/esp} que

formó un total de 331.3 nódulos verdes 2 plantas⁻¹. Las cepas que también produjeron una cantidad considerable de nódulos verdes fueron la CPHEX 138 (407.2 nódulos verdes 2 plantas⁻¹) y la CPHEX 140 (518.7 nódulos verdes 2 plantas⁻¹) localizados dentro de los competidores regulares, que aún formaron nódulos rojos.

A partir de la CPHEX 122 (407 nódulos verdes 2 plantas⁻¹) ya no se observaron diferencias significativas ($\alpha=0.05$) entre los tratamientos, aunque si se omite esta herramienta, se puede decir que las diferencias son notorias e importantes desde el punto de vista biológico, y que se deben tomar en cuenta para poder explicar el comportamiento de cada cepa seleccionada en condiciones controladas por su capacidad competitiva (CUADRO 5).

Número de nódulos blancos de *Phaseolus vulgaris* L. variedad Bayo Zacatecas en el estudio de competencia en sustrato estéril.

En este caso, la cepa CPHEX 78 fue el tratamiento que formó el máximo número de nódulos blancos (905.7 nódulos 2 plantas⁻¹), siguiéndole las cepas: CPHEX 73 (836.3 nódulos blancos 2 plantas⁻¹) y la CPHEX 76 (808.7 nódulos blancos 2 plantas⁻¹), las cuales están dentro del grupo de los competidores regulares y malos. En tanto que que la CPHEX

111 y CPHEI 100 son altamente competitivas, sin embargo, formaron alto número de nódulos blancos (670.3 y 634.0, respectivamente), aunque la última se comportó como cepa ineficiente.

El valor máximo obtenido de nódulos blancos no presenta diferencias significativas ($\alpha=0.05$) con 18 de los tratamientos. A partir de la cepa CPHEI 103, ya no se observan diferencias con el resto de los tratamientos, pero sí entre tratamientos. También se puede mencionar que las cepas de menor capacidad competitiva formaron en general la mayor cantidad de número de nódulos blancos (CUADRO 6).

Número de nódulos totales de *Phaseolus vulgaris* L. variedad Baya Zacatecas en el estado de competencia en sustrato estéril.

En general, se observó una clara relación entre la capacidad competitiva de las cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* y la formación de los nódulos totales, a excepción de la CPHEX 93 (47.76% de nódulos formados) que presentó el mismo número de nódulos totales (1387.3 nódulos totales 2 plantas⁻¹). Este tratamiento no presentó diferencias significativas ($\alpha=0.05$) con 8 cepas más, de las cuales 5 son de las mejores en capacidad competitiva y el resto tienen menos del 50% de habilidad

CUADRO 6. Medias del número de nódulos blancos y totales de *Phaseolus vulgaris* L. variedad Bayo Zacatecas inoculado con diferentes cepas de *Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli* más el mutante CP 163/1000 1200 est/exp en una relación 1:1.

TRATAMIENTO	NUMERO DE NODULOS & PLANTAS ⁻¹	
	BLANCOS	TOTALES
CPMEX 93+CP 163*	206.3 defg	1387.3 a
CPMEX 84+CP 163*	218.3 defg	1107.0 ab
CPMEX 85+CP 163* ²	315.0 cdefg	963.3 abc
CPMEX 99+CP 163* ²	364.7 bcdefg	779.0 bc
CPMEX 1c	212.3 defg	552.7 bcd
CPMEX 153+CP 163*	411.7 abcdefg	621.0 bc
CP 163+CP 163*	117.3 efg	473.0 cd
CPMEX 131+CP 163*	212.3 defg	629.0 bc
CPMEX 120+CP 163* ²	381.0 bcdefg	687.3 bc
CPMEX 162+CP 163*	210.3 defg	579.0 bc
CPMEX 122+CP 163*	359.0 bcdefg	685.0 abc
CPMEX 123+CP 163*	214.3 defg	668.3 bc
CPMEX 1+CP 163* ²	432.7 abcdefg	680.3 abc
CPMEX 70+CP 163*	224.3 defg	487.0 bc
CPMEX 111+CP 163*	690.3 abcd	676.7 abc
CPMEX 165+CP 163*	309.0 cdefg	569.7 bc
CPMEX 101+CP 163*	271.0 defg	500.0 cd
CPMEX 119+CP 163*	352.0 bcdefg	489.0 cd
CPMEX 80+CP 163*	415.7 abcdefg	611.7 bc
CPMEX 158+CP 163*	577.0 abcdef	796.3 bc
CPMEX 134+CP 163*	291.7 cdefg	630.3 bc
CPMEX 118+CP 163*	514.3 abcdefg	726.0 bc

CUADRO 6. CONTINUACION

TRATAMIENTO	NUMERO DE NODULOS E PLANTAS ⁻¹	
	BLANCOS	TOTALES
CPNEX 90+CP 163*	808.7 abc	976.7 abc
CPNEX 103+CP 163*	596.3 abcdef	683.0 bc
CPNEX 139+CP 163*	225.3 defg	546.0 cd
CPNEX 127+CP 163**	412.0 abcdefg	451.7 cd
CPNEX 100+CP 163*	634.0 abcde	679.0 bc
CPNEX 141+CP 163*	256.7 defg	591.7 bc
CPNEX 138+CP 163*	149.7 efg	757.0 bc
CPNEX 125+CP 163*	134.0 efg	748.7 bc
CPNEX 126+CP 163*	142.0 efg	537.3 cd
CPNEX 78+CP 163*	906.7 a	977.0 abc
CPNEX 124+CP 163*	595.0 abcdef	643.3 bc
CPNEX 82+CP 163*	554.3 abcdef	739.7 bc
CPNEX 75+CP 163*	836.3 ab	917.0 abc
CPNEX 137+CP 163*	204.0 defg	548.0 cd
CPNEX 105+CP 163*	460.3 abcdefg	614.0 bc
CPNEX 107+CP 163*	596.3 abcdef	784.7 bc
CPNEX 140+CP 163*	106.7 fg	688.3 bc
CP 163*	418.7 abcdefg	750.0 bc
CPNEX 130+CP 163*	503.0 abcdefg	594.0 bc
TESTIGO	0.0 g	0.0 d

Las medias de las variables con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0.05$).

*CP 163= mutante resistente a 1000 y 1200 μg de estreptomisina y espectinomicina, respectivamente.

CPNEX ic = testigo altamente efectiva.

* = tratamiento evaluado en dos ocasiones (se reportan promedios).

competitiva. El resto de cepas no presentó diferencias significativas a partir de la CPHEX 78 (977.0 nódulos totales 2 plantas⁻¹) a pesar de que el valor mínimo obtenido, el cual pertenece a la CPHEX 127 (451.7 nódulos totales 2 plantas⁻¹) fue casi un 50% menor, que en términos biológicos es de gran importancia, sobre todo si esa nodulación es ineficiente en la fijación de nitrógeno.

Un aspecto que es importante mencionar, es el efecto de los tratamientos donde se inculó la mezcla del mutante patrón más CPHEX 1 y la CPHEX 1 sola (CPHEX 1c) en la formación de nódulos rojos, verdes, blancos y totales (CUADROS 5 y 6). Cuando se inculó con la mezcla, se obtuvo una mayor cantidad de nódulos totales (880.3 nódulos 2 plantas⁻¹) en contraste con lo producido por la cepa CPHEX 1 sola (552.7 nódulos 2 plantas⁻¹), observándose así un claro efecto de la cepa patrón al incrementar la cantidad de nódulos formados, solo que este aumento se reflejó principalmente en la presencia de una alta cantidad de nódulos verdes y blancos. El peso seco de la parte aérea del tratamiento donde se inculó la CPHEX 1 más el mutante patrón puso en evidencia el alto número de nódulos verdes y blancos al obtenerse un valor menor (1.63g 2 plantas⁻¹) en contraste con el valor obtenido cuando se inculó la CPHEX1 sola (1.787 g 2 plantas⁻¹). Dichos resultados explican de alguna manera que la presencia de cepas altamente

competitivas influyen en la expresión de la capacidad competitiva de otra cepa, dando como consecuencia lógica un bajo rendimiento de biomasa aérea (CUADRO 6).

Peso seco de nódulos raíes de *Phaseolus vulgaris* L. variedad Bayo Zacatecas en el estudio de competencia en sustrato estéril.

Las cepas que presentaron los valores más altos de peso seco de nódulos eficientes, y que resultaron estadísticamente iguales ($\alpha=0.05$) fueron: CPNEX 85 (211.09 mg 2 plantas⁻¹), CPNEX 93 (187.45 mg 2 plantas⁻¹), CPNEX 120 (170.19 mg 2 plantas⁻¹) y CPNEX 84 (153.70 mg 2 plantas⁻¹). Por otra parte, la CPNEX 99 (140.73 mg 2 plantas⁻¹) presentó diferencias significativas ($\alpha=0.05$) con las cepas que produjeron el máximo peso de nódulos eficientes y con el resto de las cepas (CUADRO 7). De este grupo, la excepción fue la cepa CPNEX 93, ya que se trata de una cepa que formó menos del 50% de nódulos.

La CPNEX 1c (testigo eficiente) produjo un peso seco de nódulos eficientes de 53.56 mg 2 plantas⁻¹, que es un valor estadísticamente diferente ($\alpha=0.05$) al de las 9 cepas que presentaron los valores más altos, y que están dentro los buenos, muy buenos y excelentes competidores, pero sin diferencias significativas con el resto de las cepas que

CUADRO 7. Medias del peso seco de nódulos rojos y verdes de *Phaseolus vulgaris* L. inoculado con diferentes cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* más el mutante CP 103,000 más est/esp en una relación 1:1.

TRATAMIENTO	PESO SECO DE NÓDULOS mg ± PLANTAS ⁻¹	
	ROJOS	VERDES
CPREX 85+CP 163 ⁰	211.09 a	71.88 a
CPREX 93+CP 163 ⁰	187.45 ab	55.86 a
CPREX 120+CP 163 ⁰	170.19 ab	52.00 a
CPREX 84+CP 163 ⁰	153.70 ab	79.16 a
CPREX 99+CP 163 ⁰	140.73 b	24.72 a
CPREX 129+CP 163 ⁰	76.83 c	95.33 a
CPREX 162+CP 163 ⁰	75.36 cd	79.16 a
CP 162+CP 163 ⁰	74.57 cd	50.17 a
CPREX 131+CP 163 ⁰	65.52 cde	63.68 a
CPREX 1c	53.56 cdef	37.14 a
CPREX 123+CP 163 ⁰	50.43 cdef	75.01 a
CPREX 1+CP 163 ⁰	41.91 cdef	61.41 a
CPREX 70+CP 163 ⁰	40.27 cdef	89.12 a
CPREX 101+CP 163 ⁰	34.38 cdef	90.63 a
CPREX 165+CP 163 ⁰	30.05 cdef	43.73 a
CPREX 111+CP 163 ⁰	28.55 cdef	57.77 a
CPREX 119+CP 163 ⁰	27.43 cdef	31.32 a
CPREX 122+CP 163 ⁰	25.13 cdef	43.05 a
CPREX 118+CP 163 ⁰	15.53 cdef	42.04 a
CPREX 80+CP 163 ⁰	14.36 def	70.89 a
CPREX 134+CP 163 ⁰	9.69 ef	47.25 a
CPREX 158+CP 163 ⁰	6.20 ef	48.88 a

CUADRO 7. CONTINUACION

TRATAMIENTO	PESO SECO DE NODULOS mg 2 PLANTAS ⁻¹	
	ROJOS	VERDES
CPMEX 90+CP 163*	6.00	ef 41.12 a
CPMEX 127+CP 163* ^a	0.00	f 17.56 a
CPMEX 139+CP 163*	0.00	f 56.84 a
CPMEX 141+CP 163*	0.00	f 56.53 a
CPMEX 100+CP 163*	0.00	f 0.00 a
CPMEX 137+CP 163*	0.00	f 68.50 a
CPMEX 138+CP 163*	0.00	f 91.18 a
CPMEX 125+CP 163*	0.00	f 82.71 a
CPMEX 126+CP 163*	0.00	f 59.47 a
CPMEX 78+CP 163*	0.00	f 55.99 a
CPMEX 124+CP 163*	0.00	f 26.00 a
CPMEX 82+CP 163*	0.00	f 61.37 a
CPMEX 75+CP 163*	0.00	f 33.90 a
CPMEX 103+CP 163*	0.00	f 44.20 a
CPMEX 105+CP 163*	0.00	f 99.71 a
CPMEX 107+CP 163*	0.00	f 71.42 a
CPMEX 140+CP 163*	0.00	f 95.82 a
CP 163* \bar{O}	0.00	f 81.75 a
CPMEX 130+CP 163*	0.00	f 35.38 a
TEST100	0.00	f 0.00 a

Las medias de las variables con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0.05$).

CP 163* = CP 163_{10000 10000 est/esp.}

CPMEX 10 = cepa testigo altamente efectiva.

* = tratamientos evaluados en dos ocasiones (se reportan promedios).

presentaron nódulos rojos, lo que indica que la masa nodular eficiente formada por estas cepas es muy baja en comparación al valor máximo obtenido con el tratamiento que contenía CPNEX 85.

En este caso sí se puede mencionar que la presencia de un alto valor de peso seco de nódulos eficientes en la fijación de nitrógeno (rojos) estuvo directamente relacionado con la capacidad competitiva de cepas de *Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli* cuando fueron inoculadas en concentraciones equivalentes 1:1 con el mutante patrón en la variedad de frijol Bayo Zacatecas, ya que en general los valores más altos de biomasa nodular eficiente los presentaron las cepas que resultaron con una mayor habilidad competitiva; sin embargo, la cepa CPNEX 155 no produjo el mismo peso de nódulos eficientes, a pesar de haber formado el 100% de nódulos (CUADRO 7).

Es muy importante mencionar que 17 de las cepas seleccionadas no presentaron biomasa nodular eficiente (CUADRO 7), a pesar de haber sido seleccionadas previamente como eficientes en la fijación de nitrógeno en la variedad Bayo Durango. Probablemente, se deba al efecto de la variedad de frijol en la cual fueron inoculadas, ya que la simbiosis que se establece entre cepas de *Rhizobium* y plantas leguminosas está determinada en parte por la especificidad de la bacteria por el hospedero. Dicha falta

de especificidad puede explicar de alguna manera los motivos por los cuales no se obtienen resultados satisfactorios cuando se introduce una cepa en un suelo que contiene cepas de *Rhizobium* nativas, tanto en condiciones controladas como de campo.

En general, las cepas de *Rhizobium* sólo son evaluadas por su eficiencia, sin tomar en cuenta los demás factores que influyen en la simbiosis *Rhizobium*-Leguminosa, el entendimiento y manejo de dichos factores podría en un futuro llevar a la sustitución de los fertilizantes nitrogenados que además de ser muy caros, el uso en cantidades excesivas los ha convertido en importantes fuentes de contaminación tanto de suelos, como de Santos acuíferos y atmósfera.

Es necesario recalcar que, una cepa seleccionada en condiciones controladas no va a presentar el mismo comportamiento en condiciones naturales; no obstante, se pueden obtener buenos resultados si se evalúan los factores del suelo que afectan la simbiosis así como los factores climáticos y genéticos.

Peso seco de nódulos verdes (ineficientes) de *Phaseolus vulgaris* L. en el Estudio de Competencia en Sustrato Estéril.

En lo que se refiere al peso seco de nódulos verdes, no se observaron diferencias significativas ($\alpha=0.05$) entre los tratamientos (mezcla de cepas), ni se observó ninguna relación con la capacidad competitiva de las cepas debido a que presentaron una gran variabilidad en la biomasa de nódulos verdes. Se encontró que la CPME1 155, que formó el 100% de los nódulos en la planta produjo uno de los valores más altos de nódulos verdes ($95.33 \text{ mg } 2 \text{ plantas}^{-1}$), así esto explica la baja producción de peso de la parte aérea y masa nodular eficiente.

La mutante CP 163₁₀₀₀ 120085t/cep presentó un peso seco de nódulos verdes de $81.75 \text{ mg } 2 \text{ plantas}^{-1}$, lo que la ubicó dentro de las 8 primeras cepas, que es evidencia de su carácter ineficiente.

Por otro lado, la cepa CPME1 105, que formó el 23.34% de nódulos, fue la que presentó el valor máximo de peso seco de nódulos verdes ($99.71 \text{ mg } 2 \text{ plantas}^{-1}$) de lo que se puede inferir que la mayor cantidad de nódulos fue formada por la cepa ineficiente (mutante resistente a antibióticos). Dicha cepa, también formó parte del grupo de cepas que no presentó nódulos eficientes (rojos), lo cual se reflejó en la biomasa

de la parte aérea que fue de 1.210 g 2 plantas⁻¹, siendo un valor con diferencias significativas ($\alpha=0.05$) con respecto a los tratamientos que sí formaron nodulación eficiente. Un fenómeno similar se observó con la cepa CPHEX 140, con un peso seco de nódulos verdes de 95.82 mg 2 plantas⁻¹ y un peso seco de parte aérea de 1.047 g 2 plantas⁻¹, que fue menor a la del testigo absoluto (1.067 g 2 plantas⁻¹) aunque sin diferencias significativas ($\alpha=0.05$). El tratamiento en el cual estuvo involucrada la cepa CPHEX 138, se obtuvo un peso seco de nódulos verdes de 91.18 mg 2 plantas⁻¹ y un peso seco de parte aérea de 0.893 g 2 plantas⁻¹, que además de ser menor a la del testigo absoluto fue menor al de la cepa patrón, aunque las diferencias estadísticas no fueron significativas ($\alpha=0.05$); en la misma situación se vio la cepa CPHEX 125.

En relación a las cepas que fueron seleccionadas como altamente competitivas y que produjeron una masa de nódulos verdes considerable se pueden mencionar a las cepas: CPHEX 162, con 79.16 mg 2 plantas⁻¹; la CPHEX 84, que presentó un peso seco de nódulos verdes igual al de la anterior; la CPHEX 131, con 63.68 mg 2 plantas⁻¹ y la cepa CPHEX 1 con 61.41 mg 2 plantas⁻¹. Este es un aspecto que se debe tomar en cuenta, ya que efectivamente se comportaron como cepas altamente competitivas, pero tienen la capacidad de formar nódulos ineficientes en la fijación de nitrógeno, que de

alguna manera explica que sean cepas que den como resultado un menor peso seco de parte aérea (CUADRO 7).

Peso seco de nódulos blancos (ineficientes) de *Phaseolus vulgaris* L. variedad Bayo Zacatecas en el Estudio de Competencia en Sustrato Estéril.

En general, se observaron diferencias significativas ($\alpha=0.05$) entre los tratamientos (39 cepas evaluadas), encontrándose una mayor masa de nódulos blancos en las cepas que resultaron con una capacidad competitiva baja (competidores regulares, malos y muy malos). Dentro de este grupo de cepas, la CPNEX 73 con 27.77% de nódulos formados presentó la mayor biomasa de nódulos blancos (ineficientes) siendo de 188.15 mg 2 plantas⁻¹; en adición, 6 cepas más presentaron valores sin diferencias significativas con la anterior, de estas la CPNEX 111 que formó el 96.76% de nódulos en la planta, presentó un peso seco de nódulos blancos de 128.0 mg 2 plantas⁻¹ que resultó superior a los valores de peso seco, tanto de nódulos rojos como de nódulos verdes (38.55 mg 2 plantas⁻¹ y 57.77 mg 2 plantas⁻¹ respectivamente), pero esto no influyó en su capacidad de fijación de nitrógeno (N₂). Por lo que se puede decir que no necesariamente una cepa deba producir una gran masa nodular eficiente para proporcionar el nitrógeno necesario para la

CUADRO 8. Medias del peso seco de nódulos blancos y totales de *Phaseolus vulgaris* L. inoculado con diferentes cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* más el mutante CP 183₁₀₀₀ (200 est/exp en una relación 1:1).

TRATAMIENTO	PESO SECO DE NODULOS mg 8 PLANTAS ⁻¹	
	BLANCOS	TOTALES
CPHEX 85+CP 163 ^{ab}	36.20 fgh	319.17 a
CPHEX 93+CP 163 ^a	44.04 efgh	287.35 ab
CPHEX 120+CP 163 ^{ab}	52.00 efgh	274.19 abc
CPHEX 84+CP 163 ^a	39.62 efgh	272.48 abcd
CPHEX 99+CP 163 ^{ab}	55.88 defgh	221.34 abcdef
CPHEX 155+CP 163 ^a	43.57 efgh	215.73 abcdefg
CPHEX 162+CP 163 ^a	33.56 fgh	188.08 bcdefghi
CP 162+CP 163 ^a	14.65 gh	139.39 efghi
CPHEX 131+CP 163 ^a	33.19 fgh	162.38 cdefghi
CPHEX 1c	49.53 efgh	160.23 cdefghi
CPHEX 123+CP 163 ^a	33.42 fgh	158.87 cdefghi
CPHEX 1+CP 163 ^{ab}	47.59 efgh	150.92 defghi
CPHEX 70+CP 163 ^a	32.78 fgh	162.17 cdefghi
CPHEX 101+CP 163 ^a	45.92 efgh	170.92 bcdefghi
CPHEX 165+CP 163 ^a	45.64 efgh	119.39 efghij
CPHEX 111+CP 163 ^a	128.00 abcde	214.31 abcdefgh
CPHEX 119+CP 163 ^a	53.42 defgh	112.17 efghij
CPHEX 122+CP 163 ^a	26.75 fgh	114.94 efghij
CPHEX 118+CP 163 ^a	78.22 cdefgh	135.79 efghi
CPHEX 80+CP 163 ^a	60.82 cdefgh	146.07 efghi
CPHEX 134+CP 163 ^a	37.96 efgh	94.90 ghij
CPHEX 158+CP 163 ^a	92.75 bcdefg	147.83 efghi

CUADRO B. CONTINUACION

TRATAMIENTO	PESO SECO DE MODULOS mg 2 PLANTAS ⁻¹	
	BLANCOS	TOTALES
CPREX 90+CP 163*	142.36 abcd	189.52 bcdefghi
CPREX 127+CP 163* ^a	82.53 cdefgh	100.09 fghij
CPREX 139+CP 163*	35.31 fgh	92.15 hij
CPREX 141+CP 163*	34.88 fgh	91.42 ij
CPREX 100+CP 163*	149.99 abc	149.99 defghi
CPREX 137+CP 163*	29.01 fgh	97.52 ghij
CPREX 138+CP 163*	15.83 gh	107.01 fghij
CPREX 125+CP 163*	10.95 gh	93.66 ghij
CPREX 126+CP 163*	14.84 gh	74.31 ij
CPREX 78+CP 163*	177.95 ab	233.94 abcde
CPREX 124+CP 163*	112.80 abcdef	138.81 efghi
CPREX 82+CP 163*	90.53 bcdefg	151.90 cdefghi
CPREX 73+CP 163*	188.15 a	222.05 abcdef
CPREX 103+CP 163*	87.27 cdefgh	131.47 efghi
CPREX 105+CP 163*	59.25 defgh	158.96 cdefghi
CPREX 107+CP 163*	82.02 cdefgh	153.44 cdefghi
CPREX 140+CP 163*	10.78 gh	106.60 fghij
CP 163*	31.31 fgh	113.06 efghij
CPREX 130+CP 163*	99.83 abcdefg	135.21 efghi
TESTIGO	0.00 h	0.00 j

Las medias de las variables con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0.05$).

CP 163* = CP 163,000 2000 est/exp.

CPREX ic = cepa testigo altamente efectiva.

^a = tratamientos evaluados en dos ocasiones (se reportan promedios).

planta.

La CPMEX 100 produjo una masa de nódulos blancos de 149.99 mg 2 plantas⁻¹ pero no formó nódulos verdes ni rojos, además de comportarse como altamente competitiva formando el 92.23% de nódulos de la planta. En condiciones naturales este tipo de comportamiento posiblemente sea el más común, y por ende uno de los principales factores que han influido en general en la baja respuesta de cepas introducidas, que se evalúan en presencia de cepas nativas tanto en condiciones controladas como en campo.

Con respecto a las cepas altamente competitivas (competidores excelentes, muy buenos y buenos), en general produjeron una masa de nódulos blancos más baja encontrándose entre los 56 y 15 mg 2 plantas⁻¹ sin diferencias significativas ($\alpha=0.05$) entre ellas. Además de que no se observó una relación evidente con la capacidad competitiva, es decir, que no precisamente la cepa más competitiva produjo menos masa de nódulos blancos, ya que los valores son muy heterogéneos (CUADRO B).

Peso seco de nódulos totales de *Phaseolus vulgaris* L. variedad Bayo Zacatecas en el Estado de Coahuila en Sustrato Estéril.

En lo que se refiere a los nódulos totales, éste sí estuvo relacionado directamente con la capacidad competitiva de cada uno de los grupos de cepas, ya que los valores más altos corresponden a los competidores buenos, muy buenos y excelentes; aunque sin llevar un orden estricto, por ejemplo la CPHEX 155 que forzó el 100% de los nódulos en la planta no fue la que produjo la máxima biomasa nodular, aunque sí quedó dentro del grupo de 7 cepas que presentaron valores sin diferencias estadísticas significativas ($\alpha=0.05$) al máximo valor obtenido, presentado por la cepa CPHEX 85 con $319.17 \text{ mg } 2 \text{ plantas}^{-1}$, de los cuales 211.09 correspondieron a la biomasa de los nódulos eficientes (que también fue el máximo valor). El mismo esquema lo presentó la CPHEX 93, que en orden descendente presentó el segundo lugar con $267.35 \text{ mg } 2 \text{ plantas}^{-1}$ de masa nodular total, de los cuales 187.45 mg correspondieron al peso seco de nódulos rojos. La cepa que ocupó el tercer lugar fue la CPHEX 120 con $274.19 \text{ mg } 2 \text{ plantas}^{-1}$, de los cuales 170.19 mg correspondieron a la masa de nódulos rojos; en tanto que la CPHEX 84 produjo $272.48 \text{ mg } 2 \text{ plantas}^{-1}$ de peso seco de nódulos totales, siendo 153.70 mg la biomasa de los nódulos rojos. Estas cuatro cepas

presentaron el peso seco de nódulos rojos más alto, sin diferencias significativas ($\alpha=0.05$) entre ellas, lo que indica que en este caso la biomasa nodular estuvo determinada por el peso seco de nódulos eficientes en la fijación de Nitrógeno (CUADRO 8).

Las cepas CPNEX 78 y CPNEX 73 que produjeron un peso de nódulos totales de 233.94 y 222.05 mg 2 plantas⁻¹ respectivamente, fueron las que presentaron los valores más altos en peso seco de nódulos blancos (188.15 y 177.95 mg 2 plantas⁻¹, respectivamente), por lo que la biomasa nodular estuvo representada por la presencia de nódulos ineficientes en la fijación de nitrógeno. Estas cepas no formaron nódulos rojos (eficientes) y se caracterizaron además por presentar una capacidad competitiva muy baja de ahí que el autante ineficiente formó la mayor biomasa nodular.

La CPNEX 135 fue otra de las cepas que presentó un peso seco de nódulos totales alto (215.73 mg 2 plantas⁻¹), e igualmente en este caso el peso total estuvo determinado por la masa nodular ineficiente (nódulos verdes y blancos). Sin embargo, no se observó efecto depresivo en la fijación de nitrógeno, ya que fue una de las mejores cepas en lo que se refiere a producción de biomasa aérea, encontrándose dentro del grupo que sólo presenta diferencias significativas ($\alpha=0.05$) con los valores máximos. La CPNEX 111 también presentó un peso seco de nódulos totales alto,

(estadísticamente igual al valor máximo), con 214.31 mg 2 plantas⁻¹, de los cuales 128.00 fueron de la biomasa de los nódulos blancos.

El resto de las cepas presentó valores estadísticamente iguales ($\alpha=0.05$) a la cepa DMEX 111; lo cual indica que la capacidad competitiva de las cepas está relacionada con la biomasa nodular total (CUADRO 8).

EXPERIMENTO II. Competencia en Suelo con Cepas Nativas de *Rhizobium*.

Marcaje de las cepas con Kanamicina.

El marcaje de las cepas se realizó en un periodo de 3 meses, debido principalmente a la dificultad de encontrar dosis mínimas en las que se desarrollaran las cepas mutantes espontáneas. Esta característica las hizo diferentes a la cepa CP 163, la cual desde el principio creció en placas preparadas con 100 μ g de estreptomicina (est). Las cepas en cuestión se desarrollaron a una concentración de 0.1 μ g de kanamicina (kan). Otro de los aspectos que también se observaron fue el intervalo de concentración en el cual se desarrollaron estas cepas, ya que se tuvieron que preparar

placas con tan solo 1 μg de diferencia al inicio de la selección de los mutantes resistentes, posteriormente fue de 5 μg y luego a intervalos distintos hasta que finalmente se logró obtener cepas que crecieron a intervalos de 100 μg de kan, obteniendo finalmente cepas resistentes a 1000 μg de kan. Respecto a la prueba de estabilidad, ésta fue más rápida, debido a que se desarrolló la misma cantidad de colonias en las placas con 1000 μg de kan y en las placas sin antibiótico.

Prueba de nodulación de los mutantes resistentes a 1000 μg de kan.

La prueba de nodulación resultó ser positiva para cuatro de los mutantes obtenidos (CPHEX 84, CPHEX 111, CPHEX 120 y CPHEX 135). En tanto que, el mutante de la cepa CPHEX 131 no noduló, lo que indica que el antibiótico afectó dicho carácter en la célula bacteriana. Este efecto fue corroborado al volver a realizar la prueba de nodulación del mutante CPHEX 131₁₀₀₀kan. Por otra parte la cepa parental formó suficientes nódulos, que dieron como resultado una parte aérea vigorosa, presentando el máximo valor de peso seco de la parte aérea (CUADRO 9).

En el CUADRO 9 se presentan los resultados de las pruebas de nodulación y habilidad competitiva de los 5

CUADRO 9. Medias del peso seco de la parte aérea y raíz de *Phaseolus vulgaris* L. variedad Bayo Zacatecas de la prueba de nodulación de 5 mutantes resistentes a 1000 µg de kanamicina.

TRATAMIENTO	PESO SECO g ± PLANTAS ⁻¹	
	PARTE AÉREA	RAÍZ
CPHEX 155	1.330 ab	0.4100 ab
CPHEX 155 ₁₀₀₀ kan	1.105 abcd	0.5000 ab
CPHEX 155 ₁₀₀₀ kan†	0.880 bcdef	0.4650 ab
CPHEX 84	1.227 abc	0.3850 b
CPHEX 84 ₁₀₀₀ kan	1.075 abcde	0.4150 ab
CPHEX 84 ₁₀₀₀ kan†	0.837 cdef	0.4550 ab
CPHEX 120	1.010 bcdef	0.3825 b
CPHEX 120 ₁₀₀₀ kan	0.917 bcdef	0.4750 ab
CPHEX 120 ₁₀₀₀ kan†	0.730 def	0.4675 ab
CPHEX 111	1.143 abcd	0.4375 ab
CPHEX 111 ₁₀₀₀ kan	1.067 abcde	0.3450 b
CPHEX 111 ₁₀₀₀ kan†	0.633 ef	0.3700 b
CPHEX 131	1.502 a	0.4675 ab
CPHEX 131 ₁₀₀₀ kan	0.892 bcdef	0.4925 ab
CPHEX 131 ₁₀₀₀ kan†	0.755 def	0.4100 ab
CP163 ₁₀₀₀ 1200est/esp	0.575 f	0.4500 ab
TESTIGO	0.870 bcdef	0.6000 a

Las medias de las variables con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0.05$).

† Inoculadas junto con el mutante CP163₁₀₀₀ 1200est/esp en una relación 1:1.

mutantes resistentes a 1000 µg de kanamicina (kan). Se puede observar que en general los mutantes se comportaron de forma semejante a sus progenitores, excepto el mutante CPMEK 131_{1000kan} que resultó ser totalmente no infectivo, ya que perdió la capacidad de nodulación, de ahí que presentara diferencias significativas ($\alpha=0.05$) con la cepa parental, CPMEK 131, la cual produjo el máximo peso seco de la parte aérea de 1.502 g 2 plantas⁻¹, que en comparación con el del mutante que fue de 0.092 g 2 plantas⁻¹, es casi el doble. Cuando se inoculó junto con el mutante CP 163₁₀₀₀ est/esp en una relación 1:1, el peso seco de la parte aérea no presentó diferencias significativas con el tratamiento inoculado con el mutante resistente a antibióticos de la cepa CP 163, considerada como altamente competitiva pero infectiva, ya que la nodulación fue totalmente ineficiente (nódulos blancos).

Un aspecto muy importante que se presentó es que a excepción del tratamiento CPMEK 131_{1000kan} + CP 163₁₀₀₀ est/esp, los demás tratamientos donde se inoculó junto con el mutante patrón presentaron una biomasa de la parte aérea menor que la del testigo absoluto, aunque sin diferencias significativas ($\alpha=0.05$). En tanto que el valor mínimo fue del mutante CP 163₁₀₀₀ est/esp cuando fue inoculado solo.

También se puede mencionar que el máximo valor de peso

seco de raíz fue del testigo absoluto; aunque sin presentar diferencias significativas con la mayoría de los tratamientos, excepto para CPHEX B4, CPHEX 120, CPHEX 111₁₀₀₀kan y CPHEX 111₁₀₀₀kan + CP 163₁₀₀₀ 1200est/esp.

En general no se observaron diferencias entre la cepa parental, el mutante y en competencia con el mutante resistente a antibióticos CP 163₁₀₀₀ 1200est/esp, en el peso seco de raíz (CUADRO 9).

En cuanto al peso seco y el número de nódulos totales tampoco se presentaron diferencias significativas entre la cepa progenitora, el mutante resistente a 1000 µg de kan y cuando se inocularon en una mezcla con el mutante originado de la cepa patrón CP 163, a excepción del mutante CPHEX 131₁₀₀₀kan por supuesto (CUADRO 10). Sin embargo, a pesar de que una de las cepas marcadas con kan haya perdido su capacidad de nodulación en la variedad de frijol Bayo Zacatecas, no podemos decir que la técnica de resistencia a antibióticos "inducida" sea inadecuada para trabajos ecológicos en *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli; mientras no se tenga una alternativa mejor se seguirá utilizando a pesar de sus desventajas, ya que se ha reportado que afecta parcial o totalmente la capacidad de la bacteria para fijar nitrógeno (Schweinghamer, 1967), así como la pérdida de efectividad, como lo reportado por Zelazna-Kowalska (1971), Jones y Brosfield (1978), con

CUADRO 10. Medias del peso seco y del número de nódulos de *Phaseolus vulgaris* L. variedad Bayo Zacatecas de la prueba de nodulación de 5 mutantes resistentes a 1000 µg de kanamicina.

TRATAMIENTO	PESO SECO NODULOS g 2 PLANTAS ⁻¹	NUMERO DE NODULOS
CPMEX 155	0.15013 a	242.75 ab
CPMEX 155 ₁₀₀₀₀ kan	0.15340 a	380.75 a
CPMEX 155 ₁₀₀₀₀ kan*	0.11770 a	217.25 ab
CPMEX 84	0.11567 ab	233.75 ab
CPMEX 84 ₁₀₀₀₀ kan	0.11207 ab	326.00 a
CPMEX 84 ₁₀₀₀₀ kan*	0.11600 ab	436.00 a
CPMEX 120	0.09162 ab	277.00 a
CPMEX 120 ₁₀₀₀₀ kan	0.06710 bc	373.50 a
CPMEX 120 ₁₀₀₀₀ kan*	0.09923 a	357.50 a
CPMEX 111	0.15017 a	239.25 ab
CPMEX 111 ₁₀₀₀₀ kan	0.09953 ab	286.00 a
CPMEX 111 ₁₀₀₀₀ kan*	0.07112 bc	227.00 ab
CPMEX 131	0.11510 ab	236.00 ab
CPMEX 131 ₁₀₀₀₀ kan	0.00000 c	0.00 b
CPMEX 131 ₁₀₀₀₀ kan*	0.05930 bc	298.00 a
CP163 ₁₀₀₀₀ 12000est/esp	0.06085 bc	257.75 a
TESTIGO	0.00000 c	0.00 b

Las medias de las variables con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0.05$).

* Inoculadas junto con el mutante CP163₁₀₀₀₀ 12000est/esp en una relación 1:1.

mutantes resistentes a estreptomicina, encontraron que fueron menos efectivos simbióticamente que sus progenitores, aunque sólo dos de ellos difirieron significativamente ($P > 0.01$), además de que fueron menos competitivos en términos de formación de nódulos.

Turco et al. (1986) también reportaron un estudio de la efectividad y capacidad competitiva de mutantes resistentes a antibióticos (doblemente marcados) de *Rhizobium leguminosarum* y *Bradyrhizobium japonicum*, bajo condiciones controladas, en donde encontraron que el 93% de los mutantes fueron menos competitivos en la habilidad de formar nódulos en relación a sus cepas originales; además de que el 38% de los mutantes presentó una disminución en su capacidad de fijar nitrógeno. Mencionan que la resistencia a antibióticos produce algunos cambios fisiológicos en las cepas.

Se tienen reportes que dan evidencias de que las cepas resistentes a antibióticos no necesariamente pierden la capacidad de infectar al hospedero o su habilidad para fijar nitrógeno. Collobin y Levin (1974) observaron que mutantes resistentes a estreptomicina de *R. japonicum* conservaron su propiedad de infectividad y efectividad. Berg et al. (1988) reportaron que el comportamiento de 4 cepas resistentes a antibióticos (rifampicina, ácido nalidixico y estreptomicina) fue similar al de sus cepas originales,

tanto en su capacidad de nodulación, como en el carácter de fijación de nitrógeno, además de que algunos mutantes fueron más efectivos en relación a sus cepas originales.

Competencia en Suelo con Cepas Nativas de *Rhizobium*

Los resultados más sobresalientes se observaron cuando se aplicaron 40 ppm de P y 0 ppm de N, más la inoculación con la mezcla de los dos mutantes resistentes a antibióticos (FIGURA 2). El mutante CPMEK 155₁₀₀₀₀ tuvo la capacidad de formar el 48.96% de los nódulos por dos plantas, en tanto que el mutante CP 143₁₀₀₀₀ formó tan sólo el 9.34% de los nódulos, correspondiéndole a las cepas nativas el 42.70%. Estos resultados se deben a la fertilización fosfatada, ya que en el caso en el que se inocularon los mutantes tanto en una mezcla con una relación 1:1, como cuando fueron inoculados por separado y no se aplicó fósforo, estuvieron ausentes o con un mínimo porcentaje de nodulación (2.08%, en ambos mutantes). Esto sugiere que se deben de tomar en cuenta otros factores tanto bióticos como abióticos y no solamente el manejo de la cepa seleccionada como efectiva, altamente competitiva y de buena sobrevivencia en condiciones adversas de humedad. Es importante también el uso de la doble inoculación, es decir cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* y hongos

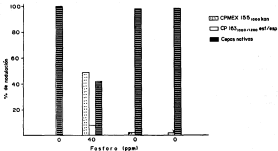


Figura 2. Efecto de la interacción entre la inoculación y la fertilización fosforada en la capacidad competitiva de *Rhizobium (CPMEX 155, CP 163 y Capes nativas)* en frijol Negro Zacatecas.

endosicorrizicos vesiculo-arbuscular (V-A), ya que estos últimos juegan un papel muy importante en la aportación de fósforo en la planta. Se ha reportado que la infección micorrizica o fertilización fosfatada es un prerrequisito para la nodulación en leguminosas en suelos deficientes en P (Munn y Mosse, 1980). El suelo utilizado en este experimento ha sido reportado como deficiente en P (Espínosa-Victoria, 1986).

Peso seco de la parte aérea de *Phaseolus vulgaris* de variedad Bayo Zacatecas inoculado con mutantes resistentes a antibióticos en suelo sin esterilizar.

En la FIGURA 3, se muestra el efecto de la inoculación con *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* y la fertilización nitrogenada y fosfatada sobre el peso seco de la parte aérea de la variedad de frijol Bayo Zacatecas. Se observó que cuando se tiene una fertilización de 40 ppm tanto de P como de N, se obtiene el máximo peso de la parte aérea (3.84 g 2 plantas⁻¹), dicho valor no presenta diferencias significativas ($\alpha=0/05$) con el tratamiento en el cual se aplicaron 40 ppm de P y la inoculación con la mezcla de los mutantes de E. i. bv *phaseoli* (3.6530 g 2 plantas⁻¹), que como ya se mencionó anteriormente fue el tratamiento en el que el mutante IPNEX 155₁₀₀₀₀₀ formó casi el 50% de los

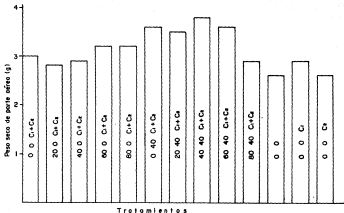


Figura 3. Efecto de la inoculación con *Rhizobium lotuminosarum biovar phaseolii* y fertilización nitrogenada y fosforada en el peso seco de la parte aérea de trébol Bayo Zacatecos. C+ CPMEK 155, 155, 155, 155, 155, 155, 155, 155, 155, 155, 155, 155. C= CP 183, 183, 183, 183, 183, 183, 183, 183, 183, 183, 183, 183. -10, 20, 40, 60, 80 ppm N; 0 y 40 ppm Pi.

nódulos. Esto es de gran importancia ya que podemos sustituir la fertilización nitrogenada por la biológica, lo que nos permitiría disminuir los costos de producción del cultivo de frijol. Almaraz (1989) estimó que por la aplicación de inoculantes se pueden obtener ahorros hasta del 50% con respecto al uso de fertilizantes nitrogenados (sulfato de amonio y urea).

Esto es reforzado con los resultados de peso seco de parte aérea de los tratamientos que fueron fertilizados con 60 ppm de N y 40 ppm de P + inoculación y los de 20 ppm de N y 40 ppm de P + inoculación, así como los fertilizados con 60 y 80 ppm de N + inoculación, que están dentro del grupo que no presentó diferencias significativas ($\alpha=0.05$) con el máximo valor de biomasa aérea (CLASROD 11).

Número y peso seco de nódulos de *Phaseolus vulgaris* de variedad Bayo Zacatecas inoculado con mutantes resistentes a antibióticos en suelo sin esterilizar.

El máximo número de nódulos por dos plantas lo presentó el tratamiento en el cual se inoculó con la mezcla de los mutantes (121.333) los cuales fueron formados por las cepas nativas (FIGURA 2), al igual que en los tratamientos en los cuales se inocularon los mutantes resistentes a antibióticos CPREX 155₁₀₀₀kan y Cp 153₁₀₀₀ 1220est/esp por

separado, formando tan solo el 2.08% del total de nódulos por dos plantas, y que resultaron con 91.5 y 82.0 nódulos por dos plantas, respectivamente; el primero no presentó diferencias significativas ($\alpha=0.05$) con el valor más alto obtenido. Es importante mencionar que el testigo absoluto también presentó un valor alto de nódulos (82.33 nódulos 2 plantas⁻¹) aunque ya con diferencias significativas con los valores más altos. Otro de los tratamientos que produjo una cantidad considerable de nódulos (81.33 nódulos 2 plantas⁻¹) fue el fertilizado con 40 ppm de P + la inoculación con la mezcla de cepas mutantes, los cuales fueron formados casi en un 50% por el mutante efectivo altamente competitivo. Todos estos tratamientos presentaron nódulos rojos (eficientes), además de ser los mejores en peso seco de nódulos (17.1-19.467 g 2 plantas⁻¹).

En general, todos los tratamientos fertilizados con nitrógeno presentaron los valores más bajos de nódulos (55.5-22.5 nódulos 2 plantas⁻¹) los cuales presentaban una coloración blanca y un tamaño pequeño, lo cual se refleja en el peso seco (4.125-0.567 g 2 plantas⁻¹), que en comparación a los valores más altos presentan diferencias significativas ($\alpha=0.05$) (CUADRO 11). Sparrow y Ham (1983) reportaron que cuando se tiene un contenido relativamente alto de nitrógeno (30 ppm) no se observa efecto de la inoculación, en cambio en un suelo con un contenido de

CUADRO 11. Medias del peso seco de la parte aérea, raíz y nódulos totales y número de nódulos de *Phaseolus vulgaris* L. variedad Bayo Zacatecas inoculado con mutantes resistentes a antibióticos, en suelo conteniendo cepas nativas de *Rhizobium*.

TRATAMIENTO	PESO SECO g 2 PLANTAS ⁻¹			NUMERO DE NODULOS
	PARTE AEREA	RAIZ	NODULOS	
P ₀ N ₀ C ₁ +C ₂	3.0030 abc	0.7125 a	0.01910 a	121.33 a
P ₀ N ₁₀₀ C ₁ +C ₂	2.7900 bc	0.5475 a	0.00313 de	55.50 cd
P ₀ N ₁₀₀ C ₁ +C ₂	2.8600 bc	0.5750 a	0.00160 e	31.25 d
P ₀ N ₁₀₀ C ₁ +C ₂	3.1780 abc	0.5775 a	0.00090 e	32.50 d
P ₀ N ₁₀₀ C ₁ +C ₂	3.2375 abc	0.5950 a	0.00135 e	39.64 d
P ₁₀₀ N ₀ C ₁ +C ₂	3.6830 ab	0.5925 a	0.00946 bcd	81.33 bc
P ₁₀₀ N ₁₀₀ C ₁ +C ₂	3.5180 ab	0.6400 a	0.00412 cde	44.66 d
P ₁₀₀ N ₁₀₀ C ₁ +C ₂	3.8400 a	0.5775 a	0.00175 e	41.00 d
P ₁₀₀ N ₁₀₀ C ₁ +C ₂	3.6130 ab	0.6275 a	0.00056 e	27.33 d
P ₁₀₀ N ₁₀₀ C ₁ +C ₂	2.9075 bc	0.6725 a	0.00083 e	32.66 d
P ₀ N ₀ Nat	2.6250 c	0.6175 a	0.01113 bc	91.50 ab
P ₀ N ₀ C ₁	2.8620 bc	0.6300 a	0.01080 bc	82.00 bc
P ₀ N ₀ C ₂	2.6200 bc	0.6900 a	0.01346 ab	82.33 bc

C₁= CPHE1155₁₀₀₀₀/an

C₂= CP163₁₀₀₀₀ 12000st/esp

Nat= cepas nativas

Las medias de las variables con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0.05$)

nitrógeno mineral de 9 ppm la inoculación aumenta el rendimiento de semilla, además de incrementar el número y peso seco de los nódulos. Sears y Huse (1979), en un experimento bajo condiciones de campo con soya (*Glycine max* Merr.), observaron que al aumentar la cantidad de nitrógeno adicionado producía una disminución de la fijación biológica de nitrógeno, así como el número y peso seco de nódulos. Sprent (1979) reportó que el nitrógeno combinado inhibió la nodulación y la fijación biológica de nitrógeno, además de que aceleró la senectud de los nódulos. También Gibson (1974) había reportado que los nitratos y otras formas de nitrógeno combinado retardaban el desarrollo de los nódulos y en concentraciones altas causaba pérdidas en el peso seco de los nódulos y aceleraba la senectud de los nódulos.

CONCLUSIONES

- La evaluación de cepas efectivas de *Micobium leguminosarum biovar phaseoli* por su capacidad competitiva permitió determinar el comportamiento de 39 cepas frente a un mutante resistente a antibióticos, originado de una cepa altamente competitiva e inefectiva.

- De las 39 cepas evaluadas 9 de ellas (CPNEX 155, CPNEX 131, CPNEX 111, CPNEX 120, CPNEX 100, CPNEX 84, CPNEX 85 y CPNEX 162) formaron más del 70% de los nódulos, de las cuales la CPNEX 155 fue la única que formó el 100%.

- Las cepas que presentaron una capacidad competitiva en la formación de nódulos mayor al 50% fueron las que produjeron un peso seco de la parte aérea mayor (2.413 a 1.797 g por 2 plantas), debido a la presencia de una mayor cantidad de nódulos rojos (967 a 51.67 g por 2 plantas) (eficientes), que es un criterio más convincente de la efectividad de las cepas evaluadas.

- En la selección de cepas, el mejor indicador de la capacidad competitiva de una determinada cepa de *Rhizobium*, es el porcentaje de nodulación.

- La evaluación de cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* por su capacidad competitiva se debe llevar a cabo en diferentes genotipos de frijol, por la especificidad de la cepa por el hospedero, ya que de 39 cepas efectivas evaluadas, 17 se comportaron como inefectivas, en la variedad Bayo Tacatecas.

- El método de Graham (comun. pers.) para evaluar cepas de *Rhizobium*, por su capacidad competitiva en este caso *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* es confiable, ya que es posible reproducir los resultados.

- La técnica de resistencia inducida a antibióticos puede ser usada para la identificación de cepas *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*, corroborando infectividad, efectividad y habilidad competitiva de las mismas, mientras no se tenga una técnica más apropiada.

- El mutante CPNEX 155₁₀₀₀ requiere de una concentración de 40 ppm de P en el suelo para poder manifestar su potencial competitivo en la formación de nodulos, en la variedad Bayo Tacatecas.

- La selección de cepas por su capacidad competitiva nos proporciona un criterio más para determinar si una cepa puede ser recomendada para su uso como

inoculante; sin embargo, es necesario corroborar su comportamiento en suelo no esterilizado tanto a nivel de invernadero como bajo condiciones de campo.

BIBLIOGRAFÍA

- Alexander, M. 1966. Introducción a la microbiología del suelo. AST., S.A. 2a. México.
- Almaraz, S.J.J. y R. Ferrera-Cerrato. 1967. Evaluación y selección de cepas de *Rhizobium phaseoli* eficientes en fijación de nitrógeno, aisladas de Zacatecas, Durango y Aguascalientes. Proyecto Título XII. Informe (Avances) 1966. Colegio de Postgraduados, Montecillo, México.
- Almaraz, S.J.J. 1968. Empleo de la técnica de raíz dividida en el estudio ecológico de la simbiosis *Rhizobium phaseoli-Phaseolus vulgaris* L. bajo sequía. Tesis Profesional. UACH, Chapingo, México.
- Almaraz, S.J.J. y R. Ferrera-Cerrato. 1967. Consideraciones teóricas sobre la economía de nitrógeno para la inoculación de frijol y soya en México. Memorias del XXII Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo. Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. pp. 134.
- Amabile, C. 1968. La resistencia bacteriana a los antibióticos. Ciencia y Desarrollo, No. 90:57-68.
- Amarger, N. 1981a. Competition for nodule formation between effective and ineffective strains of *Rhizobium meliloti*. *Field. Sci. Biotech.* 15: 475-480.
- Amarger, N. 1981b. Selection of *Rhizobium* strains on their competitive ability for nodulation. *Field. Sci. Biotech.* 13:481-486.
- Banco de México. 1982. Cultivos del maíz y frijol en México, participación del FIRA en su producción. Banco de México.
- Bazan, R. 1975. Nitrogen fertilization and management of grain legume in Central America. p. 228-245. In: Eisser in Tropical America. Proc. of a seminar at CIAT. Cali, Colombia, 1975.

- Beattie, G.A., and J. Handelsman. 1989. A rapid method for the isolation and identification of *Rhizobium* from root nodules. *Journal of Microbiological Methods*. 9: 29-33.
- Berg, R.K., T.E. Loynachan, R.M. Zablotowicz, and M.T. Lieberman. 1988. Nodule occupancy by introduced *Bradyrhizobium japonicum* in Iowa Soils. *Agronomy J.* 80: 874-881.
- Berger, J.A., S.N. May, L.R. Berger, and B.B. Bohlool. 1979. Colorimetric enzyme-linked immunosorbent assay for the identification of strains of *Rhizobium* in culture and in the nodules of lentils. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 642-646.
- Bonkerd, N., D.F. Heber, and D.F. Bendrick. 1978. Influence of *Rhizobium japonicum* strain and inoculation methods on soybeans grown in rhizobia populated soil. *Agron. J.* 70: 547-549.
- Brockwell, J., E.A. Schweinghauser, and R.R. Gault. 1977. Ecological studies of root-nodule bacteria introduced into field environments. V. A critical examination of the stability of antigenic and streptomycin-resistance markers for identification of strains of *Rhizobium trifolii*. *Field Crops Res. & Biotechnology*. 9: 19-24.
- Bronfield, E.S.P., and D.S. Jones. 1980. Studies on double strain occupancy of nodules and the competitive ability of *Rhizobium trifolii* on red and white clover grown in soil and agar. *Ann. Appl. Biol.* 94:51-59.
- Bronfield, E.S.P., M. Stein, and R.P. White. 1982. Identification of *Rhizobium* strain on antibiotic concentration gradient. *Ann. Appl. Biol.* 101: 269-277.
- Bronfield, E.S.P., D.M. Lewis, and L.R. Barran. 1985. Ciptic plasmid and rifampin resistance in *Rhizobium meliloti* influencing nodulation competitiveness. *J. Symbiote.* 164: 410-413.
- Bronfield, E.S.P., I.B. Sinha, and M.S. Malynets. 1986. Influence of location, host cultivar, and inoculation on the composition of naturalized populations of *Rhizobium meliloti* in *Medicago sativa* nodules. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 1077-1084.
- Burton, C.J. 1979. *Rhizobium* species. En: Microbial Technology. 2 and 1. Copyright Academic Press.
- Bushby, H.V.A. 1982. Ecology. p. 35-75. In: M.J. Broughton (ed.). Nitrogen Fixation. Vol. 2. *Rhizobium*. Clarendon Press.

- Chanway, C.P., and F.B. Holl. 1985. Suitability of intrinsic antibiotic y resistance as a method of strain identification in *Rhizobium trifolii*. *Plant and Soil* 93: 287-291.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1988. Simbiosis leguminosa-rizobios manual de métodos de evaluación, selección y manejo agronómico. Sección de Microbiología de Suelos del Programa de Pastos Tropicales y Sección de Microbiología de Suelos del Programa de Frijol (coope.), Cali, Colombia.
- Cooper, J.E. 1979. Rapid method for counting antibiotic-resistant rhizobia in soil. *Soil Biol. Biochem.* 11: 433-435.
- Cregan, P.B., and H.H. Keyser. 1985. Host restriction of nodulation by *Bradyrhizobium japonicum* strain USDA 129 in soybean. *Soil Science* 26: 911-916.
- Dawson, S.K.A., M. Hants, and M. Alexander. 1973. Estimating the density of individual bacterial populations introduced into natural ecosystems. *Canadian Journal of Microbiology* 19: 1480-1481.
- Dote, R.A. 1975. Principles of *Rhizobium* strain selection. In: Symbiotic nitrogen fixation in plants. Ed. Nutman. P.S. Cambridge University Press.
- DeBennire, R. 1968. Plant communities. A textbook of plant synecology. Harper & Row, Publishers, New York.
- Datto, F.B., and D.H. Hubbell. 1975. Antigenic differences between infective and noninfective strains of *Rhizobium trifolii*. *Applied Microbiol. Sup.* 30: 172-177.
- Diatloff, A. 1977. Ecological studies of root-nodule bacteria introduced into field environments. B. Antigenic and symbiotic stability in Loison's rhizobias over a 12 year period. *Soil Biol. Biochem.* 9: 85-88.
- Diatloff, A., and S. Langford. 1975. Effective natural nodulation of peanuts in Queensland Queensland. *J. Agric. Res.* 32: 95-100.
- Dirección General de Política y Desarrollo Agropecuario y Forestal. 1985. Evaluación del año agrícola 1985. SAGM, México.
- Dowling, D.H., and M. J. Broughton. 1985. Competition for nodulation of legumes. *Ann. Rev. Microbiol.* 40: 131-157.
- Dudman, W.F., and J. Brockwell. 1968. Ecological studies of root-nodule bacteria introduced into field environments. I. A survey of field performance of clover inoculants by gel immunodiffusion serology. *Aust. J. Agric. Res.* 19: 754-767.

- Eaglesham, A. 1987. The use of intrinsic resistance for *Rhizobium* study. In: Symbiotic nitrogen fixation technology (Elkan ed.) Ed. Marcel Dekker Inc. New York.
- Espinosa-Victoria, D. 1985. Resistencia a la Sequía XVIII: Efecto de la tensión hídrica (sequía) en la simbiosis *Rhizobium phaseoli*-*Phaseolus vulgaris* L. Tesis Profesional, UNAM, México.
- Espinosa-Victoria, D., R. Ferrera-Carrato, S.A. Larqu@, and I.R. López. 1985. Competition and survival of *Rhizobium phaseoli* in water stress bean plants. VI Fixing Nitrogen International Symposium. University of Oregon. Corvallis, OR. Proceedings.
- Espinosa-Victoria, D. Manual para la identificación de *Rhizobium* mediante técnicas serológicas. Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. (No publicado).
- Espinosa-Victoria, D. 1989. Caracterización de once cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* mediante la técnica de inmunoelectrotransferencia. (Western Blot). Tesis de M.C. Colegio de Postgraduados, Montecillo, México.
- Espinosa-Victoria, D., R. Ferrera-Carrato, y F. Guesada Pascual. 1989. Inconvenientes de la técnica de ELISA convencional con propósitos de identificación de cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. SONAFIBIN, Soc. Nat. de la Fijación Biológica del Nitrógeno- México. Resúmenes. II Congreso Nacional: 23-25 de julio de 1989. Esc. de Biología U.A.S. Guadalajara, Jal. México. pp. 26-27.
- FAO, 1980. 1979 FAO production yearbook, vol. 33. FAO Statistics Series No. 28. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Fred, E.B., and S.A. Waksman. 1928. Manual of General Microbiology, with Special Reference to the Microorganisms of the soil. Mc Gray-Hill, New York.
- Gardezi, A.K. 1986. Selección de genotipos de *Phaseolus vulgaris* de alta eficiencia en la fijación de nitrógeno asociado con *Rhizobium phaseoli*. Tesis de M.C., Colegio de Postgraduados, Montecillo, México.
- Gibson, A.H. 1974. The influence of the environment and managerial practices on the legume-*Rhizobium* symbiosis. In: Attractives on dinitrogen fixation. Section IV. John Wiley & Sons, Inc.
- Gillobin, G.S., and R.A. Levin. 1974. Streptomycin resistance in *Rhizobium japonicum*. *Phytopath.* 64: 93-99.

- Guar, Y.D., A.N. Sen, and N.S. Subba Rao. 1974. Problem regarding groundnut (*Arachis hypogaea* L.) inoculation in tropics with special reference to India. *Proc. Indian Acad. Sci. Sec. B40*: 562-570.
- Graham, P.H. 1978. Some problems and potential of field beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in Latin America. *Field. Crops. Res.* 1: 295-317.
- Graham, P.H. 1981. Some problems of nodulation and symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L.: a review. *Field. Crops. Res.* 4: 93-112.
- Graham, P.H. 1987. 1985-1986 Results in the area of BNF (Minnesota). Proyecto de resistencia a sequía en frijol. INIFAP, MSU, MU, CP. Evaluación y programación 1987. Sudadalajara, Jal., México.
- Guzmán, P.R., R. Ferrera-Carrato y I.R. Lépiz. 1983. Proposición de un sistema alternativo al uso de las bolsas de crecimiento (Growth pouch) en la determinación del número más probable de *Rhizobium phaseoli* en suelo. *Xenobiotas Anot. Pac. Agronomía de Oaxaca*, p.23. Soc. Mex. de la Ciencia del Suelo: 123-124.
- Ham, G.E., V.B. Caldwell, and H.W. Johnson. 1971. Evaluation of *Rhizobium japonicum* inoculants in soils containing naturalized populations of rhizobias. *Agro. J.* 63: 301-303.
- Hernández-Bravo, G. 1973. Potential and problems of production of dry beans in the lowland tropics. p.144-150. In: D. Waal (ed.). Potentials of field beans and other food legume in Latin America. Centro Internacional de Agricultura tropical. Series Seminars. No. 2e.
- Hernández, X.E., R.A. Rodríguez y H.A.M. Alfaro. 1979. Etnobotánica. En: Contribuciones al conocimiento del frijol (*Phaseolus*) en México. (Ed. M. Engleand). Colegio de Postgraduados, Chapingo, México.
- Jansen van Rensburg, H., and B.M. Strijdon. 1982. Competitive abilities of *Rhizobium meliloti* strains considered to have potential as inoculants. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 98-106.
- Jansen van Rensburg, H., and B.M. Strijdon. 1985. Effectiveness of *Rhizobium* strains used in inoculants after their introduction into soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 127-131.
- Jones, D.G., and E.S.P. Broadfield. 1978. A study of the competitive ability of streptomycin and spectinomycin mutants of *Rhizobium trifolii* using various marker techniques. *Ann. Appl. Biol.* 88: 448-450.

- Jordan, C.D., and N.D. Allen. 1975. *Rhizobium*. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ed. The Williams ET. Wilkins Company, Baltimore, Ga. Ed.
- Keyser, H.H., and P.B. Cregan. 1987. Modulation and competition for nodulation of selected soybean genotypes among *Bradyrhizobium japonicum* serogroup 129 isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2631-2636.
- Kishinevsky, B. and M. Bar-Joseph. 1978. *Rhizobium* strain identification in *Arachis hypogaea* nodules by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Canadian Journal of Microbiology*, 24: 1537-1543.
- Kohashi - Shibata, J. 1990. Morfología y fisiología del frijol *Phaseolus vulgaris* L. En: Simposio de la Fijación Biológica de Nitrógeno en Frijol Común *Phaseolus vulgaris* L. Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo. Zacatecas, Zacatecas. (En prensa).
- Kosslack, R.H., S.B. Bohlool, S. Bowdler, and M.J. Sadowsky. 1983. Competition of *Rhizobium japonicum* strain in early stages of soybean nodulation. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 870-873.
- Kremer, R.J., and H.L. Peterson. 1982. Modulation efficiency of legume inoculation as determined by intrinsic antibiotic resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 638-642.
- Kremer, R.J., and H.L. Peterson. 1983. Field evaluation of selected *Rhizobium* in an improved legume inoculants. *Appl. J.* 75: 139-143.
- Kuykendall, D. 1987. Isolation and identification of the genetically marked strains of nitrogen fixing microsymbionts of soybeans. *Planting Nitrogen Fixation Technology* (Elkan ed.). Ed. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Kuykendall, L.D., and D.F. Heber. 1978. Genetically marked *Rhizobium* identifiable as inoculum strains in nodules of soybean plants grown in fields populated with *Rhizobium japonicum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 36: 915-919.
- Kvien, C.S., S.E. Han, and J.W. Lambert. 1981. Recovery of introduced *Rhizobium japonicum* strains by soybean genotypes. *Appl. J.* 73: 900-905.
- López, A. E. 1982. Generación de tecnología de producción y evaluación de cepas de *Rhizobium phaseoli* y *Rhizobium japonicum* por su efecto en la producción de granos y economía de nitrógeno en los cultivos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y soya (*Glycine max* L. Merr.) en la Mixteca Poblana. Tesis de M.C. Colegio de Postgraduados, Chapingo, México.

- Martensson, A.M., and J.G. Gustafsson. 1983. Competition between *Rhizobium trifolii* strains for nodulation, during growth in a fermenter, and in soil-based inoculants, studies by ELISA. *J. Gen. Microbiol.* 131: 3077-3082.
- Martensson, A.M., J.G. Gustafsson, and H.D. Ljunggren. 1984. A modified, Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) for *Rhizobium meliloti* strain identification. *J. Gen. Microbiol.* 130: 247-253.
- Martensson, A.M., J.G. Gustafsson, and H.D. Ljunggren. 1987. Competition in soil between effective and ineffective strains of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* in the nodulation of red clover, *Trifolium pratense* L. studies with ELISA. *J. Gen. Microbiol.* 133: 3467-3472.
- Mathieu, B.M.L. 1982. Estudio rizosférico del frijol -*Phaseolus vulgaris* L.- inoculado con mutantes de *Rhizobium phaseoli* resistentes a estreptomicina. Tesis Profesional. IPN, México.
- May, S. M., and B.B. Bohlool. 1983. Competition among *Rhizobium leguminosarum* strains of nodulation of lentils (*Lens culcatis*). *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 960-965.
- Miller, R.H., 1979. Ecological factor which influence the success of microbial fertilizers or activator. *Dev. Ind. Microbiol.* 20: 335-342.
- Moaad, H., and B.B. Bohlool. 1984. Competition among *Rhizobium* spp for nodulation of *Leucaena leucocephala* in two tropical soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 5-9.
- Moaad, H., M.R. Ellis, and E.L. Schmidt. 1984. Rhizosphere response as a factor in competition among three serogroups of indigenous *Rhizobium japonicum* for nodulation of field-grown soybean. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 607-612.
- Munns, D.H., and B. Moaad. 1980. Mineral nutrition of legume crops. In: *Advances in Legume Science* (Ed. by R. J. Summerfield & A.H. Bunting), pp. 115-125. Proceedings of the International Legume Conference, New.
- Nelson, D.W., M.L. Swearingin, and L.S. Beckham. 1978. Response of soybean to commercial soil-applied inoculants. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 517-518.
- Obaton, M. 1971. Utilisation de mutants spontanés résistants aux antibiotiques pour l'étude écologique des *Rhizobium*. Comptes Rendus Séances Hebdomadaires des Séances de L'Académie de Sciences Série D, Sciences Naturelles (Paris). 272: 2630-2633.
- Olsen, P.E. and M.A. Rice 1984. Minimal antigenic characterization of eight *Rhizobium meliloti*

- strains by indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Can. J. Microbiol.* 30: 1093-1099.
- Olsen, P.E., M.A. Rice, G.W. Stecke, and M.S. Page. 1983. Strain-specific serological techniques for the identification of *Rhizobium meliloti* in commercial alfalfa inoculants. *Can. J. Microbiol.* 29: 225-230.
- Oosting, H.J. 1956. The study of plant communities an introduction to plant ecology. 2a. M.H. Freeman and Company, San Francisco, Estados Unidos.
- Pinchinat, A.M. 1977. The role of legume in Tropical America. p. 171-182. In: J.M. Vincents, S.A. Whitney, and J. Bose (ed.). Exploiting the legume-Rhizobium symbiosis in tropical agriculture. College of Tropical Agriculture Miscellaneous Publications 145. Univ. of Hawaii, Honolulu, Hawaii.
- Ramos, M.L.G., and R.M. Boddey. 1987. Yield and nodulation of *Phaseolus vulgaris* and the competitiveness of an introduced *Rhizobium* strains: Effects of lime, mulch and repeated cropping. *Field. Sci. SocAm.* 19: 171-177.
- Ramos, M.L.G., F. Nilo, M. Magalhães, and R.M. Boddey. 1987. Native and inoculated rhizobia isolated from field grown *Phaseolus vulgaris*: effects of liming and soil acid on antibiotic resistance. *Field. Sci. SocAm.* 19: 179-185.
- Robert, F.M., and E.L. Schmidt. 1983. Population changes and persistence of *Rhizobium phaseoli* in soil and rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 550-556.
- Rodriguez, M.M.N. y R. Ferrera-Cerrato. 1984. Estudio y caracterización de la relación simbiótica de *Rhizobium phaseoli* en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) de distintos hábitos de crecimiento. Memorias de la XII Reunion Latinoamericana sobre *Rhizobium* 21-2a de octubre de 1984. Colegio de Postgraduados, Chapingo, México.
- Roughley, R.J., W.M. Blower, and D.F. Herridge. 1976. Modulation of *Trifolium subterraneum* by introduced rhizobias in competition with naturalized strains. *Field. Sci. SocAm.* 8: 403-407.
- Sadowsky, M.J., E.J. Raymond, P.B. Oregan, and H.H. Keyser. 1987. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* serogroup 123 and its relation to genotype-specific nodulation of soybean. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2624-2630.
- Schweingherer, E.A. 1967. Effectiveness of *Rhizobium* as modified by mutation for resistance to antibiotics. *Genetics v. ZeemanArch.* 33: 121-136.

- Sau, E., and D.J. Hume. 1979. Effects of inoculation and fertilizer N levels on N₂ fixation and yields of soybeans in Ontario. *Can. J. Plan. Sci.* 59: 1129-1137.
- Solórzano, V.R. 1982. Clasificación de hábitos de crecimiento de *Phaseolus vulgaris* L. Tesis de M.C. Colegio de Postgraduados, Chapingo, México.
- Somasegaran, P., and H.J. Hoben. 1985. Methods in legume. Rhizobium Technology. United States Agency for International Development.
- Somasegaran, P., and R.B. Martin. 1986. Symbiotic characteristics and Rhizobium requirements of a *Leucaena leucocephala* x *Leucaena diversifolia* hybrid and its parental genotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 1422-1424.
- Somasegaran, P., H.J. Hoben, and V. Surgun. 1980. Effects of inoculation rate, rhizobial strain competition and nitrogen fixation in chickpea. *Appl. J.* 60: 60-73.
- Sparrow, S.D.(Jr.), and G.E. Han. 1983. Modulation, N₂ fixation, and seed yield of navy beans as influenced by inoculant rate and inoculant carrier. *Appl. J.* 75: 20-24.
- Sprent, I.J. 1979. The biology of nitrogen fixing Organism. Mc Graw-Hill, London. 51-60, 75-103 pp.
- Stein, M., E.S.P. Bronfield, and M. Dye. 1982. An Assessment of a method based on intrinsic antibiotic resistance for identifying Rhizobium strains. *Ann. Appl. Biol.* 101: 261-267.
- Susserfield, R. J., P. A. Hurley and F. E. Michen. 1976. Plant and management techniques for growing grain legumes under simulated tropical conditions in controlled environments. *Exp. Agric.* 13: 81-92.
- Turco, R.F., T.B. Hoeman, and D.F. Sardick. 1986. Effectiveness and competitiveness of spontaneous antibiotic-resistant mutant of *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium japonicum*. *Fed. Biol. SocAm.* 18: 259-262.
- Van der Merwe, S.R., B. Strijdom, and C.J. Dye. 1974. Groundnut response to seed inoculation under extensive agricultural practices in South African soil. *Paper/Agriculture.* 6: 295-302.
- Vidor, C.E. 1981. Microbial restraints on Legume symbiosis. Depto. de Solo/UFRGS and IRABRO/Secretaria de Agricultura RS. Boletim Do CNPq.
- Vincent, J.M. 1975. Manual práctico de rizobiología. Ed. Ministerio Sur. Buenos Aires, Argentina.
- Weaver, R.W., and L.R. Frederick. 1974. Effect of inoculum rate on competitive nodulation of *Glycyne max* L. Merrill. I. Greenhouse studies. *Appl. J.* 66:

229-232.

- Weaver, R.W., and L.R. Frederick. 1974b. Effect of inoculum rate on competitive nodulation of *Glycine max* L. Merril. II. Field studies. *Appl. J.* 66: 233-236.
- Wolkowski, R.P., and K.A. Kelling. 1984. Evaluation of a soil inoculant for improving corn and potato yield and quality. *Appl. J.* 76: 189-192.
- Zelazna-Kowalska, I. 1971. Correlation between streptomycin resistance and infectiveness in *Rhizobium trifolii*. *Plant and Soil*, special Vol. 67-71.

APÉNDICE I

MEDIO EXTRACTO DE LEVADURA MANITOL AGAR ROJO CONGO, ELMARC C Vincent, 1975D

K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2 g
NaCl	0.1 g
Extracto de Levadura	1.5 g
Manitol	10.0 g
Agar	15.0 g
Agua	1000.0 ml
Solución de Rojo Congo*	10.0 ml

ELMA: no se le adiciona rojo congo.

CELN: no lleva ni agar ni rojo congo.

*Solución de Rojo Congo: 1 g en 400 ml de agua.

El pH se ajusta a 7.

Se esteriliza a 18 libras durante 18 min.

APÉNDICE II

SOLUCION NUTRITIVA SANDMAN (Summerfield et al.,
1977).

M E D I O	—	B A S I C O
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O		0.06 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O		0.33 g
CaSO ₄		0.29 g
K ₂ SO ₄		0.36 g
NaFe EDTA		0.01 g
Ca(H ₂ PO ₄) ₂ ·H ₂ O		0.062g
Microelementos		0.05 ml
Agua		1000.00 ml

M I C R O E L E M E N T O S

KCl	27.0 g
H ₃ BO ₃	30.0 g
MnSO ₄ ·H ₂ O	2.7 g
ZnSO ₄ ·H ₂ O	2.7 g
(NH ₄) ₂ MoO ₇ ·4H ₂ O	2.7 g
CuSO ₄ ·H ₂ O	2.4 g
H ₂ SO ₄	10.8 ml
Agua	1990.0 ml

Se ajusta a pH 7.

Se esteriliza a 10 libras durante 10 min.