



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
IZTACALA

"ESTUDIO DEL POTENCIAL DE MICORRIZACION POR
ENDOFITOS VESICULO ARBUSCULAR (VA) Y NODULACION
POR *Rhizobium* QUE SE ASOCIAN A CACAHUATE
(*Arachis hypogaea* L.) ORIGINARIO DEL MUNICIPIO DE
HUITZUCO DE LOS FIGUEROA, ESTADO
DE GUERRERO"

TESIS PROFESIONAL

para obtener el título de

B I O L O G O

p r e s e n t a n:

ELSA CRISTINA CASAS PEREZ

Y

MOISES LOZANO LUGO



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICO ESTE TRABAJO A QUIENES SON LA RAZON DE MI VIDA:

MONI

E

ISRA

Elisa

DEDICO ESTE TRABAJO MUY ESPECIALMENTE:

A MI MADRE QUE ES EJEMPLO DE HONESTIDAD, RESPONSABILIDAD, TRABAJO
Y EL SENTIMIENTO MAS NOBLE Y SUBLIME.

A MI PADRE QUE ES EJEMPLO DE TRABAJO Y TENASIDAD.

A MIS QUERIDOS HERMANOS.

A MIS ADORADOS SOBRINOS

*Doy gracias a la vida por haberme permitido rodearme de
seres humanos tan especiales, de los cuales siempre he
aprendido, dejando una profunda huella en mi vida.*

*Y aunque el tiempo pase, siempre
permanecerán en mi,*

aun mas alla de

el fin

A todos mis amigos

Moisés

AGRADECIMIENTOS

DESEAMOS EXPRESAR NUESTRO MAS SINCERO AGRADECIMIENTO A TODAS LAS PERSONAS QUE HICIERON POSIBLE LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO:

A LA BIOL. BEATRIZ CUENCA AGUILAR POR SU VALIOSO APOYO EN AL DIRECCION DE ESTE TRABAJO.

A EL BIOLOGO RAFAEL FAMILIAR GONZALEZ DIRECTOR DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES PLANTEL NAUCALPAN POR EL SOPORTE Y LA INFRAESTRUCTURA FACILITADAS; ASI COMO A SU ADMINISTRACION.

A EL BIOL. JOSE PICHARDO DIAZ POR SU APOYO EN EL CAMPO Y SUGERENCIAS.

MUY ESPECIALMENTE A LA SRA. BEATRIZ ZITLALPOPOCA MORA POR QUE SIN SU AYUDA FISICA Y MORAL NO HUBIERA SIDO POSIBLE LA CONCLUSION DE ESTE TRABAJO.

A LA M. EN C. LUCIA VARELA FRAGOSO POR SU VALIOSO APORTE Y DESINTERESADA COLABORACION, CON RESPETO Y ADMIRACION.

A EL DR. RONALD FERRERA CERRATO POR SUS VALIOSAS OBSERVACIONES.

A EL BIOLOGO JOSE CARLOS VERA CASTELLO Y LUPITA POR SU ENTUSIASTA COLABORACION.

A EL M EN C. MANUEL PIÑON POR SUS SUGERENCIAS Y APOYO TECNICO Y CIENTIFICO.

A EL BIOL. DANIEL MUÑOZ INIESTRA, JEFE DEL LABORATORIO DE EDAFOLOGIA DE LA ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA POR LA REALIZACION DE LOS ANALISIS EDAFICOS.

A LA BIOL. MARTHA VIRGINIA VALDES GUTIERREZ Y A EL BIOL. FRANCISCO LOPEZ GALINDO POR SU VALIOSA COLABORACION EN EL ANALISIS EDAFICO.

MUY ESPECIALMENTE LOS SRES. MARCOS MARROQUIN LOPEZ Y GALDINA CRISTOBAL MATEOS POR TODAS LAS FACILIDADES BRINDADAS EN LA REALIZACION DEL TRABAJO EN EL CAMPO, POR SU SENCILLEZ Y VALIOSOS CONOCIMIENTOS APORTADOS A ESTE TRABAJO.

I N D I C E

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
ANTECEDENTES	3
EL CACAHUATE:	
ORIGEN Y DISTRIBUCION DEL CACAHUATE	6
TAXONOMIA DEL CACAHUATE	7
CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS	8
CONDICIONES ECOLOGICAS DEL CULTIVO	10
COMPOSICION Y CARACTERISTICAS DE LA SEMILLA Y DEL ACEITE	11
USOS	12
RHIZOBIUM:	
FIJACION BIOLOGICA DEL NITROGENO	13
SIMBIOSIS <i>Rhizobium</i> -LEGUMINOSA	16
CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS	20
CARACTERISTICAS FISIOLÓGICAS	21
CARACTERISTICAS ECOLOGICAS	22
MICORRIZAS:	23
TAXONOMIA	24
MORFOLOGIA	25
PROCESO DE INFECCION	26
BENEFICIOS	27
ORIGEN DE <i>Rhizobium</i> MICORRIZAS	29
OBJETIVOS	34
MATERIAL y METODOS	35
RESULTADOS y DISCUSION	39
CONCLUSIONES	79
APENDICE	82
BIBLIOGRAFIA	94

INDICE
FIGURAS Y TABLAS

FIGURA 1.	ESQUEMA DE LA PLANTA DE CACAHUATE	9
FIGURA 2.	ZONA DE ESTUDIO	33
TABLA 1.	CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS DEL SUELO	40
TABLA 2.	ASILAMIENTOS DE <i>Rhizobium</i>	43
TABLA 3A.	AISLADOS CON LA PRUEBA DE BROMOTIMOL (CEPAS ACIDAS)	44
TABLA 3B.	AISLADOS CON LA PRUEBA DE BROMOTIMOL (CEPAS ALCALINAS)	45
TABLA 4A.	PRUEBAS CON DIFERENTES FUENTES DE CARBOHIDRATOS (CEPAS DE CRECIMIENTO RAPIDO)	47
TABLA 4B.	PRUEBAS CON DIFERENTES FUENTES DE CARBOHIDRATOS (CEPAS DE CRECIMIENTO LENTO)	48
TABLA 5A.	CRECIMIENTO DE BACTERIAS EN DIFERENTES ANTIBIOTICOS. (CEPAS ACIDAS)	49
TABLA 5B.	CRECIMIENTO DE BACTERIAS EN DIFERENTES ANTIBIOTICOS. (CEPAS ALCALINAS)	50
GRAFICA 1.	HISTOGRAMA DE PESO SECO DE LAS PLANTAS TRATADAS CON AISLADOS ACIDOS	52
GRAFICA 2.	HISTOGRAMA DE PESO SECO DE LAS PLANTAS TRATADAS CON AISLADOS ALCALINOS	53
TABLA 6.	RESULTADOS DEL CONTENIDO DE NITROGENO EN LAS PLANTAS INOCULADAS CON <i>Rhizobium</i> .	55
GRAFICA 3.	HISTOGRAMA DEL CONTENIDO DE NITROGENO EN PLANTAS INOCULADAS CON AISLADOS ACIDOS.	56
GRAFICA 4.	HISTOGRAMA DEL CONTENIDO DE NITROGENO EN PLANTAS INOCULADAS CON AISLADOS ALCALINOS	57

FIGURA 3.	ESQUEMA DE LAS CARACTERISTICAS TAXONOMICAS DE	
	<i>Glomus</i> .	60
MICROFOTOGRAFIA 1.	<i>Glomus</i>	61
MICROFOTOGRAFIA 2.	<i>Glomus</i>	61
MICROFOTOGRAFIA 3.	<i>Glomus</i>	62
MICROFOTOGRAFIA 4.	<i>Glomus</i>	62
MICROFOTOGRAFIA 5.	<i>Glomus</i>	63
MICROFOTOGRAFIA 6.	<i>Glomus</i>	63
MICROFOTOGRAFIA 7.	<i>Glomus</i>	64
FIGURA 4.	ESQUEMA DE LAS CARACTERISTICAS TAXONOMICAS DE	
	<i>Sclerocystis</i> .	65
MICROFOTOGRAFIA 8.	<i>Sclerocystis</i>	66
MICROFOTOGRAFIA 9.	<i>Sclerocystis</i>	66
MICROFOTOGRAFIA 10.	<i>Sclerocystis</i>	67
MICROFOTOGRAFIA 11.	<i>Sclerocystis</i>	67
MICROFOTOGRAFIA 12.	<i>Sclerocystis</i>	68
MICROFOTOGRAFIA 13.	<i>Sclerocystis</i>	68
FIGURA 6.	ESQUEMA DE LAS CARACTERISTICAS TAXONOMICAS DE	
	<i>Acaulospora</i>	69
MICROFOTOGRAFIA 14.	<i>Acaulospora</i>	70
MICROFOTOGRAFIA 15.	<i>Acaulospora</i>	70
MICROFOTOGRAFIA 16.	<i>Acaulospora</i>	71
FIGURA 7.	ESQUEMA DE LAS CARACTERISTICAS TAXONOMICAS DE	
	<i>Scutellospora</i>	72
FIGURA 8.	ESQUEMA DE LAS CARACTERISTICAS TAXONOMICAS DE	
	<i>Gigaspora</i>	73
MICROFOTOGRAFIA 17.	INFECCION POR ENDOMICORRIZA V A	76
MICROFOTOGRAFIA 18.	INFECCION POR ENDOMICORRIZA V A	76
MICROFOTOGRAFIA 19.	INFECCION POR ENDOMICORRIZA V A	77
MICROFOTOGRAFIA 20.	INFECCION POR ENDOMICORRIZA V A	77
MICROFOTOGRAFIA 21.	INFECCION POR ENDOMICORRIZA V A	78
MICROFOTOGRAFIA 22.	INFECCION POR ENDOMICORRIZA V A	78

ABREVIATURAS

M V A : MICORRIZA VESICULO ARBUSCULAR

V A : VESICULO ARBUSCULAR

NH₄ : AMONIO

NO₃ : NITRATO

N₂ : NITROGENO MOLECULAR

ATP : ADENOSIN TRIFOSFATO

°C : GRADOS CENTIGRADOS

AIA : ACIDO INDOLACETICO

CIC : CAPACIDAD DE INTERCAMBIO CATIONICO

ha : HECTAREA

RESUMEN

La demanda de alimentos ricos en proteínas es cada día mayor, para cubrir las necesidades de la población. Este tipo de alimentos pueden ser suministrados por las plantas capaces de formar proteínas a través de la fijación biológica del nitrógeno (N_2) realizada por microorganismos. Es el caso de la planta de cacahuete (*Arachis hypogaea* L.), leguminosa fuente de proteínas y aceites, que para el estado de Guerrero representa el 3% de la producción agrícola.

Se realizó un estudio sobre el potencial de micorrización por endofitos V A y *Rhizobium* que infectan a la planta de cacahuete originaria de Huitzuc de los Figueroa, estado de Guerrero, obteniéndose los siguientes resultados: *A. hypogaea* es infectada por una gran variedad de especies de *Rhizobium*, mostrando que no hay una especificidad. A pesar de que no hubo nodulación es posible que los rizobia aislados hayan intervenido en el proceso de fijación, debido a que en las pruebas para la determinación de nitrógeno se obtuvo una mayor concentración de nitrógeno en las plantas inoculadas con las diferentes cepas, comparadas con los testigos a los cuales no se les inoculó la bacteria. La no nodulación pudo ser ocasionada por la deficiencia de absorción de fósforo, debido a que estas plantas necesitan ser infectadas por las micorrizas vesículo-arbusculares (MVA) que ayudan en el proceso de obtención de elementos libres, tales como P, K y Mg. Por otra parte, el análisis edáfico para extraer esporas, mostró una gran diversidad de especies de MVA, así como un porcentaje muy alto de infección por estos endofitos, que fue del 80%.

De acuerdo al análisis edáfico, la planta de cacahuete se desarrolla en un suelo pobre sobretodo en N y P y poco tecnificado que permite la simbiosis microorganismos-planta a tal grado que la producción de cacahuete en el Edo. de Guerrero es por arriba del promedio nacional.

INTRODUCCION

Todos los seres vivos requieren de una fuente nitrogenada para su metabolismo, ya que los principales componentes celulares, como las proteínas y los ácidos nucleicos, contienen nitrógeno. Varían, sin embargo, los compuestos nitrogenados que los distintos organismos son capaces de asimilar; las plantas utilizan compuestos inorgánicos, como amonio (NH_4^+) o nitrato (NO_3^-); los animales superiores, además de amonio, requieren compuestos orgánicos, como aminoácidos o bases nitrogenadas (Soberón, 1985).

En última instancia, todos los compuestos nitrogenados que los seres vivos utilizan provienen del nitrógeno molecular (N_2), que representa el 80% de los gases que forman la atmósfera terrestre. Los únicos organismos capaces de utilizar directamente este elemento son los microorganismos fijadores de nitrógeno, los demás dependen del metabolismo de estos para tener una fuente nitrogenada (Soberón, 1985).

En la mayoría de los hábitats del planeta, la productividad biológica está limitada por la disponibilidad de una fuente nitrogenada, de modo que si se aumentara la fijación de nitrógeno aumentaría la biomasa del ecosistema. La disponibilidad de amonio o nitrato en el suelo condiciona también el crecimiento de muchas plantas cultivadas por el hombre, que han de fertilizarse para aumentar los rendimientos (Soberón, 1985).

La fijación biológica de nitrógeno es, de manera cuantitativa, el proceso más importante de todos los implicados en el aporte de este elemento al suelo. Mientras que los fertilizantes nitrogenados suministran al suelo anualmente 60 millones de toneladas métricas de N y la fijación química natural representa unos 30 millones, la fijación biológica supone unos 130 millones de toneladas métricas; de éstas, algo más de la mitad se deben a la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. El resto del nitrógeno fijado biológicamente, si bien importante en cantidad, reviste poca significación agrícola. Se debe en su mayor parte a la acción de microorganismos de vida libre, aerobios o anaerobios, de un

escaso rendimiento fijador, aunque bastante abundantes en número (Azcón et.al., 1983).

La fijación biológica de nitrógeno adquiere cada día mayor interés, habida cuenta de la crisis actual del petróleo, fuente de energía y materia prima para la producción de amoniaco, sin olvidar las implicaciones ecológicas que se derivan del uso intensivo de los fertilizantes nitrogenados (Azcón et.al., 1983); los fertilizantes no solo regresan el nitrógeno y otros nutrimentos al suelo, sino que restringen el crecimiento de las semillas, lixiviando y erosionando el suelo (Norhayati et.al., 1988).

Por otra parte, el crecimiento de la población determina una mayor necesidad de alimentos, y los requerimientos nutricionales humanos exigen una proporción mas alta de proteínas en la dieta. Todos estos factores, por sí solos y en conjunto, hacen que el cultivo de leguminosas muestre un interés especial, no solo en virtud de su alto contenido de proteínas, sino también por su relativa independencia de la fertilización nitrogenada al poder fijar nitrógeno atmosférico en simbiosis con *Rhizobium* (Azcón et.al., 1983).

El éxito de la inoculación en campo depende del uso de una cepa de *Rhizobium* eficaz, de su empleo en la situación ecológica adecuada, aplicación en la forma apropiada y recurso coordinado y complementario con los fertilizantes químicos. La utilización de "fertilizantes biológicos" en el cultivo de las leguminosas no es mas que una manera de aprovechar el potencial natural del suelo y las plantas. Como consecuencia de su correcto uso se ganan alimentos (proteínas), se ahorra dinero (fertilizantes químicos) y se evita la alteración de los ecosistemas (Azcón et.al., 1983).

En leguminosas noduladas por *Rhizobium sp.*, la simbiosis endomicorrícica juega, también, un papel importante debido a que el proceso de fijación biológica de nitrógeno genera una alta demanda de fósforo en forma de ATP. Por cada molécula de N_2 fijado en condiciones óptimas se requieren 12 ATP. El costo metabólico

del uso del nitrógeno atmosférico con respecto al de la utilización de formas combinadas es en general mayor, pero las plantas son capaces de incrementar su eficiencia fotosintética y suministrar los carbohidratos necesarios para ese proceso, además de sostener el desarrollo de su cosimbionte micorrícico, quien les confiere mayor capacidad de absorción del fósforo necesario para su crecimiento y para la formación y funcionamiento de los nódulos (Guzmán y Ferrera, 1990).

La mayoría de las leguminosas son capaces de formar la doble simbiosis *Rhizobium*-endomicorriza vesículo-arbuscular (VA), lo cual puede explicar en parte la buena adaptabilidad de diversas especies de esta familia en suelos marginales. El estudio de la endomicorriza (VA) ha cobrado creciente interés en los últimos años. Esta forma de simbiosis, que se establece entre el orden del género Glomales (Morton y Benny, 1990) y una alta diversidad de especies vegetales, permite a muchas plantas que crecen en suelos infértiles absorber fósforo y otros nutrimentos poco movibles en forma mas eficiente que en la condición no micorrizada. Como consecuencia del mejoramiento de la absorción bajo esas condiciones, las plantas pueden crecer mejor y producir mas biomasa.

Del total del fósforo aplicado a un cultivo en un ciclo solo es asimilada una cantidad menor al 50%; el resto se convierte en formas temporal o permanentemente no aprovechables por las plantas. Por la micorrización puede incrementarse la eficiencia de absorción de ese elemento, lo cual permite ahorrar fertilizantes fosfatados. Esto es importante desde el punto de vista económico, energético y ecológico, dado que además del continuo incremento en el costo de tales insumos la fertilización ocupa entre 30 y 40% de la energía usada en la agricultura; adicionalmente la formación de micorriza es un factor de sobrevivencia o de dominancia en comunidades vegetales establecidas en suelos donde la disponibilidad de fósforo es una limitante para el crecimiento (Guzmán y Ferrera, 1990).

En cuanto a la importancia económica del cacahuate para el estado de Guerrero, esta leguminosa representa uno de los recursos agrícolas mejor explotados en la región noreste en donde las condiciones ambientales permiten su cultivo con un buen rendimiento en la cosecha (INEGI, 1987); también es cultivado en los estados de Chihuahua, Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guanajuato y Morelos (Montemayor, 1980), es sembrado generalmente en cultivo mixto con el maíz, ya que el cacahuate al captar nitrógeno permite un mejor aprovechamiento de este elemento para otras plantas.

La importancia de este estudio radica en el conocimiento preliminar de los microsimbiontes propios del cacahuate existentes en la zona de estudio, ya que no se han realizado trabajos de investigación con tales características.

Este primer paso es la base para generar otras investigaciones que se aboquen al entendimiento de su ecología, ya que la introducción exitosa de los microsimbiontes en suelos agrícolas requiere un conocimiento previo de los sistemas y de las poblaciones nativas para poder predecir el efecto de la introducción y el desempeño de las cepas y su capacidad para competir con las nativas, que finalmente repercutirán en el mejoramiento de la planta y su consecuente rendimiento económico, energético y ecológico.

ANTECEDENTES.

EL CACAHUATE (*Arachis hypogaea*)

ORIGEN Y DISTRIBUCION:

El cacahuete *Arachis hypogaea* L. al igual que tantas plantas útiles es originario del nuevo mundo, de la parte tropical de América del Sur, siendo probablemente Brasil el país nativo, donde constituía uno de los principales alimentos de las poblaciones indígenas. Se admite actualmente la posibilidad de que sea originario de la región del Gran Chaco, con inclusión de los valles de Paraguay y del Panamá (Giller y Silvestre, 1970).

Tanto en Brasil, Paraguay y norte de Argentina, existen especies silvestres de este cultivo. en Perú se ha encontrado en las prehistóricas tumbas de la zona de Ancón, Pachacamac y otros lugares, junto con piezas de cerámica decoradas con dibujos de cacahuete, que corresponden a la época de por lo menos 200 años A.C. (Box, 1971).

A pesar de que el cacahuete existió en México en la época Precolombina y de que hubo contacto entre los indios de estas regiones y los de las zonas vecinas de Estados Unidos, no se dispone de prueba alguna acerca de la existencia de la planta en dicho país (Box, 1971).

El cacahuete se cultiva en Brasil, Perú y otras regiones del continente sudamericano desde antes de la colonización española, siendo desconocido en el Continente Europeo. Los primeros traficantes de esclavos lo introdujeron de las costas del Brasil a las costas occidentales de Africa. Los navegantes portugueses lo llevaron posteriormente a las Indias (Box, 1971). Fué descubierto en el siglo XVII en las Antillas y sólo en el transcurso del siglo siguiente se determinó su existencia en la mayoría de los países tropicales del mundo (Giller y Silvestre, 1970).

A principios del siglo XIX los españoles introdujeron la planta en las Filipinas a partir de la costa occidental mexicana. Desde ahí el cultivo del cacahuete pudo extenderse hasta China,

Japón, el Sureste Asiático, la India y la costa oeste de Australia (Montemayor, 1980).

Actualmente el género *Arachis* se encuentra ampliamente distribuido en el mundo, sobre todo en zonas tropicales o subtropicales semiáridas; siendo cultivado ampliamente en zonas afroasiáticas como la India, China, Malawi, Centro y Sudáfrica (IAN, 1987); en Sudamérica los países de alta producción son Bolivia, Argentina, Paraguay y Brasil (Pietrarelly, 1976); siendo las 5 especies argentinas: *Arachis marginata*, *A. prostrata*, *A. villosa*, *A. pusilla* y *A. hypogaea*, las más comunes y de más amplio rango (Hermann, 1978). Otras regiones americanas de cultivo en menor escala son: la Florida (USA), México y algunos países Centroamericanos. La especie cultivable es *Arachis hypogaea* L., aunque hay muy poco acuerdo en la clasificación de las subespecies (Channabyre et.al., 1989) y generalmente se consideran más como formas que como un taxón definido (Hermann, 1978).

En México por su parte se viene cultivando desde hace tiempo, sin embargo su aprovechamiento se ha limitado casi exclusivamente al consumo humano directo, no obstante dadas sus enormes posibilidades industriales como planta oleaginosa. En la actualidad el cacahuete es un cultivo en el que a nivel nacional se tienen 100,000 hectáreas aproximadamente en explotación, siendo los principales productores Chihuahua, Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacan, Guerrero y Morelos, registrándose un rendimiento medio de 1500 kilogramos por hectárea, del cual un 80% se destina para consumo nacional y un 20% para exportación (Giller y Silvestre, 1970).

TAXONOMIA:

Las leguminosas forman una familia amplia (Leguminosae) que se divide en tres subfamilias, elevadas a la categoría de familias por muchos taxonomistas modernos: MIMOSOIDEAE, CAESALPINIOIDEAE y PAPILIONOTIDAE (de gran importancia económica). La familia cuenta con más de 550 géneros y unas 15 000 especies, repartidas en todo

el mundo, entre las que se encuentran plantas de frecuente cultivo como son: *Phaseolus vulgaris* L. (frijol), *Vicia faba* (haba), *Lens culinaris* (lenteja), *Pisum sativum* (chicharo), *Cicer arietinum* L. (garbanzo), *Medicago sativa* (alfalfa), *Erythrina americana* (colorín), *Lathyrus odoratus* (chicharo de olor), *Spartium junceum* (cretamo), y *Arachis hypogaea* (cacahuate) (Sánchez, 1979).

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS:

Las características morfológicas (fig. 1) para la especie son las siguientes:

Plantas anuales, de una raíz principal, tallo ramificado desde la base, el tallo y las ramas erectas o, en algunas formas, postradas y enraizantes en los nodos mas bajos, de 20 a 70 cm de largo (en la var. *gigantea* cercano a 2 m), angular, liso o con vellos esparcidos; hojas 4-foliadas, lisas o ligeramente pubescentes; estípulas grandes (2 a 3, raramente 5 cm de largo), lanceoladas-acuminadas y algo encorvadas, el tercio mas bajo unido con el peciolo; hojillas aovadas a elípticas, 8-60 mm de longitud, 15 a 30 mm de ancho, papiraceas, redondeadas en la base, subaguda a obtusa en el ápice u ocasionalmente emarginada, lisa o con pocos pelos largos en la parte baja y sobre el margen, el nervio marginal escasamente evidente; peciolos articulados, de 1 a 15 mm de longitud, generalmente hirsutos; inflorescencia axilar, las flores subsésiles en fascículos de 2 a 6, de amarillo dorado a naranja; frecuentemente con venas rosetadas mas abajo de la base que el estandar; tubo receptacular adelgazado, de 10 a 12 mm de largo, piloso o desnudo; cáliz bilabiado, de 10 a 12 mm de largo, el labio superior oval (con 3 o 4 dientes cortos), la parte mas baja aovada-lanceolada, acuminada; corola de 10 a 12 mm de largo; el estandar ampliamente elíptico a orbicular, muy cortamente unguiculado, el ápice emarginado; alas elíptico-oblongas, de 7 mm de largo; quilla incluida, muy delgada, rostrada incurvada; fruta ovoide o cilíndrica-oblonga, de 2 a 6 cm de largo, contraída entre las semillas, el pericarpio mas o menos esponjado, variando

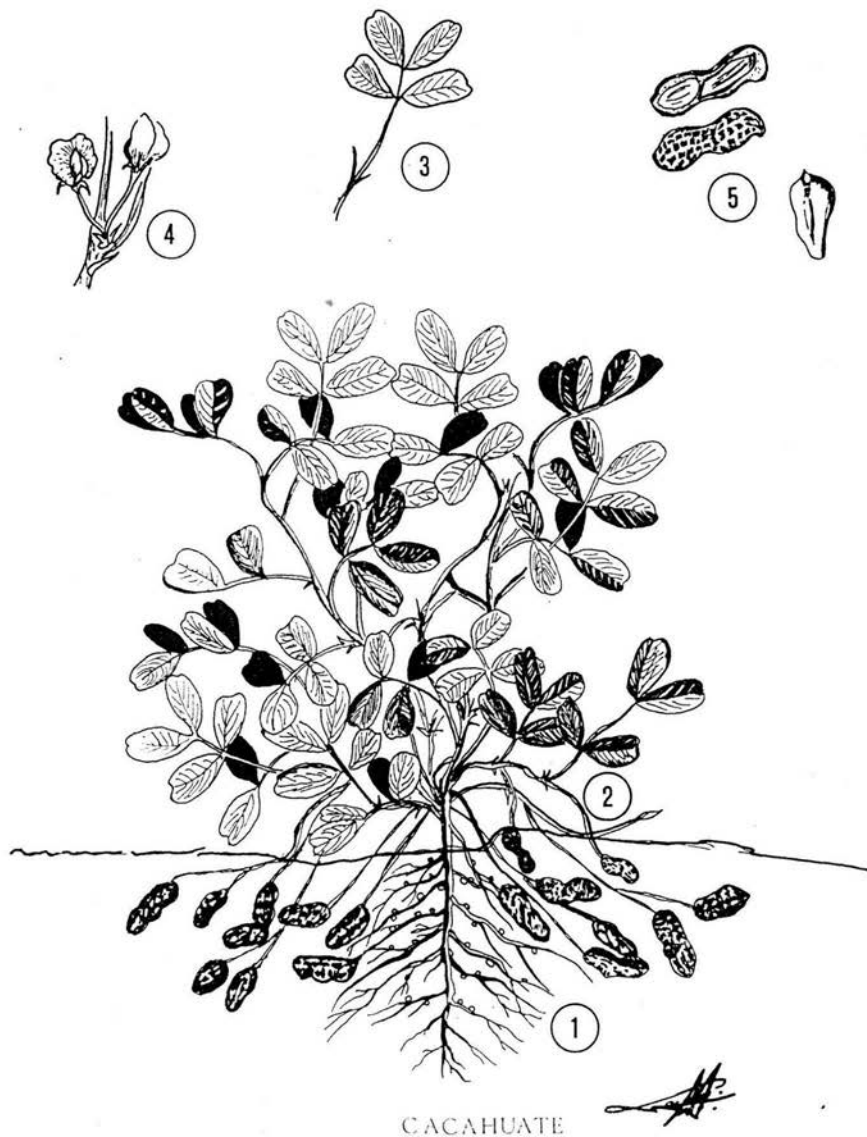


FIGURA 1: ESQUEMA DE *Arachis hypogaea*. 1: RAIZ CON NODULOS E INFRUTESCENCIAS SUBTERRANEAS; 2: PARTE AEREA O VASTAGO; 3: HOJAS AOVADAS CARACTERISTICAS DE LA ESPECIE CULTIVABLE *A. hypogaea*; 4: INFLORESCIENCIAS; 5: VAINAS CON SEMILLAS PAREADAS

bastante en delgadez, con 10 a 12 nervaduras longitudinales, reticuladas entre ellas; semillas 1 a 6; ovoides a oblongas, la testa extremadamente variable en color, ordinariamente rojo caoba, rosa o salmón, pero algunas veces blanco-uniforme jaspeadas, conocida sólo en cultivo y como una fuga ocasional (Hermann, 1978).

CONDICIONES ECOLOGICAS DEL CULTIVO:

Clima: El cacahuete es esencialmente un cultivo de climas tropicales y subtropicales, aunque también tienen un desarrollo adecuado en climas templados con estación calurosa suficientemente largas de 4 a 5 meses que asegure su normal desarrollo. Se cultiva desde una latitud N 40° y a una latitud S 40° desde el nivel del mar hasta unos 1200 m de altitud. Para su óptimo desarrollo requiere de lluvias suficientes y bien distribuidas durante el ciclo vegetativo de la planta, alrededor de 500 a 1000 mm anuales (Montemayor, 1980).

Por otra parte el exceso de lluvias se traduce en exagerado desarrollo vegetativo y escasa fructificación, en zonas secas se hace necesario proporcionar agua al cultivo mediante riegos (Box, 1971; Mazzani, 1963).

Heladas: En este cultivo a diferencia de otros una helada no causa daños tan drásticos, sin embargo no es conveniente tomar un riesgo como este, para lo cual sólo basta evitar las siembras demasiado tempranas (Bretón, 1972; Gámez, 1971).

Temperatura: La temperatura ejerce un efecto muy importante sobre la velocidad de los procesos fisiológicos y por consiguiente, en la duración de las diversas fases del desarrollo. Con una temperatura alrededor de 32 a 43°C se obtiene una germinación rápida de 4 a 5 días (Giller y Silvestre, 1970). La temperatura mínima de germinación es de 18°C y la máxima de 41°C. En la prefloración se necesitan de 25 a 35°C, según las variedades, cuando se tienen temperaturas menores de 18°C la floración experimenta un retraso y es extraordinariamente débil.

La temperatura óptima de floración está entre los 25 y 33°C según la variedad, y en la madurez es de 22 a 25°C (Montemayor, 1980).

Humedad: El cacahuate es considerado con frecuencia como una planta relativamente resistente a la sequía. En realidad el régimen hídrico no repercute del mismo modo sobre el desarrollo vegetativo, la floración, la maduración y finalmente sobre los rendimientos, según la época en que se manifieste (Montemayor, 1980).

En general se requieren de 380 a 650 mm teniendo el periodo crítico de falta de humedad en la germinación, floración, y llenado de la vaina. En el periodo de prefloración es muy resistente a la sequía. Los excesos de humedad son dañinos en el periodo de la cosecha, ya que se pueden germinar las semillas (Giller y Silvestre, 1970).

En general la cantidad de humedad necesaria para este cultivo varía ampliamente, dependiendo directamente de la variedad (Bretón, 1972; Gámez, 1971).

Suelos: Los terrenos ligeros claros y arenosos profundos y aereados son los que se recomiendan, porque permiten la penetración del clavo y el desarrollo de la vaina, evitándose de esta manera una mala formación de la misma y al mismo tiempo que se facilite la recolección. Se desarrolla bien en las zonas intertropicales, en suelos poco fértiles, muy lavados y escasos en materia orgánica, siendo el cacahuate una de las pocas plantas que pueden ser cultivadas en estos terrenos (Giller y Silvestre, op.cit.). En resumen se considera un suelo ideal aquel que tenga una composición aproximada del 60% de arenas, 25% de arcillas, 8% de humus y 7% de cal; con un pH que varíe de 6.5 a 9.0, teniendo su óptimo ligeramente alcalino (Bretón, 1972).

COMPOSICION Y CARACTERISTICAS DE LA SEMILLA Y DEL ACEITE:

Las diferentes partes que componen la semilla del cacahuate se encuentran en las siguientes proporciones:

Tegumento.....3%

Embrión.....3%

Cotiledón.....94%

La composición química de la semilla es la siguiente:

Humedad.....4-8%

Proteínas.....22-30%

Grasas.....43-45%

Hidratos de Carbono.....11-16%

Fibras.....3-3.5%

Minerales.....1.4-2.8%

El aceite de cacahuete pertenece a los no secantes, en frío es casi inodoro, untuoso, muy fluido e insípido. En caliente tiene un color amarillo, además posee un peso específico de 0.9118 a 0.9145 a una temperatura de 20°C.

Los ácidos grasos que lo componen se encuentran en las proporciones siguientes:

Palmítico.....6-8.5%

Esteárico.....2.6-6%

Araquídico....2.6-4.9%

Lignosérico...2.5-3.0%

Oleico.....50.6-71.5%

Linoleico.....13-26% (Montemayor, op.cit.)

USOS:

El cacahuete tiene infinidad de usos obteniéndose diferentes productos y subproductos derivados del mismo, los cuales son aprovechados en diversas formas, algunas de ellas son las siguientes:

1. La parte aérea heneficada es empleada como forraje en la alimentación de ganado (Montemayor, 1980).

2. Los frutos son empleados en la alimentación humana como cacahuete de boca, como cacahuete de confitería y en la alimentación animal como forraje (Bretón, 1972).

3. La semilla se emplea en la fabricación de mantequillas, en

la extracción de aceites (Alvarez, 1977), en la manufactura de la torta y de la harina de cacahuete, etc. (Mazzany, 1963; Tisdale y Nelson, 1966).

4. El aceite se usa como aceite crudo de masa, en la manufactura de mantecas vegetales, oleomargarinas, mayonesas, cosméticos, productos farmacéuticos, jabones, etc. (Tisdale y Nelson, 1966).

5. La torta se emplea en la alimentación de los animales y en la confección de diversos productos industriales, como material plástico, pinturas, adhesivos, fibras textiles, emulsificantes, etc. (Montemayor, 1980).

6. La semilla blanqueada se usa en la manufactura de la mantequilla de cacahuete, para la preparación del cacahuete tostado y salado, en la industria del dulce y helados y en la fabricación de harina comestible después de extraído el aceite (Bretón, 1972).

7. El tegumento de la semilla se emplea principalmente para alimentación de animales y en la preparación de compuestos con alto contenido de vitaminas del complejo B (Bretón, 1972; Gámes, 1971).

8. La cáscara en combinación con resinas es prensada para formar paneles de madera resistentes al fuego, como material inherente en fertilizantes químicos, alimentos en forraje y salvadillo para consumo animal (Montemayor, 1980).

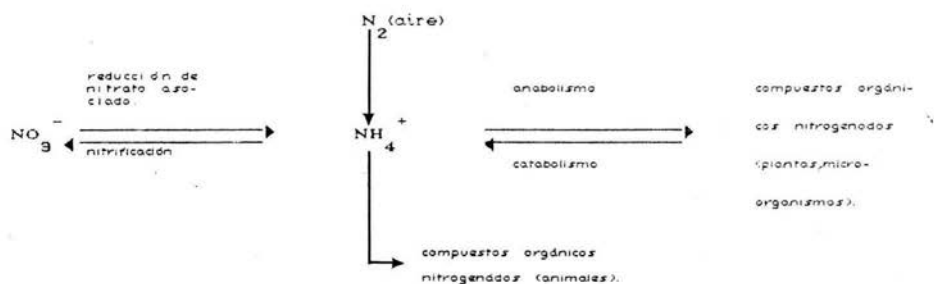
9. En crudo el cacahuete fresco se usa para la elaboración de leche que es de color blanco y tiene el olor característico de cacahuete (Mazzani, 1963).

FIJACION BIOLOGICA DE NITROGENO:

A través de la fijación biológica llega a la Tierra cuatro veces mas nitrógeno que por los fertilizantes químicos, productos comerciales de elevado precio y contaminantes de los ecosistemas. La mitad del nitrógeno fijado biológicamente lo suministra la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa mediante un proceso en el que la

energía consumida procede de la fotosíntesis. Por otra parte, para que el nitrógeno captado por fijadores libres pueda ser utilizado por las plantas ha de tener lugar una secuencia de acontecimientos (citólisis, amonificación, etc.), en la que intervienen grupos de microorganismos especializados. En el transcurso de tales transformaciones ocurren pérdidas de nitrógeno asimilado por inmovilización, fijación a coloides del suelo o desnitrificación. En la fijación simbiótica el nitrógeno es utilizable por el vegetal (Azcón et al. 1983).

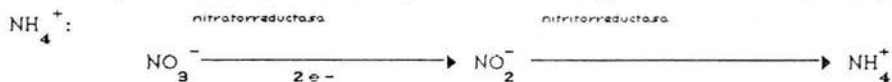
Como en el caso de otros elementos, las transformaciones del nitrógeno vegetal forman parte de un ciclo, en el que participan enormes cantidades de materia:



La desnitrificación (respiración de nitrato) y la fijación de N_2 solo pueden ser realizadas por procariotas (Strasburger et al., 1988).

La mayoría de las plantas toman nitrógeno del medio en forma de ión nitrato o amonio, aunque algunos organismos especializados absorben N_2 de la atmósfera, el nitrógeno se introduce siempre en los compuestos orgánicos en forma reducida. El nitrato y el N_2 deben, pues, ante todo, reducirse.

Tanto los hongos como las plantas verdes reducen el nitrato en dos pasos, catalizados por enzimas, primero a nitrito y luego a NH_4^+ :



Sólo unos pocos procariotas pueden utilizar la gran reserva

de nitrógeno molecular de la atmósfera. El sistema de enzimas necesario para ello, la **nitrogenasa**, existe en todas aquellas bacterias que fijan nitrógeno, incluyendo las que viven en simbiosis, en los nódulos radiculares de algunas Angiospermas.

La reducción de N_2 a NH_4^+ con ayuda de nitrogenasa necesita 6 electrones, que "in vivo", son suministrados por la ferredoxina reducida; en esta reacción no han podido ser observados productos intermedios de la reducción, solo el NH_4^+ es liberado por la enzima.

Para transferir los átomos de hidrógeno se requiere del transporte activo de electrones. Los protones se capturan libremente a través del medio acuoso de la célula. Los electrones son donados primero al componente II y después al componente I de la enzima, en donde ocurre la verdadera reducción del nitrógeno. El funcionamiento de ambos componentes requiere de energía, que se proporciona en forma de ATP, el cual es producto del metabolismo de la glucosa, estimándose que la producción de dos moléculas de amoníaco a partir de nitrógeno molecular requiere de 12 a 24 moléculas de ATP (Brill, 1978, citado por Cuenca, 1988).

La especificidad de sustrato de la nitrogenasa es relativamente pequeña; así, por ejemplo, puede reducir también N_3^- ($\rightarrow N_2 + NH_3$), N_2O ($\rightarrow N_2 + H_2O$), H^+ ($\rightarrow 1/2 H_2$) y acetileno ($C_2H_2 \rightarrow C_2H_4$), probablemente por distintos tipos de conformación de la enzima. Sobre todo la reducción del acetileno por la nitrogenasa ha facilitado mucho el análisis de la acción de la enzima y el descubrimiento de nuevos organismos portadores de nitrogenasa (capaces de asimilar N_2): el etileno que resulta es fácil de reconocer por cromatografía de gases. Cepas de *Rhizobium* poseedoras de una hidrogenasa que vuelve a fijar, el H_2 que se forma como producto lateral de la fijación de N_2 , presentan una capacidad de fijación de nitrógeno mas elevada (Strasburger et.al., 1988).

En las bacterias aerobias de vida libre y en las simbióticas, la presión parcial de O_2 en las células que contienen nitrogenasa

está reducida a consecuencia de la gran intensidad de la respiración que es necesaria para atender el gasto de energía de la reducción del N_2 . En los rizobios simbióticos de las nudosidades de las raíces de leguminosas el consumo de hidratos de carbono se ha valorado en 5 a 20 mg/mg de N_2 . El suministro de oxígeno es facilitado por un transportador especial, la leghemoglobina, localizado en las células del hospedante, fuera de las células del rizobio; tal sustancia ejerce una función semejante a la de la hemoglobina de los animales.

La síntesis de la leghemoglobina se produce en el citoplasma de la célula hospedante; pero, según parece, genes de la bacteria son responsables de la síntesis del componente hemínico (Strasburger et.al., 1988).

Tanto el NH_4^+ procedente de la reducción del nitrato y de la fijación de N_2 como el que se toma del medio, en la célula se introducen de inmediato en compuestos orgánicos, a saber, aminoácidos o amidas.

El NH_4^+ formado por la deshidrogenasa en los rizobios simbióticos de los nódulos radicales de las leguminosas pasa al citoplasma de las células del nódulo y allí es incluido en la glutamina por la glutamin-sintetasa. Con la ayuda de la glutamato-sintetasa puede formarse entonces glutamato, con la de la asparagin-sintetasa, asparagina. El transporte a partir de los nódulos radicales se realiza por el xilema con la corriente de transpiración, en la que la asparagina, el ácido asparagínico, la glutamina, el ácido glutámico y la alanina son los aminoácidos de transporte de mayor importancia cuantitativa. La tasa de fijación es de 30-100 mg N/g de peso fresco de nódulos por día, es decir, un nódulo puede transformar de 3 a 10 veces su propio contenido en nitrógeno (Strasburger et.al., 1988).

SIMBIOSIS *Rhizobium*-LEGUMINOSA:

La simbiosis *Rhizobium*-leguminosa se establece como resultado de la expresión de unas características propias de la bacteria, de

la planta hospedadora o de la asociación de ambas. Estas características o propiedades simbióticas, reciben los nombres de especificidad, infectividad y efectividad (Azcón et.al., 1983).

Cualquiera que sea el mecanismo de la invasión de las raíces por *Rhizobium*, a través de los pelos radicales o de los espacios intercelulares de la corteza de la raíz, existe un grado de especificidad variable. Ciertas leguminosas tienen requerimientos muy concretos para "su" *Rhizobium*, mientras que un determinado *Rhizobium* puede infectar una sola especie de leguminosa, un grupo de especies o incluso miembros de distintos géneros o subfamilias (Azcón et.al., 1983).

El esquema propuesto por Nutman en 1965, en el que se recogen las interacciones bacteria-raíz que conducen a la infección de los pelos radicales, sigue aceptándose en sus líneas generales, y es descrito como sigue:

1.-Cuando la infección ocurre a través de los pelos radicales, el primer hecho que se aprecia es la elongación y ramificación de los mismos. El periodo de susceptibilidad a la infección es corto y transcurre durante la elongación de los pelos. Las infecciones no se presentan al azar, sino que se registran en sitios determinados. La formación de cordones de infección después del periodo de susceptibilidad puede no dar lugar a la formación de nódulos y, en todo caso, estos pueden resultar inoperantes para fijar N_2 .

Las enzimas hidrolíticas de la pared celular intervienen de una manera destacada en el proceso de infección, en particular, las pectinasas producidas inducen una relajación de la pared celular permitiendo la penetración de las bacterias en el interior de los pelos radicales. Por otra parte, se ha sugerido que la liberación de ácido indol-acético (AIA) por algunos *Rhizobium*, tiene una participación en la formación, curvatura y desarrollo de los pelos radicales.

2.-Establecidos en la rizósfera de una leguminosa, ciertos rhizobia se unen a la superficie de la raíz, tanto de los pelos

radicales como de las células epidérmicas. La unión ocurre siempre con el eje mas largo de la bacteria perpendicular a la rizoplana y sólo se manifiesta entre un *Rhizobium* y su leguminosa apropiada.

Se ha sugerido que estas bacterias podrían unirse a las raíces a través de las lectinas (fitohemaglutininas) situadas en el "sitio" de unión polar. Una hipótesis sugiere que estas glucoproteínas son las responsables directas del control de la especificidad en la asociación *Rhizobium*-leguminosa.

Una vez que la bacteria ha reconocido a su leguminosa provoca la curvatura de los pelos radicales de la planta, proceso que posee una elevada especificidad, aunque se ha observado la reacción de curvatura ("curling") de una leguminosa frente a *Rhizobia* sp. no específicos suyos. Hay que distinguir, no obstante, entre una "moderada curvatura" de los pelos radicales y una "curvatura marcada", en la cual los pelos muestran en su extremo un ángulo de unos 180°. Sólo en el caso de una curvatura marcada se puede hablar de gran especificidad, que ocurre únicamente cuando existe un contacto físico íntimo con el *Rhizobium* específico infectivo. Parte de los pelos deformados conducen a la formación de nódulos; la infección parece iniciarse en los puntos más agudos de los pliegues de los pelos.

3.-La observación de que *Rhizobium* no disuelve ni penetra a la pared celular del pelo en el sitio de contacto condujo a la hipótesis de que la infección empieza a través de un proceso de invaginación del pelo radical. Tal invaginación va a dar lugar a la formación del cordón de infección, por donde *Rhizobium* penetra en el pelo y alcanza el citoplasma de las células corticales. Una vez allí tiene lugar una serie de reacciones enzimáticas que acabarán por romper el cordón, quedando las bacterias libres en el citoplasma de la célula huésped.

El cordón de infección es una estructura tubular, cuya superficie interna está formada por celulosa y rodeada por la membrana plasmática de la célula huésped. En su interior se encuentran las bacterias unidas extremo con extremo, inmersas en

una matriz de polisacárido. El cordón crece hasta alcanzar la corteza de la raíz, donde se ramifica y divide. El crecimiento del cordón de infección ocurre probablemente por aflojamiento de la celulosa bajo la influencia de las auxinas producidas en el interior del tubo por *Rhizobium*, ya que estas hormonas inducen la síntesis de celulasas.

4.-Posteriormente, el cordón de infección se disuelve liberándose las bacterias al citoplasma de la célula huésped. Según parece, las pectinasas intervienen de una manera destacada en los primeros estadios de la infección, mientras que las hemicelulasas y celulasas actuarían en la rotura de los filamentos de infección que liberan bacterias dentro del citoplasma de las células corticales envueltas en plasmalema formando bolsas o vesículas que contienen una o varias bacterias.

5.-Cuando el cordón de infección alcanza la corteza de la raíz, las células de ésta son estimuladas en su ritmo de división y a partir de ellas se desarrollará el nódulo, aunque sólo un porcentaje relativamente bajo de infecciones da lugar a nódulos. La mayoría de estas células iniciales del nódulo son disomáticas, pero se dividen también algunas células normales. Las células disomáticas producirán el tejido central del nódulo, en el cual las bacterias se transforman en bacteroides y tiene lugar la fijación de nitrógeno. Las otras células darán lugar a los tejidos no infectados del nódulo: la corteza y un rudimentario sistema vascular que conecta con el floema y xilema de la raíz.

Cuando la infección es a través de los pelos radicales, en la zona central del nódulo aparecen células invadidas y no invadidas según haya entrado o no en ellas el filamento de infección. Una vez invadida, la célula ya no se divide.

6.-La efectividad es la tercera propiedad o "característica simbiótica" de la asociación mutualística *Rhizobium*-leguminosa. Las reacciones clave de la fijación de N_2 ocurren en las células infectadas por *Rhizobium* en forma de bacteroides existentes en el tejido central del nódulo. Los bacteroides difieren de las células

normales en su morfología, en que poseen alteraciones en los citocromos y otros componentes de la cadena de transporte de electrones y en que contienen nitrogenasa activa. Como consecuencia de la correcta expresión de esta característica, se desarrolla en el nódulo una secuencia de procesos bioquímicos que conducen a la reducción del N_2 de la atmósfera hasta NH_4^+ , el cual pasa a la célula hospedadora en forma orgánica y del nódulo al xilema, siendo así transportados para su utilización por la planta (Azcón *et.al.*, 1983).

Se ha relacionado con la masa del tejido nodular activo y la velocidad de fijación, más que con el número de nódulos. Es importante que cuando se haga una evaluación de fijación de nitrógeno, se tomen en cuenta datos tales como: el número de nódulos producidos por una cepa, que fácilmente puede determinarse usando el método de aglutinación, inmunodifusión, inmunofluorescencia y tipificación de fagos (Mendoza, 1983).

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE *Rhizobium*:

Rhizobium es un bacilo Gram (-) que mide 0.5 a 0.9 μm por 1.2 a 3.0 μm , presenta pleomorfismo bajo condiciones de estrés de crecimiento; frecuentemente, contiene granos de poli- β -hidroxibutirato, los cuales presentan refracción bajo el microscopio de contraste de fases, es aeróbico, crece en medio con carbohidratos simples usualmente acompañado de formación de polisacáridos excretados por la bacteria (Manual Bergey's, 1984).

La posición taxonómica de *Rhizobium* es causa de controversia existen clasificaciones de acuerdo a las diferentes características de la bacteria. Presenta flagelos peritricos subpolares, de acuerdo a esto se le divide en dos grandes grupos, I: las especies que tienen de 2 a 6 flagelos peritricos, con velocidad de crecimiento rápida de 3 a 5 días; dentro de este grupo están *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium phaseoli*, *Rhizobium trifolii*, *Rhizobium meliloti*; II: bacterias que tienen flagelos polares o subpolares, con velocidad de crecimiento lento de 4 a 7

días, dentro de este grupo están *Rhizobium japonicum*, *Rhizobium lupini* y *Rhizobium* del grupo *cowpea* (Mendoza, 1983).

CARACTERISTICAS FISIOLÓGICAS:

Para la propagación de *Rhizobium* a menudo se necesitan una o varias vitaminas del complejo B. Las vitaminas que se requieren incluyen Tiamina, Acido pantoténico, y alguna vez Riboflavina, además de la Biotina (Mendoza, 1983).

Rhizobium prolifera en ausencia del hospedero tanto en la naturaleza, como "in vitro", de tal modo que la asociación entre los dos no es obligada. Incluso si no se supiera que los nódulos radicales fijan nitrógeno, debiera concluirse que es un organismo patogénico, debido a que los nódulos parecen tumores (Mendoza, 1983).

Las cepas de *Rhizobium* para inoculantes de leguminosas deben evaluarse en dos o tres fases, la primera es una preselección para la efectividad en la fijación de nitrógeno en condiciones de invernadero, la segunda es un ensayo de las cepas preseleccionadas bajo condiciones de campo y la tercera cuando sea necesario cubrir otros aspectos tales como la adaptación al pH del suelo, la tolerancia a los pesticidas, la sobrevivencia en cultivos y sobre la semilla (Mendoza, 1983).

La efectividad también se puede medir directamente al determinar la cantidad de nitrógeno fijado o, indirectamente, al medir el peso seco de la planta, pues estos dos parámetros están correlacionados. Se utilizan otros parámetros para evaluar la capacidad de fijación de distintas cepas de *Rhizobium*, algunos se refieren a las características de los nódulos, como son: su aparición temprana, su número, peso fresco y peso seco. Otros se refieren al rendimiento de la planta, tales como el peso fresco y el peso seco total o el de la parte aérea, agua y cenizas de la parte aérea. (Mendoza, 1983).

Es una responsabilidad importante para la manufactura de inoculantes que las cepas de *Rhizobium* sean seleccionadas, de

acuerdo con Mendoza (1983), en base a las siguientes cualidades:

a) Deben formar nódulos fijadores de nitrógeno en la planta específica y proveer un adecuado aporte de nitrógeno.

b) Deben ser competitivos en la colonización de los pelos radicales y nodular en presencia de otras cepas de *Rhizobium* altamente infectivas.

c) Que la nodulación ocurra bajo un amplio rango de temperaturas y que la planta tenga un buen crecimiento.

d) Las cepas de *Rhizobium* deben crecer bien en medio de cultivo, en medio acarreador y en el suelo después de sembrada la semilla.

e) El organismo debe tener la habilidad de sobrevivir en el suelo de una estación a otra (Mendoza, op.cit.).

CARACTERISTICAS ECOLOGICAS:

La sobrevivencia de *Rhizobium* en el suelo y en el nódulo, así como el funcionamiento del mismo, están influenciados por diversos factores entre los que encontramos: temperatura, humedad, pH y nutrimentos.

La temperatura superficial del suelo sin cobertura vegetal puede alcanzar los 50°C en regiones tropicales y subtropicales, lo que puede ocasionar efectos adversos sobre las poblaciones de microorganismos que habitan en el suelo (Cuenca, 1988).

Se puede decir que las temperaturas extremas disminuyen el proceso de infección y formación del nódulo, así como el funcionamiento del mismo. No obstante, se sabe que los rhizobia de crecimiento rápido son mas sensibles a altas temperaturas que los de crecimiento lento (Cuenca, 1988).

En condiciones de laboratorio, la temperatura óptima para el crecimiento de *Rhizobium* es de 28 a 32°C, pero estos valores varían de acuerdo con la especie.

En el caso del agua, ésta ejerce un efecto directo no sólo sobre las poblaciones de microorganismos, sino también afecta a la planta y a la simbiosis. Así, la escasez de agua es mucho mas drástica que un periodo de exceso, particularmente cuando se



combinan altas temperaturas y el suelo carece de coloides (Cuenca, 1988).

La falta de agua afecta el número, la distribución y la estructura de los pelos absorbentes infectados y el número de nódulos formados (Cuenca, op.cit.).

Por otra parte, diversos nutrimentos influyen específicamente en el crecimiento de la planta y en la fijación de nitrógeno. En general, las mayores exigencias se presentan en el nivel de función nodular. El fósforo es importante porque participa en la fijación de nitrógeno en forma de ATP y, por lo tanto, una deficiencia de éste puede acarrear alteraciones en el proceso. Sin embargo, se necesitan pequeñas cantidades de nitrógeno para el crecimiento de la planta, la formación y funcionamiento del nódulo (Cuenca, 1988).

El calcio también es importante en el proceso de infección de los pelos absorbentes y la formación del nódulo. El carbonato de calcio se usa para cubrir las semillas inoculadas con *Rhizobium*, protegiéndolas mientras se inicia la infección. Los micronutrimentos son importantes porque intervienen en la formación molecular y el funcionamiento de las enzimas que participan en la simbiosis (Cuenca, 1988).

MICORRIZAS:



El término micorriza deriva del vocablo griego *myce*: hongo y *rhiza*: raíz; así que las micorrizas son asociaciones simbióticas mutualistas entre hongos microscópicos y las raíces de plantas. La planta ofrece al hongo nutrimentos y un nicho ecológico protegido de los depredadores microbianos de la rizósfera (Janerette, 1991; Le Tacon, 1986). Por su parte el hongo ayuda a la planta a absorber nutrimentos minerales del suelo. Se sabe que las hifas del hongo que se desarrollan en la raíz y emergen de ella desempeñan un importante papel en la translocación de iones fosfato hacia la planta, por lo que, en suelos con un bajo contenido de fósforo asimilable, caso generalizado en la mayoría de los suelos



agrícolas, las micorrizas representan una contribución fundamental para la economía nutritiva de la planta (Azcón y Barea, 1980).

TAXONOMIA:

Las micorrizas se han venido clasificando, con base en su estructura y morfología, en tres grandes grupos:

ECTOMICORRIZAS

ENDOMICORRIZAS

ECTOENDOMICORRIZAS (Janerette, 1991; Azcón y Barea, 1980).

En las primeras se incluyen micorrizas en las cuales el hongo, normalmente de micelio septado, forma un manto de hifas que rodea la raíz. El desarrollo del hongo en el interior de la corteza es intercelular, dando aspecto de red (red de Hartig). En las endomicorrizas, sin embargo, el hongo no forma manto sobre la raíz y las hifas penetran en el interior de las células de la corteza. Y en las ectoendomicorrizas se presentan ambas características (Azcón y Barea, 1980).

Las micorrizas más extendidas son las de tipo vesículo-arbuscular (VA), ya que esta simbiosis se encuentra en todos los climas y permiten el desarrollo vegetal sobre el planeta de la mayoría de las plantas de interés agrícola e industrial (Azcón y Barea, 1980; Le Tacon, 1986).

Los hongos endomicorrícicos VA son Zygomycetos, del orden Glomales que se dividen en dos subórdenes (Morton y Benny, 1990).

SUBORDEN	FAMILIA	GENERO
Glominie	Glomaceae	<i>Glomus</i> <i>Sclerocystis</i>
	Acaulosporaceae	<i>Acaulospora</i> <i>Entrophospora</i>
Gigasporinae	Gigasporaceae	<i>Gigaspora</i> <i>Scutellispora</i>

MORFOLOGIA

Las endomicorrizas VA se caracterizan por la producción de hifas, vesículas y arbuscúlos en el parénquima radical.

Hifas: La endomicorriza VA presenta una extensa red de micelio en el suelo, unida al sistema radical de las plantas hospederas, el micelio externo tiene estructura dimórfica con hifas de pared gruesa (20 a 30 μm de diámetro) y a menudo con una protuberancia de las que ramifican hifas finas (2 a 7 μm de diámetro), de pared delgada y efímera, las cuales se tornan septadas antes de morir. Hayman (1978) y Rhodes y Herdemann (1975), determinaron mediante P^{32} que el micelio puede extenderse en el suelo hasta una distancia de 7 cm de la raíz (Guzmán y Ferrera, 1990).

Las estructuras fúngicas intrarradicales se distribuyen en el tejido parenquimatoso y no invaden los haces vasculares. Las hifas del interior de la raíz se ubican inter o intracelularmente; su forma puede ser lineal, curvada o irregular. Las hifas que invaden el interior de las células se separan del citoplasma por plasmalema, sintetizado de nuevo y por una zona compacta de apariencia similar a la pared celular cortical (Guzmán y Ferrera, 1990).

Arbuscúlos: Son estructuras altamente ramificadas, típicamente intracelulares, que se localizan en las células cercanas al cilindro vascular y cuya función es la transferencia de nutrimentos desde y hacia el hospedante. Se forman a partir de una hifa inter e intracelular, mediante ramificaciones dicotómicas sucesivas, hasta formar series de ramas cortas bifurcadas, de diámetro menor a 1 μm . Durante su desarrollo y madurez son separados del citoplasma hospedante por material de apariencia similar al de la pared celular vegetal. Los arbuscúlos maduros ocupan gran parte del volumen celular; al formarse aumentan notoriamente el volumen citoplasmático, desaparecen los gránulos de almidón, el núcleo aumenta de tamaño y en las cercanías de las ramas arbusculares se detectan abundantes mitocondrias, retículo

endoplásmico y plástidos. Los arbusculos se forman a partir del segundo día de iniciada la infección y permanecen viables de 4 a 5 días; su degradación se inicia en las ramas mas finas y progresa basipetálicamente, formando agregados con apariencia de terrón. En una misma célula puede haber arbusculos en formación y en degradación (Guzmán y Ferrera, 1990).

Vesículas: Son estructuras de forma ovalada a esférica, cuya función mas probable es la de almacén de nutrimentos. Se forman inter o intracelularmente. En su juventud contienen citoplasma homogéneo y su pared es delgada y estratificada. Con la maduración los materiales lipídicos coalescen gradualmente y el protoplasma se torna denso (Guzmán y Ferrera, 1990).

Esporas: Son de tamaño grande (20 a 500 μm); su forma puede ser globosa, elíptica, ovoide, reniforme, claviforme o irregular. Algunas especies forman esporocarpos, mientras que otras forman esporas solitarias, ya sea en el interior o en el exterior de la raíz. Las esporas extrarradicales son producidas por las hifas gruesas del micelio externo (Guzmán y Ferrera, 1990).

Además de las esporas, la endomicorriza VA puede establecerse a partir de la colonización del sistema radical hospedante, por hifas procedentes de residuos de raíz previamente colonizados o de sistemas hifales preestablecidos en el suelo (Guzmán y Ferrera, 1990).

PROCESO DE INFECCION

La infección se desarrolla a partir de las clamidosporas o bien a partir de micelio originario de una raíz previamente infectada. Las clamidosporas, que resisten condiciones adversas en el suelo tales como el calor y la sequía, germinan cuando las circunstancias son favorables, pero los tubos de germinación producidos mueren a no ser que encuentren una raíz huésped y penetren con éxito en ella. En este caso el tubo de germinación o la hifa infectiva, forma un apresorio sobre la superficie de la raíz, produciéndose así la penetración del hongo, que tiene lugar

normalmente entre dos células epidérmicas. A continuación, la hifa invasora se ramifica intercelularmente de forma rápida, en la corteza de la raíz, sin invadir endodermis, tejidos vasculares, ni meristemos (Azcón y Barea, 1980).

Poco tiempo después de iniciada la infección se desarrollan los arbuscúlos a través de ramificaciones dicotómicas repetidas de hifas intracelulares, hasta la formación de hifas de menos 0.2 μ m. Cuando se forma un arbuscúlo, el almidón de la célula invadida desaparece, al tiempo que el núcleo se alarga y divide. Los arbuscúlos son digeridos rápidamente y su contenido, absorbido por el huésped. Después de que los arbuscúlos son digeridos los núcleos vuelven a su tamaño normal y el almidón suele reaparecer (Azcón y Barea, 1980).

Posteriormente a los arbuscúlos se forman las vesículas, éstas son órganos de reserva y en algunos casos su pared gruesa las asemeja a clamidosporas. Se forman intra o intercelularmente y tanto fuera como dentro de la raíz. El desarrollo de la infección en el interior de la corteza está acompañado por un crecimiento exterior de las hifas, estableciéndose posteriores puntos de entrada. Las hifas que emergen de la raíz se extienden varios cm dando lugar al micelio externo que constituye el sistema de absorción de nutrimentos. Este consta de una red tridimensional de hifas. Sobre el micelio externo se forman grandes esporas vegetativas que van madurando hasta convertirse en clamidosporas (Azcón y Barea, 1980).

BENEFICIOS

Los beneficios de la simbiosis micorrízica VA son debidos principalmente a la mayor capacidad de las raíces para absorber fosfatos y otros iones poco móviles en el suelo.

La formación de micorriza VA induce cambios fisiológicos en las plantas, las cuales contribuyen, a su vez, a mejorar la absorción de nutrimentos; Hayman (1983) los resumió de la siguiente manera:

a) Las raíces se mantienen funcionales por más tiempo cuando están micorrizadas.

b) Las raíces micorrizadas pueden absorber fósforo del suelo cuando este elemento se encuentra en concentraciones tan bajas (menos de 3 mg de P soluble en NaHCO_3) que no puede ser absorbido por las no micorrizadas.

c) Las raíces colonizadas son más activas porque contienen más energía metabólica que les permite absorber fósforo contra un gradiente de concentración.

Como consecuencia de su mayor capacidad para absorber fósforo en suelos deficientes, las plantas micorrizadas tienen un mejor desarrollo radical, lo que les permite asimilar mayores cantidades de otros elementos para satisfacer su nueva demanda nutricional (Guzman y Ferrera, 1990).

Otros beneficios considerados son:

- 1) Incremento de la biomasa.
- 2) Incremento en la concentración de S, N, P, Ca, Cu, Mn, K, Mg, Fe.
- 3) Mayor rendimiento de grano.
- 4) Mayor contenido proteico.
- 5) Mayor contenido de aceites en semilla.
- 6) Mayor capacidad nodulante.
- 7) Mayor crecimiento.
- 8) Mayor absorción de agua.
- 9) Raíces más sanas y longevas.
- 10) Más tolerancia a la sequía.
- 11) Tolerancia a altas temperaturas en el suelo.
- 12) Tolerancia a la toxicidad de metales pesados.
- 13) Tolerancia a cambios extremos de pH (Janerette, 1991; Guzman y Ferrera, 1990).

Específicamente para las Leguminosas, se sabe que el sistema radical es más reducido que el de las Gramíneas, lo cual hace a estas plantas micótrofas obligadas, especialmente por su mayor requerimiento de fósforo para la fijación de nitrógeno y su



especial demanda de Mo, Co, B, Cu y Zn. La doble inoculación (de *Rhizobium* y hongos micorrícicos) tiene un gran efecto en el cacahuate, en las siguientes características:

- a) mayor crecimiento
- b) mayor peso seco
- c) mas Leghemoglobina producida
- d) mayor nodulación
- e) alta concentración de proteínas
- f) mayor rendimiento de grano
- g) mayor cantidad de Nitrógeno
- e) mayor absorción de agua
- f) mas resistencia al trasplante
- g) mejor recuperación al estrés hídrico
- h) resistencia a patógenos (Guzmán y Ferrera, 1990)

ORIGEN DE *Rhizobium* y MICORRIZAS:

Hace unos 400 millones de años las plantas comenzaron a colonizar la superficie terrestre, hecho importante en la evolución de los seres vivos. Generalmente se acepta que las plantas se originaron a partir de las algas verdes. El tránsito de éstas desde su habitat acuático hacia ambientes secos y la evolución en ellos a plantas con raíces, antecesores de los actuales vegetales superiores fué en efecto punto crucial en la historia de la vida sobre la Tierra. Sin lugar a dudas, el hambre y la sed, las dos grandes y eternas dificultades de la existencia sobre nuestro planeta, incidieron de forma decisiva en los primeros pasos de la evolución de los vegetales. La opinión común sostiene que la colonización de aquel suelo, seco y pobre, por las algas fué posible gracias a que éstas se asociaron con microorganismos, lo cuál permitió que pudieran captar sus alimentos minerales. Por un lado, se asociaron microorganismos fijadores de nitrógeno molecular (N_2) atmosférico (*Rhizobium*), y por otro las plantas se asociaron con hongos microscópicos y formaron las primeras micorrizas (Azcón y Barea, 1980).



ANTECEDENTES DE LA ZONA DE ESTUDIO.

La zona de estudio se ubica en el municipio de Huitzuc de los Figueroa, en la parte noreste del estado de Guerrero, entre los paralelos $18^{\circ}16'$ y $18^{\circ}22'$ de latitud Norte y los meridianos $99^{\circ}17'$ y $99^{\circ}23'$ de longitud Oeste (CETENAL, 1983). Con una elevación de 900 m s.n.m., cuenta con un clima de tipo $A_{wg}(w)(i)g$ de acuerdo con la clasificación climática de Köppen modificada por García (1981). Colinda al norte con Buenavista de Cuellar y el estado de Morelos, al Sur con Mártir de Cuilapan, Zitlala y Copalillo, al Este con el Estado de Puebla y Atenango del Río y al Oeste con Tepecoacuilco de Trujano y parte de Iguala de la Independencia (fig .2).

El estado de Guerrero presenta un aspecto fisiográfico determinado por la presencia de la Sierra Madre del Sur en la porción Austral y los macizos montañosos del Eje Neovolcánico en el Norte, lo cuál determina que los valles y llanuras sean escasos. Considerando los valles de Iguala, en donde se ubica el municipio, y Chilpancingo, las llanuras costeras y las de Tierra Caliente y acaso uno que otro valle mas pequeño, se cubre la parte no montañosa de la entidad. Estas zonas son las que se utilizan en actividades agrícolas, lo que determina que su extensión se limite aproximadamente a la octava parte de su territorio (INEGI, 1987).

En términos generales, el estado cuenta con suelos ricos en materia orgánica que son útiles en actividades primarias. En la porción Norte se localizan suelos originados por roca caliza (Rendzinas) (INEGI, 1987), particularmente en la zona se cuenta con suelos de drenaje interno bueno, la presencia de piedras o rocas va de 0 a 5%, tienen una pendiente de 1% uniforme, generalmente no hay inundaciones, presentan susceptibilidad ligera a la erosión si se desmontan, sodicidad salina normal (CETENAL, 1977).

La precipitación media anual es de 1127 mm (CETENAL, 1977) permaneciendo el suelo húmedo de 3 a 5 meses (INEGI, 1987).

La zona de estudio se encuentra irrigada principalmente por el río Huitzucó, aunque tiene muchos afluentes en forma de arroyos como son: el Potrero, Amatitlán, el Limón, Zintetitla, la Cacahuatla, la Calera; y la presa Atopula con una capacidad de 1810 Mm³, utilizada fundamentalmente para riego.

La zona de estudio presenta una vegetación natural de selva baja caducifolia y subcaducifolia, este tipo alcanza una altura de entre 4 y 5 m, presentando algunos manchones de asociación con Palmar; en su mayor parte se encuentran tierras con pastizal inducido y tierras de cultivo fundamentalmente de temporal.

Otros datos de importancia económica son los siguientes:

a) Se estima que viven en la entidad 2'469 000 personas (INEGI, 1987), observándose un deterioro demográfico en los últimos 40 años del 3.6% al 3.1% comparativamente al resto del país. La población de Huitzucó en 1980 era de 33 403 hab. con una densidad de 36.27/km².

b) El estado se sitúa entre las entidades con menor desarrollo de la República, con un nivel general de bienestar semejante a los estados de Hidalgo y Chiapas.

c) La zona de mayor bienestar social se localiza en la región centro-norte de la costa y en una franja que se extiende en la parte central de la entidad, desde los municipios de Acapulco y Coyuca de Benítez, hasta Huitzucó de los Figueroa y Taxco de Alarcón en la parte oriental del Estado.

d) Las actividades predominantes en la entidad en relación con la media nacional son: las agropecuarias que representan el 14.3% del PIB estatal contra un 8.3% para el país en 1980, el comercio (34.4% contra 23.4%), el transporte (8.0% contra 6.5%), los servicios financieros (9.6% y 7.9%) y la electricidad (2.3% y 1.0%).

e) Los principales productos agrícolas de la entidad son: maíz, copra, café oro, ajonjolí, toronja y mango, que en conjunto representaron el 74% del valor de la producción agrícola del estado en 1981. Para 1985, el valor de la producción fué de 53 847

millones de pesos, con predominio de maíz (79% del valor total), cacahuete (3.0%), ajonjolí (2.7%) y frijol (2.1%).

f) Se aprecia que debido, entre otras cosas, a la menor infraestructura de riego disponible, la entidad presenta rendimientos promedio menor a la media nacional de productos como: maíz, frijol y melón; en cambio en ajonjolí, cacahuete y café oro los rendimientos son mayores (INEGI, 1990).

El cacahuete en la región constituye uno de los principales cultivos anuales de ciclo corto en materia de oleaginosas, es sembrado generalmente en cultivo mixto con el maíz, como fuente enriquecedora de nitrógeno.

Entre los municipios que cultivan cacahuete se encuentran: Atenango del Río, Coahuayutla de Guerrero, Huitzuco de los Figueroa, Iguala de la Independencia, Mochitlán, Pilcaya y Tepecoacuilco; siendo Huitzuco el mayor contribuyente con más del 8.1% estatal (INEGI, 1990).

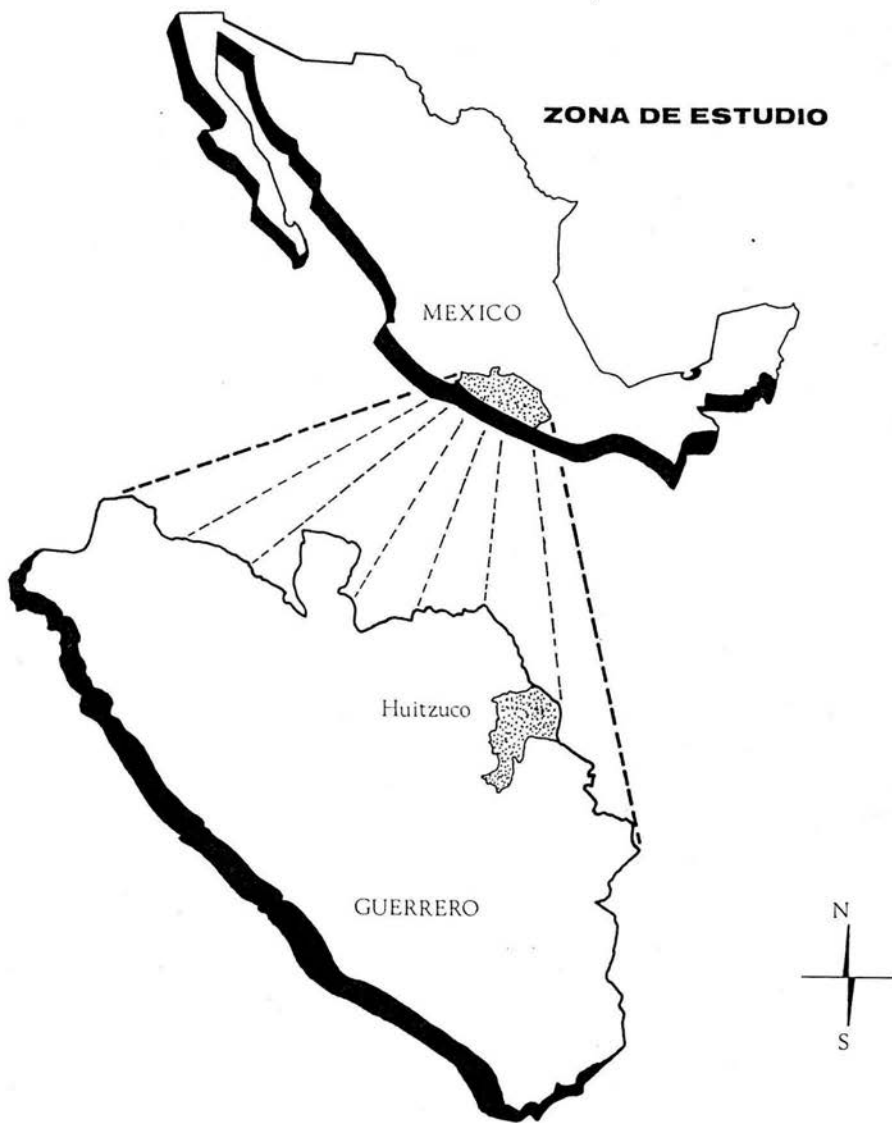


FIGURA 2. MAPA DE LA REPUBLICA MEXICANA QUE MUESTRA LA LOCALIZACION DEL ESTADO DE GUERRERO Y LA ZONA DE ESTUDIO CORRESPONDIENTE AL MUNICIPIO DE HUITZUCO DE LOS FIGUEROA, UBICADO EN LOS PARALELOS $18^{\circ} 16'$ Y $18^{\circ} 22'$ DE LATITUD NORTE Y LOS MERIDIANOS $99^{\circ} 17'$ Y $99^{\circ} 23'$ DE LONGITUD OESTE.

OBJETIVOS.

Durante el presente estudio se pretendieron cubrir los siguientes objetivos:

a) Aislar y caracterizar las cepas de *Rhizobium sp.* asociadas a cacahuete (*Arachis hypogaea*), originarias de Huitzuco Guerrero.

b) Evaluar el crecimiento de *Rhizobium* con diferentes fuentes de Carbono.

c) Establecer la capacidad infectiva de las cepas aisladas de *Rhizobium*.

d) Determinar los géneros nativos de micorriza VA que infectan a *A. hypogaea*.

d) Evaluar el porcentaje de infección de micorriza VA en *A. hypogaea*.

MATERIAL Y METODOS

MUESTREO EN EL CAMPO:

1. Se determinó una área de muestreo de 1 1/2 ha a través de cuadrantes al azar, en la zona de estudio.

2. Se eligieron 5 cuadrantes al azar, se tomaron 5 muestras de suelo de 30 x 30 cm con una profundidad de 40 cm. Así mismo se recolectaron plantas de cacahuate que estaban noduladas con *Rhizobium*, anotando los datos del colector, la fecha y las condiciones ambientales en el momento de la colecta.

3. Se determinaron las condiciones de temperatura, humedad y observaciones ambientales de la zona en el momento del muestreo.

ANALISIS DEL SUELO:

1. A las muestras obtenidas secas y tamizadas se les determinaron las características fisicoquímicas en el laboratorio de Edafología de la ENEP Iztacala, como son:

a) pH con el potenciómetro en dilución con agua 1:2.5

b) Cantidad de materia orgánica por el método de Walkley y Black (1934).

c) Textura por el método de Boyoucos (1951).

d) Humedad relativa.

e) Capacidad de intercambio catiónico (CIC) se determinó por el método de Versenato (Valdez, 1986).

f) Densidad real y aparente.

g) Porcentaje de espacio poroso.

h) Contenido de Nitrógeno total.

i) Contenido de Fósforo por el método de Bray I (Cuenca, 1988)

j) Contenido de Ca^{++} , Mg^{++} , Na^{+} y K^{+} por extracción con acetato de amonio (Jackson, 1964).

Se realizó una encuesta en el campo sobre el manejo del suelo en el sitio de estudio.

AISLAMIENTO DE *Rhizobium*:

1. Las plantas colectadas se utilizaron para aislar, a partir de sus nódulos, las cepas de *Rhizobium* presentes de acuerdo a la técnica de Vincent (1970).

2. Se caracterizaron las cepas aisladas por medio de:

a) Observación macroscópica:

a1. Características de las colonias (tamaño, color, borde, textura, etc).

b) Observación microscópica:

b1. Tinción por la técnica de Gram.

c) Determinación de pruebas bioquímicas:

c1. Velocidad de crecimiento.

c2. Crecimiento a diferentes pH (4,7 y 9).

c3. Crecimiento en azul de bromotimol.

c4. Resistencia a antibióticos.

c5. Crecimiento en diferentes fuentes de Carbono (glucosa, sacarosa, lactosa, maltosa, fructosa y glicerol).

d) Infección en planta para determinar la infectividad y efectividad de las cepas aisladas (Vincent op.cit.). Para lo cual se sembraron 3 semillas originarias de la zona de estudio en bolsas de plástico de 2 kg con un soporte de vermiculita grado 2, con 5 repeticiones por cepa aislada. Se sembraron también, 5 testigos positivos (con la solución nutritiva y una fuente de N) y 5 testigos negativos (con la solución nutritiva sin N); comparándolos con una cepa patrón (Cp-92), proporcionada por el cepario del Departamento de Microbiología del Suelo del Colegio de Postgraduados de Chapingo.

Se usó la solución nutritiva de Jensen (Vincent op.cit.). Se dejaron en el invernadero por un lapso de 90 días. Se realizaron observaciones cada 3 días respecto del vigor de la planta, el color y el follaje.

Al finalizar se cosecharon las plantas registrando: la altura de la parte aérea, o, el peso fresco, el peso seco, número de nódulos, tamaño y peso de los nódulos, así como su posición y

coloración en la planta.

Se determinó el contenido de Nitrógeno por el método de Kjeldahl.

A los datos obtenidos se les aplicó el Análisis de Varianza (CANDEVA) para determinar si existió significancia estadística en los tratamientos y dentro de los tratamientos.

Se graficaron en histogramas los datos de no. de cepa vs. peso seco y contenido de nitrógeno.

ENDOMICORRIZAS VA :

Se realizaron 4 salidas al campo con la finalidad de obtener muestras de raíces de plantas de cacahuete y suelo de la zona de estudio. Las muestras colectadas correspondieron a los mismos cuadrantes considerados en cada salida. Dichas muestras se sometieron a los siguientes tratamientos:

SUELO: Las muestras de suelo fueron procesadas en el Departamento de Ecología Microbiana de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I.P.N. Se aislaron esporas nativas de micorrizas VA por la técnica de extracción de esporas por gradiente de sacarosa (Gerdemann y Nicolson, 1963; citado por Schenck, 1982).

Una vez aisladas las esporas se montaron en portaobjetos con alcohol polivinílico para su examen al microscopio.

Al microscopio óptico se observaron a 10x y 40x para poder determinar los géneros de acuerdo a la clasificación de Morton y Benny (1990).

Se tomaron microfotografías de las esporas y esporocarpos encontrados.

PLANTAS: Las muestras de raíces de *A. hypogaea* fueron sometidas a la técnica de aclareo y tinción propuesta por Kormanik et. al. (1980) (citado por Schenck, 1982). Para la observación de las estructuras de las endomicorrizas VA.

Una vez teñidas con el colorante (Fucsina ácida) se montaron los fragmentos radiculares en portaobjetos con Lactoglicerol para

su posterior examen al microscopio y su correspondiente cuantificación del porcentaje de infección como lo proponen Phillips y Haymann (1970), (citados por Ferrera, 1985).

RESULTADOS Y DISCUSION

I. SUELOS:

Ia. Análisis fisicoquímico del suelo:

Los resultados del análisis de suelo se muestran en la tabla no.1. Las muestras tomadas en los primeros 40 cm de la capa superficial indican que el suelo es arena migajosa, por lo que los nutrimentos, la materia orgánica y el agua son difícilmente retenidos debido a su alta porosidad que rebasa mas del 50%.

Su densidad corresponde a arenas que tienen un peso ligeramente mayor de 1 g/ml, esto permite que la capa arable sea bastante manejable ya que permite el desarrollo adecuado de la raíz.

El color del suelo en general fue amarillo-cafesáceo, sin llegar a rojo lo que puede indicar la presencia de algunos óxidos de fierro libres.

El contenido de materia orgánica presenta valores que van de 1.1 a 1.7 lo que indica que es un suelo pobre, de acuerdo con Ortiz y Ortiz (1980). Esta falta de materiales orgánicos evita que se ligen los suelos arenosos y tengan poca plasticidad y cohesión, además favorece la filtración de agua y nutrimentos.

El pH alcanza valores que van de 5.7 a 8.0, siendo ligeramente ácidos en las zonas que alcanzan mayor pendiente en el terreno, mientras que las que presentan menos pendiente van de casi neutros a moderada alcalinidad. Cuando en el suelo existen pH ligeramente ácidos se favorece el intercambio aniónico lo que muestra valores más altos para el intercambio catiónico, en tanto que en valores elevados de pH disminuye bastante el intercambio catiónico.

Los valores de los cationes que se encuentran en solución como el Na^+ , Ca^{++} y Mg^{++} presentan cantidades mas altas en la zona de un pH elevado, comparativamente los valores mas bajos corresponden a las zonas donde el pH desciende. Este caso no se aplica al K^{++} cuyos valores no tienen diferencias marcadas en

ZONA DE MUESTR	COLOR		TEXTURA		
	SECO	HUMEDO	%LIMO	%ARENA	%ARCILLA
A	10vR 6/6 amarillo-cafesaceo	10vR 4/4 cafe-amarillo oscuro	12	78 arena migajosa	10
B	10vR 6/4 cafe-amarillo claro	10vR 4/4 cafe-amarillo oscuro	18	74 arena migajosa	8
C	10vR 7/4 cafe muy palido	10vR 5/4 cafe-amarillo	18	74 arena migajosa	8
D	10vR 6/8 amarillo-cafesaceo	10vR 4/8 cafe-amarillo oscuro	18	70 arena migajosa	12
E	10vR 5/3 cafe	10vR 3/4 cafe-amarillo oscuro	14	72 arena migajosa	14

ZONA DE MUESTR	DENSIDAD		% ESPACIO FOROSO
	REAL	g/ml APARENTE	
A	2.34	1.08	53.3
B	2.5	0.99	60.4
C	2.5	1.07	56.4
D	2.5	1.18	52.8
E	2.63	1.21	54.0

ZONA DE MUESTR	Na ⁺	K ⁺	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	ClCl	M.O.%	N%	pH
A	2.17	0.51	8.35	7.87	2.04	1.12	0.0014	8.0
B	1.63	0.38	5.37	1.53	2.16	1.51	0.0380	7.8
C	1.41	0.37	4.41	2.88	2.76	1.24	0.0252	7.4
D	1.63	0.51	2.88	3.49	2.3	1.34	0.0378	5.7
E	1.41	0.32	3.84	1.92	2.84	1.26	0.0266	5.7

TABLAS No. 1A, 1B Y 1C. Resultados del análisis de suelo en las cinco zonas de muestreo, de la zona de estudio del Municipio de Huitzuco de los Figueroa, Edo. de Guerrero.

ninguna de las zonas.

En el caso del porcentaje de N presente va de 0.0014 (extremadamente pobre) hasta 0.038 (pobre).

El Fósforo en todas la muestras presenta menos de 1 p.p.m. que de acuerdo con el criterio de INIA (1977) corresponde a un suelo extremadamente pobre.

Ib. INVESTIGACION DE CAMPO:

Se realizaron una serie de entrevistas sobre las prácticas agronómicas mas frecuentes empleadas por los campesinos de Huitzuco de los Figueroa en el estado de Guerrero y las resumimos de la siguiente manera:

Ib1. Prácticas agrícolas: La preparación de la tierra se realiza en mayo, por medio del barbecho tradicional con tracción animal (la yunta); La fertilización se lleva a cabo manualmente; no hay riego; el deshierbe y la cosecha se hacen manualmente.

Ib2. Fertilizantes: Los abonos naturales son poco usados y cuando se emplean, lo hacen con estiércol bovino, meses antes de la cosecha.

Los fertilizantes químicos mas utilizados son:

Sulfato de amonio y/o urea..200-300 kg /ha como fuente de N
Super triple.....300 kg /ha como fuente de N,P,S.

Ib3. Pesticidas: Se utiliza el sellador para controlar la plaga del gusano barrenador y la gallina ciega.

Ib4. Semillas: Son seleccionadas manualmente las mejores semillas de la cosecha anterior. Los lugareños emplean dos variedades de *A. hypogaea* que llaman: a) de maton y b) de guía.

Ib5. Tipos de cultivo: Son básicamente de dos tipos:

a) Púros: Solamente se siembra cacahuate.

b) Mixtos: Sembrados con cacahuate y maíz.

Ib6. Duración del cultivo: Se siembra en Junio y cosecha en Octubre, teniendo un período de 4 meses.

Ib7. Producción: 3-4 toneladas por hectárea; de semilla con vaina.

II. CARACTERISTICAS DE LAS CEPAS DE *Rhizobium* sp. OBTENIDAS.

A partir de los nódulos (10 por planta) obtenidos de las plantas de cacahuete muestreadas en las 5 zonas del cultivar se hicieron un total de 38 aislados determinados como *Rhizobium* sp., al realizar la técnica de Gram se presentó la clásica forma del bacilo corto con tinción negativa.

Se usó una cepa de referencia (Cp 92) que, de acuerdo con ICRISAT (1987) y Rongwen *et.al.* (1988), resulta ser muy eficiente como fijadora de nitrógeno en el cacahuete, esta cepa fué de crecimiento rápido y se consideró dentro de las productoras de ácido (tabla 3A).

El tiempo de aparición de colonias en el primoaislamiento varió (tabla no. 2), encontrándose que el 68.4 % de los aislados son de crecimiento rápido (3 a 4 días), en tanto que el 31.6% crecieron después de los 5 días. Las colonias variaron de transparentes a un color rosáceo, algunas mostraron pigmentación, su diámetro osciló entre 1 y 2 mm, su apariencia fué regular y convexa de bordes enteros.

Al realizar la prueba de Bromotimol, para determinar la producción de ácido o álcali, se observó que 12 produjeron álcali y 27 produjeron ácido. De acuerdo con este criterio se establecieron 2 grandes grupos de comparación, a saber: de crecimiento rápido (de 3 a 4 días, tabla 3A) y de crecimiento lento (+ 5 días, tabla 3B). Hay que resaltar que de los 27 productores de ácido 20 crecieron bien en un pH 9 y sólo 13 a pH 7, los aislados 1 y 12 no tuvieron ningún crecimiento, en tanto que el 15, 20, 30, 36 y 37 presentaron muy buen crecimiento en todos los pH's.

De los 12 aislados productores de álcali crecieron bien todos en pH 9, en pH 7 sólo 2 no crecieron y en pH 4 sólo se desarrollaron 5. Los aislados 29, 31 y 35 tuvieron buen crecimiento en la escala de ácido a alcalino.

La cepa de referencia (número 32) creció muy poco, aunque el número de colonias formadas es mayor en pH alcalino.

AISLADO	MUESTRA	FECHA PRIMO AISL.	TINCION DE GRAM	FECHA DE AUTENTIFICACION	MORFOLOGIA CELULAR	MORFOLOGIA DE LA COLONIA	VEL. DE CRECIMIENTO
1	A	15-8-91	-	22-8-91	BACILOS	REG.Y CONVEXA	3-4 DIAS
2	A	19-8-91	-	22-8-91	BACILOS	REG.Y CONVEXA	3-4 DIAS
3	A	15-8-91	-	22-8-91	BACILOS	REG.Y CONVEXA	3-4 DIAS
4	A	15-8-91	-	22-8-91	BACILOS	REG.Y CONVEXA	3-4 DIAS
5	A	15-8-91	-	22-8-91	BACILOS	REG.Y CONVEXA	3-4 DIAS
6	A	15-8-91	-	22-8-91	BACILOS	REG.Y CONVEXA	3-4 DIAS
7	A	15-8-91	-	22-8-91	BACILOS	REG.Y CONVEXA	3-4 DIAS
8	A	15-8-91	-	22-8-91	BACILOS	REG.Y CONVEXA	3-4 DIAS
9	A	15-8-91	-	22-8-91	BACILOS	REG.Y CONVEXA	3-4 DIAS
10	A	15-8-91	-	22-8-91	BACILOS	REG.Y CONVEXA	3-4 DIAS
11	A	15-8-91	-	22-8-91	BACILOS	REG.Y CONVEXA	3-4 DIAS
12	B	26-7-91	-	22-8-91	BACILOS	REG.Y CONVEXA	3-4 DIAS
13	B	26-7-91	-	22-8-91	BACILOS	REG.Y CONVEXA	+5 DIAS
14	B	14-8-91	-	22-8-91	BACILOS	REG.Y CONVEXA	+5 DIAS
15	C	25-7-91	-	22-8-91	BACILOS	REG.Y CONVEXA	3-4 DIAS
16	C	30-7-91	-	22-8-91	BACILOS	REG.Y CONVEXA	3-4 DIAS
17	C	25-7-91	-	22-8-91	BACILOS	REG.Y CONVEXA	3-4 DIAS
18	C	25-7-91	-	22-8-91	BACILOS	REG.Y CONVEXA	3-4 DIAS
19	D	14-8-91	-	22-8-91	BACILOS	REG.Y CONVEXA	+5 DIAS
20	E	13-8-91	-	22-8-91	BACILOS	REG.Y CONVEXA	3-4 DIAS
21	E	13-8-91	-	22-8-91	BACILOS	REG.Y CONVEXA	+5 DIAS
22	E	14-8-91	-	22-8-91	BACILOS	REG.Y CONVEXA	3-4 DIAS
23	E	13-8-91	-	22-8-91	BACILOS	REG.Y CONVEXA	3-4 DIAS
24	E	13-8-91	-	22-8-91	BACILOS	REG.Y CONVEXA	3-4 DIAS
25	E	13-8-91	-	22-8-91	BACILOS	REG.Y CONVEXA	+5 DIAS
26	E	13-8-91	-	22-8-91	BACILOS	REG.Y CONVEXA	3-4 DIAS
27	E	13-8-91	-	22-8-91	BACILOS	REG.Y CONVEXA	+5 DIAS
28	E	13-8-91	-	22-8-91	BACILOS	REG.Y CONVEXA	+5 DIAS
29	E	19-8-91	-	22-8-91	BACILOS	REG.Y CONVEXA	+5 DIAS
30	D	14-8-91	-	22-8-91	BACILOS	REG.Y CONVEXA	3-4 DIAS
31	D	14-8-91	-	22-8-91	BACILOS	REG.Y CONVEXA	+5 DIAS
32	Op92	REFERENCIA	-	27-8-91	BACILOS	REG.Y CONVEXA	3-4 DIAS
33	D	14-8-91	-	22-8-91	BACILOS	REG.Y CONVEXA	3-4 DIAS
34	D	14-8-91	-	22-8-91	BACILOS	REG.Y CONVEXA	+5 DIAS
35	D	14-8-91	-	22-8-91	BACILOS	REG.Y CONVEXA	+5 DIAS
36	D	14-8-91	-	22-8-91	BACILOS	REG.Y CONVEXA	3-4 DIAS
37	D	14-8-91	-	22-8-91	BACILOS	REG.Y CONVEXA	3-4 DIAS
38	D	14-8-91	-	22-8-91	BACILOS	REG.Y CONVEXA	3-4 DIAS
39	D	14-8-91	-	22-8-91	BACILOS	REG.Y CONVEXA	+5 DIAS

TABLA No. 2. Resultados de los aislamientos obtenidos en el presente estudio, la zona de muestreo de donde se aislaron, la fecha del primoaislamiento, la autentificación de Gram, la morfología celular al microscopio, la morfología de la colonia y su velocidad de crecimiento en medio ELWA.

No. DE CEPA	BROMOTIMOL	pH9	pH7	pH4
1	ACIDO	CERO	CERO	CERO
2	ACIDO	3	CERO	CERO
3	ACIDO	+300	CERO	CERO
4	ACIDO	CERO	+300	CERO
5	ACIDO	CERO	CERO	43
6	ACIDO	+300	CERO	CERO
7	ACIDO	55	CERO	CERO
8	ACIDO	CERO	60	CERO
9	ACIDO	+300	CERO	CERO
10	ACIDO	7	CERO	CERO
11	ACIDO	+300	CERO	CERO
12	ACIDO	CERO	CERO	CERO
15	ACIDO	+300	+300	+300
16	ACIDO	50	CERO	CERO
17	ACIDO	9	CERO	CERO
18	ACIDO	CERO	+300	CERO
20	ACIDO	+300	+300	+300
22	ACIDO	CERO	55	CERO
23	ACIDO	+300	+300	49
24	ACIDO	+300	CERO	16
26	ACIDO	+300	+300	55
30	ACIDO	+300	+300	+300
32 (REF.)	ACIDO	20	CERO	3
33	ACIDO	+300	+300	CERO
36	ACIDO	+300	+300	+300
37	ACIDO	+300	+300	112
38	ACIDO	CERO	+300	37

TABLA No. 3A. Grupo de aislados que resultaron ácidos en la prueba de Bromotimol, así como el número de colonias obtenidas en diferentes pH's (9, 7 y 4).

No. DE CEFA	BROMOTIMOL	pH9	pH7	pH4
13	ALCALINA	+300	+300	CERO
14	ALCALINA	+300	150	CERO
19	ALCALINA	+300	+300	CERO
21	ALCALINA	40	+300	60
25	ALCALINA	24	+300	107
27	ALCALINA	+300	+300	CERO
28	ALCALINA	217	66	CERO
29	ALCALINA	+300	+300	+300
31	ALCALINA	+300	+300	+300
34	ALCALINA	+300	CERO	CERO
35	ALCALINA	+300	+300	+300
39	ALCALINA	7	CERO	CERO

TABLA No. 3B. Grupo de aislados que resultaron alcalinos en la prueba de Bromotimol, así como el número de colonias obtenidas en diferentes pH's (9, 7 y 4).

En lo general se puede decir que los aislados de lento crecimiento se adaptan mejor a las variaciones de pH, en tanto que las de crecimiento rápido lo hacen en un pH alcalino.

El crecimiento de los aislados en las 6 fuentes de carbono se muestra en las tablas 4A y 4B. En la tabla 4A se resumen los aislados de crecimiento rápido (productoras de ácido), se observa que 13 aislados crecieron en Glicerol, 11 en Fructosa, 13 en Glucosa, 12 en Sacarosa, 15 en Maltosa y 13 en Lactosa. Es decir de un 28 a un 38 % de este grupo crecieron en al menos una fuente de carbono, siendo los aislados 15, 20, 22, 23, 26, 33, 36 y 37 los que crecieron en todas las fuentes de carbono, que también reportaron un amplio espectro de crecimiento en pH. La cepa de referencia sólo alcanzó un desarrollo adecuado en glicerol.

En la tabla 4B se observa el resultado de los aislados de crecimiento lento (productores de álcali), es decir, 12 se desarrollaron en Glicerol, 9 en Fructosa, 8 en Glucosa, 10 en Sacarosa, 10 en Maltosa y 10 en Lactosa, en general se dió un crecimiento de un 66 a un 100% para todos los aislados, siendo el 13, 21, 25, 27 y 35 los que utilizan todas las fuentes de carbono probadas, en tanto que es en Glicerol donde crecieron mejor.

El análisis de esto nos permite decir que el uso de una determinada fuente de carbono, va a depender del tipo de experimento a realizar.

Por otra parte, la utilización de cualquier fuente de carbono depende del tipo de enzima presente en la bacteria y del tipo de transportador del azúcar a la célula.

Los resultados del crecimiento con antibióticos para los dos grupos de aislados se muestran en las tablas 5A y 5B. Los aislados de crecimiento rápido mostraron una sensibilidad del 74% a la Eritromicina y Estreptomina; una sensibilidad del 29 al 40 % para Polimixina, Ampicilina, Rifampicina, Gentamicina, Cloranfenicol, Kanamicina y Acido Nalidixico, y la sensibilidad

CEPA	GLICEROL	FRUCTOSA	GLUCOSA	SACAROSA	MALTOSA	LACTOSA
1	CERO	CERO	CERO	CERO	130	52
2	CERO	CERO	CERO	1	CERO	CERO
3	CERO	CERO	CERO	CERO	8	CERO
4	CERO	CERO	+300	CERO	+300	CERO
5	10	CERO	CERO	CERO	CERO	+300
6	CERO	CERO	CERO	CERO	CERO	3
7	CERO	CERO	CERO	CERO	CERO	CERO
8	CERO	CERO	+300	CERO	+300	CERO
9	CERO	CERO	CERO	CERO	CERO	CERO
10	CERO	CERO	CERO	CERO	CERO	CERO
11	CERO	CERO	+300	CERO	1	CERO
12	CERO	12	CERO	CERO	CERO	CERO
15	+300	+300	+300	+300	+300	+300
16	20	CERO	CERO	CERO	CERO	CERO
17	CERO	CERO	CERO	CERO	CERO	CERO
18	CERO	+300	CERO	+300	CERO	CERO
20	+300	+300	134	18	+300	+300
22	+300	63	88	+300	+300	+300
23	+300	+300	206	+300	+300	+300
24	CERO	CERO	CERO	CERO	CERO	+300
26	+300	15	20	25	+300	+300
30	85	+300	+300	112	+300	CERO
32	+300	CERO	CERO	CERO	CERO	CERO
33	92	42	+300	15	+300	+300
36	+300	128	+300	48	44	+300
37	+300	181	+300	+300	+300	+300
38	+300	CERO	+300	7	+300	+300

TABLA No. 4A. Número de colonias obtenidas en diferentes fuentes de Carbono (Glicerol, Fructosa, Glucosa, Sacarosa, Maltosa y Lactosa) para el grupo de aislados de crecimiento rápido de la zona de estudio.

CEPA	GLICEROL	FRUCTOSA	GLUCOSA	SACAROSA	MALTOSA	LACTOSA
13	34	+300	+300	48	+300	68
14	+300	+300	238	CERO	+300	+300
19	123	+300	+300	+300	103	CERO
21	+300	17	21	36	+300	+300
25	263	49	204	117	+300	+300
27	+300	24	+300	58	+300	+300
28	65	CERO	CERO	37	+300	+300
29	+300	217	CERO	112	74	56
31	28	CERO	+300	+300	261	+300
34	+300	53	CERO	5	CERO	+300
35	225	257	+300	248	+300	+300
39	110	CERO	CERO	CERO	CERO	CERO

TABLA No. 4B. Número de colonias obtenidas en diferentes fuentes de Carbono (Glicerol, Fructosa, Glucosa, Sacarosa, Maltosa y Lactosa) para el grupo de aislados de crecimiento -- lento de la zona de estudio.

CEPA	Cl	Ka	Te	Nd	Px	Am	E	Es	Rf	Ge
1	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S
2	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
3	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
4	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
5	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
6	R	R	R	R	S	R	S	R	S	R
7	R	S	R	R	R	R	S	R	R	S
8	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
9	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S
10	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
11	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
12	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
15	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
16	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R
17	R	R	R	R	S	R	S	R	R	S
18	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R
20	R	R	R	S	R	R	S	R	S	S
22	S	R	R	S	R	R	S	R	R	S
23	S	S	R	S	S	R	S	S	R	S
24	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R
26	S	S	R	S	S	S	S	R	S	R
30	S	S	R	R	R	S	S	S	S	R
32	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R
33	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
36	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
37	S	R	R	S	R	S	S	S	R	S
38	S	S	R	S	R	S	R	S	R	S

TABLA No. 5A. Resultados del crecimiento de los aislados ácidos de la zona de estudio, con diferentes antibióticos. R=resistente (si hay crecimiento), S=sensible (no hay -- crecimiento). Cl=Cloranfenicol 30 mog, Ka=Kanamicina 30 mog, Te=Tetraciclina 30 mog, Nd=Acido Nalidixico 30 mog, Px=Polimixina B 300 u, Am=Ampicilina 10 mog, E= Eritromicina 15 mog, Es=Estreptomicina 10 mog, Rf=Rifampicina 5 mog, Ge=Gentamicina 10 mog (Unidisos Bigaux Diagnostica S.A.)

CEPA	Cl	Ka	Te	Nd	Px	Am	E	Es	Rf	Ge
13	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R
14	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R
19	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
21	S	R	R	S	S	R	R	R	R	R
25	S	R	R	S	S	S	R	R	R	S
27	R	R	R	S	R	S	R	R	R	S
28	R	S	R	S	S	R	R	R	R	S
29	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R
31	S	R	R	R	R	S	S	S	R	S
34	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R
35	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
39	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R

TABLA No. 5B. Resultados del crecimiento de los aislados alcalinos de la zona de estudio, con diferentes antibióticos. R=resistente (si hay crecimiento), S=sensible (no hay crecimiento). Cl=Cloranfenicol 30 mcg, Ka=Kanamicina 30 mcg, Te=Tetraciclina -- 30 mcg, Nd=Acido Nalidixico 30 mcg, Px=Polimixina B 300 u, Am=Ampicilina 10 mcg, E=Eritromicina 15 mcg, Es=Estreptomicina 10 mcg, Rf=Rifampicina 5 mcg, Ge=Gentamicina 10 mcg (Unidisicos Bigaux Diagnostica S.A.).

menor (11.1%) correspondió a Tetraciclina. El aislado 12 fue resistente a todos los antibióticos, los nos. 2, 3, 4, 5, 8, 10, 11, 15 y 18 tuvieron una resistencia del 90%, los nos. 6, 7, 9, 16, 17, 20, 22, y 32 (cepa de referencia) tuvieron una resistencia mayor al 50% a los antibióticos; en tanto que los de resistencia menor al 50% fueron los nos. 1, 23, 24, 26, 30, 33, 36, 37 y 38. Es decir las dos terceras parte de este grupo son resistentes a la mayoría de los antibióticos probados.

En la tabla 5B se observa que la mayor sensibilidad para los aislado de crecimiento lento corresponde al ac. nalidíxico (83%), siguiendo con un 66.6% de sensibilidad para el cloranfenicol, polimixina y ampicilina, el 50% de sensibilidad para eritromicina y estreptomocina, el 41.6% para kanamicina y gentamicina, y el 33.3% para tetraciclina y rifampicina. Los aislados con mas de un 50% de resistencia son los nos. 13, 14, 21, 27, 28 y 29, en tanto que los nos. 19, 25, 31, 34, 35 (el mas sensible a todos) y 39 tienen una resistencia menor al 50% de los antibióticos probados.

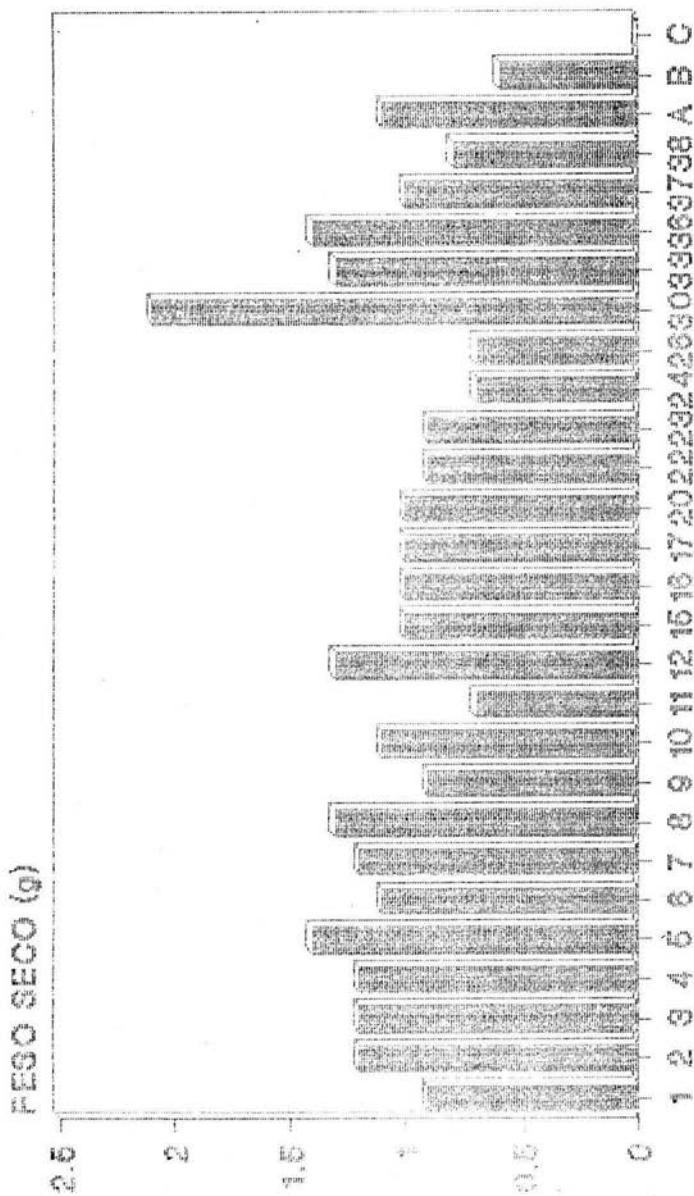
De acuerdo con el manual Bergey's (1984) los rhizobia son intrínsecamente mas sensibles a la tetraciclina y estreptomocina. Nuestros resultados para ambos grupos mostraron que la mayor resistencia se presentó en la tetraciclina, no así en la estreptomocina donde la mayor sensibilidad es para el grupo de aislados de crecimiento rápido.

III. PRUEBAS DE INFECTIVIDAD.

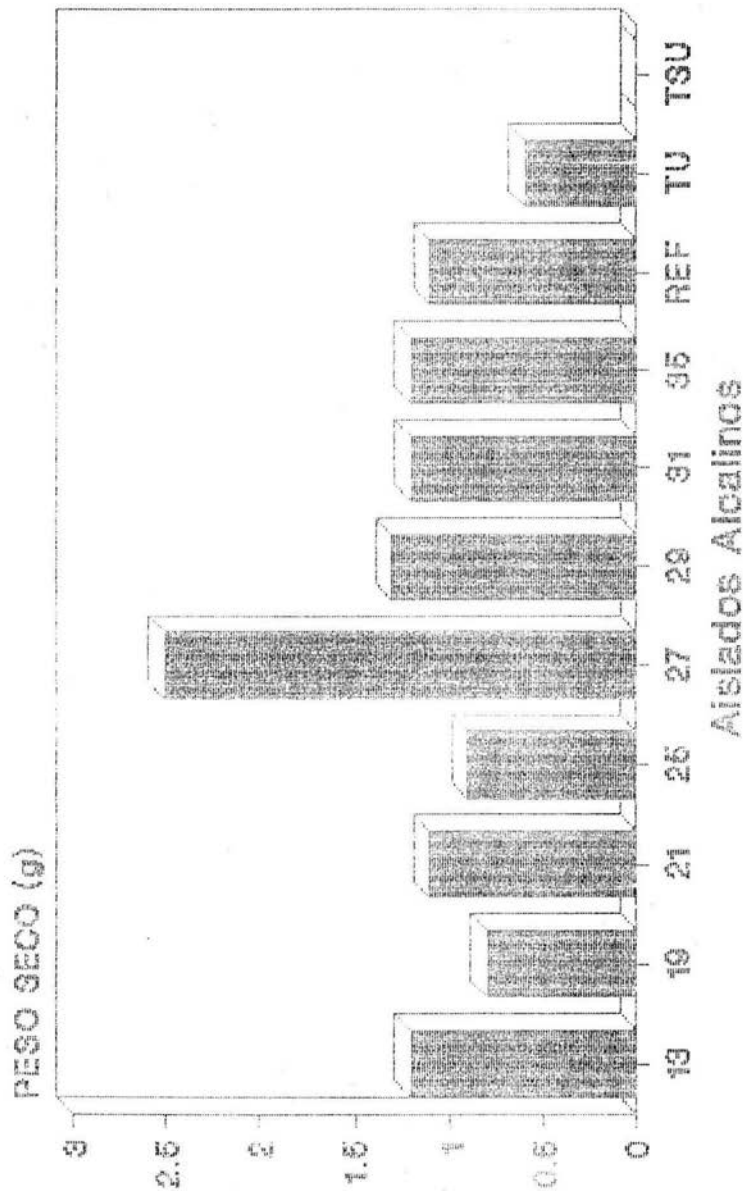
Esta prueba se realizó en bolsas de crecimiento adicionadas con solución de Jensen y una cantidad de 0.417 g de Urea C como fuente de N) por g de soporte usado (de la Garza, 1986); los testigos negativos no fueron adicionados con Urea.

Se dejaron en solarío durante 90 días regándose con agua destilada cada semana.

De las 39 cepas probadas, ninguna formó nódulos por lo que sólo se obtuvieron los datos para peso seco, el cual se observa en la gráfica número 1, para los aislados de crecimiento rápido.



GRAFICA No.1.El histograma representa el peso seco de las plantas tratadas con -- aislados acidos de la zona de estudio.



GRAFICA No. 2. El histograma representa el peso seco de las plantas tratadas con aislados alcalinos de la zona de estudio

REF. - CEPAS DE REFERENCIA

TU. - TESTIGO CON UREA

TSU. - TESTIGO SIN UREA

En dicha gráfica se aprecia que el aislado número 30 fué el de mayor desarrollo, en tanto que el 18 y el testigo sin urea no se desarrollaron.

El análisis de varianza (ANDEVA) realizado entre estos aislados fué de $F=2.3253$ ($P 0.05=1.82$) que indica una gran significancia, atribuida al efecto de los aislados sobre las plantas.

En la gráfica no.2 se observan los resultados en peso seco para los aislados alcalinos probados, resaltando que el testigo sin urea no se desarrolló, además de los aislados nos.: 14, 28, 34 y 39. El ANDEVA efectuado a este grupo fué de $F=9.6784$ ($P 0.05=2.25$), que indica alta significancia entre los tratamientos

El aislado ácido que presento un peso seco mas elevado fué el 30, en tanto que el aislado alcalino de mayor peso fué el 27.

En la tabla 6 se muestran los resultados del análisis que sobre contenido de nitrógeno se efectuó a 25 muestras de plantas seleccionadas al azar. El ANDEVA realizado a este grupo mostro una $F=72.043$ ($P 0.05=1.79$) que indica alta significancia entre los tratamientos, es decir entre las cepas (aislados) probadas.

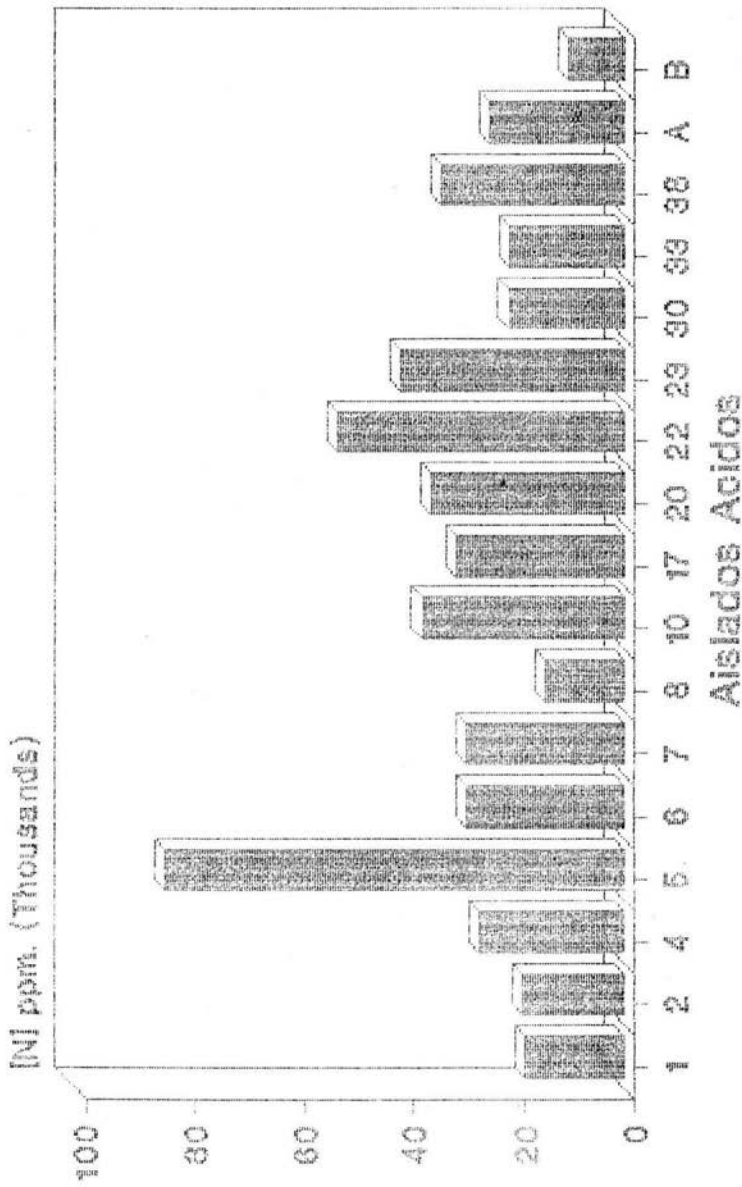
La gráfica no. 3 muestra los resultados comparativos del contenido de nitrógeno en las plantas tratadas con rhizobia ácidos, se observa que el aislado no. 5 es el mayor, siguiéndole los nos. 22, 23, 10 y 38; en este sentido se aprecia que no corresponden al aislado de mayor peso seco (el no. 30), y que también rebasan a la cepa de referencia usada, denotada aquí como la no. 32.

La gráfica no. 4 muestra la comparación del contenido de nitrógeno para las plantas tratadas con rhizobia alcalinos, los aislados mas representativos corresponden, en orden de importancia, a los nos.: 25, 29, 21 y 35, así mismo la cepa de mayor peso seco (la 27) no corresponde a las reportadas.

De los resultados obtenidos resalta la no formación de nódulos que, de acuerdo con Singh et.al. (1991), Kesava Rao et.al. (1990) y de la Garza (1986), puede ser debida a la carencia de

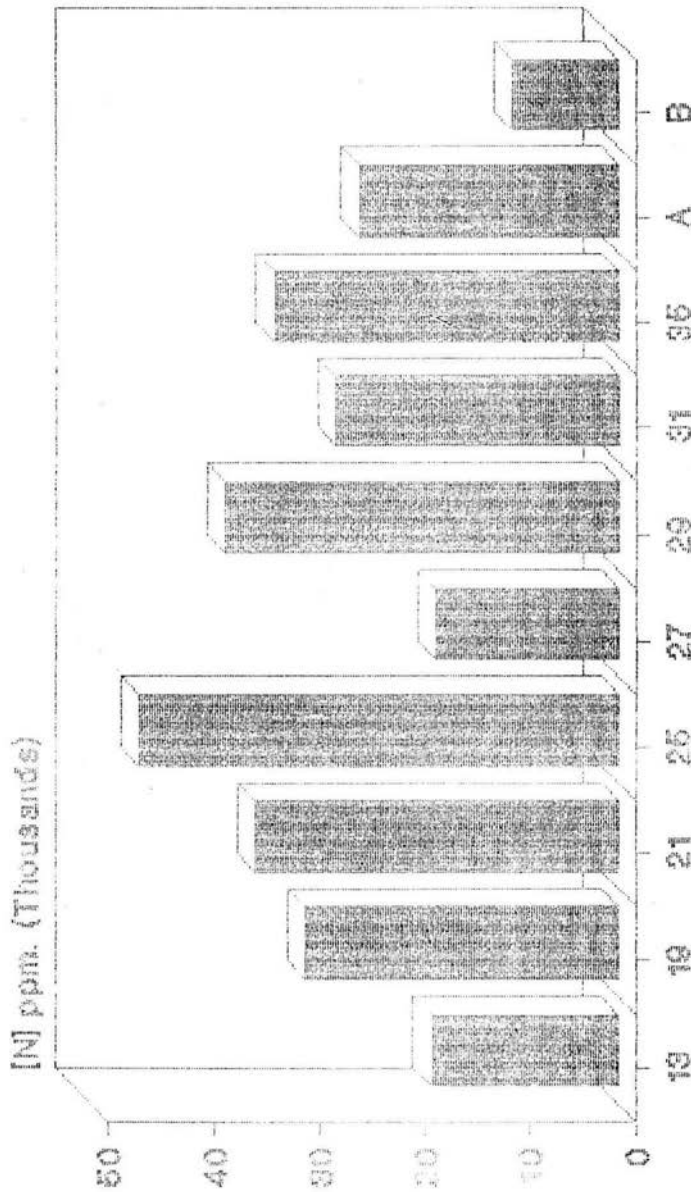
AISLADO	LECTURA	PESO (g)	FACTOR DE DILUCION	CONCENTRACION (ppm)
1-AC.	37.14	0.512	488.28	18135
2-AC.	43.07	0.585	427.35	18406
4-AC.	114.54	1.097	227.69	26103
5-AC.	235.10	0.704	355.11	83487
6-AC.	71.40	0.628	398.09	28424
7-AC.	97.21	0.849	294.46	28625
8-AC.	48.11	0.650	294.12	14150
10-AC.	103.09	0.746	335.12	36558
13-ALC.	66.10	0.936	287.09	17655
17-AC.	87.34	0.722	346.26	30242
19-ALC.	56.57	0.477	524.11	29649
21-ALC.	88.52	0.640	398.63	34578
20-AC.	73.05	0.525	476.19	34786
22-AC.	132.53	0.640	398.63	51770
23-AC.	110.94	0.666	364.43	40430
25-ALC.	86.29	0.474	527.43	45512
27-ALC.	101.41	1.469	170.18	17258
29-ALC.	113.48	0.759	329.38	37378
30-AC.	45.97	0.549	455.37	20934
31-ALC.	58.04	0.542	461.25	26771
32-REF.	57.86	0.588	425.17	24600
33-AC.	48.50	0.581	430.29	20969
35-ALC.	66.69	0.510	490.20	32691
38-AC.	72.64	0.549	455.37	33078
TEST-U.	18.99	0.466	536.48	10188

TABLA No. 6. Resultados del contenido de nitrógeno en 25 muestras de plantas. La lectura se refiere al valor ajustado del extracto a la curva de calibración. El factor de dilución es la relación de la muestra y el volumen al cual fue atorada (250 ml/peso de cada muestra). La concentración real de la muestra se obtiene multiplicando la lectura del extracto por el factor de dilución. Se redondearon a dos decimales la lectura y el factor de dilución, el resultado de la muestra se redondeo a unidades (T.A. II, 1979).



GRAFICA No. 3. Histograma que representa el contenido de nitrogeno en las plantas probadas con aislados acidos.

A. - CEPA DE REFERENCIA
 B. - TESTIGO CON UREA



GRAFICA No. 4. Histograma que representa el contenido de nitrógeno en las plantas probadas con aislados alcalinos.

A. - CEPA DE REFERENCIA

B. - TESTIGO CON UREA

hongos micorrícicos (MVA) que permiten la asimilación de nutrimentos minerales del suelo, especialmente elementos inmóviles como P, Ca y Mg que son indispensables para la nodulación.

Por otra parte, las diferencias significativas en el contenido de nitrógeno serían consideradas de dos formas:

a) Una que supone la asimilación de nitrógeno a partir de la Urea adicionada en el medio y otra de la fijación de N_2 . En este sentido la ausencia de nódulos que manifiestan en sentido estricto la colonización por rhizobia, supone que es poco probable que se haya asimilado N_2 ,

b) Y otra en donde la simbiosis se haya presentado como lo hace *Azospirillum-L. maiz*, que tampoco nodula. Es interesante comentar que hay indicios de una relación similar con *A. hyrogaea* (Raverkar y Konde, 1988).

IV. MICORRIZAS:

Para poder valorar y utilizar biotecnológicamente las endomicorrizas VA es necesario conocer la dinámica de éstas, que incluye la descripción de las variaciones del componente fúngico en relación con el hospedero, las propiedades de los suelos y algunos parámetros agronómicos bióticos o climáticos.

Antes de que se examine la posibilidad de introducir cepas es necesario un mejor entendimiento de la ecología de las endomicorrizas nativas del lugar donde se pretenden introducir, además estudiando la distribución y la abundancia de las micorrizas en relación con algunas propiedades del suelo y las características del lugar (Gavito, 1991).

IVa1 DETERMINACION DE LOS GENEROS MICORRIZAS VA.

La identificación de los hongos micorrícicos VA nativos es el primer paso en la descripción de las poblaciones del lugar que se pretenda estudiar, Son pocos los listados de estos organismos, en México casi no existen estos reportes.

La identificación taxonómica de los endosimbiontes VA se basa en el análisis de las características de las esporas, como puede verse en las figs. nos. 3, 4, 5, 6 y 7 donde se muestran las características de los diferentes géneros encontrados. Como ya mencionamos las esporas son el medio de sobrevivencia de los hongos VA cuando no hay plantas hospederas vivas (Sutton y Barron, 1972).

La siguiente tabla muestra los géneros nativos de micorrizas VA que infectan a la planta de cacahuate en el municipio de Huitzuc de los Figueroa edo. de Guerrero; agrupados en familias, y subordenes de acuerdo a la propuesta hecha por Morton y Benny 1990:

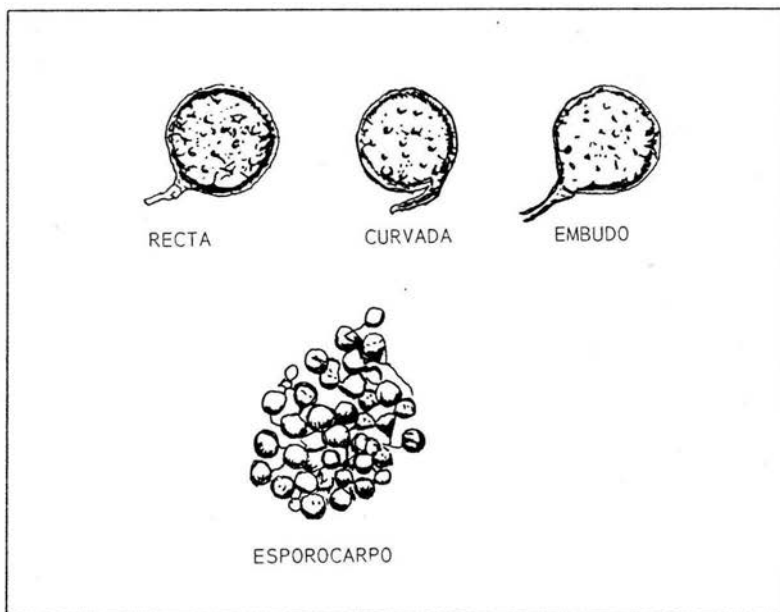
SUBORDEN	FAMILIA	GENERO	N° DE SP N. I.
Glominie	Glomaceae	<i>Glomus</i>	4
		<i>Sclerocystis</i>	2
	Acaulosporaceae	<i>Acaulospora</i>	1
Gigasporine	Gigasporaceae	<i>Scutellispora</i>	3
		<i>Gigaspora</i>	2

Como puede observarse todas las familias están representadas, aunque no se encontró ninguna especie del género *Entrophospora*.

Los géneros mejor representados son: *Glomus* (microfotografías 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7) y *Scutellispora* con cuatro y tres especies n.i. respectivamente. La información disponible de los hongos micorrízicos es muy escasa y existen pocos reportes para México que permitan comparar, a no ser por el manual de Schenck y Pérez (1990), ellos determinaron que *Acaulospora* (microfotografías 14, 15 y 16), *Scutellispora* y *Sclerocystis* (microfotografías 8, 9, 10, 11, 12 y 13) son géneros que se encuentran comunmente en las zonas tropicales y corresponden a las encontradas en la zona de estudio.

Dado que la identificación de los hongos VA se basa en las características de las esporas, la lista de los géneros de la zona incluye unicamente a las especies que esporularon en el campo. ,Si

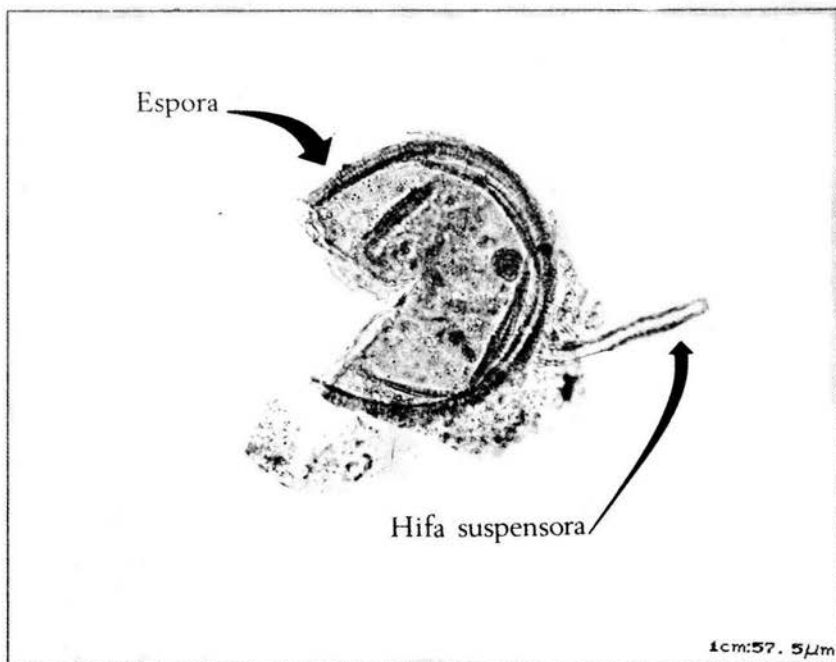
GLOMUS



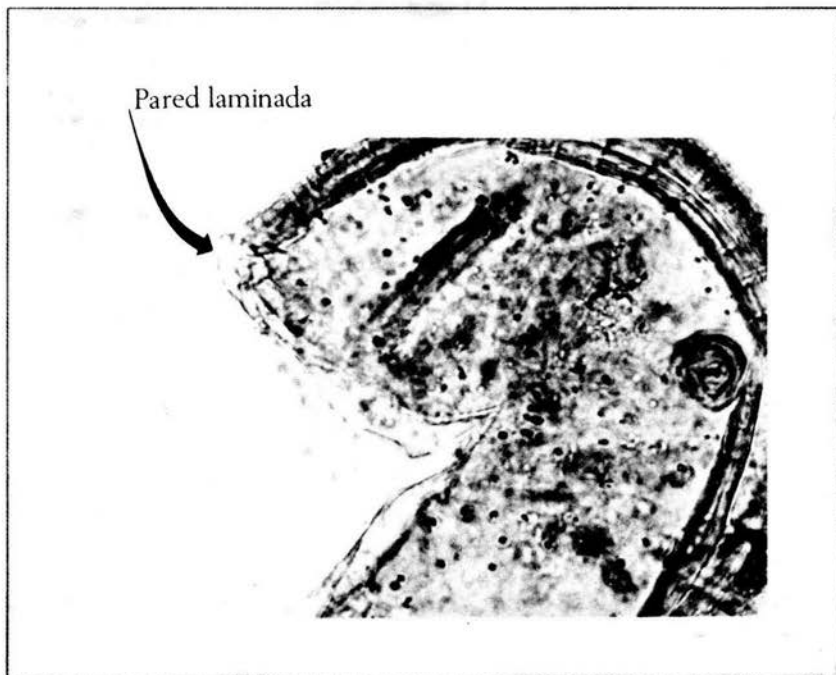
LAS ESPORAS SE FORMAN TERMINALMENTE SOBRE LAS HIFAS INDIFERENCIADAS, EN ESPOROCARPOS O INDIVIDUALMENTE EN EL SUELO Y OCACIONALMENTE DENTRO DE LAS RAICES. LA MAYORIA DE LAS VECES LAS ESPORAS SON HIPOGEAS AUNQUE LOS ESPOROCARPOS DE ALGUNAS ESPECIES PUEDEN FORMARSE SOBRE EL MUSGO, SUPERFICIE DEL SUELO O SOBRE DETRITUS.

LA HIFA SUSPENSORIA PUEDE INSERTARSE A LA ESPORA EN FORMA DE EMBUDO RECTA O CURVA.

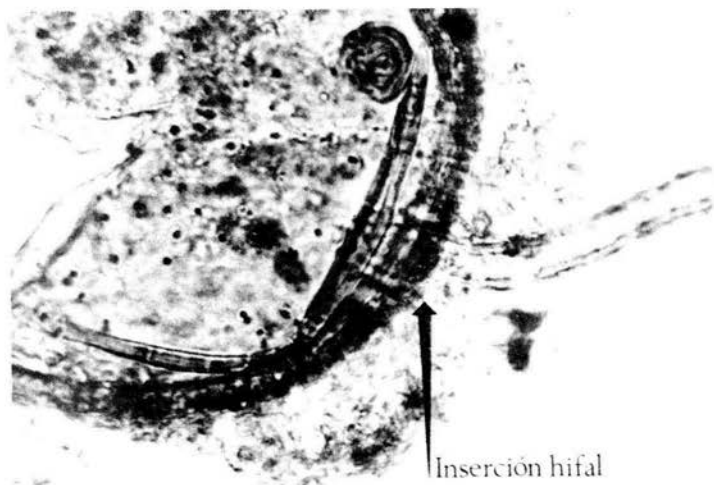
FIGURA 3



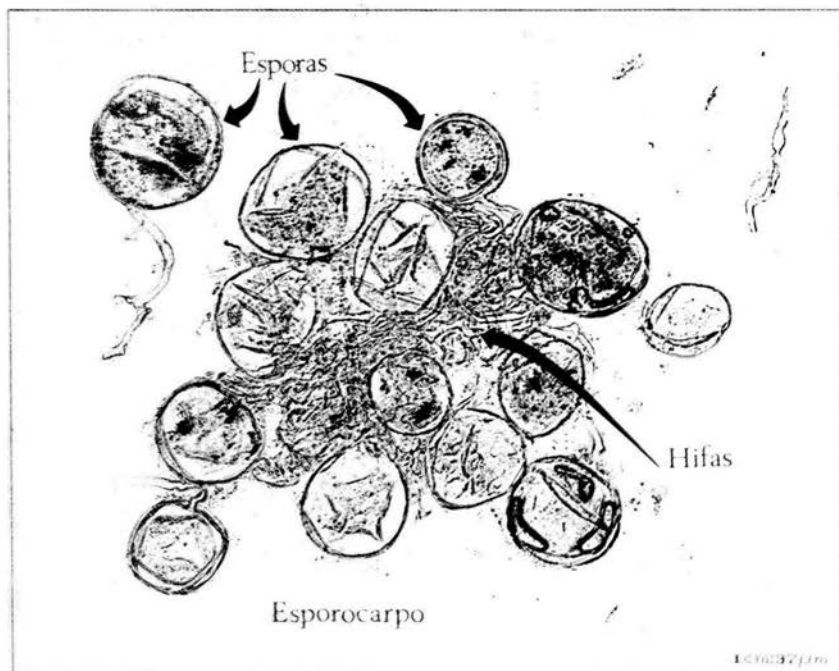
MICROFOTOGRAFIA 1: ESPORA SOLITARIA DE *Glomus* sp
DONDE SE OBSERVA LA HIFA SUSPENSORA RECTA.



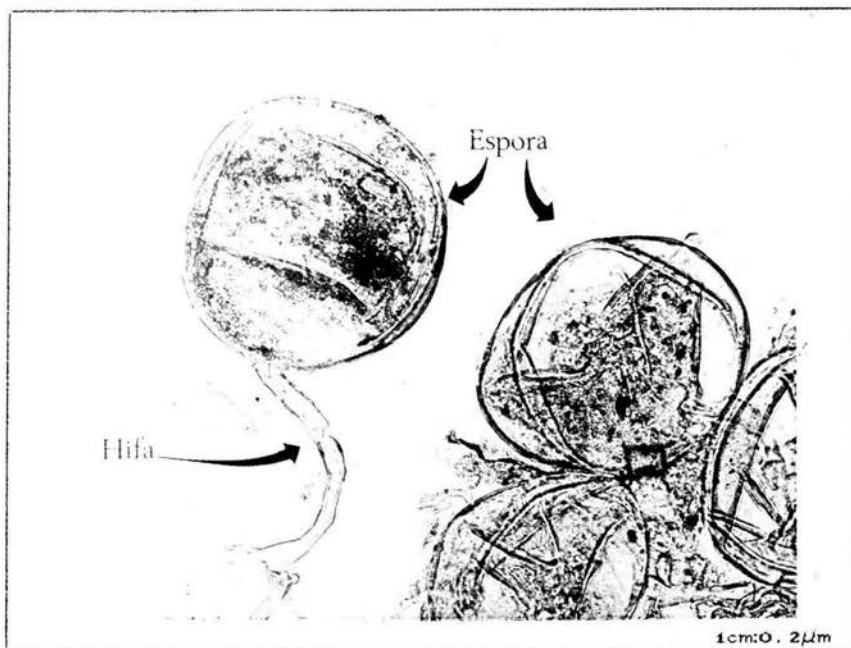
MICROFOTOGRAFIA 2: LA MISMA ESPORA AMPLIFICADA A
40X. SE OBSERVAN LAS DIFERENTES CAPAS QUE FORMAN LA
PARED LAMINADA.



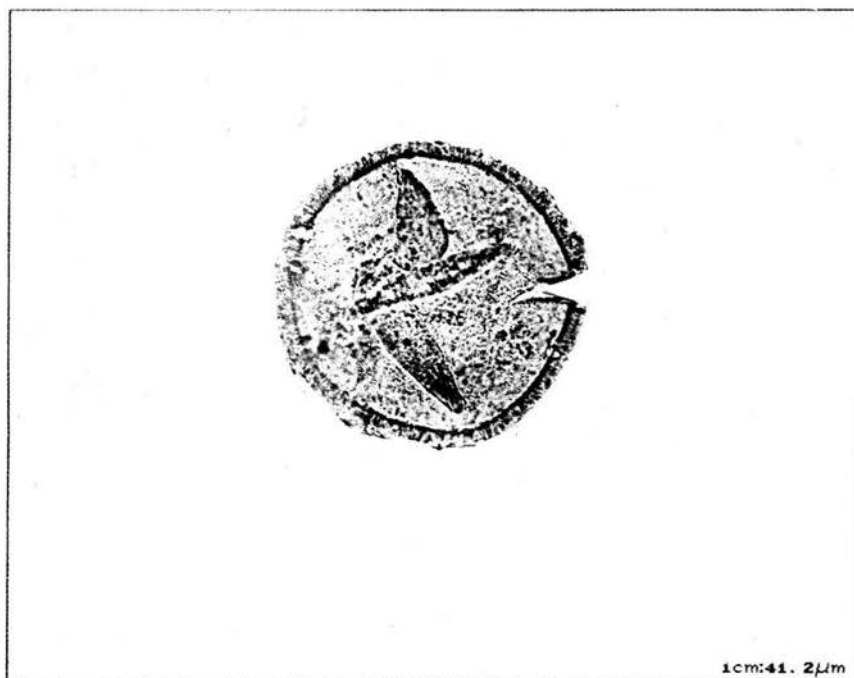
MICROFOTOGRAFIA 3 AMPLIACION DE OTRA SECCION DE LA ESPORA DONDE SE OBSERVA LA PARED LAMINADA Y LA HIFA SUSPENSORA RECTA. VISTA A 40X.



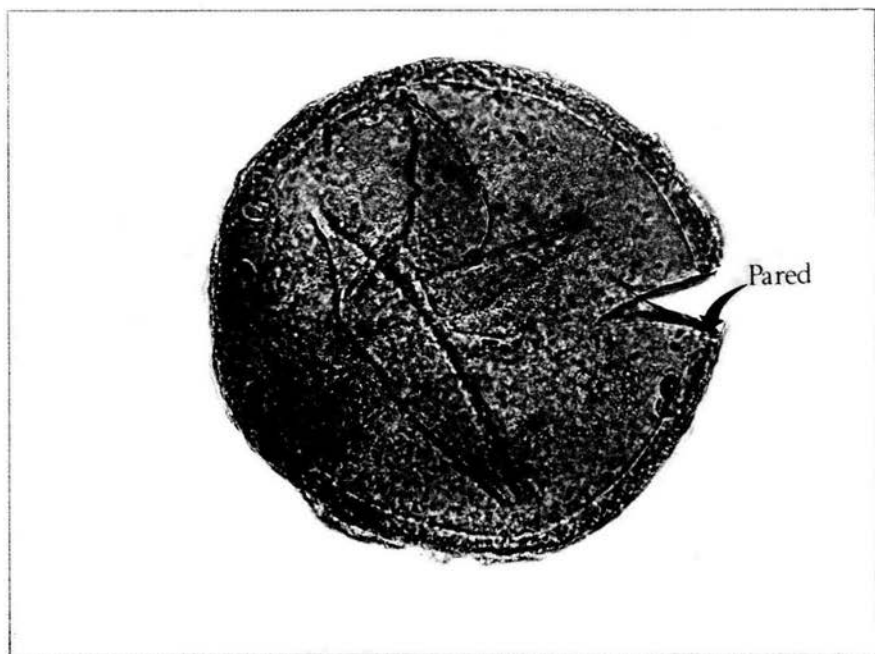
MICROFOTOGRAFIA 4 ESPOROCARPIO DE *Glomus* sp DONDE SE OBSERVAN GRAN CANTIDAD DE ESPORAS EMBEBIDAS EN UNA MATRIZ DE HIFAS. VISTA A 10X



MICROFOTOGRAFIA 5: AMPLIACION DEL ESPOROCARPO ANTERIOR DONDE SE OBSERVA QUE LA ESPORA DESPRENDIDA TIENE UNA HIFA SUSPENSORA RECTA TIPICA DEL GENERO *Glomus* sp. VISTA A 40X.

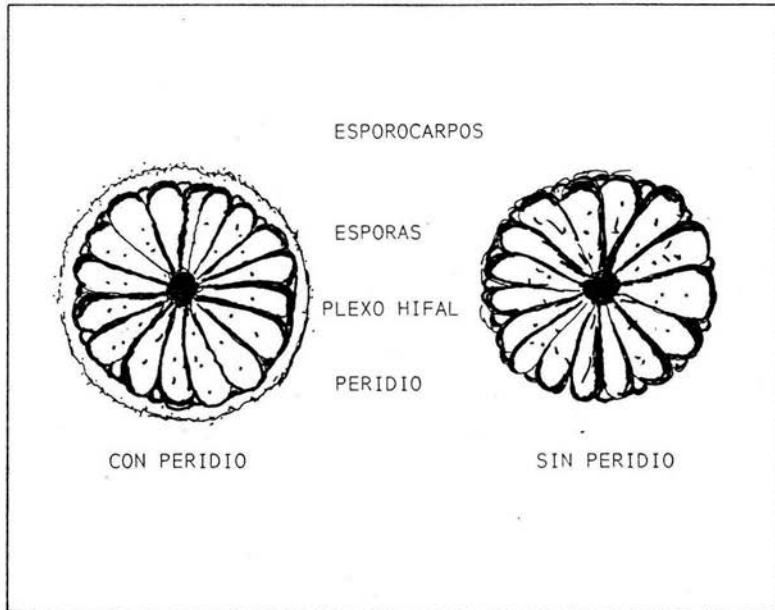


MICROFOTOGRAFIA 6: ESPORA DE *Glomus* sp QUE DEBIDO A SU MANEJO HA PERDIDO LA HIFA SUSTENTORA. 10X.



MICROFOTOGRAFIA 7: *Glomus* sp DONDE SE OBSERVA UNA PARED EXTERNA MUY GRUESA. 40X.

SCLEROCYSTIS

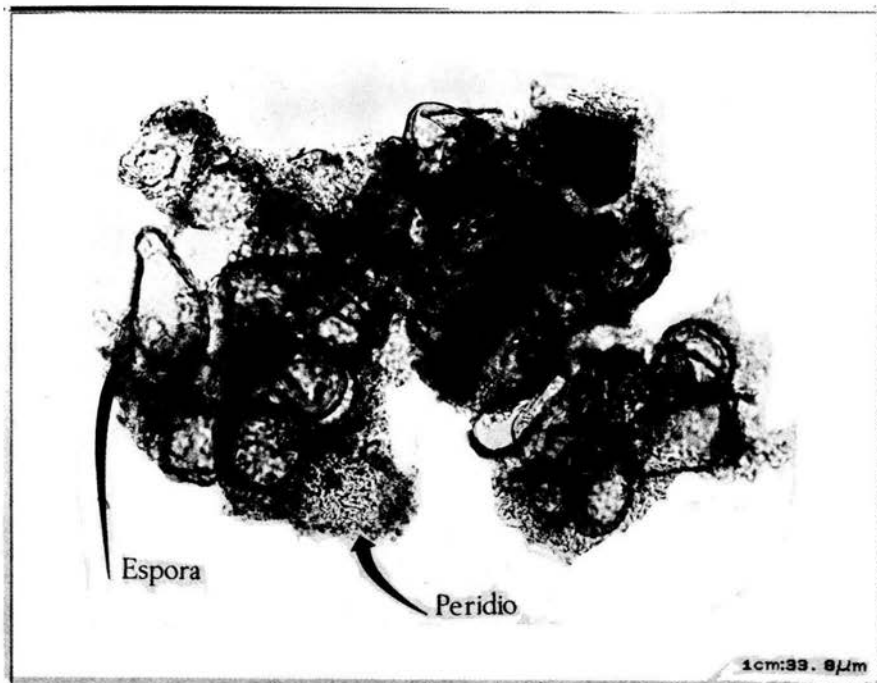


ESTE GENERO SE CARACTERIZA POR FORMAR ESPORAS ARREGLADAS ORDENADAMENTE ALREDOR DE UN PLEXO CENTRAL DE HIFAS FORMANDO SIEMPRE ESPOROCARPOS.

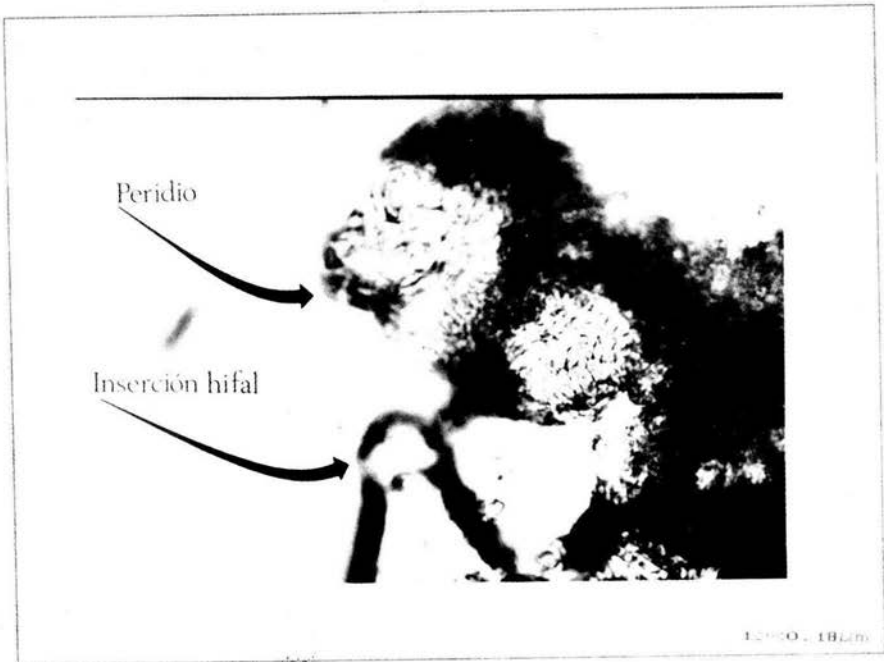
FIGURA 4



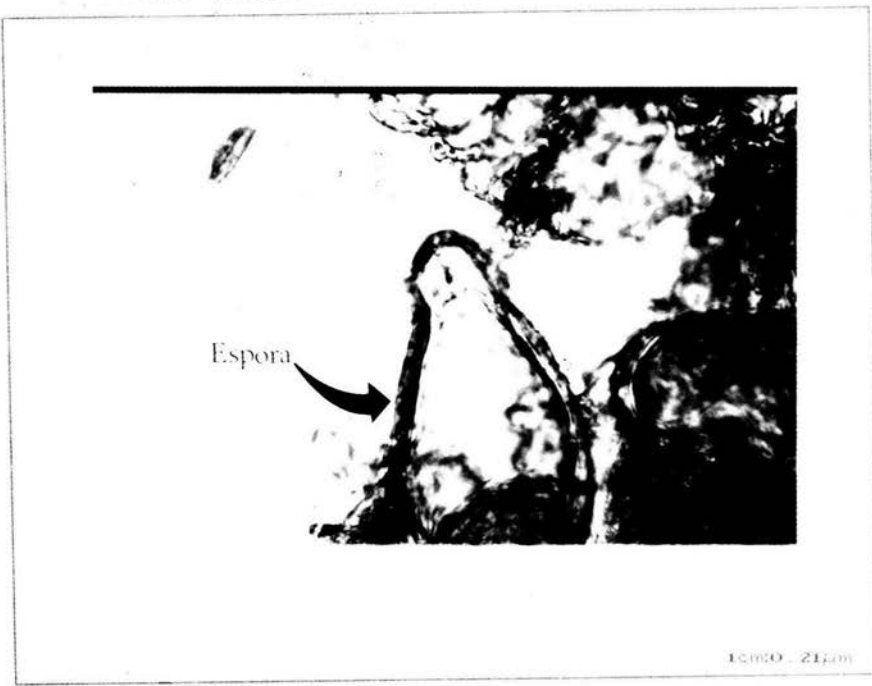
MICROFOTOGRAFIA 8: CORTE DE UN ESPOROCARPO DE *Sclerocystis* sp. 10x DONDE SE OBSERVAN LAS HIFAS QUE RODEAN LAS ESPORAS FORMANDO EL PERIDIO.



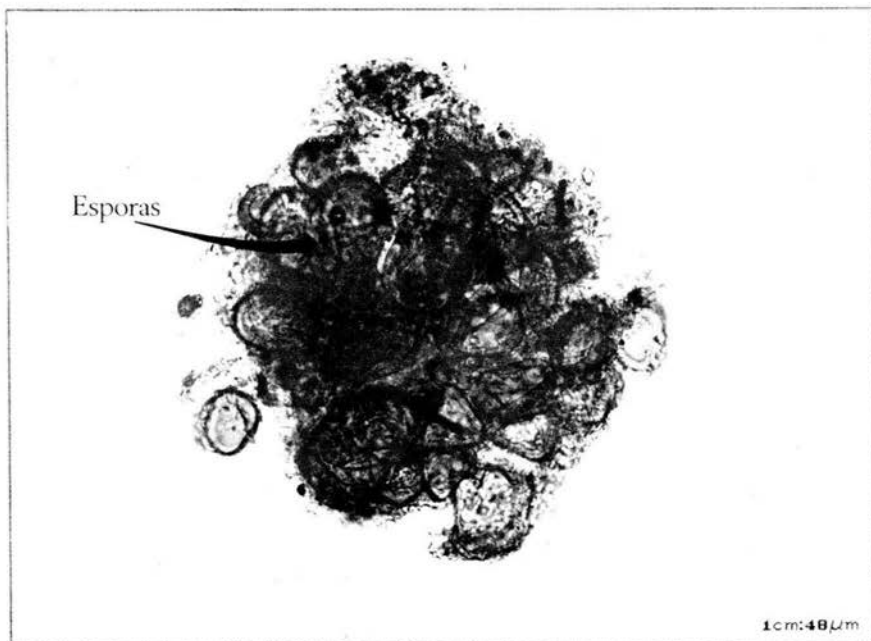
MICROFOTOGRAFIA 9: CORTE DE UN ESPOROCARPO DE *Sclerocystis* sp. 10x, DONDE SE DISTINGUEN ESPORAS QUE PRESENTAN FORMA CLAVADA. TAMBIEN SE OBSERVAN LAS HIFAS PERIDIALES QUE RODEAN LAS ESPORAS.



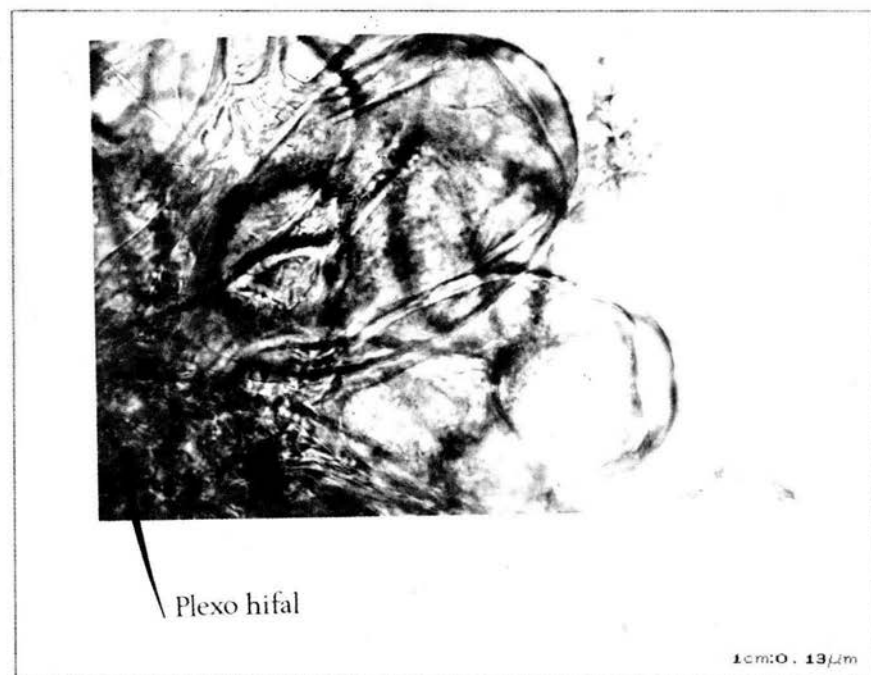
MICROFOTOGRAFIA 10: CORTE DE UN ESPOROCARPO DE *Sclerocystis* sp. 40 X SE DISTINGUEN LAS HIFAS SINUOSAS MUY ENTRELAZADAS QUE FORMAN EL PERIDIO.



MICROFOTOGRAFIA 11: ESPORA ANCHAMENTE CLAVADA DE *Sclerocystis* sp. 40x

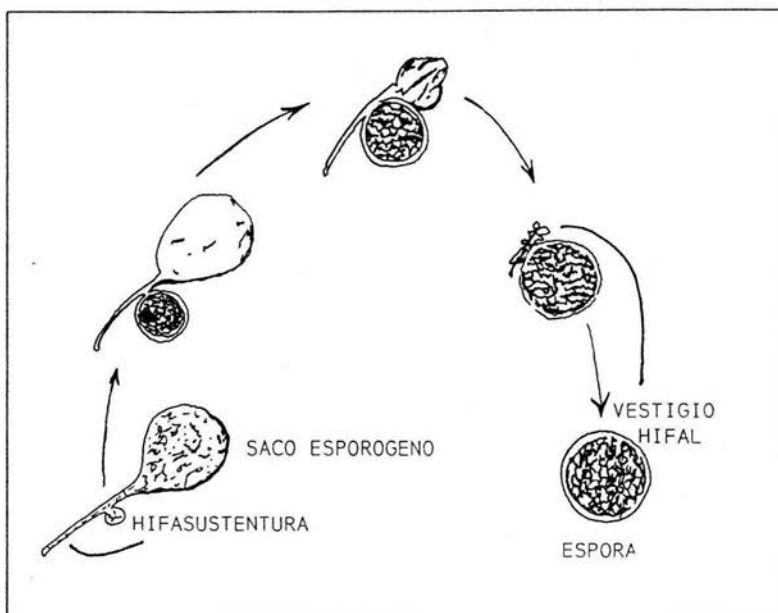


MICROFOTOGRAFIA 12: ESPOROCARPO DE *Sclerocystis* sp.
QUE CÁRECE DE PERIDIO. 10X.



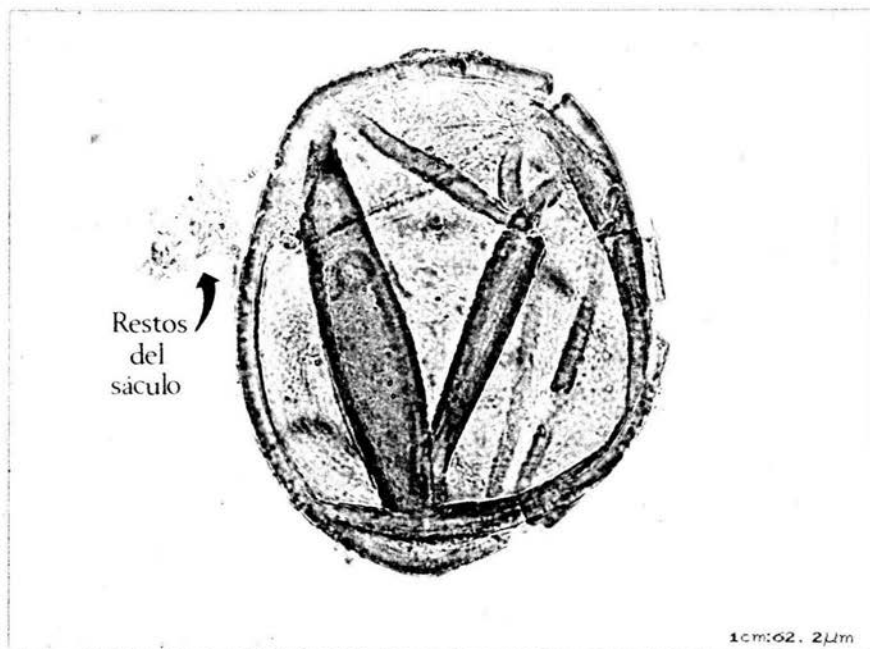
MICROFOTOGRAFIA 13: VARIAS ESPORAS DE *Sclerocystis* sp.
DONDE SE OBSERVA LA DISPOSICION DE LAS MISMAS Y SU
FORMA ANCHAMENTE CLAVADA. 40X.

ACAULOSPORA

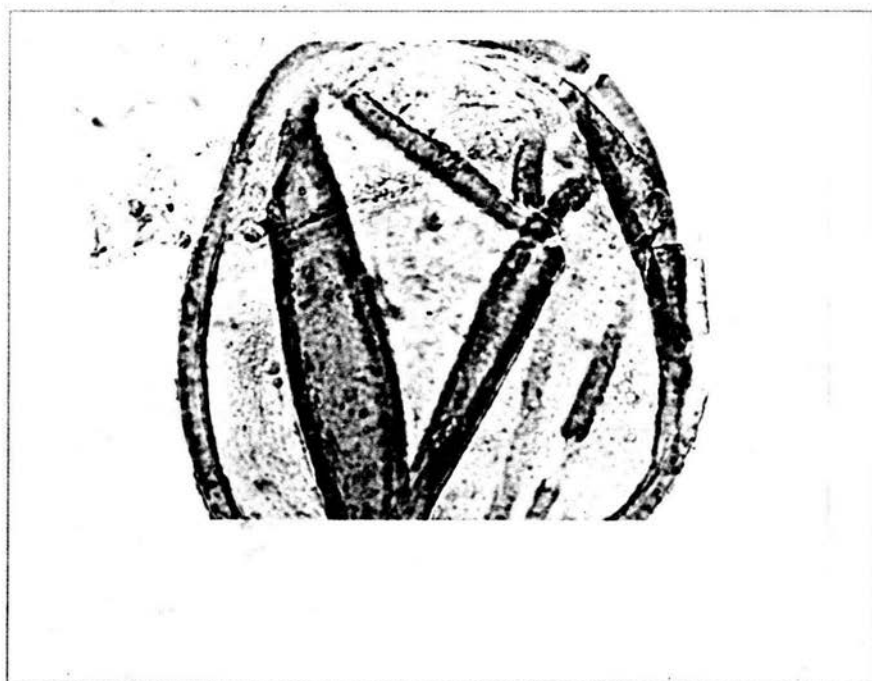


ESPORAS QUE SE FORMAN LATERALMENTE SOBRE UNA HIFA SUSTENTORA QUE TERMINA EN UN SACO ESPOROGENO DE PARED DELGADA. EL SACULO O ESPOROGENO PUEDE ALCANZAR HASTA DOS VECES EL TAMAÑO DE LA ESPORA Y SU CONTENIDO ES TRANSFERIDO A LA ESPORA EN DESARROLLO.

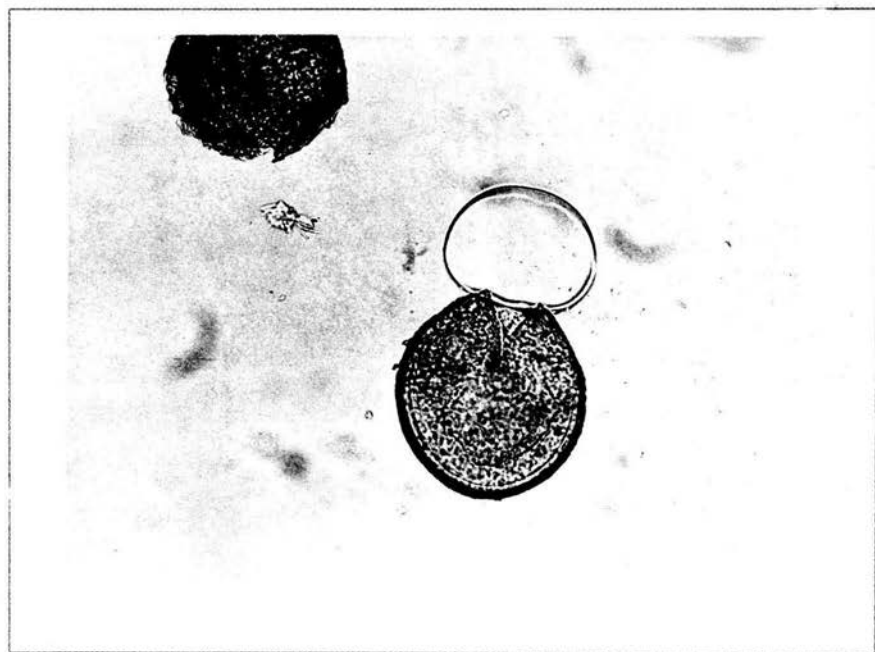
FIGURA 5



MICROFOTOGRAFIA 14: ESPORA DE *Acaulospora* sp. 10X DONDE SE DISTINGUE UNA PARED ORNAMENTADA Y RESTOS DEL SACULO ESPORIFERO.



MICROFOTOGRAFIA 15: AUMENTO A 40X DE LA MISMA ESPORA DE *Acaulospora* sp.



MICROFOTOGRAFIA 16: ESPORA MADURA DE *Acaulospora* sp.
VISTA AL MICROSCOPIO OPTICO A 10X

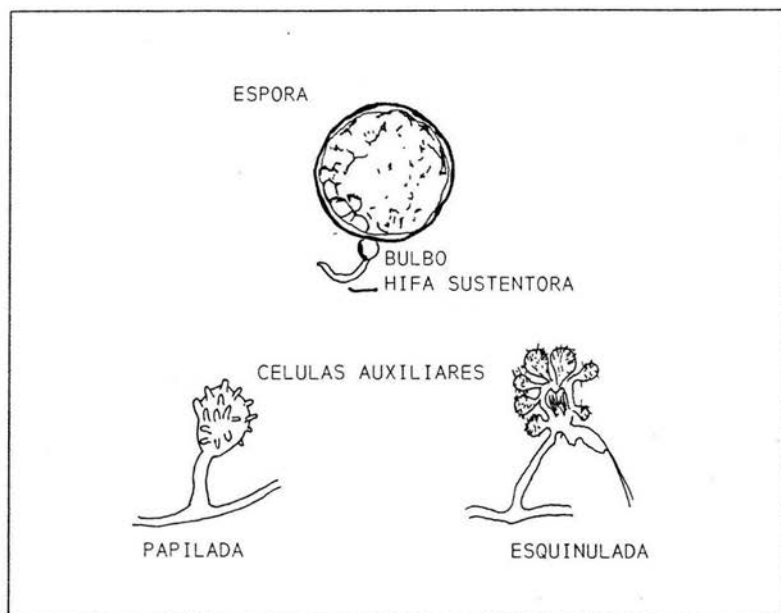
SCUTELLOSPORA



LAS ESPORAS SE FORMAN TERMINALMENTE SOBRE UNA CELULA SUSPENSORA BULBOSA. LAS ESPECIES DE ESTE GENERO FORMAN EN EL SUELO CELULAS AUXILIARES VERRUCOSAS O AMPLIAMENTE PAPILADAS. NO FORMAN VESICULAS DENTRO DE LAS RAICES. LOS TUBOS DE GERMINACION SE PRODUCEN A PARTIR DE UN ESCUDO DE GERMINACION. LAS ESPORAS PRESENTAN AL MENOS DOS GRUPOS DE PAREDES.

FIGURA 6

GIGASPORA



LAS ESPORAS SE FORMAN TERMINALMENTE SOBRE UNA CELULA SUSPENSORA BULBOSA. LAS ESPECIES DE ESTE GENERO FORMAN EN EL SUELO CELULAS AUXILIARES EQUINULADAS O FINALMENTE PAPILADAS. NO FORMAN VESICULAS DENTRO DE LAS RAICES. LOS TUBOS DE GERMINACION SE PRODUCEN DIRECTAMENTE DE LA PARED DE LA ESPORA. LAS ESPORAS PRESENTAN UN SOLO GRUPO DE PAREDES.

FIGURA 7

existe alguna especie que no forme esporas, lo cuál puede suceder, su identificación no es posible con los manuales de identificación actuales.

La presencia o ausencia de ciertas especies de micorrizas en algunos sistemas es indicadora de la selección que existe por diversas condiciones del medio, una de estas condiciones es la conversión a la agricultura, que provoca una serie de cambios relacionados con las prácticas agrícolas, además de otras condiciones que no son producidas por el hombre.

IVb. CUANTIFICACION DEL PORCENTAJE DE INFECCION

Los hongos micorrízicos VA son simbioses obligados que no presentan especificidad para asociarse con las plantas hospederas y el estudio de sus poblaciones se realiza generalmente para un sistema particular con cierto tipo de hospederos (Gavito, 1991).

La descripción de la dinámica puede hacerse mediante la identificación de las esporas y la estimación del porcentaje de infección micorrízica en el campo o por ensayos de infectividad del suelo o por combinaciones de estos (Moorman y Reeves, 1979). La infectividad mas que una forma de identificar propágulos, es una forma de determinar su viabilidad y su capacidad de infección.

La cuantificación del hongo resulta muy difícil porque no se pueden identificar los individuos en una raíz, debido a que las especies producen estructuras muy parecidas que hacen muy complicada la identificación y se pueden encontrar varias especies de hongo infectando diferentes segmentos (Hetrick, 1985). Aunque algunos trabajos han logrado identificar las especies que están colonizando las raíces. en sistemas radiculares con varias especies de hongos VA nativos resulta muy complicado e implica tener mucha experiencia para reconocer las estructuras que forman cada especie, por esta razón se cuantifica generalmente la infección micorrízica causada por cualquier hongo, el número total de esporas y si el conocimiento de las especies lo permite, el número de esporas de cada especie.

IVb1. PORCENTAJE DE INFECTIVIDAD.

Se observaron al microscopio óptico 580 fragmentos de raíz de *A. hypogea*, determinándose el porcentaje general de infección con el método de Phillips y Hayman (1970):

$$\% \text{ de Colonización} = \frac{\text{No. de campos colonizados}}{\text{No. Total de campos observados}} \times 100 =$$

$$\frac{1392}{1740} \times 100 = 80\% \text{ de INFECTIVIDAD.}$$

La estimación visual del porcentaje de infección aunque no permite una estimación segura (Giovanetti y Mosse, 1980), es rápida y suficiente para determinar cuales son las estructuras fúngicas predominantes en cada etapa de la planta. De esta manera se pudo apreciar que durante la colonización de las raíces se observó únicamente micelio. En el crecimiento y desarrollo de la planta hasta la floración se encontraron predominando los arbusculos y el micelio; en la fructificación las vesículas (ver microfotografías de infección nos. 17, 18, 19, 20, 21 y 22). En la senescencia de la planta sólo quedan algunas vesículas y muy poco micelio.

CONCLUSIONES

Las características físicas que presentó el suelo son adecuadas para que el cacahuate se desarrolle en condiciones óptimas, dada su ligereza, gran porosidad, poca cantidad de materia orgánica, etc. que permiten que el ginóforo (clavo) penetre en el suelo. A pesar de la enorme cantidad de fertilizantes que aplican los campesinos, suponemos que los nutrimentos se lixivian y no son bien aprovechados por la planta, depositándose en los mantos acuíferos por gravedad. Por lo tanto, se hace un gasto innecesario y se contaminan las aguas subterráneas.

Basándonos en el contenido de P y N, este tipo de suelos constituyen un buen material para estudiar el efecto de una doble inoculación con *Rhizobium* y hongos VAM.

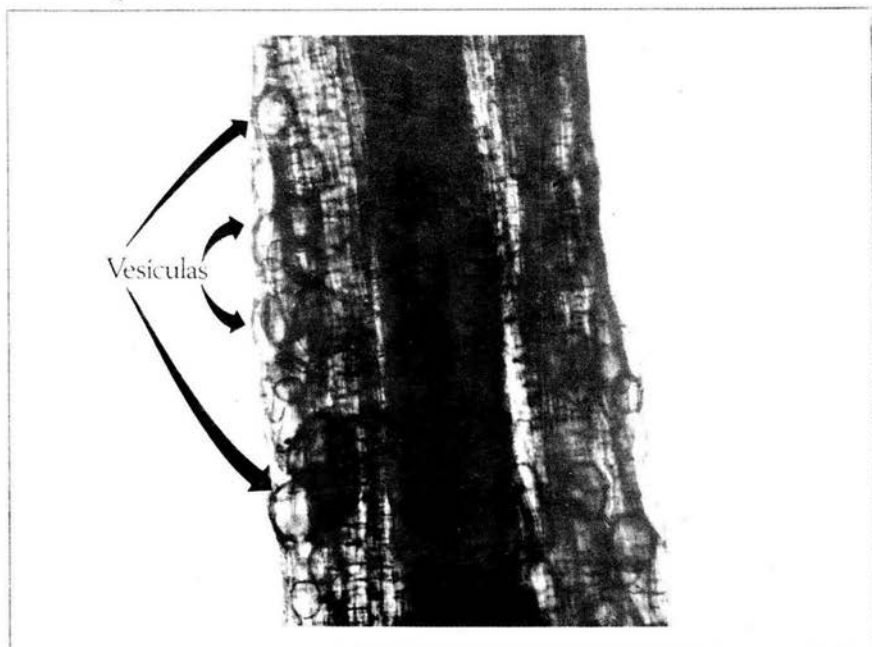
Los microorganismos (*Rhizobium sp.*) aislados nos muestran que no parece existir una especificidad estricta en cuanto a las cepas que se asocian con *A. hypogaea*, ya que se encontraron dos grupos principales, uno de crecimiento lento y otro de crecimiento rápido. Para poder afirmar que son en realidad dos grandes grupos se requieren ensayos de hibridación de DNA y la cuantificación del contenido G/C.

En general todos los aislados se comportaron como rhizobia típicos de acuerdo con las caracterizaciones bioquímicas realizadas.

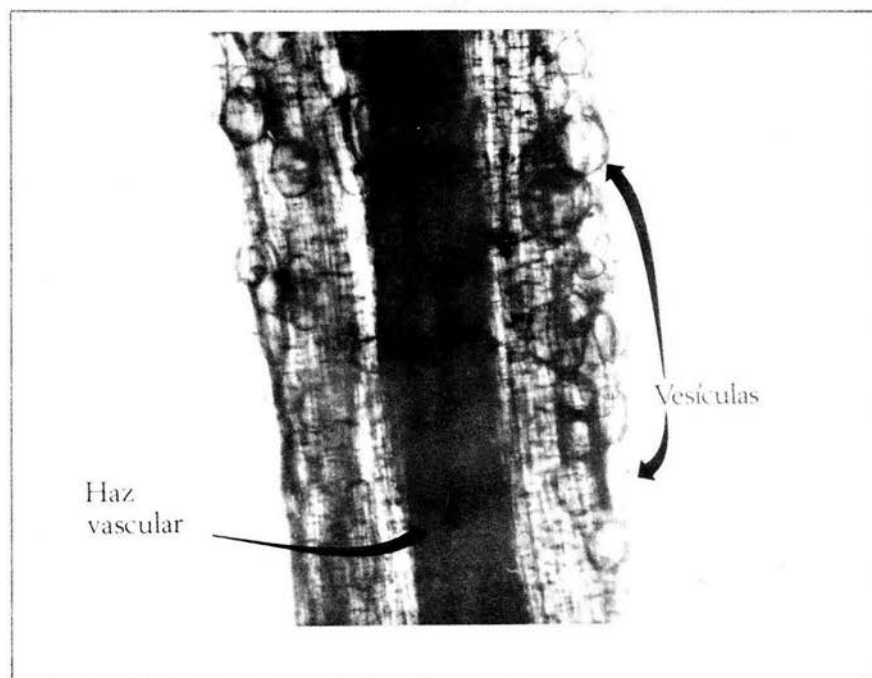
La utilización de diferentes azúcares como fuente de carbono no mostró un patrón preferencial, por lo que el azúcar probado dependerá de los objetivos de estudio a que sean sometidos estos rhizobia.

La prueba de resistencia a antibióticos corroboró la información bibliográfica y puede ser utilizada como marcador diferencial en estudios ecológicos.

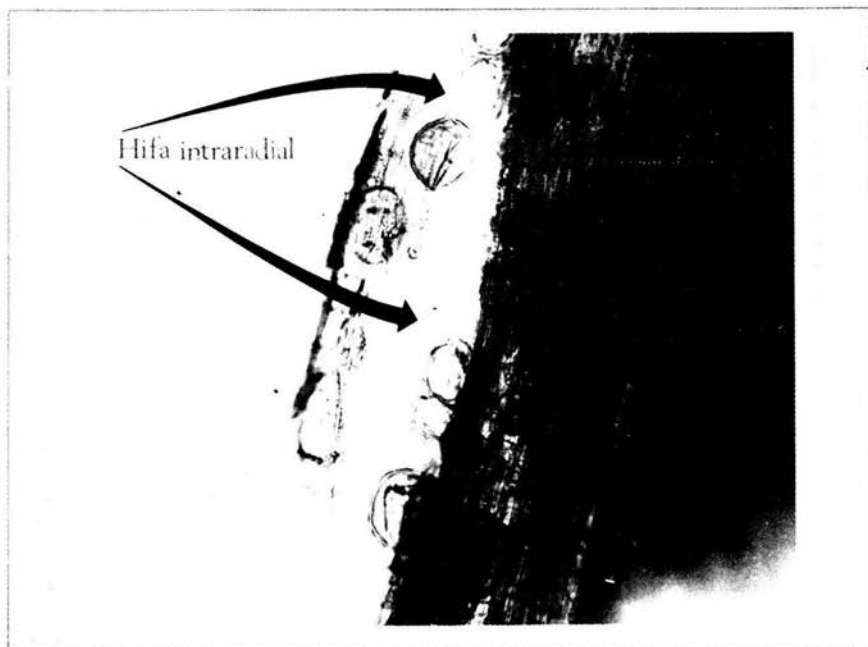
En el ensayo de infectividad ninguna cepa formó nódulos en las plantas, lo que es bastante desconcertante ya que ni la cepa de referencia noduló; esto puede deberse a que como afirman Guzmán



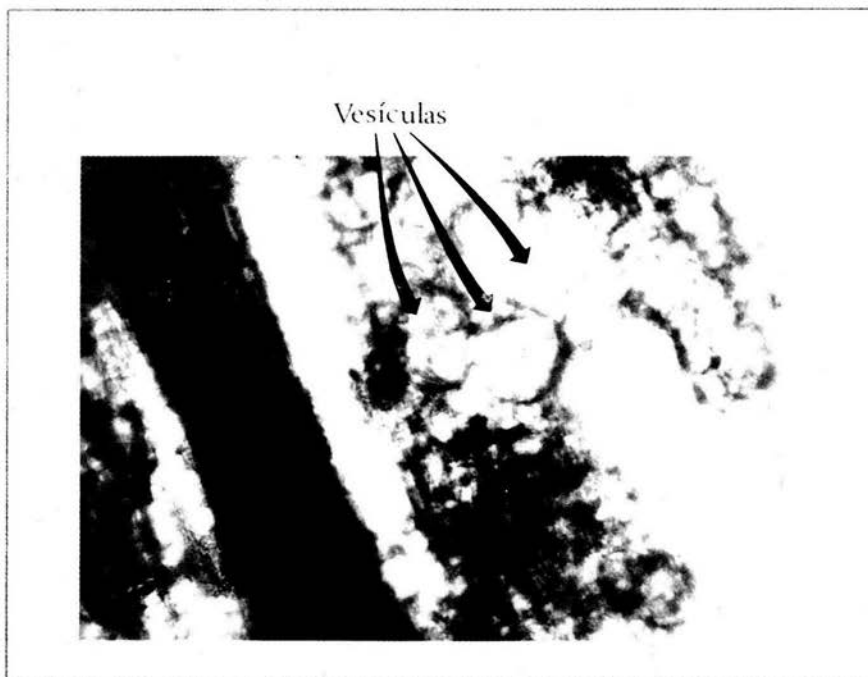
MICROFOTOGRAFIA 17 : RAIZ MICORRIZADA 10 X CON MVA
 OBSERVESE LA GRAN CANTIDAD DE VESICULAS QUE INFECTAN
 TAN SOLO A LAS CELULAS CORTICALES DE *Arachis hypogaea*



MICROFOTOGRAFIA 18 : RAIZ MICORRIZADA 10X OBSERVESE
 COMO LAS PAREDES SON DEFORMADAS POR LAS VESICULAS; LAS
 MICORRIZAS NUNCA INVADEN LOS HACES VASCULARES.



MICROGRAFIA 19 : AUMENTO A 40X. RAIZ MICORRIZADA DE *A. hypogaea*. LA FLECHA INDICA A LA HIFA INTRARADIAL QUE SOSTIENE LA VESICULA.



MICROFOTOGRAFIA 20: AUMENTO A 40X. COMO SE MUESTRA EL HONGO NO INVADIR LOS HACES VASCULARES Y SOLO INFECTA LAS CELULAS CORTICALES



MICROFOTOGRAFIA 21: RAIZ MICORRIZADA 10X. OBSERVESE LAS VESICULAS EN LA ZONA CORTICAL.



MICROFOTOGRAFIA 22: RAIZ DE CACAHUATE MICORRIZADA 10X

y Ferrera (1990) debe haber infección micorrícica para que se pueda utilizar el P disponible en el suelo y se forme el ATP que será utilizado en la formación del nódulo y su consecuente fijación eficiente de nitrógeno, así como también para la asimilación de elementos como Ca y Mg.

Se detectó que *A. hypogaea* es muy sensible a modificaciones en el ambiente y las condiciones de nuestro cultivo fueron muy diferentes a las naturales. Sin embargo, el peso seco de las plantas, así como el contenido de nitrógeno, sugieren que debió existir algún aporte de este elemento. En este sentido se piensa que *Rhizobium* pudo haber establecido una relación parecida a la simbiosis entre *Azospirillum* y maíz, en donde no hay nodulación aunque la bacteria crece en la rizósfera de la planta y es ahí donde se efectúa la fijación de nitrógeno. Esto podría ser punto de partida de estudios posteriores.

Los análisis de varianza realizados mostraron en todos los casos diferencias significativas entre los aislados utilizados y también con el testigo, por lo que podemos concluir que cualquiera de estos aislados es mejor que el testigo positivo, y aún que el negativo.

Es sorprendente que aún con las condiciones edáficas detectadas la producción de cacahuete para Huitzuco sea tan elevada, lo que sugiere que los rhizobia al igual que los hongos VAM muestran una gran eficiencia tanto en la fijación de nitrógeno como en la translocación de iones P y K, así como la resistencia y supervivencia a condiciones extremas de variación en su medio natural.

La infección que tiene *A. hypogaea* por la endomicorriza VA es elevada ya que presentó un 80%, además de la diversidad de especies encontradas de estos endofitos a través de la identificación de las esporas. La endomicorriza VA le ayuda a la planta a absorber mas eficientemente tanto nutrientes como agua.

La fenología biológica de la endomicorriza está en estrecha

relación con la de la planta, encontrándose el mayor número de arbusculos cuando la planta estaba en crecimiento y maduración ya que es cuando mas nutrientes necesitaba incluso en la floración y fructificación, siendo también importante el porcentaje de vesículas presente.

Al llevar a cabo el aislamiento de esporas para su identificación se encontró, que por cada 100 g de suelo, hubo un promedio de +/- 50 esporas. esto supone que la infección por esporas es importante pero no es la única ya que posiblemente la infección por fragmentos de raíz de cacahuete de la cosecha anterior o de otras plantas que contengan hifas de endomicorriza VA contribuyen a la alta infectividad que se presenta.

Otra contribución importante de este trabajo es el haber encontrado una especie no reportada para México hasta el momento. Esta especie esta siendo estudiada en la E.N.C.B. del IPN por la M. en C. Lucía Varela en el Dpto. de Ecología Microbiana.

A partir del presente estudio se hace necesario incrementar el conocimiento de la relación tripartita entre planta-hongos VA-microorganismos fijadores de N_2 para su uso biotecnológico adecuado, las vías de investigación que podrían abarcarse son las siguientes:

a) La dinámica de las micorrizas y las poblaciones de *Rhizobium* a diferentes profundidades del suelo, así como el comportamiento de los nutrimentos presentes.

b) Estudios estacionales para determinar la concentración de esporas, micorrizas y rhizobia, en relación a las condiciones edafológicas y climáticas.

c) Diferenciación y utilización de esporas viables.

d) Identificación a nivel de especie de las micorrizas presentes.

APENDICE

DETERMINACION DE TEXTURA POR EL METODO DE BOUYOCOS

(Valdés, R. M., 1986)

- Pesar 50 grs. (fina) ó 100 grs. (arenosa) de suelo previamente tamizado (abertura de malla 2mm.)
- Eliminar la materia orgánica agregando peróxido de hidrógeno al 30 % (15ml. por cada 50grs. de suelo)
- Dejar secar durante 24 horas a 80 °C.
- Dispersar la solución de 15 a 20 minutos en una batidora.
- Transferir la muestra a una probeta y aforar con el hidrómetro dentro hasta 1 130 ml. y 1 250 con agua destilada.
- Retirar el hidrómetro y mezclar la muestra.
- Tomar la primera lectura a los 40 segundos.
- Introducir el hidrómetro y registrar la temperatura
- Dejar en reposo la probeta durante dos horas.
- Tomar la segunda lectura en forma similar a la primera.

Cálculos:

Por cada grado arriba de 19.4 °C agregar a la lectura 0.36 unidades y por cada grado abajo de 19.4°C restar a la lectura 0.36 unidades.

Primera Lectura Corregida X 100 = % de limo + arcilla
peso de la lectura

100 - % de limo + arcilla = % de arena

Segunda Lectura Corregida X 100 = % de arcilla
peso de la muestra

Leer los porcentaje obtenidos en el triángulo de textura.

DETERMINACION DE PH

(Valdés, R. M., 1986)

- Pesar 50grs. del suelo a examinar.
- Colocar en un vaso de precipitado de 250 ml.
- Agregar 150 ml. de agua destilada
- Dejar reposar la muestra durante 30 minutos
- Hacer la prueba en el potenciómetro
- Registrar los valores obtenidos.

SOLUCION NUTRITIVA DE JENSEN

(Valdés, R. M. 1986)

CaHPO_4	1.0 g
K_2HPO_4	0.2 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.2 g
NaCl	0.2 g
FeCl_3	0.1 g
Agua	1.0 l

METODO DE WALKLEY Y BLACK

DETERMINACION DE MATERIA ORGANICA (Valdés, R. M., 1986)

- Colocar en un matr az erlenmeyer de 500ml 1 gr. de suelo.
- Añadir 10 ml de H_2SO_4 concentrado y seguir mezclando .
- Dejar reposar durante 30 minutos.
- Simultáneamente realizar lo mismo con un blanco de reactivo (sin suelo)
- Diluir la mezcla a 200 ml con agua destilada.
- Adicionar 10 ml de H_3PO_4 al 85% y 30 gotas de difenilamina (indicador).
- Titular con una solución de $FeSO_4$ I N

Al principio de la mezcla debe tener un color verde oscuro debido a los iones cromato, después se desplaza hacia azul y finalmente vira a amarillo.

C culos:

Realizar los c culos por la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de materia orgánica} = 10 \left(1 - \frac{P}{T} \right) \times 1.34$$

P = ml de disolución de $FeSO_4$ IN gastado por el problema.

T = ml de disolución de $FeSO_4$ IN gastado en el blanco.

METODO DE VERSENATO

PARA DETERMINACION DE CAPACIDAD DE INTERCAMBIO CATIONICO.

(Valdés, R. M., 1986)

- Colocar 5 grs. de suelo en un embudo de filtración que contenga un papel filtro
- Añadir 5 veces (10ml cada vez) CaCl_2 (desechar este filtrado)
- Añadir 5 veces (10ml cada vez) alcohol etílico de 96°, (desechar este filtro)
- Agregar 5 veces (10 ml cada vez) NaCl 1N (guardar este filtrado)
- En el filtrado anterior se titula el Ca^{++} por el método del Versenato.
- Agregar 10 ml de solución amortiguadora de ph 10
- Agrgar 5 gotas de solución de KCN
- Adicionar 5 gotas de solución de clorhidrato de hidroxilamina.
- Añadir 5 gotas del indicador negro de ericromo T
- Titular con una solución de Versenato hasta que el color vire de púrpura a azul

Cálculos:

$$\text{Normalidad de EDTA} = \frac{0.1 \times 10 \text{ ml}}{\text{ml de EDTA gastados}}$$

$$\text{CIC (meg. por 100)} = \frac{\text{ml de EDTA} \times N \times 100}{\text{g. de suelo}}$$

AISLAMIENTO DE RHIZOBIUM A PARTIR DE NODULO

(VINCENT 1975)

- Utilizar nódulos de raíces frescas o almacenadas en refrigeración (4°C)
- Cortar los nódulos dejando una porción de raíz adherida para manipularlas
- Lavar perfectamente el nódulo hasta que se elimine el suelo
- Colocar el (los) nódulo (s) en etanol al 95% por 10 segundos.
- Sumergir entonces el nódulo en $HgCl_2$ al 0.1% acidificado por 1-30 mins. según el tamaño del nódulo
- Lavar vigorosamente por lo menos seis veces con agua estéril
- Se coloca el nódulo en un tubo de ensayo con 1ml de agua destilada estéril y se aplasta asépticamente
- Tomar una asada del jugo lechoso y sembrarlo sobre una placa de agar extracto de levadura manitol
- Incubar a 28 °C
- Después de 4 ó 5 días revisar
- Purificar en caso de ser necesario (muy contaminado)
- Sembrar entonces en tubos con agar inclinado
- Registrar el aislamiento
- Identificar la autenticidad del aislamiento con *Rhizobium* por prueba de infección en planta o por su caracterización

COLORACION DE GRAM

SOLUCIONES UTILIZADAS

A.	Solución Cristal Violeta	
	Cristal Violeta	10g
	Oxalato de Amonio	4g
	Etanol	100g
	Agua destilada	400g
B.	Solucion de Yodo	
	Yodo	1g
	Yoduro de Potasio	2g
	Etanol	25g
	Agua destilada	100g
C.	Alcohol (Yodatado)	
	Solución Yodo (B)	5ml.
	Etanol	95ml.
D.	Colorante de Contraste	
	Solución al 2.5% safranina en etanol	10ml.
	Adua destilada	100ml.

PROCEDIMIENTO:

- Preparar y fijar el frotis en la forma habitual
- Teñir con la solución A durante un minuto
- Enjuagar con agua y escurrir el exceso
- Cubrir con solución B durante un minuto, escurrir la solución
- Decolorar con solución C el tiempo suficiente para quitar el exceso de colorante
- Lavar con agua y escurrir
- Teñir con solución D durante cinco minutos
- Lavar con agua, eliminar el exceso y secar
- Examinar directamente al objetivo de inmersión

Las células Gram positivas toman un color violeta y las Gram negativas un color rojo claro.

COMPOSICION DEL MEDIO LEVADURA MANITOL DE FREED Y WASKMAN

(Valdés, R. M. 1986)

KHPO ₄	0.5g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.2g
NaCl	0.1g
Manitol	10.0g
Extracto de Levadura	0.5g
Agar	18.0g
Rojo Congo diluido 1:400	10.0ml.
Agua destilada	1000.0ml.

Ajustar el ph a 6.5 a 7.0 y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

SOLUCION FISIOLÓGICA DE RINGER

NaCl	6 g
CaCl	0.1 g
KCl	0.1 g
Agua destilada	1 000 ml

pH 7.4 ajustar con NaOH

-Esterilizar a 120 °C durante 20 min

-Agregar:

Sulfato de Estreptomicina 200 mg

Gentamicina 100 mg

Sol. de H₂O₂ alcalinizada

NH₄OH 3 ml

H₂O₂ al 10% 30 ml

Agua destilada 567 ml

-Si no hay NH₄OH disponible, agregar amonio común

-La solución debe prepararse al momento de utilizarse

SOLUCION DE FUCSINA ACIDA-ACIDO LACTICO

Acido láctico	875 ml
Glicerina	63 ml
Fucsina ácida	0.1 g
Agua destilada	63 ml

EVALUACION DE RAICES MICORRIZADAS

(PHILLIPS Y HAYMAN, 1970)

En el Manual "Curso de Micorriza VA del Colegio de Postgraduados, Chapingo". Ferrera C., R. (1985).

Para determinar el porcentaje de colonización micorrízica en raíces de plantas es necesario evaluar microscópicamente la morfología interna de la micorriza VA:

- a) Colocar las raíces coloreadas, por lo menos 100 segmentos por cada repetición.
- b) Agregar de 1 a 3 gotas de lactofenol o lactoglicerol en los extremos de las raíces.
- c) Tomar un cubreobjetos y dejarlo caer suave y verticalmente sobre la preparación.
- d) Eliminar las burbujas de aire.
- e) Quitar el exceso de lactofenol o lactoglicerol con un algodón humedecido en alcohol.
- f) Sellar herméticamente la preparación, con esmalte transparente.
- g) Con ayuda del microscopio óptico en el aumento de 100 X se observa la presencia de las estructuras fúngicas.
- h) La estimación del porcentaje de colonización de las raíces se hace realizando al menos tres pasajes equidistantes sobre cada segmento cuando una parte de la raíz atraviesa el campo óptico del microscopio, si contiene hifas, vesículas o arbusculos, independientemente del estado de intensidad de la micorrización, se le da el valor uno, para cada estructura, y dependiendo del número de observaciones, se saca el porcentaje de colonización micorrízica:

$$\text{colonización} = \frac{\text{No de campos colonizados}}{\text{No Total de Campos Obser.}} \times 100$$

METODO DE CLAREO Y TINCION DE RAICES MICORRIZADAS

(Phillips y Hayman, 1970; modificado por Kormanik, et.al., 1980)
En el Manual "Curso de Micorrizas VA del Colegio de Postgraduados,
Chapingo" Ferrera C., R. (1985).

Kormanik, et.al. (1980) publicaron un procedimiento de clareo y tinción similar al de Phillips y Hayman, en donde se eliminan los fenoles tóxicos; su procedimiento ha sido igualmente efectivo en el clareo y tinción de un amplio rango de plantas hospederas:

- a) Las raíces después de ser cosechadas se lavan perfectamente con agua y son procesadas frescas o fijadas en FAA para su tinción posterior.
- b) Se les agrega KOH al 10% y se calienta 30 min a 10 libras de presión.
- c) Retirar el KOH.
- d) Enjuagar con agua destilada.
- e) Sumergirlas en HCl al 10% y agitar por 15 min.
- f) No lavar.
- g) Agregar la solución colorante, Fucsina ácida.
- j) Las raíces con la solución colorante se calientan por 20 min a 10 lb de presión.
- k) Para eliminar el exceso de colorante se añade lactoglicerol limpio.

METODO DE EXTRACCION DE ESPORAS POR GRADIENTE DISCONTINUO DE SACAROSA

(MERTZ, ET. AL. , 1979).

En el Manual "Curso de micorrizas VA del Colegio de Postgraduados, Chapingo". Ferrera C., R. (1985).

Por este método se obtienen grandes cantidades de esporas libres de partículas.

- a) Se realizan los pasos del a) al e) del Método Gerdemann y Nicolson (1963).
- b) Se utilizan las fracciones de los tamices que se crean convenientes para cada objetivo de trabajo.
- c) Primer gradiente:
Las esporas son separadas de los restos de desecho usando el gradiente de sacarosa al 30% (w/v).
- d) El material del tamiz se disuelve en 600 ml de agua sobre 200 ml de Sacarosa en un vaso de 1 l procurando que el gradiente no se pierda.
- e) Después de la solución, las esporas y los restos son colectados en la interfase donde son recuperadas por aspiración al vacío y rápidamente enjuagadas en agua fría y centrifugando en tubos de 50 ml de 1-5 min a 1600 rpm en una centrífuga clínica.
- f) La parte sobrenadante se decanta sobre un papel filtro para observar las esporas de esta fase.
- g) Segundos gradientes:
A la parte que queda en el tubo se le agregan 15 ml de agua sobre 20 ml de sacarosa formando así un segundo gradiente.
La duración de centrifugación es determinada por la cantidad de restos presentes.
- h) El sobrenadante se filtra sobre un tamiz y se enjuaga con agua fría.
- i) El material de cada una de las fracciones se pasa a papel filtro para la observación de las esporas recolectadas.

FUENTE DE VARIACION	G. DE L.	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	FRECUENCIA 5% 1%	F OBSERV.
TRATAMIENTOS	24	1946202159	81091756.63	1.79 2.28	4.3679
ERROR	49	909706084.47	18555430.29		
TOTAL	73	2845590243.47			
X=10747.702					
C.V.=40.09%					

ANALISIS DE VARIANZA DEL CONTENIDO DE NITROGENO REALIZADO A LAS PLANTAS DE CACAHUATE DE HUITZUCO DE LOS FIGUEROA, GRO. 1991.

FUENTE DE VARIACION	G. DE L.	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	FRECUENCIA 5% 1%	F OBSERV.
TRATAMIENTOS	26	4.4557	0.1714	1.82 2.35	2.3253
ERROR	42	3.0339	0.0737		
TOTAL	68	7.5496			
X=1.0954					
C.V.=24.78%					

ANALISIS DE VARIANZA DEL PESO SECO REALIZADO A LAS PLANTAS DE CACAHUATE PROBADAS CON AISLADOS ACIDOS DE HUITZUCO DE LOS FIGUEROA, GRO. 1991.

FUENTE DE VARIACION	G. DE L.	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	FRECUENCIA 5% 1%	F OBSERV.
TRATAMIENTOS	9	8.4488	0.9388	2.25 3.4	3.6784
ERROR	21	2.038	0.097		
TOTAL	30	10.4868			
X=12.049					
C.V.=2.58%					

ANALISIS DE VARIANZA DEL PESO SECO REALIZADO A LAS PLANTAS DE CACAHUATE PROBADAS CON AISLADOS ALCALINOS DE HUITZUCO DE LOS FIGUEROA, GRO. 1991.

BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez G., F. (1977). Características de la variedad de cacahuete Bachimba-74. Organó oficial del Comité Directivo, Cd. Delicias, Chih. Dto. de Riego No. 5, Boletín No. 52 p.p.24-25.
- Azcón-G.,C. y Barea,J-M (1980). Micorrizas. Scientific American, Biología Vegetal. Prensa Científica, España. p.p. 83-91.
- Azcón-G.,C. et.al.(1983). Simbiosis *Rhizobium*-Leguminosa. Scientific American, Biología Vegetal.Prensa Científica España. p.p. 56-65.
- Barea, J-M et.al.(1984). Avances recientes en el estudio de las micorrizas VA. I Formación, funcionamiento y efectos en la nutrición vegetal (1).Annal. Edafol. Agrobiol. p.p. 59-677.
- Bouyoucos G., F. (1951). A recalibration of the hydrometer method for making mechanical analysis of soils. Agron. J. 43:434-438.
- Box, J.H. (1971). Leguminosas de Grano. México, Salvat. p.p. 449-497.
- Bretón, V. (1972). Determinación de la Mejor Fecha de Siembra en el Cultivo de Cacahuete (*Arachis hypogaea*) en el Municipio de Gral. Escobedo. Tesis Profesional UANL, México. p.p.1-45.
- CETENAL (1976). Carta de USO del SUELO Tilzapotla E-14-A-79 Esc. 1:50 000.
- CETENAL (19876). Carta de USO del SUELO Iguala E-14-A-78. Esc. 1:50 000.
- CETENAL (1977). Carta de USO POTENCIAL Iguala E-14-A-78. Esc. 1: 50 000.
- CETENAL (1977). Carta de USO POTENCIAL Tilzapotla E-14-A-79 Esc. 1:50 000.

- Cuenca A.,B. (1988). Estudio del Potencial de Micorrización por Endofitos VA y Nodulación por *Rhizobium* que se Asocian al Huaje Rojo (*Leucaena sculenta*) en Suelos del Estado de Oaxaca. Tesis ENEP Iztacala UNAM. p.p. 63.
- Channabyre Gowda, M.V. et.al. (1989). Groundnut Cropping on Residual Moisture in Coastal Tracts at Karnataka, India. IAN 5:9-10.
- De La Garza, H. R. (1986). Inoculación con *Rhizobium loti* J. a Guaje (*Leucaena leucocephala* Lam de Wit) en dos suelos de la costa de Chiapas en Invernadero. Tesis Profesional. México, UACH. p.p. 141.
- Ferrera, C.R. (1985). Manual del Curso de Endomicorrizas VA. México UACH. p.p.7-19.
- Furlan, V.B. y Fortin, J.A. (1975). A Flotation-Bubbling system for Colecting Endogonaceae Spores from Sieved Soil. Naturaliste Can.102:663-667.
- Games Torres, H. (1971). Prueba de adaptación y rendimiento de 10 variedades de cacahuate *Arachis hypogaea*, de porte erguido en el municipio de Gral. Escobedo. Tesis Profesional UANL, México. p.p. 13-33.
- García, E. (1981). Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen. México, 3ra, ed. p.p.114-117, 239-240.
- Gavito Pardo, M.. (1991). Estudio de los hongos micorrízicos arbusculares asociados al maíz en el volcán Malitzin, Tlaxcala. Tesis Profesional UNAM, México. p.p. 1-71.
- Giller, P. y Silvestre, P. (1970). El Cacahuate. España, Blume. p.p. 9-266.
- Giovanetti, M. y Mosse, B. (1980). An Evaluation of Techniques for Measuring Vesicular-Arbuscular Micorrhizal Infection in Root. New Phytol. 84:489-500.
- Greenberg, D.C. y Ndunguru, B.J. (1989) Groundnut Drought Simulation Studies at ICRISAT Sahelian Center. IAN 6:10-11.

- Guzmán, P.R. y Ferrera, C.R. (1990). La endomicorriza vesículo arbuscular en las leguminosas. Colegio de Postgraduados, Chapingo, México. p.p. 1-119.
- Hayman, D.S. (1978). Endomycorrhizae. En: Y.R. Krupa (eds.) Interaction Between Non-Pathogenic Soil Microorganisms and plants. Elsevier Scientific Pub. Co. p.p.401-442.
- Hayman, D.S. (1983). The Physiology of Vesicular Arbuscular endomycorrhizal fungi. *Phytopathology* 72:1119-1125.
- Herman, F.J. (1978). A Synopsis of the Genus *Arachis*. Agriculture Monograph 19:1-26.
- Hetrick, B.A.D. y Bloom, J. (1985). Ecology of VA Mycorrhizal Fungi. p.p. 35-55. En: VA Mycorrhiza. Powell y Bagyaraj (eds) CRC Press, Boca Raton.
- ICRISAT (1987). Research on Groundnut at the International Crops Research Institute for the Semiarid Tropics. *International Arachis Newsletter (IAN)* 1:3-11.
- INEGI (1987). GUERRERO. Cuaderno de Información para la Planeación. México, 1ra. ed. p.p. 1-296.
- INEGI (1990). El Sector Alimentario en México. México 1ra. ed. p.p. 1-312.
- Jackson, M.L. (1964). Análisis químico de suelos. Barcelona, Omega p.p. 662.
- Janerette, C.A. (1991). An Introduction to Mycorrhizae. *The American Biology Teacher*. Vol. 53. 1:13-19.
- Kesava Rao, P.S., Tilak K.V.B.R. y Arunachalam V. (1990). Genetic variation for VA mycorrhiza-dependent phosphate mobilisation in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant and Soil* 122:137-142.
- Krieg, N.R. (1984). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. I. Williams & Wilkins. London. p.p. 235-242.
- LeTacon, F. (1986). Las Micorrizas una Cooperación entre Plantas y Hongos. *Mundo Científico*. Vol. 5. 86:776-784.
- Mazzani, B. (1963). Plantas oleaginosas. México, Salvat. p.p. 249-305.

- Mendoza R., Ma. N. (1983). Estudio y Caracterización de la Relación Simbiótica de *Rhizobium phaseoli* en Frijol (*Phaseolus vulgaris*) de distintos hábitos de Crecimiento. Tesis FES Cuautitlán UNAM p.p. 1-150.
- Montemayor, G. (1980). Prueba de Siete Niveles de Fertilización en Cacahuate. Tesis Profesional. UANL, México. p.p. 1-56.
- Moorman, J. B. y Benny, G. L. (1990). Revised Classification of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (Zygomycetes): A New Order Glomales, Two New Suborders, Glominae and Gigasporinae, and Two New Families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, With an Emendation of Glomaceae. Mycotaxon 37: 471-491.
- Moorman, T. y Reeves, F.B. (1979) The role of endomycorrhizae in revegetation practices in the semi-arid west. A bioassay to determine the effect of land disturbance on endomycorrhizal population. Amer. J. Bot. 66:14-18.
- Morton, B.J. (1988). Procedimientos para la Extracción, Cultivo e Identificación de Hongos Micorrízicos VA. Curso: ENEP Iztacala UNAM.p.p. 1-55.
- Morton, B.J. y Benny, G.L. (1990). Revised Classification of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (Zygomycetes): a New Order Glomales, Two New Suborders, Glominae and Gigasporinae and Two Families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae an Emendation of Glomaceae. Mycotaxon 37; 471-491.
- Moss, J.P. et.al. (1988) Root Induction on In Vitro Grown Shoots of *Arachis* Species and a Hybrid. IAN 4:25-26.
- Nicolson, T.H. y Schenck, N.C. (1979). Endogonaceus Mycorrhizal Endophytes in Florida. Mycologia Vol. LXXI.1:178-198.
- Norhayati, M. et.al.(1988) Adaptación de los Métodos para evaluar la Fijación de N_2 en Leguminosas Alimenticias y Leguminosas Cultivadas con Abono. Plant and Soil. Vol.108 1:143-150.
- Ortiz, B.V. y Ortiz, S.C.A. (1980). Edafología. México, UACH. 3ra. ed. p.p. 1-331.

- Pietrarello R., J. (1967) Producción de Maní para Semilla. Rev. Argentina. IDIA 238:28-64.
- Raverkar, K.R. y Konde, B.K. (1988) Effect of *Rhizobium* and *Azospirillum lipoferum* inoculation on the nodulation, yield and nitrogen uptake of peanut cultivars. Plant and Soil Vol. 106 2:249-252.
- Ramírez G., R.M. et.al.(1984). Curso de Tecnología de *Rhizobium* y Producción de Inoculantes. CONACYT México p.p.93.
- Reddy, P.V. et.al.(1989) Influence of Soil Moisture Contents on Pod Zone Temperatures in Groundnut. IAN 6:9-10.
- Robles, S.R. (1980). Producción de Oleaginosas y Textiles. México, Limusa. p.p. 287-315.
- Rhodes, L.H. y Gederman, J.W. (1975). Phosphate Uptake Zones of Mycorrhizal and Non-Mycorrhizal Onions. New Phytol. 75:555-561.
- Rongwen, J. et.al. (1988) Evaluation of the Symbiotic Potential of Some Wild *Arachis* Species with Two *Rhizobium* Strains. IAN 4:23-24.
- Sánchez S., O. (1979) La Flora del Valle de México. Herrero, Sta.ed. México. p.p. 197-227.
- Schenck, N.C. (Ed.) (1982). Methods and Principles of Mycorrhizal Research. Pub. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota. p.p. 1-244.
- Schenck N.C. y Pérez, Y. (1990). Manual for the Identification of VA Mycorrhizal Fungi. INVAM, Gainesville. p.p. 1-286.
- Selvam, V.S. et.al.(1989) Foliar Application of Urea Boosts Irrigated Groundnut Yield. IAN 6:12-14.
- Singh, C.S., Kapoor, A. y Wange, S.S. (1991). The enhancement of root colonisation of legumes by vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi through the inoculation of the legume seed with commercial yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). Plant and Soil 131:129-133.

- Soberón, Gloria (1985). Mecanismo de Nodulación de las Leguminosas. Scientific American, Biología Vegetal. Prensa Científica, España. p.p. 66-73.
- Somesagaran, P. et.al. (1981). Ejercicios Prácticos en Tecnología *Rhizobium*-Leguminosa. Curso Internacional NIFTAL, Chapingo, México. p.p. 1-87.
- Strasburger, E. et.al.(1988). Tratado de Botánica. Omega, España. 7ma. ed. p.c. 350-382.
- Sutton, J.C. y Barron, G.L. (1972). Population Dynamics of Endogonae Spores in Soil. Can. J. Bot. 50: 1909-1914.
- Technicon Autoanalyzer II. (1979). Método Industrial no. 334-74 W/B. Tarrytown, N.Y.
- Tisdale, S.L. y Nelson, W.L. (1966). Fertilidad de los Suelos y Fertilizantes. Barcelona, Simons. p.c. 173-174.
- Valdés, Ma. et.al. (1979) Manual Práctico de Microbiología Agrícola. ENCB IPN. p.p. 1-56.
- Vincent, J.M. (1975). Manual Práctico de Rhizobiología. Hemisferio, Argentina. p.p. 1-200.
- Wright, G.C. (1989). Effect of Poda Zone Moisture Content on Reproductive Growth in Three Cultivars of Peanut (*Arachis hypogaea*). Plant and Soil 116:111-114.