



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**



23
Rij

**"EVALUACION DE LA FIJACION SIMBIOTICA DE
NITROGENO EN SUELOS CULTIVADOS CON ALFALFA
E IRRIGADOS CON DIFERENTES TIPOS DE AGUA"**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
INGENIERO AGRICOLA
P R E S E N T A
JOSE JESUS RAMIREZ GUTIERREZ**

ASESORES:

**M. EN C. JORGE W. BERMUDEZ ESTEVEZ
M. EN C. STELLA MARIS REGINENSI RIVERA
M. EN C. RICARDO CAZARES GARCIA**

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES - CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DEPARTAMENTO DE

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLÁN
PRESENTE.

AT'NI: Ing. Rafael Rodríguez Roballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

"Evaluación de la fijación simbiótica de nitrógeno en algunas
cultivados con alfalfa e irrigados con diferentes tipos de agua".

que presenta el pasante: José Jesús Ramírez Gutiérrez
con número de cuenta: 8301905-6 para obtener el TÍTULO de:
Ingeniero Agrícola

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXÁMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE.
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cuautilán Izcalli, Edo. de Méx., a 11 de diciembre de 1995

PRESIDENTE	M. en C. Jorge W. Hernández Estévez	
VOCAL	Ing. Raúl Espinoza Sánchez	
SECRETARIO	Ing. Guillermo Magante Butrón	
PRIMER SUPLENTE	Ing. Otilio Acevedo Sandoval	
SEGUNDO SUPLENTE	Ing. Salvador Del Castillo Habacán	

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores:

Al M. en C. Ricardo Cázarez García por su sugerencia y dirección del presente trabajo.

Al M. en C. Jorge W. Bermúdez Estevez por su orientación y asesoría en el análisis estadístico de esta tesis.

A la M. en C. Stella Maris Reginensi Rivera por su asesoría y apoyo en el asilamiento de las cepas utilizadas en este trabajo.

A mis amigos:

A la Srita. Patricia Columba Gómez Avila por su afecto y atenciones recibidas durante el desarrollo de la investigación.

Al Ing. Ruperto Valencia por su ayuda y sincera amistad que me ha brindado como estudiante y profesionalista.

A la Srita. Adriana Bernardet Chavez Ordoñez por su amistad de muchos años y apoyo desinteresado en la evaluación de los datos de esta tesis.

JURADO:

M. en C. JORGE W. BERMUDEZ ESTEVEZ

ING. RAUL ESPINOZA SANCHEZ

ING. GUILLERMO BASANTE BUTRON

M. en C. OTILIO ACEVEDO SANDOVAL

ING. SALVADOR DEL CASTILLO RABADAN

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres, Ana Marafa Gutiérrez Paniagua y Jesús Ramírez Romero, así como a mis hermanos Claudia y Axayacatl por el apoyo que me brindaron durante la realización del mismo.

ÍNDICE

RESUMEN

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	OBJETIVOS.....	3
III.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
3.1.	LA ALFALFA.....	3
3.1.1.	ORIGEN E HISTORIA.....	3
3.1.2.	IMPORTANCIA ECONÓMICA.....	4
3.1.3.	CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS.....	5
3.1.3.1.	HOJAS.....	5
3.1.3.2.	FLOR.....	5
3.1.3.3.	FRUTO.....	6
3.1.3.4.	SEMILLA.....	6
3.1.4.	CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.....	7
3.2.	IMPORTANCIA DE LA FIJACIÓN DEL NITRÓGENO.....	8
3.3.	NODULACIÓN.....	14
3.3.1.	PROCESO INFECTIVO.....	14
3.3.1.1.	FASE DE PREINFECCIÓN.....	14
3.3.1.2.	ZONA DE INFECCIÓN DE LAS RAÍCES.....	18
3.3.1.3.	PENETRACIÓN DE BACTERIAS.....	19

3.3.2. MECANISMOS DE FORMACIÓN DE NODULOS.....	20
3.3.2.1. ESTRUCTURA DEL NODULO	25
3.3.3. ESPECIFICIDAD ENTRE SIMBIONTES.....	30
3.4. FACTORES QUE AFECTAN INFECCIÓN Y EL PROCESO DE FIJACIÓN DE NITRÓGENO.....	33
3.4.1. pH DEL SUELO.....	34
3.4.2. TEMPERATURA DEL SUELO.....	36
3.4.3. DURACIÓN DEL DÍA.....	39
3.4.4. AIREACIÓN.....	39
3.4.5. HUMEDAD.....	40
3.4.6. COMPETENCIA.....	41
3.4.7. PRACTICAS AGRONOMICAS.....	46
3.4.8. FACTORES NUTRIMENTALES.....	47
3.4.8.1. RELACIONES NUTRIMENTALES.....	49
3.4.8.1.1. NITRÓGENO.....	50
3.4.8.1.2. FÓSFORO.....	51
3.4.8.1.3. POTASIO.....	52
3.4.8.1.4. CALCIO Y MAGNESIO.....	54
3.4.9. CEPA NATIVA.....	55
3.5. INOCULACIÓN.....	56
3.5.1. IMPORTANCIA DE LA INOCULACIÓN.....	56
3.5.2. PROBLEMAS DE LA INOCULACIÓN.....	57
3.5.3. TIPOS DE INOCULANTE.....	62
3.6. AGUA.....	65

IV. MATERIALES Y METODOS.....	67
4.1. SITIOS DE MUESTREO.....	67
4.1.1. LOCALIZACIÓN.....	67
4.1.2. SUELOS.....	67
4.1.3. AGUA PARA RIEGO.....	68
4.1.4. CLIMA.....	68
4.2. PROCEDIMIENTO DE MUESTREO.....	69
4.3. CARACTERÍSTICAS DEL INVERNADERO.....	69
4.4. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	70
4.5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	70
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	74
VI. CONCLUSIONES.....	83
BIBLIOGRAFÍA.....	85

RESUMEN

El presente trabajo se realizó con el objetivo de evaluar el efecto de la inoculación de semilla de alfalfa (Medicago sativa, L.), con tres cepas (Rhizobium meliloti) y una multicepa, sobre la producción de materia seca. Para la obtención de material se realizó un muestreo de suelo, plantas y nódulos en parcelas de los municipios de Zumpango, Tepozotlán y Cuautitlán, donde emplean diferentes tipos de agua para el riego del cultivo de la alfalfa (aguas negras, gris y blanca). La preparación del inoculante se realizó en laboratorio con los nódulos de las plantas muestreadas, depositándolos en un tubo de ensayo con agua estéril y destilada por espacio de 5 minutos, posteriormente se desinfectaron con una solución de etanol y se exprimieron sobre cajas con medio agar rojo congo, incubándose a 30°C, hasta aislar totalmente las colonias características de Rhizobium; al mismo tiempo, los suelos muestreados fueron secados al aire y tamizados en una criba, posteriormente se esterilizaron en estufa a una presión de 15 libras durante 30 min. Con los tres tipos de suelo y la capa de Rhizobium se prepararon 4 tratamientos, que fueron: semilla inoculada en suelo esterilizado, semilla inoculada en suelo no esterilizado, semilla inoculada con multicepa en suelo esterilizado y semilla no inoculada en suelo no esterilizado o testigo, cada tratamiento contó con 5 repeticiones, lo que originó un trabajo de 60 macetas, por lo que se implementó un diseño experimental de bloques al azar para analizar los datos del presente trabajo.

Los resultados de esta tesis indican efectos significativos ($P < 0.05$) en los tratamientos esterilizados e inoculados con unicepa y multicepa respecto al testigo para las variables: Peso seco de biomasa aérea, tamaño de raíz y número de nódulos, estos efectos son atribuidos a la presencia temprana del inoculante en la semilla, lo que originó el desarrollo de nódulos fijadores, sin embargo la esterilización del suelo fue el factor principal en la producción de biomasa, debido a la reducción de agentes competidores y fitopatógenos que facilitó el rápido desarrollo de los organismos fijadores en las raíces. Así mismo, se comprobó que las cepas inoculadas fueron efectivas, puesto que el número de nódulos y peso en forraje seco fue mayor a los no inoculados.

Se demostró la existencia de Rhizobium nativo en los tratamientos inoculado-no esterilizado y testigo debido a nodulación desarrollada, además se comprobó que el Rhizobium nativo está adaptado a las condiciones de su medio ambiente ya que la producción de biomasa aérea en estos tratamientos se incrementó notablemente durante el tercer corte, en comparación con los tratamientos inoculados.

Así mismo, se encontró un efecto de suelo sobre los resultados obtenidos en peso seco de biomasa, tamaño de raíz y número de nódulos, a pesar que los resultados en forraje no fueron significativos ($P > 0.05$) el peso total de los cortes realizados a la

alfalfa indica que el suelo de Zumpango desarrollo mejor producción de biomasa aérea en comparación con los otros. Si bien, los suelos muestreados presentan similitud geológica y edafológica, la diferencia de producción encontrada se atribuye a un mayor contenido de minerales, acumulados debido al tipo de riego empleado (aguas negras) en las parcelas de Zumpango.

I. INTRODUCCIÓN.

El consumo de fertilizantes va en aumento en el mundo debido a la necesidad de producir mas alimento para el hombre y forraje para el ganado. Es posible que a corto plazo, la humanidad se enfrente a una escasez de los mismos, lo que obligaría a usarlos con mayor eficiencia o a buscarle sustitutos. La lejanía de los centros de distribución de los insumos agrícolas, o de las dificultades de transporte, hace ya de por si que la presencia de los fertilizantes sea escasa o nula.

En el suelo y la atmósfera existen grandes reservas de nutrimentos, por ejemplo, en la atmósfera que existe sobre una hectárea de suelo hay al rededor de 78, 000 toneladas de N, y en los primeros 20 cm de suelo también en una hectárea existe alrededor de 5.6 ton de N (Gómez, 1983) y sólo una mínima parte es utilizado por las plantas.

El nitrógeno, es el nutrimento que más limita la producción primaria sobre el suelo. Esto es especialmente crítico pues para finales de siglo se necesita duplicar la producción de cereales de 1.3 a 2.6 x 10⁹ toneladas, y cuadruplicar la producción de leguminosas de grano de 0.13 a 0.5 x 10⁹ toneladas para satisfacer las necesidades proyectadas para entonces.

Normalmente la producción de fertilizantes no alcanza a cubrir la demanda para las áreas cultivadas, por lo que es necesario buscar otras alternativas de solución al problema. La utilización de especies microbianas como las bacterias del genero Rhizobium en leguminosas como la alfalfa, es una alternativa, ya que tienen la particularidad de fijar el nitrógeno atmosférico simbióticamente, lo cual es muy útil en la agronomía y por lo tanto en la alimentación mundial.

La alfalfa, además de estar asociada con la fijación simbiótica del nitrógeno constituye una especie forrajera fundamental en las raciones alimenticias del ganado y sobre todo del ganado bovino, productor de leche de alto rendimiento debido a su elevado nivel nutricional. La favorable composición química de la alfalfa se une a su gran apetibilidad por el ganado (especialmente los rumiantes), lo que hace que los animales aumenten su ingestión de materia seca, que al ser de tan alta calidad, permite la lógica transformación en una mayor cantidad de producto, bien sea carne, leche, lana, etc., contribuyendo con ello a mejorar la alimentación del hombre.

El presente trabajo consiste en estudiar la relación simbiótica que existe entre la alfalfa sembrada en suelos de Zumpango, Tepozotlán y de FES-Cuautitlán e irrigados con agua de tipo negra, gris y blanca, con el fin cuantificar su rendimiento al ser inoculadas las semillas con cepas de Rhizobium bajo condiciones de invernadero.

II. OBJETIVOS.

- Identificar la existencia de rhizobium nativo en los suelos muestreados.
- Evaluar el efecto de los diferentes tratamientos rizobiológicos sobre la producción de materia seca de alfalfa (Medicago sativa).
- Evaluar el efecto del tipo de riego en los suelos muestreados.

III. REVISIÓN DE LITERATURA.

Frecuentemente ha sido llamada la alfalfa la reina de las plantas forrajeras. Villax, citado por Del Pozo (1983) hace una lista de las que él llama "las doce grandes" especies pratenses y en lugar preferente sitúa a la alfalfa. Es esta planta una pieza fundamental en la alimentación del ganado, cuyas producciones ocupan cada día un más importante lugar en la alimentación del hombre moderno.

3.1. LA ALFALFA.

3.1.1. ORIGEN E HISTORIA.

La alfalfa se extiende por todo el mundo. Sin embargo, dada la gran variedad de ecotipos existentes en estado espontáneo en las regiones, se fija su área de origen en Asia Menor y sur del

Cáucaso, abarcando esta zona geográfica Turquía, Siria, Irak. Irán, Afganistán, parte occidental de Paquistán y Cachemira.

Los misioneros españoles también la llevaron consigo a sus establecimientos de Nuevo México, California y Texas (Del Pozo, 1983).

3.1.2. IMPORTANCIA ECONÓMICA.

El interés que presenta la alfalfa ha determinado que su expansión sea tan completa como para conocerse y cultivarse prácticamente en todos los países del mundo, contando con una extensión del cultivo en el mundo de 33 millones de hectáreas.

En América, Estados Unidos es el país de mayor superficie cultivada de alfalfa, con más de diez millones de hectáreas, casi un 90% de las mismas se encuentran en los estados nortefios centrales y occidentales. Estos mismos estados son los principales productores de semilla, fundamentalmente Dakota, California y Kansas. El aumento del área de alfalfa en México es mucho más reciente, aunque probablemente más rápido. Ello convierte a nuestro país en los mayores importadores de semilla del momento (Del Pozo, 1983).

3.1.3. CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS.

Es la familia de las leguminosas uno de los grupos de plantas más importantes en la agricultura de todos los países. Comprende una numerosa lista de especies con variadisimas finalidades productivas; grano, forraje, abonos en verde, etc.

3.1.3.1. LAS HOJAS.

La alfalfa esta normalmente dotada de hojas compuestas. Estas hojas constan de estípulas, pecíolos, raquis, peciólulos y folíolos. Las estípulas son una reja de apéndices, a modo de pequeñas hojas situadas en la base y a ambos lados del pecíolo.

El pecíolo es a modo de un pequeño tallo que une al raquis al resto de la planta. Los folíolos son como pequeñas hojas, el conjunto de las cuales forman la hoja propiamente dicha.

Las hojas son imparipinnadas insertándose por parejas en el raquis. El haz de los folíolos suele ser de un verde más intenso que el envés, generalmente más pubescente y con marcadas nervaciones.

3.1.3.2. LA FLOR.

La flor característica es de la subfamilia papilionoidea, con colores vistosos que suelen variar del amarillo al violeta. Flores

pentámeras con cinco pétalos distintos que reciben los nombres de: estambre, el pétalo superior que suele ser al mismo tiempo el mayor; las alas, situadas a ambos lados del estandarte y completamente separadas del mismo, finalmente los dos últimos delanteros se encuentran soldados por uno de los bordes y forman lo que se le llama quilla. Queda pues la corola formada por tres pétalos separados y otros dos unidos a una sola pieza.

3.1.3.3. EL FRUTO.

El fruto típico que viene a dar nombre a la familia de las leguminosas es la legumbre. Se trata de un fruto seco, alargado y comprimido, que adopta diversas formas, dehiscente, con las semillas en una fila correspondiendo con la ya señalada posición de los óvulos en el ovario. La dehiscencia se realiza a lo largo de la sutura dorsal y/o ventral.

3.1.3.4. LA SEMILLA.

La semilla de las leguminosas está formada por el funículo, tegumento, embrión y albumen. El funículo no es más que el sostén de la semilla por lo que esta permanece unida a la placenta. Una vez madurado el fruto y las semillas, el funículo normalmente se seca y desaparece, librándose de esta forma la semilla.

El tegumento envuelve a la semilla al mismo tiempo que le sirve de protección. Es el tegumento el que procura la coloración de la

semilla, es impermeable y solamente después de un prolongado humedecimiento (por ejemplo, en la germinación) se logra ablandarle y reducir esa impermeabilidad.

El tegumento está constituido por varias capas que varían según la especie en la forma particular de sus células y en el grosor relativo de las mismas.

El embrión constituye lo que una vez debidamente desarrollado será la futura planta (plántula); por tanto puede observarse prácticamente las mismas partes que ostenta una planta adulta.

El albumen en la alfalfa de ha reducido sensiblemente. Constituye un tejido de reserva, rico en azúcares, que facilita la germinación del embrión (Del Pozo, 1983).

3.1.4. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.

FAMILIA: Leguminosa

SUBFAMILIA: Papilonoidea

TRIBU: Trifolieas

GENERO: Medicago

ESPECIE: Sativa

3.2. IMPORTANCIA DE LA FIJACIÓN DEL NITRÓGENO.

El nitrógeno, debido a que es un elemento indispensable para toda forma de vida, es el constituyente principal de las proteínas.

La presencia del nitrógeno en el suelo en formas químicas asimilables para las plantas (nitríca y amoniacal) generalmente se ve restringido, mientras que el aire contiene este elemento en un 80% (Sprent, 1980).

Debido a que el nitrógeno (N_2) en su estado natural gaseoso es una molécula inerte y de las más estables que se conocen, muy difícilmente se puede usar en forma directa, por lo cuál, es muy importante para la vida las transformaciones de éste a formas que las plantas puedan utilizar, ya que como se sabe, las plantas azules entre los primeros fijadores del nitrógeno son parte de los primeros eslabones de la cadena alimenticia (figura 1).

Entre los microorganismos de vida libre que fijan nitrógeno se menciona a las bacterias Clostridium, Azobacter y Beijerinckia, y también a las algas verde-azules entre los primeros fijadores (Vásquez, 1986).

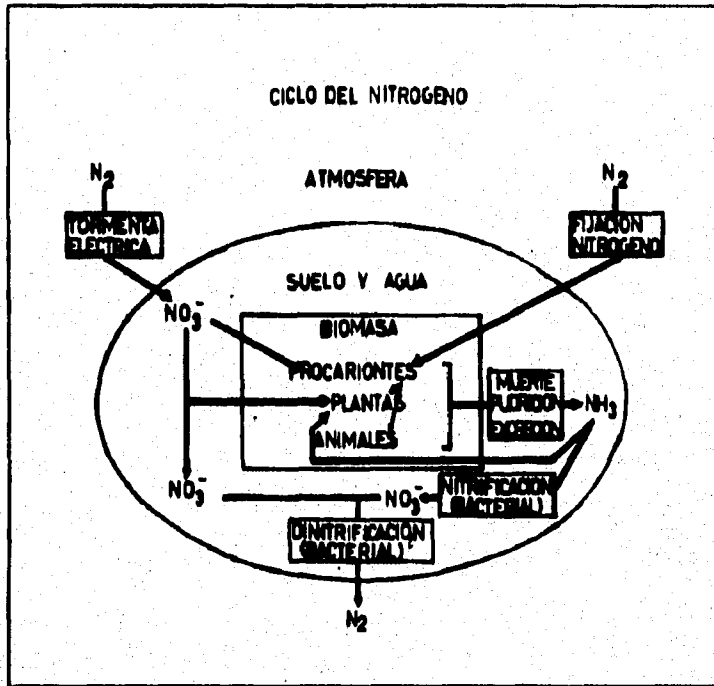


Figura 1 Versión simple del Ciclo del Nitrógeno (Sprent, 1980).

Al proceso de transformación de la estructura molecular del nitrógeno, que incluye el rompimiento de su molécula y su posterior reacción con hidrógeno para la formación en primer lugar del amoníaco y en forma subsecuente de otras moléculas nitrogenadas se le denomina fijación de nitrógeno.

Cuando dicho proceso es realizado por diferentes microorganismos que poseen en su estructura un complejo sistema enzimático capaz de

transformar el nitrógeno molecular se le conoce como fijación biológica del nitrógeno (Vásquez, 1986; Agrios, 1986).

La capacidad de utilizar y guardar el gas nitrógeno (N_2) como fuente única es muy restringida, ni las leguminosas y los microsimbiontes pueden fijar dinitrógeno (N_2) cuando están separados, la morfogénesis de los nódulos crea las condiciones que se requieren para ello al funcionar simbioticamente.

La fijación de nitrógeno simbiótico se observa principalmente entre las leguminosas y las bacterias del género Rhizobium (spp.).

Las bacterias simbiotes se establecen en el sistema de raíces y conforman nódulos, es en ellos donde se transforma el nitrógeno atmosférico a las formas químicas utilizables (Orozco citado por Vásquez, 1986), como glúcidos y energía a las bacterias mediante la fotosíntesis, la bacteria aporta hidrógeno sobre el nitrógeno del aire para formar el gas amoníaco (NH_3) el cual pasa a través del xilema de las hojas donde se utiliza los aminoácidos y las proteínas (Gross, 1976 y Brock, 1978; Alexander, 1984; Sánchez, 1988; Agrios, 1986).

Brill (1975), discute que existen algunas cepas de Rhizobium que sintetizan hidrogenasa, una enzima que convierte el hidrógeno molecular en electrones y protones para ser re-usados por la nitrógenasa. La hidrogenasa puede, por lo tanto, servir como una

clase de regulador que deba convertir a las bacterias fijadoras de nitrógeno en más eficaces energéticamente.

Por otra parte Sánchez (1988), Brill (1975) y Romero (1991) mencionan que la enzima llamada nirogenasa (N_2 ase) la utilizan los microorganismos para reducir el dinitrogeno (N_2) en amonio (NH_4^+).

La nitrogenasa fija el nitrógeno reduciéndolo a amoniaco y esta consta de dos componentes:

- La componente hierro proteína
(Fe-proteína o azoferrodoxina, o componente I).

- La componente hierro-molibdeno proteína
(FE-Mo-proteína, o componente II).

Los dos componentes catalizan la reducción del nitrógeno sólo cuando están combinados, pero no solos (FAO, 1985).

Los requisitos para la fijación del nitrógeno son los siguientes:

- Una enzima nitrogenasa.

- Una fuente de trifosfato adenisivo (ATP).

- Una fuente de poder reductor.
- Un sistema que proteja la enzima de su inactivación por el oxígeno.
- La rápida desaparición del nitrógeno de su lugar de fijación para evitar la inhibición de la nitrogenasa (FAO, 1985).

Por otra parte el nitrógeno fijado puede ser:

- Aprovechado por la planta hospedero.
- Usado por plantas no leguminosas que crecen en estrecha relación con las leguminosas.
- Aprovechado por el cultivo siguiente cuando el nitrógeno queda en el suelo después de la muerte y descomposición de los nódulos (Brady, 1977).

Se tiene conocimiento que la cantidad de nitrógeno fijado varía según la especie de leguminosa; a continuación en el tabla 1 se presentan dichos datos.

Tabla 1. Cantidad media de nitrógeno fijada por hectárea en algunas leguminosas.

Leguminosa	Nitrógeno fijado kg/ha
Alfalfa	220
Trébol ladino	203
Lupino azul	208
Trébol rojo	129
Trébol blanco	132
Trébol bur	120
Lenteja	114
Kudzu	99
Lespedeza	95
<u>Medicago</u> (otras especies)	88
Veza-ebo	92
Chícharo	77
Soya	57
Frijol	45

Fuente: Erdman (1967), citado por Vásquez (1986); Hughes (1978).

Una vez que se formó totalmente el nódulo la fijación del nitrógeno continúa hasta la formación de semillas, cuando esto sucede, en los nódulos comienzan la senescencia. Sin embargo, los bacteroides

permanecen viables; con el tiempo el nódulo muere pero muchos sobreviven hasta la siguiente estación de desarrollo (Sprent, 1990).

3.3. MODULACIÓN.

Los nódulos de la raíz son estructuras bien organizadas y altamente especializadas que se forman en las raíces de las leguminosas una vez que han sido inoculadas por algunas especies de bacterias del género Rhizobium (Agrios, 1986).

3.3.1 PROCESO INFECTIVO.

La infección de las leguminosas se produce solamente en ciertas zonas de la raíz transitoriamente susceptibles; Numa, (1962) citado en FAO, (1985) indicó que, al principio, la infección está restringida a unas pocas zonas anchas, a lo largo de las raíces, pero que dentro de esas zonas hay áreas de infección mucho más densas.

3.3.1.1. FASE DE PREINFECCIÓN.

Sargent (1987) y Young (1988) menciona que las paredes de las células vegetales están formadas por fibrillas celulocíticas encerradas en una matriz de sustancias pépticas hemicelulosas, proteínas y lignina. Antes de que se desarrolle la estructura

nodular el paso inicial parece involucrar la liberación de productos de excreción vegetal, los cuales son atractivos y estimulantes para el rizobio y bacterias en general, Hughes (1981) por su parte menciona que también existe un mutuo reconocimiento entre el Rhizobium y las leguminosas.

Las bacterias del género Rhizobium para poder degradar las paredes celulares vegetales, producen un número de sustancias biológicamente como las celulosas (B, 1,4-gluconasas), hemicelulosas, glicósida péctica (agrupada como poligalacturonasa) y lisas pécticas (transeliminadas) Parke (1991). Otro ácido llamado ácido giberélico que se produce en los nódulos formados, tiene la particularidad de inhibir el desarrollo de nuevos nódulos (García, 1993).

Por otra parte uno de los aminoácidos exudados por las raíces, que se le ha dado especial atención es el triptofano, el cual se ha observado que puede ser fácilmente convertido por Rhizobium a fitohormonas como el ácido indolacético (IAI) (Lie, 1981).

El IAI se origina por la oxidación del triptofano y en presencia de un cofactor desconocido parece que estimula la formación y elongación de los pelos radicales, induciendo al curvamiento y ramificación de los mismos (Nutman, 1971 citado por Vásquez 1986), ya que por sí solo el AIA no causa la deformación de éstos pelos radicales.

En la actualidad se cree que un ácido nucléico y un polisacárido o protefina son los causantes de tal deformación (Alexander 1980 y Lie 1981).

Además del AIA, se ha identificado otros reguladores de crecimiento, otras auxinas, ácido giberílico, citocininas, ácido abscísico y etileno en las raíces de las plántulas, pero aún no se ha encontrado la función específica de estos factores (Date, 1976).

Se observa que antes de la infección los rizobios y los pelos radicales se unen estrechamente (Lie, 1981), lo cual es perpendicular a los pelos radicales y se atribuye a una fuerte polaridad de las células de Rhizobium (Turgeon, 1982).

Se supone que la responsable de dicha acción es la lactina; se cree que por acción de un puente molecular entre los antígenos comunes o la reacción cruzada de las raíces y las células de Rhizobium está en contacto con las raíces de las leguminosas; la infección se lleva acabo casi sin excepción en los pelos radicales marcadamente curvados (Turgeon, 1982).

La producción de estas sustancias se localiza en la superficie de los pelos radicales y su función consiste en suavizar la pared celular de tal manera que puede ocurrir la deformación característica o enchinamiento de las raicillas o pelo, que

representan el inicio de la infección (Young 1988; Alexander 1980; Sprent, 1990).

Yao y Vincent (1969), citado en FAO (1985) y Huges (1981), citado por Barlandas (1985) distinguieron grados de encurvamiento en los pelos radiculares y determinaron que es producido únicamente por las bacteria capases de infectar la raíz, en tanto que el IAI produce una deformación más generalizada.

En el desarrollo de la estructura nodular el paso inicial parece involucrar la liberación de productos de excreción vegetal, tales como el triptofano que son estimulantes para Rhizobium y bacterias en general, las cuales producen a la vez sustancias que son estimulantes para la planta como el IAI (Alexander, 1980).

En el proceso de infección pueden participar las fitohemogluteninas, o lectinas: estas sustancias son proteínas con una afinidad específica por los polisacáridos y con ciertas propiedades lícticas; suelen encontrarse en las semillas de las leguminosas.

Según algunos investigadores, las lectinas despojan a la bacteria de su envoltura de polisacáridos lo que permite una asociación más estrecha entre el huésped y la bacteria (FAO, 1985). Algunos investigadores afirman que la poligalacturonasa desempeña una

función en el proceso de preinfección, mientras que otros la ponen en duda (FAO, 1985). Sin embargo, se ha demostrado que existe una estrecha relación entre la tasa de leg-hemoglobina en los nódulos y en la eficiencia de la simbiosis leguminosa-Rhizobium (Viertanen, 1939), la cual se mantiene hasta el decaimiento de la actividad del nódulo.

El inicio de la infección radical es facilitado por la producción de poligalacturonasa por la bacteria, que degradan los enlaces a 1,4-gluco-sídicos de los pelos radicales permitiendo el ingreso del filamento de infección (Martínez 1986, citado por Reginensi, 1992).

3.3.1.2. ZONAS DE INFECCIÓN DE LAS RAÍCES.

En todos los suelos se puede encontrar Rhizobium, pero normalmente no fijan nitrógeno, y la colonización apropiada se da en el estado joven de la planta cuando las hojas comienzan a aparecer.

El proceso de infección para la nodulación se inicia normalmente en las células de la epidermis que han terminado su elongación pero que no han alcanzado el estado de pelo radicular emergente, ya que en cortes de seccionamiento seriado de pelos radiculares, estos autores encontraron desarrollo de la infección sólo en pelos radiculares cortos y emergentes (Bhuvanesweri, et.al. 1980 citado por Barlandas, 1985; Sprent, 1990) Figura 2.

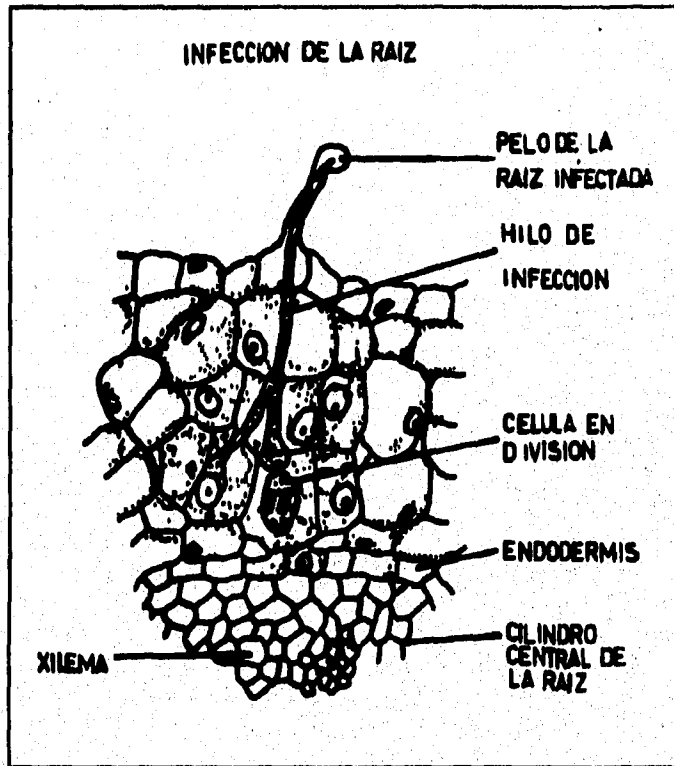


Figura 2. Ilustración de la infección de la raíz de Medicago sativa por Rhizobium meliloty (Postgate, 1971).

3.3.1.3. PENETRACIÓN DE BACTERIAS.

Sprent (1990), menciona que los rhizobios pueden vivir sapróficamente en el suelo hasta que encuentran un hospedero como la alfalfa.

Las bacterias Rhizobium que viven en los nódulos radicales inicialmente se comportan como fitopatógenos, invadiendo los pelos de las raíces primarias o secundarias de las plántulas jóvenes (Carlsson, 1973; Agrios, 1986).

La entrada de microorganismos se efectúa normalmente por los pelos deformados de la raíz, después de la penetración o invaginación inicial de la membrana primaria de la célula capilar, se continúa con la formación de un tubo cuya superficie interna está recubierta de celulosa; contiene rizobios colocados con los extremos unidos; se forma un cordón de infección parecido a una hifa, que se ramifica dentro por lo general en una matriz de polisacáridos.

Las bacterias se liberan dentro del citoplasma de las células radiculares, y poco antes o inmediatamente después de la liberación tiene lugar un período de rápida división celular en la raíz (Vásquez, 1986; FAO, 1985; Hughes, 1981).

3.3.2. MECANISMOS DE FORMACIÓN DE NÓDULOS.

Los nódulos representan un crecimiento anormal, pero organizado, que constituye una nueva estructura considerada como órgano "sui generis", que difiere de forma cualitativa y específica de los que se encuentran normalmente en la planta (Anaya, 1987 y Ko, 1990) Figura 3.

La función de los nódulos es fijar dinitrógeno (N_2) para beneficio de la planta en su conjunto lo que permite su crecimiento en deficiencia de este elemento (Russel, 1985 citado por García, 1993).

Los nódulos están formados por azúcares sintetizados en las hojas y el nitrógeno protéico producido en el nódulo, el cual a su vez se transloca a través de la planta entera (Walter, 1984).

Virtanen (1939), señala que los microorganismos de las leguminosas viven en nódulos radicales, los cuales toman el nitrógeno del suelo y lo sintetizan en formas complejas, considera además que los nódulos son el resultado de la irritación de la superficie de la raíz.

La infección penetra por las células corticales del pelo radical, o entre ellas, hacia la estela o cilindro central, en las células tetrafoideas de la corteza interna ocurre una división de solamente algunas células corticales que forman un grupo compacto de células de abundante citoplasma, el cual da origen al nódulo meristemático por lo que los nódulos poseen dos veces el número de cromosomas característicos de las células. Muy importantes son volumen y duración de tejido central que contiene a los bacteroides y leghemoglobina (Carlson, 1973; Srhoder, 1970; Turgeon, 1982).

Bral y Shantharam (1980), mencionan que después de la gran proliferación de Rhizobium dentro de las células de la raíz, estas bacterias sufren cambios bioquímicos en sus membranas celulares, mientras la célula huésped engloba a las bacterias con una membrana proveniente de su membrana plasmática.

La proliferación de rizobios se atribuye a la presencia de factores de crecimiento (bionita y tiamina) y fuentes energéticas (carbohidratos y aminoácidos) (Date, 1976). Bral y Shantharam (1980) mencionan que fragmentos de la membrana externa de Rhizobium son desechados durante la transformación de bacterias a bacteroides, las cuales persisten dentro de la membrana envolvente.

La frecuencia de la distribución de los nódulos a lo largo del sistema radical está determinada por factores que controlan los pasos en secuencia para la formación del nódulo: a) acumulación de las bacterias en la rizósfera, b) infección de los pelos radicales que culmina con la formación de filamentos de infección dentro de la corteza y c) inducción de crecimiento meristemático local en la corteza radical (Hotter, 1991; Reginensi, 1991).

Carlson (1973), considera a los bacteroides alojados dentro de la membrana como vacuolas infectantes, las cuales contienen de dos a ocho bacteroides. Estas vacuolas pueden estar interconectadas por medio de túbulos de membrana plasmática.

Las células de la raíz cuando comienzan a engrosar con la bacteria infectante en desarrollo asumen formas inusuales. En este estado la bacteria es llamada bacteroide y es rica en nitrogenasa (Sprent, 1990).

La forma del nódulo está determinada en primer lugar, por la especie de leguminosa, aunque puede ser modificado por el grado de efectividad de la cepa bacteriana asociada y esta definida por el material meristemático; puede ser redonda, oval, alargada, en forma de masa, ramificada, coralcide o en forma de collar (Islam, 1987; Reginensi, 1991).

Después de la infección se inicia la síntesis gradual de leghemoglobina en el tejido de la célula huésped, esta es una proteína que contiene hierro parecida a la hemoglobina, por lo que dos semanas después el nódulo fijador de nitrógeno adquiere una coloración de rosa a rojiza (Brock, 1978).

El color de los nódulos varía desde rojo hasta blanco. Cuando funciona con efectividad tiene una región roja relativamente más grande debido a la presencia de leghemoglobina, la cual puede enmascararse a veces por pigmentos externos de la raíz o por pigmentación oscura del propio tejido central del nódulo. El pigmento rojo (antocianina), asociado con simbiosis menos efectivas puede ser confundido con la leghemoglobina, pero se distingue por su localización en la corteza externa y por su solubilidad en agua.

Los nódulos expuestos a la luz pueden llegar a ser verdes debido a la clorofila de los cloroplastos, pero un color verde en la región basal puede indicar la modificación del leghemoglobina en biliverdina debido a la respuesta a condiciones no satisfactorias para la fotosíntesis y la continuación de la fijación (Slattery, 1989 y Whitehead, 1970 citados por García, 1993).

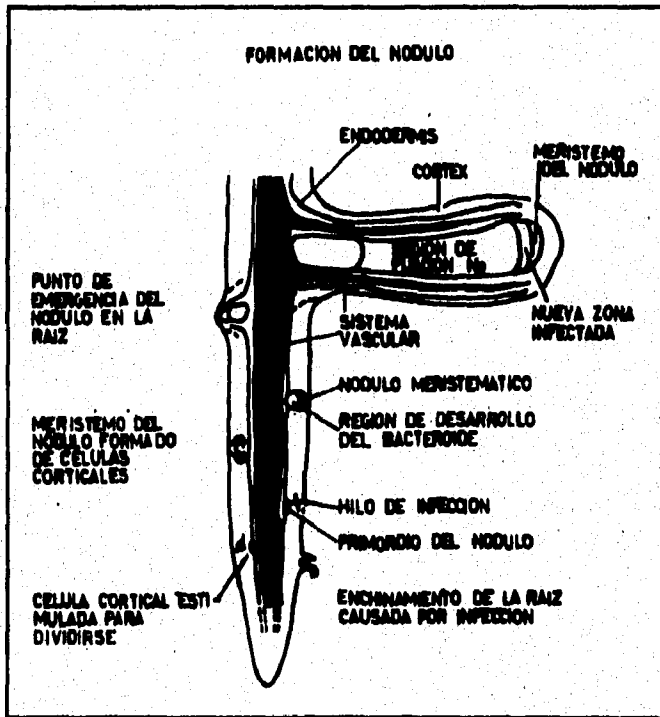


Figura 3 Secuencia típica de los eventos que conducen a la formación de un nódulo indeterminado en el caso de las leguminosas y trébol, (Alexander, 1980).

3.3.2.1. ESTRUCTURA DEL NÓDULO.

Histológicamente, el término "nódulo maduro" se aplica a aquella fase en la que todos los tejidos esenciales para la función nodular están bien definidos estructuralmente. Los nódulos se integran en la fisiología general de la planta y por lo tanto, son susceptibles de cambios que afectan a la nutrición, a la fotosíntesis, a las variaciones de lugar y a los efectos fotoperiódicos y fotoquímicos (Walter, 1984; FAO, 1985). El nódulo maduro está caracterizado por cuatro zonas distintas de diferenciación tisular:

a) **La corteza del nódulo:** Este tejido está formado por los cuatro a diez estratos celulares más exteriores del parénquima no infectado; se distingue fácilmente de la corteza de la raíz por su compacidad y por el menor tamaño de células.

b) **La zona meristemática:** Es la zona del crecimiento del nódulo, y está compuesta de células en estado de división activa y de crecimiento. En esta región, el proceso de formación de tejidos es constante mientras funcione el nódulo. Todos los tejidos especializados dentro del nódulo tienen su origen en la diferenciación celular dentro del meristema.

- La posición, tamaño y duración de esta zona varía según la especie huésped, en la alfalfa la posición de los nódulos es apical, son elongados y de formas irregulares.

c) **El sistema vascular:** Este tejido sirve para el transporte de nutrimentos de las plantas al nódulo y a su vez, para transportar a la planta huésped las sustancias nitrogenadas y otros subproductos metabólicos de los rizobios.

Carlson (1973), menciona que la vascularización se hace evidente de tres a cinco días después de la invasión del pelo radical, cuando la infección ha penetrado dos o tres capas, a la vez continúa la división de las células del parénquima cortical. Dos o tres semanas después de la infección, una envoltura de esclerenquima se diferencia sobre la corteza externa a las cuatro semanas posteriores a la infección, y previene cualquier nuevo incremento en el tamaño del nódulo, Figura 4. El proceso de fijación implica la aparición de alteraciones morfológicas en ambos simbioses, como la formación de nódulos, formación de bacteroides a partir de los bacilos vegetativos y síntesis al menos de dos nuevas proteínas (leghemoglobina y nitrogenasa).

d) **La zona bacteriana:** Esta zona, situada en la porción central del nódulo, es literalmente el tejido bacteriano, y es el lugar donde se efectúa el proceso de fijación del nitrógeno (FAO, 1985), en general para las leguminosas, pero puede variar de acuerdo a las condiciones del cultivo, tiempo de infección, variedad y otros factores que se mencionan adelante. Brock (1978), menciona que al parecer algunos de los compuestos de nitrógeno producidos dentro de las células bacterianas se difunde a través de la pared celular y son absorbidos por la planta huésped.

Tabla 2 . Etapas del proceso de infección.

Edad del nódulo en días	Etapas de nodulación.
0	Invasión inicial de pelos radiculares de células epidérmicas ordinarias por <u>Rhizobium</u> .
1-2	El hilo de infección alcanza la base de célula epidérmica y entra a la corteza.
3-4	Pequeña masa de células infectadas en el primordio del nódulo; el filamento del procambio se extiende del nódulo a las células corticales de la raíz.
5	División bacteriana y de la célula huésped muy rápida que continúa por dos semanas.
7-9	Nódulo visible; el procambio del sistema vascular del nódulo aparece en la base del nódulo y se desarrolla hacia la base del nódulo.

12-18 Crecimiento continuo de todos los tejidos del nódulo; algunas células maduran en la cepa del esclerenquima el sistema vascular y forma una red dentro de la corteza del nódulo; el tejido bacteriano es rosado al final de este período y la fijación del nitrógeno se inicia.

23 La mayor parte de la división bacteriana y de las células huésped ha cesado; el nódulo continúa su crecimiento por casi dos semanas más, período activo de la fijación de nitrógeno.

28-37 El nódulo alcanza su máximo tamaño; el tejido vascular y de esclerenquima madura; la fijación de nitrógeno continúa hasta que la degeneración del nódulo principia.

50-60 Degeneración del nódulo.

Los tiempos absolutos pueden variar con las condiciones del cultivo, tiempo de infección y otros factores (Barlandas, 1985).

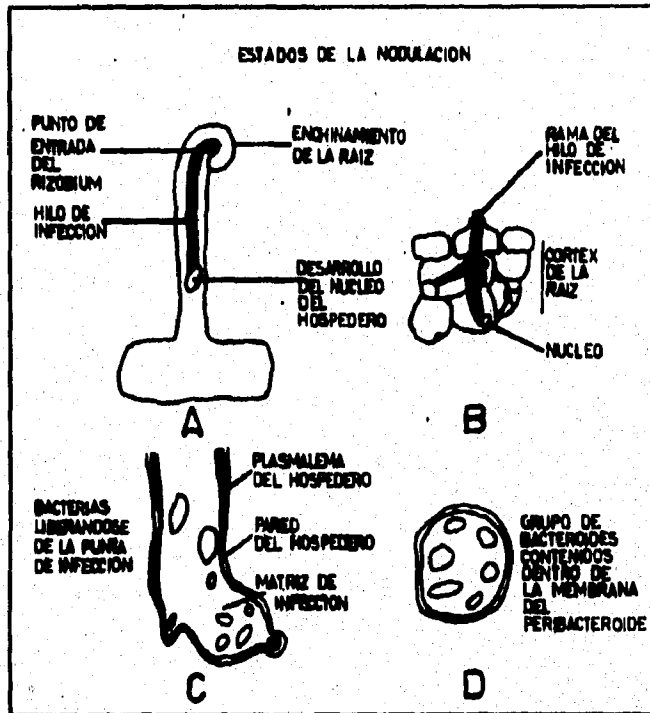


Figura 4. Estados de infección y formación de células fijadoras de nitrógeno en una "típica" planta leguminosa. A) Enchinamiento de la raíz con hilo de infección, B) Sección transversal del cortex de una raíz que muestra una rama de hilo de infección asociada con el núcleo de la célula, C y D) Muestra la liberación de bacterias. (Alexander, 1980).

3.3.3. ESPECIFICIDAD ENTRE SIMBIOTES.

Como se ha indicado, las leguminosas presenta una alternativa como aportadores de nitrógeno asimilable por las plantas, para un futuro, por lo que se han llevado acabo diversos trabajos para poder conocer las mejores condiciones para que la especie a manejar puede aportar la mayor cantidad de nitrógeno (N_2); con dichos trabajos ha sido posible conocer algunos procesos y factores que en determinado momento puede hacer de la relación Rhizobium-leguminosa un éxito o un fracaso. Entre estos se encuentra la importancia de la especificidad entre simbioses; no sólo para la especie sino aún para la variedad que se vaya a trabajar.

Las cepas del género Rhizobium se distingue por su diferente habilidad para nodular distintos grupos de plantas. La especificidad constituye la expresión de alguno de los siguientes niveles de interacción entre simbioses:

- Invasión y formación de un filamento de infección
- Formación y persistencia de un meristema nodular
- Liberación intra celular de las bacterias invasoras.
- Multiplicación de las bacterias dentro de la membrana envolvente y transformación en bacteroides.

- Establecimiento de un metabolismo eficiente integral entre el macro y microsimbionte (Barran 1988, citado por García 1993).

Por otro lado, se cree que el establecimiento de dicha asociación depende de la planta hospedera para determinar cuales cepas podrán formar nódulos en ella o no, así como de algunos nutrimentos (Date 1976; Souto 1968, citado por Vásquez 1986).

Se ha encontrado que el carácter de la nodulación se regula por un par de genes recesivos, designados como *rj1* (Hinson y Hartwing 1978, citados por Vásquez, 1986).

La especificidad puede residir en la capacidad de algunos componentes encontrados en la superficie de las células radicales; estos componentes son las lectinas, las cuales son proteínas o glicoproteínas, que se enlazan específicamente con azúcares, incluyendo aquellos carbohidratos complejos encontrados sobre la superficie de las células bacterianas (Hugés, 1981).

Allen (1974), citado por Vásquez (1986), señala que algunas líneas de Rhizobium son compatibles y útiles en algunas especies vegetales y en otras no, aún cuando formen nódulos infectivos. Ahora bien, al inocular con Rhizobium infectivo la planta no presenta ninguna

respuesta, mientras que al hacerla con la cepa compatible la planta se desarrolla bien sin que se observen deficiencias (Dumham 1931, citado por Vásquez 1986).

Crofts et.al. (1971), citado por Vásquez (1986) y Graham (1976), mencionan que cuando las semillas de leguminosas son inoculadas por una cepa adecuada de Rhizobium y la siembra se hace en la forma y condiciones adecuadas la nodulación se presenta generalmente, dando resultados bueno económicamente hablando, Day (1976), considera que la leguminosa tiene utilidad práctica cuando la asociación Rhizobium-leguminosa es efectiva.

Aún cuando las leguminosas nodulan muy bien con Rhizobium del suelo, es muy importante conocer la especificidad de la planta hospedera con la cepa bacteriana, ya que es muy necesario tener un control cuidadoso no sólo de la inoculación en el cultivo implementado, sino en todo lo que se relacione con un mejor rendimiento (Walter et.al. 1984).

Brock (1978), indica que para hacer una selección de cepa Rhizobium, es necesario fijarse en:

- Eficiencia simbiótica.
- Aptitud para formación temprana de nódulos.

- Capacidad para competir con Rhizobium nativo.

- Capacidad para persistir en el suelo.

3.4. FACTORES QUE AFECTAN LA INFECCIÓN Y EL PROCESO DE FIJACIÓN DE NITRÓGENO.

Como se ha mencionado, debido a la importancia que representa para el hombre el aporte de nitrógeno atmosférico por medio de la relación Rhizobium-leguminosa, se han llevado a cabo trabajos de investigación para conocer mejor las condiciones que se requieren para obtener mejores resultados; gracias a lo cual ha sido posible conocer algunos de los factores que influyen en los resultados de ésta relación, y que se pueden agrupar en:

1.- Factores internos

y

2.- Factores externos

1.- Uno de los principales factores internos que pueden influir bajo condiciones de crecimiento satisfactorio son los factores genéticos que afectan tanto a la cepa bacteriana como a la planta hospedera; los cuales pueden alterar el número de nódulos producidos por la cepa (Bhaduri 1951, citado por Vásquez 1986).

2.- Entre los factores externos se menciona a todos aquellos relacionados con el suelo (pH, temperatura, aireación, humedad, contenido de nitrógeno inorgánico o mineral, cal activa, fertilizantes químicos), temperatura y duración del día; algunas prácticas culturales, el empleo de pesticidas agrícolas; así como factores biológicos.

3.4.1. pH DEL SUELO.

La reacción del suelo (pH) es de gran importancia, ya que no solo afecta la formación de nódulos si no que también influye en la cantidad de nitrógeno absorbido por la planta hospedera en su crecimiento normal. Cuando el suelo es ácido se nos presentan problemas de nutrición mineral, por ejemplo en suelos deficientes de calcio las plantas pueden presentar toxicidad de aluminio, fierro, manganeso y deficiencias de magnesio y potasio, provocando con ello pobres cosechas (Alexander 1980; Walter 1984).

La producción, el contenido de nitrógeno y la nodulación de las leguminosas forrajeras a menudo responden marcadamente al encalamiento. La sensibilidad al pH debe considerarse en términos de los efectos sobre el macrosimbionte y la interacción simbiótica de ambos.

Se manejan diversos valores de Ph para una buena nodulación. Bryan (1923), citado por Alexander (1984), en recientes estudios encontró

que las cepas de Rhizobium toleran diferentes Ph de suelo siendo que algunas mueren a Ph de 5.0 mientras otras son tolerantes a pH de 4.5. Otros autores están de acuerdo con esto, estableciendo que un pH entre 5.5 y 7.5 es lo recomendable (Aguilera, 1974; FAO, 1985). Por otra parte, el macrosimbionte crecerá ocasionalmente a pH de 4.0 o menos (Alexander, 1980).

En la mayoría de las plantas que crecen a pH menores de 5.0 la infección de las raíces no ocurre; a pH de 6.0 los nódulos reducen su actividad o desaparecen rápidamente, esto es debido a la reducción en el desarrollo y multiplicación de la rizobia en el suelo (Rice, Penney y Nyborg, 1977 citados por Sprent, 1990), o a la sensibilidad al proceso de infección (Munns 1968a, 1968b; Date 1981, citados por Sprent 1990), por ello el pH es de importancia para el proceso de infección (Graham 1977; Alexander 1980; Allen 1974, citado por Vásquez 1986).

Un suelo ácido puede provocar bajos niveles de disponibilidad de calcio, magnesio, fósforo y molibdeno, y puede contener niveles de aluminio y manganeso tóxicos a las plantas hospedadas (Munns 1977a, 1977b, citado por Sprent 1990).

La alfalfa (Medicago sativa) exhibe efectos típicos de pH sobre el número formado de nódulos y su caída rápida cuando el pH < 4.7 (Sprent, 1990).

3.4.2. TEMPERATURA DEL SUELO.

El efecto de la temperatura es muy complejo, manifestándose de manera diferente según las especies de leguminosas y las cepas de Rhizobium. Alguno de los aspectos más importantes de la simbiosis Rhizobium-leguminosa que son afectados por este factor son los siguientes:

- El crecimiento y la supervivencia del Rhizobium en la rizósfera.
- La formación de pelos absorbentes.
- El enlace de las células del Rhizobium a las células de los pelos absorbentes.
- La formación de la infección.
- La estructura, crecimiento y desarrollo de los nódulos de la raíz.
- El contenido de leghemoglobina en los nódulos.
- La actividad de la enzima nitrogenasa y consecuentemente, el contenido de nitrógeno de la planta.

La nodulación se presenta en todas las temperaturas del suelo que tolera la planta, pero la abundancia de los nódulos se reduce con temperaturas extremas (Graham 1977; Alexander 1980). Raper (1980), esta de acuerdo con lo anterior, señalando que al trabajar en un experimento con ambientes controlados de temperatura, determino que la actividad específica del nódulo declina con el aumento de la temperatura.

Sprent (1990), menciona que la temperatura del suelo influye en el tiempo entre la infección y la nodulación de la raíz, siendo este más corto a temperaturas bajas.

Por su parte Day (1976), menciona que la temperatura óptima para la nodulación, varía de acuerdo al tipo de leguminosa y la cepa usada, pero que cuando la temperatura es alta se recomienda utilizar altos niveles de inoculante.

Varios estudios han mostrado una marcada diferencia en el efecto de la temperatura causada por las estaciones del año, entre ellos están los de Masterson y Murphy (1976), citados por Sprent (1990), donde consideran que la producción de nódulos y su actividad esta relacionada con la temperatura del suelo en diferentes épocas del año. Ellos observaron que la actividad del nódulo y su desarrollo en invierno (Febrero-Marzo) presenta un largo retardo cuando la temperatura del suelo es de sólo 4-5°C., por su parte Wilson, (1930) citado por Alexander, (1984) menciona que los rizobios

comienzan a ser más numerosos en la época de primavera; Iswaran et al. (1970) citado por Alexander, (1984) menciona que en suelos tropicales donde ocasionalmente se llega a registrar una temperatura de 40°C ocasiona una baja en el número de rizobios.

Janseen, (1972) reporta que al aumentar la temperatura en el suelo se incrementa y favorece la nodulación, pero a temperaturas menores se presenta mayor cantidad de nitrógeno fijado en la planta de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.).

Según los datos disponibles, los rizobios crecen a temperaturas de 0-50°C, siendo su crecimiento óptimo de 20-28°C, aproximadamente (FAO, 1985), y que la temperatura óptima del suelo para el proceso de nodulación y de fijación del nitrógeno atmosférico es de 30°C (Graham, 1977).

Raper (1980) en un experimento encontró que la soya presenta una disminución del crecimiento de las plantas que dependen de la fijación del nitrógeno, comparadas con plantas que a la misma temperatura se les aplicó una fuente de nitrógeno, sugiriendo que el sistema simbiótico es afectado adversamente por la temperatura, y no por otros procesos fisiológicos de la planta.

Las plantas que dependen de la fijación simbiótica del nitrógeno, son más sensibles a altas temperaturas, comparadas con las plantas que no dependen de este proceso (Munévar, 1981).

3.4.3. DURACIÓN DEL DÍA.

La duración del día e intensidad de luz también afectan el número y peso de los nódulos; la falta de luz tiende a disminuir el peso de los nódulos, mientras que la intensidad de luz elevada pero no excesiva aumenta el número de nódulos (Alexander, 1980).

Janseen (1972), observó que la fijación de nitrógeno durante el día fue el doble que la registrada en la noche.

Galomo (1978), menciona que la luz solar es útil para la fijación, siempre y cuando la humedad aprovechable sea adecuada, pero que bajo condiciones lluviosas la radiación solar puede limitar el crecimiento debido a la nubosidad.

3.4.4. AIREACIÓN.

Debido a que la nitrificación es un proceso de oxidación, cualquier procedimiento que aumenta la aireación del suelo podrá favorecerlo hasta cierto punto (Brady, 1977).

Gram (1963), citado por FAO (1985), obtuvo resultados similares ya que en un experimento montado encontró que ningún rizobio creció anaeróbicamente; aunque con menos de 0.01 atm de oxígeno se obtuvieron crecimientos excelentes, sin oxígeno no se consiguió ninguno.

3.4.5. HUMEDAD.

El potencial del agua próximo a la capacidad de campo es usualmente considerado necesario para la nodulación y fijación del N_2 . El déficit de agua en sólo 2.5 bares puede causar una reducción significativa de la fijación simbiótica del nitrógeno y con -15 a -20atm la fijación es eliminada esencialmente. Recobrase de la sequía puede tomar considerable tiempo, y con una prolongada sequía hay una pérdida completa de la fijación del nitrógeno (Graham, 1984).

Se ha demostrado que un déficit hídrico inhibe la formación de nódulos y el crecimiento de los preexistentes en numerosas leguminosas, determinando en consecuencia, una apreciable disminución de la fijación de nitrógeno atmosférico.

Rathore (1981), describe resultados similares en un experimento donde encontró una reducción significativa en el peso total de los nódulos, causado por falta de humedad al principio de la floración. La falta de humedad en los diferentes estados de desarrollo fisiológico de la planta, no reduce significativamente el contenido de bacteroides, pero el contenido de leg-hemoglobina fue reducido significativamente por la falta de humedad, tanto al inicio de la formación del nódulo como al inicio de la floración. Se observó además, una marcada reducción en la asimilación de nitrógeno al inicio de la floración.

El efecto de la falta de humedad puede afectar directa o indirectamente la fijación del nitrógeno. El efecto directo es sobre la desecación del nódulo, lo que trae consecuentemente una baja fijación de nitrógeno. Por otra parte, un exceso de agua trae como consecuencia la saturación de los poros del suelo y, por tanto, una baja difusión del O_2 necesario para el buen desarrollo y funcionamiento de los nódulos. Indirectamente, se afecta la cantidad y calidad del follaje, lo que trae un reducido porcentaje de fotosíntesis y, por lo tanto, una baja asimilación del CO_2 necesario para la producción de fotosintatos indispensables para la simbiosis (Sivakumar 1978 y Brose 1979, citados por Barlandas 1985, Rathore, 1981).

Galomo (1978), concluye que la humedad óptima para las plantas es la óptima para el desarrollo de la nodulación, por lo que este proceso puede retardarse tanto por condiciones de muy escasa como de abundante humedad.

3.4.6. COMPETENCIA.

La competencia es el fenómeno en el cual un organismo es indirectamente perjudicial para otro, por tener demandas similares de los recursos del ambiente (Daubenmire 1968, citado por Vega, 1990).

Dentro de una comunidad la competencia ocurre entre los individuos de la misma o diferente especie, siempre que los mismos requerimientos empleados por las poblaciones estén disponibles en cantidades insuficientes para abastecer todas las demandas adecuadamente.

La introducción de nuevas cepas en una comunidad por medio de la inoculación de semillas por lo general es un fracaso, debido a que dichos organismos no pueden contrarrestar la habilidad competitiva de las especies naturales, las cuales se encuentran adaptadas a su medio (Vega, 1990). Sin embargo, en algunas ocasiones los nuevos organismos pueden establecerse como parte de la comunidad, aunque frecuentemente producen algunos cambios que pueden ser favorables para esa comunidad (Oosting 1956; Kremer y Peterson 1983, citados por Vega, 1990).

La cepa introducida, además de competir con otras rizobias por los sitios de infección y por el sustrato, deben también competir con otros organismos del suelo (Vidor 1981, citado por Vega, 1990). Estos organismos que pueden ejercer efectos dañinos en la nodulación son: hongos, bacterias, virus y nemátodos, los cuales pueden causar pérdidas considerables y reducir la cantidad de nitrógeno fijado. También al Rhizobium lo puede afectar la presencia de toxinas en las semillas, que puede ser digerido por enzimas o inhibido por antibióticos y bacteriocinas (Ortega 1976, citado por Vásquez, 1986).

La competencia por los sitios de infección en las leguminosas es usualmente medida al comparar la habilidad de cepas de Rhizobium introducidas en la formación de nódulos en el hospedero respectivo. Esto implica que la competencia está limitada por los elementos que se presentan fuera del microsimbionte y del huésped. Sin embargo, se sabe que el genoma de la rizobia contribuye sustancialmente en la competencia y que también los factores ecológicos afectan directamente a la rizobia y al crecimiento de la planta (Dowling y Broughton 1986, citados por Vega, 1990).

La mayoría de las semillas de leguminosas inoculadas son sembradas en suelos que contienen poblaciones establecidas de Rhizobium, en algunos casos se ha reportado que la cepa introducida induce la formación de la mayoría de los nódulos en el primer año; pero que desaparece progresivamente y es reemplazada por las rizobias nativas en años sucesivos (Dudman y Brockwell, 1968; Roughley et.al., 1976; Jensen y Strijdom 1982; citados por Vega, 1990).

A las rizobias nativas se les puede considerar como una barrera para la introducción exitosa de cepas que nodulen satisfactoriamente, por lo que se requiere de más conocimientos acerca de la naturaleza de la población nativa de Rhizobium (Bromfield et.al. 1986, citado por Vega, 1990).

Un objetivo en la investigación de la inoculación es la selección de cepas altamente efectivas de rizobias para una leguminosa particular (alfalfa). Tales cepas deben ser capaces de establecerse en la rizosfera y competir satisfactoriamente por los sitios de infección con las rizobias nativas del suelo, las cuales también incluyen cepas infectivas y altamente competitivas (May y Bohlool 1983, citados por Vega, 1990).

Debido a que el área inmediatamente adyacente al sistema radicular es el sitio de origen de los rizobios, no es sorprendente que la microflora asociada tenga influencia en el desarrollo de la simbiosis. Los fracasos ocasionales en la inoculación pueden ser resultado de una competencia microbiológica que suprime al microsimbionte deseado y evita la iniciación de la infección. Alternativamente, los miembros de la microflora pueden ejercer una influencia benéfica proporcionando factores de crecimiento, eliminando metabolitos tóxicos o inmovilizando el nitrógeno inorgánico aumentando de esta forma la formación de nódulos.

La inoculación a menudo fracasa pues las plantas no son noduladas por la cepa de Rhizobium inoculada en la semilla, sino por cepas propias del suelo (nativas) menos eficientes en la fijación, pero mejor adaptadas al suelo (Kapusta 1973; Quispel 1974; Holland 1966; Franco 1976; Obaton 1977; Kuykendall 1978, citados por FAO, 1983). Por esta razón no se han dado resultados satisfactorios en la mayoría de las inoculaciones, debido a que la cepa introducida sólo

forma una proporción muy pequeña de nódulos ya que la mayoría mueren (Miller 1979; Roughley et.al. 1976, citados por Vega, 1990), ocasionado por la inadaptación de estas nuevas poblaciones a las condiciones adversas del suelo (Wolkoski y Kelling 1984, citados por Vega, 1990).

Cuando se introducen grandes números de rizobios al suelo, como ocurre en la temporada de siembra de semilla inoculada, su abundancia disminuye pronto; esta disminución es correlacionada con un aumento en la densidad de protozoarios, un grupo de depredadores capaces de alimentarse ávidamente de cepas de Rhizobium, sin embargo, la predación de los protozoarios no elimina por completo a la rizobia pero si merma su población (Alexander, 1984). Aparentemente, los animales microscópicos son comedores efectivos cuando sus células presa son comunes, pero su tasa de alimentación disminuye cuando las bacterias se vuelven más escasas.

Cuando se obtienen mejoras notables en la nodulación al incrementar el inóculo (Johnson 1965; Bohlool 1973; Kapusta 1973; Kuykendall 1978, citados por FAO, 1983) sugieren que el bajo número de Rhizobia en la rizosfera es el factor limitante.

Las cepas de Bdellovibrio que atacan organismos de los nódulos de las raíces, están ampliamente distribuidas y son capaces de parasitar y diezmar grandes poblaciones de Rhizobium. Las especies de Rhizobium también son susceptibles de ataque y lisis por bacteriófagos (Alexander, 1980).

Tu (1978), citado por Sprent (1990), reporta que el hongo fitopatógeno Phytophthora megasperma causa la pudrición de la raíz en alfalfa y es particularmente significativo a bajas temperaturas, compitiendo así con el desarrollo del nódulo.

Otro competidor es la Sitona weevil larvae, la cual se come los nódulos de la alfalfa e incrementa su número por la presencia de los mismos (Sprent, 1990).

Por otra parte, una de las propiedades consideradas como esencial para que una cepa de Rhizobium sea utilizada como inóculo es la capacidad de persistir en el suelo, tanto en ausencia como en presencia del hospedero (Vega, 1990).

3.4.7. PRACTICAS AGRONOMICAS.

El contacto directo de la semilla con el fertilizante o agentes químicos ya sea para desinfectarla o para controlar plagas representan un severo estrés para la misma, debido a que provoca la muerte de la rizobia afectando con ello la nodulación (Loneragam 1972, citado por Vásquez 1986; Del pozo, 1983; Alexander 1984).

Peezen Meyer (1974), citado por Del Pozo (1983), menciona que en un experimento realizado con alfalfa inoculada, sembrada en un suelo con pH de 6.5 previamente encalado, se estableció sensiblemente mejor que la testigo, produciendo abundantes nódulos. En cambio, la

inoculada y sembrada en una parcela sin encalar no presentaba mejor nodulación que la testigo, implantada sin cal y de semilla no inoculada.

Por otro lado algunas prácticas culturales ayudan a un mejor desarrollo de las raíces y por ende de los nódulos bacterianos (Brady, 1977).

3.4.6. FACTORES NUTRIMENTALES.

Estos factores son muy importantes en la simbiosis Rhizobium-leguminosa ya que cualquier deficiencia o exceso de elementos nutritivos que afecten a la planta, afectará también la relación y por lo tanto también la fijación simbiótica del nitrógeno (Graham 1977; Stewart 1961, citado por Vásquez 1986).

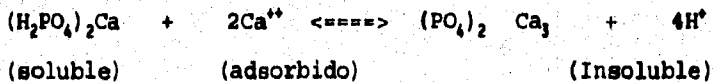
Franco (1977), menciona que las diferencias fisiológicas entre variedades está relacionada con la nutrición de calcio y nitrógeno que pueden ser responsables para determinar las diferencias de nodulación en las plantas.

Se señalan diversos micronutrientes importantes para la nodulación sea o no efectiva, por ejemplo: los elementos necesarios en la planta hospedera para la fijación simbiótica son: Fósforo, potasio, calcio y azufre; y fósforo, calcio, molibdeno para la nodulación y fijación del nitrógeno por Rhizobium (Galomo, 1978). La escasez de

éstos elementos nutritivos esenciales contribuye a la ausencia de un reducido número de Rhizobium en el suelo (Alexander, 1980).

Uno de los micronutrientes que desempeña un papel muy importante es el calcio, ya que tiene efecto sobre la absorción de otros elementos necesarios tanto en el desarrollo de bacterias como de plantas, entre las cuales esta el boro, molibdeno y fósforo (Dawson 1970, y Day, 1976) . El molibdeno no parece ser esencial para el proceso de fijación del nitrógeno, a pesar de ser requerido en cantidades pequeñas es necesario en las reacciones enzimáticas por las cuales el nitrógeno queda fijado. Algunos investigadores creen que casi toda la respuesta favorable de ciertas leguminosas a la cal es debida indirectamente al aumento del aprovechamiento molibdeno asociado con la cal (Brady, 1977) .

Brady (1977), menciona que las altas concentraciones de calcio influyen negativamente en la aprovechabilidad del fósforo ocurriendo las siguientes reacciones:



Se menciona también que las deficiencias de calcio pueden producir toxicidad de aluminio y manganeso, deficiencias de magnesio, potasio y hierro (Dawson, 1970 citado por Vásquez, 1986).

La deficiencia presentada por los micronutrientes mencionados, así como el pH del suelo, puede afectar fuertemente la fijación simbiótica de nitrógeno en cualquiera o todas las fases siguientes:

- Supervivencia y crecimiento de bacterias en el inóculo.
- Formación del nódulo.
- Función del nódulo.
- Crecimiento de la leguminosa hospedera.

3.4.0.1. RELACIONES NUTRIMENTALES.

La planta de alfalfa como todas las demás, requiere de los elementos denominados esenciales para su crecimiento y desarrollo. Es fundamental que exista entre ellos un cierto equilibrio, ya que a menudo están de tal manera interrelacionados que el exceso o deficiencia de uno de ellos puede limitar o condicionar la adsorción por parte de las plantas de otros, aunque en ocasiones la tolerancia puede ser amplia (Del pozo, 1983). Los cortes de la alfalfa, provocan un continuo y progresivo agotamiento de sustancias minerales, lo que puede originar déficit de uno o más nutrientes, aún en suelos fértiles (Rhykerd y Overdahl, 1972).

Un suministro adecuado y a la vez balanceado de elementos esenciales es básico para la producción de plantas de crecimiento sano y de alimentos de calidad. Contrariamente, un desbalance nutrimental entre aquellos disponibles y otros no esenciales para el crecimiento vegetal pueden disminuir el rendimiento y en casos extremos causar severos daños a los cultivos (Bolton, 1962).

3.4.8.1.1. NITRÓGENO.

El nitrógeno constituye el elemento de mayor repercusión económica en la agricultura moderna y más concretamente en la producción de forrajes. Es parte fundamental de proteínas, prótidos y de la molécula de clorofila, determinante en la asimilación fotosintética vegetal; constituyente de enzimas, así como de los ácidos nucleicos, esenciales para la síntesis protéica (Del Pozo 1983; Mengel y Kirkby 1978, citados por Cazares 1988).

Se ha reportado que una baja cantidad de este elemento (16 a 17 kg/ha), aplicado durante la siembra, resulta benéfica para la alfalfa, pues con ello se facilita el rápido crecimiento inicial de las plántulas, hasta que se formen los nódulos en las raíces y los rizobios estén en condiciones de fijar el elemento del aire (Rhykerd y Overdahl, 1972).

Sin embargo, es conocido, que al incrementar la dosis de fertilizante nitrogenado, la eficiencia funcional de los nódulos disminuye (Nelson y Barber, 1964).

Otros factores han sido detectados como limitantes o básicos en la respuesta de la alfalfa a la fertilización nitrogenada. Este cultivo resulta más sensible a la acidez del suelo, cuando depende de la fijación simbiótica para obtener su nitrógeno, que cuando éste último le es adicionado en forma complementaria (Doerge et.al. 1985; Munns, 1964 citados por Cazares, 1988); la acidez reduce el desarrollo nodular y por ende la fijación simbiótica del nitrógeno atmosférico (Martín y Matocha, 1973 citados por Cazares, 1988).

Bueno (1981), citado por Cazares (1988), sostiene que la eficiencia de las bacterias fijadoras de nitrógeno se reduce proporcionalmente a medida que el suelo se enriquece en este nutrimento, ya que las primeras utilizan más de ese nitrógeno y menos del proveniente de la atmósfera.

3.4.8.1.2. FÓSFORO.

Aunque el porcentaje de fósforo en la alfalfa generalmente alcanza sólo 0.2 a 0.4% desempeña una función fundamental en muchos procesos esenciales de la vida vegetal. Entre los compuestos importantes que contienen fósforo están los ácidos nucleicos, los fosfolípidos, el ATP y las coenzimas NAD Y NADP, que juegan un importante papel en la fotosíntesis, en la síntesis de carbohidratos y proteínas, en el metabolismo de las grasas, en la transferencia de energía y la herencia (Rhykerd y Overdahl 1972; Gauch 1972, Mengel y Kirkby 1978, citados por Cazares 1988).

El fósforo tiene un papel decisivo en el crecimiento radicular; favorece y regula los procesos generativos de la planta, tales como la floración y la fructificación; regula la asimilación y utilización nitrogenada de la planta, al permitir el transporte de azúcares en la síntesis proteica (Del Pozo, 1983).

Las leguminosas, como grupo, tienen un contenido relativamente alto de fósforo; casi similar al azufre pero nunca tan elevado como el nitrógeno o el potasio. La respuesta del fósforo es normalmente más marcada durante el período de crecimiento inicial, debido al limitado sistema radicular que hace depender a la plántula de las aplicaciones localizadas de fertilizante. Por otra parte, un suplemento limitado de fósforo reduce tanto el número como la eficiencia de las bacterias nodulares (Nelson y Baber, 1964).

3.4.8.1.3. POTASIO.

El potasio se encuentra en la alfalfa en una concentración más elevada que los demás nutrimentos, con excepción del nitrógeno, por lo que con frecuencia constituye el elemento clave para la mayor producción de alfalfa de calidad. Varios autores (Bolton, 1962; Gauch, 1972; Rhykerd y Overdahl 1972; Juscafresa, 1980; Muslera y Ratera 1984, citados por Cazares, 1988) coinciden en señalar entre las funciones más importantes del potasio a las siguientes:

- a) Síntesis y degradación de hidratos de carbono y la translocación del almidón, cuyo resultado es una mayor área foliar y un retraso en la senescencia.
- b) Participación en el metabolismo del nitrógeno y la síntesis de proteínas.
- c) Control y regulación de la actividad nutricional.
- d) Neutralización de ácidos orgánicos.
- e) Activación de enzimas.
- f) Estimulación del crecimiento de meristemas así como del número y ritmo de la actividad estomatal.
- g) Participación en la regulación del contenido hídrico del citoplasma celular, estimulando así la resistencia a la sequía.
- h) Contribución al incremento de la resistencia de los tejidos vegetales, tornándolos menos sensibles a los efectos del frío y a las invasiones parasitarias.

Los altos niveles de potasio disminuyen consistentemente la concentración de sodio (Barbarick 1985, citado por Cazares, 1988),

calcio y magnesio, pero tienen poco efecto sobre los micronutrientes. (Smith 1975, citado por Cazares, 1988).

3.4.8.1.4. CALCIO Y MAGNESIO.

Tanto el calcio como el magnesio son importantes en la producción de leguminosas. Sin embargo, están íntimamente asociados con la acidez del suelo. Esta acidez puede ser perjudicial para el desarrollo vegetal, ya sea por que aumenta la solubilidad de elementos tóxicos, reduce la disponibilidad de nutrientes esenciales o deprime la actividad microbológica del suelo (Pearson y Hoveland, 1974).

El calcio favorece el desarrollo radicular y es esencial para la nodulación y fijación simbiótica de nitrógeno. Ejerce cierta influencia en la movilización de carbohidratos y es indispensable para mantener el equilibrio biológico de la planta, actuando como neutralizador de ácidos orgánicos. Es pieza fundamental en la constitución de las paredes celulares, además de que influye en la formación y maduración de semillas. Cuando se presentan niveles deficitarios, es notable la falta de resistencia de las plantas a la sequía y las heladas.

El magnesio forma parte de la molécula de clorofila, por lo que resulta esencial para la fotosíntesis y el metabolismo de los carbohidratos. Interviene en el metabolismo del nitrógeno y en la

síntesis de aceites. Se considera que está asociado con el transporte de fósforo en la planta y, además, tiene un papel importante en la activación de enzimas (Gauch y Hoveland 1974, citados por Cazares, 1988).

3.4.9. CEPA NATIVA.

Otro factor muy importante es la respuesta de cepas nativas; ya que donde los Rhizobium nativos son numerosos y eficientes la respuesta de la inoculación puede ser escasa o nula (Alexander, 1980). Vargas (1957), menciona que cuando el suelo esta provisto de la bacteria específica, la inoculación no tiene razón de ser.

Por otra parte, la nodulación no necesariamente indica fijación de nitrógeno ya que algunas cepas que producen nódulos fija poco nitrógeno o no lo fijan y en ocasiones se comportan como parásitos. El suelo puede no contener Rhizobium de tipo específico para una leguminosa dada y entonces se hace necesaria la inoculación (Dawson, 1970).

Se han hecho diversos estudios sobre la capacidad de una cepa inoculada para competir con las cepas nativas del suelo, pero no existe hasta el momento ningún dato práctico para resolver tal problema (Graham, 1977).

Cuatle (1979), citado por Vásquez (1986), observó que las cepas nativas de Rhizobium presentaron gran capacidad infectiva, tanto en campo como en invernadero, en suelo fumigado y sin fumigar, interfiriendo la evaluación del efecto de las cepas inoculadas.

3.5. INOCULACIÓN

Con la inoculación se pretende facilitar la formación de nódulos por la planta mediante la adición de un cultivo de Rhizobium, bien directamente al terreno o impregnando la semilla previamente a la siembra (Del Pozo, 1983).

3.5.1. IMPORTANCIA DE LA INOCULACIÓN.

Como ya se ha indicado uno de los aspectos fundamentales para que se presente una nodulación efectiva (siempre y cuando se presenten las condiciones para ello), es la presencia de Rhizobium específico para la variedad a sembrar, lo ideal es que la bacteria exista en el suelo, pero cuando no hay disponibilidad se puede añadir por medio de la inoculación en la semilla (S.E.P. 1985, citado por Vásquez, 1986).

En la actualidad muchos países desarrollados se lleva acabo la inoculación de varias leguminosas de importancia económica, principalmente en soya, alfalfa, cacahuete, y frijol, con el objeto de promover la formación de dichos nódulos y conseguir un buen rendimiento a un menor costo.

La inoculación representa por lo tanto un gran potencial para la obtención de alimentos a bajo costo sin necesidad de usar fertilizantes. Sin embargo, la inoculación por sí sola no nos produce los resultados que esperamos, si no que esto depende de la clase de inoculante, forma de inocular, contacto con fertilizante y supervivencia de semilla.

A pesar de la importancia que representa la inoculación los resultados hasta la fecha no han sido muy satisfactorios, pero se han hecho ya a la fecha se siguen llevando a cabo en diversas áreas del país varios experimentos con el objeto de conocer mejor las respuestas de las variedades a la inoculación, para posteriormente si los resultados son buenos, poder ser recomendada a las zonas en que más se podría necesitar y en ese caso poder proporcionar un forraje con un alto contenido protéico a bajos costos.

3.5.2. PROBLEMAS EN LA INOCULACIÓN.

Un inoculante es un cultivo de bacterias que se presenta en medios líquidos o sólidos y que se emplean para promover la formación de nódulos en las raíces de las leguminosas. Una pobre respuesta en campo a la inoculación es el resultado de los problemas que aparecen en la preparación y almacenamiento del inoculante; y al tiempo de la aplicación en el campo; lo que implica la necesidad de seleccionar cépas de la misma región (FAO 1983). En la práctica de la inoculación se presenta una serie de problemas que hacen llegar

a la conclusión de que podría no ser recomendable llevarla acabo, sin embargo se cree que en los casos en que no ha habido respuesta se observa que puede deberse a:

- 1.- Que la nodulación natural sea adecuada.
- 2.- Calidad del inoculante.
- 3.- Empleo de cepas no competitivas.
- 5.- Que el inóculo aplicado no se estableció por fallas de sobrevivencia o en su capacidad colonizadora o por competencia de Rhizobium del lugar.
- 6.- Alteración de la calidad del inoculante durante el transporte, almacenamiento y posterior distribución bajo condiciones adversas (Trujillo 1981, y Brockwell 1986).
- 7.- Métodos de aplicación inadecuados.
- 8.- Que hay condiciones desfavorables para la formación y funcionamiento de los nódulos (huésped, temperatura, deficiencia nutricional, N combinado) (FAO 1983; Vincent 1975, citado por Vásquez 1986).
- 9.- Número de Rhizobium.

Dawson (1970), manifiesta que el suelo puede no contener Rhizobium de tipo específico para la leguminosa que se va a sembrar, ya sea por que es introducida la variedad o por que hace años que no se siembra, es necesaria la inoculación de la semilla.

Otra razón es que se asegura la efectiva fijación simbiótica de nitrógeno por la bacteria y que ésta esté disponible en la zona de la raíz cuando la planta empieza a desarrollarse.

Existen datos que mencionan que solamente 25% de los rizobios encontrados naturalmente en el suelo, son altamente benéficos, mientras que el 50 % son moderadamente benéficos y el otro 25% no lo son (Dawson, 1970).

Crispin (1967), citado por Galomo (1978), indica que en distintos campos experimentales se han hecho estudios, sobre uso de inoculantes, no encontrándose una respuesta consistente y positiva que amerite recomendar éstos productos.

Walter (1984), indica que los inoculantes comerciales se usan ampliamente para asegurar que la leguminosa en germinación se ponga en contacto con la cepa adecuada de Rhizobium, ya que si esto ocurre la relación en vez de ser un parasitismo, se convierte en simbiote.

La competitividad caracterizada por la capacidad de competir con otras cepas y con las nativas del suelo es otro factor de importancia, donde los Rhizobium nativos son numerosos y eficientes la respuesta de la inoculación puede ser escasa o nula (Vargas 1957; Alexander, 1980).

Se observa también que el número de nódulos formados no es proporcional a la cantidad de inoculante agregado (Burton 1954, citado por Vásquez, 1986).

Cuando el suelo está provisto de la bacteria específica la inoculación tiene poco efecto (Vargas, 1957).

Chávez (1975), citado por Vásquez (1986), señala que trabajando en dos experimentos de frijol en dos suelos del Valle de México; a nivel invernadero, probando la eficiencia de los inoculantes y del molycofix (inoculante comercial) sobre la nodulación de frijol, observó que las plantas no inoculadas mostraron nodulación, lo que demuestra que hay inóculo nativo en los suelos.

Otro de los problemas que puede afectar enormemente los resultados es en el momento de la siembra, por lo que según (Manguiat 1981, citado por Vásquez, 1986) se recomienda sembrar inmediatamente después de la inoculación, lo que debe hacerse a la sombra, por lo que se sugiere hacerlo antes de que salga el sol.

Las recomendaciones acerca del tipo de adherente lleva, caducidad del inoculante, aplicación de fungicidas, temperatura de almacenamiento y hora de siembra dependen del tipo de inoculante que se utilice, si es un producto comercial o bien cepas proporcionadas por alguna institución. En general todos los factores mencionados que afectan la nodulación afectan también la inoculación.

En cuanto al número de Rhizobium se tienen datos que nos indican cuál puede ser el número apto para asegurar la inoculación. En general para la mayoría de las leguminosas, si las condiciones son favorables, 100 rizobios por semilla pueden dar una buena nodulación (Date, 1976).

En Australia, el estándar es de 300 rizobios por semilla para dar pronta nodulación bajo condiciones normales de campo, mientras que cuando las condiciones de sobrevivencia y multiplicación son adversas, o si hay competencia de cepas nativas, son necesarias más de 100 000 bacterias por semilla.

Se menciona que un inoculante de buena calidad debe proporcionar 10^5 a 10^6 células viables por semilla y que son necesarios al menos 2×10^5 rizobios/semilla para una nodulación eficiente bajo condiciones relativamente buenas y que es necesaria mayor cantidad de inóculo cuando las condiciones son desfavorables (Freire 1976; Muldoon 1980, y Manguiat 1981, citados por Vásquez, 1986).

3.5.3. TIPOS DE INOCULANTE.

En la actualidad son pocas las empresas que producen inoculantes comerciales en México por lo cual los tipos son también pocos:

- 1.- Por el tipo de cepa, los hay que son microorganismos de cepas extranjeras, o bien los que usan cepas nativas (haciendo selección en invernadero y campo).
- 2.- Por el tipo de soporte, los que utilizan turba (Ya sea importada o nacional) o los de arcilla.
- 3.- Por su tipo de presentación, se presentan en forma granular y en polvo (en ambos casos es necesario aplicar un adherente, que generalmente recomienda el fabricante) (Trujillo, 1981).

Según Trujillo 1981, y Boonkerd (1978), citado por Vázquez (1986), al utilizar inoculantes hechos a base de cepas nativas podríamos esperar mejores resultados lo que confiere mayor efectividad sobre los fabricados a base de cepas extranjeras.

En cuanto al tipo de soporte se tienen datos de estudios que muestran que la turba es el mejor material para ser usado como soporte, ya que mantiene más Rhizobium viable que aquellos a base de arcilla (Trujillo 1981, Hitboald 1980, citado por Vázquez, 1986), como lo señala el Tabla 3.

Tabla 3. Humedad y número de células por gramo de inoculante empleado como soporte turba nacional, con Rhizobium phaseoli FM¹⁸ en el transcurso de 6 meses.

Tiempo (días)	Humedad	Células/gr inoculantes
15	48.8	3.5×10^9
30	48.8	2.4×10^8
120	47.4	1.7×10^8
180	45.3	5.5×10^7

Fuente: Trujillo 1981.

A partir aproximadamente de 1972, algunos fabricantes empezaron a vender inoculantes granulares y cultivos en caldo congelados y concentrados para la inoculación directa del suelo. Los cultivos granulares y de caldo concentrado son más caros y exigen técnicas especiales de aplicación, no obstante, son más eficaces en medios donde la inoculación del suelo con semillas como portadores resulta difícil o poco segura (Hinson, 1978).

Algunos autores consideran que los inoculantes granulares confieren ventajas respecto al almacenamiento, manejo y aplicación. Estos inoculantes pueden ser aplicados en el surco con sembradoras y los porcentajes de Rhizobium se pueden incrementar mucho más que con los inoculantes convencionales (Barlandas 1985; Boonkerd 1978, citado por Vásquez 1986). Sin embargo la cantidad de inoculante granular aplicada al surco, comparada con la aplicada a la semilla, puede ser de 20 a 50 veces más que el inoculante a base de turba (Muldoon 1980, citado por Vásquez, 1986).

Manguiat (1981), citado por Barlandas (1986), propone la preinoculación como una alternativa para evitar el sembrar inmediatamente la semilla. Dicha preinoculación está influenciada por el método de mezclado, el tipo de adherente, temperatura de almacenamiento y período de incubación.

Manguiat (1981), encontró que una temperatura de refrigeración de 4°C, no produce cambios significativos en la población de Rhizobium que yace sobre la superficie de la semilla hasta por un período de 7 días después de la inoculación. Pero la mantenerlas en almacenamiento las semillas inoculadas a una temperatura ambiente de 28 a 31°C, usando goma arábica al 40% como adherente, encontró que sólo pudieron mantenerse por tres días sin cambios significativos en la población de Rhizobium; además observó una reducción en el porcentaje de germinación de la semilla.

Por lo anterior, este autor menciona que la preinoculación puede emplearse exitosamente, sólo cuando se efectúe 2 días después de la inoculación.

Se elaboran también inoculantes en diferentes centros de enseñanza e investigación aislando cepas nativas pero su uso esta restringido a los trabajos de investigación que realizan éstos tanto en campo como en invernadero.

3.6. AGUA.

En la actualidad, México enfrenta una disminución acelerada de la disponibilidad de agua en las zonas más pobladas y una creciente contaminación de los cuerpos hídricos susceptibles de servir como fuentes de abastecimiento. En muchas zonas del país es posible aprovechar las aguas generadas principalmente por medianas y grandes ciudades para cubrir los déficit generados.

Entre los usos más comunes del agua residual se tienen principalmente los que no requieren calidad de agua potable, tales como algunos procesos industriales, riego de parques jardines y uso agrícola entre otros. De estos usos los dos primeros, por lo regular, requieren calidad de agua tratada y sólo el uso agrícola puede aceptar agua residual cruda (González, 1986).

En específico la utilización de aguas residuales crudas en el riego agrícola genera una situación muy controvertida, ya que por un lado presenta efectos positivos, tales como mayor rendimiento en el cultivo, debido al aporte de los fertilizantes, amortiguamiento en la salinización del suelo por contenido de materia orgánica y contar con una fuente alterna de agua disponible en zonas de escasez; por otro lado presenta efectos negativos como: problemas en salud pública por el consumo y manejo de productos agrícolas regados con aguas residuales, contaminación de acuíferos en el área de riego y la generación de suelos infértiles por la salinización y obstrucción causada por la materia suspendida (Tejeda, 1986).

La presencia de nitratos en el agua utilizada para riego de cultivos puede considerarse como un elemento aprovechable. En muy raras ocasiones el agua para irrigación puede dañar a los cultivos (O.S.E.P.A. 1972, citado por González 1986).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1. SITIOS DE MUESTREO.

Los sitios de muestreo se encuentra ubicados dentro del Estado de México, en los municipios de Zumpango, Tepozotlán y Cuautitlán.

4.4.1. LOCALIZACIÓN.

El área experimental se localiza dentro de las instalaciones de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, la cual se ubica en la cuenca del Valle de México, al oeste de la cabecera del municipio de Cuautitlán, Estado de México.

El municipio de Cuautitlán Izcalli geográficamente se encuentra entre los 19° 37' y los 19°45' de latitud norte y entre los 99° 14' de longitud oeste a una altitud de 2250 msnm., limita al sur con el Municipio de Tultitlán, al sureste con Tultepec, al este con Melchor Ocampo, al norte con Teoloyucan, al noreste con Zumpango y al oeste con Tepozotlán.

4.1.2. SUELO.

De acuerdo con el sistema de clasificación FAO Detenal (S.P.P. 1981) estos suelos han sido clasificados como vértisoles pélicos (Vp). Son suelos que presentan una textura fina arcillosos;

pesados, difíciles de manejar por ser plásticos y adhesivos cuando están húmedos, y duros forman grietas profundas cuando se secan, pueden ser impermeables al agua de riego o lluvia (FAO. 1968, citado por De la Tajada, 1982).

4.1.3. AGUA PARA RIEGO.

El tipo de agua usada para el riego del cultivo de alfalfa en los lugares muestreados fueron:

Zumpango	Aguas negras
Tepozotlán	Aguas grises
FES-Cuautitlán	Aguas blancas

4.1.4. CLIMA.

De acuerdo al sistema de Köppen modificado por García el clima para la región de Cuautitlán corresponde al C(Wo), (W)b (i'') templado, el más seco de los subhúmedos, con lluvias en verano e invierno seco. Las temperaturas medias mensuales oscilan entre 17 - 18.5°C que coinciden con la época de lluvias, por lo que el cultivo de alfalfa se desarrolla favorablemente. La temperatura máxima promedio es de 26.5°C durante los meses de abril, mayo y junio, la mínima promedio es de 2.3°C en enero y febrero, aunque la presencia de heladas es muy marcada durante los meses de diciembre - febrero.

La precipitación media anual es de 605 mm; siendo julio el mes más lluvioso con 128.9 mm y febrero el mes más seco con 3.8 mm. Las probabilidades de lluvia en esta zona son menores de 50% por lo que es indispensable contar con riego.

4.2. PROCEDIMIENTO DE MUESTREO.

Las cepas utilizadas para la inoculación de semilla corresponden a Rhizobium meliloti, fueron extraídas de parcelas ubicadas en Zumpango, Tepozotlán y FES-Cuautitlán.

Para la realización de la colecta se eligieron tres lugares establecidos con alfalfa, tomando en cuenta el tipo de agua empleada para su riego, posteriormente se sacaron 5 plantas con raíz y suelo de cada lugar en forma aleatoria, con la finalidad de evitar su desecación y extraer los nódulos de la raíz. El muestreo se realizó en el centro de las parcelas, con la finalidad de hacer a un lado los caminos y canales que bordean a las parcelas, evitado así un error causado por el efecto de orilla.

4.3. CARACTERÍSTICAS DEL INVERNADERO.

No fue propiamente un invernadero sino una cubierta plástica, donde sus dimensiones son de 2 m de ancho, 4 m de largo y 2 m de alto.

4.4. DISEÑO EXPERIMENTAL.

El diseño experimental utilizado fue el de bloques al azar con 4 tratamientos y tres repeticiones.

4.5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.

En la realización de la colecta de plantas de alfalfa se eligieron tres lugares establecidos con la misma, tomando en cuenta el tipo de agua empleada para su riego (en el caso de Zumpango el riego es realizado con aguas negras, en Tepozotlán el riego es con aguas grises y para Cuautitlán el agua empleada es blanca), de estos lugares se escogieron cinco plantas al azar por parcela, sin importar la edad del cultivo y tomando en cuenta que el mismo estuviera recién cortado, para evitar el maltrato de las plantas durante su transporte. También fue muestreado suelo, a una profundidad de 0-20cm, para llenar macetas de 1 kg.

Las plantas muestreadas fueron sacadas con suelo para evitar la desecación de los nódulos durante el transporte, una vez en el laboratorio se prosedió a eliminar el suelo de las raíces y posteriormente se separaron los nódulos para ser enjuagados con agua corriente para ser depositados en un tubo de ensayo con agua estéril y destilada por espacio de 5 minutos; pasado este período se procedió a desinfectar los nódulos con una solución de etanol. En laboratorio se trabajó en cajas con medio agar rojo congo* se

exprimieron los nódulos más grandes y rojizos con pinzas estériles, incubándose a 30°C hasta observar el desarrollo total de las colonias, después se aislaron las colonias características de este grupo, volviéndose a sembrar para obtener una cepa sin contaminantes.

* Medio base del cultivo.

COMPOSICIÓN	CONCENTRACIÓN	(g/l)
- cloruro de sodio	0.26	0.078
- cloruro férrico	0.1	0.03
- extracto de levadura	1.0	0.3
- sulfato de magnesio	0.76	0.23
- fosfato de potasio	1.66	0.5
- manitol	10.00	3
- rojo congo		2ml
- agar		0.5

El experimento se realizó en macetas a nivel de invernadero, empleando suelo y cepas de diferente procedencia (FES-Cuautitlán, Tepozotlán y Zumpango) que fueron evaluados en cuatro tratamientos (suelo esterilizado e inoculado con unicepa, suelo no esterilizado e inoculado con unicepa, suelo esterilizado e inoculado con multicepa y suelo no esterilizado y no inoculado), y cada tratamiento contó con cinco repeticiones (60 macetas con 4 plantas cada una), estos datos fueron analizados con un arreglo estadístico completamente al azar.

Los suelos muestreados se secaron al aire y tamizaron en una criba, posteriormente en estufa se esterilizó a una presión de 15 libras durante 30 min. Al mismo tiempo se prepararon 60 macetas de 1 kg, cada una en bolsas de polietileno negro sin perforar, con objeto de controlar el nivel de humedad a través de su peso.

La siembra con alfalfa (variedad Valencia) se realizó el 5 de julio de 1993, depositándose 30 semillas por maceta (previamente inoculadas con 3 ml de Rhizobium), realizándose el riego cada tercer día, suministrando 200 ml de agua destilada y esterilizada por maceta en un principio y después se regó con 100 ml de agua corriente. El deshierbe de las macetas fue manualmente durante todo el experimento y se rotaban ocasionalmente para evitar el efecto de invernadero, al presentarse una germinación del 90% se comenzó a ralear hasta dejar 4 plantas por maceta.

Las plantas sufrieron un ataque débil de mosquita blanca debido al exceso de humedad, siendo combatida con Malatión a una solución de 2 ml por litro de agua.

El experimento duró 80 días, realizándose cuatro cortes con intervalos de 20 días cada uno, donde sólo se evaluaron los tres últimos (2/sep/93, 21/sep/93 y 14/oct/93). El segundo corte de forraje no fue evaluado debido a que todos los tratamientos

sufrieron una inundación provocada por la entrada de agua de lluvia en la cubierta plástica donde se mantuvo el experimento, lo que originó exceso de humedad en las macetas, pérdida de suelo, enlameamiento del suelo y amarillamiento de la planta. El primer y tercer corte fueron pesados en húmedo, después secados en una estufa con aire caliente a 55°C durante 48 hrs y pesados nuevamente para evaluar el rendimiento de materia seca.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1.- EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS EXPERIMENTADO SOBRE EL CRECIMIENTO DE BIOMASA AÉREA Y SUBTERRANEA EN LA PLANTA DE ALFALFA.

En el Cuadro 1 se presenta los datos obtenidos del efecto del tratamiento sobre la producción de biomasa seca aérea evaluada durante el primer (COR1S) y tercer corte (COR3S).

Los datos encontrados muestran la existencia de diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los tratamientos estudiados, donde las medias de COR1S fueron de 0.23, 0.58, 0.31 y 0.55g para los tratamientos testigo (T), inoculado esterilizado (I/E), inoculado no esterilizado (I/NE) y multicepa esterilizado (M/E) respectivamente, en tanto que para COR3S se encontró también diferencia estadística ($P < 0.05$), siendo los valores medios de 0.43, 0.60, 0.56 y 0.55g para los tratamientos T, I/E, I/NE y M/E respectivamente.

Durante el primer corte la diferencia de biomasa aérea entre el testigo e I/NE fueron del 34.7% no siendo significativos a ($P > 0.05$), mientras que en el tercer corte esta diferencia entre los mismos tratamientos fue de 30.2% y significativos ($P < 0.05$), lo cual indica que la esterilización en los tratamientos dio cierto grado de estabilidad en la producción de biomasa.

Cuadro 1. Producción de forraje seco en alfalfa para los tratamientos experimentados.

	T R A T A M I E N T O				
	1	2	3	4	ee*
	T	I/E	I/NE	M/E	
COR1S	0.23 a	0.58 b	0.31 a	0.55 b	0.027
COR3S	0.43 a	0.60 b	0.56 b	0.55 b	0.019

a Tratamientos no significativos

b Tratamientos significativos

* Error estándar de la media

En el Cuadro 2 se presenta las medias correspondientes al Tamaño de Raíz (TRAIZ), Número de Nódulos (NNOD) y Peso Seco de Raíz (PSRAIZ) para los diferentes tratamientos empleados.

El resultado de la evaluación del TRAIZ indica la existe de diferencia estadística ($P < 0.05$) donde las medias son de 15.64, 19.61, 14.06 y 19.13cm para los tratamientos T, I/E, I/NE y M/E respectivamente, los resultados del NNOD señalan diferencias significativas ($P < 0.05$), con medias de 38, 58, 33 y 57 para los tratamientos T, I/E, I/NE y M/E respectivamente y en PSRAIZ se determinó también diferencia significativa ($P < 0.05$) con valores medios de 0.13, 0.15, 0.13 y 0.17g para T, I/E, I/NE y M/E respectivamente.

Cuadro 2. Efecto de los tratamientos sobre la parte subterránea de la planta de alfalfa.

	TRATAMIENTO				
	1	2	3	4	ee*
	T	I/E	I/NE	M/E	
TRAIZ	15.64 a	19.61 b	14.06 a	19.13 b	0.353
NNOD	38 a	58 b	33 a	57 b	2.154
PSRAIZ	0.13 a	0.15 a	0.13 a	0.17 b	0.004

a Tratamientos no significativos

b Tratamientos significativos

* error estándar de la media

En los resultados obtenidos de ambos cuadros se puede apreciar que los tratamientos inoculados (inoculado esterilizados e inoculado con multicepa esterilizado) favorecieron el desarrollo vegetativo de la planta por ello se obtuvieron promedios superiores de biomasa aérea y subterránea con respecto al testigo, además mantuvieron su nivel de producción durante todo el experimento, esta diferencia fue inexistente en el primer período, debido a la variabilidad originada por la competencia cepas y patógenos del suelo, siendo esto apoyado por otros autores, donde reportan que las raíces no son noduladas por la cepa de Rhizobium inoculada en la semilla,

sino por cepas nativas menos eficientes en la fijación de nitrógeno, pero mejor adaptadas al suelo (Holland, 1966; Kapusta 1973; Quispel 1974; Franco 1976; Obaton 1977; Kuykendall 1978; citados por FAO, 1983; Bromfield et.al., 1986 citado por Vega, 1990).

Los tratamientos al ser inoculados aumentaron sustancialmente los niveles de bacterias fijadoras en la rizosfera, que se considera como uno de los factores limitantes para el establecimiento de la simbiosis (Johnson 1965; Bohlool 1973; Kapusta 1973; Kuykendall 1978 citados por FAO, 1983), promoviendo así la fijación del nitrógeno atmosférico en forma utilizable para la planta, lo cual es coincidente con lo reportado por Davison (1978), en relación a que una mayor disponibilidad de nitrógeno afecta el patrón de distribución de la fotosíntesis y como consecuencia el desarrollo de la parte aérea, sin embargo en algunos casos se ha reportado que la cepa introducida induce la formación de la mayoría de los nódulos en el primer año, pero desaparecen progresivamente, siendo reemplazada por las rizobias nativas en años sucesivos (Roughley et.al. 1976; Dudman y Brockwell 1968; Jensen y Strijdom, 1982; citados por Vega, 1990).

El efecto de la esterilización en suelo benefició el crecimiento de la planta, por la eliminación de agentes patógenos y competidores,

que llegó a suprimir al microsimbionte deseado y evitar la iniciación de la infección, de esta manera se proporcionó así las condiciones para el desarrollo de la planta y el Rhizobium. lo que brindó las facilidades para infectar las raíces y provocar un mejor desarrollo del TRAIZ, NNOD y PSRAIZ, siendo similar a lo reportado por Daubenmire (1968), citado por Vega (1990).

Dentro de los organismos competidores o fitopatógenos que pudieron haber sido eliminados en un principio por la esterilización del suelo se encuentran el hongo Phytophthora megaspermae causante de la pudrición de la raíz en la alfalfa, las cepas de Bdellovibrio que atacan organismos de los nódulos de las raíces, (Tu 1978 citado por Sprent 1990), bacteriofagos a la que las especies de Rhizobium son susceptibles de ataque y lisis (Alexander, 1980), la Sitona waevil larvae, la cual se como los nódulos de la alfalfa e incrementa su número por la presencia de los mismos (Sprent, 1990), así como la competencia con rizobias nativas que están mejor adaptadas al medio.

Finalmente, por medio del tratamiento testigo se comprobó la existencia de cepas nativas en los suelos estudiados, por la nodulación presentada, ello es comprensible, dado que en las parcelas muestreadas ya se encontraba establecido el cultivo de alfalfa, y las plantas recolectadas presentaban nodulación, lo que

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

indicó la presencia de Rhizobium nativo en el suelo durante el momento del muestreo.

5.2.- EFECTO DEL TIPO DE SUELO SOBRE EL CRECIMIENTO DE BIOMASA AÉREA Y SUBTERRANEA EN LA PLANTA DE ALPALFA.

El Cuadro 3 presenta los datos obtenidos del primer y tercer corte de biomasa aérea (COR1S, COR3S) para los suelos considerados en el experimento, así como una sumatoria en cada suelo de la biomasa desarrollada. El resultado del primer corte indica la inexistencia de diferencias ($P=0.08$), con medias de 0.38, 0.40 y 0.46g para los suelos FES-Cuautitlán (FES), Tepozotlán (TEPO) y Zumpango (ZUMP) respectivamente, los resultados del tercer corte muestran diferencia significativa ($P<0.05$) con medias de 0.48, 0.57 y 0.55g en los suelos de FES, TEPO y ZUMP respectivamente.

La diferencia antes mencionada se presentó en el suelo de TEPO con una media de 57g, mientras que los suelos de FES y ZUMP no difirieron entre sí, sin embargo, el total de biomasa aérea indica que ZUMP presenta la mejor producción, en comparación con los otros suelos.

Cuadro 3. Producción de biomasa aérea evaluando la variable suelo.

	S U E L O			
	1	2	3	ee*
	FES	TEPO	ZUMP	
COR1S	0.38 a	0.40 a	0.46 a	0.027
COR3S	0.48 a	0.57 b	0.55 a	0.019
TOTAL	0.86	0.97	1.01	

- a Tratamientos no significativos
- b Tratamientos significativo
- * error estándar de la media

El Cuadro 4 presenta los promedios del Tamaño de la Raíz (**TRAIZ**), Número de Nódulos (**NNOD**) y el Peso Seco de biomasa de raíz (**PSRAIZ**) para la variable suelo considerada en el experimento.

El resultado de la evaluación del **TRAIZ** indica la existencia de diferencia ($P < 0.05$) con medias de 17, 16 y 18cm para FES, TEPO y ZUMP respectivamente, los resultados del **NNOD** también mostraron diferencia significativa ($P < 0.05$) con medias de 44, 40 y 55 en los suelos FES, TEPO, y ZUMP respectivamente, mientras que los datos de **PSRAIZ** no mostraron diferencia significativa ($p > 0.07$), siendo las medias de 0.14, 0.15 y 0.15g para los suelos de FES, TEPO y ZUMP respectivamente.

En el cuadro 4 se aprecia que el suelo de ZUMP registraron valores significativos para el TRAIZ y NNOD, sin embargo, se esperaba que la media de PSRAIZ también fuera significativa, lo que no ocurrió así, debido al manejo dado a la raíz durante el lavado para su medición, donde se perdieron innumerables raicillas que quedaron incrustadas en el suelo.

Cuadro 4. Efecto del suelo sobre la biomasa subterránea de la planta de alfalfa.

	S U E L O			
	1	2	3	ee*
	FES	TEPO	ZUMP	
TRAIZ	17 a	16 a	18 b	0.353
NNOD	44 a	40 a	55 b	2.154
PSRAIZ	0.14 a	0.15 a	0.15 a	0.004

- a Tratamientos no significativos
- b Tratamientos significativos
- * error estándar de la media

Analizando los datos recabados se determinó que "estadísticamente" el suelo de TEPO produjo mejores resultados en cuanto a desarrollo de biomasa aérea se refiere, sin embargo y a pesar que ZUMP no presentó resultados estadísticamente significativos desarrollo

17.4% más biomasa aérea que FES, así mismo TEPO produjo 12.7% más forraje que en FES, lo anterior se explica tomando en cuenta que los suelos son parecidos en su fertilidad por la similitud geológica y edafológica que tienen, según FAO Detenal (S.P.P. 1981), por ello las diferencias encontradas en los tratamientos no es debido a las características del suelo, si no a la fertilidad originada por el manejo del mismo, ya que el agua empleada para el riego del cultivo de alfalfa en los suelos de FES y TEPO sufre un tratamiento antes de ser distribuida en los canales de riego, lo que no ocurre con el agua de riego en ZUMP, que emplea directamente aguas negras, lo que origina mayor fertilidad en el suelo por la acumulación de materia orgánica (MO) aportada durante el riego de las parcelas.

VI. CONCLUSIONES.

Los tratamientos de inoculación con Rhizobium afectaron positivamente el crecimiento de la planta de alfalfa, llegando a producir más del 30% de biomasa aérea en comparación con el testigo, es decir que con sólo la inoculación se mejoró el desarrollo de la planta debido a la disponibilidad temprana de bacterias que promovieron la fijación de nitrógeno atmosférico, afectando así el patrón de distribución de fotosíntesis y como consecuencia el desarrollo de la biomasa aérea. Por otra parte, aunque los tratamientos inoculado no esterilizado y testigo no mostraron resultados sobresalientes, incrementaron notablemente el desarrollo de biomasa aérea en el último corte, debido a la presencia de Rhizobium nativo en el suelo, el cual tiene la característica de estar adaptado a las condiciones de su medio ambiente y la presencia de la cepa nativa en el suelo se comprobó por la nodulación presentada en los tratamientos no inoculados.

El efecto de la inoculación se mejoró indiscutiblemente con la esterilización del suelo, lo que proporcionó cierto grado de estabilidad en la producción de biomasa aérea durante todo el experimento, de esta forma el tratamiento inoculado-esterilizado mostró los mejores resultados de la investigación, por que con la esterilización se redujo durante el inicio de la investigación los agentes patógenos y competidores de la cepa inoculada inoculada lo que promovió el crecimiento del tamaño de raíz, número de nódulos y biomasa seca de raíz.

En lo que respecta a los tratamientos inoculado-esterilizado y multicepa-esterilizado se determinó que no existe diferencia entre ellos y ambos mostraron mejor desarrollo que el testigo.

El efecto del suelo que se presentó en el experimento, mostró que el suelo de Tepozotlán durante el tercer corte consiguió una producción de biomasa aérea estadísticamente significativa, en tanto que para el tamaño de raíz y número de nódulos los valores significativos se presentaron en el suelo de Zumpango, a pesar de que en este último suelo no obtuvo valores significativos en el crecimiento aéreo desarrollo un total de 17.4% y 12.7% más biomasa que los suelos de Tepozotlán y FES respectivamente, ello debido al riego con aguas negras empleado en la zona de Zumpango, que origina mayor fertilidad por la acumulación de materia orgánica aportada durante el riego de las parcelas.

BIBLIOGRAFÍA

Anaya A. y Ramos L. 1987. Perspectives on allelopathy in Mexican Traditional Agroecosystems: A case study in Tlaxcala
J. Chem Ecol. vol. 13, No. 11, p. 2083-2102.

Aguilera, M.R.G. 1974. Evaluación del efecto simbiótico de 14 cepas de Rhizobium phaseoli en tres variedades mejoradas de frijol negro de Guatemala. Tesis Profesional. Facultad de Agronomía. Universidad de San Carlos, Guatemala.

Agrios, G. 1988. Plant Pathology 3era edition, Ed. Academic Press, INC. San Diego california E.U. p.p. 546.

Alexander, M. 1980. Introducción a la microbiología del suelo. Ed. AGT. Editor S.A., México, p.p. 327-351.

Alexander, M. 1984. Biological nitrogen fixation, ecology, technology and physiology. Ed Plenum Press, Nuw York, pp. 247.

Barlandas, R.H. 1985. Evaluación de la inoculación de cinco variedades de soya (*Glycine max* L.) en el área de Zumpango del Río, Edo. de Queretaro. Tasis Ing. Agrícola, FES-Cuautitlán, Cuautitlán Izcalli, México.

Bolton, J.L. 1962. Alfalfa. Botany, cultivation and utilization, Interscience Publ. Inc. New York. 29

Brady, N.C. Y Buckman, H.O. 1977. Naturaleza y propiedades de los suelos. Montaner y Simon, S.A. Barcelona, 2a. edición.

Brokwell, J., Dudman, W.F., Gibson, A.H., Heley, F.W. y Robinson, A.C. 1968. An integrated programme for the improvement of legume inoculant strains. Trans. of the 9th Int. Congress of Soil Science. Adelaide.

Brokwell, J. et.al., 1975. Use of wild soybean (*Glycine ussuriensis* Regal and Maack) as test plant in dilution nodulation frequency test for counting *Rhizobium japonicum*. Soil Biol. Biochem. 7.

Bral, A.K., Shantharam, S. and Verma, D.P.S. 1980. Changes in the outer cell wall of *Rhizobium* during development of root nodule symbiosis in soybean. Can. J. Microbiol. 26. p. 1096-1103.

Brill, J. W. 1975. Regulation and genetics of bacterial nitrogen fixation. Ann. Review of Microbiology. vol. 29, p. 109-129.

- Brock, D.T. 1978. *Biología de los Microorganismos* 2a. Ed. Omega, S.A. Barcelona, España.
- Carlsson, B.J. 1973. *Soybeans. Improvement, production and uses.* American Society of Agronomy Inc., Agronomy Num. 16. Edited by Caldwell, E.B. Publisher Madison. Wisconsin, U.S.A.
- Cassman, K.G., Whitney, A.S. and Stockinger, K.F. 1980. *Root Growth and Dry Matter Distribution of Soybean as affected by Phosphorus Stress, Nodulation and Nitrogen Source.* Crop. Sc. 20. p. 239-243.
- Cazares, G.R. 1988. *Evaluación del estado nutricional de los alfalfares del estado de México.* Tesis de M.C. especialista en edafología. Colegio de Posgraduados, Chapingo, México.
- Date, R.A. 1970. *Microbiological problems in the inoculation and nodulation of legumes. Plant and soil.*
- Date, R.A. 1976. *Especificidad de la Simbiosis Rhizobium leguminosa VIII RELAR, Cali, Colombia.*
- Davison, R.L. 1978. *Root system -The forgotten components of pasture.* En J.R. Wilson (Ed) *Plant Relations in Pastures.* CSIRO. Melbourne. p.p. 86-94.

Dawson, C.R. 1970. Potential for increasing protein production by legume inoculation. Plant and soil, 32.

Day, M.J. 1976. Influencia de los factores ambientales en la fijación de nitrógeno por las leguminosas. VIII RELAR. Cali, Colombia.

Del Pozo, I.M. 1983. La alfalfa su cultivo y aprovechamiento, tercera edición, Ed. Mundi-Prensa, España, Madrid. pp. 23-66.

FAO, 1983. El reciclaje de materias orgánicas en la agricultura de America Latina, Roma, Italia.

FAO, 1985. La fijación del nitrógeno en la explotación de suelos. Boletín de suelos de la FAO., Roma, pp.188.

Franco, A.A. y Dobereiner, J. 1967. Especificidade hospedeiro no simbiose com Rhizobium-Feijao e influencia de diferentes nutrientes. Pes. Agropec. Brasil 2.

Galomo, R.T. 1978. Respuesta de la inoculación y fertilización en cuatro variedades de frijol Phaseolus vulgaris L. en la Región de la Chontalpa , Tabasco.

García, M.Y. 1993. Evaluación de una cepa de Rhizobium en cultivos de Lotus corniculatus. Tesis Licenciatura, Química Farmacéutica Bióloga, FES-C. Edo. de México.

Gómez, L.J. 1983. Susustitutos de la fertilización. Universidad Nacional de Colombia, vol. 1 no.1 pp. 35-41.

Graham, P.H. 1976. Problemas de la nodulación de las leguminosas VIII RELAR. Cali, Colombia.

Graham, P.H. y Halliday, J. 1977. Inoculation and nitrogen fixation in the genus Phaseolus. In exploiting the Legume-Rhizobium Symbiosis in tropical agriculture. Ed. J.M. Vincent University of Hawaii. Colege of Tropical Agriculture Publis.

Graham, P.H. 1984. Plant factors affecting nodulation and symbiotic nitrogen fixation in legumes. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali Colombia.

Gross, A. 1976. Abonos. Guía Práctica de la fertilización. 6a. edición. Ediciones Mundi-Prensa.

Hinson, K. y Hartwing, E.E. 1978. Nutrición de nitrógeno e inoculación. Producción y Protección Vegetal. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma. p. 52-59.

Hotter, G.S. 1991. Exopolysaccharide mutants of Rhizobium loti are fully efective on a determinate nodulating host but are ineffective on indeterminate nodulating host. J. Bacteriol. vol. 173 No. 2 p. 851-859.

- Huges, H.D. 1978. Forrajes, Edit Española, México, p.p. 143-150.
- Hughes, T.A. And Elkan, G.H. 1981. Study of Rhizobium Japonicum Soybean Symbiosis. Plant and Soil. 61. p.87-91.
- Islam, H. 1987. Effect of different Rhizobium inoculants on soybean. J. Agriculture. vol. 12. No. 2 p. 129-137.
- Janseen, K.A. 1972. Effect of Physical and nutritional Factors of the Enviroment on nitrogen fixation. Plant Composition and yeald of dark Kidnay beans (Phaseolus vulgaris L.) Ph, D. Thesis. Michigan State University. East Lansing.
- Ko, Y. and Ganda R. 1990. Nodule Formation in soybeans by Espolysaccharide Mutants of Rhizobium fredii USDA. Gen Microbiol. vol. 136. No.1 p. 105-113.
- Lie, T.A. 1981. T.A. 1981. Environmenral Physiology of the Legumen-Rhizobium symbiosis. In nitrogen Fixation Vol. 1. Ecology. W.j. Broughton ed. Oxford University Press. 15 BNO-19-8545-40-1.
- Munévar, F. and Wollum, A.G. 1981. Effect of high root temperature and Rhizobium strain on nodulation, nitrogen fixation and growth of soybeans. Soil Sci. Soc. Am. J. 45. p. 1113-1119.

Nelson, W.L., S.A. Barber. 1964. Nutrient deficiencies in legumes for grain and forage, In H.B. Sprague (ed.). Hunger signs in crops. Third edition. David Mckay Compy. pp. 143-169.

Parke, D. 1991. Regulation of Phenolic Catabolism in R. leguminosarum bv trifoli. J. Bacteriol. 173: 5546-5550.

Pearson, R.W., C.S. Hoveland, 1974. Lime needs of forage cops. In. D. A. Mays, ed.) Forage fertilization. Amer.Soc. Agron. Madison. Wisconsin. pp. 301-322.

Postgate, J. 1987. Nitrogen fixation, second edition, Ed. Edward Arnold, Maryland, USA. p.p. 41-52, 64-67.

Raper, C.D. Jr., and Patterson, R.P. 1980. Environmental sensitivity of acetylene reduction activity in prediction of N fixation in Soybeans. Agronomy Journal 72, p. 717-719.

Rathore, T.R. Chonkar, P.K. Sachan, R.S. and Ghildayl, B.P. 1981. Effect of soil moisture stress on legume Rhizobium symbiosis in soybeans. Plant and soil 60. p. 445-450.

Rhykerd, C.L. , C.j. Overdahl. 1972. Nutrition and fertilizer use. In C.H. Hanson (ed.) Alfalfa science and tecnology. Amer. Soc. Agron. Agronomy 15. madison, Wisconsin. pp. 437-468.

Reginensi, R.S. 1992. Producción de inoculante para leguminosas usando como soporte bagacillo de caña de azúcar, Tesis M.C. (Area Microbiología), FES-Cuautitlán UNAM.

Romero, D. 1991. Amplification and Delection of a Nod-Nif region in the symbiotic plasmid of R. phaseoli. J. Bacteriol. 173: 2435-2441.

Sanchez, E.S. 1988. Nitrogen Source Control of Microbial Processes, Ed. CRC. Press, Florida. pp. 1-20.

Sargent. L. 1987. Split-Root Using Trifolium Subterraneum Show that Rhizobium Infection Induces a Systematic Response that can Inhibit Nodulation of Another Invasive Rhizobium Strains. Appl. Environ. Microbiol. 53: 1611-1619.

Sprent, I.J. 1990. Nitrogen Fixin Organisms, Ed. Chapman and Hall, New York, USA. p.p. 30-54; 92- 121.

Srhoder, E.C. 1970. Métodos de selección de cepas de Rhizobium trifolii (Dangeard) para Trifolium subterraneum L.CV. Baccus Marsh. I. Ensayos de laboratorio V. Reunión Latinoamericana de Rhizobium, Río de Janeiro, Brasil.

Trujillo, G.G. 1976. Perspectivas de la inoculación de leguminosas de grano en México. Resúmenes de la VIII. RELAR, Cali, Colombia.

Trujillo, G.G. 1981. Producción de inoculantes en México. Memoria del IV Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo, Tomo II. S.L.P.

Turgeon, G.B. y Bauer, D.W. 1982. Early Events in the infection of soybean by Rhizobium japonicum. Time Course and Cytology of the initial infection. Process. Co. Bot. vol. 60.

Vargas, S.R. 1957. Abonamiento e inoculación en el cultivo del frijol . Informe mensual La Molina 32 (372).

Vásquez, G.M. 1986 Efectos de diferentes dosis de fertilización fosfatada sobre la nodulación, fijación de nitrógeno y rendimiento de dos variedades de frijol (Phaseolus vulgaris L.) en San Mateo Tequixquiac, Edo. de México, Tesis Ing. Agrícola FES-C, UNAM, México.

Vega, M. 1990. Estudio de competencia de diferentes cepas de Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli provenientes de zonas áridas de México. Tesis de Lic. Biología, UNAM-Zaragoza.

Viertanen, A.I. 1939. Mecanismo de la fijación del nitrógeno simbiótico por las leguminosas, Proc. Soil. Sci. Soc. Soc. Amer. 4.

Walter, G.M., Mebee, H.R. and Temple, L.K. 1984. Introducción a la microbiología. Ed. Compañía Editorial Continental, S.A. de C.V., México.

Young J. & Wexler M. 1988. Sys Plasmids and Chromosomal Genotypes are Correlated in Field Populations of Rhizobium Leguminosarum. J. Gen. Microbiol. 134: 2731-2739.