

# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

---

FACULTAD DE AGRONOMIA



“ EFICIENCIA DE SIMBIOSIS MEDIANTE APORTACION DE  
NITROGENO DE TRES LEGUMINOSAS EN ZAPOPAN, JALISCO. ”

---

## TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

INGENIERO AGRONOMO

P R E S E N T A N:

LILY                      GONZALEZ                      CASTILLO

OMAR SALOMON MACIAS CONTRERAS

Las Agujas Mpio. de Zapopan, Jal. Agosto 1993

---



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA  
FACULTAD DE AGRONOMIA

SECCION ESCOLARIDAD

EXPEDIENTE \_\_\_\_\_

NUMERO 1571/92

16 de Diciembre de 1992.

C. PROFESORES:

ING. SANTIAGO SANCHEZ PRECIADO, DIRECTOR  
QFB. MARIA ELENA VILLASEÑOR DE ZARAZUA, ASESOR  
ING. JOSE SANCHEZ MARTINEZ, ASESOR

Con toda atención me permito hacer de su conocimiento, que habiendo sido aprobado el Tema de Tesis:

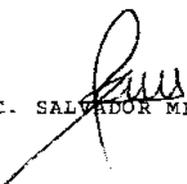
" EFICIENCIA DE SIMBIOSIS MEDIANTE APORTACION  
DE NITROGENO DE TRES LEGUMINOSAS EN ZAPOPAN  
JALISCO."

presentado por el (los) PASANTE (ES) LILY GONZALEZ CASTILLO  
OMAR SALOMON MACIAS CONTRERAS

han sido ustedes designados Director y Asesores, respectivamente, para el desarrollo de la misma.

Ruego a ustedes se sirvan hacer del conocimiento de esta Dirección su Dictamen en la revisión de la mencionada Tesis. Entre tanto, me es grato reiterarles las seguridades de mi atenta y distinguida consideración.

ATENTAMENTE  
"PIENSA Y TRABAJA"  
"AÑO DEL BICENTENARIO"  
EL SECRETARIO

  
M.C. SALVADOR MENA MUNGUÍA

mam

ryr



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**  
FACULTAD DE AGRONOMIA

Sección **ESCOLARIDAD**

Expediente .....

Número ... 1571/92 .....

16 de Diciembre de 1992.

ING. JOSE ANTONIO SANDOVAL MADRIGAL  
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA  
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA  
PRESENTE

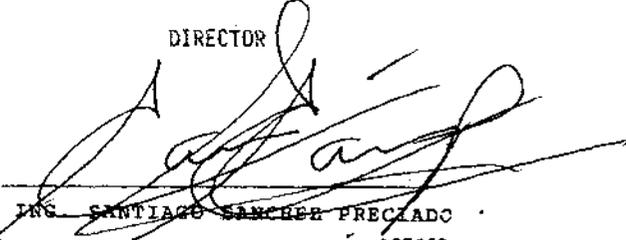
Habiendo sido revisada la Tesis del (los) Pasante (es)  
LILY GONZALEZ CASTILLO, OMAR SALOMON MACIAS CONTRERAS

titulada:

" EFICIENCIA DE SIMBIOSIS MEDIANTE APORTACION  
DE NITROGENO DE TRES LEGUMINOSAS EN ZAPOPAN  
JALISCO."

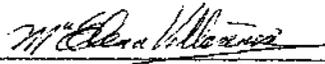
Damos nuestra Aprobación para la Impresión de la misma.

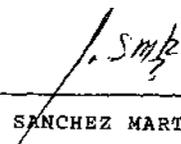
DIRECTOR

  
ING. SANTIAGO SANCHEZ PRECIADO

ASESOR

ASESOR

  
QFB. MARIA ELENA VILLASEÑOR

  
ING. JOSE SANCHEZ MARTINEZ

srd'

RYR

Al contestar este oficio cifrese fecha y número

## AGRADECIMIENTOS

Al M.C. SANTIAGO SANCHEZ PRECIADO, por su sugerencia en la elaboración, dirección y realización de este trabajo de tesis.

Al ING. JOSE SANCHEZ MARTINEZ, por su asesoría y disposición hacia nuestras personas.

A la Q.F.B. MA. ELENA VILLASEÑOR DE ZARAZUA, por sus conocimientos y experiencia, impartidos en nuestra carrera profesional.

Al M.C. SALVADOR MENA MUNGUIA, por su cooperación.

A nuestra UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA, por sus conocimientos impartidos.

Y con principal afecto, a la FACULTAD DE AGRONOMIA.

A nuestros COMPAÑEROS DE GENERACION 1987-1992.

## DEDICATORIAS

Damos gracias a nuestros Padres:

MA. ESTHER CONTRERAS LOPEZ

JOSE MACIAS ZEPEDA

CECILIA CASTILLO RODRIGUEZ

por el apoyo recibido, incondicionalmente,  
en nuestra carrera.

A nuestros Hermanos:

JOSE ULISES MACIAS CONTRERAS

LETICIA GONZALEZ CASTILLO

para que ésto sirva de estímulo, para futuras  
generaciones familiares.

Así como también a personas que colaboraron  
estrechamente con nosotros, con apoyo en  
todos los aspectos. En especial y con gran cariño a

SAMUEL SOLORZANO MENDOZA

Y a todas aquellas personas que colaboraron con  
este proyecto.

Gracias.

# I N D I C E

	Pág.
LISTA DE CUADROS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
RESUMEN.....	iii
1 INTRODUCCION.....	1
1.1 Objetivos.....	4
1.2 Hipótesis.....	4
2 REVISION DE LITERATURA.....	6
2.1 Fijación Biológica del Nitrógeno.....	6
2.1.1 fijación simbiótica del Nitrógeno.....	8
2.1.1.1 ciclo bioquímico del Nitrógeno.....	9
2.1.1.2 bacterias nitrantes saprófitas y simbióticas.....	9
2.1.2 nutrición mineral de la simbiosis.....	12
2.1.2.1 acidez, Calcio, Aluminio y Manganeso....	12
2.1.2.2 Fósforo, Azufre y Potasio.....	13
2.2 Nodulación.....	14
2.2.1 infección de pelos radiculares.....	15
2.2.2 problemas de la nodulación y la fijación de Nitrógeno.....	15
2.2.2.1 variación genética en la capacidad para fijar Nitrógeno.....	16
2.2.2.2 factores edáficos y agronómicos que limitan la nodulación y la fijación de N <sub>2</sub> ...	18
2.2.2.3 Fósforo.....	20
2.2.3 tipos y distribución de nódulos.....	21
2.2.4 color de nódulos.....	22
2.2.5 examen de nódulos.....	23
2.2.5.1 evaluación de la nodulación y fijación de Nitrógeno.....	24
2.2.5.1.1 control bacteriológico.....	24
2.2.5.1.2 control del medio ambiente....	25
2.2.5.1.3 escala de pruebas.....	25
2.2.5.1.4 oportunidad de una observación progresiva de la formación nódulos.....	26
2.3 Rhizobium.....	27
2.3.1 taxonomía.....	28
2.3.2 especies y cepas.....	28
2.3.3 agrupamiento por efectividad.....	29
2.4 Determinación de la Necesidad de Inoculación.....	33
2.4.1 prueba de campo.....	33
2.4.1.1 objetivo de la inoculación.....	34

2.4.2	métodos de inoculación.....	34
2.4.2.1	métodos de aplicación de inoculantes para semillas.....	35
2.4.2.1.1	método seco.....	36
2.4.2.1.2	peleteado con carbonato de Calcio.....	36
2.4.2.1.3	peleteado con inoculante.....	37
2.4.2.1.4	semilla recubierta.....	38
2.4.2.1.5	semilla preinoculada.....	39
2.5	Inoculación del Suelo.....	39
2.6	Tipos de Inoculantes para Semillas.....	41
2.6.1	tipos de inoculante para el suelo.....	41
2.6.1.1	líquidos o congelados concentrados.....	41
2.6.1.2	gránulos inoculados.....	42
2.6.1.3	gránulos en turba normal.....	43
2.6.1.4	gránulos de yeso poroso.....	43
2.6.1.5	otros gránulos.....	44
2.7	Cualidades de un Inoculante Efectivo.....	44
2.8	Compatibilidad de los <i>Rhizobium</i> con pesticidas.....	46
2.8.1	efectos de los fungicidas.....	46
2.8.2	efecto de los insecticidas.....	48
3	MATERIALES Y METODOS.....	49
3.1	Características Agroclimatológicas de la Región.....	49
3.1.1	localización.....	49
3.1.2	localización del sitio experimental.....	49
3.1.3	clima.....	50
3.1.3.1	precipitación.....	52
3.1.3.2	temperatura.....	52
3.1.4	suelo.....	53
3.2	Materiales.....	54
3.2.1	materiales físicos.....	54
3.2.2	material genético.....	55
3.3	Métodos.....	57
3.3.1	metodología experimental.....	57
3.3.1.1	diseño experimental.....	57
3.3.1.2	unidad experimental y parcela útil.....	58
3.3.1.3	distribución y trazo de las parcelas en campo.....	58
3.3.2	análisis estadístico.....	60
3.3.3	comparación de promedios.....	60
3.3.4	variables analizadas.....	60
3.4	Desarrollo del Experimento.....	60
3.4.1	preparación del terreno.....	60
3.4.2	preparación de la semilla.....	61
3.4.3	métodos y fecha de siembra.....	61
3.4.4	prácticas culturales.....	61
3.5	Control de Plagas.....	62
3.5.1	cosecha.....	62

	Pág.	
4	RESULTADOS	63
	4.1 Fijación de Nitrógeno.....	63
	4.1.1 muestreo en floración.....	63
	4.1.2 muestreo en llenado de vaina.....	64
	4.1.3 muestreo en madurez fisiológica de grano y vaina.....	64
5	DISCUSION.....	75
	5.1 Fijación de Nitrógeno.....	75
	5.1.1 muestreo en floración.....	75
	5.1.2 muestreo en llenado de vaina.....	76
	5.1.3 muestreo en madurez fisiológica.....	78
6	CONCLUSIONES.....	80
	6.1 Sugerencias.....	80
7	BIBLIOGRAFIA.....	82

## LISTA DE CUADROS

<u>No.</u>	<u>Descripción</u>	<u>Pág.</u>
1	Grupos de inoculación cruzada y asociaciones de <u>Rhizobium</u> -Leguminosas.	31
2	Especies de <u>Rhizobium</u> .	32
3	Características de las especies estudiadas.	56
4	Factores, niveles y tratamientos estudiados.	58
5	Resultados obtenidos en el primer muestreo del porcentaje de Nitrógeno, fijado en la floración del Verano del '92, - en Zapopan, Jal.	66
6	Análisis de varianza en el primer muestreo. Floración.	67
7	Comparación de medias de la variable A, en la fijación de Nitrógeno en el primer muestreo.	68
8	Comparación de medias de la variable B, en la fijación de Nitrógeno del primer muestreo en las cuatro fuentes de Nitrógeno.	68
9	Resultados obtenidos en el segundo muestreo del porcentaje de Nitrógeno, fijado en la fase de llenado de vaina, del - Verano del '92, en Zapopan, Jal.	69
10	Análisis de varianza en el segundo muestreo. Llenado de - vaina.	70
11	Comparación de medias de la variable A, fijación de Nitrógeno del segundo muestreo.	71
12	Comparación de medias de la variable B, fijación de Nitrógeno en el segundo muestreo de las cuatro fuentes de Nitrógeno.	71
13	Resultados obtenidos en el tercer muestreo del porcentaje de Nitrógeno fijado en la fase de madurez fisiológica en - el Verano del '92. Zapopan, Jal.	72

<u>No.</u>	<u>Descripción</u>	<u>Pág.</u>
14	Análisis de varianza en el tercer muestreo. Madurez fisiológica.	73
15	Comparación de medias de la variable A, en la fijación de Nitrógeno del tercer muestreo.	74
16	Comparación de medias de la variable B, en la fijación de Nitrógeno del tercer muestreo de las cuatro fuentes de Nitrógeno.	74

#### LISTA DE FIGURAS

1	Localización del sitio experimental.	51
2	Distribución de los tratamientos en campo.	59

## RESUMEN

Este trabajo de investigación se realizó en el Verano de 1992 en el valle de Zapopan, Jalisco, en los terrenos de la Facultad de Agronomía.

Se probaron tres especies de leguminosas: frijol (Phaseolus vulgaris), soya (Glycine max) y chícharo (Pisum sativum) y sus tres fuentes de Nitrógeno, como son: inoculante, fertilizante, Agromil y su respectivo testigo.

El objetivo principal, fue encontrar cuál de las tres especies fijaba más Nitrógeno y determinar en cuál había una mejor nodulación, de acuerdo a las condiciones climáticas y al tipo de suelo de la región del estudio.

Se condujo un experimento bifactorial con un diseño de bloques al azar y con un arreglo en parcelas divididas, teniendo como Factor A, especies de leguminosas; y al Factor B (fuentes de Nitrógeno), a las subparcelas. Los porcentajes fueron analizados estadísticamente y los promedios comparados por la prueba de Duncan.

Se muestreó en tres etapas de la planta, siendo éstas: en floración, llenado de vaina y madurez fisiológica de grano y vaina. Se observaron los nódulos efectivos e inefectivos.

Con estos datos se procedió a la preparación de las muestras, siguiendo el método Weende: se trituraron las muestras frescas, se les practicaron los cuarteos y ya reducidas las muestras al máximo; de inmediato se tomaron alrededor de 5.0 gr para determinar humedad. El resto de la muestra cuarteada se extendió en el laboratorio, sobre el periódico limpio para el secado al aire; enseguida se procedió a moler las muestras en molino Wildy. Se guardaron molidas en frascos de plástico con tapa, se etiquetaron y quedaron así todas, para proceder a la determinación de Nitrógeno total (el fijado y el no fijado).

La especie de leguminosa que mayor porcentaje de Nitrógeno aportó fue la soya. La nodulación no fue muy efectiva, debido a la acidez del suelo.

Por lo tanto, se sugiere el recubrimiento de semilla que es peleteado con carbonato de calcio o con roca fosfato, para que la acidez no perjudique a los Rhizobium en el proceso de infección de pelos radiculares.

## 1. INTRODUCCION

El frijol, el chícharo y la soya, pertenecen a la familia Leguminosae. Estas especies fijan el nitrógeno atmosférico por la presencia de bacterias simbióticas, principalmente del género Rhizobium.

Este proceso de fijación de Nitrógeno, consiste en la relación que existe entre Rhizobium y los pelos absorbentes de las raíces de las leguminosas. Tomando así el carbón de la planta y éste, a su vez, recibe el Nitrógeno que la bacteria ha logrado fijar para que llegue a realizar el proceso de simbiosis. Es necesario que la bacteria exista en el suelo, pero cuando no está disponible es necesario la inoculación de la semilla.

El Nitrógeno es el elemento indispensable, tanto para la vida vegetal como animal, ya que es el constituyente esencial de los tejidos. La deficiencia de ese elemento en los suelos se manifiesta en las plantas por un color amarillento en el follaje, los tallos se encuentran débiles y delgados y la producción es reducida. Manteniendo el nivel adecuado de Nitrógeno en los suelos, se conserva un buen nivel en su fertilidad.

Las pérdidas de Nitrógeno en el suelo se deben a

Las siguientes causas:

- a) La planta toma gran cantidad de este nutriente para alimentarse.
- b) Son grandes las pérdidas sufridas por el arrastre que hace el agua, ya sea de riego o por lluvia.
- c) Mucho Nitrógeno se queda inútil, debido a que las condiciones del suelo no son propicias para la descomposición de materia orgánica.

Haciendo un buen manejo del suelo se evita la pérdida del Nitrógeno y se conserva el equilibrio en el contenido de nutrientes (Sainz, 1974).

Las condiciones del clima y otros factores formadores del suelo en el Estado de Jalisco, son propicias para que se desarrolle la acidez; esta a su vez puede ser responsable de una baja disponibilidad de nutrientes, poca estabilidad de los agregados e inadecuada actividad microbiana.

La acidez del suelo es una propiedad adquirida por la pérdida de elementos básicos, como Calcio y Magnesio; lo cual es debido, entre otras cosas, por el lavado del suelo sujeto a la precipitación con buen drenaje.

Las ideas con respecto a la naturaleza del suelo, lo han ubicado como un cuerpo natural organizado, producto de las influencias constantes de los agentes ambientales como son: clima, organismos, topografía, material parental

y tiempo; los cuales al actuar en forma conjunta en un marco biogeográfico o ecológico, determinan sus características y propiedades en la amplitud comprendida por estos conceptos.

Los suelos del Valle de Zapopan tienen acidez y cuentan con poca materia orgánica.

De acuerdo con los estudios elaborados por el Instituto de Geografía y Estadística de la Universidad de Guadalajara, el Municipio se encuentra cubierto por suelos CHERNOZEM, en el cual se distinguen dos grupos:

- 1.- Corresponden a los suelos que se desarrollan bajo - condiciones insuficientes de humedad en clima extremo.
- 2.- Pertenecen a los suelos de región montañosa, que se desarrollan en condiciones de precipitación media.

Contando con estos tipos de problema en el Valle de Zapopan, aunado a la compactación del suelo y la aplicación inadecuada de compost y su mal manejo, sin separar antes desechos inorgánicos.

Por lo tanto, la condición del suelo no es propicia para la descomposición de materia orgánica.

Por consiguiente, queda mucho Nitrógeno inutilizado por esta mala disponibilidad.

Actualmente estos suelos han sido mejorados con

la aplicación directa de materia orgánica como son la adición de pollinaza y compost.

Por todo lo anterior, en el Valle de Zapopan cada día los suelos se han visto deteriorados por el mal manejo al que se han sometido, lo cual ha provocado una baja en la fertilidad, por lo que es necesario buscar otras opciones que permitan rehabilitar estos suelos (H. Ayuntamiento de Zapopan, Jalisco, 1992).

### 1.1 Objetivos

- 1.- Cuantificar la fijación de Nitrógeno en las especies de leguminosas estudiadas.
- 2.- Identificar cuál de los tratamientos evaluados tiene mayor formación de nódulos de Rhizobium.
- 3.- Detectar cuál de los tres cultivos aportan mayor porcentaje de Nitrógeno.
- 4.- Buscar el tratamiento de inoculación adecuado para cada cultivo.

### 1.2 Hipótesis

H<sub>0</sub>: Las especies estudiadas aportan la misma cantidad en promedio de Nitrógeno.

H<sub>A</sub>: Las especies estudiadas aportan una cantidad diferente,

## 2. REVISION DE LITERATURA

### 2.1 Fijación biológica del Nitrógeno

La fijación del Nitrógeno es una facultad reservada a unos cuantos géneros de bacterias (ciertas algas verdes). Ningún organismo superior desarrolla esta capacidad a pesar de que algunos participan independientemente mediante el establecimiento de asociación simbiótica con bacterias fijadoras de nitrógeno.

La relación mejor conocida de éstas, es la que se da entre plantas leguminosas y varias bacterias del género Rhizobium; otras bacterias viven asociadas con plantas huésped y muchas viven en el suelo o en el agua.

Unas son fotosintéticas, otras requieren Oxígeno y otras son anaerobias; pero todos estos organismos disfrutan al parecer de un mecanismo común para la fijación del Nitrógeno. El producto inicial es el amoniaco. Comparten además una enzima: la Nitrogenasa.

La asociación simbiótica entre leguminosas y las bacterias del género Rhizobium integran el sistema más complejo y desarrollan fijación biológica del Nitrógeno, pero no es el único, por ejemplo: el Aliso, que es una

especie maderera común en los Estados Unidos, contienen bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) en nódulos radicales parecidos a los de la leguminosa.

Otra simbiosis es la del helecho acuático Azolla, con una cianoficea, que se localiza en las frondas del helecho. Las cianofíceas suministran nutrimentos útiles al helecho y a la misma alga.

En Vietnam utilizan las propiedades de las algas, favoreciendo el crecimiento de Azolla entre los arrozales.

En el Instituto Agrícola de Brasil se descubrió otra simbiosis entre bacterias fijadoras de Nitrógeno, que vivían asociadas a las raíces de ciertas plantas (gramíneas).

El género Digitaria hospeda en su raíz a la bacteria fijadora del nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ), género Spirillum lipoferum (M.). Esta bacteria no forma nódulos en la raíz, sino que se localiza en la parte superior del maíz; también se descubrió en el maíz, porque éste podría crecer con menos fertilizantes nitrogenados.

Otra simbiosis más rara es la que se establece entre bacterias fijadoras de Nitrógeno que colonizan termes. Estos insectos xilófagos poseen microorganismos que segregan enzimas para la digestión de la celulosa. También poseen otras bacterias en el tubo digestivo, que son los que proporcionan el Nitrógeno Atmosférico ( $N_2$ ) en forma de

compuestos. (Revista de Investigación y Ciencia, 1977)

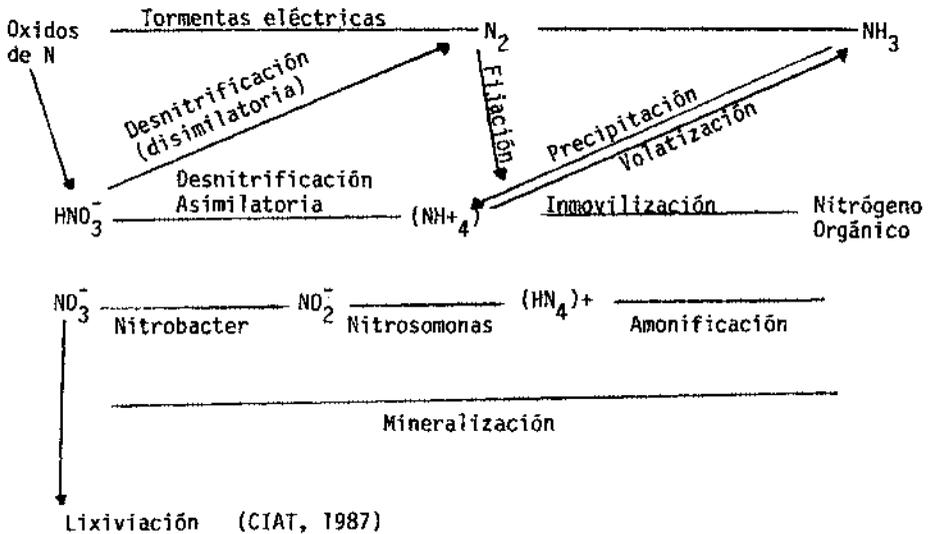
### 2.1.1 Fijación simbiótica del Nitrógeno

CIAT (1987) concluye que el ciclo bioquímico del Nitrógeno comprende una serie de procesos microbiológicos, químicos y físicos, en el cual ocurren varias transformaciones simultáneas y en diversos sentidos, en las que participan muchos compuestos orgánicos e inorgánicos volátiles.

En el proceso de fijación, el Nitrógeno atmosférico se encuentra en forma molecular ( $N_2$ ) y se reduce a la forma amoniacal por la intervención de ciertos microorganismos del suelo, ya sean simbióticas o de vida libre.

Este proceso de fijación constituye un aporte importante de Nitrógeno al suelo (CIAT, 1987).

### 2.1.1.1 ciclo bioquímico del Nitrógeno



### 2.1.1.2 bacterias nitrantes saprófitas y simbióticas

Rojas (1984) señala que en el suelo existen dos clases de bacterias relacionadas con el Nitrógeno y viven libremente, pero su característica es diferente; unas fijan Nitrógeno del aire, en tanto que otras solamente lo degradan al suelo.

## COMPARACION ENTRE LAS BACTERIAS NITRANTES Y NITRIFICANTES

BACTERIAS NITRANTES	BACTERIAS NITRIFICANTES
Género: <u>Azotobacter</u> y <u>Clostridium</u>	Género: <u>Nitrosomonas</u> , <u>nitrosococcus</u> y <u>nitrobacter</u>
Nutrición: Saprófitas	Nutrición: Quimiosintéticas
Actividad: Fijan $N_2$ del aire, no exigen N en el suelo. Utilizan hidratos de C en el suelo, para obtener energía.	Actividad: No fijan $N_2$ del aire, exigen N en el suelo y lo oxidan para obtener energía. No necesitan hidratos de C en el suelo.

Tanto Azotobacter como Clostridium viven libres en suelos de pH 5 a 6; Azotobacter es aerobia y fijan 15 mg de N por gramos de Carbono oxidado. Clostridium es anaerobia y fijan 2 a 3 mg por un gramo de hidrato de Carbono.

La fijación de N por bacterias exige altas cantidades de Hierro, Molibdeno y Calcio, y es inhibida por el amoníaco, nitratos y nitritos. Estas bacterias nitrantes presentan mayor facilidad para usar el N del suelo que del aire.

La fijación del N rinde  $NH_3$  como primer producto asimilable la nitrogenasa se ha purificado parcialmente; el extractor celular divide en dos fracciones respecto a la fijación del N: fracción NAS (Sistema Activador

del Nitrógeno) y fracción HDS (Sistema Donador de Hidrógeno). Se supone que la fracción NAS lleva nitrogenasa, que la ferredoxina está involucrada en la fijación de N por Clostridium.

Las bacterias nitrantes simbióticas pertenecen al género Rhizobium. Se les nombra específicamente, según la afinidad con la leguminosa a la que parasitan: R. phaseoli, en frijol; R. pisum, en chícharo; R. japonicum, en soya.

Pueden vivir libremente en el suelo por largo tiempo, pero están adaptadas a vivir en simbiosis con la leguminosa, por lo que emigran a las raíces de éstas formando nódulos. El Rhizobium vive dentro de las células tomando formas extrañas llamadas bacteroides; sólo invade células de los nódulos que tiene el doble de cromatina normal; para su actividad requieren altas cantidades de Molibdeno, que es un constituyente de la nitrogenasa, Cobalto que es constituyente de otras enzimas; cobre, cuya función se desconoce; y, Fósforo, para forma ATP.

Para fijar N se requiere luz. El sustrato energético para el proceso lo constituyen hidratos de Carbono y ácidos orgánicos que sintetizan la leguminosa en la hoja, los cuales son transportados a la raíz. El primer producto encontrado en experimentos con  $N_2$  fue el amoníaco, que puede pasar a los ácidos orgánicos.

### 2.1.2 nutrición mineral de la simbiosis

Niftai (1985) menciona que una leguminosa bien nodulada tiene su propio suministro de Nitrógeno, que no queda inmediatamente disponible para las malezas o para un cultivo asociado, los cuales podrían competir por humedad, nutrientes minerales o espacio. La leguminosa nodulada tiene, por lo tanto, una gran ventaja, particularmente en los suelos pobres en Nitrógeno; sin embargo, el óptimo crecimiento y la fijación de Nitrógeno dependen del suministro adecuado de los demás elementos esenciales, ya que los Rhizobium en los nódulos proveen sólo el Nitrógeno.

Las leguminosas han sido consideradas erróneamente exigentes en nutrición y altamente intolerantes a suelos ácidos.

No existe evidencia de que las leguminosas que crecen sin Rhizobium difieran en sus necesidades nutritivas de los demás grupos de plantas; sin embargo, debe reconocerse la necesidad de la leguminosa de una adecuada nutrición mineral.

#### 2.1.2.1 acidez, Calcio, Aluminio y Manganeso

La acidez y la concentración de Calcio interactúan sobre la proliferación de los Rizobium y la infección de ciertas leguminosas.

En condiciones de campo, es difícil determinar el papel específico de cada factor sobre la proliferación de la bacteria y la infección del pelo radicular.

El Calcio tiene otras funciones: modera el efecto tóxico del Aluminio y Manganeso sobre el crecimiento de las plantas, lo cual puede limitar también la fijación del Nitrógeno.

El efecto del exceso de Aluminio sobre la nodulación y la fijación de Nitrógeno, independientemente del pH, no ha sido establecido. Se sabe que el exceso de Aluminio limita tanto el crecimiento como la elongación de la raíz. Sin embargo, no se presentan altas concentraciones de Aluminio, al menos que el suelo tenga un pH de 5.0 o menor.

La mayoría de las leguminosas, con excepción del Caupino nodulan con pH bajo, independientemente de la concentración de Aluminio (Niftal, 1985).

#### 2.1.2.2 Fósforo, Azufre y Potasio

Niftal (1985) consigna que las deficiencias de Fósforo, Azufre y Potasio se manifiestan principalmente en reducción de crecimiento de la leguminosa, lo cual a su vez reduce la fijación total del Nitrógeno, aunque también puede afectar la formación de nódulos.

La aplicación de Fósforo o de Potasio pueden incrementar el número de nódulos por planta y por unidad de volumen del suelo.

La aplicación de Potasio puede incrementar más el número de nódulos, el peso total de éstos y las vainas por plantas, que la aplicación de Fósforo; pero, el efecto puede ser mayor cuando se aplican ambos nutrientes.

De esto se habla cuando se dice que el suministro de Potasio en el suelo es más adecuado que el de Fósforo. Lo contrario puede expresarse en suelos tropicales ácidos con alto contenido de Aluminio, donde el elemento más probablemente deficiente es el Fósforo.

La deficiencia de Azufre puede limitar la nodulación, así como la fijación de Nitrógeno. Debido a que el Azufre integra muchos aminoácidos, una deficiencia de este elemento puede traducirse en menor rendimiento de proteína, aún sin afectar el crecimiento.

## 2.2 Nodulación

**NODULO.-** Es una masa de células que contiene las bacterias; las células infectadas se dividen por el estímulo de las bacterias para formar nodulaciones de la raíz.

La masa queda rodeada de células pequeñas no contaminadas por las bacterias (SEP, 1983).

### 2.2.1 infección de pelos radiculares

Una célula infectiva de Rhizobium establece contacto con la raíz de una plántula de leguminosa susceptible. Las células de Rhizobium se multiplican y colonizan la superficie del pelo radicular.

El pelo radicular se encorva, un Rhizobium entra, se multiplica y se forma un hilo de infección. El hilo de infección penetra la corteza radicular. Se infectan otras células radiculares y se incrementa la división celular.

El embrión del nódulo se desarrolla; los nódulos varían ampliamente en forma, tamaño, color, textura y ubicación. La forma y ubicación de los nódulos efectivos es determinada por la planta huésped.

Los nódulos producidos por una cepa de Rizobium en una leguminosa, pueden no ser similares a los nódulos producidos por la misma cepa sobre otro huésped dentro del mismo grupo de inoculación cruzada. El tamaño, color y distribución de los nódulos en la raíz de las plantas leguminosas refleja el tipo de asociación Rizobium-leguminosa y su eficiencia de fijación de Nitrógeno (Niftal, 1985).

### 2.2.2 problemas de la nodulación y la fijación de Nitrógeno

Ferrera y Espinoza (1990) en 1981 realizaron los

trabajos sobre nodulación y fijación de Nitrógeno (N) en Phaseolus vulgaris, y se enfatizó sobre la capacidad de muchos cultivares nativos para fijar  $N_2$  la extremadamente variable de campo a la inoculación, los múltiples aspectos y efectos de la acidez del suelo, haciendo referencia brevemente sobre los efectos de temperatura y disponibilidad de agua, competencia por sitios de nodulación y otros problemas agronómicos.

#### 2.2.2.1 variación genética en la capacidad para fijar Nitrógeno

Graham et al (1982) encontraron que la variación entre cultivares de Phaseolus vulgaris, en relación a la fijación simbiótica de  $N_2$ , fue demostrada por primera vez en 1977-1978, cuando se consignó que las líneas de hábito determinado resultaron ser más pobres para fijar  $N_2$ , que las de hábito indeterminado o cultivares trepadores.

Se han obtenido grandes progresos en la identificación de líneas con las características agronómicas de los progenitores recurrentes y con alta capacidad de fijación de  $N_2$  cuando la diferencia en el potencial de fijación de  $N_2$  entre los progenitores ha sido grande (Rosas y Biiss, 1986).

Es interesante notar que mientras la fijación de  $N_2$  es generalmente considerada un carácter cuantitativo, se han obtenido ganancias significativas en la habilidad

para fijar  $N_2$  en poblaciones en donde el 87.5% de la información genética proviene del padre recurrente débil. También se han evaluado progenies altamente fijadoras de  $N_2$  (Vovahum y Temple, 1984).

Se encontró que el peso seco de nódulos, valores de la actividad de reducción de acetileno (ARA), grado de nodulación, relación del peso de nódulos, peso de la parte aérea y peso seco de la parte aérea, correlacionaron altamente con la fijación del  $N_2$  (Rosas y Biiss, 1986).

Algunos autores como Piha y Munns (1978) encontraron, tanto en los cultivares dependientes de  $N_2$  como en los fertilizados, una acumulación de N inferior a caupí y soya. Con algunas variedades de frijol particularmente en desventaja cuando dependieron de una fuente de Nitrógeno atmosférico.

Los caracteres en los cuales se observaron diferencias entre especies y que podrían indicar que se requiere mejoramiento genético, en frijol fueron: tamaño de nódulos, eficiencia en la absorción de hidrógeno, velocidad de acumulación de materia seca de la parte aérea y la relación parte aérea raíz, duración del desarrollo de la parte aérea y la raíz y actividad de la reducción de acetileno.

La disponibilidad de germoplasma de Rhizobium, se ha incrementado dramáticamente en los últimos años con

las principales colecciones realizadas en México, Brasil, Ecuador y Argentina. La colección es particularmente interesante, debido a que esta área ha sido sugerida como un posible segundo centro de origen de Phaseolus vulgaris y su Rizobium.

#### 2.2.2.2 factores edáficos y agronómicos que limitan la nodulación y la fijación de $N_2$

##### Acidez del Suelo

Graham y Rosas (1977) consideran que la acidez del suelo influye sobre todos los estados de la nodulación y fijación, desde la multiplicación de Rhizobium en el suelo, la infección y formación del nódulo, hasta la fijación de  $N_2$ .

Ferrera y Espinoza (1990) involucran el valor mínimo de pH, en el cual ocurre el crecimiento de Rhizobium en medio del cultivo, varía de acuerdo al medio utilizado, a la cepa y a la densidad de células introducidas; muy pocas cepas de Rhizobium crecen en un medio con pH menor de 5. No obstante, se han identificado cepas que tienen una tolerancia a la acidez por encima de lo normal.

Cunningham y Munns (1984) citan que tal es el caso de la cepa CIAT 899, que crece bien en un medio a pH de 4.0 o en un medio de pH de 4.5, conteniendo, además,

100 moles de Aluminio o 200 moles de Manganeso.

La frecuencia con que se presenta la tolerancia a estas cepas al pH, varía ampliamente.

Se observa que el 35.9% de aislamiento de R. leguminosarum, Phaseoli, colectados predominantemente en regiones de suelos ácidos del Brasil, resultaron tolerantes a un pH de 4.5, mientras que sólo 6 de 55 cepas de la colección sin seleccionar de CIAT, fueron tolerantes a tal pH.

Las cepas tolerantes a la acidez fueron más capaces de sobrevivir bajo condición de pH bajo. De la misma manera encontraron que la cepa CIAT 899, tolerante a la acidez fue capaz de sobrevivir mejor en el suelo que la cepa CIAT 632, sensible a la acidez cuando éstas fueron probadas a valores de pH 4.19 hasta 4.90; además, la primera respondió a la inoculación con un rendimiento de grano de más de 500 kg/ha a un pH de 4.5.

El pH ácido es una causa importante de falta de nodulación en el trópico. La sensibilidad al pH ocurre en etapas de nodulación y sólo se inhibe cuando la exposición a la acidez ocurre en el período entre 2 y 4 días después de la inoculación (Alexander, 1983).

Lie (1969) encontró que los cultivares "Venezuela 350" y "Carioca", redujeron el número de nódulos en 80% cuando crecieron a un pH de 5.0.

Los estudios sobre toxicidad de Aluminio en frijol, han sido duplicados por la necesidad de mantener niveles bajos de Fósforo (P) en la solución. En uno de los pocos estudios en los cuales los niveles de Fósforo (P) fueron cuidadosamente controlados, se encontró que la colonización e infección de Rhizobium en la raíz, eran inhibidas a una concentración de 33 moles de Aluminio, pero notaron que el crecimiento y desarrollo de la planta fueron aún más afectados. (Franco y Munns, 1982)

La adición de Calcio puede reducir estos efectos tóxicos y es importante, también, en la suplementación de Molibdeno a la planta (Franco y Day, 1980).

### 2.2.2.3 Fósforo

Munns (1968) considera que en las leguminosas el Fósforo (P) es comunmente el elemento más limitante, y es particularmente importante en plantas que dependen de la fijación de  $N_2$ .

Las plantas de soya dependientes de  $N_2$  requieren 320 kg/ha más de Fósforo (P) que las plantas fertilizadas con este nutrimento en el mismo suelo (Cassman y Whitney, 1981).

Schettini, Gabelman y Gerloff (1987) comentan que la variación entre cultivares en relación a la tolerancia

a bajas concentraciones de Fósforo (P) en Phaseolus vulgaris, pero sin relación a la fijación  $N_2$ .

Las líneas de Phaseolus vulgaris eficientes en el aprovechamiento del Fósforo (P) tienen más baja actividad de la fosfatasa, observándose ineficiencia, no obstante la actividad de la enzima (CIAT, 1985).

### 2.2.3 tipos y distribución de nódulos

El CIAT (1987) señala que los nódulos en corona, son los primeros en formarse y tienen mayor probabilidad de provenir de las cepas inoculadas. Generalmente son más efectivos por estar más cercanas a la fuente de carbohidratos.

Los nódulos efectivos son generalmente grandes y se agrupan en la raíz primaria y las raíces secundarias superiores. El máximo desarrollo de los nódulos, determinado por peso y volumen, normalmente ocurre en el estado de floración tardía. En contraste, los nódulos inefectivos son pequeños, numerosos y con frecuencia distribuidos en todo el sistema radicular.

La existencia de nodulación, la abundancia o escasez de nódulos, su tamaño y el momento de aparición, entre otros, son caracteres que dependen de la planta huésped o de la bacteria.

Hay cepas de Rhizobium que, infectando la raíz e iniciando canales de infección, los abortan sin llegar a producir nódulos. Otras cepas de Rhizobium y variedades de huésped, influyen sobre el tamaño y número de los nódulos. También se sabe de variedades que presentan distintos tiempos en la aparición de la nodulación (Cubero y Moreno, 1983).

#### 2.2.4 color de nódulos

El color interno de los nódulos vivos puede ser rojo, rosado, verde, blanco, negro o marrón. Debe recalcarse que un solo nódulo puede presentar dos colores. El color interno de un nódulo efectivo generalmente es rojo o rosado, por la presencia de leghemoglobina. Sin embargo, algunas cepas inefectivas, también pueden formar nódulos rojos. Los nódulos verdes o blancos generalmente son inefectivos. También existen algunas cepas que forman nódulos negros (CIAT, 1987).

CIAT (1989) comenta que la efectividad de la asociación Rhizobium-leguminosa puede ser determinada por escisión de nódulos de la planta huésped, durante el período de floración temprana y observando el color de los nódulos. Los nódulos efectivos son grandes y tienen internamente un color rosado intenso. El pigmento rojo leghemoglobina se asocia con Nitrógeno activo en nódulos de leguminosas.

La leghemoglobin roja en nódulos efectivos se transforma en verde a medida que los nódulos envejecen. Un nódulo individual efectivo en ciertas leguminosas puede mostrar simultáneamente regiones blancas, rojas y verdes durante cualquier etapa de crecimiento.

Esto indica, respectivamente, el área de crecimiento nodular de activa fijación de Nitrógeno y de senescencia. Los nódulos inefectivos son internamente de blanco a verde pálido y no cambian de color con la edad. Cuando las leguminosas se suplementan con fertilizantes nitrogenados, los nódulos producidos por cepas efectivas de Rhizobium permanecen pequeños y muestran las mismas características de los producidos por Rhizobium inefectivos. Después que el Nitrógeno del suelo se agota, los nódulos generalmente aumentan de tamaño y funcionan normalmente.

En contraste, los nódulos producidos por Rhizobium efectivo en plantas deficientes en Molibdeno tienden a crecer más y tienen aspecto normal, excepto el color. Los nódulos deficientes en Molibdeno son internamente verdes y de apariencia senescente.

#### 2.2.5 examen de nódulos

Niftal (1985) sostiene que cuando la nodulación de la planta de campo puede ser examinada sólo una vez,

el mejor momento es en máxima floración. Si es posible observar con mayor frecuencia el desarrollo de los nódulos de 4-5 semanas, debería revelar el éxito de la inoculación y la infección relativa de las cepas de Rhizobium. Exámenes posteriores durante la formación de vainas pueden ser útiles para seleccionar las cepas de Rhizobium más compatibles durante el período crítico del desarrollo de las semillas.

#### **2.2.5.1 evaluación de la nodulación y fijación de Nitrógeno**

La evaluación de la capacidad de las bacterias para nodular con leguminosas específicas, así como también de la capacidad de los nódulos para fijar Nitrógeno atmosférico exige los requisitos adecuados. No todos pueden satisfacerse por igual, mediante la misma técnica (Niftal, 1985).

##### **2.2.5.1.1 control bacteriológico**

Niftal (1985) concreta que el experimentador debe estar seguro de que los nódulos en estudio han sido formados realmente por la cepa bacteriana experimental.

#### 2.2.5.1.2 control del medio ambiente

El medio ambiente deberá ser tal, que permite una formación temprana de nódulos y el funcionamiento eficiente de los que son capaces de fijar Nitrógeno. Como norma se dará por satisfecho con una o varias condiciones (temperatura, período luminoso, intensidad de la iluminación) elegidas por grupos de leguminosas, por ejemplo: especies de zonas templadas o zonas tropicales.

En algunas investigaciones puede ser parte del estudio la reacción de la simbiosis a los cambios del medio ambiente, dato que constituye una base útil para la diferenciación de cepas (Gibson, 1961).

#### 2.2.5.1.3 escala de pruebas

Niftal (1985) consigna que la demanda de espacio, de equipo y horas de trabajo debe estar justificada con la información que se requiere. Siempre que sea posible, se recomienda el análisis preliminar de un gran número de cepa de Rhizobium, empleando un método sencillo. También resulta difícil aumentar el número de unidades sin introducir variaciones posicionales serias (por ejemplo: desigual iluminación y temperatura).

#### 2.2.5.1.4 oportunidad de una observación progresiva de la formación nódulos

Los métodos se aplican en el invernadero, en un ambiente iluminado totalmente con luz artificial o en un ensayo de campo. Los ensayos deben ser apropiados para la evaluación preliminar de cepas de rizobios y para la investigación detallada de la interacción entre los rizobios, la planta huésped y el medio. Sin embargo, los ensayos de campo son la base definitiva para la evaluación. La falta de control del medio ambiente en los ensayos de campo queda contrarrestado por sus ventajas para un examen de simbiosis en condiciones natural y biológicamente complejas. Las decisiones acerca de qué variables evaluar requieren estudios detallados; bajo condiciones controladas puede surgir de las indicaciones derivadas de situaciones complejas naturales.

La importancia de los experimentos en campo, comparados con los de laboratorio e invernadero, son:

1.- Se necesita comunmente una mayor cantidad de rizobios por semilla, para la nodulación de leguminosas sembradas en campo.

2.- La capacidad de nodulación más pobre, revelada por ciertas combinaciones satisfactorias de huésped bajo condiciones de campo (Vincet, 1975).

### 2.3 Rhizobium

Martín (1980) considera que las bacterias del género Rhizobium son gram-negativas, no forman esporas, son bacilos aerobios de 0.5 a 0.9  $\mu\text{m}$  (micras de ancho y de 1.2 a 3.0  $\mu\text{m}$  (micras de largo).

Móvil por la presencia de flagelos peritricos o polares por la existencia de ciertas formas de resistencia al calor. Poseen a menudo vacuolas en forma de citoplasma y gránulos de poli-beta-hidroxibutirato. (Gilbery, 1968)

En medios normales de cultivo, el género Rhizobium produce un polisacárido extracelular que da un aspecto mucilaginoso a sus colonias y que parece tener importancia en el proceso infectivo de la leguminosa huésped.

Su metabolismo es heterótrofo, al menos en condiciones de vida. Las necesidades en Nitrógeno las puede satisfacer con sales inorgánicas como nitrato, nitrito o sales amoniacales o con un compuesto orgánico como aminoácidos (Bergenson, 1961).

Recientemente se ha demostrado que el género Rhizobium en vida libre y en medio adecuado, puede fijar Nitrógeno molecular, aunque muchos menos activamente que en la asociación simbiótica. (Cubero y Moreno, 1983).

Algunas especies o cepas necesitan para su crecimiento ciertas vitaminas del grupo B, como biotina, tiamina, pantotenato (Bergenson, 1961).

El pH óptimo de crecimiento se encuentra próximo a la neutralidad; según las especies varían la resistencia a los pH extremos. Temperaturas próximas a los 30°C permiten mayor velocidad de crecimiento para la generalidad de las especies, aunque algunas pueden tener el óptimo en 35°C (Graham y Parker, 1964).

### 2.3.1 taxonomía

El género Rhizobium se incluye, como de los Agrobacterium y Chromobacterium, en la familia Rhizobiaceae, del orden Eubacteriales. La clasificación se hace en base a la distinta capacidad para nodular las diversas especies de leguminosas. (Allen on Allen, 1985) (Fred y Baldwin, - - 1932).

### 2.3.2 especies y cepas

Generalmente, según Niftal (1985), se consideran seis especies de Rhizobium: R. leguminosarum, R. trifoli, R. phaseoli, R. meliloti, R. japonicum y R. lupini.

El R. leguminosarum es capaz de nodular a diversas especies de la tribu Viceae, pertenecientes a los géneros Vicia, Lens, Lathyrus y Pisum.

R. trifoli nodula a los tréboles, en general; y R. phaseoli a diversas especies del género Phaseolus.

R. meliloti nodula a los géneros Medicago, Melilotus y Trigonella.

R. japonicum nodula a la soya Glycine max (L) Merrill, algunas otras especies del género Glycine y a ciertas leguminosas tropicales.

R. lupini es capaz de producir nódulos en los géneros Lupinus y Ornithopus. Observando en el Cuadro No. 1 algunas especies.

### 2.3.3 agrupamiento por efectividad

En las especies nombradas anteriormente, se consideran los grupos "Caupi", "Lotus Rápido" y "Lotus Lento". El primero es un grupo de Rhizobium capaz de nodular una gran cantidad de especies tropicales, entre las que se encuentran el Caupi (Vigna unguiculata). El grupo de los "lotus", subdividido según sus velocidades de crecimiento, infecta las especies de ese género (Graham y Parker, 1964).

Los Rhizobium de crecimiento rápido, entre ellos R. leguminosarum, R. trifoli, R. phaseolus, R. meliloti y el grupo "Lotus rápido" presenta tiempo de generación, en los medios normales de crecimiento, de 2-4 hrs y tienden a acidificar el medio de manitol extracto de levadura.

Los Rhizobium de crecimiento lento, como R. japonicum,

R. lupini y el grupo "Caupi", tienen tiempo de generación de 6-8 hrs, o más; tienden a alcalinizar el medio de manitol extracto de levadura.

Dentro de los Rhizobium "rápidos" R. leguminosarum, R. trifoli y R. phaseolus guardan más parentesco y no parece justificado separarlos en especies distintas.

R. meliloti podría considerarse una especie aparte, con alguna semejanza a algunas especies de Agrobacterium, que debería desaparecer como tal género e incluirse en el de Rhizobium (Mannetje, 1979).

Graham y Parker (1964) señalan que los Rhizobium lentos quedan netamente diferenciados de los rápidos, por proposición de algunos autores, se incluyen en un género distinto.

Ciertas plantas tienden a responder en forma similar frente a determinadas cepas de Rhizobium (una cepa de Rhizobium que nodula y fija una gran cantidad de Nitrógeno en asociación con algunas otras especies).

Las plantas leguminosas que muestran esta tendencia a responder en forma similar frente a determinadas cepas de Rhizobium, se considera un grupo de efectividad. (Niftal, 1985).

El grupo de efectividad de especies de leguminosas se presenta en el Cuadro No. 2.

CUADRO No. 1 GRUPOS DE INOCULACION CRUZADA Y ASOCIACIONES DE RHIZOBIUM-LEGUMINOSAS

GRUPO DE INOCULACION	ESPECIES DE <u>Rhizobium</u>	GENERO HOSPEDERO	LEGUMINOSAS INCLUIDAS
De la alfalfa	<u>R. meliloti</u>	<u>Medicago</u>	Alfalfa
		<u>Melilotus</u>	Trébol dulce
		<u>Trigonella</u>	Alholva
Del trébol	<u>R. trifolii</u>	<u>Trifolium</u>	Tréboles
Del chícharo	<u>R. leguminosarum</u>	<u>Pisum</u>	Chícharo
		<u>Vicia</u>	Algarroba
		<u>Lathyrus</u>	Almorta
		<u>Lens</u>	Lenteja
Del frijol	<u>R. phaseoli</u>	<u>Phaseolus</u>	Frijol
Del altramuz	<u>R. lupini</u>	<u>Lupinus</u>	Altramuz
		<u>Ornithopus</u>	Serradela o pie de pájaro
De la soya	<u>R. japonicum</u>	<u>Glycine</u>	Soya
Del caupí		<u>Vigna</u>	Caupí
		<u>Lespedeza</u>	Trébol del ja-- pón
		<u>Crotalaria</u>	Crotalaria
		<u>Pueraria</u>	Kudzú
		<u>Arachis</u>	Cacahuate
		<u>Phaseolus</u>	Frijol lima

CUADRO No. 2 ESPECIES DE Rhizobium

BACTERIA	GENEROS DE PLANTAS
	PARTE 1
<u>R. meliloti</u>	<u>Medicago, Melilotus y Trigonela</u>
<u>R. trifolii</u>	<u>Trifolium</u> spo.
<u>R. leguminosarum</u>	<u>Pisum, Vicia, Lathyrus, Lens</u>
<u>R. phaseoli</u>	<u>Phaseolus vulgaris, P. multiflora.</u>
<u>R. lupini</u>	<u>Lupinus y Ornithopus</u>
<u>R. japonicum</u>	<u>Glycine max</u>
Tipo caupí	<u>Vigna, muchos otros géneros y especies</u>
	PARTE 2
Crecimiento rápido	
<u>R. meliloti</u>	<u>Medicago, Melilotus y Trigonela</u>
<u>R. leguminosarum</u>	
biovar.- trifolii	<u>Trifolium</u> spp.
biovar.- phaseoli	<u>Phaseolus vulgaris, P. multiflora</u>
biovar.- viceae	<u>Pisum, Vicia, Lathyrus, Lens</u>
<u>R. loti</u>	<u>Lupinus, Lotus, Anthyllis, Ornithopus</u>
Crecimiento lento	
<u>Bradyrhizobium</u>	<u>Glycine max</u>
<u>japonicum</u>	
<u>Bradyrhizobium</u> spp	
<u>Bradyrhizobium</u> spp ( <u>Vigna</u> )	<u>Vigna.- Otros numerosos géneros y especies</u>
<u>Bradyrhizobium</u> ( <u>Lupinus</u> )	<u>Lotus pedunculatus, Lupinus</u> spp

## 2.4 Determinación de la necesidad de inoculación

El CIAT (1987) menciona que la inoculación es casi siempre necesaria, cuando ciertos cultivos de leguminosas se introducen en nuevas regiones. Es beneficioso inocular cultivos de leguminosas recientemente desarrolladas o introducidas, aún cuando las especies hayan sido previamente cultivadas. Con frecuencia se desarrollan cepas específicas de rizobios.

Muchos suelos están altamente infectados con rizobios inefectivos, capaces de inducir nodulación sin beneficio para la planta huésped. En esas condiciones se requiere un inóculo abundante de cepas de rizobios altamente competitivas para contrarrestar la agresividad de rizobios nativos.

### 2.4.1 prueba de campo

Si no se conoce la situación, Niftal (1985) recomienda una prueba de campo, para determinar la necesidad de inoculación. Se requiere de tres tratamientos básicos:

- a) Plantas obtenidas de semillas inoculadas con el mejor inoculante disponible.
- b) Plantas no inoculadas sin tratamiento de fertilización.
- c) Plantas no inoculadas, fertilizadas con Nitrógeno (sirven como pruebas de condiciones de crecimiento).

#### 2.4.1.1 objetivo de la inoculación

Según el CIAT (1987) el objetivo es modificar la población de rizobios en el suelo, mediante la introducción de cepas efectivas. Es más probable que una leguminosa específica responda a la inoculación en el campo, que una leguminosa nativa, debido a la escasez de cepas nativas.

Factores que afectan la efectividad de simbiosis en el campo:

- 1.- La mezcla de cepas nativas en el suelo pueden incluir pocas cepas efectivas.
- 2.- Las cepas inefectivas pueden ser más competitivas e inhibir la nodulación por cepas efectivas.
- 3.- Las condiciones de estrés pueden bajar la efectividad en simbiosis.

En consecuencia, es común observar que las leguminosas nativas presenten nodulación "semiefectiva" con las cepas de campo.

Como resultado, aún una leguminosa clasificada como nativa puede requerir inoculación en condiciones de campo, al igual que una leguminosa específica.

#### 2.4.2 métodos de inoculación

Niftal (1985) consigna que los cultivos de rizobios

preparados en el laboratorio se mezclan con varios tipos de sólidos inertes. Finamente pulverizados, como turba, compost, residuos de la industria azucarera, bagazo o algún otro soporte apropiado. Esta formulación se aplica normalmente a la siembra para asegurarse que se desarrollan nódulos efectivos y que las plantas tendrán suministro seguro de Nitrógeno. Un método alternativo es aplicar inoculante directamente al suelo. Esto es necesario bajo algunas condiciones, aunque puede ser más caro.

Con semillas, las dosis de inoculante recomendada por los fabricantes varían, de 4-6 gr/kg de semilla o 0.28-0.42 kg/ha, para densidades normales.

#### 2.4.2.1 métodos de aplicación de inoculantes para semillas

APLICACION EN HUMEDO.- El inoculante se mezcla con el agua, para formar suspensión uniforme y fluida. A veces se le agrega al agua goma arábiga o azúcar, para aumentar la adhesividad del inoculante de la semilla.

El uso de azúcar en la suspensión, decrece el ritmo de mortandad del Rhizobium durante la desecación de la semilla. La cantidad de agua varía en función del tamaño de la semilla.

Es importante no humedecer demasiado las semillas y que pueden formarse grumos o sufrir daños al pasar

por el mecanismo de distribución. Las semillas deben quedar uniformemente cubiertas (Niftal, 1985).

#### **2.4.2.1.1 método seco**

Niftal (1985) sugiere que el cajón sembrado, donde el inoculante en polvo se mezcla directamente con la semilla sin usar agua o líquido alguno, debido a que el inoculante en seco se adhiere bien a la semilla y se pierde; en general, no es satisfactorio y no se recomienda. Su única ventaja es la sencillez del método.

#### **2.4.2.1.2 peleteado con carbonato de Calcio**

Otros métodos sugeridos por Niftal (1985) son los siguientes:

Los rizobios en la semilla inoculada mueren cuando la semilla se planta en suelos marcadamente ácidos, o cuando se mezcla con fertilizantes ácidos antes de la siembra y para evitar ésto, las semillas se recubren con carbonato de Calcio. Primero se inoculan humedeciéndolas en suspensión de inoculante a base de turba. Luego, se mezcla rápidamente, haciéndolas rodar en carbonato de Calcio finamente pulverizado, hasta que queden uniformemente cubiertas por las partículas de carbonato. En condiciones

tropicales el fosfato de roca sustituye a menudo al carbonato de Calcio, debido a que el carbonato puede ser perjudicial para los rizobios ácido-tolerantes.

El carbonato de Calcio o el fosfato de roca sirven para secar las semillas y para evitar grumos. La suspensión del inoculante debe hacerse con un adherente, ya sea goma arábiga o goma celulósica sintética, para pegar firmemente el carbonato a las semillas. La desventaja del peleteado es que el peso de la semilla se incrementa sustancialmente, las semillas peleteadas son muy abrasivas y pueden dañar los distribuidores y se requiere maquinaria especial para mezclar la semilla húmeda con el carbonato de Calcio o fosfato molido; es difícil recubrir uniformemente.

La proporción semilla-carbonato de Calcio puede variar ampliamente y traducirse en densidades de semilla irregular.

#### **2.4.2.1.3 peleteado con inoculante**

Se requiere un inóculo muy abundante de Rhizobium, en el cual nos comenta Niftal (1985), puede utilizarse un sistema de peleteado modificado, en el cual las semillas se recubren con inoculante a base de turba.

Este sistema de inoculación ha sido muy satisfactorio para semillas plantadas en suelos calientes, secos o

donde los suelos están altamente infectados por rizobios nativos inefectivos.

#### 2.4.2.1.4 semilla recubierta

Cuando se peletean semillas de leguminosas con carbonato de Calcio, fosfato de roca o inoculante a base de turba, se emplean gomas solubles en agua. Con gomas de origen vegetal, los materiales de peleteado tienden a desprenderse, cuando las semillas se inoculan con varias semanas de anticipación. Para solucionar, se utilizan varios adhesivos insolubles en agua como: polivinil acetato, polivinil alcohol, poliuretano, poliurea, barnices y resinas que se disuelven en solventes para adherirla a diversas sustancias (carbón, arcilla, tierra diatomeas, talco y otras) a la semilla. De acuerdo con Niftal (1985) también puede incluirse a la mezcla inoculante a base de turba, productos químicos y micronutrientes.

El recubrimiento de la semilla se realiza generalmente por empresas especializadas con anticipación. Normalmente no es práctico realizar el recubrimiento a la semilla en el propio establecimiento.

Algunas de las ventajas enunciadas para la semilla recubierta son: mayor uniformidad y facilidad de siembra, mejor germinación, plántulas más fuertes y sanas, nodulación

temprana, mejor asimilación de nutrientes. Sin embargo, no ha sido probado el efecto beneficioso de la sustancia de recubrimiento.

Los adhesivos basados en solventes son a menudo tóxicos para el Rhizobium. Con un inoculante a base de turba concentrado, algunos rizobios pueden sobrevivir unas pocas semanas, pero la probabilidad de nodulación efectiva en la mayoría de condiciones de campo es baja.

#### **2.4.2-1.5 semilla preinoculada**

Se inocula antes de su comercialización. Esta es la recomendación hecha por Niftal (1985). La inoculación es realizada normalmente por compañía especializada con meses de anticipación a la siembra. Si bien la idea ha sido atractiva para los agricultores, la resultante ha sido muy desalentadora. La semilla de leguminosa no provee un buen ambiente para el Rhizobium; el ritmo de mortandad es rápido. La aplicación de un inoculante a base de turba con recubrimiento de gomas y azúcares, permite mejor supervivencia que otros sistemas, los resultados con semilla preinoculada no han sido seguros.

#### **2.5 Inoculación del suelo**

Este tipo de inoculación, según Niftal (1985), se

recomienda bajo las siguientes condiciones:

- a) Cuando las semillas de leguminosas están recubiertas con sustancias químicas tóxicas para protegerlas contra hongos, insectos u otras plagas del suelo.
- b) Cuando se siembra en suelos calientes o secos, su uso es inevitable. La ubicación de los Rizobium en el suelo húmedo debajo de la semilla puede dar como resultado una buena supervivencia y efectiva nodulación.
- c) Cuando los suelos están infectados con poblaciones altas de cepas inefectivas no fijadoras de Nitrógeno. Los inoculantes del suelo pueden introducir un inóculo mayor de rizobios efectivos que el que puede aplicarse directamente a la semilla.
- d) Cuando se obtiene buena densidad inicial de plantas y por alguna razón fallan en producir nódulos. Los inoculantes para el suelo pueden ser introducidos en surcos en el terreno después de la siembra, usando sembradoras tipo Zapata, o distribuidos en cobertura o pulverizados sobre el suelo antes de una lluvia o riego.

Esta práctica de inoculación de emergencia puede inducir nodulación efectiva y salvar el cultivo.

## 2.6 Tipos de inoculantes para semillas

Los tipos de inoculantes disponibles son:

- a) En botellas en agar inclinado.
- b) En turba, compost, carbón, vermiculita y otros soportes sólidos finamente molidos y húmedos.
- c) Caldos o cultivos líquidos.
- d) Formulación liofilizadas o congeladas.
- e) Caldos concentrados congelados.
- f) Formulaciones desecadas en aceites sobre el talco o vermiculita.
- g) Rhizobium incluidos en poliacrilamidas, alginatos o antinas. (Niftal, 1985)

### 2.6.1 tipos de inoculante para el suelo

Los diferentes tipos que recomienda Niftal (1985), son: líquidos o congelados concentrados, gránulos inoculados, gránulos en turba normal, gránulos de yeso poroso y otros gránulos.

#### 2.6.1.1 líquidos o congelados concentrados

Usando un sistema de goteo o de pulverización, se han obtenido nodulaciones en soya en Senegal, aplicando 5 lts de suspensión inoculante (2/3 de turba y 1/3 de

agua por hectárea).

En Australia se han obtenido buenos resultados, mezclando con agua el inoculante normal a base de turba para semillas, y bombeando la suspensión resultante en el surco, mediante una unidad de bombeo especialmente montada.

#### **2.6.1.2 gránulos inoculados**

Pequeños granos de mármol, calcita o de sílice. Se humedecen con un buen adhesivo y se inoculan con un inoculante en polvo (usualmente de turba). Después de oreados, los gránulos se distribuyen en cobertura, usando un distribuidor centrífuga. La densidad de los gránulos es muy apropiada para distribuirlos por gravedad, ya sea sobre la superficie o desde el aire.

En Nueva Zelanda se preparan inoculantes granulares adhiriendo un inoculante en turba finamente pulverizado a arena común, usando un adhesivo. Este inoculante se distribuye al voleo sobre la superficie del suelo o se aplica en surcos con un distribuidor de productos granulares. Son diseñados para ser distribuidos en surco, mediante aplicadores montados para distribuir insecticidas. Son de origen más reciente.

### 2.6.1.3 gránulos en turba normal

Es en forma de inoculante "Implant". Se prepara agregando un cultivo líquido de Rhizobium a gránulos naturales de turba de juncia de 300 a 800  $\mu$ m de diámetro. Se agrega suficiente humedad como para permitir el crecimiento y la multiplicación de los rizobios en los gránulos. El inoculante cae fácilmente y pueden ser distribuidos uniformemente usando el dispositivo de distribución en surcos.

### 2.6.1.4 gránulos de yeso poroso

Se preparan haciendo pasar una pasta de Sulfato de Calcio a través de pequeños orificios circulares y cortando los gránulos con un cuchillo, para obtener el largo adecuado.

Estos gránulos de yeso se hacen de diferente medida, para que correspondan con los tamaños de la semilla. Después de secado, los gránulos de yeso se pulverizan con un cultivo líquido de Rhizobium, mezclado con 12.5% de leche en polvo y un volumen igual de solución saturada de sacarosa. Los gránulos de yeso quedan así listos para ser mezclados y distribuidos simultáneamente con la semilla.

### 2.6.1.5 otros gránulos

En Francia, tres inoculantes, una poliacrelamida (PER), un alginato (AER), y un inoculante xántico de goma de algarrobo (XER) en cultivo de soya, en suelo libre de Rhizobium japonicum.

### 2.7 Cualidades de un inoculante efectivo

Niftal (1985) investigó las cualidades de un inoculante, debiendo ser las siguientes:

- a) El inoculante debería de contener sólo Rhizobium capaz de producir nódulos y fijar grandes cantidades de Nitrógeno con diferentes huéspedes. Los inoculantes efectivos pueden integrarse con una sola cepa de Rhizobium o pueden contener varias cepas. El primer tipo se conoce como monocepa, y al segundo como multicepas. Los inoculantes monocepas son buenos donde las pruebas de campo han demostrado que una determinada cepa de Rhizobium se comporta mejor en un huésped específico o genotipo, en las condiciones de suelo y clima predominantes y cuando los productores siembran generalmente una determinada variedad o genotipo de leguminosa. Los inoculantes multicepa se prefieren en zonas donde se cultivan muchas

variedades o cultivares de leguminosas y donde pueden existir grandes variaciones de suelo o clima. Los inoculantes multicepas no deberían contener cepas de Rhizobium que formen nódulos que no beneficien al huésped o huéspedes considerados. Tales cepas pueden impedir la nodulación por Rhizobium efectivos.

- b) Los inoculantes deben contener grandes cantidades de Rhizobium viables, por lo menos de 10,000 a un millón por semilla.
- c) El soporte o base del inoculante debe de proteger al Rhizobium en el paquete y sobre la semilla. Debe ser fácil de aplicar y se debe adherir bien a la semilla.
- d) El inoculante debe estar libre de otras bacterias que pueden ser perjudiciales al Rizobium o a la plántula.
- e) El inoculante debe estar envasado para proteger al Rhizobium hasta que sea usado por el productor. El paquete debe permitir intercambio de gases y debe retener la humedad.
- f) El paquete debe proveer instrucciones claras y una lista de las especies de leguminosas que nodulan efectivamente.
- g) El paquete debe mostrar la fecha de caducidad, la cual el productor puede considerarla segura.

- h) El nombre y dirección del fabricante deben estar impresos en el paquete.

## 2.8 Compatibilidad de los Rhizobium con pesticidas

Martin (1980) y Niftal (1985) coinciden en que la modulación frecuentemente se reduce o se anula con los pesticidas. Debido a su elevada concentración local y su estrecho contacto con el Rhizobium inoculado en las semillas; los agentes químicos aplicados directamente, afectan las bacterias de las raíces, en tal grado que éstos no aparecen; y, por lo tanto, la leguminosa no dispone de  $N_2$ . Se ha ideado vencer la incompatibilidad entre sustancia y el inóculo, proponiéndose un nuevo método que involucre la obtención de mutantes resistentes a los pesticidas, así como la elaboración de inóculos a partir de estos rizobios.

Muchos géneros de heterótrofos usan pesticidas como sustratos, metabolizadas las moléculas como nutrientes. Las especies de Agrobacterium, Arthrobacter, Bacillus, Clostridium, etc.

### 2.8.1 efectos de los fungicidas

Los metales pesados como Mercurio, Zinc, Cobre o

Plomo son tóxicos para el rizobio y no compatible con la nodulación.

Esas semillas no deberán inocularse directamente; sino utilizarse inoculantes para el suelo. Los fungicidas orgánicos son generalmente menos tóxicos que los constituidos por metales pesados, pero la mayoría son tóxicos. En unos casos el agente químico mata a los rizobios.

En otros los rizobios permanecen viables y producen colonias, pero pierden la habilidad de inducir nodulación. Los parámetros de compatibilidad deberían incluir la habilidad para producir colonias, también la capacidad para inducir nodulación y fijar Nitrógeno.

Agentes químicos orgánicos utilizados como fungicida en semilla de leguminosa, que generalmente es tóxico para el rizobio:

Captan:	N-triclorometiltio-4-ciclohexeno-1,2 dicarboximida
Carboxin:	2-3-dihidro-5-carboxanilidro-6-metil, 1,2 - oxantín
Chloronil:	2-3,5,6 tetracloro-1,4, benzoquinona
PCNB:	Pentacloronitro-benceno
Thiabendazole:	2-(4-tiazolil)-benzomidazola ( $C_{10}, H_7N_3S$ )
Thiram:	Disulfuro de tetrametil-Thiram ( $C_6H_{12}N_2 S$ )

(Niftal, 1985)

## 2.8.2 efecto de los insecticidas

Niftal (1985) redactó que no ha sido estudiada suficientemente la compatibilidad de los rizobios con insecticidas y herbicidas. Los insecticidas más utilizados en semillas de leguminosas son:

Carbofuram:	2,3 dihidro-2,2 dimetil-7 bensofuroniil-metil carbamato
Phorate:	O-O dietil-S(etiltioil)-metil fósforo ditioato
Aldicarb:	2-metil-2 (metiltio) propionaldehido-o-metil carbamoil

Normalmente existen formulaciones granulares para distribución en el surco con la semilla, pero no se aplica directamente a la semilla. Cuando estos insecticidas se aplican directamente a la semilla o al suelo en las dosis recomendadas, no tienen efecto perjudicial sobre la nodulación (Niftal, 1985).

### 3. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1 Características Agroclimatológicas de la Región

##### 3.1.1 localización

De acuerdo con S.P.P. (1981) citado por García (1990) nos dicen que el valle de Zapopan está localizado en la Región Centro del Estado de Jalisco, perteneciendo al área de influencia del Distrito de Desarrollo Rural de Zapopan.

Está ubicado geográficamente entre los meridianos  $103^{\circ}35'$  y  $103^{\circ}23'$  longitud Oeste y entre los paralelos  $20^{\circ}54'$  y  $20^{\circ}42'$  latitud Norte (Figura 1). Se encuentra a una altura aproximadamente de 1,580 msnm, teniendo una extensión aproximada de  $760 \text{ km}^2$ .

##### 3.1.2 localización del sitio experimental

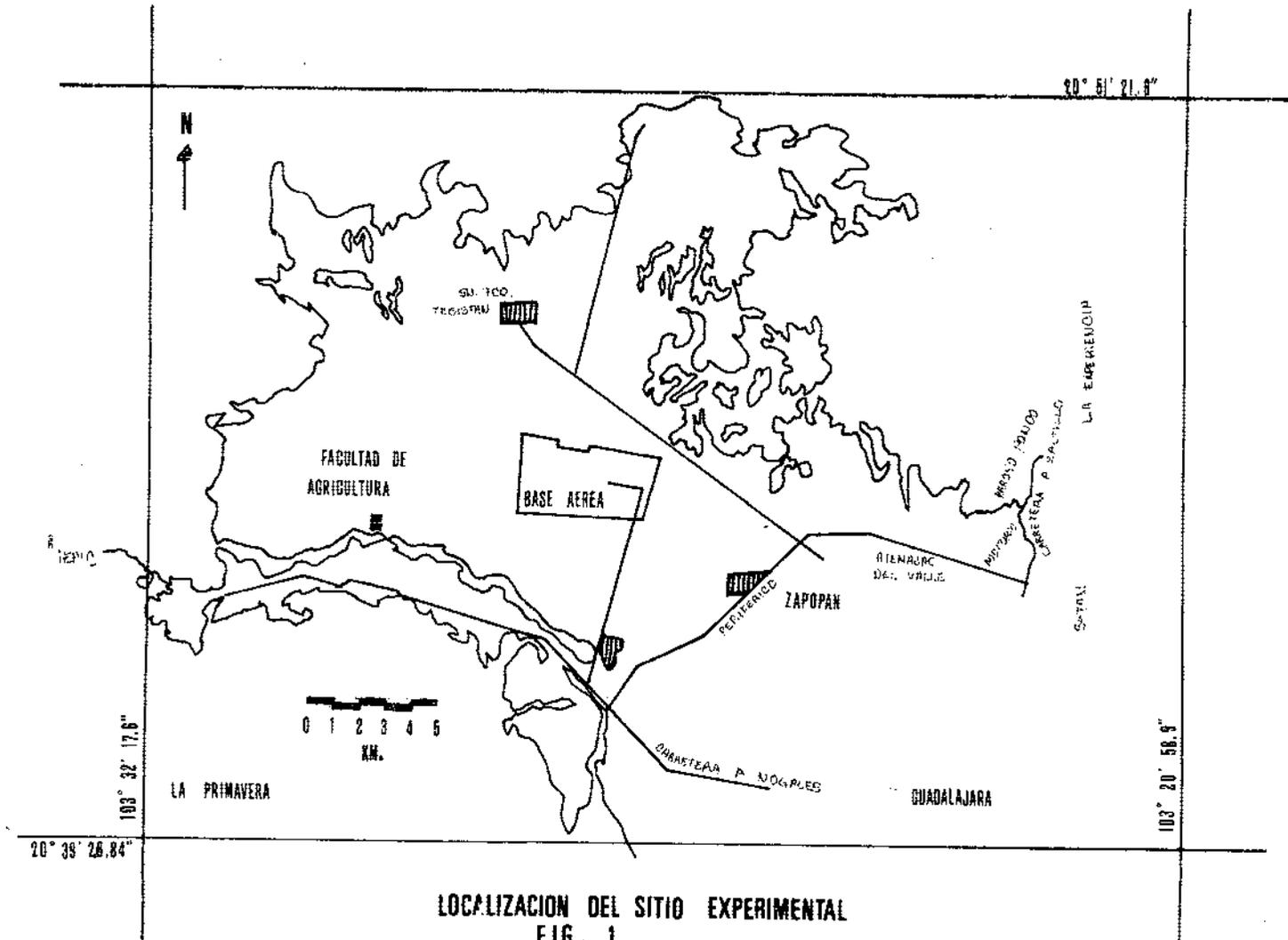
El sitio experimental se encuentra situado en la Facultad de Agronomía de la Universidad de Guadalajara, en el predio de Las Agujas, Mpio. de Zapopan (Figura 1) (García, 1990).

### 3.1.3 clima

Según Villalpando y Palacios (1988) citados por García (1990) señalan que en el valle de Zapopan se presenta más del 70% de la precipitación en los seis meses más calientes y ésta es mayor de dos veces; la temperatura media anual más de 14, es decir,  $2(T+14)$ ; además presenta uno o más meses con temperatura media, menor de 18°C; ninguno menor de -3°C, al menos uno mayor de 10°C, por lo que se considera de acuerdo a Köppen, como un clima templado-caliente (C) en el primer orden; en el segundo es invierno seco (W), dado que la precipitación es del mes más seco en la estación invernal y menor de 1/10 del mes más húmedo del verano (mes más seco: Febrero, con menos de 5 mm; mes más húmedo: Julio, 250-260 mm) y en el tercer orden pertenecen a un verano caliente (a) donde la temperatura del mes más caliente es superior a 22°C (en este caso corresponde a Mayo, con 23°C a 24°C).

Por lo que se concluye que el clima del valle de Zapopan es un clima templado-caliente, con invierno seco y verano caliente (Cwa).

En la Síntesis Geográfica de Jalisco que publica la Secretaría de Programación y Presupuesto (1981), se establece que la región de Zapopan el clima pertenece al grupo de los climas templados, en el subgrupo de los climas subhúmedos, situándose entre los de un nivel interme-



dio de humedad de los semicálidos.

### 3.1.3.1 precipitación

La precipitación anual que se tiene registrada es de 850 mm. Los meses de julio y agosto presentaron la más alta precipitación pluvial. (García, 1990)

### 3.1.3.2 temperatura

García (1990) nos dice que uno de los principales factores climáticos limitantes en la producción de cultivos, es la temperatura. El punto crítico de la relación temperatura-planta se encuentra en antesis, lo cual ocurre en el mes de julio.

Por el climógrafo de Gaussen, que se basa en clasificar como mes seco aquél en el cual la temperatura media mensual es dos veces mayor a la precipitación pluvial correspondiente al mes en cuestión.

Los meses de octubre a mayo encajan en la categoría de meses secos; el resto de los meses se catalogan como húmedos y semihúmedos.

### 3.1.4 suelo

Duchautour (1978) citado por García (1990) comentan que los suelos más frecuentes en la región son los de tipo regosol, cambisol y feozem. A continuación se presentan las características principales de cada uno de ellos:

#### **Regosol eutrico (Re)**

Se caracterizan por no presentar capas distintas. En general son claros y muy similares a la roca que los subyace, cuando no son profundos. Frecuentemente son someros, de fertilidad moderada alta.

#### **Cambisol crómico (Rc)**

Se caracterizan por presentar en el subsuelo una capa que parece más suelo que roca, ya que en ella se forman terrones; además, pueden presentar acumulación de algunos materiales como arcilla, carbonato de Calcio, Manganeso, pero sin que esta acumulación sea muy abundante. Presentan una coloración de rojizo a pardo oscuro y por tener una alta capacidad para retener nutrimentos. Se usan para explotar pastos naturales en ganadería, inducidos y cultivados; y en agricultura, para cultivos de grano y oleaginosas, principalmente. En ambos casos sus rendimientos son de medios altos.

### **Feozem háptico (Fh)**

Su característica principal es una capa superficial oscura, suave, rica en materia orgánica y en nutrimentos, semejantes a capas superficiales de los Chernozem y Castañozem, pero sin presentar las capas, ricas en cal, con que cuentan estos dos suelos.

## **3.2 Materiales**

### **3.2.1 materiales físicos**

Para las determinaciones químicas del número fijado, tomando información del Manual de Bromatología del Prof. Zarazúa (1982) se procedió. Los materiales que se utilizaron en el laboratorio fueron:

- Balanza analítica
- Estufa de desecación
- Cajas de aluminio para humedad
- Desecador
- Matraz Erlenmeyer
- Matraz Kjeldhal
- Papel filtro
- Tren de Kjeldal para digestión y destilación
- Probetas
- Buretas
- Vasos de precipitación

### Reactivos

- Acido sulfúrico concentrado
- Granallas de Zinc
- Hidróxido de Sodio al 40%
- Perlas de vidrio
- Acido clorhídrico D.I.N.
- Agua destilada
- Acido bórico al 40%
- Parafina
- Mezcla indicadora azul de metileno

### **3.2.2 material genético**

Con INIFAP (1989) e INIFAP (1990) se trabajó con el material genético, siendo tres especies de leguminosas. El frijol (Phaseolous vulgaris), de la variedad Azufrado Regional 87; la soya (Glycine max), de la variedad Rosales S-80.

Fueron cedidas por el campo experimental Valle del Fuerte INIFAP las variedades antes citadas; por último, el chícharo fue comprado en el mercado, eligiéndose la variedad Perfección. Las características fenotípicas se describen en el Cuadro No. 3.

CUADRO No. 3 CARACTERISTICAS DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS

NORTE DE SINALOA

AZ - REGIONAL 87

ROSALES S-80

DIAS A FLORACION	43	DIAS A FLORACION	40
COLOR DE FLOR	BLANCO	DIAS A MADUREZ	127
MADUREZ FISIOLÓGICA	95	ALTURA DE VAINA	8
HABITO DE CRECIMIENTO	DET. SEM.	CENTIMETROS DE PLAT.	70
ENTRENUDOS	6-7	<u>CENTRO DE SINALOA</u> ROSALES S-80	
ALTURA DE PLANTA	36 cm		
VAINAS POR PLANTA	21		
SEMILLAS POR VAINA	4.5		
PESO POR 100 SEMILLAS	34 grs		
REACCION A ROYA	RESISTENTE	DIAS A MADUREZ	116
REACCION A VIROSIS	TOLERANTE	ALTURA DE VAINA	10
REACCION A MALTO B	SI	CENTIMETRO DE PLAT.	86

SI = Susceptible, pero escapa, debido a su hábito de crecimiento.

### 3.3 Métodos

#### 3.3.1 metodología experimental

En la presente investigación para encontrar la eficiencia de la simbiosis, mediante la aportación de Nitrógeno de tres especies de leguminosas, se realizó trabajo de campo y laboratorio. (Lithe y Hills, 1979) (Reyes, 1984)

##### 3.3.1.1 diseño experimental

Se utilizó un experimento bifactorial, con una distribución en bloques al azar y un arreglo de parcelas divididas con cuatro repeticiones. El factor A, fueron las especies de leguminosas; y el factor B, fueron las fuentes de Nitrógeno. La distribución de las parcelas se hizo según se muestra en el Cuadro 4.

A = Especies

B = Fuentes de Nitrógeno

a<sub>1</sub> = Frijol

b<sub>1</sub> = Inoculante

a<sub>2</sub> = Soya

b<sub>2</sub> = Fertilizante

a<sub>3</sub> = Chícharo

a<sub>3</sub> = Agromil

a<sub>4</sub> = Testigo

CUADRO No. 4 FACTORES, NIVELES Y TRATAMIENTOS ESTUDIADOS

## FACTOR B

		$b_1$	$b_2$	$b_3$	$b_4$
F A C T O R A	$a_1$	$a_1b_1$	$a_1b_2$	$a_1b_3$	$a_1b_4$
	$a_2$	$a_2b_1$	$a_2b_2$	$a_2b_3$	$a_2b_4$
	$a_3$	$a_3b_1$	$a_3b_2$	$a_3b_3$	$a_3b_4$

**3.3.1.2 unidad experimental y parcela útil**

Lithe y Hills (1979) tomaron los siguientes conceptos, los cuales consisten en que la unidad experimental fue de 4 surcos, de 80 cm de ancho y 5 m de largo.

La dimensión de las subparcelas fue de 80 cm de ancho y 5 m de largo.

Para la parcela útil se toma un surco central, eliminando un metro de ambos extremos, para evitar el efecto de orilla.

**3.3.1.3 distribución y trazo de las parcelas en campo**

En la Figura 2, se muestra la distribución de los tratamientos en campo.

# DISTRIBUCCION DE LOS TRATAMIENTOS EN CAMPO.

FIG. 2

A<sub>1</sub>: FRIJOL = AZ REGIONAL 87

A<sub>2</sub>: SOYA = ROSALES S-80

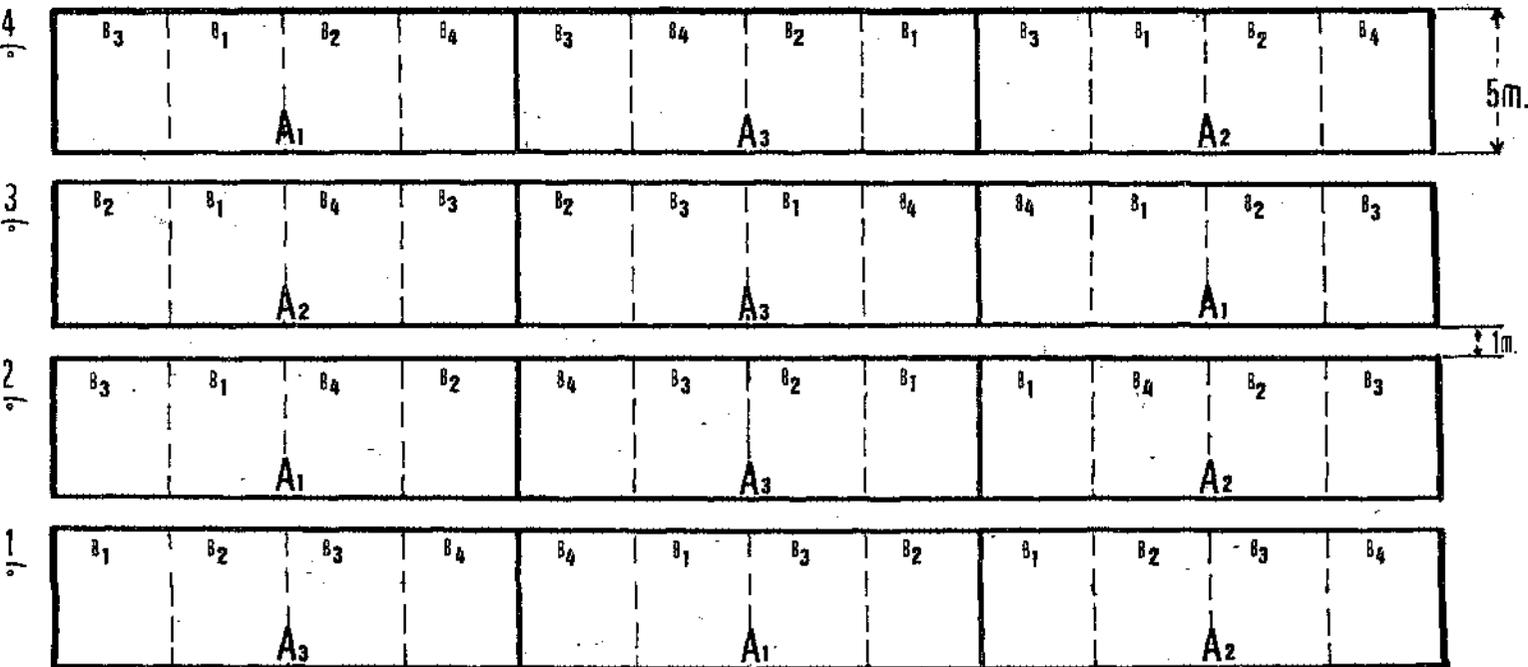
A<sub>3</sub>: CHICHARO = PERFECCION

B<sub>1</sub> = INOCULANTE

B<sub>2</sub> = FERTILIZANTE

B<sub>3</sub> = AGROMIL

B<sub>4</sub> = TESTIGO



### 3.3.2 análisis estadístico

Se realizó el análisis de varianza, para cada muestreo de las variables estudiadas.

### 3.3.3 comparación de promedios

Se empleó la diferencia mínima significativa modificada la prueba de Duncan al 0.05%, para cada variable.

### 3.3.4 variables analizadas

Las diferentes respuestas en el cultivo fueron cuantificadas, mediante las siguientes variables:

- a) Muestreo en floración.
- b) Muestreo en el llenado de vaina.
- c) Muestreo en la madurez.

## 3.4 Desarrollo del Experimento

### 3.4.1 preparación del terreno

Se preparó el suelo normalmente, con los siguientes pasos:

- 1) Aradura
- 2) Dos pasos de rastra

- 3) Surcado
- 4) Tumba de bordos
- 5) Siembra sobre el lomo

#### 3.4.2 preparación de la semilla

Las semillas se humedecieron y previamente se aplicó el inoculante.

Otras semillas se mezclaron con el Agromil, en una bolsa, quedando adheridos a la superficie de la semilla.

La semilla Testigo, sin inoculación, se sembró directamente en el suelo.

#### 3.4.3 métodos y fecha de siembra

La siembra se realizó manualmente "a chorrillo" sobre el lomo del surco, a tierra venida, el día 15 de julio de 1992.

#### 3.4.4 prácticas culturales

La mayoría se realizó manualmente, para no dañar a los rizobios para la formación de nódulos, para cada una de las repeticiones.

Para combatir la maleza se hizo manualmente y se sacaban las malezas con todo y raíz, durante los periodos más críticos del cultivo para dejar libre de competencia.

La escarda fue hecha con simple azadón, para delimitar los surcos de las calles.

### **3.5 Control de Plagas**

Se presentó en el frijol, conchuela, en el periodo de floración, donde se aplicó Sevin 80% pH, el día 22 de agosto de 1992.

#### **3.5.1 cosecha**

La cosecha se realizó manualmente al completar la planta su ciclo de desarrollo, aproximadamente a los 105 días, después de la fecha de siembra.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Fijación de Nitrógeno

#### 4.1.1 muestreo en floración

Los resultados logrados en esta variable, se concentran en el Cuadro 5.

Al aplicar el análisis de la varianza, se observa en el Cuadro 6, donde vemos que el factor A, tiene una alta significancia estadística, debida a la variación que muestran. Lo que quiere decir que hay diferencia entre las especies, en el muestreo correspondiente a la floración.

Con respecto al factor B, no hubo significancia estadística, por lo que se puede postular que no existe respuesta entre las fuentes de Nitrógeno (Cuadro 8).

Después de aplicar la prueba de Duncan, en la soya, se encontró un mayor porcentaje de fijación de Nitrógeno, en comparación al frijol y chícharo. Debido a la significancia, será estadísticamente mostrada por el factor A. Se procedió a aplicar la comparación de medias, mediante la prueba de Duncan, lo cual se puede constatar por medio de la probabilidad.

Los resultados alcanzados se muestran en los Cuadros 7 y 8. En el factor A, se encontraron tres grupos de significancia.

#### 4.1.2 muestreo en llenado de vaina

En el Cuadro 9 se muestran los valores obtenidos de Nitrógeno, encontrados en esta variable. Al realizar los análisis de varianza, arrojaron resultados altamente significativos para el factor A, pero no así para el factor B, de tal forma que existe diferencia entre especies y para fuentes de Nitrógeno son iguales (Cuadro 10).

Al aplicar la prueba de medias Duncan al 0.05, se observa que en el factor A se formaron tres grupos, correspondiendo a la soya el valor más alto, o sea, que fija mayor cantidad, seguida del chícharo y, por último, el frijol (Cuadro 11).

En la prueba de Duncan al 0.05, para el factor B (Cuadro 12), se aprecia que todos los tratamientos son iguales. Esto indica que las especies, con o sin tratamiento, la fijación es la misma.

#### 4.1.3 muestreo en madurez fisiológica de grano y vaina

Las observaciones realizadas en el campo de esta

variable, se concentran en el Cuadro 13.

Como se hizo en los muestreos anteriores, se realizó el análisis de varianza, cuyos resultados obtenidos se encuentran concentrados en el Cuadro 14, en el cual se observa que el factor A es el que tiene una diferencia altamente significativa, no encontrándose esta diferencia en el factor B.

Al aplicar la prueba de Duncan al 0.05 al factor A, se obtuvieron los resultados que se enlistan en los Cuadros 15 y 16, observando así, que hay grupos de variación en las especies de leguminosas, siendo la soya la de más alto valor.

En esta ocasión se pudo observar un aumento de fijación de Nitrógeno, a diferencia del muestreo anterior, que es el llenado de vaina.

Este aumento se debe a que ya el Nitrógeno se encuentra concentrado en los granos ya formados en la planta.

CUADRO NO. 5 RESULTADOS OBTENIDOS EN EL PRIMER MUESTREO DEL PORCENTAJE DE NITROGENO, FIJADO EN LA FLORACION DEL VERANO DEL '92, EN ZAPOPAN, JAL.

	I	II	III	IV
$a_1b_1$	3.9	3.1	6.1	4.5
$a_1b_2$	3.2	5.1	6.7	4.8
$a_1b_3$	3.3	1.7	4.8	4.8
$a_1b_4$	2.9	7.7	3.3	4.5
$a_2b_1$	5.6	5.2	5.6	5.0
$a_2b_2$	6.5	6.4	6.2	5.6
$a_2b_3$	4.8	5.6	5.8	4.2
$a_2b_4$	5.7	4.2	5.4	7.1
$a_3b_1$	4.4	6.5	6.9	3.7
$a_3b_3$	7.0	5.6	7.4	3.8
$a_3b_4$	4.8	6.9	5.3	4.7

CUADRO No. 6 ANALISIS DE VARIANZA EN EL PRIMER MUESTREO

## FLORACION

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F	F	T
					0.05	0.01
BLOQUES	3	6.865	2.288	1.416		
TRATAMIENTOS	11	25.35	2.305	1.427	2.093	2.839
FACTOR A	2	17.05	8.525	5.277++	3.284	5.311
FACTOR B	3	5.522	1.840	1.1396	2.891	4.437
INTERACCION	6	2.784	0.464	0.287	2.389	3.405
ERROR	33	53.30	1.615			
TOTAL						

C.V. = 24.2762%

(++ = Altamente significativo)

CUADRO No. 7 COMPARACION DE MEDIAS DE LA VARIABLE A, EN LA FIJACION DE NITROGENO EN EL PRIMER MUESTREO

ESPECIES		MEDIAS	GPOS
CHICHARO	3	5.75	A
SOYA	2	5.55	A
FRIJOL	1	4.40	B

CUADRO No. 8 COMPARACION DE MEDIAS DE LA VARIABLE B, EN LA FIJACION DE NITROGENO DEL PRIMER MUESTREO EN LAS CUATRO FUENTES-DE NITROGENO

FUENTES DE NIT.		MEDIAS	GPOS
FERTILIZANTE	2	5.79	A
TESTIGO	4	5.20	A
INOCULANTE	1	5.04	A
AGROMIL	3	4.90	A

CUADRO No. 9 RESULTADOS OBTENIDOS EN EL SEGUNDO MUESTREO DEL PORCENTAJE DE NITROGENO, FIJADO EN LA FASE DE LLENADO DE VAINA, - DEL VERANO DEL '92, EN ZAPOPAN, JAL.

	I	II	III	IV
$a_1b_1$	1.0	2.3	2.9	2.0
$a_1b_2$	1.2	2.3	1.2	3.0
$a_1b_3$	0.9	1.8	1.0	0.9
$a_1b_4$	1.2	1.7	1.4	1.5
$a_2b_1$	0.8	3.8	3.1	2.6
$a_2b_2$	3.8	3.9	2.7	2.5
$a_2b_3$	3.4	2.6	3.5	3.6
$a_2b_4$	3.0	3.3	3.6	3.2
$a_3b_1$	2.5	2.9	3.0	2.4
$a_3b_2$	3.8	1.0	3.7	2.0
$a_3b_3$	3.3	5.8	3.6	2.4
$a_3b_4$	2.9	3.0	2.5	1.7

CUADRO No. 10 ANALISIS DE VARIANZA EN EL SEGUNDO MUESTREO

## LLENADO DE VAINA

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.	F T	
					0.05	0.01
BLOQUES	3	2.722	0.905	1.321		
TRATAMIENTOS	11	27.38	2.489	3.624	2.093	2.839
FACTOR A	2	19.79	9.896	14.40++	3.284	5.311
FACTOR B	3	0.777	0.259	0.377	2.891	4.437
INTERACCION	6	6.818	1.136	1.654	2.389	3.405
ERROR	33	22.66	0.686			
TOTAL	47	52.77				

C.V. = 32.554840%

(++ = Altamente significativo)

CUADRO No. 11 COMPARACION DE MEDIAS DE LA VARIABLE A, FIJACION DE NITROGENO DEL SEGUNDO MUESTREO

ESPECIES		MEDIAS	GPOS.
SOYA	2	3.87	A
CHICHARO	3	2.90	B
FRIJOL	1	1.64	C

CUADRO No. 12 COMPARACION DE MEDIAS DE LA VARIABLE B, FIJACION DE NITROGENO EN EL SEGUNDO MUESTREO DE LAS CUATRO FUENTES DE NITROGENO

FUENTES DE NIT.		MEDIAS	GPOS.
AGROMIL	3	2.73	A
FERTILIZANTES	2	2.59	A
INOCULANTE	1	2.44	A
TESTIGO	4	2.4	A

CUADRO No. 13 RESULTADOS OBTENIDOS EN EL TERCER MUESTREO DEL PORCENTAJE DE NITROGENO FIJADO EN LA FASE DE MADUREZ FISIOLÓGICA EN EL VERANO DEL '92. ZAPOPAN, JAL.

	I	II	III	IV
$a_1b_1$	3.8	3.9	3.7	4.5
$a_1b_2$	3.7	4.5	4.0	6.9
$a_1b_3$	3.7	3.5	3.4	4.9
$a_1b_4$	3.8	3.7	3.9	4.1
$a_2b_1$	7.6	5.3	6.0	4.0
$a_2b_2$	6.3	6.0	5.0	3.8
$a_2b_3$	7.0	5.9	5.9	4.1
$a_2b_4$	9.0	5.7	6.3	7.1
$a_3b_1$	4.0	3.9	5.0	5.2
$a_3b_2$	5.0	5.0	7.4	4.0
$a_3b_3$	4.3	5.5	8.8	5.3
$a_3b_4$	5.0	4.8	4.8	2.9

CUADRO No. 14 ANALISIS DE VARIANZA EN EL TERCER MUESTREO

## MADUREZ FISIOLÓGICA

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.	F T	
					0.05	0.01
BLOQUES	3	3.542	1.180	0.814		
TRATAMIENTOS	11	42.12	3.829	2.641	2.093	2.839
FACTOR A	2	26.28	13.14	9.068++	3.284	5.311
FACTOR B	3	7.480	0.943	0.340	2.891	4.437
INTERACCION	6	14.35	2.392	1.650	2.389	3.405
ERROR	33	47.83	1.449			
TOTAL	47	93.49				

C.V. = 23.889143%

(++ = Altamente significativo)

CUADRO No. 15 COMPARACION DE MEDIAS DE LA VARIABLE A, EN LA FIJACION DE NITROGENO DEL TERCER MUESTREO

ESPECIES		MEDIAS	GPOS.
SOYA	2	5.93	A
CHICHARO	3	5.05	B
FRIJOL	1	4.12	C

CUADRO No. 16 COMPARACION DE MEDIAS DE LA VARIABLE B, EN LA FIJACION DE NITROGENO DEL TERCER MUESTREO DE LAS CUATRO FUENTES DE NITROGENO

FUENTES DE N.		MEDIAS	GPO.
AGROMIL	3	5.19	A
FERTILIZANTE	2	5.13	A
TESTIGO	4	5.09	A
INOCULANTE	1	4.7	A

## 5 DISCUSION

### 5.1 Fijación de Nitrógeno

#### 5.1.1 muestreo en floración

Los resultados demuestran que la eficiencia de Rhizobium está fuertemente influenciada por condiciones ambientales; sin embargo, es posible, de acuerdo con Ferrera y Espinosa (1990) que se adaptan a muchos tipos de ambiente.

La fijación de  $N_2$  depende de las características, tanto de la bacteria, como de la planta y de la influencia de ambiente; sin embargo, una vez que se establece la simbiosis entre una cepa efectiva y el hospedero, la fijación del Nitrógeno dependerá en gran medida de la planta, puesto que es la que aporta los carbohidratos necesarios para el funcionamiento de los nódulos.

La nodulación de leguminosas y la fijación de N son muy pobres en la parte Norte Central de México.

Muchos de los nódulos que se forman son ineficaces y en ocasiones, a pesar de obtenerse buenas cosechas, después de una inoculación.

En los muestreos realizados se encontró una

mayor fijación de Nitrógeno en la etapa de floración en la soya.

Algunos investigadores reportan que el desarrollo máximo del nódulo ocurre entre la floración y el inicio del llenado de la vaina; sin embargo, a pesar de haberse realizado en este período el muestreo, es posible que otro muestreo a las raíces utilizadas como comparación, serviría para obtener una concluyente aseveración del problema de la nodulación efectiva.

La falta de nódulos puede deberse a que se hayan desprendidos éstos al momento del muestreo y/o que en el suelo no existieran las cantidades de Molibdeno y Cobalto no determinados en el análisis del suelo, necesarios como señala Rojas (1983), quien resalta la función de estos elementos en el proceso de nodulación y fijación del  $N_2$ .

### **5.1.2 muestreo en llenado de vaina**

En la leguminosa la antesis o apertura de las flores de una planta ocurre en forma continua, en un lapso de dos a cuatro semanas, según la variedad, el hábito de crecimiento y las condiciones ambientales.

Este ritmo de floración continua también ocurre a nivel de inflorescencia individual y de desarrollo de los -

frutos, según lo señalan Ferrera y Espinosa (1990) y es importante, porque en estas condiciones se imbrica o traslapa el período de apertura de las flores con el de crecimiento de las vainas y el llenado de las semillas.

Esto permite que la planta ajuste la potencia de la demanda con la de la fuente.

Por ejemplo, si la fuente, representada por las hojas, en un momento del período reproductivo no produce suficiente fotosintatos para llenar todas las vainas, la planta podría presentar absición (caída controlada fisiológicamente, pero modulada por el ambiente) de botones, flores o vainas jóvenes, regulando de este modo el tamaño de la demanda.

Así pues, la absición podría ser una "estratagema" de la planta para ajustar la potencia de la demanda, a la potencia de la fuente.

Esto se comparte con otras especies, como: manzano, ciruelo y otros frutales. La característica de producir un número de botones y flores mucho mayor que el número de vainas que finalmente llegan a alcanzar la madurez.

Los botones y flores que no llegan a transformarse en vainas maduras, sufren absición. Este mismo fenómeno se presenta en un gran número de vainas jóvenes, especialmente aquellas de longitud menor de 3 cm. Una vaina de mayor longitud ya no sufre absición.

Asimismo, algunas vainas permanecen en la planta, pero tienen solamente semillas abortadas y/o rudimentos abortados.

A estas vainas se les llama "vainas vanas" y son importantes porque derivan fotosintatos para su desarrollo, pero no contribuye el rendimiento.

En esta fase hay una disminución de fijación de Nitrógeno, por la formación de vainas y fruto.

### **5.1.3 muestreo en madurez fisiológica**

En este muestreo las observaciones hechas por Ferrera y Espinosa (1990), se realizó cuando la planta complementa en su ciclo de vida y se puede arrancar o cortar, sin consecuencias negativas en la fisiología y peso de la semilla.

De los resultados obtenemos las siguientes observaciones: la raíz, tallo y hojas mostraron incrementos de peso seco hasta el final de la tercera etapa. Después, se presenta una disminución de materia seca en estos órganos.

La vaina mediana y grande presentaron incrementos continuos durante su formación, reflejando el máximo desarrollo de la semilla.

De observaciones hechas por Lobato (1979), Granados (1981) y Tanaka Fujita (1979) citados por Ferrera, se sabe que los órganos que presentan marcada disminución en su contenido de materia seca durante la etapa de llenado de grano, son: hojas, tallo y pericarpio. Al tiempo que las semillas presentan un aumento de peso seco, por lo que se considera que estos órganos son los que más contribuyen al rendimiento.

La variedad que mayor utilización de la biomasa acumulada en el período vegetativo en la fase inicial de la etapa reproductiva, se puede señalar como la más eficiente.

Es por esto que se presenta una mayor acumulación de fijación de Nitrógeno en comparación con la del llenado de vaina y siendo menor fijación que en la etapa de floración.

## 6 CONCLUSIONES

Bajo las condiciones en que se realizó el presente trabajo y en base a los resultados obtenidos, se concluye lo siguiente:

- 1.- En la etapa de floración hay una mayor fijación de Nitrógeno.
- 2.- La nodulación no fue tan efectiva como se esperaba, debido a las condiciones climáticas y la acidez del suelo.
- 3.- La especie que mayor porcentaje de Nitrógeno fijó fue la soya.

### 6.1 Sugerencias

Para que la nodulación sea más efectiva, que haya un mayor contenido de Nitrógeno total y una producción más alta en grano, se sugiere lo siguiente:

- 1.- Se debe analizar el suelo, para saber si las condiciones son propicias para la siembra de leguminosas.
- 2.- Tratar de recuperar el suelo, por medio de mejoradores químicos y orgánicos.

- 3.- Para un suelo ácido si se quiere sembrar leguminosas, se deberá utilizar semillas recubiertas con carbonato de Calcio o aplicar a la semilla fosfato de roca o inoculante a base de turba, antes de su siembra.
- 4.- Se sugiere tratar de seguir la continuación de este trabajo, en base a las variables citadas, para una mejor investigación y provecho para la fijación de Nitrógeno, por medio de leguminosas.

## 7 BIBLIOGRAFIA

- 1.- ALEXANDER, M. 1980. Introducción a la Microbiología al Suelo. Características del Rhizobium. Editorial AGT Editor, S.A.
- 2.- ALEXANDER, M. 1983. Problemas de la Nodulación y la Fijación en Nitrógeno en una Revaluación. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo. Volumen 8. Chapingo, Edo. de México.
- 3.- ALLEN on Allen, E.K. 1985. Características del Rhizobium, Leguminosas de Grano. Editorial Mundi-Prensa. Madrid-1.
- 4.- BERGENSEN, F.J. 1967. Morfología y Caracteres Culturales del Rhizobium. Leguminosas de Grano. Editorial Mundi-Prensa. Madrid-1.
- 5.- CASSMANN, WHITNEY y FOX. 1981. Problemas de la Nodulación y la Fijación en Nitrógeno en una Revaluación. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo. Volumen 8. Chapingo, Edo. de México.
- 6.- CIAT. 1985. Problemas de la Nodulación y la Fijación en Nitrógeno en una Revaluación. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo. Chapingo, Edo. de México.

- 7.- CIAT. 1987. Simbiosis leguminosa-Rhizobium. Evaluación, Selección y Manejo. Guía de estudio publicación Sección Desarrollo de Materiales para la Capacitación.
- 8.- CUBERO, J., MORENO, M. 1983. Leguminosas de Grano. Editorial Mundi-Prensa. Madrid-1.
- 9.- CUNNINGHAM, S. y Munns. 1984. Problemas de la Nodulación y la Fijación de Nitrógeno en una Revaluación. Chapingo, Edo. de México.
- 10.- DUDMAN, W.F. 1968. Morfología y Caracteres Culturales del Rhizobium. Leguminosas de Grano. Editorial Mundi-Prensa. Madrid-1.
- 11.- FERRERA, C.R., Espinosa, V.D. 1990. Revista Terra. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo. Volumen 8. Chapingo, Edo. de México.
- 12.- FRANCO, A.A. y DAY, M. 1980. Problemas de la Nodulación y Fijación de Nitrógeno en una Revaluación. Soc. Mexicana de la Ciencia del Suelo. Vol. 8. Chapingo, Edo. de México.
- 13.- FRED, E.B., Baldwin, J.L., McCoy, E. 1932. Taxonomía del Rhizobium. Leguminosas de grano. Editorial Mundi-Prensa. Madrid-1.
- 14.- GARCIA, C.P. 1990. Clasificación del Suelo del Valle de Zapopan, Jalisco en base a su Fertilidad. Tesis Prof. Fac. de Agronomía. U. de G. Inéd.

- 15.- GRAHAM y P.H. Parker, C.A. 1964. Taxonomía del Rhizobium. Leguminosas de Grano. Editorial Mundi-Prensa. Madrid-1.
- 16.- GRAHAM, P.H. y J.C. Rosas. 1977. Problemas de la Nodulación y la Fijación de Nitrógeno en una Revaluación. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo. Volumen 8. Chapingo, Edo. de México.
- 17.- GRAHAM et al. 1982. Problemas de la Nodulación y la Fijación de Nitrógeno en una Revaluación. Soc. Mexicana de la Ciencia del Suelo. Vol. 8. Chapingo, Edo. de México.
- 18.- GRAHAM, P.H. y S.R. Temple. 1984. Problemas de la Nodulación y la Fijación de Nitrógeno en una Revaluación. Soc. Mexicana de la Ciencia del Suelo. Vol. 8. Chapingo, México.
- 19.- GIBSON, A.H. 1961. Control del Medio Ambiente. Leguminosas de Grano. Editorial Mundi-Prensa. Madrid-1.
- 20.- GILLBERG, B.O. 1968. Factores que Influyen en la Fijación de Nitrógeno. Leguminosas de Grano. Editorial Mundi-Prensa. Madrid-1.
- 21.- H. AYUNTAMIENTO DE ZAPOPAN, JALISCO. 1992. 450 Aniversario. Características Agro-climatológicas del Valle de Zapopan. Manual de Zapopan "Tierra de Amistad y Respeto".

- 22.- INIFAP. 1989. Azufrado Peruano 87 y Azufrado Regional 87 Nuevas Variedades para el Estado de Sinaloa. Folleto No. 5.
- 23.- INIFAP. 1990. Guía para Cultivar Soya en el Estado de Sinaloa. Folleto Técnico No. 20.
- 24.- LIE, T.A. 1969. Problemas de la Nodulación y la Fijación de Nitrógeno en una Revaluación. Soc. Mexicana de la Ciencia del Suelo. Volumen 8. Chapingo, Edo. de México.
- 25.- LITHE, T. y Hills. 1979. Método Estadístico para la Investigación en la Agricultura. Editorial Trillas, México.
- 26.- MANNETJE, T.L. 1979. Agrupamiento por Efectividad Leguminosas de Grano. Editorial Mundi-Prensa. Madrid-1.
- 27.- MUNNS, D.N. 1968. Problemas de la Nodulación y la Fijación de Nitrógeno en una Revaluación. Soc. Mexicana de la Ciencia del Suelo. Volumen 8. Chapingo, Edo. de México.
- 28.- NIFTAL. 1985. Inoculante para Leguminosas y su Uso. Proyecto de Fijación de Nitrógeno por Leguminosas de Agricultura Tropical E.E.U.U. Servicio de Fertilizantes y Nutrición de las Plantas de la FAO. Dirección de Fomento de Tierras y Aguas. Organización de las Naciones Unidas para la

## Agricultura y la Alimentación. Roma.

- 29.- NUTMAN, P.S. 1952. Infección de la Raíz y Formación del Nódulo. Leguminosa de Grano. Editorial Mundi-Prensa. Madrid-1.
- 30.- PIHA, M.I; y MUNNS, D.N. 1978. Problemas de la Nodulación y Fijación de Nitrógeno en una Revaluación. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo. Vol. 8. Chapingo, Edo. de México.
- 31.- REVISTA de Investigación y Ciencia Científica. 1977. Fijación Biológica de Nitrógeno. Vol. No. 8. Editorial Prensa Científica. Barcelona.
- 32.- REYES, C.P. 1984. Diseño de Experimentos Aplicados. Resultados Experimentales y su Interpretación. Editorial Trillas. México.
- 33.- ROSAS, J.C. y F.A. Bliss. 1986. Problemas de la Nodulación y Fijación de Nitrógeno en una Revaluación. Soc. Mexicana de la Ciencia del Suelo. Vol. 8. Chapingo, Edo. de México.
- 34.- ROJAS, G. 1984. Fisiología Vegetal Aplicada. Editorial McGraw-Hill de México, S.A. México.
- 35.- SAINZ, I.F. 1974. El Cultivo de la Soya en México. El Nitrógeno como el Elemento Indispensable. Editorial La Gaceta Agrícola. México.
- 36.- SCHETTINI, T.M., GEBELMAN, H. y GERLOFF, G.C. 1987.

- Problemas de la Modulación y la Fijación de Nitrógeno en una Revaluación. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo. Vol. 8. Chapingo, Edo. de México.
- 37.- SEP. 1983. Manuales para la Educación Agropecuaria. Area Producción Vegetal: Frijol y Chicharo. Editorial SEP.
- 38.- VARGAS, A.A. y GRAHAM, P.H. 1988. Problemas de la Modulación y la Fijación de Nitrógeno en una Revaluación. Soc. Mexicana de la Ciencia del Suelo. Vol. 8. Chapingo, Edo. de México.
- 39.- VINCET, J.M. Manual Práctico de Rizobiología. Editorial Hemisferio Sur. Montevideo.
- 40.- ZARAZUA, C.B. 1982. Determinación de Proteína Bruta. Manual de Laboratorio de Bromatología. Facultad de Agronomía. U. de G.