

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**INOCULACION DE *Vicia villosa* R (Veza) Y *Melilotus alba* M (Trébol Dulce) CON  
CEPAS DE *Rhizobium* Y SU EFECTO COMO ABONOS VERDES EN LA  
FERTILIZACION DEL SUELO**

**TESIS**

**QUE EN OPCION AL TITULO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA**

**PRESENTA**

**BIOL. JESUS JAIME HERNANDEZ ESCAREÑO**

**MONTERREY N.L., MEXICO**

**JULIO DE 1998**





1080087111

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**INOCULACION DE *Vicia villosa* R (Veza) Y *Melilotus alba* M (Trébol Dulce) CON  
CEPAS DE *Rhizobium* Y SU EFECTO COMO ABONOS VERDES EN LA  
FERTILIZACION DEL SUELO**

**TESIS**

**QUE EN OPCION AL TITULO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA**

**PRESENTA**

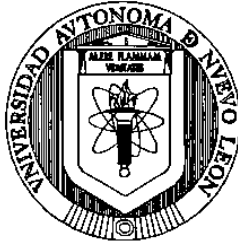
**BIOL. JESUS JAIME HERNANDEZ ESCAREÑO**

QR 113

14.



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO



**INOCULACION DE *Vicia villosa* R (Veza) Y *Melilotus alba* M (Trébol Dulce) CON  
CEPAS DE *Rhizobium* Y SU EFECTO COMO ABONOS VERDES EN LA  
FERTILIZACION DEL SUELO**

**T E S I S**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO  
DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA**

**POR**

**BIOL. JESUS JAIME HERNANDEZ ESCAREÑO**

**APROBADA:  
COMISION DE TESIS**

**M.C. HUGO ALBERTO LUNA OLVERA  
PRESIDENTE ( DIRECTOR)**

**M.C. LICET VILLARREAL TREVIÑO  
(SECRETARIO)**

**M.C. NABOR GONZALEZ GARZA  
(VOCAL)**

## ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICO.....	5
ANTECEDENTES.....	6
MATERIAL Y MÉTODOS.....	13
RESULTADOS.....	19
TABLAS.....	23
FIGURAS.....	30
DISCUSIÓN.....	37
CONCLUSIONES.....	43
LITERATURA CONSULTADA.....	44

## **AGRADECIMIENTOS**

**Al Laboratorio de Microbiología Industrial y del suelo de la Facultad de Ciencias Biológicas, del Departamento de Inmunología de la U.A.N.L.**

**Agradezco a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por todas las facilidades para la elaboración del presente trabajo.**

**Ing. M.C. Gildardo Carmona Ruíz , por su dirección, asesoría y consejos durante la realización de esta investigación**

**Q.B.P. M.C. Jorge Miguel Saldaña Acosta, , por todo el apoyo que me brindo durante la realización de la tesis, por su amistad y ayuda desinteresada ¡ Gracias !**

**Q.B.P. M.C. Hugo Alberto Luna Olvera mi agradecimiento por su constante apoyo y sus valiosas sugerencias en la realización de este trabajo.**

**Q.B.P. M.C. Licet Villarreal Treviño , por sus sugerencias acertadas y correcciones de este escrito.**

**Q.B.P. M.C. Nabor González, por su asesoría y atención prestada en la revisión de este trabajo.**

**Q.B.P. M.C. Francisco R. de la Garza Requena., por su motivación a continuar en mis estudios y experiencias durante el trabajo de investigación.**

**A todas aquellas personas que de alguna manera contribuyeron en la realización de esta tesis.**



## DEDICATORIA

**El presente trabajo es dedicado con especial cariño a mis padres:**

Sr. Gonzalo Hernández Avelar  
Sra. Catalina Escareño de Hernández.

Quienes siempre han inculcado en mi el espíritu de superación personal y profesional. A ellos con profundo respeto y amor.

**A mi esposa Yolanda:**

Por su apoyo interminable que siempre me ha brindado, por el estímulo que me dio para realizar siempre mis metas.

**A mis hijos:**

Angel Gustavo  
Jesús Jaime  
Dante Isai

A los que quiero mucho y siempre han sido un estímulo para mi.

**A mis hermanos:**

Ma. Antonia  
Alfonso Gerardo  
Ricardo  
Luz María

Por haber estado siempre conmigo y demostrarme su apoyo y cariño en todo momento.

**A MIS TIOS :**

Sr. Gonzalo Cervantes Uribe  
Sra. Ma. Mercedes Escareño de Cervantes

Por su apoyo incondicional desde el principio de mi carrera.

**A la Sra. María Luisa García de Castillo y Lucy,** por ser un ejemplo de dedicación, empeño y sabiduría.

**A mis amigos :** Ramiro Castillo, Carlos Fco, Lourdes Silva, Rodolfo Niño, Luis Edgar García, Ricardo Moreno, Antonio Cerda, Juan Llovera, Pablo Velázquez , Luciano Vázquez, José Inés Barajas y Víctor M. Riojas V.

## RESUMEN

En el presente trabajo se estudió el efecto de la inoculación de *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* ó *Vicia villosa* R. y *R. meliloti* a *Melilotus alba* M. en condiciones de campo y su influencia en la fertilidad del suelo al ser incorporados, así como la persistencia de las cepas durante un año después de su aplicación en el campo. El experimento constó de 3 ciclos; el primero, fue la inoculación de las leguminosas donde se tomó en cuenta peso seco, rendimiento (Kg/Ha) y nitrógeno total de las plantas antes de la floración, en este ciclo no se presentó diferencia significativa tanto para materia seca y verde entre los tratamientos para trébol inoculado y no inoculado, sin embargo sí existió diferencia significativa entre la veza inoculada y sin inocular, así como para el testigo en el que no se sembró ninguna leguminosa. Respecto al nitrógeno se pudo observar un efecto en la inoculación en la veza que presentó el valor mas alto de nitrógeno contra los demás tratamientos. El segundo ciclo, posterior a la incorporación de las leguminosas, comprendió la siembra de una gramínea, para evaluar la fertilidad del suelo proporcionada por los abonos verdes mediante el rendimiento en grano del maíz (Kg/Ha). Aquí se encontró que la veza inoculada aportó mayor fertilidad al suelo, puesto que el mayor rendimiento en grano fue el tratamiento con esta leguminosa (264.10 Kg/Ha). Los tratamientos con trébol inoculado y no inoculado, así como la veza sin inocular, no presentaron diferencia significativa entre ellos (178.76, 148.58 y 170.44Kg/Ha respectivamente). El tercero después de un año aproximadamente de haber iniciado el primer ciclo, se sembraron las leguminosas para obtener plantas noduladas y así valorar la distribución, persistencia o establecimiento de las cepas. Para el muestreo de las plantas, las parcelas en estudio se dividieron en 196 cuadros de 0.25 m<sup>2</sup>, para realizar la toma de muestras se utilizó la tabla de números aleatorios. Se contó el número de plantas y número de nódulos que contenían cada 0.25 m<sup>2</sup>, tomando 10 muestras por parcela. Para analizar la nodulación de las leguminosas se utilizaron los mapas de los valores interpolados por Krigin para ambas leguminosas. Los resultados indican que tanto *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* y *R. meliloti* se distribuyeron isotrópicamente con estructura espacial sin dependencia direccional. Finalmente para el monitoreo de los rizobios inoculados en campo se compararon los

Finalmente para el monitoreo de los rizobios inoculados en campo se compararon los patrones electroforéticos de proteínas de los homogenados de la cepa patrón con las cepas recuperadas de las plantas noduladas mediante geles de poliacrilamida-SDS, se encontró un modelo similar al encontrado en los homogenados de las cepas patrón utilizados al inicio del experimento.

## ABSTRACT

The effect of inoculation with *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* or *Vicia villosa* R. and *R. meliloti* to *Medicago alba* M. under field conditions and its influence on soil fertility when incorporated, as well as the strain persistence for a year after its application on the field was studied. The experiment was divided in three stages: first was the leguminous inoculation, where the dry weight, yield (kg/Ha) and total nitrogen of the plants before flowering was recorded; no significant difference was found in this cycle both for dry and green matter among treatments for inoculated and non-inoculated clover, however there was a significant difference between inoculated and non-inoculated *Vicia villosa* R, as well as for the control, in which no leguminous was planted. In regard to nitrogen, an effect was observed for the inoculated *Vicia villosa* R, which had the highest nitrogen value of all other treatments.

The second stage, posterior to the incorporation of leguminous, consisted in the seeding of a gramineous, in order to evaluate soil fertility given by green manure by measuring the yield in maize kernel (Kg/Ha). In this stage the inoculated *Vicia villosa* R, was found to give higher soil fertility, since the highest kernel yield was the treatment with this leguminous (264.10 Kg/Ha). Treatments with inoculated and non-inoculated clover, as well as the non-inoculated *Vicia villosa* R, showed no significant difference among them (178.76, 148.58 and 170.44 Kg/Ha, respectively). Stage three was after approximately one year after beginning of stage one, leguminous were planted to obtain nodulated plants and in that way to rate the strains distribution, persistence or establishment. For plant sampling, the parcels of land were divided in 196 squares of 0.25 m<sup>2</sup>, a random number table was used for sampling. The number of plants and nodules inside each 0.25 m<sup>2</sup> was counted, taking 10 plants for parcel of land. To analyze the leguminous nodulation, isolines of translated values were used by the Kriging method in 2 and 3 levels. Results showed that both *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* and *R. meliloti* were distributed isotropically with spatial structure without directional dependency.

Finally, for the screening of inoculated *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* in the field, the protein electrophoretic patterns of the homogenisates of the standard strain were compared with the strains recuperated from nodulated plants by means of polyacrilamide-SDS electrophoresis. The model found was similar to the model for the homogenisates of the standard strains used in the beginning of the experiment.

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el lento desarrollo de la producción de alimentos y fibras frente a un aumento constante de la población en México, ha traído como consecuencia la necesidad de establecer programas dinámicos que promuevan la utilización más adecuada de los recursos del campo y de esta manera aprovechar hasta el máximo su explotación con un inherente aumento en la producción agrícola. (Wellhausen, 1976). Una de las soluciones prácticas que se han aplicado en nuestro país con respecto al problema de escasez de alimentos ha sido el incremento de productos agrícolas mediante el uso de fertilizantes nitrogenados, los cuales se han utilizado con resultados aceptables en la mayoría de los casos. Sin embargo actualmente estos fertilizantes son adquiridos a un costo elevado, ya que para su elaboración se utilizan hidrocarburos, los cuales están en un constante aumento, por lo tanto los hace inaccesibles con el tiempo, sin considerar otros factores ecológicos, como la degradación microbiana de los mismos (Guzmán, 1982).

Una de las alternativas con alto potencial en la fertilización del suelo, es la utilización de bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico que se asocian con leguminosas, de estas la relación más importante es con el género *Rhizobium*, que posee la habilidad de penetrar los pelillos radiculares e inducir la formación de nódulos y transformar el nitrógeno atmosférico a amonio (una de las formas mejor asimilables para las plantas) (Alexander, 1980). Esta relación es interesante debido a que disminuyen el uso de fertilizantes nitrogenados, su aplicación tiene un bajo costo y mantiene buena fertilidad del suelo (Meade et al. 1985, Fisher. et al. 1985). Es por ello, necesario aprovechar al máximo el potencial de la interacción Leguminosa-*Rhizobium* mediante el uso de cepas compatibles con su hospedero homólogo en el campo.

La utilización de las leguminosas como abono verde ha sido uno de los recursos adecuados desde la antigüedad para mantener la fertilidad del suelo en forma de fertilizantes orgánicos (Baruco, 1970). Esta práctica consiste en sembrar plantas herbáceas con el exclusivo fin de incorporarlas al suelo, las cuales trae como consecuencia un incremento de la materia orgánica, aumento en la permeabilidad, adición de nitrógeno, fomenta la granulación aumentando la adsorción del agua,

reduce la erosión y disminuyen los escurrimientos de agua en el suelo. (De la Garza, 1971; Buckman and Brand, 1965; Anónimo, 1982.) Debido a que los suelos en el Estado de Nuevo León, en forma general presentan bajo contenido de materia orgánica, nitrógeno y algunos nutrientes como fósforo y potasio, lo cual representa una baja fertilidad del suelo, es por ello necesario buscar alternativas que ayuden a incrementar su rendimiento y a su vez disminuir el uso de fertilizantes químicos, estableciendo un programa de rotación de cultivos, mediante el uso de leguminosas como abono verde.

Existen algunos trabajos que se han hecho en la región sobre abonos verdes e inoculantes en varios aspectos (densidad de siembra, tipos de riego, inoculación a diferentes tipos de leguminosas, etc.). Sin embargo no se tienen reportes en los cuales se evalúe la respuesta de la inoculación de *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* a *Vicia villosa* Roth y *R. meliloti* a *Melilotus alba* Medick. Por lo tanto es necesario realizar una serie de estudios y valorar los efectos de estas asociaciones y determinar su potencialidad como fertilizantes orgánicos del suelo.

## **OBJETIVO GENERAL**

**Evaluar la inoculación con *Rhizobium* a nivel de campo de plantas leguminosas utilizadas como abono verde y el efecto de la incorporación sobre la fertilidad del suelo.**

### **Objetivos específicos:**

- 1) Seleccionar cepas infectivas y efectivas de *Rhizobium*, que sea compatibles a las leguminosas que se usarán como abono verde.**
- 2) Evaluar el efecto de la inoculación en las leguminosas e introducción en el campo.**
- 3) Evaluar el efecto de incorporación del abono verde y su influencia en el suelo sobre el rendimiento en grano del maíz, usada como planta indicadora de la fertilidad del mismo.**
- 4) Recuperar las cepas inoculadas en el campo.**

## ANTECEDENTES

Actualmente el uso de microorganismos en la agricultura como aportadores de nutrimentos para las plantas, fuente de factores de crecimiento, control de plagas (insectos) y enfermedades presenta una alternativa para ayudar a incrementar el rendimiento en diversos cultivos de interés agronómico. En la actualidad varios microorganismos son usados masivamente y otros podrian ser utilizados en el futuro conforme se obtenga información acerca de su fisiología y la forma de aplicación

Hoy en día los microorganismos más usados en la agricultura, entre otros, son las bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico del género *Rhizobium* el cual es capaz de establecer una relación simbiótica con las plantas principalmente de la familia Leguminosae (Elkan, 1981) y algunas plantas no leguminosas (Alexander, 1980). En esta relación la bacteria suministra amoniaco a la planta, el cual es asimilado por el sistema glutamina sintetasa-glutamato sintasa (Salminen and Streeter, 1987). La planta por su parte, dona esqueletos carbonados susceptibles de oxidación a la bacteria, lo que se conoce como "fotosintatos", dichos complejos se componen predominantemente de ácidos dicarboxílicos como succínico, málico, fumárico, etc. (Brill, 1973).

La utilización e incorporación al suelo de microorganismos del género *Rhizobium* apropiados para las leguminosas, implica una serie de factores que el investigador debe tomar en cuenta; uno de los principales, es determinar la necesidad de inoculación (en base al nitrógeno presente en el suelo), posteriormente aislar y seleccionar las mejores cepas y la utilización de un huésped adecuado. Moreno (1977), establece que las leguminosas que se introducen a una zona pueden o no encontrar el *Rhizobium* específico, por lo que es necesario hacer un estudio antes de su aplicación al cultivo, de esto sugiere:

- a) Determinar la existencia en el suelo de cepas que puedan infectar la leguminosa introducida.
- b) En el caso de que existan bacterias infectivas y efectivas, cuantificar su mayor capacidad de fijar nitrógeno en el laboratorio y comprobar su eficiencia en el campo.



La presencia de cepas nativas en el suelo y las diversas condiciones fisicoquímicas de éste, en gran medida son factores determinantes en muchas ocasiones para que la inoculación tenga éxito, aunque pueden encontrarse otros; como la incompatibilidad entre las cepas de *Rhizobium* disponibles comercialmente y las leguminosas inoculadas con ellos, manejo, almacenamiento y uso inadecuado de los inoculantes por parte de fabricantes, distribuidores y/o agricultores. Chávez (1977); Rensburg and Stridjom (1982), consideran que la capacidad de *Rhizobium* para persistir en el suelo en la presencia o ausencia de una leguminosa es una de las propiedades consideradas esenciales para ser usadas como inoculantes. Los mismos autores Rensburg and Stridjom (1985), en experimentos realizados en el sur de África con cepas de *Rhizobium* utilizadas como inoculantes para *Trifolium spp*, *Medicago spp*, *Glicine max* y *Lotus pedunculatus* se aislaron cepas a partir de estas plantas noduladas las cuales habían sido introducidas de 4 a 8 años antes. La formación de los nódulos por las cepas varió de un 17.7% para la soya a un 100% en el caso de *L. pedunculatus*. Brunel., et al (1988), encontraron una alta estabilidad y permanencia de *Bradyrhizobium japonicum* en suelos previamente inoculados (8 a 13 años antes) tal estabilidad fue confirmada mediante la comparación de cepas reaisladas de plantas noduladas comparadas con su respectiva cepa patrón, las cuales habían sido liofilizadas y almacenadas con anterioridad. Se obtuvieron un total de 115 aislamientos a partir de nódulos y 7 colonias directamente por un método serológico.

En los suelos, las cepas inoculadas generalmente están sujetas a los efectos de numerosos factores bióticos y abióticos (Cadwell and Weber, 1970) muchos de los cuales pueden actuar seleccionando las cepas, causando cambios genéticos en la población; esto puede ser desfavorable en el proceso de infectividad y efectividad de *Rhizobium* y/o competitividad ( Damirigi., et al. 1967). Por otro lado, los rizobios autóctonos han sido una barrera para la introducción de nuevas cepas a través de la inoculación, resultando esta práctica en inaceptables y bajos de colonización y establecimiento de las cepas aplicadas en los años de inoculación. Por lo tanto, un entendimiento de la naturaleza de poblaciones de *Rhizobium*, de los factores que afectan su distribución y dinámica así como su papel en la competencia y persistencia es de considerable significancia en la agricultura (Jhonson., et al. 1965). Debido a estos factores, Singleton., et al. (1982), estudiaron el efecto de la salinidad sobre el crecimiento; (tiempo de duplicación) de *Rhizobium* , en todas las cepas y especies probadas decreció cuando la conductividad eléctrica del medio de

cultivo alcanzó de  $1.2 \text{ mS cm}^{-1}$  a  $6.7 \text{ mS cm}^{-1}$  (equivalente 15% al agua salada). Sin embargo Hua., et al. (1982), aislaron una cepa de *Rhizobium sp* del desierto de Sonora a partir de nódulos de mezquite la cual fue capaz de crecer en un medio definido conteniendo por encima de 500 mM de NaCl, una concentración cercana a la del agua de mar, por lo tanto es una cepa de considerable importancia para estudios de las bases bioquímicas de la tolerancia a la salinidad.

Para determinar si la sobrevivencia de *Rhizobium phaseoli* en suelos ácidos podría predecirse en base a su tolerancia en medio de cultivo, Lowendorf and Alexander (1983), probaron 16 cepas, de las cuales todas crecieron a un pH de 4.6 en el laboratorio, pero solo las que toleraron un pH de 3.8 sobrevivieron en suélo con valores de pH de 4.1 a 4.6. Las cepas tolerantes a pH bajos en medio de cultivo fueron tolerantes a altas concentraciones de aluminio (50mM) a diferencia de las que crecieron a pH de 4.6, la tolerancia de aluminio varió de 0-10mM. Otros de los factores físicos que afectan la sobrevivencia de *Rhizobium* en el suelo se encuentran, la temperatura y desecación, como en los trabajos realizados por Osa-Afiana and Alexander, (1982), en donde probaron cepas de *Rhizobium sp* creciendo en medio manitol suplementado con suelo no estéril a temperaturas de 29 y 35°C, mientras que a 40°C no existió crecimiento. Cuando se colocaron cepas en suelo no estéril a 42°C por 7 días, el número de células declinó muy poco. Las cepas difirieron ampliamente en su tolerancia a la desecación a 30°C en suelo estéril y no estéril y menos de 1 al 50% de las bacterias aún fueron viables después de 11 días no se encontró ninguna relación evidente a la tolerancia de desecación y el grado de aridez del sitio de donde las bacterias fueron aisladas o su tasa de crecimiento en medio de cultivo pero las cepas no productoras de polisacárido extracelular fueron frecuentemente mas tolerante que las productoras de polisacárido.

Entre los factores biológicos, los protozoarios juegan un papel muy importante en el control del número de bacterias alrededor de la planta y la rizósfera. Se han realizado diversas investigaciones con cepas de *Rhizobium* en suelos estériles y no estériles inoculados con estas bacterias y se ha encontrado una relación directa en la disminución de los rizobios con un incremento en la densidad de población de los protozoarios (Danso, 1975; Ramírez and Alexander, 1980; Hossain and Alexander, 1984). Así mismo se ha encontrado que la presencia de bacteriófagos y algunas bacterias como *Erwinia herbicola* reducen la densidad de población de *Rhizobium sp*

afectando posiblemente la nodulación, compitiendo por los nutrientes con las cepas, o bien por desplazamiento de los rizobios en la superficie de la raíz mediante la ocupación de los sitios de infección, por la producción de algunas toxinas. (Evans., et al. 1979a ; Evans., et al. 1979b; Barnet, 1980; Werquin., et al. 1988; Lawson., et al. 1987).

Los estudios ecológicos requieren de la identificación específica de estos microorganismos en medio de cultivo y en el campo a partir principalmente de plantas noduladas por lo que el uso de métodos propios y adecuados; así como la estabilidad de marcadores es de primordial importancia en los estudios de recuperación, la interpretación adecuada y caracterización de las cepas que son incorporadas al suelo. Para lo cual a través del tiempo se han venido utilizando una serie de técnicas tradicionalmente aplicadas en estudios con *Rhizobium* estos incluyen serología (Fuquay., et al. 1984; Fuhrmann and Wollum II 1985; Olsen and Rice, 1989), inmunofluorescencia (Kingley and Bohlool, 1981, Schmidt, 1973, resistencia intrínseca a antibióticos (IAR) (Brockman and Bezdicek, 1989; Habte, 1985); patrón electroforético de proteínas (Jenkins and Bottomley, 1985; Kamicker and Brill, 1985); homología de DNA (Wheatcroft and Watson, 1988; Lindstrom., et al. 1990), uso de anticuerpos monoclonales (Wright., et al. 1986); susceptibilidad a bacteriófagos (Bromfield., et al, 1986; Stacey., et al, 1984; Werquin., et al. 1988).

Grandes extensiones agrícolas de nuestro país se caracterizan por presentar bajos contenidos de materia orgánica, lo cual refleja negativamente en sus propiedades físicas químicas y biológicas, convirtiéndose en una limitante en la productividad. Esto puede corregirse mediante el incremento de materia orgánica en estos suelos, a través de la adición de abonos orgánicos, cuyo efecto benéfico se traduce en un mayor rendimiento y calidad de los cultivos. Para lograr lo anterior es necesario generar nuevas técnicas de obtención de fertilizantes a partir de recursos renovables que sean de fácil manejo y de menor gasto.

La aplicación de abonos verdes como materia orgánica al suelo es uno de los recursos por acudir para mantener la fertilidad de los suelos y mejorar sus características orgánicas. El efecto de los abonos verdes sobre el suelo es que proveen; materia orgánica, nutrientes vegetales, mejoran las condiciones físicas, aumentan la actividad microbiana además proporciona un ambiente favorable para

muchas actividades químicas y biológicas (Donahue., et al. 1981; Tamhane., et al. 1978; De la garza, 1971) Los abonos verdes deben tener tres características importantes:

- a) Un crecimiento rápido.
- b) Habilidad de crecer bien en suelos pobres.
- c) Follaje abundante y succulento.

A más rápido crecimiento mayor es la posibilidad de aptitud para ser introducido en una rotación y uso económico como medio de mejoramiento del suelo. A mayor contenido de humedad en el abono verde, más rápida es la descomposición y más pronto se obtienen resultados (Buckman and Brady, 1982).

La mayoría de las veces se utilizan leguminosas como abonos verdes, ya que éstas presentan las siguientes ventajas:

- 1) Son fuente de nitrógeno orgánico combinado.
- 2) Liberan y movilizan las sustancias minerales fomentando la estructura franca del suelo.
- 3) Abastecen también al subsuelo de materia orgánica incrementando espacio libre entre las partículas del suelo en forma natural.
- 4) Como medio de defensa contra la erosión (Anónimo, 1982).

Se llevaron a cabo experimentos de campo durante 5 años para determinar la cantidad de nitrógeno fijado biológicamente y posteriormente proporcionarlo al maíz (*Zea mays L*) con cero labranza, mediante la siembra de varias leguminosas anuales como abono verde; la veza vellosa (*Vicia villosa Roth*), la veza flor grande (*Vicia grandiflora W. Koch var. ketailbeliana*) y el trébol carmesí (*Trifolium incarnatum L*). Las leguminosas fueron comparadas con una cobertura de residuos de maíz y de centeno (*Secale cereale L*) como abono. La veza vellosa produjo mas materia seca. Con el mas alto porcentaje de N en las plantas de maíz y mas N inorgánico en el suelo que las otras leguminosas. El rendimiento promedio en el grano de maíz siguiente a la siembra de la veza fue aproximadamente de 2,500 kg./ha (2.5Mg/ha) mayor que el obtenido con lá cobertura de residuos de maíz o la siembra de centeno como abono (Ebelhar., et al. 1984).

Groya and Sheaffer, (1975), determinaron el efecto de manejo de la cosecha y preparación de suelo usando trébol dulce [*Melilotus officinalis*(L) Lam.], trébol rojo (*Trifolium patrense* L.) y alfalfa (*Medicago sativa* L) analizando la materia seca y nitrógeno sobre la producción de materia seca y N recuperable en un cultivo de zacate Sudán [*Sorghum bicolor* (L) Moench] como indicador de la fertilidad. Las leguminosas tuvieron un rendimiento similar, total por estación en rendimiento de nitrógeno (261 Kg./ha-1), en materia seca radicular (1.4 Mg/ha-1) y nitrógeno (30Kg/ha-1), y finalmente el rendimiento de nitrógeno por plantas totales (325 Kg/ha-1). Los mejores resultados se encontraron cuando las leguminosas no se incorporaron en comparación cuando se incorporó la planta completa. La selección de las tres leguminosas presentó poco efecto sobre el rendimiento de materia seca o toma de nitrógeno además el método de trillaje utilizado en este trabajo no tuvo un efecto consistente sobre los mismos parámetros.

Westcott and Mikkelsen (1987), compararon el efecto de la veza (*Vicia beghalæsis* L.) y sulfato de amonio sobre patrones de disponibilidad de nitrógeno por la planta, recuperación de nitrógeno en la cosecha y la producción en grano en cultivos de arroz. El sulfato de amonio fue mas efectivo en incrementar las concentraciones de N extraído en el inicio del crecimiento, mientras que la veza fue menor. La producción de grano fue altamente dependiente sobre la toma de N; optimizaron a 10.1 Mg/ha con 120 Kg/ha para sulfato de amonio y 8.4 Mg/ha para la veza. El nitrógeno recuperable para el sulfato de amonio fue de 55.6% mientras que para la veza de 27.9 %. La tasa de mineralización de los abonos verdes fue un factor limitante para realizar una buena comparación con el nitrógeno inorgánico.

Galván (1981), determinó el establecimiento y rendimiento de forraje de dos especies de veza; *Vicia villosa* R. y *Vicia sativa* L., con tres densidades de siembra: 130, 170 y 220 plantas por metro cuadrado. Se encontró una diferencia altamente significativa en la producción de materia verde y seca entre especies siendo la veza vellosa la mejor. Con respecto a las densidades de siembra no se encontró diferencia significativa en la producción de forraje verde y seco.

Por otra parte Zamudio (1974), realizó una prueba de 4 leguminosas de invierno como abono verde; alfalfa, trébol Kenlandia, trébol hubam y veza común. Se evaluó

el efecto de estas leguminosas sobre la producción de materia seca, encontrando que el trébol hubam, alfalfa y la veza fueron mejores. En cuanto a la producción de sorgo en grano, la veza común fue la que dio mayor rendimiento, aproximadamente 1 Ton/ha comparada con el testigo sin abono verde. Sánchez (1960), establece que con algunas leguminosas (veza y trébol) es posible obtener hasta 25 Ton/ha de materia verde, lo que proporciona al suelo hasta 120 Kg de nitrógeno por ha. Esto equivale a una aplicación de aproximadamente 600 Kg de  $\text{NH}_4\text{SO}_4$  /ha, así mismo se han encontrado casos en que la siembra de estas leguminosas en tiempo de invierno ha permitido obtener un aumento de 3 Ton. de maíz y de 1.5 Ton. de trigo por ha, comparados con los tratamientos sin leguminosas, dando un promedio de 1 Ton/ha de maíz y media ton/ha de trigo.

Las leguminosas como abono verde presentan un gran potencial en la productividad y fertilidad del suelo, solo que hasta la fecha existe poca información disponible concerniente a la evaluación cuantitativa de la fijación simbiótica del nitrógeno, con las leguminosas de pradera tales como la veza vellosa (*Vicia villosa Roth*), el trébol dulce (*Melilotus alba L.*), alfalfa (*Medicago sativa L.*) entre otras, por lo que Lynd., et al. (1980), estudiaron durante tres años la influencia de la defoliación mediante un pastoreo simulado (cortes) en la producción de la planta, la nodulación y la actividad nitrogenasa en anthesis en la veza vellosa, inoculada con *Rhizobium leguminosarum* (ATCC 10314). Se lograron incrementos significativos en el retoñamiento cuando se efectuaron 3 cortes a los 45, 96 y 180 días, además se incrementó el peso húmedo de los nódulos, el número de los nódulos y el nivel de la actividad nitrogenasa, las correlaciones fueron significativas para los niveles de actividad nitrogenasa con peso máximo, número de retoños, peso y número de nódulos para las plantas que recibieron los tres cortes. El número de nódulos fue significativamente correlacionado con el peso total de la planta. El peso y número de nódulos fueron negativamente correlacionados debido a un gran desarrollo de los nódulos

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Material biológico

Se utilizaron cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* y *R.meliloti* procedentes del cepario del laboratorio de microbiología industrial y del suelo. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León.

- \* semillas de veza vellosa (*Vicia villosa* Roth) Fertimex
- \* semillas de trébol dulce (*Melilotus alba* Medick.)
- \* semillas de maíz variedad blanco alemán-10 proporcionado por el
- \* banco de germoplasma de la Facultad de Agronomía U.A.N.L.

### Selección de cepas bajo condiciones de invernadero

Se utilizó el sistema de jarras Leonard modificado, la cual contenía arena de río como soporte, se esterilizaron a 121°C durante dos horas en autoclave, posteriormente se sembraron 6 semillas por jarra previamente desinfectadas por inmersión en HgCl<sub>2</sub>, por un tiempo de 2 min, posteriormente se eliminó el bicloruro de mercurio y las semillas se lavaron 6 veces con agua destilada estéril sembrándolas en las jarras Leonard después de 10 días ya germinadas las plantas se procedió a hacer un raleo dejando 2 plántulas por jarra; la inoculación de las cepas se aplicó cuando el cultivo alcanzó la fase logarítmica, conteniendo aproximadamente una cantidad de  $1 \times 10^9$  cel/ml, agregando 15ml por jarra aproximadamente, el experimento se realizó por triplicado y su control nitrogenado y sin nitrógeno. Se dejaron las plantas en el invernadero durante 30 días aproximadamente antes de la floración. Para la evaluación de la infectividad y efectividad se tomó en cuenta: tamaño y peso seco de la planta, (Vincent, 1975; Somasegaran and Hallidy, 1982) .

### Producción del inoculante a pequeña escala

Las cepas se activaron en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 100 ml de caldo extracto de levadura manitol.(ELM). Se mantuvieron en agitación rotatoria 200 r.p.m. a una temperatura de 28°C durante 24-48 horas en un agitador mecánico (Lab-Line Orbital Incubator Shaker No. 3595)

## **Propagación**

Las cepas se inocularon en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de caldo ELM por 48 h en agitación a 200 r.p.m. a 28°C, posteriormente se agregó 5 % del cultivo activado a un matríz nefelométrico con 25 ml de caldo ELM, con un inóculo de 12.5 ml del cultivo para cada matríz, se incubaron a 200 rpm a una temperatura de 28°C hasta alcanzar 350 UK en un fotocolorímetro con filtro rojo. Este cultivo se utilizó para la impregnación del soporte.

## **Impregnación del soporte y preparación de inoculante**

El material de soporte utilizado fue a base de turba, proporcionada por Fertimex, previamente esterilizada, mediante calor húmedo a 121°C durante dos horas por 3 días consecutivos, colocados en botes de lámina para facilitar la impregnación. Se mezcló homogéneamente en forma aséptica el soporte y el inóculo que contenían  $10^9$  cel/ml, hasta obtener del 50-60% de humedad en el soporte. El inoculante se transfirió a bolsas de polietileno oscuras y se dejó madurar por tres días a temperatura ambiente (Promedio 25-30°C), posteriormente se mantuvieron a 4°C hasta el momento de la aplicación en el campo.

## **Control de calidad del inoculante**

Una vez terminado el tiempo de maduración de los inoculantes se determinó la sobrevivencia y pureza de las cepas, se realizaron cuentas viables periódicas (3, 15 y 30 días) y tinciones de Gram haciendo diluciones y sembrando en medio de agar extracto de levadura manitol rojo congo (ELMARC), se incubaron a una temperatura de 28°C durante 24-48 horas. El trabajo de campo se llevó a cabo en la unidad experimental de la Facultad de Agronomía de la U.A.N.L. que se localiza en el municipio de Marín Nuevo León, encontrándose a una altitud de 375 msnm, y sus coordenadas geográficas 25°53' Latitud Norte y 10°03' Latitud Oeste

## **Análisis físico y químico del suelo**

Se realizaron en dos etapas: la primera fue antes de sembrar las leguminosas y la segunda posterior a la incorporación de los abonos verdes. Se extrajeron 2



muestras a una profundidad de 0-30 cm, de cada bloque, posteriormente se formó una muestra compuesta en base a cada tratamiento, fueron secadas al aire, tamizadas y analizadas en el laboratorio de microbiología industrial y del suelo de la Facultad de Ciencias Biológicas y laboratorio de suelos de la Facultad de Agronomía de la U.A.N.L.

**Los métodos utilizados para determinar las propiedades físicas y químicas del suelo, fueron las siguientes:**

Reacción del suelo pH.....	Potenciómetro relación 1:2
Textura.....	Hidrómetro de Bouyoucos
Materia orgánica.....	Método de Walkley-Black
Determinación de capacidad de retención de agua.....	Método gravimétrico
Nitrógeno total.....	Método de kjeldhal

### **Diseño de campo**

Con la debida anticipación a la siembra se efectuó la preparación del terreno con las labores comunes de la región, como son: barbecho, rastra y nivelación; se delimitaron las parcelas y se distribuyeron de acuerdo al diseño de Bloques al azar con 5 tratamientos y 3 repeticiones. Los tratamientos fueron los siguientes:

- a) trébol inoculado
- b) trébol no inoculado
- c) veza inoculada
- d) veza no inoculada
- e) testigo (sin sembrar y sin inocular)

### **Siembra**

La siembra se realizó en 3 ciclos: el primero consistió en la inoculación de las leguminosas (*Vicia villosa R.* y *Melilotus alba M.*) con las cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* y *R meliloti* respectivamente, y producción de materia verde de los abonos.

## **Inoculación a nivel de campo**

La densidad de siembra para la veza fue de 25 kg/ha, mientras que para el trébol fue de 18 Kg/ha. En este caso, las semillas se colocaron en bolsas de polietileno oscuras, se agregó suficiente solución de glucosa al 40% (como adherente) para que se humedezca totalmente la superficie de la semilla y garantizar una buena peletización. Se agregó el inoculante para cada leguminosa. Para la veza fue de  $5.3 \times 10^9$  y de  $7.5 \times 10^9$  células por gramo de turba para el trébol. Adicionalmente, se mezcló vigorosamente sobre la semilla de tal forma que la misma quede perfectamente recubierta. Finalmente, la semilla con alta probabilidad de nodulación se sembró al voleo tapando la semilla con rastrillo. La emergencia se inició a los seis días después de la siembra, las labores culturales proporcionadas al experimento consistieron principalmente en riegos y deshierbes. Se efectuaron solo 2 riegos tanto para el trébol como para la veza, siendo el primero un mes después de la siembra y el segundo y último se efectuó a un lapso de un mes aproximadamente. El número de riegos se redujo debido a que existieron precipitaciones durante el resto del experimento.

## **Producción de los abonos verdes**

Para determinar la producción de materia verde, se tomaron dos muestras de un metro cuadrado por cada repetición, se pesaron y se promedió la producción por parcela, del cual se hizo una extracción para ponerla a secar y cuantificar materia seca y el porcentaje de nitrógeno contenido en ésta.

## **Incorporación al suelo**

La incorporación de los abonos verdes se llevó a cabo tres meses después de su siembra antes de la floración, utilizando el arado de disco, haciendo pasar después la rastra para reducir el tamaño de los terrones y hacer un cubrimiento total del suelo. El segundo ciclo posterior a la incorporación, comprendió la siembra de la planta indicadora de la fertilidad del suelo proporcionada por el abono verde, en este caso se utilizó semilla de maíz variedad blanco alemán 1-10 con una densidad de siembra de 68 Kg./ha; se sembró a chorro, a capacidad de campo. Posteriormente se aclaró, dejando las plantas a una distancia aproximada de 25-30 cm, entre cada una

de ellas. Se realizó una aplicación de insecticida Sevin 80 granulado directamente al cogollo (dosis de 15 Kg/ha), debido a que se presentó un ataque de gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*). Para medir la fertilidad del suelo se cuantificó el rendimiento en grano, después de 3 meses de establecido el cultivo, se tomaron 10 plantas al azar de cada tratamiento, para evitar error por el efecto de orilla se eliminaron dos surcos mientras que para el bordo fueron 2 hileras de plantas para cada tratamiento, se peso el grano y se midieron las plantas de las diferentes parcelas. La interpretación de los resultados fueron sujetos a un análisis de varianza (ANOVA) y la comparación de medias por la diferencia mínima significativa (DMS).

Para medir el establecimiento y persistencia además de la distribución de las cepas, se llevó a cabo el tercer ciclo del experimento, el cual consistió en la siembra de las dos leguminosas en las parcelas con los tratamientos ya establecidos que con anterioridad se había efectuado la preparación del terreno con las labores comunes de campo. La siembra se realizó de la misma forma anteriormente descrita a excepción de que las plantas no fueron reinoculadas. Las parcelas en estudio se dividieron en 196 cuadros de 0.25 m<sup>2</sup>. Para realizar la toma de muestras se utilizó la tabla de números aleatorios (Spiegel,-1970 ), se contó el número de plantas y nódulos que contenían cada 0.25 m<sup>2</sup>, tomándose 10 muestras por parcela, las cuales fueron puestas en bolsas de polietileno y mantenidas en refrigeración a 4°C, posteriormente los nódulos se esterilizaron de acuerdo a Vincent (1970), las cepas se recuperaron en medio ELMA (agar extracto de levadura-manitol).

#### Distribución de las cepas

Para analizar la nodulación (distribución de las cepas) de veza vellosa y trébol dulce por *Rhizobium*, se utilizaron, las isolíneas de valores interpolados por el método de Kriging en 2 y 3 planos espaciales (Delhomme, 1978, Burges and Webster, 1980; Wollum and Cassal, 1989)

**Patrón electroforético de las cepas recuperadas de plantas noduladas de *Vicia villosa* R. y *Melilotus alba* M. en geles de poliacrilamida-SDS**

De las cepas recuperadas a partir de nódulos de las plantas inoculadas a nivel de campo, se sembró en matraces de un litro con 200 ml de caldo ELM a una temperatura de 28-30°C a una velocidad de 200 r.p.m. durante 48 has, las células fueron cosechadas por centrifugación a 3000 r.p.m. , el paquete celular se lavó 2 veces con amortiguador tris pH 7.6, las células se suspendieron en 0.2 ml de la mezcla 1:1 del amortiguador tris pH 7.6 mas el amortiguador para la muestra (10% (vol/vol) de glicerol, 5% (vol/vol) de 2-mercaptoetanol, 3% (peso/vol) de SDS y Tris-HCl 62 mM, pH 6.8 ), posteriormente las células se lisaron a vapor durante 2 min a una temperatura de 100°C, se colocaron en hielo hasta el momento de su uso. El gel que se utilizó fue de dos fases (concentrador 4 % y separación 10 %). Una vez polimerizado el gel se colocó en la cámara de electroforesis, se agregó el amortiguador de cámara (14.4 g de Glicina, 3.0 g de Tris Base, 1.0 g de SDS y 800ml de agua destilada a un pH de 8.3, posteriormente se agregaron 35 ul de los homogenados de proteínas totales de las cepas recuperadas de las plantas noduladas que contenían 5 ul de azul de bromofenol al 0.1 % y 5 ul de amortiguador de muestra (100 ml de Glicerol, 5 ml de 2-mercaptoetanol, 30 ml de SDS al 10% y 12.5 ml de Wper Tris 4X). La electroforesis se corrió a 100 Volts ( 50 mA ) por 12 h en cada comida se incluyó una mezcla de marcadores de pesos moleculares conocidos (anhidrasa carbónica 29 kd; albúmina de huevo 45 kd, albúmina bovina 66 kd;  $\beta$  fosforilasa 97 kd;  $\beta$  galactosidasa 116 kd y miosina 205, kd). Para la tinción del gel , se utilizó una solución de azul de coomassie R- 250 (metanol 45 %, ácido acético 9 %, y azul de coomassie 0.25 %), éste se sumergió por 10 a 15 min con agitación suave en la solución de tinción; en seguida se destiño por inmersión en una solución ácido acético-metanol (90 ml de ácido acético, 450 ml de agua destilada y finalmente 450 ml de metanol), durante 30 min. La decoloración final se hizo en ácido acético al 10 % por 12 a 17 h aproximadamente (Kamicker and Winston, 1986; Jenkins and Bottomley, 1985; Wright, et al. 1986, Walker, J. M. 1984, Scheleif, R. F. and P. C. Wensink, 1984; Laemmli, 1970.

## RESULTADOS

Los datos obtenidos de la selección de cepas en base a su capacidad de infectar (formar nódulos en raíces) y efectividad (promover el desarrollo de follaje en su hospederero homólogo), se muestran en la Tabla 1 y 1A. Inicialmente se probaron 9 cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* con *Vicia vellosa* R. (veza vellosa) y 7 cepas de *R. meliloti* con *Melilotus alba* M. (trébol dulce). La capacidad de nodular se evaluó a nivel de invernadero en jarras Leonard donde se encontró que las cepas; Rle-9, C-3, C-2 y RleCB-1 mostraron la mayor nodulación o afinidad con veza vellosa, mientras que las cepas Rm-1, Rm-2 y Rm-3 se asociaron mas efectivamente con trébol dulce. Las cepas que no tuvieron capacidad de infectar se eliminaron y se procedió a realizar una nueva selección de efectividad con las cepas nodulantes a las leguminosas probadas. Las plantas se colocaron nuevamente en jarras Leonard y se utilizaron como tratamientos control, plantas con nitrógeno y sin nitrógeno. El análisis de varianza obtenido para estos tratamientos nos muestra que para el experimento con las cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*, la veza inoculada con la cepa Rle-9 presentó diferencia significativa en el peso del follaje en comparación a las demás cepas y el testigo sin nitrógeno, sin embargo, no existió diferencia significativa con respecto al testigo nitrogenado, resultando este último y el tratamiento con la cepa Rle-9 los que presentaron mayor peso seco (Tabla 2). De las tres cepas de *R. meliloti* que se usaron para inocular trébol dulce, Rm-2 presentó un rendimiento significativamente mayor con respecto a las cepas Rm-1, Rm-3 y el testigo sin nitrógeno y de la misma forma que el otro cultivo, el tratamiento nitrogenado produjo mayor cantidad de materia seca. (Tabla 3). De acuerdo a los resultados anteriores se seleccionaron para los subsecuentes experimentos las cepas Rle-9 para veza vellosa y la Rm-2 para trébol dulce.

Para comprobar que los inoculantes no presentaban contaminación o disminución del número de microorganismos durante el transcurso de maduración, se realizó un control de calidad mediante cuenta viable en placa. Los resultados se muestran en la Tabla 4, donde las cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* (Rle-9) y *R. meliloti* (Rm-2) se mantuvieron viables durante el período de estudio, alcanzando cifras de  $5.3 \times 10^9$  y  $7.5 \times 10^9$  unidades formadoras de colonias (UFC)

por gramo de turba respectivamente. Además no se observó desarrollo de otro tipo de microorganismo.

La comparación del análisis físico y químico del suelo a una profundidad de 0-30 cm antes y después de la incorporación de los abonos verdes (trébol dulce y veza vellosa) nos muestran una mejoría importante en la capacidad de retención de agua, la aportación de nitrógeno, así como la cantidad de materia orgánica depositada en el suelo, tanto en los tratamientos inoculados y no inoculados, posterior a la mineralización de las leguminosas, comparado con los testigos. Sin embargo la comparación entre los tratamientos sin inoculación e inoculados, estos últimos favorecieron mejor a la fertilidad. La textura que presentó el suelo a través de todo el experimento fue migajón arcilloso, mientras que la variación en el pH fue mínima y no significativa (tabla 5).

La producción de los abonos verdes (*Vicia villosa* R. y *Melilotus alba* M) inoculados y no inoculados con las cepas Rle-9 y Rm-2 respectivamente, así como la materia seca incorporada y el porcentaje de nitrógeno de las plantas, se muestran en la Tabla 6 donde se aprecia que los tratamientos del trébol inoculado y no inoculado, no presentaron diferencias significativas tanto para la materia verde como para la materia seca, sin embargo, sí existe diferencia significativa contra los tratamientos de veza inoculada y sin inocular, así como para el testigo en el que no se incluyó alguna leguminosa. Respecto al nitrógeno se pudo observar que sí existió un efecto de la inoculación en donde la veza inoculada mostró el valor más alto de nitrógeno contra los demás tratamientos.

Después de la incorporación de los abonos verdes, y su mineralización en el suelo, se sembró maíz variedad Blanco Alemán 1-10, en las mismas parcelas en las que se habían puesto a crecer. Aproximadamente 90 días después se realizó la toma de muestras para hacer las diferentes determinaciones en las parcelas experimentales. En este estudio se encontró que la veza inoculada aportó mayor fertilidad al suelo, puesto que el rendimiento mas alto en grano del maíz fue el

tratamiento con esta leguminosa (264.10 Kg/Ha). Los tratamientos con trébol inoculado y no inoculado, así como la veza sin inocular, no presentaron diferencia significativa entre ellos, (178.76, 148.58, 170.44 Kg/Ha respectivamente), sin embargo, en comparación al testigo sin nitrógeno, todos los tratamientos fueron significativamente diferentes (108.85 kg/Ha). Estos datos son mostrados en la Tabla 7.

La distribución, persistencia y/o establecimiento de las cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* y *R. meliloti* inoculados a *Vicia villosa* R y *Melilotus alba* M, respectivamente, después de un año de su aplicación en el campo, utilizando los mapas de los valores interpolados por Kriging. Los resultados indican que las dos cepas se distribuyeron isotrópicamente con estructura espacial sin dependencia direccional. En la Figura 1 se presentan los sitios de muestreos de las parcelas experimentales de las leguminosas inoculadas con *Rhizobium* a nivel de campo. Los mapas en dos planos de los valores interpolados por Kriging del número de nódulos para veza y trébol dulce, nos muestran que para ambas leguminosas, las cepas de *Rhizobium* se distribuyeron heterogeneamente en toda el área de estudio. Sin embargo, para *V villosa* R la mayor concentración de nodulación, se encuentra entre las coordenadas (3.71, 4.4 m), así mismo, la menor concentración se localizó en diferentes puntos del área de muestreo (X= 8.75, 9.0, 13.0; Y= 4.0, 5.57, 2.6). Mientras que para el trébol dulce se encontraron dos sitios localizados entre las coordenadas para las X 2.0 y 5.63 m y para las coordenadas de las Y 2.0 y 14.0 m, donde hubo mayor nodulación, y el valor mas bajo fue localizado entre las coordenadas( 17.5, 1.86 ) Figuras 2 y 3 . Por otro lado en las Figuras 4 y 5, se muestran los mapas en tres planos de valores interpolados por Kriging del número de nódulos para las leguminosas, donde podemos observar que los puntos más altos corresponden a la mayor concentración y los más bajos a los sitios donde la nodulación fue menor.

La Figura 6 nos muestra el patrón electroforético de las proteínas totales de los homogenados de *R. leguminosarum* biovar *viciae* donde se observa en el primer carril los marcadores de pesos moleculares conocidos (anhidrasa carbónica 29, albúmina de

huevo 45, albúmina bovina 66 ,  $\beta$  fosforilasa 97,  $\beta$  galactosidasa 116 y miosina 205 (Kd) ; en el segundo carril tenemos el perfil de proteínas de la cepa que se utilizó para la inoculación de la leguminosa al inicio del experimento, mientras que en el tercero, cuarto y quinto carril, se presentan los perfiles de las cepas recuperadas de plantas noduladas de los tratamientos después de un año de la aplicación del inoculante. Se encontró que el patrón de proteínas de las cepas recuperadas, mostraron un modelo similar al encontrado en el homogenado de la cepa patrón, en los cuales se localizaron 5 bandas con pesos moleculares de aproximadamente; 116, 45, 29, 18 y de 14 Kd.

La Figura 7 nos muestra el patrón electroforético de las proteínas de homogenados de *R meliloti*, donde, de igual manera el primer carril se tiene el marcador de pesos moleculares conocidos, en el carril 2 se tiene el perfil de proteínas de la cepa de *R meliloti* aplicada al inicio del experimento mientras que en los carriles 3, 4 y 5, los perfiles proteínicos de las cepas recuperadas después de un año. También se encontró que las cepas obtenidas de plantas noduladas presentaron un modelo similar al encontrado en la cepa que se inoculó al inicio del estudio. Se localizaron tres bandas de pesos moleculares de aproximadamente: 205, 97 y 29 Kd.



## RESULTADOS

TABLA I

INFECTIVIDAD DE LAS CEPAS DE *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* y  
*R. meliloti* sobre *Vicia villosa* R y *Melilotus alba* M

HOSPEDERO		CEPAS de <i>Rhizobium leguminosarum</i> biovar <i>viciae</i>							
<i>Vicia villosa</i> R.	C1	C-29	C-18	C-14	C-16	Rle-9	C-3	C-2	RLCB-1
	-	-	-	-	-	+	+	+	+

- = Ningún nódulo

+ = Nodulación

TABLA IA

HOSPEDERO	CEPAS de <i>Rhizobium meliloti</i>						
<i>Melilotus alba</i> M.	Rm-1	Rm-2	Rm-3	Rm-4	Rm-16	Rm-12	Rm-14
	+	+	+	-	-	-	-

- = Ningún nódulo

+ = Nodulación

TABLA 2

SELECCIÓN DE CEPAS DE *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* MEDIANTE LA EFECTIVIDAD (PESO SECO FOLLAJE) EN *Vicia villosa* R BAJO CONDICIONES DE INVERNADERO, UTILIZANDO EL SISTEMA DE JARRA DE LEONARD MODIFICADO.

TRATAMIENTO	PESO SECO DEL FOLLAJE (g/PLANTAS)				
CEPAS	REPETICIONES				DMS*
	I	II	III	X	
Testigo nitrogenado.	0.75	0.70	0.82	0.75	a
Testigo sin nitrógeno	0.23	0.33	0.22	0.26	c
Rle-9	0.67	0.70	0.69	0.68	a
Rle-3	0.40	0.43	0.42	0.41	b
RL-2	0.42	0.41	0.42	0.41	b
RLCB-1	0.40	0.39	0.39	0.39	b

\*DMS 0.5% de significancia 0.0701

TABLA 3

SELECCIÓN DE CEPAS DE *Rhizobium meliloti* MEDIANTE LA EFICIENCIA (PESO SECO DE FOLLAJE) EN *Melilotus alba* M. BAJO CONDICIONES DE INVERNADERO UTILIZANDO EL SISTEMA DE JARRA LEONARD MODIFICADO.

TRATAMIENTO	PESO SECO DEL FOLLAJE (g/PLANTAS)				
CEPAS	REPETICIONES				DMS*
	I	II	III	IV	
Testigo nitrogenado	1.30	1.20	1.20	1.23	a
Testigo sin nitrógeno	0.84	0.76	0.76	0.78	c
Rm-1	0.82	0.80	0.84	0.82	c
Rm-2	1.06	1.10	1.08	1.08	b
Rm-3	0.80	0.86	0.80	0.82	c

\*DMS 0.75 nivel de significancia 0.075

TABLA 4

CONTROL DE CALIDAD DE LOS INOCULANTES DE  
*Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* (I) y *R. meliloti* (II) POR CUENTA VIABLE EN  
 PLACA.\*

		TIEMPO (DIAS)		
		0	15	30
INOCULANTE		UFC/ g DE INOCULANTE ( $10^8$ )		
I		33	42	53
II		27	54	75

- Experimento realizado por duplicado en medio extracto de levadura manitol rojo congo (ELMARC)

TABLA 5

ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DEL SUELO A UNA PROFUNDIDAD DE 0-30 cms. ANTES Y DESPUES DE LA INCORPORACION DEL TREBOL Y VEZA INOCULADO Y NO INOCULADO

A		N T E S			D E S P U E S				
	pH	% CAPACIDAD DE RETENCION DE AGUA	% NITROGENO TOTAL	% DE MATERIA ORGANICA		pH	% CAPACIDAD DE RETENCION DE AGUA	% NITROGENO TOTAL	% DE MATERIA ORGANICA
INOCULADO									
Trébol	8.2	42.7	1.70	1.3	INOCULADO	8.3	56.5	2.5	2.2
Veza	8.2	42.5	1.69	1.3	Veza	8.3	62.5	3.6	2.4
NO INOCULADO									
Trébol	8.2	42.5	1.69	1.3	INOCULADO	8.3	44.5	2.2	1.5
Veza	8.2	42.7	1.70	1.3	Veza	8.3	50.5	2.5	1.8
Testigo	8.2	42.5	1.72	1.2	Testigo	8.3	44.5	1.8	1.5

TABLA 6

RENDIMIENTO DE MATERIA VERDE, SECA Y PORCIENTO DE NITROGENO EN PLANTAS INOCULADAS Y NO INOCULADAS INCORPORADAS AL SUELO

TRATAMIENTO	RENDIMIENTO EN FORRAJE VERDE (Kg/ha)	MATERIA SECA (Kg/ha)	% DE* NITROGENO
Trébol inoculado	11,000.00 <sup>a</sup>	2,719.8 <sup>a</sup>	1.0
Trébol no inoculado	8,450.00 <sup>a</sup>	2,819.1 <sup>a</sup>	0.9
Veza inoculada	1,425.00 <sup>a</sup>	351.5 <sup>b</sup>	1.8
Veza no inoculada	754.6 <sup>b</sup>	294.9 <sup>b</sup>	1.0
Testigo (malezas)	512.0 <sup>b</sup>	310.2 <sup>b</sup>	0.4
DMS	3.47	1,231.6	

Los datos fueron evaluados por análisis de varianza a un nivel de significancia  $P=0.05$

\*Análisis realizados por duplicado mediante el método Kjeldhal

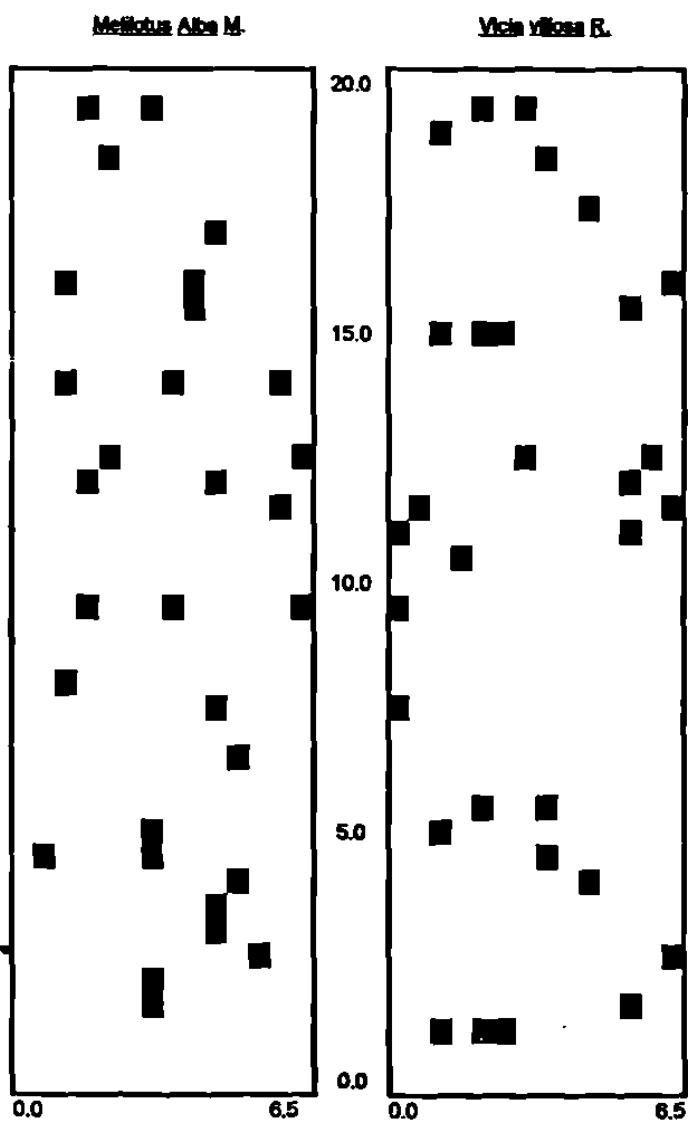
TABLA 7

EFFECTO DE LA INCORPORACION DE TREBOL Y VEZA SOBRE LA ALTURA DE LAS PLANTAS Y EL RENDIMIENTO EN GRANO DE MAIZ.

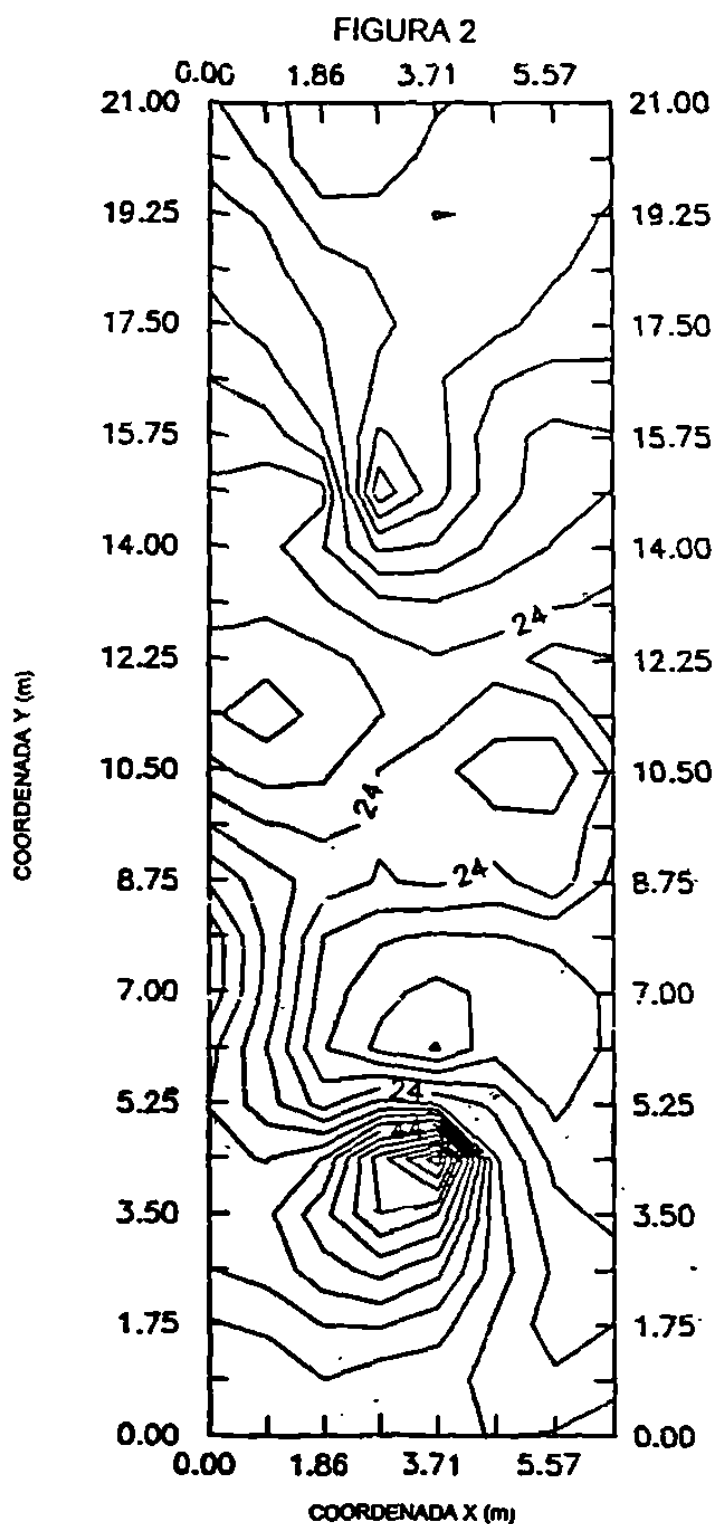
TRATAMIENTO	RENDIMIENTO DEL MAIZ (Kg/ha)
Trébol inoculado	178.76 <sup>ab</sup>
Trébol no inoculado	148.58 <sup>ab</sup>
Veza inoculada	264.10 <sup>a</sup>
Veza no inoculada	170.44 <sup>ab</sup>
Testigo (malezas)	124.5 <sup>b</sup>

Los datos fueron evaluados por análisis de varianza a un nivel de significancia P= 0.05

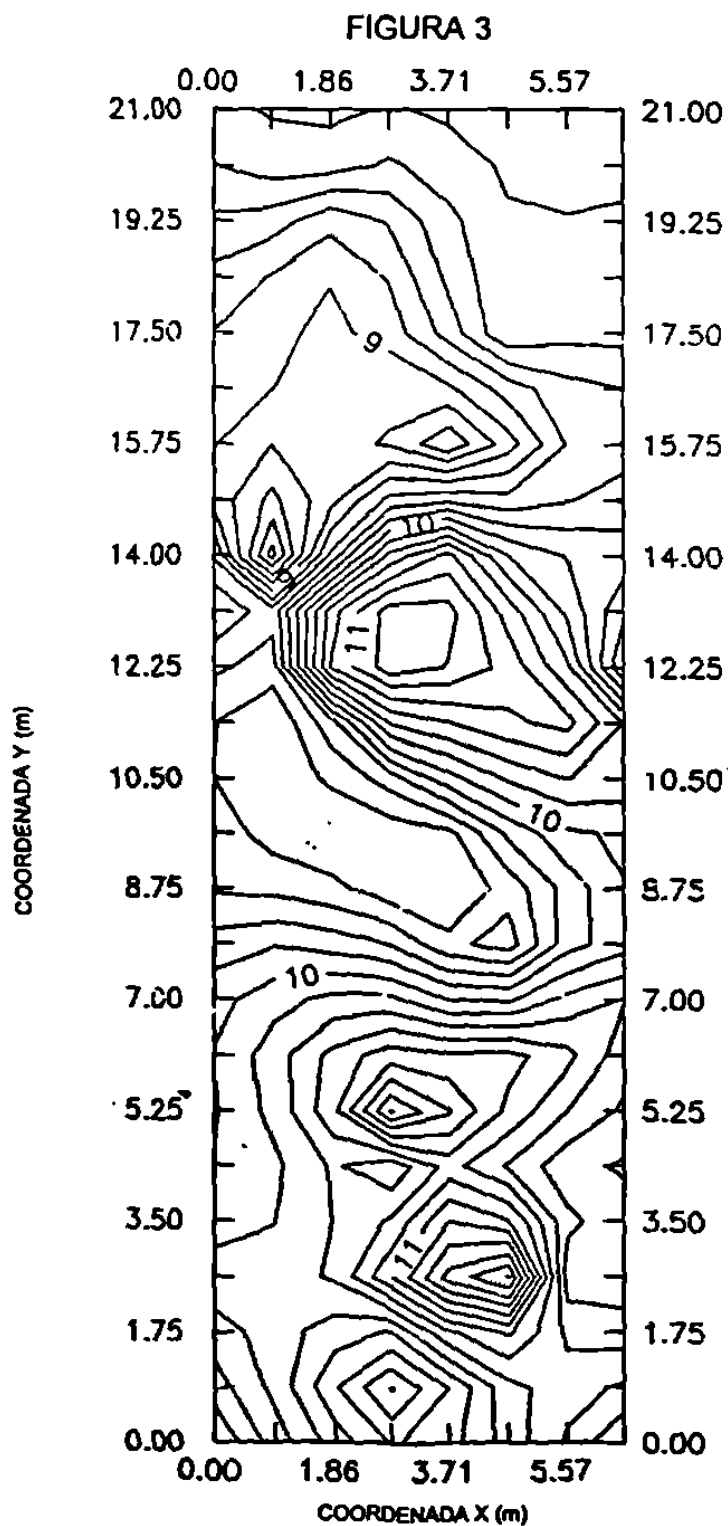
Figura 1.-Sitios de muestreo aleatorio en las parcelas experimentales, Marín, N. L.





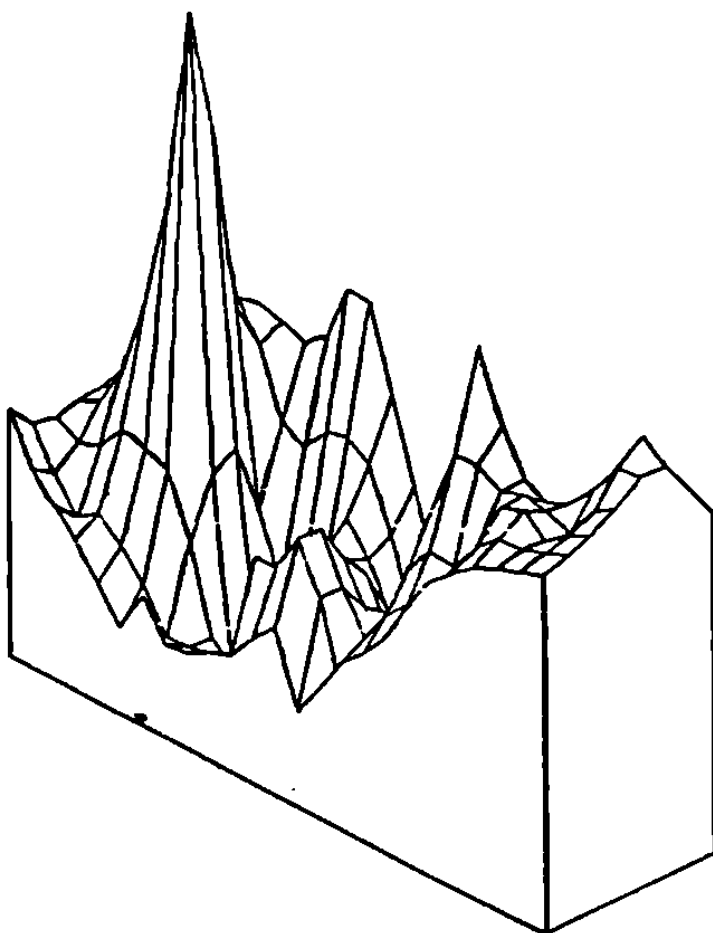


MAPA EN DOS PLANOS DE VALORES INTERPOLADOS  
POR KRIGING DEL NÚMERO DE NÓDULOS  
POR PLANTA *Vicia villosa* R.



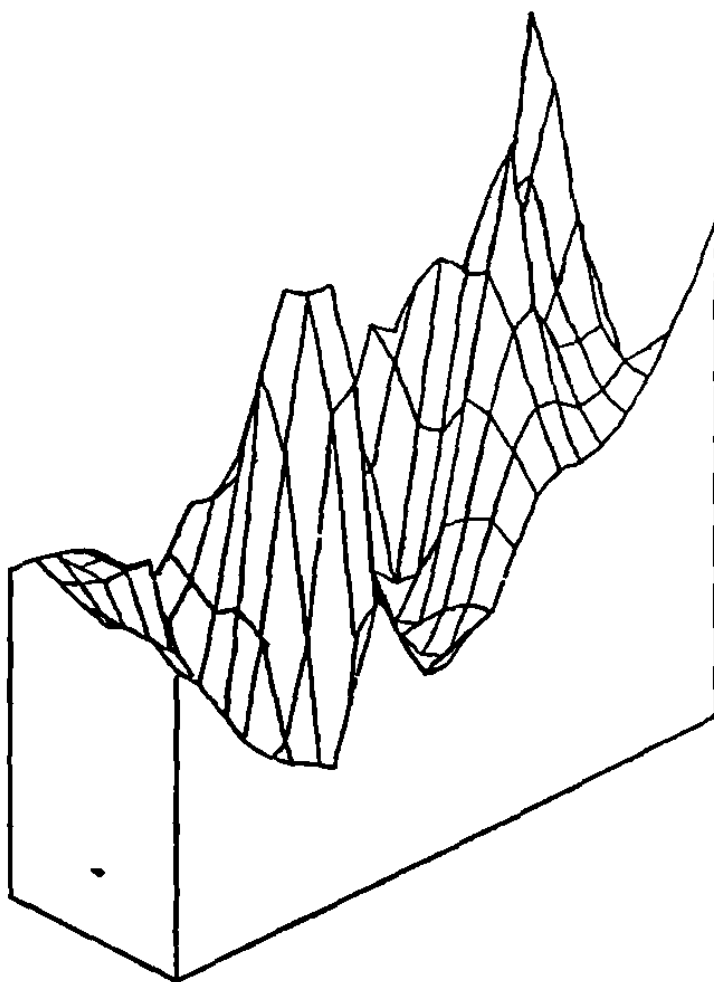
**MAPA EN DOS PLANOS DE VALORES INTERPOLADOS  
POR KRIGING DEL NÚMERO DE NÓDULOS  
POR PLANTA *Melilotus alba* M.**

FIGURA 4



MAPA EN TRES PLANTAS DE VALORES INTERPOLADOS  
POR KRIGING DEL NÚMERO DE NÓDULOS  
POR PLANTA EN *Vicia villosa* R.

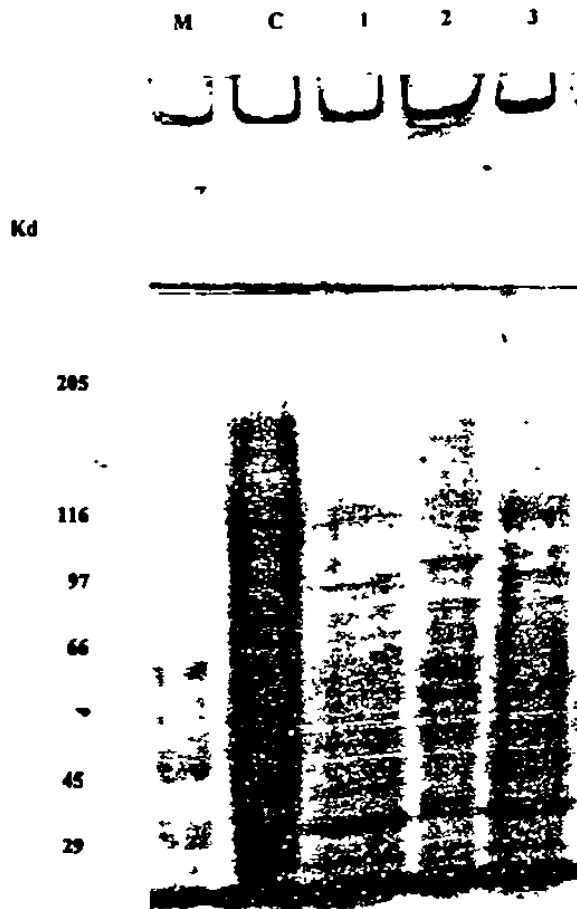
FIGURA 5



MAPA EN TRES PLANOS DE VALORES INTERPOLADOS POR KRIGING DEL  
NUMERO DE NODULOS POR PLANTA EN *Melilotus alba* M.

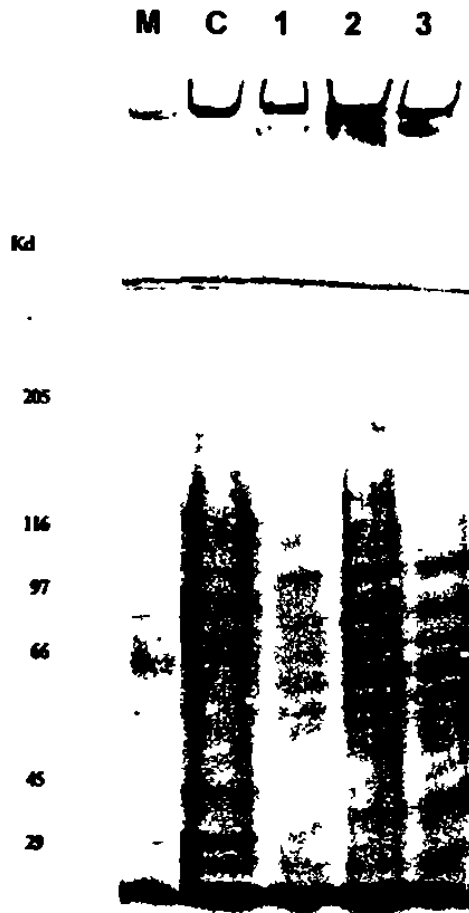
FIGURA 6

PATRÓN ELECTROFORÉTICO DE PROTEÍNAS DE *Rhizobium leguminosarum* biovariedad *viciae*.



M.- Marcador, C.- Cepa patrón,  
1.- R1e1, 2.- R1e2, 3.- R1e3.

FIGURA 7

PATRÓN ELECTROFORÉTICO DE PROTEÍNAS DE *Rhizobium meliloti*

M.- Marcador de PM, C.- Cepa patrón,  
1.- Rme1, 2.- Rme2, 3.- Rme3.

## DISCUSION

En el experimento de la selección de cepas, que sirvió para determinar la afinidad bacteriana con las dos leguminosas a utilizarse, se encontró que de las 9 cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* solo 4 formaron nódulos con veza vellosa, mientras que de 7 para trébol dulce solo 3 fueron afines. Esto no es raro ya que en estudios que se han realizado con respecto a la falta de afinidad o infectividad de las cepas, se ha encontrado que esto puede ser debido a que existe cierta especificidad entre las bacterias y las plantas principalmente el factor importante es la adsorción de los microorganismos a la pared celular de las raíces para el establecimiento de la relación simbiótica entre *Rhizobium* - leguminosa tal como lo mencionan Dazzo and Brill (1977), en estudios sobre los sitios receptores de la raíz en trébol y alfalfa inoculadas con *R. trifolii*; encontraron que existe unión específica a los pelillos radiculares del trébol pero no con la alfalfa; varias técnicas inmunológicas han demostrado la presencia de un determinante antigénico similar tanto en los polisacáridos asociados a la superficie de *R. trifolii* como en las raíces del trébol. Este determinante antigénico es único inmunológicamente al sistema *R. trifolii*- trébol y no es detectado a la superficie celular de otras cepas de *Rhizobium*. (Dazzo and Hubbell, 1975). Se ha encontrado además que existe una disminución de la adsorción a los pelillos radiculares de las cepas incapaces de infectar contra las que sí lo pueden hacer, esto es debido a que existe una lectina multivalente con un azúcar específico (2- desoxiglucosa) capaz de reconocer ó aglutinar células de numerosas cepas infectivas de *R. trifolii* (incluyendo revertantes infectivas) pero no con diferentes cepas no infectivas (Dazzo., et al. 1976)

Debido a las investigaciones anteriores y a los datos proporcionados posiblemente algunas de las cepas probadas carecen de algún determinante antigénico que ayude a reconocer la bacteria con su hospedero y llegue a formar la relación simbiótica de la manera más óptima para lograr los mejores resultados

La utilización ó incorporación de los rizobios al suelo como inoculante, implica una serie de factores que se deben tomar en cuenta: el inóculo que se agrega al

soporte (turba, composta, suelo, etc.), debe mantener su viabilidad alta durante el tiempo de maduración y ser óptima para cada bacteria, así como la capacidad de infectividad y efectividad en el campo (Thompson, 1980).

En los inoculantes a pequeña escala que se prepararon para veza y trébol dulce, las cepas no solo se mantuvieron viables, sino aumentaron gradualmente hasta alcanzar un número de  $10^8$  UFC/g de turba, en un tiempo de maduración de 4 semanas, el cual algunos investigadores lo consideran suficiente para lograr la máxima densidad de población, tal es el caso de Materon and Weber (1985), quienes trabajaron con *R. trifolii*, con inoculantes a base de turba, carbón vegetal y vermiculita, en cuatro semanas de inoculación, donde la población excedió de  $10^9$  organismos por gramo de inoculante para todos los soportes probados. Después de este tiempo la población declinó, pero permaneció razonablemente alta durante un periodo de 15 semanas.

Los resultados encontrados para los inoculantes de veza y trébol dulce se consideran aceptables, debido a que en México no existen normas que ayuden a uniformizar el criterio para el control de calidad de los inoculantes, sin embargo a nivel internacional, los estándares aceptables de rizobios viables en inoculantes para leguminosas varía de acuerdo a cada país. Por ejemplo: Australia requiere un mínimo de  $1 \times 10^6$  células viables por gramo de inoculante, Canadá especifica un mínimo de  $1 \times 10^6$  rizobios viables por gramo de inoculante, mientras que Holanda tiene altos estándares que requiere un mínimo de 4 a  $25 \times 10^9$  células por gramo de inoculante (SNFBN, 1986, Burton, 1981). Nuestros resultados están de acuerdo a lo establecido para Australia y Canadá.

El análisis físico y químico del suelo después de la incorporación y mineralización del abono verde, reveló algunos cambios favorables en varios aspectos de la fertilidad del suelo (Materia orgánica y nitrógeno, etc.), así como también en las condiciones físicas (capacidad de retención de agua). Lo anterior se vio más marcado principalmente en los tratamientos que fueron inoculados con



*Rhizobium*, esto es debido en parte, fundamentalmente al proceso de fijación biológica del nitrógeno atmosférico proporcionado por las bacterias alojadas en los nódulos de la raíz y que posteriormente los abonos verdes al descomponerse lo depositan al suelo. (Jansen and Brady, 1985.). Es importante tomar en cuenta que casi las tres cuartas partes del nitrógeno proteico que se acumula en el follaje y no en las raíces, es debido a la transformación del nitrógeno atmosférico por las bacterias a compuestos asimilables de este elemento para la planta, si el follaje se corta para hacer heno y únicamente se entierran las raíces, puede haber una pérdida leve del nitrógeno del suelo y es posible que después de todo, no exista beneficio hacia el suelo, con el proceso de inoculación é incorporación de los abonos verdes (Tamhane, 1978). Para este caso los abonos verdes utilizados en este experimento toda la planta se incorporó al suelo para permitir su descomposición y mejorar la fertilidad del suelo.

La textura del suelo de acuerdo a la proporción y tamaño de partículas, se mantuvo constante, resultando iguales en el primero y segundo muestreos efectuados para cada uno de los tratamientos, siendo del tipo migajón arcilloso ).

La inoculación de trébol dulce por *R meliloti* (Rm-2) y *R. leguminosarum* biovar *viciae* (Rle-9) a veza vellosa, no presentó un efecto significativo en la producción de materia verde y seca, en ambas leguminosas. Sin embargo, en los tratamientos con *Vicia villosa* R. Cabe mencionar que la producción de materia verde en sus rendimientos, debido al arrastre que sufrieron las plantas, provocado por las fuertes precipitaciones que se presentaron durante el experimento. Por otra parte, la influencia de la fijación de nitrógeno proporcionado por la cepa Rle-9 se pudo observar en el porcentaje de nitrógeno proporcionado por esta bacteria a la planta que fue del 1.8 %.

Los resultados de producción de materia verde y seca a partir de los abonos verdes obtenidos en este experimento son bajos (trébol inoculado 1.1 ton/ha y sin inocular, 0.89 ton/ha ; la veza sin inocular 0.754 Ton/ha y 0.140 Ton/ha con la veza

inoculada de materia verde; mientras que la materia seca para trébol inoculado y sin inocular fue de 0.27 Ton/ha y 0.028 Ton/ha respectivamente, así también para la veza sin inocular e inoculada se obtuvo 0.0294 Ton/ha y 0.0351 Ton/ha respectivamente), comparados con lo obtenido por Baruco , (1979), donde el trébol hubam alcanzó 20.27 Ton/ha de materia verde y 5.05 Ton/ha de materia seca, mientras que la veza 1.94 Ton/ha y 0.54 Ton/ha ; así como también los porcentajes de nitrógeno encontrados en las dos leguminosas fue más alto 2.66 y 2.26 % , respectivamente que lo obtenido en el presente trabajo (1.0 y 1.8 % ). Millar (1964), a diferencia de Baruco(1979), encontró que la veza produjo más materia seca que el trébol dulce ( 4,307 y 1,622 Ton/ha respectivamente ), lo cual también difiere con lo encontrado en esta investigación.

La baja producción en materia verde y seca de las plantas en éste experimento pudo deberse a diversos factores entre ellos las temperaturas altas (30-37 °C) que se presentaron en el transcurso de este trabajo ya que la óptima varía entre 15 y 20°C aunque soportan temperaturas inferiores de 0°C; las precipitaciones pluviales, que en este experimento fueron copiosas y se produjo acarreo de plantas principalmente de veza, así como la fecha de siembra , tal es el caso en el trabajo realizado por Reyes,(1989), quien encontró que la veza produjo mayor materia verde y seca en fechas que variaron del 3 de Noviembre, 17 de Noviembre y 3 de Diciembre ; para el 3 de Nov. se produjeron 12.01 y 3.52 Ton/ha de materia verde y seca, mientras que para el 17 de Nov. 12.59 y 4.76 Ton/ha , así mismo para la fecha del 3 de Dic. fue de 8.0 y 5.01 Ton/ha de materia verde y seca respectivamente, siendo la mejor fecha de siembra el 17 de Noviembre. Para este experimento se sembró en fechas de marzo a mayo donde se presentaron ciertas condiciones adversas para el desarrollo óptimo del trabajo aquí presentado.

Las parcelas de veza inoculada e incorporada al suelo fueron las que presentaron el mayor rendimiento en grano de maíz (264.10 Kg/ha) con respecto a los demás tratamientos de trébol inoculado (178.76 Kg/ha) trébol sin inocular (148.58 Kg/ha, veza no inoculada), (170.44 Kg/ha y el testigo (108.85 Kg/ha).

Para este experimento aún y cuando la veza inoculada presentó menor aportación de materia verde y seca que los tratamientos de trébol inoculado y sin inocular, de acuerdo a los resultados, la veza inoculada aportó mayor fertilidad al suelo, probablemente porque la descomposición de la planta sea más fácil, ya que esta leguminosa es rastrera y menos fibrosa que el trébol y de esta manera la aportación de nitrógeno y carbono al suelo pudo ser mas eficiente. (Buckman, 1982), bajo las condiciones aquí probadas

Millar, (1964), encontró valores más altos a los nuestros en la cosecha de maíz utilizando veza de invierno y trébol dulce como abono verde (1,022 y 917 Kg/ha ), sin embargo estos resultados son promedio de 5 años del uso de las leguminosas. Al igual que Baruco, (1979), obtuvo 3.7 y 2.97 Ton/ha en grano de maíz híbrido h 412 que usando trébol dulce y veza como abono verde para la fertilización del suelo.

Aún y cuando los resultados de producción en grano del maíz para este experimento fueron bajos comparados con otros trabajos realizados con las mismas leguminosas para la fertilidad del suelo se pueden considerar relativamente buenos debido a que no se consideraron algunos factores importantes para lograr mejores resultados alcanzados en otras investigaciones con las mismas leguminosas utilizadas en este trabajo.

El éxito de la relación *Rhizobium*-leguminosa dependerá principalmente de la persistencia de las cepas y de su habilidad para competir con poblaciones de rizobios ya establecidas en el suelo, por lo que en este trabajo con respecto a la distribución y persistencia de las cepas de *R leguminosarum* biovar *viciae* a veza vellosa y *R meliloti* a trébol dulce, después de un año de su aplicación en el campo, se encontró una buena respuesta del establecimiento al ser recuperadas las cepas a partir de plantas noduladas en el campo. La estabilidad de los inoculantes se confirmó por comparación de cepas aisladas con su respectiva cepa patrón, utilizando el perfil de proteínas en geles de poliacrilamida al 10 % de las bacterias aplicadas al inicio del experimento. La estrategia utilizada en este trabajo para el monitoreo de las cepas es

aceptable ya que existen diversas investigaciones utilizando esta técnica para determinar el establecimiento y persistencia de las cepas en subsecuentes estaciones de siembra. (Jenkins and Bottomley, 1985; Hickey., et al . 1987; Fuquay., et al 1984 ). Aunque existen procedimientos más específicos además del perfil de proteínas , la serología, tipificación con fagos, resistencia intrínseca a antibióticos, perfil de plásmidos, propiedades inmunológicas, patrones de hibridización de DNA, así como perfiles de restricción de DNA, de estas propiedades, todas permanecen estables en el suelo, con excepción de alguna variación en la resistencia intrínseca a antibióticos. (Lindstron., et al. 1990; El Hassan., et al. 1986; Bromfield., et al. 1986; Brockman and Bezdícek, 1989; Demézas and Bottomley, 1986; Sadowsky., et al. 1987).

## CONCLUSIONES

- 1) Las cepas R1e-9 de *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* y Rm-2 de *Rhizobium meliloti* fueron seleccionadas en base a su infectividad y efectividad a *Vicia villosa* R (veza) y *Melilotus alba* M. (trébol dulce), respectivamente.
- 2) La inoculación de veza vellosa con *R. leguminosarum* biovar *viciae* y trébol dulce con *R. meliloti* no mostró el efecto significativo esperado en la producción de materia verde y seca.
- 3) La incorporación al suelo de veza inoculada con *Rhizobium* fue el tratamiento que presentó el mejor rendimiento en grano de maíz comparado con la veza no inoculada y el trébol inoculado y sin inocular, así como contra el testigo.

## LITERATURA CONSULTADA

1. Anónimo, 1982. Manual de agricultura; departamento de agricultura de Iowa, E. U. A. C. E. C. S. A. pp: 201-202,397-410.
2. Alexander, M. 1980. Introducción a la microbiología del suelo. Segunda edición. Ed. John Wiley and Sons. New York. pp: 333-340.
3. Brill, J. W. 1973. Fijación biológica del nitrógeno. Investigación y ciencia. Ed. P. C. S. A. México 8: 44-54.
4. Bronfield, E. S. P., I. B. Sinha and S. Wolnatz. 1986. Influence of location, host cultivar, and inoculation on the composition of naturalized populations of *Rhizobium meliloti* in *Medicago sativa* nodules. Appl. Environ. Microbiol. 51:1077-1089.
5. Brockman, F. J., and D. F. Bezdicsek. 1989. Diversity within serogroups of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* in the Palouse region eastern Washington as indicated by plasmid profiles, intrinsic antibiotic resistance, and topography. Appl. Environ. Microbiol. 55: 109-115.
6. Baret, Y. M. 1980. The effect of rizobiophages on populations of *Rhizobium trifolii* in the root zone of clover plants. Can. J. Microbiol. 26:572-576.
7. Brunel, B., J. Č. Cleyet- Marel, P. Normand and R. Bardin. 1988. Stability of *Bradyrhizobium japonicum* inoculants after introduction into soil. Appl. Environ. Microbiol. 52:2636-2642.
8. Buckman, H. O., and N. C. Brady. 1982. Naturaleza y propiedades de los suelos. Reimpresión, 1985. Editorial Hispano Americana, S. A. de C. V. México, D. F. pp: 541-547.
9. Baruco Ruiz, C. A. 1979. Efecto de diferentes leguminosas como abono verde en la producción de maíz tardío para grano, en la región de General Escobedo. N. L. Tesis profesional. Facultad de Agronomía. U. A. N. L.

10. Cadwell, B. E., and D. F. Weber. 1970. Distribution of *Rhizobium japonicum* serogroups in soybean nodules as affected by planting dates. *Agronomy. J* 62:12-14.
11. Chávez, R. M. 1977. Efecto de la fertilización con N, P, Co, Fe y el manejo de dos cepas como inoculante (*R phaseoli*) sobre la nodulación, acumulación de nitrógeno y rendimiento del frijol. *Revista Agrociencia* No. 27: 79-94.
12. Dazzo, F. B. and D. H. Hubbell. 1975. Cross-reactive antigens and lectin as related to host specificity in the *Rhizobium* clover symbiosis. *Appl. Environ. Microbiol.* 32: 166-171.
13. Dazzo, F. B. and W. J. Brill. 1977. Receptor site on clover and alfalfa roots for *Rhizobium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 1017-1033.
14. Dazzo, F. B., C. A. Napoli, and D. H. Hubbell. 1976. Adsorption of bacteria to roots as related to host specificity in the *Rhizobium* clover symbiosis. *Appl. Environ. Microbiol.* 32:166-171.
15. Donahue, R. L., R. W. Miller and J. C. Shickluna. 1981. Introducción a los suelos y al crecimiento de las plantas. Cuarta edición. Impresiones Editoriales. S.A. pp: 288-289.
16. Demezas, D. H., and P. J. Bottomley. 1986. Interstrain competition between representatives of indigenous serotypes of *Rhizobium trifolii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 1014-1019.
17. Damirigi, S. M., L. R. Frederick, and I. C. Anderson. 1967. Serogroups of *Rhizobium japonicum* in soybean nodules as affected by soil types. *Agronomy. J.* 59:10-12.
18. Danso, S. K. A., S. O. Keya and M. Alexander. 1975. Protozoa and the decline of *Rhizobium* population added to soil. *Can. J. Microbiol.* 21:884-895.
19. Ebelhar, S. A., W. W. Frye and R. L. Blevins. 1984. Nitrogen from legume cover crops for no-tillage corn. *Agron. J.* 76:51-55.

20. El Hassan, G. A., B. S. Hernandez, and D. D. Focht. 1986. comparison of huptrait and intrinsic antibiotic resistance for assessing rhizobial competitiveness axenically and in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:546-551.
21. Elkan, G. H. 1981. The taxonomy of the Rhizobiaceae, p. 1-14 In K. Giles and A. Atherly (ed.), *Biology of the Rhizobiaceae* academic Press, Inc., New York.
22. Evans, J., Y. M. Barnet, and J. M. Vincent. 1979a. Effect of a bacteriophage on colonization and nodulation of clover roots by a strain of *Rhizobium trifolii*. *Can. J. Microbiol.* 25:968-973.
23. Evans, J., Y. M. Barnet, and J. M. Vincent. 1979 b. Effect of a bacteriophage on colonization and nodulation of clover roots by paired strains of *Rhizobium trifolii*. *Can. J. Microbiol.* 25:974-978.
24. Ebelhar, S. A., W.W. Frye and R. L. Blevuns. 1984. Nitrogen from legume cover crops for no-tillage corn. *Agron. J.* 76: 51-55.
25. Fuhrmann, J. and A. G. Wollumm 11. 1985. Simplified Enzyme-Linked immunosorbent assay for routine identification of *Rhizobium japonicum* antigens. *Appl. Environ. Microbiol.* 49:1010-1013.
26. Fuquay, J. I., P. J. Bottomley and M. B. Jenkins. 1984. Complementary methods for the differentiation of *Rhizobium meliloti* isolates. *Appl Environ. Microbiol.* 47: 63-669.
27. Guzmán, G. 1982. Conservación y mejoramiento de suelos. Primera edición. Arbol Editorial, S. A. de C. V. pp:84-85.
28. Groya, F. L. and C. C. Sheaffer. 1985. Nitrogen from legumes: Harvest and tillage effects. *Agron. J.* 77: 105-110.
29. Galván, C. N. 1981. Efecto de la densidad de la siembra en 2 especies del género *Vicia* para la producción de forraje en Anáhuac, N. L. Tesis inédita.F.A.U.A.N.L.



20. El Hassan, G. A., B. S. Hemadez, and D. D. Focht. 1986. comparison of huptrait and intrinsic antibiotic resistance for assessing rhizobial competitiveness axenically and in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:546-551.
21. Elkan, G. H. 1981. The taxonomy of the Rhizobiaceae, p. 1-14 In K. Giles and A. Atherty (ed.), *Biology of the Rhizobiaceae* academic Press, Inc., New York.
22. Evans, J., Y. M. Barnet, and J. M. Vincent. 1979a. Effect of a bacteriophage on colonization and nodulation of clover roots by a strain of *Rhizobium trifolii*. *Can. J. Microbiol.* 25:968-973.
23. Evans, J., Y. M. Barnet, and J. M. Vincent. 1979 b. Effect of a bacteriophage on colonization and nodulation of clover roots by paired strains of *Rhizobium trifolii*. *Can. J. Microbiol.* 25:974-978.
24. Ebelhar, S. A., W.W. Frye and R. L. Blevuns. 1984. Nitrogen from legume cover crops for no-tillage com. *Agron. J.* 76: 51-55.
25. Fuhmann, J. and A. G. Wollumm 11. 1985. Simplified Enzime-Linked inmunosorbent assay for routine identification of *Rhizobium japonicum* antigens. *Appl. Environ. Microbiol.* 49:1010-1013.
26. Fuquay, J. I., P. J. Bottomley and M. B. Jenkins. 1984. Complementary methods for the differentiation of *Rhizobium meliloti* isolates. *Appl Environ. Microbiol.* 47: 6-63-669.
27. Guzmán, G. 1982. Conservación y mejoramiento de suelos. Primera edición. *Arbol Editorial, S. A. de C. V.* pp:84-85.
28. Groya, F. L. and C. C. Sheaffer. 1985. Nitrogen from legumes: Harvest and tillage effects. *Agron. J.* 77: 105-110.
29. Galván, C. N. 1981. Efecto de la densidad de la siembra en 2 especies del género *Vicia* para la producción de forraje en Anáhuac, N. L. Tesis inédita.F.A.U.A.N.L.

30. Habte, M. 1985. Selective medium for recovering specific populations of *Rhizobia* introduced into tropical soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 50:1553-1555.
31. Hickey, W. J., T. E. Lownachan, A. Ayanaba, and R.M. Zablotowicz. 1987. Diversity within Iowa *Bradyrhizobium japonicum* Serogroups 123. *Soil. Sci. Soc. Am. J.* 51:941-946.
32. Hua, T. S. S., V. Y. Tsai, G. M. Lichens, and A. T. Noma. 1982. Accumulation of amino acids in *Rhizobium* sp strain WR 1001 in response to sodium chloride salinity. *Appl. Environ. Microbiol.* 44:135-140.
33. Hossain, M. A. K. and M. Alexander. 1989. Enhancing soybean rizosphere colonitation by *Rhizobium japonicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:468-472.
34. Jansen van Rensburg, H. And B. W. Strijdom. 1982. Competitive abilities of *Rhizobium meliloti* strains considered to have potential as inoculants. *Appl. Environ. Microbiol.* 49:98-106.
35. Jansen van Rensburg, H. and B. W. Strijdom. 1985. Effectiveness of *Rhizobium* strains used in inoculants after their into soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 49:127-131.
36. Jenkins, M. B. and P. J. Bottomley. 1985. Evidence for strain of *Rhizobium meliloti* dominating the nodules of alfalfa *Soil.Soc.Am.J.* 49:326-328.
37. Jhonson, H. W., V. M. Means, and C. R. Weber. 1965. Competition for nodule sites between strains of *Rhizobium japonicum* as inoculum and strains in the soil. *Agronomy. J.* 57:179-185.
38. Kingley, M. T. and B. B. Bohlool. 1981. Release of *Rhizobium* spp. from tropical soils and recovery for immunofluorescence enumeration. *Appl. Environ. Microbiol.* 42:241-248.
39. Kamicker, B. J., and W. J. Brill. 1986. Identification of *Bradyrhizobium japonicum* nodule isolates from wisconsin soybean farms. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:487-492.

40. Lindstrom, K., P. Lipsanem and S. Kajjalainem. 1990. Stability of markers used for identification of two *Rhizobium galegae* inoculant strains after five years in the field. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:444-450.
41. Lowendorf, H. S, and M. Alexander. 1983. Identification of *Rhizobium phaseoli* strains that are tolerant or sensitive to soil acidity. *Appl. Environ. Microbiol.* 45:737-742. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* pp: 680-685.
42. Lynd, J. Q., R. W. McNew, and G. V. Odell, Jr. 1980. Defoliation effects on regrowth, nodulation, and nitrogenase activity at anthesis *Agron. J.* 72:991-994.
43. Lawson, K. A., Y. M. Barnet and C. A. Mc Gilchrist. 1987. Environmental factors influencing number of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* and its bacteriophages in two field soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:1125-1131.
44. Moreno, Q. A. 1977. Producción comercial de inoculantes específicos para las leguminosas. FIRA-Banco de México S.A. Informe 103:24.
45. Millar, C. E. 1964. Fertilidad del suelo. Primera edición. Salvat Editores, S. A. Barcelona España pp: 339.
46. Osa-Afiana, L. O. and M. Alexander. 1982. Differences among cowpea *Rhizobia* in tolerance to High temperature and dessication in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 43:435-439.
47. Olsen, P. E. and W. A. Rice. 1989. *Rhizobium* strains identification and quantification in comercial inoculants by immunoblot analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:520-522.
48. Ramírez, C. and M. Alexander. 1980. Evidence suggeting protozoan predation on *Rhizobium* associated with germinating seeds and in the rizosphere of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) *Appl. Environ. Microbiol.* 40:492-499.

49. Reyes, F. F. J. 1989. Determinación de la mejor fase de desarrollo de la veza vellosa para su incorporación como abono verde y su efecto en la producción de sorgo de grano. Tesis profesional. F.A.- U.A.N.L
50. Sadowsky, M. J., R. E. Tully, P. B. Cregan, and H. H. Keyser. 1987. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* serogroup 123 and its relation to genotype-specific nodulation in soybean. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2624-2630.
51. Sánchez, A. E. J., 1980. prueba de tres fechas de siembra en el cultivo de veza velluda como abono verde en la región de Marín, N. L. Tesis inédita. Facultad de Agronomía, U.A.N.L.
52. Scheleif, R. F. and P. C. Wensink. 1981. Practical methods in molecular biology. Spring-Verlang. Ney york. Heidelberg. Berlin. pp: 78-84.
53. SNFBN. 1986. Tecnología de *Rhizobium* y producción de inoculantes. Manual de prácticas. Facultad de Ciencias Químicas, U.N.A.M. (México).
54. Stacey, G., L. A. Pocratsky and V. Puvanesarajah. 1984. Bacteriophage that can distinguish between Wild-type *Rhizobium japonicum* and a non-nodulating mutant. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 68-72.
55. Spiegel, M. R. 1970. Teoría y problemas de estadística. Ed. Mc. Graw Hill. pp: 349.
56. Schmidt, L. E. 1974. Quantitative autoecological study of microorganisms in soil by immunofluorescence. *Soil Sci.* 118: 141-149.
57. Singleton, P. W., S. A. El Sawaify, and B. B. Bohlool. 1982. Effect of salinity on *Rhizobium* growth and survival. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 884-890.
58. Tamhane, R. V., D. P. Motiramani and Y. P. Balli. 1978. Suelos: su química y fertilidad en zonas tropicales. Primera edición. Editorial Diana. S. A. pp: 275-277.

59. Vincent, J. M. 1970. A manual for the practical study of root nodule bacteria I. B. P. Handb. No. 15. Blackwell Scientific. Publications Oxford and Edinburgo.pp:25-28.
60. Vincent, J. M. 1975. Manual práctico de rizobiología. Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires Argentina. pp: 1-15.
61. Walker, J. M. 1984. Methods in Molecular Biology. Vol 1. Proteins pp: 44-45.
62. Wheatcroft, R. and R. J. Watson. 1988. A positive strain identification methods for *Rhizobium meliloti*. Appl. Environ. Microbiol. 54: 574-576.
63. Werquin, W., H. W. Ackermann and R. L. Levesque. A study of 33 bacteriophages of *Rhizobium meliloti*. Appl. Environ. Microbiol. 54: 188-196
64. Wescott, M. P. and D. S. Mikkelsen. 1987. Comparasion of organic and inorganic nitrogen sources for rice. Agron. J. 79:937-942. Wellhausen, E. J. 1976. The Agriculture of Mexico. Scientific American Vol 235. No. 3 pp: 129-150.
65. Wright, S. F., J. G. Foster, and O. L. Bennett. 1986. Production and use of monoclonal antibodies for identification of strains of *Rhizobium trifolii*. Appl. Environ. Microbiol. 52:119-123.
66. Zamudio, G. B. 1974. Prueba de cuatro leguminosas de invierno como abono verde en el Ejido San Isidro, Linares, N.L. Tesis profesional inédita. F.A.,U.A.N.L.

