

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE AGRONOMIA



"LA FIJACION BIOLOGICA DE NITROGENO ATMOSFERICO
EN LA RELACION SIMBIOTICA Rhizobium-LEGUMINOSA"

SEMINARIO

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO AGRONOMO FITOTECNISTA

PRESENTA

JULIO CESAR ESCOBAR OYERVIDES

BIBLIOTECA Agronomía UANL

NOVIEMBRE 1985

"LA P
EN LA

MALE



1080062522

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE AGRONOMIA



"LA FIJACION BIOLÓGICA DE NITROGENO ATMOSFERICO
EN LA RELACION SIMBIOTICA Rhizobium-LEGUMINOSA"

SEMINARIO

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO AGRONOMO FITOTECNISTA

PRESENTA

JULIO CESAR ESCOBAR OYERVIDES

MARIN, N.L.

NOVIEMBRE 1985

6008 *Escobar*

T
SB 327
L 8



040.631
FA8
985
c.5

CON ADMIRACION:

A los hombres comprometidos consigo mismos, conscientes de su naturaleza, situación potencial, en búsqueda continua de nuevos retos y excelencia, que les permitan sentirse satisfechos en las diferentes etapas de su vida.

CON RESPETO:

A los hombres que intuyan en su naturaleza y potencial; pero que carecen de capacidad de decisión para salir de su cautiverio.

Y CON ESPERANZA:

A los hombres con espíritu y actitud de dependencia, que desconocen su naturaleza y su potencial y que viven en el mar de la insatisfacción y de la mediocridad.

DEDICATORIAS

A mis padres:

Sr. Pedro Escobar García y

Sra. Ma. del Rosario Oyervides de Escobar

como un reconocimiento justo a los sacrificios

y privaciones que pasaron para que saliera adelante.

A mis hermanos:

Silvia Antonia

José Marcelo

Aspren

Pedro Antonio

Juan Bautista

Blanca del Rosario

Armida

Gerardo Alberto

Delia Eugenia

Lucía Adriana

por su ejemplo y ayuda

desinteresada.

Con amor a mi novia:

Ima Leticia

por el cariño, apoyo y confianza
que me brinda.

AGRADECIMIENTOS

Al Ing. Ronald Jorge Lecea Juárez

por su asesoría prestada en el desarrollo del presente trabajo y por su ayuda en el desempeño de mi Servicio Social.

Al Dr. Rigoberto Vázquez

por haberme facilitado parte del material bibliográfico que compone el presente estudio.

A mis compañeros y amigos de la generación, con los cuales pasé momentos alegres y difíciles a lo largo de mi carrera.

Y sobre todo, gracias a ti Señor por haberme dado la oportunidad de obtener una carrera.

INDICE

	Página
INTRODUCCION	1
LAS LEGUMINOSAS	3
Importancia Económica	3
Descripción Taxonómica	5
Descripción Botánica	6
EL METABOLISMO DEL NITROGENO	8
Importancia del Nitrógeno en las Plantas	8
Formas de Nitrógeno Disponibles para las Plantas	9
Etapas Esenciales del Ciclo del Nitrógeno	10
Aminización o Aminificación	11
Amonificación	11
Nitrificación	12
Pérdidas de nitrógeno aprovechable	13
ANTECEDENTES HISTORICOS	14
CARACTERISTICAS DE <u>Rhizobium</u> sp	19
Clasificación Taxonómica	19
Descripción Morfológica	22
IMPORTANCIA ECONOMICA	24
IMPORTANCIA ECOLOGICA	27
LA RELACION PLANTA-BACTERIA	29
Principios que Explican la Relación <u>Rhizobium</u> -leguminosa.	29
Infección y Formación de Nódulos	30
Infectividad y Efectividad	37
Bioquímica de la Fijación de Nitrógeno	38
FACTORES AMBIENTALES Y GENETICOS QUE AFECTAN A LA RELACION SIMBIOTICA <u>Rhizobium</u> -LEGUMINOSA	43
Factores Físicos	44
Temperatura	44

	Página
Reacción del Suelo	46
Humedad	48
Luz	49
Densidad de Población	50
Factores Químicos	51
Nutrientes	51
Nitrógeno	51
Fósforo	52
Potasio	53
Azufre	53
Molibdeno	53
Calcio	54
Fierro	54
Cobalto	54
Boro	55
Cobre	55
Elementos Tóxicos en la Nodulación	55
Pesticidas	56
Factores Biológicos	60
Microorganismos	60
Antagonismo	60
Predación	61
Sinergismo	62
Competencia con cepas nativas	63
Genética del hospedero y su relación con la bacteria..	63
ASPECTOS PRACTICOS DE LA SIMBIOSIS <u>Rhizobium</u> -LEGUMINOSA	67
BIBLIOGRAFIA	69

INDICE DE TABLAS

Tabla No.		Página
1	La producción de leguminosas en México	4
2	Valores medios de la composición química de las semillas de algunas leguminosas en porcentaje de materia seca	5
3	Rendimiento de avena (<u>Avena sativa</u>) y arvejas - (<u>Pisum sativum</u> L.) y saldo de nitrógeno en arena cuarzosa inoculada de diversas maneras o fertilizada con nitrógeno	17
4	Esquema de clasificación de las asociaciones - <u>Rhizobium</u> -leguminosa	21
5.	Efecto de un soporte peleteolimoso (Ca CO ₃) en la toxicidad de los pesticidas Tiram, Captán y Furdán	60
6	Efecto del hospedero en la sensibilidad a los detergentes por los bacteroides	65

INDICE DE FIGURAS

Figura No.		Página
1	Representación esquemática del ciclo del nitrógeno.	15
2	Etapa de formación de un nódulo radicular	31
3	Ciclo de <u>Rhizobium leguminosarum</u>	33
4	Ciclo de Bisset	33
5	Interacción entre la bacteria <u>Rhizobium</u> y las raíces de la leguminosa antes de la infección	34
6	Fijación de nitrógeno dentro de la bacteria	41
7	Esquema de la fijación de nitrógeno por el nódulo - de una leguminosa	42
8	Efecto de la temperatura en la sobrevivencia de - <u>Rhizobium meliloti</u> en un suelo de arena finofranca.	45
9	Patrones de sobrevivencia de dos cepas de <u>Rhizobium phaseoli</u> en suelos con diferentes valores de pH ...	47
10	Cinética de crecimiento de una cepa de <u>Rhizobium sp</u> creciendo en medio ELM y Sevín a 200 Rev/min	57
11	Cinética de crecimiento de una cepa de <u>Rhizobium sp</u> creciendo en medio ELM y Malathión a 200 Rev/min ..	58
12	Cinética de crecimiento de una cepa de <u>Rhizobium sp</u> creciendo en medio ELM y Diazinón a 200 Rev/min ...	59
13	Tasas de infección en plantas típicas de <u>Trifolium scabrum</u> y <u>T. fragiferum</u> inoculadas con las cepas - SU 297 y CIF de <u>Rhizobium sp</u>	66

I N T R O D U C C I O N

El nitrógeno es uno de los elementos más importantes que intervienen en el desarrollo de las plantas, ya que es esencial en la formación de gran número de compuestos, tales como: aminoácidos, proteínas, hormonas, vitaminas, etc.

Es ampliamente conocido que el nitrógeno es el elemento más abundante en la atmósfera, aproximadamente el 79% del aire está compuesto por éste.

Por otra parte, se ha encontrado que en la mayoría de los suelos de México y del mundo, el nitrógeno es insuficiente para el desarrollo normal de los cultivos, por lo que es necesario añadirlo en forma de fertilizantes (inorgánicos y orgánicos).

La creciente escasez de fertilizante nitrogenado, el alto requerimiento de energía para su fabricación y principalmente el incremento de su producción, han producido gran interés en la búsqueda de tecnologías, alternativas para obtenerlo. Por otro lado, la fertilización trae como consecuencia problemas de salinidad, cambios de pH y puesto que el fertilizante es un subproducto de petróleo, es un recurso no renovable.

La fijación de nitrógeno atmosférico por medios biológicos, es una opción con que puede contar el hombre para substituir las aplicaciones de elementos nitrogenados. Este tipo de fijación se logra gracias a una asociación simbiótica que existe entre las bacterias del género Rhizobium sp y una planta leguminosa. Debido a esto la planta recibe nitrógeno, el cual fue previamente convertido a formas utilizables, a su vez la bacteria recibe de la planta glucóidos que sirven como fuente de energía para su desarrollo.

En México, como en otros países en vías de desarrollo, la dieta alimenticia básica está formada generalmente por dos familias de plantas: las gramíneas; ya sea maíz, arroz, trigo, etc. y las leguminosas; ya sea frijol (principalmente), chícharo, soya, lenteja, etc. De tal forma que si nosotros utilizamos alternativas que disminuyan el consumo nacional de fertilizantes nitrogenados, como lo hacen las leguminosas debido a su asociación simbiótica, será ventajoso ya que este fertilizante ahorrado podrá ser destinado a otros cultivos que no tengan la particularidad de fijar nitrógeno, como lo son las gramíneas.

Por otro lado, desde el punto de vista agronómico, la asociación simbiótica Rhizobium-leguminosa reviste especial interés, ya que las leguminosas han sido empleadas en el sistema llamado rotación de cultivos con el propósito de mejorar las tierras con respecto a su contenido de nitrógeno, este método constituye en la actualidad el medio más práctico de enriquecer el suelo en forma natural con ese elemento.

El presente trabajo tiene como objetivo presentar los diferentes factores que intervienen en el proceso de fijación biológica de nitrógeno, con el fin de esclarecer un poco más este tema y poder obtener un mejor provecho de dicha relación.

Para lograr tal meta, se revisaron algunos de los principales trabajos experimentales que involucran este proceso, así como los diferentes conceptos básicos de varios autores que estudian la microbiología del suelo, por lo que se considera un compendio de material bibliográfico disperso.

LAS LEGUMINOSAS

Importancia Económica.

Uno de los problemas actuales más agudos en la alimentación de millones de habitantes en el mundo, es el déficit proteico de la dieta alimenticia (Ustemenko 1982). Las leguminosas son una alternativa para contrarrestar este problema, ya que constituyen una fuente principal de proteínas que se puede obtener a bajo costo.

Entre los representantes más importantes de la familia de las leguminosas (subfamilia papilionoidea), que se cultivan en las regiones cálidas de los trópicos y subtropicos se encuentran: El frijol (Phaseolus vulgaris L.), la soya (Glycine max L. Merrill), el chícharo (Pisum sativum L.), el garbanzo (Cicer sp), la alfalfa (Medicago sativa), la lenteja (Lens esculenta), el haba (Vicia faba), y el cacahuate (Arachis hipogea).

Las leguminosas por sus precios bajos son preferidas por grandes conglomerados humanos, y se les cultiva tanto por sus granos como por su forraje, además se utilizan como abono verde (Reyes 1972).

Según los datos de la FAO, el área mundial ocupada por las leguminosas de grano constituye 118 millones de hectáreas, alcanzando una producción total de unos 43 a 44 millones de toneladas.

En México la producción de leguminosas en el año de 1981 fue de 19'182,854 toneladas sembradas en una superficie de 3'351,128 hectáreas. Tabla 1.

La importancia en cuanto a su composición química es bastante amplia. Tabla 2.

El contenido proteico en las semillas de las leguminosas es de dos a tres veces más alto que en los cereales (trigo el 7-21%, maíz 7-15% y arroz 7-8%) y diez a veinte veces mayor con los tubérculos (Ustemenko 1982).

Tabla 1

La producción de leguminosas en México

(1981, DGEA SARH)

CULTIVO	SUP. SEMBRADA	SUP. COSECHADA	RENDIMIENTO		PRODUCCION
			Riego	Temporal	
Cacahuate	79,704 Ha.	75,080 Ha.	2.295	0.907 Ton/Ha.	87,381 Ton.
Frijol					
grano	2'408,069	1'990,665	1.242	0.560	1'331,305
ejote	6,273	6,066	5.125	2.754	29,123
Garbanzo					
C. animal	136,639	133,538	1.462	0.866	129,022
C. humano	15,304	14,435	1.654	0.550	18,999
Haba	47,319	46,534	4.645	1.225	69,915
Lenteja	18,407	14,822	1.010	0.768	12,459
Soya	379,447	361,789	2.066	1.364	706,679
Alfalfa	259,966	251,992	67.482	25.726	16'797,973
TOTAL	3'351,128	2'894,921			19'182,854

Además las leguminosas hacen una importante contribución de fierro, tiamina y ácido nicotínico a la dieta (Doughty y Orrarca 1966).

Tabla 2

Valores medios de la composición química de las semillas de algunas leguminosas en % de materia seca (Ustemenko 1982).

Cultivos	Proteína cruda	Grasa cruda	Ceniza	Substancias extractivas sin N	Celulosa cruda
Soya	39.2	17.5	4.7	30.2	4.4
Frijol	21.0	1.5	3.6	57.5	3.7
Garbanzo	18.6	5.3	3.3	55.6	4.5
Vigna	21.9	1.4	3.4	58.8	6.9

Las leguminosas tienen una gran área de adaptación, cultivándose en diferentes altitudes y latitudes; suelos y climas. Las razas, variedades e híbridos tienen un área de adaptación más restringida.

Descripción Taxonómica.

Las leguminosas se clasifican de la siguiente manera:

Reino:	Vegetal
Subreino:	Plantas
Phillum:	Tracheophita
Clase:	Angiospermas
Subclase:	Dicolitedoneas
Orden:	Rosales
Suborden:	Rosinae
Familia:	Leguminosae

Subfamilias: Papilionoidea
 Cesalpinoidea
 Mimosoideas

Como se mencionó anteriormente la subfamilia más importante desde el punto de vista agronómico es la Papilionoidea, con los géneros ya mencionados.

Descripción Botánica.

La familia Leguminosae, comprende plantas herbáceas, arbustivas o arbóreas que viven en climas tropicales y templados.

Sus órganos presentan las siguientes características:

Raíz. Poseen raíz típica, en la que presentan nudosidades o abultamientos provocados por la presencia de bacterias del género Rhizobium (Ruiz 1979). Al respecto Allen y Allen (1947) citados por Salle (1947) mencionan que las leguminosas comprenden 429 géneros con unas 10,000 especies de plantas. De ellas en 179 géneros (41%) con 946 especies se ha estudiado la nodulación y únicamente 77 especies han dejado de presentar nódulos una y otra vez.

Hojas. Son alternas generalmente pinadas, con número variable de folíolos, además poseen estípulas y se disponen en forma alterna.

Flores. Poseen flores hermafroditas, pentámeras, sigomorfas o actinomorfas, generalmente se agrupan en inflorescencia en racimos. El caliz posee cinco sépalos libres o algo soldados y la corola cinco pétalos libres rara vez soldados o desiguales. El androceo presenta generalmente 10 estambres, rara vez más o menos de 10. El gineceo presenta ovario súpero, unilocular, unilocular.

Fruto. El fruto es una vaina dehiscente o indehiscente y las semi-

llas carecen de endospermo, o bien este queda reducido a una delgada capa (Ruiz 1979).

EL METABOLISMO DEL NITROGENO

Importancia del Nitrógeno en las Plantas.

El nitrógeno se encuentra en las plantas cumpliendo importantes funciones bioquímicas.

Este elemento para ser absorbido por la mayoría de las plantas (excepto las leguminosas), debe estar en forma diferente que el nitrógeno molecular. Las formas más comunes asimiladas por las plantas son los iones de nitrato (NO_4^-) (Tisdale 1982).

Independientemente de la forma absorbida, el nitrógeno es transformado en el interior de las plantas en bases nitrogenadas ($-\text{N}=\text{}$, $-\text{NH}-$ ó NH_2). De esta forma el nitrógeno interviene en la formación de aminoácidos, luego éstos entran en la síntesis de prótidos y de proteínas vegetales (Tisdale 1982). Aproximadamente el 20 al 30% de los alimentos plásticos está formado por proteínas (Benavides 1982).

Además el nitrógeno se encuentra en moléculas tan importantes como las purinas, las pirimidinas, porfirinas y coenzimas. Las purinas y pirimidinas se encuentran en los ácidos nucleicos RNA y DNA esenciales para la síntesis de proteínas. El anillo de la porfirina se encuentra en compuestos tan importantes desde el punto de vista metabólico, como las clorofilas y las enzimas del grupo de los citocromos, esenciales para la fotosíntesis y la respiración (Devlin 1980).

Un adecuado suministro de nitrógeno está asociado con vigorosos crecimientos vegetativos y un intenso color verde, así como con un aumento en corpulencia de los granos (Buckman y Brady 1977, Tisdale 1982).

Sin embargo existen diferentes efectos negativos que se presentan debido a la aplicación de cantidades excesivas de nitrógeno, entre estos efec-

tos encontramos los siguientes:

- a) Prolongación del período de crecimiento y retraso de la madurez.
- b) Excesivo crecimiento de los entrenudos que forman así un largo y débil tallo.
- c) Puede hacer bajar la calidad del grano, debido a la falta óptima de sequedad del mismo.
- d) En ocasiones puede suprimir la resistencia a enfermedades y plagas. Esto es debido a la succulencia que presentan los tejidos (Buckman y Brady 1977).

Formas de Nitrógeno Disponible por la Planta.

Las formas de nitrógeno que se encuentran a disposición de la planta se distribuyen en cuatro grupos:

1. Nitrógeno en forma de nitrato
2. Nitrógeno en forma amoniacal
3. Nitrógeno en forma orgánica
4. Nitrógeno en forma molecular

1. Nitrógeno en forma de nitrato (NO_3^-). Es una forma inorgánica producto de la descomposición de las proteínas gracias al proceso de nitrificación.

2. Nitrógeno en forma amoniacal (NH_4^+). Forma inorgánica producto de la reducción del amoníaco, que es un compuesto intermedio del proceso de nitrificación y que se produce específicamente en una fase llamada amonización.

3. Nitrógeno en forma orgánica. En las plantas superiores el aprovechamiento del nitrógeno orgánico, se da en muy baja escala puesto que

queda sujeto principalmente a organismos inferiores. El nitrógeno orgánico puede ser representado por la entrada de algunos aminoácidos y algunas sales orgánicas como la Urea.

4. Nitrógeno molecular (N_2). Esta forma es la más abundante ya que se encuentra en un 79% en la atmósfera, sin embargo las plantas no pueden aprovecharla en forma directa, sino que necesitan de algunos microorganismos para poder obtenerla (Benavides 1982).

En esta forma de nitrógeno, es donde intervienen las bacterias del género Rhizobium sp., de las cuales hablaremos más adelante.

Etapas Esenciales del Ciclo del Nitrógeno.

En todos los suelos existen al cabo del año considerables entradas y salidas de nitrógeno acompañadas de muchas transformaciones complejas. Algunos de estos cambios pueden controlarse más o menos por el hombre, mientras que otros están mas allá de su control. Esta sucesión de reacciones químicas controladas constituye lo que se conoce con el nombre del "Ciclo del Nitrógeno" (Buckman y Brady 1977). Fig. 1

En el ciclo del nitrógeno las plantas juegan un papel muy importante ya que contienen proteínas vegetales. Los animales al alimentarse de las plantas transforman estas proteínas a proteínas animales y desechos nitrogenados, los cuales pasan nuevamente al suelo. Otro cambio de este ciclo lo constituye la muerte de las plantas y animales ya que las bacterias y hongos de la putrefacción incorporan nuevamente al suelo el nitrógeno de los primeros. Además de los microorganismos fijadores de nitrógeno atmosférico, las tormentas eléctricas juegan un papel importante en este proceso, gracias a ellas, se combina el nitrógeno con el oxígeno formando nitratos, los cuales se precipitan con la lluvia entrando a través de los

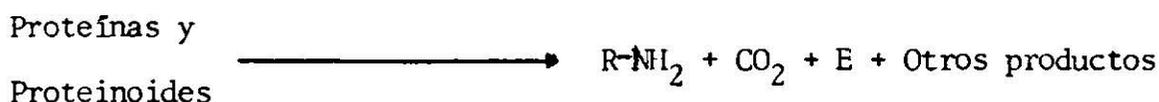
estomas, conduciendo a una fertilización foliar en forma natural. Las cantidades fijadas son muy pequeñas, van de 2 a 20 Kg./Ha.

La mineralización de los compuestos nitrogenados orgánicos se produce etapa por etapa en tres reacciones esenciales: Aminización, Amonitrificación y Nitrificación. Las dos primeras se realizan a través de organismos heterótrofos y la tercera se realiza por organismos autótrofos del suelo. Los heterótrofos requieren como fuente de energía compuestos carbonados orgánicos, los autótrofos obtienen la energía de la oxidación de sales inorgánicas y obtienen el carbono necesario del CO_2 de la atmósfera que lo rodea (Tisdale 1982).

a) Aminización o Aminificación

Es una de las etapas finales de la descomposición de los materiales nitrogenados, que consiste en la descomposición hidrolítica de las proteínas y la liberación de aminas y aminoácidos. Esta función la realizan organismos heterótrofos que incluyen numerosos grupos de bacterias y hongos.

Se representa esquemáticamente como sigue:



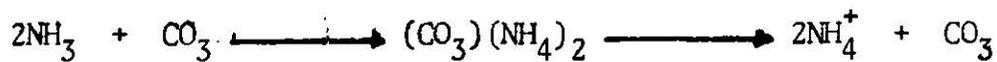
Donde E = Energía

b) Amonificación

Las aminas y los aminoácidos así liberados son utilizados posteriormente por otros grupos de organismos heterótrofos con la liberación de compuestos amoniacales. Esta etapa se denomina Amonificación y se representa como sigue:



Comb. Amino



El amoníaco así liberado sufre destinos diversos en el suelo:

1. Puede ser convertido por nitritos y nitratos por el proceso de nitrificación.
2. Puede ser absorbido directamente por las plantas superiores, esto se logra mediante la reacción con el agua formando hidróxido de amonio, de tal forma que los iones de amonio pueden ser utilizados directamente como fuente de nitrógeno.
3. Puede ser fijado en una forma no utilizable biológicamente en ciertos tipos de arcillas en expansión.
4. Puede escaparse al aire. (Buckman y Brady 1977, Tisdale 1982)

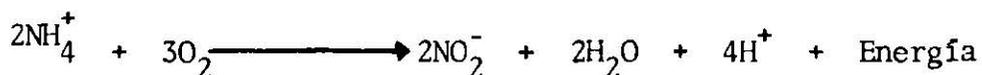
Factores que favorecen la amonificación:

1. Cantidad de carbohidratos disponibles.
2. Composición química del material nitrogenado.
3. Microorganismos involucrados.
4. Acidez, aereación y humedad del suelo. (Buckman y Brady 1977 y Meyer 1970)

c) Nitrificación

Algo de NH_4^+ liberado en el proceso de amonificación es convertido a nitrato. Esta oxidación biológica del amoníaco se conoce como nitrificación. Es un proceso en dos etapas en el que el amoníaco es convertido primero a nitrito (NO_2^-) y luego de éste a nitrato (NO_3^-). La conversión a nitrato se realiza especialmente por un grupo de bacterias autótrofas obligadas conocidas como Nitrosomonas mediante una reacción que puede represen-

tarse por la siguiente ecuación:



La conversión de nitrito a nitrato se efectúa sobre todo por un segundo grupo de bacterias denominadas Nitrobacter. La ecuación puede representarse como sigue:



Tres puntos importantes se revelan en estas ecuaciones de nitrificación proporcionando un conocimiento que puede clarificar las reacciones que suceden cuando se aplican al terreno fertilizantes nitrogenados comerciales, tanto en forma inorgánica como orgánica.

En primer lugar la reacción requiere oxígeno molecular (O_2), por lo tanto se llevará a cabo en una forma más efectiva en suelos con una buena aereación. Un segundo punto es que la reacción libera iones de hidrógeno (H^+). La liberación de estos iones da como resultante la acidificación del suelo cuando los fertilizantes son convertidos a nitratos. Un tercer punto es que, puesto que está implicada la actividad microbiana, la rapidez y extensión de la transformación estará influenciada de gran manera por las condiciones ambientales del suelo, así como por la humedad y la temperatura (Buckman y Brady 1977, Tisdale 1982).

Pérdidas de Nitrógeno Aprovechable.

Existen diferentes procesos por los cuales se puede perder el nitrógeno en forma gaseosa. Estas pérdidas ocurren cuando el nitrógeno es liberado a causa de ciertas reacciones químicas y biológicas que se verifican en el terreno. Han sido tres los mecanismos como causa de estas pérdidas:

1. La desnitrificación que es la reducción bioquímica de los nitra-

tos bajo condiciones anaeróbicas.

2. Reacciones químicas que implican a los nitratos bajo reacciones aeróbicas.

3. Pérdidas volátiles de amoníaco gaseoso (NH_3) de la superficie de los suelos alcalinos.

Desnitrificación.

Cuando los suelos se encharcan, el oxígeno es excluido y entonces se implanta la descomposición anaeróbica. Los microorganismos que intervienen son llamados bacterias desnitrificantes, siendo Bacterium desnitrificans una de las especies mejor conocidas. Estas bacterias extraen el oxígeno de los nitratos y nitritos. Más que usar el oxígeno atmosférico, este oxígeno es utilizado para oxidar el hidrógeno de los alimentos orgánicos, formando agua, óxido nitroso (N_2O) y nitrógeno molecular (N_2). Otras pérdidas pueden ser debido a; la erosión, lixiviación, volatilización (Buckman y Brady 1977, Rojas 1981 y Tisdale 1982).

Las fuentes para incorporar el nitrógeno perdido pueden ser por; materia orgánica, abono verde, adición de fertilizantes inorgánicos, fijación de nitrógeno atmosférico por organismos simbióticos y asimbióticos.

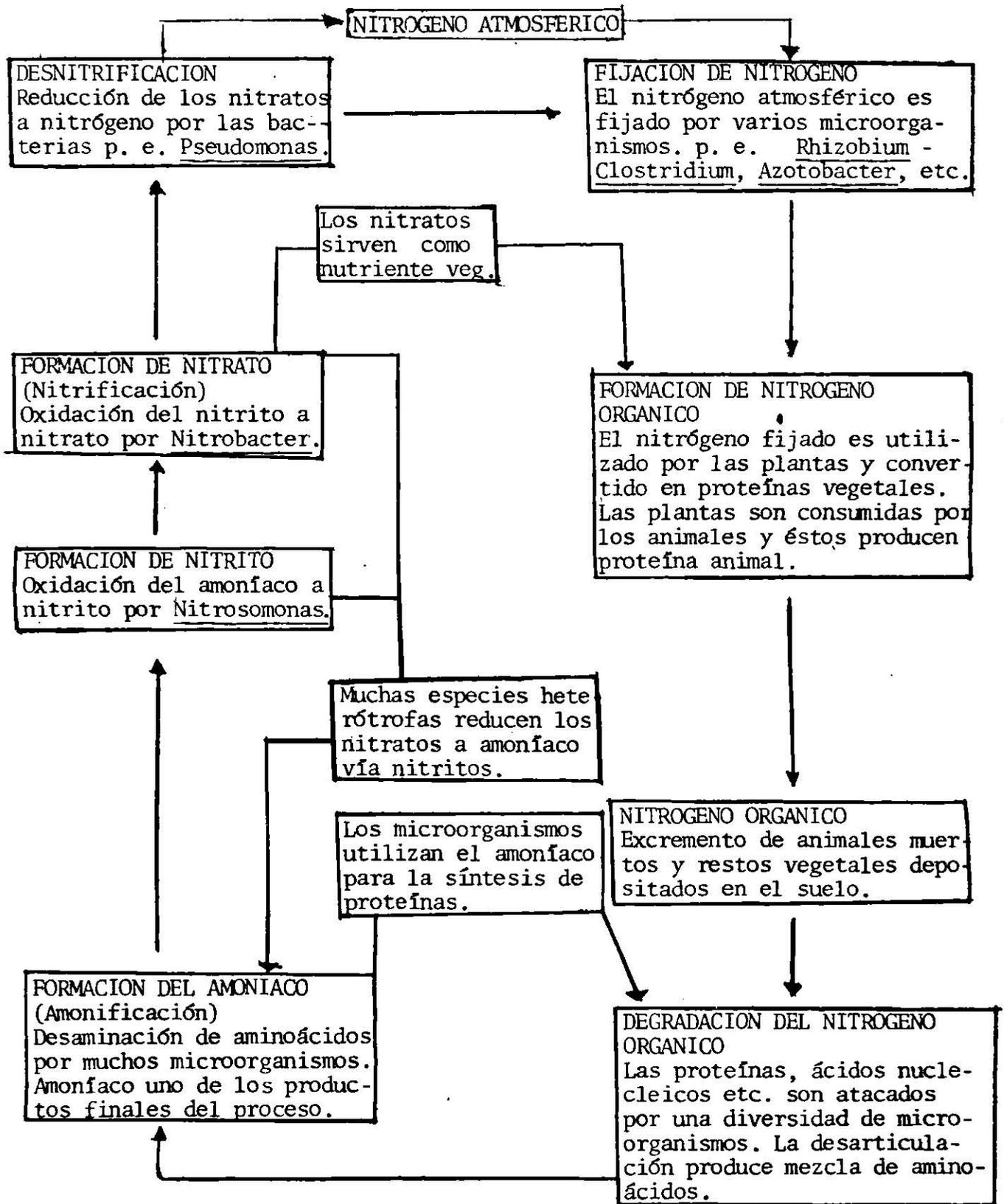


Fig 1. Representación esquemática del ciclo del nitrógeno.

ANTECEDENTES HISTORICOS

Hace ya muchos años se demostró que el cultivo de ciertas plantas mejora la tierra y al aumentar su fertilidad, estimula o favorece las cosechas venideras. Las plantas que producen tal estímulo resultaron ser de la familia de las leguminosas (Salle 1965).

Sin embargo, no se sabía de que forma las leguminosas aportaban nutrientes. Finalmente se dieron cuenta que los nódulos en las raíces de estas plantas tenían algo que ver en este proceso. Wornin (1866) encontró que una bacteria estaba presente en este proceso, pero él lo explicó como un fenómeno patológico. Mas con el conocimiento de la esterilización del suelo, se encontró que la formación de nódulos era inhibida, indicando el origen biológico de éstos.

Una contribución importante fue hecha por Wuard, quién descubrió que se podía inocular las plantas jóvenes de las leguminosas mediante el contacto de éstas con nódulos de plantas adultas (Tanner 1948).

En Alemania se observó que el cultivo de soya (Glycine max L. Merrill) no prosperaba sin antes haber adicionado suelo del habitat natural de la soya a sus semillas.

En 1886 dos científicos alemanes Hellriegel y Wilfarth, reportan haber descubierto que cierta bacteria, después llamada Rhizobium, que se encontraba en las raíces de las leguminosas inducía a la formación de nódulos. Demostraron que las plantas no leguminosas dependen para su crecimiento del nitrógeno mineral suministrado, pero que esto no es necesariamente así en el caso de las leguminosas. Hallaron que estas plantas cultivadas en un medio libre de nitrógeno, excepción hecha de las trazas aportadas en un inóculo del suelo, obtenían esta substancia en grado

suficiente y crecían bien cuando formaban nódulos. Por otro lado, si se agregaba un inóculo de suelo y luego se le esterilizaba, sus raíces no formaban nódulos, su crecimiento era lento y no ganaban nitrógeno (Tabla 3).

Tabla 3

Rendimiento de avena (Avena sativa) y arvejas (Pisum sativum L.) y saldo de nitrógeno en arena cuarzosa inoculada de diversas maneras o fertilizada con nitrógeno (Hellriegel y Wilfarth 1891).

Nitrógeno agregado como nitrato mg	inoculación	Peso de materia seca de las plantas en g		Nitrógeno en las plantas ganado (+) o perdido (-), en mg ¹	
		Avena	Arvejas	Avena	Arvejas
0	sin inocular	0.6	0.8	-20	-25
0	inoculado pe- ro esterili- zado.	- -	0.9	- -	-23
0	inoculado	0.7	16.4	-19	+386
112	sin inocular	12.0	12.9	-49	+38
112	inoculado	11.6	15.3	-47	+107

¹Relativo al nitrógeno agregado a la semilla, al medio y en forma de nitrato.

Sobre la base de estos experimentos, Hellriegel y Wilfarth formularon la teoría de que las bacterias de los nódulos radiculares asimilaban nitrógeno elemental del aire y que posteriormente, las plantas usaban parte de los

compuestos nitrogenados sintetizados por las bacterias. (Black 1975)

En 1888, Beijerinck logró aislar el organismo causal de los nódulos radiculares, al que denominó Bacillus radicola que posteriormente cambió para designarlo con el nombre genérico de Rhizobium. Mientras que el suelo es el habitat natural del rizobio, éste no está presente en todos los suelos (Burton 1961 citado por Carranza 1984).

En 1892 Schloesing y Laurent comprobaron que la ganancia en nitrógeno por las plantas se equilibraba con una pérdida correspondiente de aquel por la atmósfera, con lo que se corroboraba la teoría de Hellriegel y Wilfarth en cuanto a la fuente de nitrógeno. (Black 1975).

A este proceso de fijación biológica de nitrógeno debido a una asociación de una bacteria (Rhizobium sp) con una leguminosa, se le llamó simbiosis. La simbiosis consiste en una asociación íntima y permanente entre dos tipos diferentes de organismos (Croquist 1980). En un sentido más restringido, el término simbiosis se refiere a asociaciones en que ambos simbiosistas sacan provecho de la vida en común (Black 1975). En este caso los microorganismos radícolas utilizan el nitrógeno de la atmósfera y sintetizan compuestos nitrogenados. La planta recibe su nitrógeno de las actividades sintéticas de las bacterias y les proporciona a su vez alimento en forma de carbohidratos; es decir que una y otra se benefician viviendo en común (Salle 1965).

CARACTERÍSTICAS DE Rhizobium sp

Clasificación Taxonómica.

Bergey citado por Salle (1965), clasifica a Rhizobium sp de la siguiente manera:

Reino:	Vegetal
Subreino:	Thalophita
División:	Schizophita
Clase:	Schizomycetes
Orden:	Eubacteriales
Familia:	Rhizobiaceae
Género:	<u>Rhizobium</u>
Especies:	<u>leguminosarum</u> , <u>phaseoli</u> , <u>trifolii</u> , <u>lupini</u> , <u>japonicum</u> y <u>meliloti</u>

Un concepto generalmente aceptado para la clasificación del género - Rhizobium sp es la de grupos de inoculación cruzada, dicha agrupación se refiere solamente a la relación organismo-planta sin tomar en cuenta las características individuales de la bacteria (Perez 1980). Burton (1967) citado por el mismo autor, define como grupo de inoculación cruzada a las leguminosas que pueden ser inoculadas por un mismo Rhizobium sp y en consecuencia una especie del género Rhizobium sp está formada por todas las cepas que nodulan a un grupo de inoculación cruzada.

Fred y Wisconsin (1932) citados por Russell (1961) reconocen seis grupos de inoculación cruzada, basados en el supuesto de que todas las cepas que forman un grupo, podrían infectar todas las especies de plantas dentro del grupo y nunca fuera de él. Fred considera que cada especie de Rhizobium sp infecta a diferentes especies de leguminosas dentro de cada grupo.

Hay casi tantas cepas de bacterias radícolas como plantas sensibles. Hay que conjugar la pareja adecuada; la planta y el ríobio han de ser perfectamente compatibles (Salle 1965).

Regularmente se reconoce seis grupos de inoculación cruzada: el grupo alfalfa, frijol de vaca, lupino, chícharo, trébol y soya.

Stevenson citado por Tisdale (1982) emite un esquema de clasificación de las asociaciones Rhizobium-leguminosa Tabla 4.

TABLA 4

Esquema de clasificación de las asociaciones Rhizobium-leguminosa

ESPECIES DE RHIZOBIUM	GRUPO AL QUE PUEDE INOCULARSE	GENERO HUESPED	LEGUMINOSAS INCLUIDAS
<u>R. meliloti</u>	Alfalfa	<u>Medicago</u>	Alfalfa
		<u>Melilotus</u>	Trébol dulce
		<u>Trigonella</u>	Fenogriego
<u>R. trifolii</u>	Trébol	<u>Trifolium</u>	Trébol
<u>R. leguminosarum</u>	Chícharo	<u>Pisum</u>	Chícharo
		<u>Vicia</u>	Haba
		<u>Lanthyrus</u>	Guisante dulce
		<u>Lens</u>	Lenteja
<u>R. phaseoli</u>	Frijol	<u>Phaseolus</u>	
<u>R. lupini</u>	Altramuz	<u>Lupinus</u>	Altramuz
		<u>Orithopus</u>	Serradella
<u>R. japonicum</u>	Soya	<u>Glycine</u>	Soja
	Guisante vacuno ¹	<u>Vigna</u>	Cowpea
		<u>Lespedeza</u>	Lespedeza
		<u>Crotolaria</u>	Crotolaria
		<u>Pueraria</u>	Kudzu
		<u>Arachis</u>	Cacahuate
		<u>Phaseolus</u>	Frijol lima

¹Este grupo no ha alcanzado la condición de variedad.

Descripción morfológica.

Tanner (1949) describe a Rhizobium como una bacteria aerobia capaz de producir nódulos en las diferentes raíces de las leguminosas, son Gram negativas, miden de 0.5 a 0.9 por 1.2 a 3 micras; son móviles - cuando jóvenes comunmente cambian a formas bacteroidales en un cultivo artificial que contiene alcaloides o glucósidos, o debido a un incremento en la acidez, o bien durante la simbiosis dentro del nódulo. La temperatura óptima en que viven es de 25°C. Es una bacteria de tipo heterotrófica.

Generalmente las bacterias se producen asexualmente por división sencilla (fisión), división del cuerpo progenitor de dos partes hijas más o menos iguales (Salle 1965).

Los bacilos de Rhizobium tienen dos a cinco flagelos peritricos sobre la superficie y uno de ellos subpolar, en la mayoría de los casos los flagelos peritricos se desprenden fácilmente lo que no sucede con el flagelo subpolar (Rassel 1965 citado por Perez 1980).

En medios de cultivos in vitro pueden ser conservados fácilmente dadas las características heterotróficas (Bergey 1957 citado por Salle 1965).

Cuando se desarrollan en los nódulos muestran ramificaciones en forma de "T" o "Y" (formas bacteroidales) en las que se cree que la fijación de nitrógeno se efectúa en forma más eficiente. Otras formas características encontradas son de tipo de estrellas, clavos y bastones vacuolados (Echegary 1958).

Aunque la mayoría de los autores reconocen que Rhizobium es Gram negativa, Bisset (1952) citado por Perez (1980) menciona haber encontrado en nódulos de algunas leguminosas silvestres, formas Gram positivas semejantes a la del género Basillus sp que producen cocoides (formas muy pequeñas de bacterias) y endosporas resistentes. Crecen en medios que contenga agua de -

levaduras, manitol, extractos de plantas, malta y otros materiales. Reducen ligeramente los nitratos y no utilizan los nitritos.

IMPORTANCIA ECONOMICA DE LA RELACION SIMBIOTICA

Rhizobium-LEGUMINOSA

El aumento de la población mundial y la escasez de energía son dos fenómenos que van en crecimiento continuo, por una parte la población demanda mayor cantidad de alimento y la producción de éstos demanda a la vez la energía necesaria para incrementar el factor productividad, ya que en los últimos años el aumento de la producción vegetal está dependiendo del consumo de fertilizantes, sobre todo fertilizantes nitrogenados (Lopez y Ferrara 1981).

Para tener una idea de dicha dependencia, se menciona que la cantidad de este insumo utilizado para fines agrícolas fue de 0.4×10^6 Ton. en 1905, de 3.5×10^6 Ton. en 1974 y las proyecciones futuras indican que la demanda para la producción vegetal será alrededor de 160×10^6 Ton. para el año 2000 (Hardy citado por Lopez 1975).

Al cambio de la estructura molecular del nitrógeno que incluye el rompimiento de la molécula y su posterior reacción con hidrógeno para la formación en primer lugar del amoníaco y en forma subsecuente otros productos, se le denomina "Fijación de Nitrógeno". Este proceso es factible a nivel industrial mediante síntesis químicas, requiere consumos de grandes cantidades de combustible (hidrocarburos) para reunir las condiciones elevadas de temperatura y presión (Trujillo 1981).

Por otro lado, existe en la naturaleza un proceso de fijación de nitrógeno atmosférico de gran importancia. Este es realizado por diferentes microorganismos que poseen en su estructura un complejo sistema enzimático, capaz de transformar el nitrógeno atmosférico a varias formas asimilables por las plantas en condiciones de presión y temperatura nor-

males. Este proceso es llevado a cabo por varios microorganismos que viven en simbiosis con gran número de plantas, especialmente plantas leguminosas con las bacterias del género Rhizobium sp.

Existen gran cantidad de reportes que señalan la factibilidad económica del uso de cepas eficientes de Rhizobium en sustitución del fertilizante nitrogenado y en el incremento del rendimiento económico del cultivo (López y Ferrara 1981).

Gragham et. al. (1978-1979) efectuó un ensayo colaborativo de inoculación en varias localidades, utilizando diez cepas de Rhizobium phaseoli altamente eficiente. Los 12 ensayos del IBIT (The International Bean Inoculation Trial) se sembraron en siete países: México, Perú, Bolivia, EE UU (Hawaii), Brasil, El Salvador y Colombia, obteniendo respuestas significativas en el rendimiento (incremento del 39 al 61% sobre plantas testigas sin nitrógeno).

El área total cultivada en México es de 18'792,497 Ha. de las cuales 3'471,498 corresponden a leguminosas. Considerando que en el 27% de esta área se emplea fertilizante nitrogenado que representa el 17.3% de la producción actual del sulfato de amonio en México y de que la producción de inoculantes solamente satisface el 10.36% de las necesidades, las cuales llegan a 10,334 Ton. por año, se puede observar que la práctica de inoculación no es muy común. La principal causa es la falta de información y de divulgación de los beneficios que pueden obtenerse con la adecuada aplicación de los inoculantes (Trujillo 1981).

De acuerdo con el gran número de datos experimentales en los que se evalúan la cantidad de nitrógeno atmosférico que son fijadas por las diferentes leguminosas que se siembran en México, se puede observar la ventaja

que representa el uso adecuado de los inoculantes en las 3'000,000 de Ha. que aproximadamente se siembran, la fijación biológica aportaría 210,000 Ton. de nitrógeno anualmente, que equivaldrían a 1'000,000 de Ton. de sulfato de amonio.

IMPORTANCIA ECOLOGICA

La fijación de nitrógeno por las leguminosas, les confiere ventajas competitivas bajo condiciones de deficiencias de nutrientes, obviamente ellas son más eficientes al efectuarla bajo un conjunto de condiciones particulares. Nosotros estamos acostumbrados a considerar las plantas en términos ecológicos de su sistema fotosintético (C_3 , C_4 y CAM). La información llega a ser gradualmente disponible que nos permite pensar en términos paralelos con respecto a la fijación de nitrógeno (Sprent 1981).

La coevolución de Rhizobium-leguminosa se ha adaptado a diferentes condiciones ambientales y esto puede aún extenderla a tolerancias de minerales específicos; como el níquel y el magnesio, lo cual permite el enriquecimiento de nitrógeno en tales suelos.

La deficiencia de nitrógeno, se presenta en áreas erosionadas y abandonadas, tales como las dunas de arena, la lava volcánica, seguido de áreas agrícolas sobreexplotadas por el hombre. Estas áreas pueden ser recuperadas en cuanto al contenido de nutrientes, ya que la introducción de leguminosas permitiría el establecimiento de otras plantas no leguminosas que evitarían la erosión y ayudarían a captar agua y nutrientes. Las leguminosas juegan un papel positivo en el desarrollo de ecosistemas y en praderas, su ubicación específica puede estar estrechamente relacionada con especies complementarias especialmente pastos, las cuales crecen formidablemente en dicha asociación. La transferencia de nitrógeno de los dos simbioses Rhizobium-leguminosa puede realizarse por la exudación de compuestos nitrogenados orgánicos simples; por el desprendimiento de los nódulos y por el tejido radicular muerto.

Si un sistema se desarrolla por completo en bosques muy densos,

el sombreado generalmente eliminará a las leguminosas fijadoras de nitrógeno. El nitrógeno liberado de esta manera puede ser aprovechado por el bosque. Cuando el nitrógeno es reincorporado al suelo, las leguminosas pierden su capacidad competitiva y si éstas persisten fijarán poco nitrógeno.

LA RELACION PLANTA-BACTERIA

Principios que Explican la Relación Rhizobium-Leguminosa.

La relación Rhizobium-leguminosa depende de como sea interpretada la situación. Cuando dos organismos viven próximos el uno al otro es necesario entender cuales son las diferentes explicaciones que pueden darse al fenómeno.

Una forma interesante de intercambio de materiales entre parásito y hospedero es la que constituye la llamada simbiosis.

Con todo el rigor terminológico, la simbiosis es la asociación de dos organismos de manera tal que la vida de uno está estrechamente unida a la del otro. También el parasitismo patológico constituye una forma de simbiosis, puesto que uno de los dos microorganismos por lo general acaba por sucumbir, tal simbiosis se llama simbiosis antagónica.

Algunos autores han sugerido a la relación Rhizobium-leguminosa como un caso de parasitismo, la leguminosa efectúa el papel de hospedero y la bacteria el papel de parásito. Ruiz (1979) menciona que la simbiosis es un caso especial de parasitismo en el cual se establece una lucha entre el parásito y el huésped; de esta lucha resulta un equilibrio funcional, que una vez obtenido permite al huésped vivir a expensas del parásito contra el cual se defiende y al parásito existir a expensas del huésped. Algunas veces el equilibrio se rompe, pues en ciertas ocasiones se ha hecho constar que la planta mata a las bacterias y viceversa; éstas en condiciones apropiadas se reproducen con gran intensidad, que invaden todas las raíces y la leguminosa llega a sucumbir.

En la asociación Rhizobium-leguminosa ambos organismos se benefician,

por lo tanto el parasitismo no interviene en este fenómeno, la simbiosis mutua parece ser la explicación más razonable. Desde este punto de vista la simbiosis ha sido definida como una sucesión contigua entre dos o más organismos morfológicamente distintos, de diferente especie, resultando como consecuencia la adquisición de sustancias alimenticias. Esta definición implica que los organismos involucrados tienen la habilidad de vivir en forma independiente pero que ambos se benefician con la asociación. La pregunta puede responderse como un organismo que beneficia a otro en este caso. Esto se explica debido a que la bacteria obtiene de la planta carbohidratos y da a cambio el nitrógeno que es necesario para su crecimiento. En comparación con la forma no simbiótica de fijación de nitrógeno, la forma simbiótica tiende a aumentar la cantidad de materia orgánica en una forma alta en el suelo.

Infeción y Formación de Nódulos.

En la actualidad se comprenden bastante bien las etapas de la infección y desarrollo de los nódulos radicales (Fig. 2).

Las raíces de las leguminosas segregan diversos materiales orgánicos que estimulan el crecimiento de una microflora en la rizósfera. Alrededor de la parte exterior de la raíz de la leguminosa se forma una capa específica membranosa, el objeto de esta membrana es evitar que las secreciones de la raíz escapen de la región inmediata adyacente a esta y que la flora de la rizósfera quede así concentrada en esta zona, si en el suelo hay rizobios, crecen en la rizósfera y producen altas densidades de población (Brock 1973).

Dentro de los exudados radicales se han encontrado aminoácidos, azúcares, enzimas y vitaminas, siendo mayores las cantidades en las leguminosas (Rovira 1962 citado por Perez 1980). Así mismo Rovira y Harris 1961

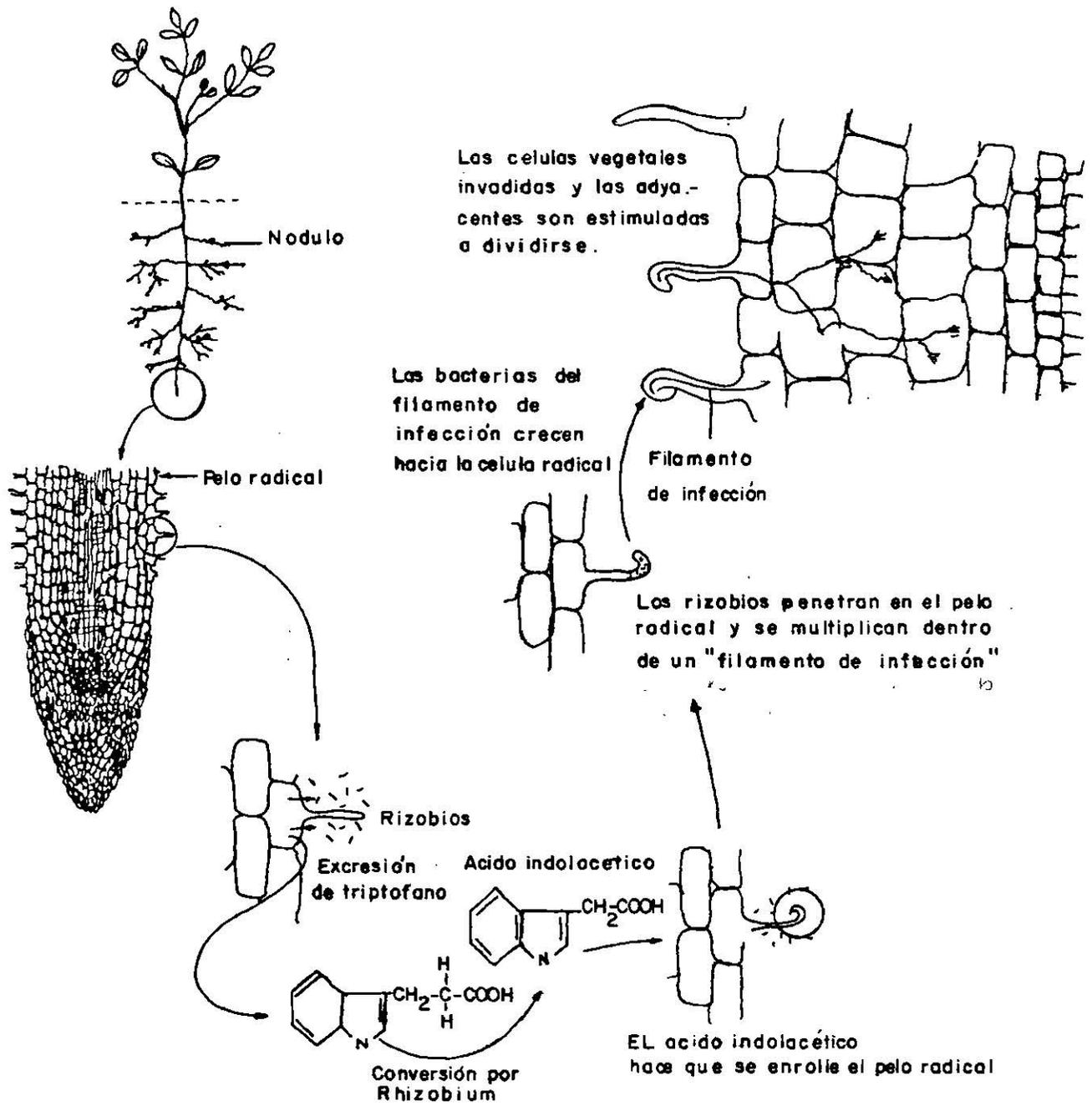


Fig. 2 Etapa de formación de un nódulo radicular

citados por el mismo autor, mencionan que la biotina pudiera ser el factor de crecimiento más importante de los exudados ya que está en cantidades suficientes para influir en los organismos de la rizósfera. Las secreciones radicales de las leguminosas estimulan cepas efectivas y no efectivas de Rhizobium y en menor grado otros microorganismos de diferentes especies.

Las bacterias existen en el suelo probablemente en una fase cocoide inmóvil, llamada también pre móvil y luego pasan a la forma flagelar de manera que están en condiciones de movilizarse y poder penetrar en los pelos absorbentes (Echegary 1958) (Fig. 3 y 4) .

La infección de la raíz se produce a través de los pelos radicales. Una de las secreciones de la raíz es el triptofano que se transforma en la hormona vegetal ácido indolacético (IAA) por los Rizobios (Brock 1973) .

Resumiendo el presente estado de conocimiento concerniente en los sucesos de la rizósfera antes de la infección por Rhizobium, Nutman (1963) emite un esquema de la interacción entre las bacterias y las raicillas. En la Fig 5 se distinguen una serie de nueve etapas. Las primeras seis afectan a la reacción de enrizado del pelo radicular de la leguminosa y las últimas tres son asociadas con la etapa preliminar específica de infección. Nutman menciona que, primero existe una secreción de la raíz, esto influye en una multiplicación de la bacteria, a su vez la planta secreta triptofano y la bacteria lo oxida a ácido indolacético (IAA), que con la ayuda de un cofactor no conocido segregado por la planta, produce un enrizado en la misma, posteriormente la bacteria produce un polizacárido que induce a la secreción de poligalacturasa por la planta, luego se produce la infección. En este momento pueden producirse enzimas que disuelven el material cementante que mantiene juntas las microfibrillas de

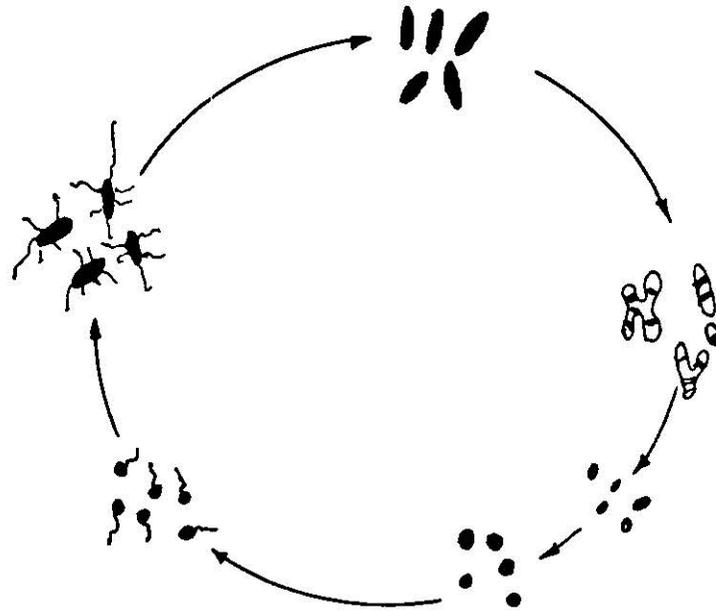


Fig. 3 Ciclo de Rhizobium leguminosarum mostrando su pleomorfismo

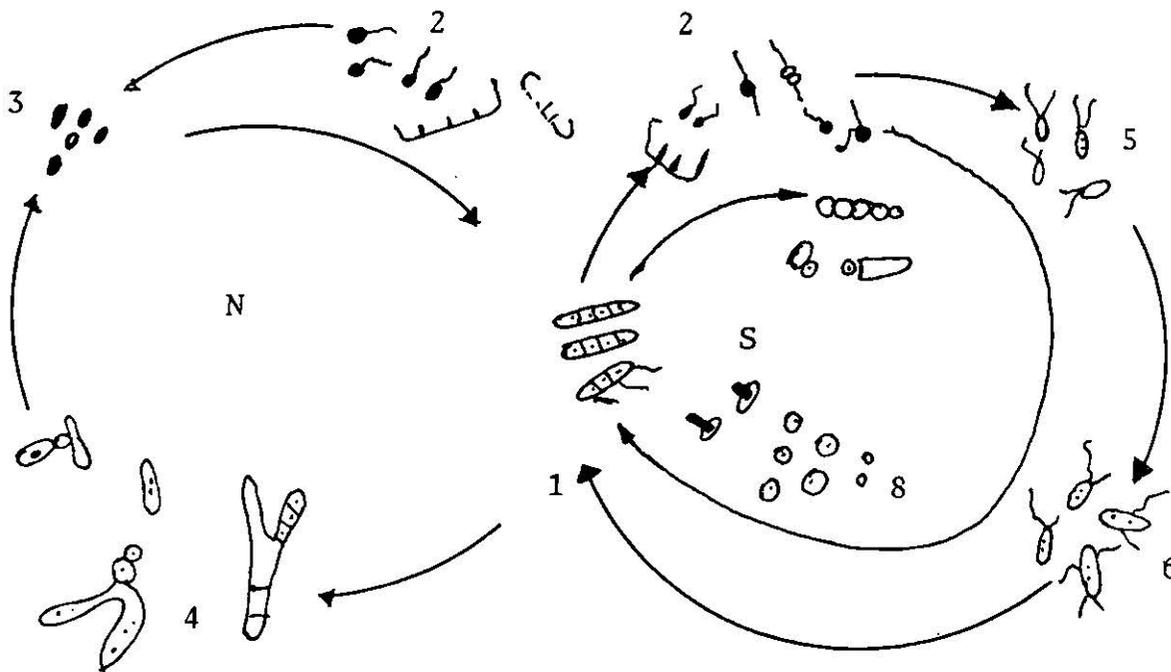


Fig. 4 Ciclo de Bisset. N. en el nódulo pequeñas bacterias pasan a bacterioides (4). S. en el suelo endosporas (8) o swimmers (2) que se forman de bacilos grandes (1-2). Los "swimmers" se transforman en pequeños bacilos (5-6), los cuales pueden atacar los pelos de las raíces de plantas susceptibles o crecer de nuevo como bacilos grandes (1). (Rubio y Tijerina citados por Sánchez 1964)

la celulosa del pelo radical y penetran en el citoplasma (Brock 1973). Entre los sistemas de enzimas poligalacturonásicos se encuentran la B-1, 3- glucanasas y pectinasas. Estas enzimas afectarían las fracciones pécticas de las paredes celulares componentes mayoritarios, en este caso facilitando de esta manera la penetración física de la bacteria (Córdoba 1976).

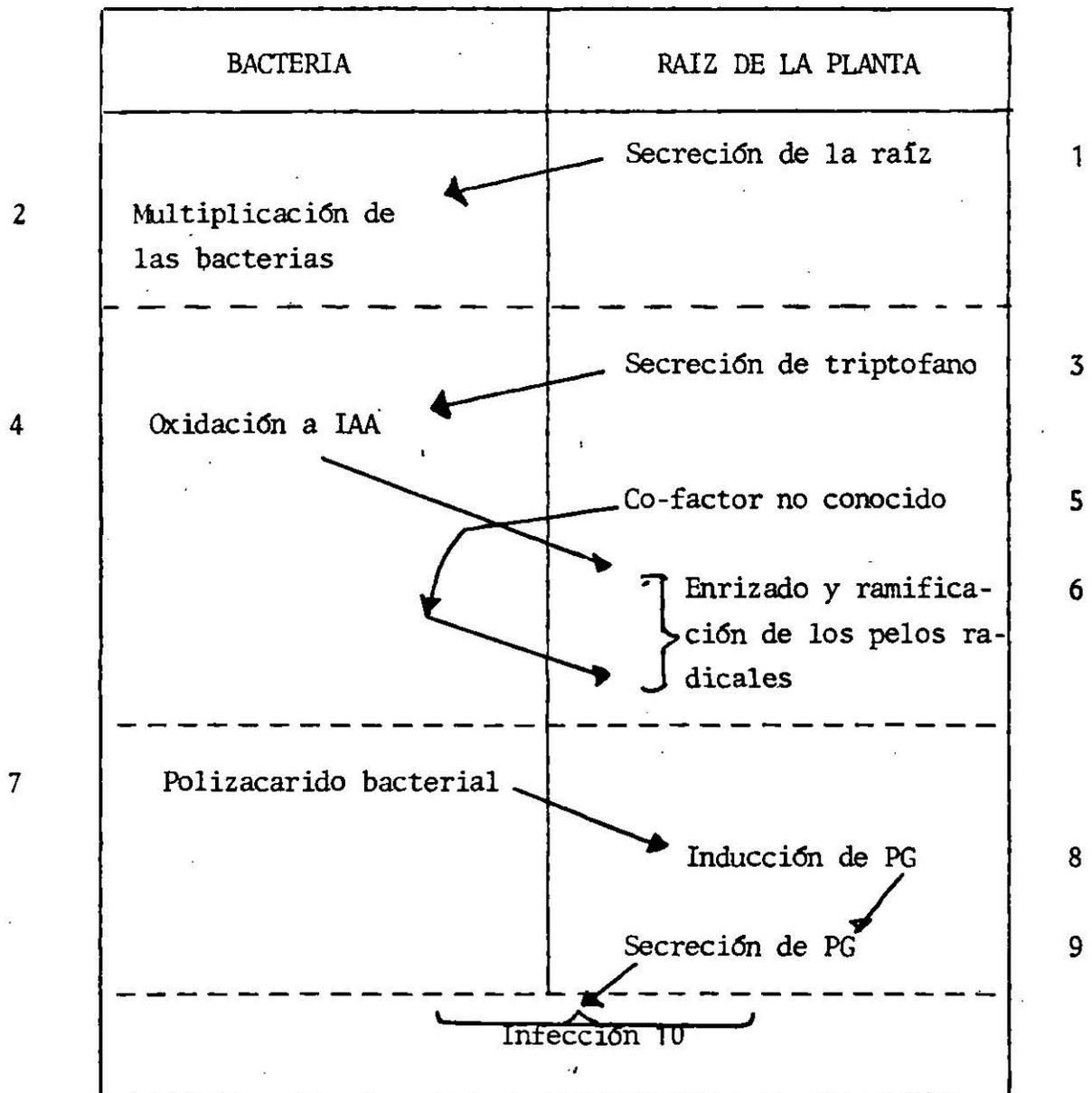


Fig. 5 Interacción entre la bacteria *Rhizobium* y las raíces de la leguminosa antes de la infección

Una vez dentro de la raíz, las bacterias se multiplican con gran rapidez y forman largos filamentos en esos pelos y hacia el interior del parénquima radical (Salle 1965). Estos filamentos son llamados "Filamentos de Infección" (Brock 1973). La progresión de este cordón infectante va acompañada de síntesis activa de celulosas y emicelulosas, depositadas longitudinalmente al camino de penetración, de tal manera que el cordón bacteriano queda envuelto en una rígida vaina polisacárida (Córdoba 1976). Estas bacterias originan una rápida proliferación de los tejidos circundantes en las células corticales más internas de la raíz y así se inicia la formación del nódulo. Este esbozo empuja hacia afuera el parénquima y la epidermis y produce una tumefacción lateral en la raíz; el nódulo consiste en una masa de células parenquimatosas de fina membrana generalmente llenas de germen específico. En estas etapas las bacterias ya perdieron sus flagelos y se transforman en las formas llamadas bacteroides, que aparecen en el interior de las células huésped con aspectos irregulares (Formas de X, Y, estrellas, clavas, bastones piriformes, hinchados o ramificados) y generalmente rodeados de una masa mucosa (Echegary 1958). Fig. 3

Si la célula infectada es una célula diploide normal habitualmente es destruida por la infección sufriendo necrosis y degenera, sin embargo si es una célula tetraploide puede ser el predecesor de un nódulo, ya que las divisiones progresivas de tales células conducen a la aparición de éste (Brock 1973).

En cultivo los rizobios producen citocininas que hacen que las células tetraploides se dividan y es posible que la producción de éstas tenga lugar en las células infectadas. Puppo y Rigaud (1978) mencionan

que la producción de citocininas en forma exógena por la planta es la responsable de alteraciones morfológicas de la raíz antes de la nodulación. Así mismo se ha comprobado que en la producción de estos fitoreguladores es necesaria la presencia de ambas partes; bacteria y planta.

Las leguminosas proveen a los bacteroides con carbohidratos los cuales oxidan. Varios de los electrones y ATP obtenidos durante esta oxidación son usados para reducir N_2 a NH_4^+ . Este NH_4^+ es convertido en los otros compuestos nitrogenados, la mayoría de los cuales son absorbidos por las células cercanas y traslocados a otros organismos (Salisbury 1978).

En frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) se ha encontrado que la actividad de fijación de nitrógeno por Rhizobium sp, comienza a ser efectiva cuando la planta tiene de dos a tres pares de hojas y se han sintetizado todos los componentes nodulares. Ella se incrementa rápidamente hasta la etapa de floración y decrece hasta llegar a cero antes de la madurez fisiológica (Rivero 1976). A partir de la madurez fisiológica, el nódulo empieza a deteriorarse en especies anuales (Brock 1978), lo cual no sucede en especies perenes ya que se ha encontrado que un mismo nódulo puede durar varios años (Black 1975). Una vez que el nódulo se desintegra, libera bacterias al suelo. Las formas bacteroidales son incapaces de dividirse, pero siempre hay un pequeño número de células bacilares que han permanecido inactivas; éstas proliferan ahora usando como nutriente algunos de los productos del nódulo deteriorado, y pueden iniciar un proceso de infección en otras raíces o pueden llevar una existencia libre en el suelo.

En resumen, el rizobio pasa por un ciclo especial que comprende cinco o seis fases: estado cocoide, fase cocoidea premóvil con organismos de diámetro mayor que los anteriores, fase móvil monoflagelar, fase móvil peritricar, fase de bastones no flagelados y por último, fase bacteroide con for-

mas vacuolizadas o con cromatina en bandas (Sánchez 1964). Fig. 3 y 4.

Infectividad y Efectividad.

Hay dos conceptos básicos que nos sirven para comprender la producción de nódulos, por la relación bacteria-hospedero, así como la eficiencia de estos nódulos en el proceso de fijación biológica del nitrógeno. Ellos son la infectividad y la efectividad. Cepa infectiva es aquella capaz de infectar una cierta leguminosa pero no siempre es capaz de producir nódulos fijadores de nitrógeno, por lo tanto estos son pequeños de color blanco verdoso. Cepa efectiva es aquella capaz de producir una eficiencia en cuanto a la fijación de nitrógeno. Al respecto Black (1975) menciona que el mejor elemento visual de la eficiencia de los nódulos es su color. Un nódulo eficaz presenta un centro rosado o rojizo, además es generalmente grande y se encuentra en una menor proporción en la raíz concentrado en las raíces principales, en tanto que los nódulos ineficaces están concentrados en las raíces laterales son pequeños y numerosos. Podemos encontrar nódulos eficaces e ineficaces en una misma planta.

Por otro lado, el color rojo resulta de la producción de una proteína parecida a la de la hemoglobina llamada leghemoglobina. No se conoce bien su papel pero parece ligarse a la fijación del N_2 , porque facilita la difusión del O_2 ya que el alto consumo de éste pudiera crear una limitante en el proceso (Sánchez 1964). Ni la planta ni Rhizobium sintetizan hemoglobina por sí solos pero la formación es inducida de algún modo por la interacción simbiótica de estos organismos. La información genética para la síntesis de leghemoglobina proviene, no obstante de la planta, como lo demuestra el hecho de que si dos leguminosas no relacionadas son infectadas con la misma especie de Rhizobium sp se forma proteína de leghemoglobina que presenta diferencias

electroforéticas, mientras que si la misma leguminosa es infectada con dos especies de Rhizobium, se forma la misma leghemoglobina (Brock 1973).

Bioquímica de la Fijación de Nitrógeno.

En el proceso de fijación el nitrógeno es reducido a amoníaco y este es convertido en la forma orgánica. El proceso de reducción es catalizado por la enzima nitrogenasa, que consiste en dos componentes proteicos separados (I y II). Los dos componentes contienen hierro y el componente I contiene además molibdeno. Los componentes de la nitrogenasa son inactivados por el oxígeno incluso si son aislados a partir de un aerobio. Debido a la estabilidad del enlace $\text{N}\equiv\text{N}$ el nitrógeno es extremadamente inerte y su reducción es un proceso que requiere mucha energía (Brock 1978). Por otro lado, la nitrogenasa no es una enzima muy activa y es por lo tanto requerida en grandes cantidades (1-2% de la proteína celular total) además que es una enzima que requiere grandes cantidades de energía (24-36 ATPs por cada molécula de N_2 reducida a NH_3) (Brill 1979). Además tienen que transferirse seis electrones por la ferredoxina para la reducción del nitrógeno (Fig. 8), pueden suponerse varios pasos intermedios, pero puesto que nunca se han aislado intermediarios, actualmente se supone que los tres pasos de reducción sucesivos tienen lugar con los intermediarios firmemente unidos a la enzima. La fijación de nitrógeno es de naturaleza altamente reductora y el proceso es inhibido por el oxígeno. En las bacterias aerobias la fijación de N_2 tiene lugar en presencia de oxígeno en las células enteras, pero no en las preparaciones enzimáticas purificadas, y se cree que la nitrogenasa de las células se haya en un microambiente protegido del oxígeno (Brock 1979). Precisamente el papel de la leghemoglobina es impedir que el oxígeno desactive la nitrogenasa (Brill 1979). Algunas bacterias que pueden

crecer tanto anaeróbicamente como aeróbicamente, fijan N_2 sólo en condiciones anaeróbicas.

Los electrones para la reducción del nitrógeno son transferidos a la nitrogenasa desde la ferredoxina, el transportador de electrones es de bajo potencial redox. (De hecho, la ferredoxina se descubrió primeramente en las bacterias fijadoras de nitrógeno al realizar estudios sobre la naturaleza del transportador de electrones en la fijación del nitrógeno y luego se encontró que estaba también presente en los organismos no fijadores de nitrógeno).

En todos los organismos estudiados, además de la ferredoxina es necesario ATP para la fijación de nitrógeno. Los electrones son primeramente transferidos al componente II la ferroproteína, aunque el componente II debe reaccionar primero con el ATP antes de que pueda aceptar electrones. Una vez que el componente II es reducido, puede reaccionar con el componente I oxidado, la proteína ferromolibdénica, que luego es reducida. El componente I reducido puede ahora convertir el N_2 a NH_4 . Fig. 6

La nitrogenasa no es específica para el N_2 , sino que también reduce el cianuro (CN^-), el acetileno ($HC\equiv CH$) o C_2H_2 y varios compuestos, la reducción del acetileno probablemente no tiene ninguna finalidad práctica para la célula, pero proporciona al experimentador una manera simple de medir la actividad de los sistemas fijadores de nitrógeno ya que es fácil medir la reducción del acetileno a etileno ($H_2C\equiv CH_2$). Esta técnica se emplea actualmente para detectar la fijación de nitrógeno en sistemas desconocidos. Otro método consiste en mostrar un incremento neto en el contenido total de nitrógeno del medio más el de los organismos después de la incubación; debería suponerse que el nitrógeno incrementado sólo podría proceder del N_2 del aire. Un procedimiento más sensible es utilizar un isótopo del -

nitrógeno ^{15}N como trazador (El ^{15}N no es un isótopo radiactivo, sino estable y su presencia puede detectarse por el espectrofotómetro de masas) (Brock 1978). El procedimiento consiste en la activación de la atmósfera del suelo con $^{15}\text{N}_2$ durante cortos períodos de tiempo, medición del aumento del ^{15}N en las plantas y cálculo del nitrógeno total durante este período. Los primeros resultados obtenidos con plantas de frijol (Phaseolus vulgaris L.) y trébol (Trifolium sp) demostraron que después de siete horas de incubación, pudieron medirse cantidades significantes de ^{15}N en las plantas, permitiendo la determinación precisa de la relación $\text{C}_2\text{H}_4/\text{N}_2$. Durante períodos más largos de tiempo, tales cantidades son de gran importancia para seguir el modelo de distribución de N de los nódulos hacia los órganos reproductivos de las plantas (Montage 1981). Sin embargo, el método de reducción de acetileno es un procedimiento todavía más sensible y está sustituyendo rápidamente al método del ^{15}N , más dificultoso. El cultivo extracto celular es incubado con acetileno y la mezcla de reacción es luego analizada por cromatografía en fase gaseosa para la producción de la sustancia gaseosa de etileno. Este método es mucho más simple y rápido que los demás.

La Fig. 6 muestra un esquema de la fijación de nitrógeno según Carpenter (1969) y Brock (1973).

La Fig. 7 muestra un esquema del proceso general de fijación de nitrógeno según Shanguman citado por Rojas (1981).

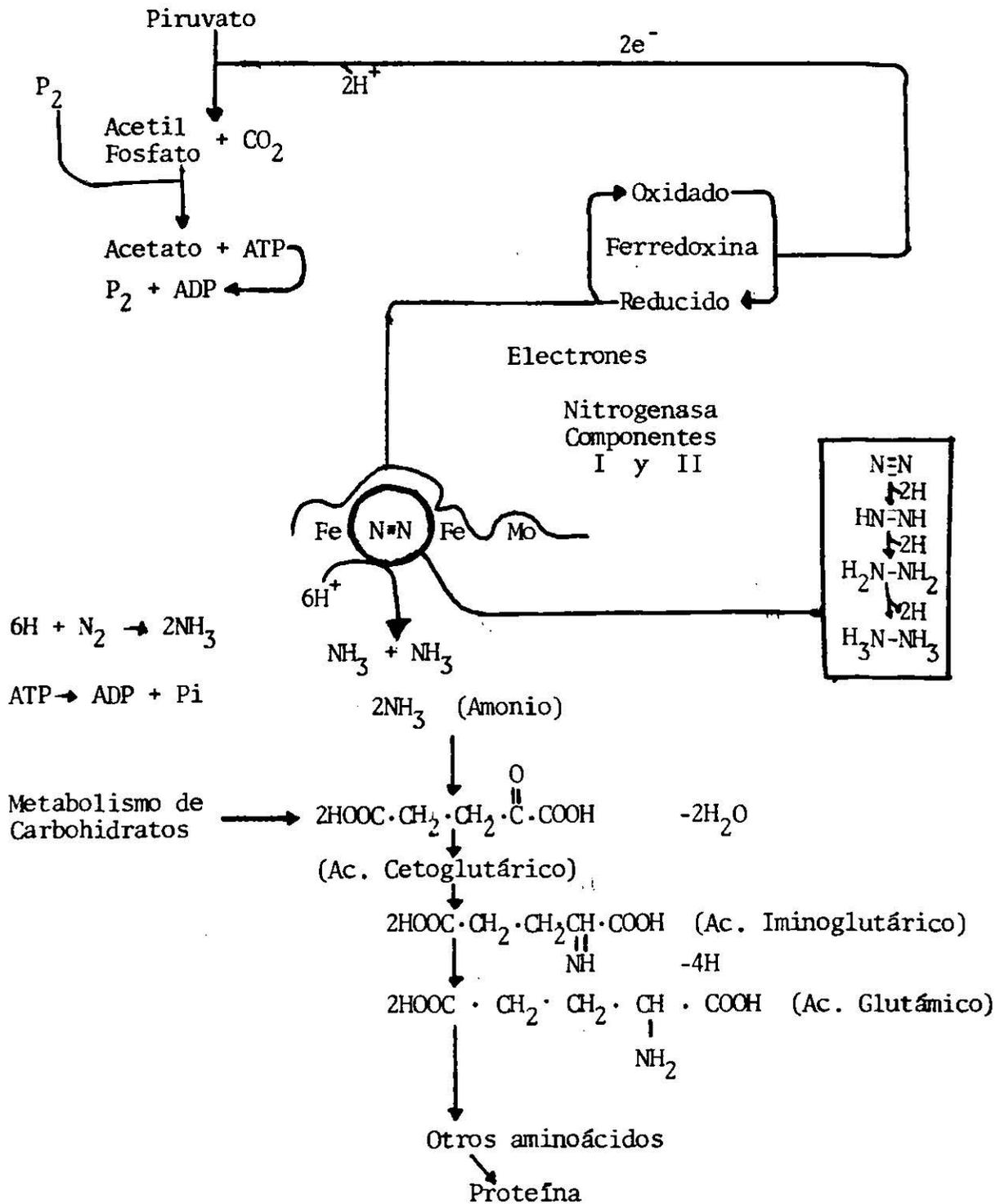


Fig 6. Fijación de nitrógeno dentro de la bacteria. (Según Brock 1973 y Carpenter 1969).

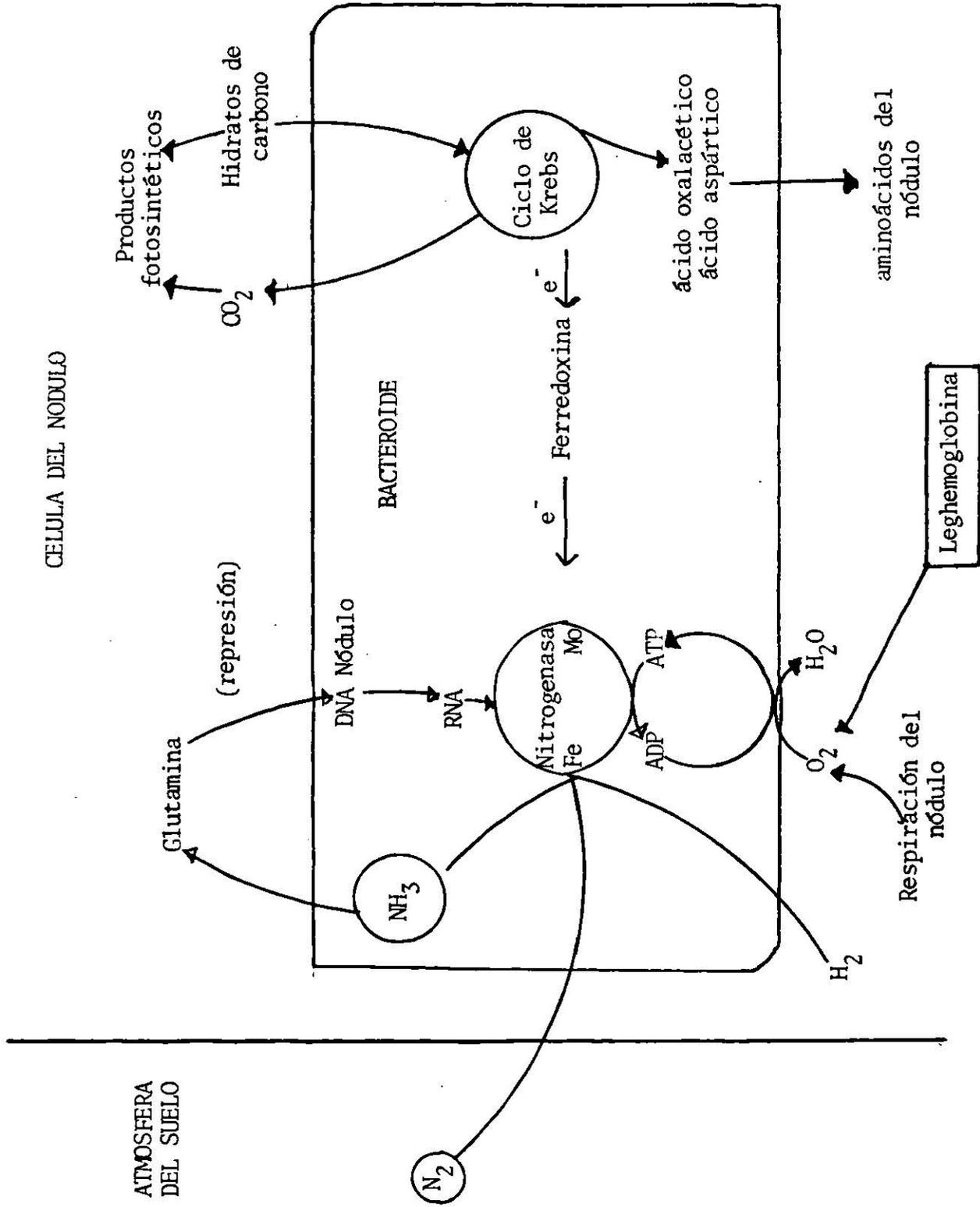


Fig. 7. Esquema de la fijación de nitrógeno, por el nódulo de una leguminosa (Según Shanguman citado por Rojas 1982).

FACTORES AMBIENTALES Y GENETICOS QUE AFECTAN A LA RELACION

Rhizobium-LEGUMINOSA

La fijación de nitrógeno por el sistema simbiótico Rhizobium-leguminosa, depende de una serie de factores edáficos, climáticos y genéticos que pueden ser agrupados en dos categorías:

a) Factores Endógenos. Son los que determinan el grado de compatibilidad entre la planta y la bacteria, dado por características fisiológicas, morfológicas y fenológicas de los individuos.

b) Factores Exógenos. Se refieren a las condiciones del medio ambiente que inciden en el sistema raíz-bacteria y definen la intensidad de la infección, nodulación y fijación activa de nitrógeno. Algunos de los más importantes son: temperatura, humedad, oxígeno, pH, disponibilidad de nutrientes y otros (Alcalde 1976 citado por Alcantar 1978).

Por otro lado, podemos agrupar a los factores que afectan a la fijación biológica del nitrógeno, de acuerdo a la naturaleza de los mismos en:

a) Factores Químicos. Se refieren al efecto que tienen los nutrientes, fungicidas, insecticidas, etc.

b) Factores Físicos. En este aspecto quedan agrupadas; la temperatura, humedad, pH, luz, etc.

c) Factores Biológicos. Se refiere a la interacción que tiene la bacteria con el hospedero, y con otros microorganismos que se encuentran en la rizósfera. Este tipo de interacción incluye procesos como el antagonismo, el sinergismo y la predación, así como el efecto genético de la bacteria y hospedero en su relación como simbiosis. Para nuestro estudio nos basaremos en esta última clasificación.

Factores Físicos.

Temperatura. La temperatura es un factor importante en la supervivencia de la bacteria, tanto en el suelo como en la planta. Según Muevar y Wollum (1981) algunos aspectos de la simbiosis afectados por la temperatura son:

1. El crecimiento y supervivencia del rizobio en la rizósfera Fig. 8.
2. La unión de células rizobiales con las células de los pelos radicales.
3. La formación de filamentos de infección.
4. El contenido de leghemoglobina en los nódulos.
5. La formación de pelos radicales.
6. La actividad de la enzima nitrogenasa.
7. Y consecuentemente el contenido de nitrógeno y producción de materia seca en la planta.

Gomez (1963) efectuando un experimento en frijol con el fin de medir el efecto de la materia orgánica, pH y la temperatura del suelo sobre la nodulación causada por Rhizobium phaseoli, encontró que la nodulación fue mayor a una temperatura de 30°C. que a 40°C. De acuerdo con Gukova (1945) una disminución de 5°C. en la temperatura óptima ocasiona una reducción de un 5% en la cantidad de nitrógeno fijado, en cambio cuando aumenta 4°C., la fijación se reduce un 50%. Temperaturas abajo de 6.5°C. no afectan el poder infectante. Según este autor la temperatura óptima está entre 20 y 24°C. (Gukova 1945 citado por Sánchez 1964).

Muevar y Wollum (1981) encontraron que el proceso de iniciación nodular es más susceptible a bajas temperaturas (alrededor de 28°C.) que a temperaturas medianamente altas (33°C.), así mismo durante esta temperatura, las colonias muestran un mayor peso nodular y actividad de nitrogenasa.

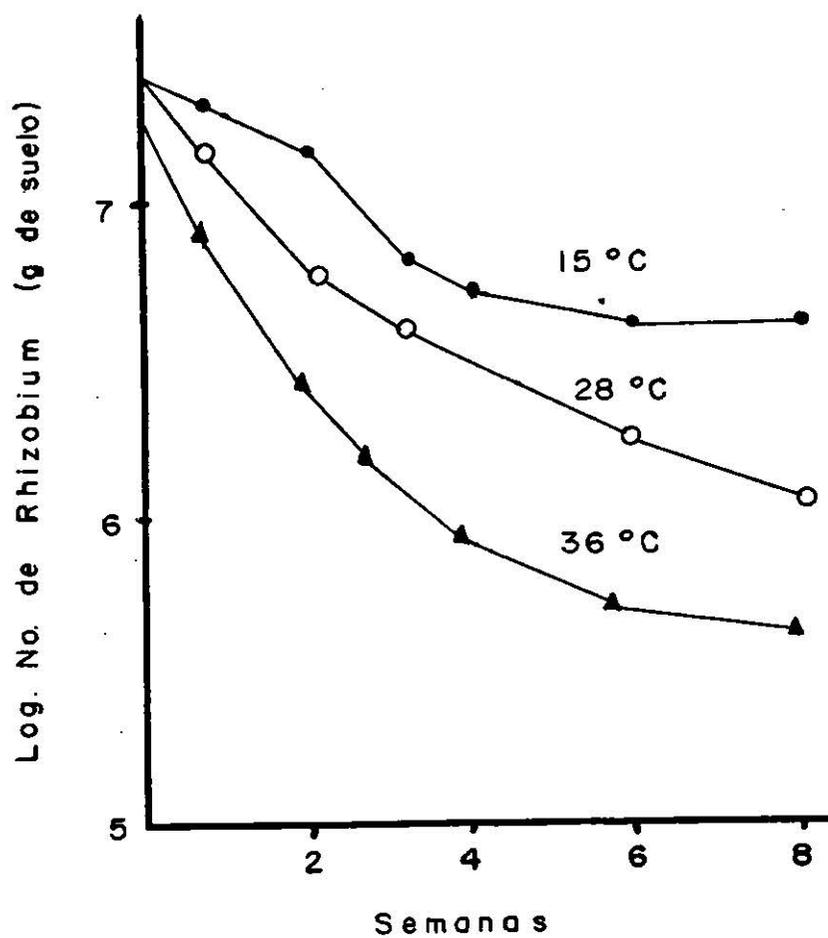


Fig. 8 Efecto de la temperatura en la sobrevivencia de *Rhizobium meliloti* en un suelo de arena finofranca. (Ciat 1980).

Reacción del Suelo.

La reacción del suelo es de gran importancia, no sólo afecta el desarrollo del rizobio y la producción de nódulos, sino también el crecimiento y captación de nitrógeno por las plantas. Los suelos ácidos generalmente causan escasez de elementos básicos como calcio, magnesio, potasio y frecuentemente fósforo y nitrógeno, además pueden originar liberación de elementos tóxicos, como aluminio y manganeso (Sánchez 1964).

Vencatasamy y Beerally (1981) mencionan que en cultivos hechos *in vitro*, la cepa de Rhizobium phaseoli presentó crecimiento satisfactorio con un pH entre 5.8 y 8.7. El desarrollo de las plantas no se afectó dentro de un rango de pH de 4.7 a 8.7, pero se observaron diferencias altamente significativas en la producción de tejido nodular. También encontraron que la formación y desarrollo de los nódulos se inhibió a un pH de 5.5 y por encima de un pH de 6.8. Los nódulos no se produjeron a un pH de 7.9 ni por encima de este.

El CIAT (1981) reporta haber encontrado cepas de Rhizobium sp que tienen la habilidad de crecer en un medio sintético con un pH de 4.6 y exceso de aluminio y manganeso Fig. 9.

Se ha encontrado que todos los rizobios muestran la misma tolerancia a la alcalinidad con un límite aproximado de pH igual a 9.6; sin embargo la acidez les afecta en una forma variable siendo Rhizobium meliloti el menos tolerante, con un límite aproximado de pH igual a 5.0; los más tolerantes con un pH igual a 3.2 - 4.2 son R. lupini y R. japonicum (Whyte 1968):

El efecto del pH puede estar correlacionado con otros factores. - Gomez (1963) efectuando un experimento con frijol (Phaseolus vulgaris L.)

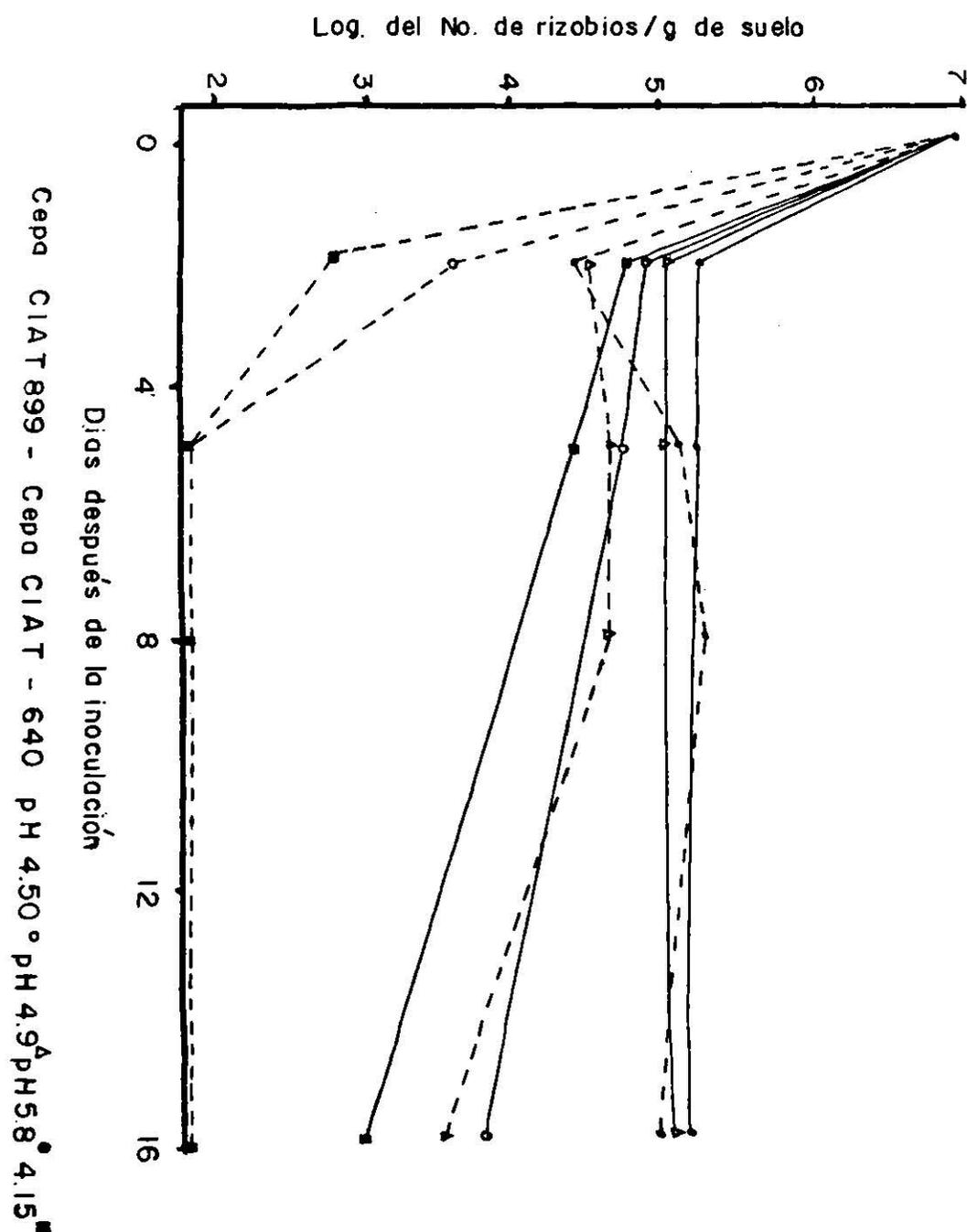


Fig. 9 Patrones de sobrevivencia de dos cepas de Rhizobium phaseoli en suelos con diferentes valores de pH.

con el propósito de medir el efecto de la materia orgánica, pH y temperatura del suelo sobre la nodulación causada por R. phaseoli, encuentra que la nodulación es mayor con los factores; temperatura del suelo a 30°C., pH 7.3 y presencia de materia orgánica, sin embargo cuando la temperatura del suelo fue de 35°C, el mayor número de nódulos correspondió a los factores pH 7.8 y sin materia orgánica.

Humedad.

El efecto de la humedad del suelo, en la nodulación de las leguminosas es manifiesto, ya que ésta puede ser demorada o inhibida completamente en los suelos expuestos a sequía o a períodos secos y húmedos alternos - (McKee 1961). La humedad no es sólo un factor importante en el desarrollo de la planta hospedera, sino también en la supervivencia de Rhizobium sp tanto en el suelo como en la semilla inoculada. Se sabe que esta bacteria es extremadamente sensible a la sequía, solamente unas cuantas células pueden sobrevivir cuando la mezcla del suelo contiene aire seco, por otro lado un exceso de agua puede limitar la aereación y por lo tanto inhibir el crecimiento de las bacterias (Sánchez 1964). De ahí que en las regiones áridas es importante inocular con cepas nativas y no con cepas importadas debido a la adaptabilidad de las primeras.

Trinidad (1979) llevó a cabo un ensayo de inoculación con Rhizobium de veza (Vicia villosa Roth) y trébol rojo (Trifolium incarnatum) bajo condiciones de invernadero. El ensayo se hizo con el fin de observar el efecto de la inoculación en el rendimiento de materia seca, bajo dos condiciones de humedad en el suelo. Se encontró un aumento en el rendimiento de M.S. en trébol rojo, por el efecto de la inoculación a un nivel alto de humedad - (19% en suelo arcilloso y 9% en suelo arenoso), en tanto la veza fue mayor

a bajo nivel de humedad (14% en suelo arcilloso y 5% en suelo arenoso).

Luz.

El número de nódulos radiculares fijadores de nitrógeno, está controlado por el fotoperíodo que actúa a través de las hojas de la planta, puesto que la bacteria necesita energía alimenticia manufacturada por las hojas para realizar su labor, cuanto más luz y clorofila haya, tanto más alimento se le proporciona a la bacteria, así pues la coordinación máxima entre la planta y la bacteria se ve reforzada por el regulador fotoperiódico (Odum 1977). Estas observaciones de Odum son hasta cierto punto verdaderas ya que es ampliamente conocido el hecho de que la bacteria necesita de fotosintatos para su manutención, al respecto Sánchez (1964) menciona que si una planta en proceso de nodulación es puesta en la oscuridad, la formación de nodulos cesa y los ya formados degeneran, la hemoglobina se destruye y da origen a pigmentos verdes. Esto se puede explicar debido al déficit de fotosintatos, ya que la planta en ausencia de luz no los produce y por lo tanto la bacteria degenera. Por otro lado, Odum (1977) menciona que con un aumento en el número de horas luz, hay más alimento para la bacteria y su eficiencia en la fijación es mayor, sin embargo en la práctica se ha encontrado lo contrario; Mckee (1961) estudió el efecto de la luz en la nodulación de trébol y encontró que ésta fue inferior en fotoperíodos de 9, 11 y 24 horas luz en comparación a la obtenida por el fotoperíodo que variaba de 12 a 15 horas; así mismo Dart (1973) encontró que tanto los días cortos como la intensidad de luz limitaron la nodulación y fijación de N, los nódulos desarrollados en días cortos desaparecieron durante la floración y formaron otros nuevos durante el desarrollo de las vainas, excepto con una cepa de Rhizobium. Por otro lado, un exceso de luz trae como consecuencia la formación excesiva de carbohidratos,

lo cual produce una disminución en la fijación de nitrógeno (Sánchez 1964).

De lo anterior podemos concluir que tanto un exceso como un déficit de luz, provocan una disminución en la eficiencia de la relación planta bacteria. Ya que el exceso trae como consecuencia la formación excesiva de carbohidratos y por lo tanto una disminución en la fijación de N_2 , por otro lado un déficit disminuirá la cantidad de energía en forma de fotosintatos destinados a la bacteria.

Densidad de Población.

Aunque la densidad de población no es un factor meramente físico, se agrupó entre éstos, debido al efecto que tiene sobre la capacidad de luz. Graham (1978) probó la densidad de población de tres variedades de frijol, con el fin de observar la fijación de nitrógeno y el desarrollo nodular. Al cosechar el frijol de tipo trepador (P 590) a los 39 días observó que la fijación de nitrógeno disminuyó de 15.1 mol de C_2H_2 producido/planta/hora con 8.5 plantas/ m^2 , a solamente 4.2 mol de C_2H_2 producido/planta/hora con 41.5 plantas/ m^2 en tanto que las variedades de tipo rastrero mostraron constantemente una fijación alta con altas densidades de siembra. La variación de la fijación de nitrógeno obedece principalmente al cambio del peso de los nódulos y la actividad nodular específica (ANE). Los cambios en la densidad afectaron al desarrollo de la hoja, la raíz y el tallo en todos los cultivares, pero las hojas de los nudos más bajos fueron las más severamente afectadas. Es lógico pensar que una disminución en el área foliar de la planta, disminuye la capacidad para producir fotosintatos y por lo tanto la capacidad de fijación de nitrógeno, sobre todo por las hojas bajas, sin embargo, es necesario encontrar la máxima densidad posible por unidad de área sin afectar el área foliar por efecto del sombreado, y de esta manera tener la máxima producción de grano.

Factores Químicos.

1.- Nutrientes

Nitrógeno. Se ha observado que existe una gran influencia de la cantidad de nitrógeno que se encuentra en el suelo, en la nodulación causada por Rhizobium sp. Westermann (1981) menciona que cuando un cultivo se fertiliza con una fuente nitrogenada (p.e. sulfato de amonio) y se inocula simultáneamente, la cantidad de nitrógeno simbiótico fijado disminuye a medida que el nitrógeno disponible en el suelo o el fertilizante nitrogenado aumenta. Así mismo en suelos deficientes de nitrógeno, una baja tasa de fertilización con este elemento, asegura un crecimiento inicial vigoroso aunque no siempre aumenta el rendimiento de la semilla. Respecto a otras fuentes de nitrógeno se ha encontrado un efecto similar, Paz (1979) en un ensayo de inoculación de Phaseolus vulgaris con Rhizobium sp., aplicó cuatro niveles de nitrógeno (utilizando como fuente el nitrato de sodio a 0, 8.4, 16.8 y 42 ppm) a una solución nutritiva, encontrando que el nitrógeno aplicado inhibió la nodulación y fijación de nitrógeno, sin embargo, es necesario una primera dosis para el desarrollo de la planta. Alcantar (1978) mediante el estudio de diferentes niveles de NH_4 y NO_3 sobre la nodulación, eficiencia de fijación de nitrógeno y rendimiento de frijol, encuentra que el peso y número de nódulos son reprimidos por los niveles altos de nitrógeno N (45 y 60 ppm), durante las etapas iniciales de su formación y crecimiento. Habiéndose detectado que existe una acción diferencial entre las dos fuentes estudiadas encontrándose una represión más evidente para los nitratos.

Posiblemente el efecto depresor del nitrógeno, sea debido a la relación carbohidratos-nitrógeno en la planta, como consecuencia de que ésta no

suministra suficiente cantidad de carbohidrato a la raíz (Allison y Ludwig 1935 citado por Sánchez 1964). Si esta relación C/N se prolonga durante mucho tiempo se inicia la degeneración del nódulo, en tales circunstancias, la presencia del nódulo en el hospedero es más perjudicial que útil, ya que los rizobios entran en una fase parasitaria. Por el contrario, cuando el suelo contiene poco o ningún nitrógeno asimilable y las plantas dependen por completo de la fijación simbiótica, después de la germinación y antes de que se haya establecido el sistema de simbiosis, la planta entra en un período de hambre de nitrógeno en que utiliza todas las reservas de la semilla durante una semana o más, hasta que empieza la fijación, si no se recurre a la inoculación.

Fósforo. Las leguminosas requieren de un alto contenido de fósforo, debido a que este elemento es un constituyente ampliamente distribuido en las proteínas. Se ha encontrado que la densidad de los nódulos existentes en la raíz es fuertemente estimulada por el fósforo.

Diener (1950) citado por Sánchez (1964) observó que cuando los niveles de fósforo en el suelo son muy bajos, los rizobios pueden penetrar a la raíz de las leguminosas; pero la infección se mantiene latente y los nódulos no se desarrollan.

Según Alexander (1980) el fósforo en su papel de nutriente esencial, tiene influencia directa en las ganancias del nitrógeno y en la producción de las leguminosas; las respuestas de la fijación de nitrógeno y de los mecanismos de nodulación hacia la fertilización con fósforo, están asociadas con el vigor y la salud del hospedero, más que ser los reflejos de una estimulación específica de la simbiosis.

Devlin (1980) menciona que en los tejidos meristemáticos (entre ellos

los de la raíz), sede de un activo crecimiento, se encuentran fuertes concentraciones de fósforo, que intervienen en la asociación de nucleoproteínas. Este elemento tiene una gran influencia en el crecimiento y desarrollo de los sistemas radiculares, lo cual beneficia al hospedero para efectuar una mejor relación planta-bacteria.

El fósforo forma parte de la molécula de ATP (trifosfato de adenosina), este compuesto sirve como portador de energía liberada durante la descomposición de productos alimenticios producidos en la fotosíntesis (Alamang y Mertens 1979). El ATP le confiere energía a la enzima nitrogenasa que es un complejo que logra la reducción del nitrógeno atmosférico (N_2) convirtiéndose en amoníaco, forma ampliada para su incorporación en aminoácidos (Córdoba 1976). Fig. 7

Potasio. Se ha encontrado que no hay estimulación en la fijación de nitrógeno por el fósforo, si no existe en los suelos adecuada cantidad de potasio, pero no así en el peso de los nódulos (Robert y Olson 1942 citado por Sánchez 1964). Sin embargo, Diener (1950) citado por el mismo autor menciona que el potasio no afecta la formación de los nódulos.

Azufre. El azufre al igual que el fósforo, es necesario para el suministro de energía en los nódulos y en su ausencia éstos permanecen pequeños y no fijan nitrógeno.

Janseen (1972) menciona que la aplicación de azufre aumenta el contenido de nitrógeno en la planta, así como su fijación. También tiene gran influencia en el aumento de la metionina en las proteínas.

Molibdeno. Este elemento posee doble función, en pequeñísimas cantidades es requerido para la reducción de NO_3 a NH_4 y relativamente en grandes cantidades para la fijación de nitrógeno en las leguminosas. El molibdeno forma parte de la enzima nitrogenasa (Rojas 1981).

Las aplicaciones de molibdeno incrementan significativamente el número, peso y tamaño de los nódulos (Mears et. al. citado por Lerma 1977).

Calcio. Este elemento tiene influencia en la reacción del suelo, de ahí su importancia en el desarrollo de la planta y sobrevivencia de los rizobios. Se ha encontrado que las aplicaciones de cal al suelo generalmente favorecen el crecimiento y nodulación de Glycine max cuando nodula en suelos bajos de calcio y con un pH de 5.3 (Diatloff y Luck citados por Lerma 1977).

Paz (1978) efectuó un experimento con el fin de observar la influencia del pH y la nutrición mineral en la nodulación y fijación de nitrógeno por el frijol cultivado en solución nutritiva. Entre algunas de las variables bajo estudio, suministró seis niveles de calcio (0.01, 0.05, 0.25, 0.50, 1.25 y 2.5 mM/l), actuando bajo cuatro rangos de pH (4.0, 5.0, 6.0 y 7.0), observando un efecto favorable del calcio en los parámetros bajo estudio hasta un nivel de 1.25 mM/l.

Fierro. El fierro es necesario para la producción de la hemoglobina presente en los nódulos y en otros compuestos en el proceso de maduración de los nódulos, ya que se cree que actúa como catalizador debido a los cambios de valencia (transportador).

El fierro forma parte de la enzima nitrogenasa que está formada por dos unidades distintas, la primera de ellas que contiene fierro y molibdeno en su molécula, toma los electrones directamente de la ferredoxina (Fig. 7), reduciendo ésta para serlos posteriormente a la segunda subunidad que contiene exclusivamente fierro, esta es la auténtica proteína reductora del nitrógeno atmosférico (Córdoba 1976).

Cobalto. El cobalto forma parte de la vitamina B₁₂, que es indis-

pensable en la síntesis de leghemoglobina.

Boro. Aunque el boro no se ha encontrado que sea esencial para los rizobios, si es necesario para el buen desarrollo de las plantas y en forma esporádica, para el buen desarrollo de las raíces.

Cuando existe una deficiencia de boro, el tejido vascular de los nódulos se desarrolla en forma anormal afectando el aspecto bacteroide. Otro efecto que causa esta deficiencia es la acumulación de carbohidratos en la planta, lo cual disminuye la fijación de nitrógeno (Sánchez 1964).

Cobre. La planta necesita pequeñas cantidades de cobre para su buen desarrollo y cuando este elemento es deficiente, el metabolismo de los carbohidratos se altera. Erkoma citado por Sánchez (1964), ha demostrado que cuando hay deficiencia de cobre se forma una menor cantidad de hemoglobina. Otro de los efectos es una pobre síntesis de proteínas.

2. Elementos Tóxicos en la Nodulación.

Se ha encontrado que elementos como el aluminio, manganeso y el cadmio inhiben la nodulación, el crecimiento de las raíces pequeñas y la fijación de nitrógeno (Paz 1978, Vige 1981).

La toxicidad de los elementos como manganeso y aluminio así como la disponibilidad de otros, puede deberse a los efectos de la acidez del suelo y deficiencias de calcio.

Vige (1981) realizó un experimento para determinar la toxicidad del cadmio en la nodulación, fijación de N_2 y crecimiento de frijol, cultivando plantas en el invernadero en soluciones hidropónicas a las cuales adicionó 0.1 y 500 Mm. de Cd/1. El contenido total de N en los tallos, el peso y número de nódulos y la fijación de N_2 (C_2H_2) se correlacionaron negativamente con las concentraciones de solución del Cd ($r = -0.97$).

3. Pesticidas

Con respecto al efecto de estas sustancias en la simbiosis Rhizobium-leguminosa, los trabajos son múltiples, en general ponen de manifiesto una inhibición o disminución total en la tasa de fijación de nitrógeno.

De Luna (1983) sometió tres cepas de R. phaseoli a tres pesticidas comerciales (Diazinón, Malathión y Sevín) aplicados en diferentes concentraciones. Él observó que el pesticida más tóxico fue el Sevín, puesto que sólo permitió un ligero crecimiento en la cepas. El Diazinón fue el menos tóxico, ya que no afectó el crecimiento de las colonias. En las figuras 10, 11 y 12 podemos observar la cinética de crecimiento de una cepa de Rhizobium en un medio ELM y tres pesticidas.

Pillay (1979) investigando el efecto de los pesticidas: Tiram (400, 800, 1600 y 2400 ppm), Azodrin (2300, 4600, 9200 y 13800 ppm) y Dithane (4500, 9000, 18000 y 27000) en Rhizobium phaseoli mediante la técnica de placa de agar, encontró que el efecto más tóxico fue del Tiram, manifestándose como una inhibición de la nodulación, mientras que Dithane la redujo pero no totalmente. Azodrin no presentó efecto inhibitorio en R. phaseoli.

Como podemos ver, en general el efecto de los pesticidas es perjudicial para Rhizobium, sin embargo es necesario proteger a la semilla de microorganismos patógenos del suelo, tales como Fusarium, Gliocadium, Phoma, etc., por lo que algunas veces en experimentos de invernadero es necesario fumigar el suelo. Se ha encontrado que esterilizantes como el Vapam, no afectan el crecimiento de la raíz, ni la producción y peso de los nódulos (Windin y Kennedy 1983). Por otro lado, cuando es necesario proteger a la semilla y simultáneamente inocularla, se pueden utilizar cepas tolerantes a pesticidas, al respecto Odeyemi y Alexander (1977) obtuvieron aislamientos de Rhizobium

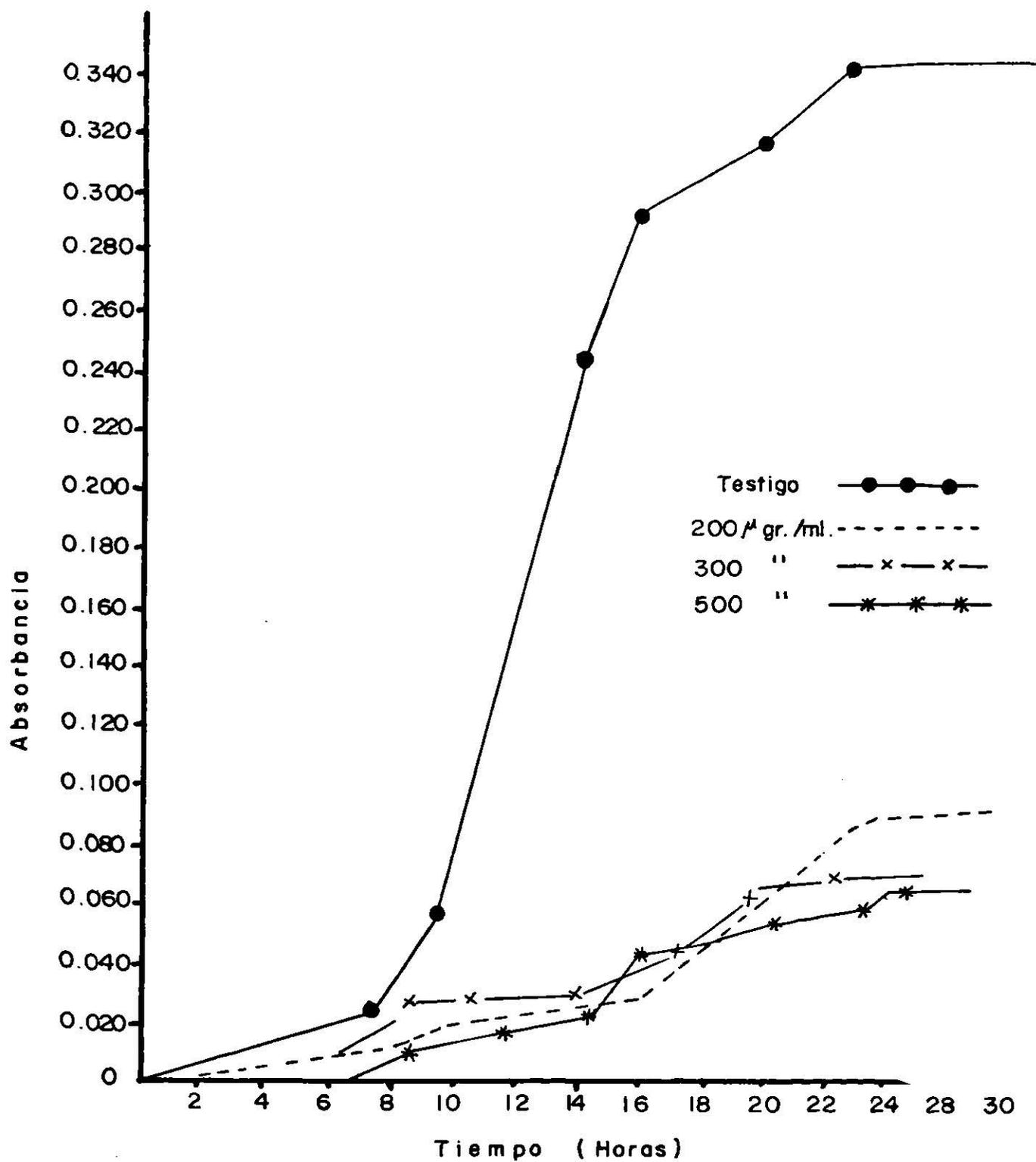


Fig. 10 Cinética de crecimiento de la cepa de Rhizobium sp creciendo en medio ELM y Sevín a 200 Rev/min.

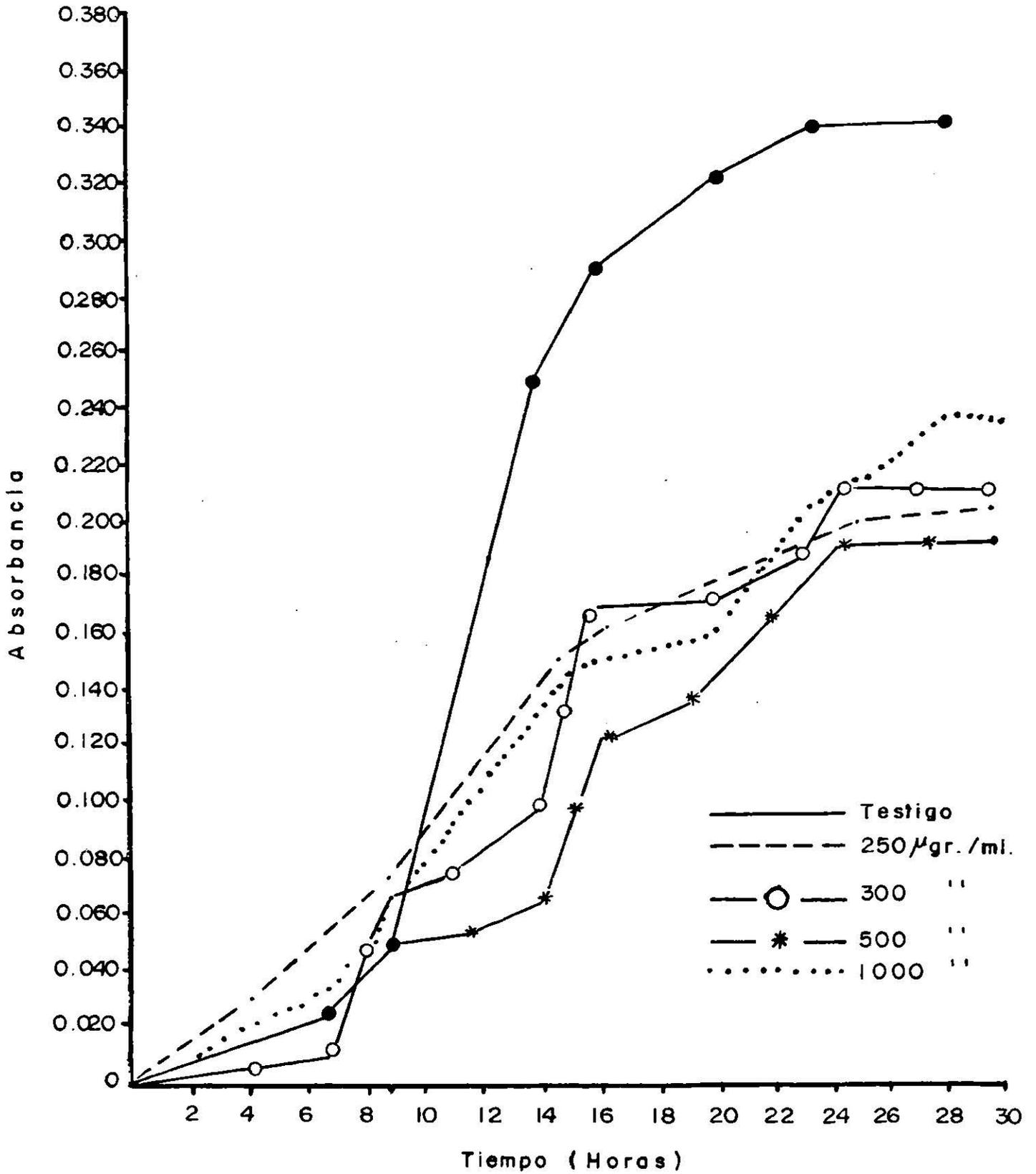


Fig. 11 Cinética de crecimiento de una cepa de *Rhizobium* sp creciendo en medio ELM y Malathión a 200 Rev/min.

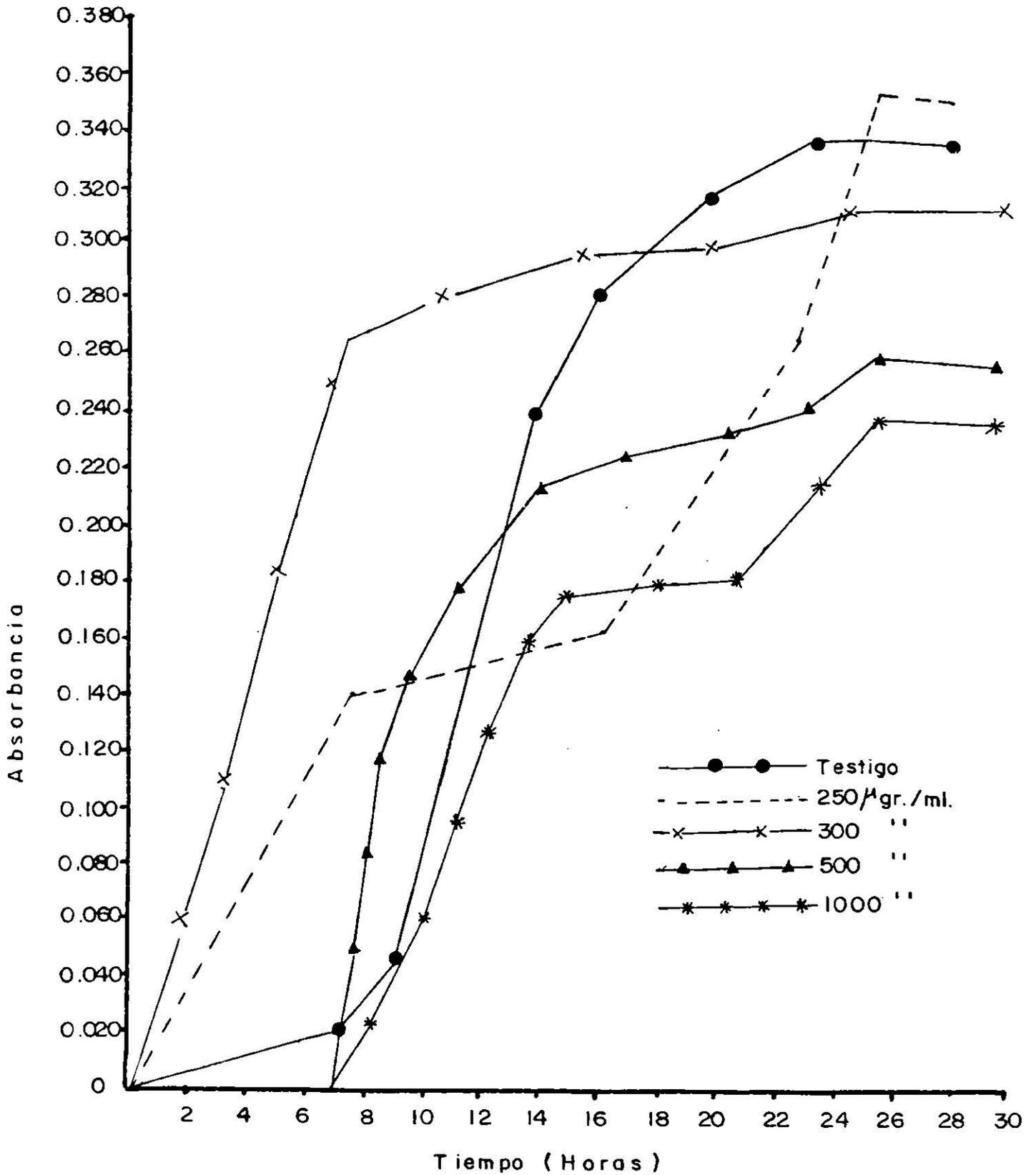


Fig. 12 Cinética de crecimiento de una cepa de *Rhizobium sp* creciendo en medio ELM y Diazinón a 200 Rev/min.

phaseoli resistentes a Cloranil , de R. meliloti resistentes a Tiram y de un Rhizobium de caupí resistentes a Phigón, cultivando las bacterias en medios con aplicaciones cada vez mayores de estos fungicidas.

Graham (1980) ha encontrado que el usar un soporte del inóculo peleteolimoso la toxicidad del pesticida disminuye, pero la semilla tiene que utilizarse rápidamente pues si se almacena, baja la viabilidad de Rhizobium. Tabla 5.

Tabla 5

Efecto de un soporte peleteolimoso (CaCO_3) en la toxicidad de los pesticidas Tiram, Captán y Furadán.

Método de Inoculación	Número de nódulos por planta a los 30 días			
	No Tratado	Tiram	Captán	Furadán
No inoculado	0	0	0	0
Inoculado	1.3	0	0	1.1
Inoculado con cubierta de CaCO_3	15.1	12.5	4.1	10.2
Inoculado con cubierta de CaCO_3 durante 7 días	13.1	1.8	9	10.8

Factores Biológicos.

1. Microorganismos

Se ha encontrado que varios microorganismos, tales como hongos, virus y bacterias, tienen un efecto benéfico o perjudicial en la relación planta-bacteria, de ahí que sea común la presencia de fenómenos como el sinergismo, antagonismo y predación en esta asociación simbiótica.

a) Antagonismo. Mew y Howard (1969) estudiaron el antagonismo que existe entre Rhizobium japonicum y Fusarium oxysporum cuando se les somete

a diferentes rangos de pH, ellos encontraron que un pH de 7.0 a 7.6, la nodulación fue favorable, por otro lado, el ataque de Fusarium fue muy severo, sin embargo cuando se presentaron ambos microorganismos, la pudrición radicular disminuyó en gran medida. Por último aconsejan la inoculación de la semilla con cepas tolerantes a la acidez como una medida para contribuir a la disminución de la pudrición radicular.

b) Predación. Microorganismos como nemátodos, bacteriófagos y protozoarios ejercen un efecto de predación sobre Rhizobium.

Protozoarios. Ramírez y Alexander (1980) estudiaron los cambios en las poblaciones de microorganismos alrededor de las semillas de frijol en germinación. Ellos observaron que los protozoarios aumentaron en número después de la siembra de las semillas. El grado de colonización de Rhizobium se relacionó en forma inversa con la presencia de gran número de bacterias y protozoarios. La colonización de R. phaseoli se mejoró después de la supresión de protozoarios con Tiram y también cuando el suelo se corrigió con otros inhibidores de protozoarios y manitol para estimular la exudación de semillas y raíces. Los datos demuestran que la disminución del número de R. phaseoli, es causada por el incremento de la predación de los protozoarios, porque ellos devoran las bacterias que proliferan mediante la utilización de los exudados de la semillas y raíces como nutrimentos.

Bacteriófagos. Se ha encontrado que los bacteriófagos cuando se hayan en cantidades considerables en los suelos, provocan la "lisis" de las bacterias Rhizobium, disminuyendo la población de ésta en la rizósfera. Estos microorganismos son capaces de atacar a la bacteria en forma específica, esta propiedad sirvió para explicar la variabilidad genética de la bacteria, ya que los bacteriófagos participan en la transferencia de material genético de una cepa a otra, lo cual tiene mucho significado cuando se intenta mapear el

genoma bacterial y el mejoramiento de cepas (Quiroz 1974), además esta propiedad sirvió para establecer una clasificación de los rizobios (Sánchez 1964).

Nemátodos. Se ha observado que en presencia de rizobios el ataque de los nemátodos es más severo. En cultivos como la soya, las plantas se vuelven más susceptibles a Meloidogyne acrita, cuando éstas han sido previamente inoculadas con Rhizobium japonicum. Se cree que existe un efecto depredatorio de Meloidogyne para con Rhizobium, ya que los pelos radiculares no nodulados presentan menor ataque, sin embargo este efecto puede deberse a la susceptibilidad física de los nódulos (Mountain 1963).

c) Sinergismo. El efecto de sinergismo puede presentarse en una relación bacteria-bacteria u hongo-bacteria.

Azcon y Barea (1980) establecieron un experimento con Rhizobium y el hongo de la micorriza VA (vesículo-arbuscular) Glomus mossae, (éste último es capaz de captar P para la planta), ambos fueron inoculados en forma individual y conjunta, ellos encontraron que las plantas respondieron mejor a la doble inoculación que a la inoculación individual, pero sólo hubo respuesta positiva a la introducción del microorganismo Rhizobium, cuando el suelo poseía cierto nivel de fosfato asimilable a un nivel de micorrización adecuado.

Daft (1978) en un experimento similar, menciona que la nodulación de Phaseolus vulgaris aumentó la infección de Glomus sp con un consecuente aumento de nitrógeno y fósforo en la planta.

Macedo y Ferrara (1981) mencionan que existe una íntima relación entre el fósforo absorbido por la endomicorriza y la fijación de nitrógeno molecular por Rhizobium sp, por lo que en un futuro es posible utilizar esta asociación con el fin de aumentar la producción. Lo anterior nos demuestra que existe un efecto benéfico, tanto para la bacteria como para el hongo, ya que la función de la bacteria sería la de fijar nitrógeno y la del hongo, ejercer un

efecto de desmineralización del fósforo, lo cual a final de cuenta repercute positivamente en el hospedero.

Respecto al sinergismo bacteria-bacteria se ha encontrado que cuando dos cepas de Rhizobium se aplican en forma conjunta, la nodulación y fijación de nitrógeno se efectúa en una forma más eficiente, que cuando se aplica en forma individual, sin embargo esto no siempre sucede debido a que no todas las cepas son compatibles.

d) Competencia del inóculo con las cepas nativas. Existen cepas nativas del suelo que pueden competir con las bacterias del inoculante, pero en ocasiones esta competencia es desventajosa para éste, debido a que las bacterias del suelo se encuentran en gran número (Montiel y López 1974). En algunas zonas donde nunca se ha utilizado la inoculación en las leguminosas, se ha observado que el frijol nodula muy bien con las cepas nativas del suelo y cuando se inocula sólo un 10 a un 20% de los nódulos provienen de las cepas inoculadas artificialmente (Burton 1952 citado por Chonay 1982). - Vicent atribuye la competencia a la ecología y origen geográfico de la cepa nativa, lo cual le confiere más adaptabilidad al medio.

2. Genética del hospedero y su relación con la bacteria.

De acuerdo con Nutman citado por Sánchez (1964) el número de nódulos formados, la presencia o ausencia de los mismos, la velocidad con la cual aparecen y los factores que influyen sobre la efectividad y el desarrollo de los nódulos son regulados genéticamente por la planta. El proceso de fijación de nitrógeno en las leguminosas, es una característica varietal que está determinada por la cantidad de hidratos de carbono disponibles a los nódulos radicales (CIAT 1978).

Existe un comportamiento diferencial de la relación Rhizobium-leguminosa, que está relacionado al origen del hospedero. Se ha encontrado que los

cultivares tropicales de frijol, tienen un mayor nivel de reducción de acetileno y una menor actividad de la nitrato-reductasa que los cultivares templados, lo cual indica que existe una relación inversa entre las dos actividades enzimáticas en el frijol y que probablemente existe variabilidad genética para un posible mejoramiento de la capacidad de fijación de nitrógeno.

Suton y Peterson (1980) citados por Sprent (1981) probaron un amplio rango de combinaciones Rhizobium leguminosa, para indagar si los bacteroides podrían ser cultivados después de la aplicación de un detergente suave (lo cual hay que tomar en cuenta cuando se va a regar el cultivo con aguas negras). Ellos concluyeron que el genotipo del hospedero controla la sensibilidad al detergente existiendo una alta correlación entre la sensibilidad y el origen de la tribu (templado o tropical) Tabla 6.

La nodulación está determinada por la interacción de dos factores:

a) El poder infectivo de la cepa que invade, que se debe a la interacción genético ambiental de la bacteria.

b) La susceptibilidad relativa del huésped a la infección, que también está determinada por la interacción genético ambiental, en este caso del hospedero.

El exceso de la infección de Rhizobium en una raíz, depende en primer lugar de la primera fase rápida de la infección, la cual está determinada tanto por la cepa como por el hospedero, y en segundo de la tasa de infección, la cual puede ser característica genética (Nutman 1963). Fig. 13

La fig. 13 además de mostrarnos diferentes tasas de infección, según la cepa y según el hospedero, nos muestra la interacción de ambos, ya que una cepa determinada puede tener un comportamiento diferente (en cuanto a su tasa de infección) dependiendo del tipo del hospedero, por el contrario

un hospedero puede mostrar una infección gradual diferente, dependiendo de la cepa que lo esté infectando.

Tabla 6

Efecto del hospedero en la sensibilidad a los detergentes por los bacteroides (Sutton y Peterson 1980 citado por Sprent 1981)

Subtribu de la familia papilionoidea	Especies	Sensibilidad al detergente
Trifolioneae (T)	<u>Medicago sativa</u>	alta
	<u>M. sculenta</u>	alta
	<u>M. trunculata</u>	alta
	<u>Trifolium repens</u>	alta
	<u>T. resupinatum</u>	alta
	<u>T. subterraneum</u>	alta
Viceae (T)	<u>Lathyrus japonicus</u>	moderada
	<u>Pisum sativum</u>	alta
	<u>Vicia dasycarpa</u>	alta
Galegeae (T)	<u>Clianthus puniceus</u>	moderada
Loteae (T)	<u>Lotus tenuis</u>	moderada
	<u>L. scholleri</u>	moderada
	<u>L. corniculatus</u>	ligera
	<u>L. pedunculatus</u>	ligera
	<u>L. angustissimus</u>	baja
Coronilleae (T)	<u>Onobrychis vicii folia</u> ¹	moderada
	<u>Ornithopus sativus</u>	baja
Phaseoleae (Trop)	<u>Glycine max</u>	baja
	<u>Macroptilium atropurpureum</u>	baja
	<u>Phaseolus vulgaris</u>	ligera
	<u>Phaseolus aureus</u> ¹	baja

¹Después llamadas Vigna radiata, ssp. radiata o V. radiata var aureus.

T = Templado

Trop = Tropical

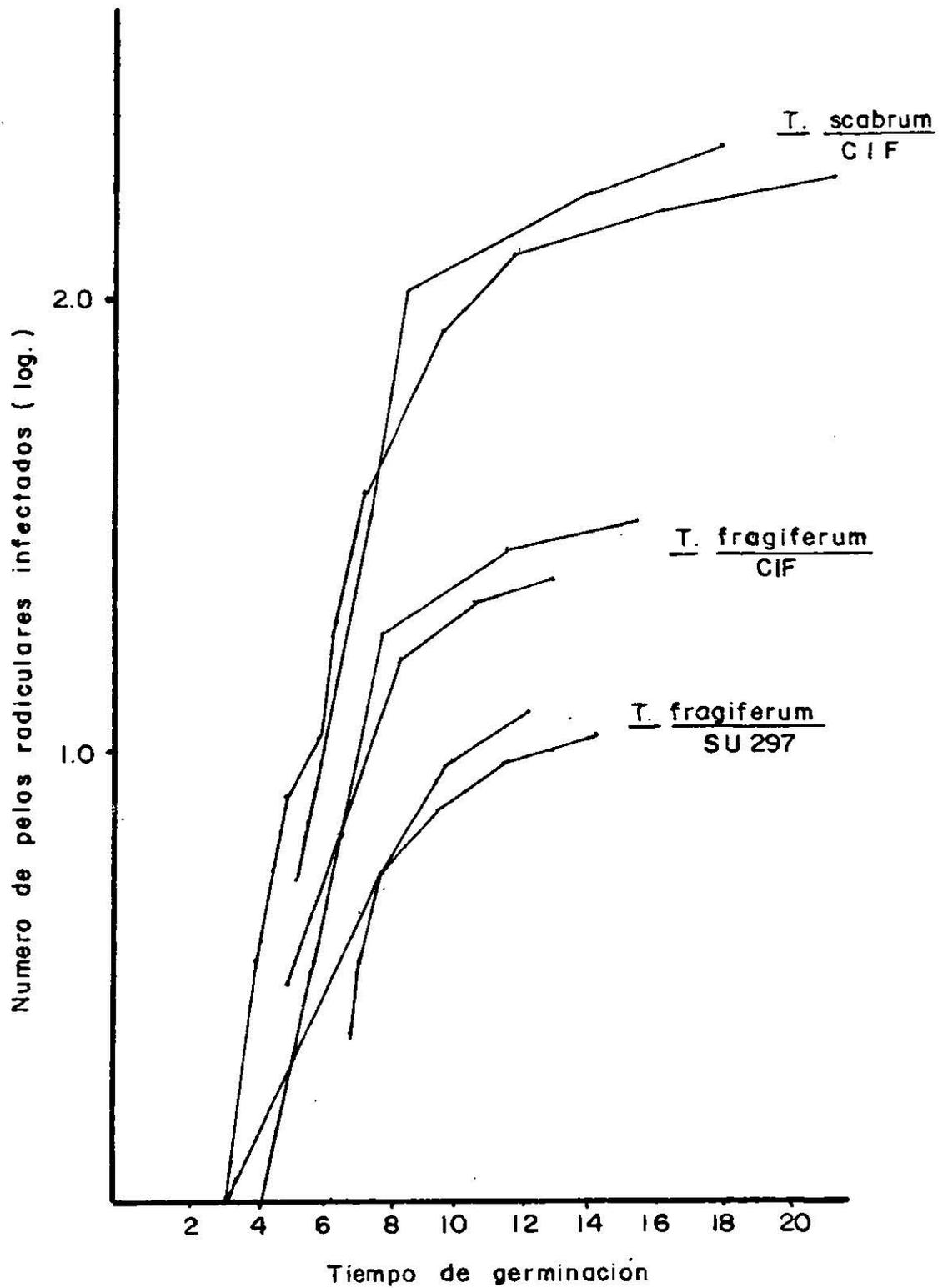


Fig. 13 Tasas de infección en plantas típicas de Trifolium scabrum y T. fragiferum inoculadas con las cepas SU 297 y CIF de Phizobium sp (Nutman 1963 trad.)

ASPECTOS PRACTICOS DE LA SIMBIOSIS Rhizobium-LEGUMINOSA

Cuando se establece un cultivo en un área que no ha sido previamente sembrada, probablemente falta en el suelo la cepa adecuada de rizobios. Para asegurar la nodulación antes de la siembra, las semillas son inoculadas por lo general, con la cepa requerida (Brock 1978). Por otro lado, la inoculación artificial bien podría tener valor insignificante en algunos casos donde la leguminosa se cultiva con frecuencia en un mismo campo, sin embargo es tan bajo el costo del inoculante y tan grande la posible pérdida de rendimiento a causa de la inoculación insuficiente o con una cepa ineficaz, que la inoculación artificial puede verse como un seguro barato y practicarla sin previo análisis específico de eficacia en el campo o en el laboratorio.

Métodos de inoculación.

Poco después de la lluvia, es el tiempo ideal para inocular y sembrar la semilla. No es recomendable plantar las semillas inoculadas en suelo seco; sin embargo, con el uso de adherentes o preparaciones comerciales se puede alargar la vida de las bacterias (Erdman 1967 citado por Carranza 1984). Otra forma para no dañar el inóculo, es efectuar un riego de presiembra, y una vez que el suelo se encuentre en condiciones óptimas efectuar la siembra.

Como se vió anteriormente, los factores ambientales tienen una gran influencia en la viabilidad de Rhizobium. Ciertos aditivos como la sacarosa, dextrosa, maltosa y goma arábica alargan la sobrevivencia de Rhizobium en la semilla. Se han obtenido buenos resultados agregando un 10% de azúcar y/o un 40% de goma arábica al medio donde los microorganismos estén suspendidos (Vicent 1975).

Existen varias formas de inocular las semillas, dentro de las cuales las más prácticas para el agricultor son las siguientes:

Se mezcla el inóculo (70 gr. de cultivo de turba comercial) con el adhesivo y posteriormente con la semilla. Las semillas son inoculadas antes de la plantación agregando una pequeña cantidad de agua a el inoculante con el adhesivo, mezclando bien por lo menos durante 5 minutos.

La otra forma es la de humedecer la semilla primero con agua y entonces mezclar el inoculante con la semilla (Vicent 1975).

Cuidados que se deben de tener al efectuar la práctica de inoculación de las leguminosas con Rhizobium:

1. Manejo del inoculante. Se debe de tomar en cuenta la procedencia e inoculación de la cepa adecuada de Rhizobium,- revisar la fecha de vencimiento, almacenarla en un lugar fresco (fuera del sol), utilizar la semilla inoculada el mismo día, utilizar dosis recomendadas y evitar el contacto con fungicidas y productos ácidos.

2. Acidez del suelo. A un pH de 5.2 la nodulación y la supervivencia de la cepa se reduce.

3. Temperatura. En promedio la temperatura óptima de nodulación es de 30°C.

4. Factores nutricionales. Cualquier deficiencia o toxicidad que afecte a la planta afecta a la fijación de nitrógeno; Sin embargo se requiere de la presencia de Co, P, S, Mo, Ca y poco N.

5. Competencia con cepas nativas. Debe tomarse en cuenta este factor, ya que muchas veces las cepas nativas son más eficientes que las introducidas (Graham 1977).

BIBLIOGRAFIA

1. ALCANTAR, G. G. (1978). Estudio del efecto de diferentes dosis de nitrógeno en dos fuentes sobre los procesos de nodulación, fijación de nitrógeno y rendimiento de frijol (Phaseolus vulgaris). E. N. A. Colegio de Postgraduados. México. Tesis sin publicar pp 110-114.
2. ALEXANDER, M. (1980). Introducción a la microbiología del suelo. 1a. edición. Ed. AGT. México. pp 327-338.
3. ALAMONG Y MERTENS (1979). Energía de los procesos biológicos. Fotosíntesis y respiración. 1a. Ed. LIMUSA. México. p. 39.
4. AZCON, G. Y J. M. BAREA (1980). Fertilizantes microbianos; Interacciones de Rhizobium y Hongos de las Micorrizas V-A en la formación y eficacia de las respectivas simbiosis con las leguminosas. Tesis doctoral sin publicar. Universidad de Granada España.
5. BENAVIDES, J. de D. (1982). Curso sobre Fisiología Vegetal. F.A.U.A.N.L. apuntes sin publicar.
6. BLACK, C. A. (1975). Relaciones suelo planta. 1a. Ed. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina. pp 545-556.
7. BRILL, W. J. (1979). Nitrogen fixing maize ?. Simposio Internacional Sobre Trasplante y Movilización de Genes. México. CONACYT.
8. BROCK, T. D. (1978). Biología de los microorganismos. 2a Ed.. Editorial Omega. Barcelona España. pp 160, 442-446.
9. BUCKMAN, H. O. Y N. C. BRADY (1977). Naturaleza y propiedades de los suelos. Montiel & Simons. Barcelona España.
10. CARPENTER, P. L. (1969). Microbiología. 2a. Ed. Editorial Interamericana México, D. F. p. 287.
11. CARRANZA, G. E. (1984). Inoculación de 17 cepas de Rhizobium phaseoli en tres variedades de frijol (Phaseolus vulgaris), bajo condiciones de invernadero. Tesis sin publicar. F.A.U.A.N.L. Marín, N. L.

12. CHONAY, P. J. et. al. (1983). Efecto de la fertilización nitrogenada foliar sobre la compensación de la fijación biológica de nitrógeno por Rhizobium phaseoli en frijol (Phaseolus vulgaris). *Agrociencia* 51: 38-39.
13. CIAT (1980). Informe anual del programa de frijol. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. pp 68-69.
14. CIAT (1981). Evaluation and improvent of agronomic practices. Bean -- Program Annual Report. Cali, Colombia. pp 63-68, 81-83.
15. CORDOBA, V. C. (1976). Fisiología vegetal. 1a. Ed. Blume Ediciones Madrid, España. pp. 258-260.
16. CRONQUIST, A. (1975). Introducción a la botánica. 6a. Ed. CECSA México. pp. 91-112.
17. DAFT, M. J. (1978). Nitrogen fixation in nodulated and mycorrhizal crop plants. *Annals of Applied of Biology*. 88(3): 461-462.
18. DART, P. (1973). Root nodule symbiosis and tropical grain legume producción IITA Workshop on Grain Leguma Improvent. Ibdan International Institute of Tropical Agriculture. pp. 185-197.
19. DE LUNA, E. G. (1983). Selección de cepas de Rhizobium resistentes a pesticidas . Tesis sin publicar. Facultad de Ciencias Biológicas U.A.N.L.
20. DEL FIERRO M. I. (1981). Influencia de la temperatura y pH sobre la viabilidad de 5 cepas nativas de Rhizobium phaseoli no infectivas y efectivas en los suelos neutros. Tesis sin publicar, Facultad de Ciencias - Biológicas, U.A.N.L.
21. DEVLIN, R. M. (1980). Fisiología vegetal. 3a. Ed. Editorial Omega. Barcelona, España. pp 304-306.
22. DOUGHTY J. AND T. ORRACA. (1966). The contribution of legumes to African diets. Food and Agriculture Organization of United Nations. pp 9-32.

23. ECHEGARY A. A. (1958). Microbiología general y agrícola. ITESM. Monterrey, N. L. México. pp.111-112.
24. FELIX, et. al. (1981). Nitrate reductase and nitrogenase activities of common beans (Phaseolus vulgaris L.) from different geographic locations. Plant and Soil. 63; 227- 238.
25. GOMEZ, A. A. (1963). Efecto del pH, MO y la temperatura del suelo sobre la nodulación en el frijol (Phaseolus vulgaris L.) causada por -- Rhizobium phaseoli. Tesis sin publicar. E. A. G. I.T.E.S.M.
26. GRAHAM, P. H. (1977). La nodulación y la fijación de nitrógeno en - Phaseolus vulgaris L. Cali, Colombia. Centro de Agricultura Tropical.
27. GRAHAM, P. H. et. al. (1980). Survival of Rhizobium phaseoli in contact with chemical seed protectants. Agron. J. 72: 525-627.
28. GRAHAM, P. H. et. al. (1982). The International Bean Inoculation Trial (IBIT): resul the 1978-1979. Biological nitrogen fixation technology for tropical agriculture, Cali, Colombia. CIAT. pp 223-229.
29. GRAHAM, P. H. Y J. C. ROSAS (1978). Nodule development and nitrogen fixation in cultivars of Phaseolus vulgaris L. as influenced by planting density. Journal of Agricultural Science 90: 19-29.
30. JANSSEN, K. A. (1972). Effect of physical and nutritio al factors of the enviroment on nitrogen fixation, plant composition, and yield of dark kidney beans (Phaseolus vulgaris). PhD. Thesis East Lansing Michigan State University.
31. LERMA, H. E. (1977). Efecto del molibdeno en la nodulación y fijación del nitrógeno en la leguminosa Glycine wightii var Tinaroo con la bacteria Rhizobium japonicum. Tesis profesional sin publicar. I.T. E.S.M. Monterrey, México.
32. LOPEZ, A. E. Y C. R. FERRARA (1981). Economía del nitrógeno e incremento de la producción de grano mediante el uso de cepas de Rhizobium

- japonicum en el cultivo de soya (Glycine max L. Merrill). Memorias del XIV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo 1; 491-492, 498-499.
33. LOPEZ A. E. (1982). Generación de tecnología de producción y evaluación de cepas de Rhizobium phaseoli y R. phaseolicola por su efecto en la producción de grano y economía de nitrógeno en los cultivos de frijol (Phaseolus vulgaris) y soya (Glycine max L. Merrill) en la mixteca poblana. Tesis M. C. Colegio de Postgraduados, Chapin-go México.
 34. MACEDO A. S. Y R. S. FERRARA (1981). Infección de la micorriza Vesículo-Arbuscular, en diferentes leguminosas, de localidades que forman el plan Zacapoaxtla-C.P. Puebla México. Memorias del XIV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo 1: 509-510.
 35. MCKEE, G. W. (1961). Some effects of liming, fertilization and soil moisture on seeding growth and nodulation of birdsfoot, *Agronomy Journal* 53: 237-240.
 36. MEW T. W. AND F. I. HOWARD (1969). Root rot of soybean (Glycine max) in relation to antagonism of Rhizobium japonicum and Fusarium oxisporum. *Phitopatology* 59; 54pp , 401 abstract.
 37. MEYER, S. B. ; D. B. ANDERSON Y R. H. BOHINING (1970). Introducción a la fisiología vegetal. 2a. Ed. EUDEBA. Argentina. pp 370-371.
 38. MONTAGE, D. : F. R. WAREMBOURG ; R. BARDIN. (1981). Utilization du ¹⁵N₂ pour estimer la fixation d'azote et sa repartition chez les legumineuses. *Plant and Soil* 63 (2): 131-139. Res Fr. Traduc. Esp.
 39. MONTIEL, M. Y H. LOPEZ (1974). Bioensayo de un inoculante a diversas dosis en cultivares de frijol. Memorias VII Congreso Nacional de la Sociedad de la Ciencia del Suelo. 2;362-375.
 40. MOUNTAIN, W. B. (1963). Phatogenesis by soil nematodes. Ecology of soil borne plant phatogens. An International Symposium of plant Phatogens in soil Held at the University of Carolina Berkley USA.

41. MUEVAR, F. AND A. G. WOLLUM II (1981). Effect of high root temperature on Rhizobium strain on nodulation, nitrogen fixation y growth of soybean. Soil, Science A. J. 45; 113-120.
42. NUTMAN, P. S. (1963). The relation between nodule bacteria and legume host in the rhizosphere in the process of infection. Ecology soil borne plant phatogens. An International Symposium of plant Phatogens in Soil Held at the University of Carolina Berkley, U.S.A.
43. ODEYEMI, O. AND M. ALEXANDER (1977). Use of fungicide-resistant rhizobia for legume inoculation. Soil Biology an Biochemistry. 9; 247-251.
44. ODUM, E. P. (1982). Ecología. CECSA. México. pp 128.
45. PEREZ, T. H. (1980). Algunos aspectos biológicos de la asociación simbiótica P.vulgaris-R. phaseoli. Tesis, M.C. Colegio de postgraduados, Chapingo México.
46. PILLAY, N. M. (1979). Effects of plant protection chemicals Thiram Dhitane M45 and Azodrin on nodulation and nitrogen fixation by Phaseolus vulgaris. Reduit, Mauritius University of Mauritius. Ingl. Res.
47. PUPPO, A. AND J. RIGAUD (1978). Cytokinins and morphological aspects of french bean roots in precence of Rhizobium. Physiology plantarum. 42: 202-206. Ingl. Res.
48. QUIROZ, R. A. Y A. L. ESPINOZA (1974). Rizobiofagos en algunos suelos mexicanos . Memorias VII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo. 2: 362-375.
49. RAMIREZ, C. AND M. ALEXANDER (1980). Evidence sugesting protozoan predation on Rhizobium asociated with germinating seeds and in the rhizosphere of beans (Phaseolus vulgaris). Applied and Environmental Microbiology. 40 (3): 492-499. Ingl.Res.
50. REYES, C. P. (1972). Notas para el curso de cerealesy leguminosas teoria y laboratorio. D. C. A. M. I.T.E.S.M.. Monterrey, N. L. p. 4

51. RIVERO, C. R. Y O. C. T. GILDARDO. (1976). Comparación de la nodulación y fijación de nitrógeno por Rhizobium en frijol (Phaseolus vulgaris L.) y soya (Glycine max L. Merrill). Tesis. Palmira. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias pp 44.
52. ROJAS, G. M. (1981). Fisiología vegetal aplicada. 2a. Ed. Editorial Mc. Graw-Hill, México, D. F. pp 89, 97-101, 226.
53. RUIZ, O. M. ; D. NIETO ; E I. LARIOS (1979). Tratado elemental de botánica. Decimoquinta Ed. ECLALSA, México. pp 322, 323, 373, 419, 422.
54. RUSSELL, E. W. (1961). Soil conditions and plant growth. Ninth Ed. Published by Longmans Green & Co. Ltd. pp. 332-333.
55. SALISBURY, B. F. Y C. F. ROSS (1978). Plant physiology. 1a. Ed. Editorial Wadsworth U.S.A. pp 192-196.
56. SALLE, A. J. (1965). Bacteriología. 2a. Ed. Editorial Gustavo Gili Barcelona España. pp. 679-724.
57. SANCHEZ, M. A. (1964). Microbiología agrícola. Escuela Nacional de Agricultura, Colegio de Postgraduados, Chapingo México. pp 128-232.
58. SARH (1981). Producción agrícola nacional. Anuario estadístico. Subsecretaría de Agricultura y Operación. Dirección General de Economía Agrícola.
59. SPRENT, J. I. (1981). Adaptative variation in legume nodule physiology resulting from host-rhizobial interactions. Nitrogen as an ecological factor. The 22nd. Symposium of the British Ecological Society Oxford 1981. Blackwel Scientific Publications. pp. 29-41.
60. TAMEZ, G. P. (1982). Aislamientos e identificación de cepas nativas de Rhizobium phaseoli y su efecto en la inoculación de frijol (Phaseolus vulgaris) Tesis Q.E.P., Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. Monterrey, N. L.
61. TANNER, F. W. AND F. W. TANNER, Jr. (1948). Bacteriology. John Wiley

- & Sons, Inc. New York, U.S.A. pp 123-124.
62. TISDALE, S. L. Y W. L. NELSON (1982). Fertilidad de suelos y fertilizantes. 1a. Ed. Editorial UTEHA S.A. México. pp 138-200.
 63. TRINIDAD, S. A. (1979). Inoculación de dos leguminosas con Rhizobium bajo condiciones de humedad. Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo. Programa General y resúmenes. - pp. 29-30.
 64. TRUJILLO, G. G. (1981). Producción de inoculantes en México. FERTIMEX S.A. dpto de Evaluación y Fertilizantes. Memorias XIV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo. 1;548-559.
 65. TRUJILLO, G. G. Y M. VALDEZ (1974). El contenido proteico y la inoculación de frijol en la región de Chilpancingo Gro. Memorias VII - Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo Gto. Gto. 2; 326-330.
 66. USTEMENKO, G. V. (1982). El cultivo de plantas tropicales y subtropicales. Editorial Mir. Moscú, U.R.S.S. pp. 111-113.
 67. VICENT, J. M. (1975). Manual práctico de rizobiología. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina. pp. 172-174.
 68. VIGE, G. T. ; I. L. PEPPER: AND D. F. BEZDIECEK. (1981). The effect of cadmium on nodulation and N_2 (C_2H_2)-fixation by dry beans (Phaseolus vulgaris L.) Journal of Enviromental Quality. 10 (1): 87-90.
 69. WESTERMANN, D. T. et. al. (1981). Nitrogen sources for bean seed production Agronomy Journal. 73: 660-664. Res. Ingl.
 70. WINDIN, K. D. AND B. W. KENNEDY (1983). Effect of chemical soil treatment on plant growth, nitrogen fixation and fungal colonization of Rhizobium nodules of soybeans. Phytopathology 73: 437-439.
 71. WHYTE, R. O. Y H. C. TRUMBLE (1968). Las leguminosas en la agricultura 2a. Ed. FAO. Estudios Agropecuarios. Yugoslavia. pp 193-203.

