

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**USO DE TECNICAS ISOTOPICAS DE  $^{15}\text{N}$  APLICADAS  
AL ESTUDIO DE LA FIJACION BIOLÓGICA DE  
NITROGENO EN EL CULTIVO DE ALFALFA  
(*Medicago sativa* L.) EN "LA COMARCA  
LAGUNERA", MEXICO**

**T E S I S  
QUE COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO  
EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD  
EN MICROBIOLOGIA**

**PRESENTA**

**JUAN LLOVERA LOZANO**

**SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L.  
DICIEMBRE DE 1999**

TM

SB205

A4

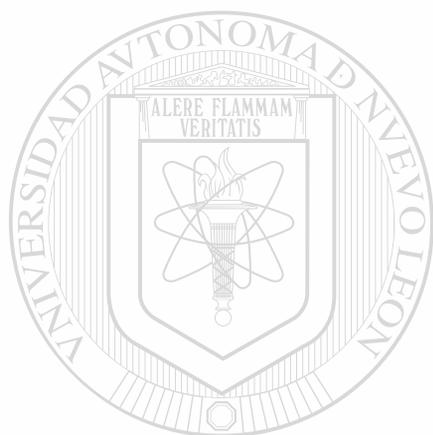
L5

1999

e.1



1080124348



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

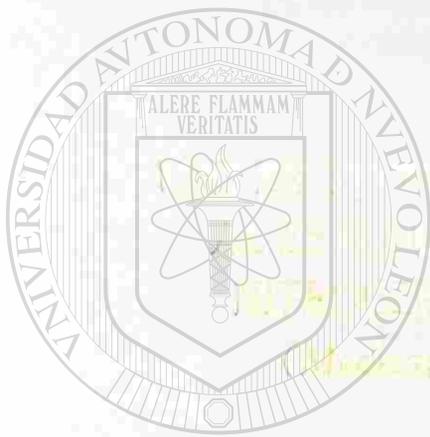


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO



CIENCIAS ISOTÓPICAS DE EN APLICADAS

EN LA REACCIÓN NUCLEAR DE

EN EL CUIDADO EN ALFAB

EN LA REACCIÓN NUCLEAR

LA REACCIÓN NUCLEAR

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

QUE COMO REQUISITO PARCIAL

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD

EN MICROBIOLOGÍA

PRESENTA

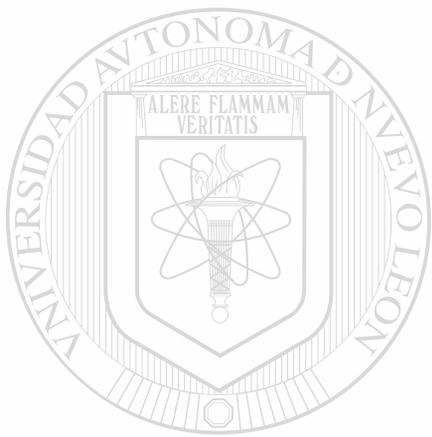
JUAN LLOVERA LOZANO

SAN NICOLÁS DE LOS GARDOS, N. L.

DICIEMBRE DE 1969



TH  
SB205  
.A4  
L5  
1999



# UANL

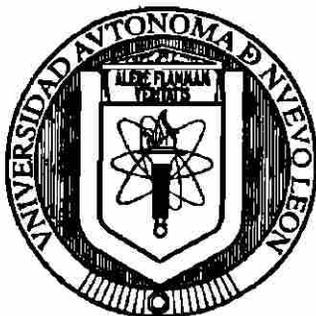
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**USO DE TÉCNICAS ISOTÓPICAS DE  $^{15}\text{N}$  APLICADAS AL  
ESTUDIO DE LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO EN  
EL CULTIVO DE ALFALFA (*Medicago sativa* L.) EN "LA  
COMARCA LAGUNERA", MEXICO**

**TESIS**

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

**PRESENTA**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**DIRECCIÓN *JUAN LLOVERA LOZANO* BIOTECAS**

**SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N. L.**

**DICIEMBRE DE 1999**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**USO DE TÉCNICAS ISOTÓPICAS DE  $^{15}\text{N}$  APLICADAS AL  
ESTUDIO DE LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO EN  
EL CULTIVO DE ALFALFA (*Medicago sativa* L.) EN "LA  
COMARCA LAGUNERA", MEXICO**

**TESIS**

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

**PRESENTA**

**JUAN LLOVERA LOZANO**

**DIRECCIÓN DE TESIS**

**DR. LUIS JESÚS GALÁN WONG<sup>1</sup>  
DIRECTOR INTERNO**

**DR. JUAN JOSÉ PEÑA CABRIALES<sup>2</sup>  
DIRECTOR EXTERNO**

.....  
<sup>1</sup> Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL). San Nicolás de los Garza, N. L. México.

<sup>2</sup> Departamento de Biotecnología y Bioquímica, Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Irapuato (CINVESTAV-IPN, UI). Irapuato, Gto, México.

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**USO DE TÉCNICAS ISOTÓPICAS DE  $^{15}\text{N}$  APLICADAS AL  
ESTUDIO DE LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO EN  
EL CULTIVO DE ALFALFA (*Medicago sativa* L.) EN  
"LA COMARCA LAGUNERA", MEXICO.**

**TESIS**

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

**PRESENTA**

**JUAN LLOVERA LOZANO**

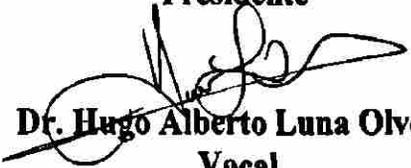
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

COMISIÓN DE TESIS

  
**Dr. Luis Jesús Galán Wong**  
**Presidente**

  
**Dra. Katiushka Arévalo Niño**  
**Secretario**

  
**Dr. Hugo Alberto Luna Olvera**  
**Vocal**

  
**Dr. Juan José Peña Cabriales**  
**Asesor Externo**

**El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología Ambiental del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Irapuato (CINVESTAV-IPN, Unidad Irapuato), bajo la dirección del Dr. Juan José Peña Cabriaes.**

**Laboratorio del Centro de Investigaciones sobre Fijación de Nitrógeno de la Universidad Nacional Autónoma de México (CIFN-UNAM), con la asesoría del Dr. Jesús Caballero Mellado,**

**Laboratorio de Microbiología Industrial y del Suelo “Dr. Howard T. Dulmage” del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría de Dr. Luis Jesús Galán Wong,**

---

**Y**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**El Laboratorio de Microbiología General de la Escuela Superior de Biología de la Universidad Juárez del Estado de Durango.**

®

## **DEDICATORIA**

**A DIOS**, por permitirme escalar un paso mas en mis aspiraciones y proyecto de vida.

**A MIS PADRES**, por su apoyo en los momentos difíciles y su espíritu de lucha que me han impulsado a salir adelante. Los quiero mucho.

**A MI ESPOSA**, por su paciencia, su comprensión que en todo momento he recibido, nuestra unión nos ha fortalecido siendo una de las razones para avanzar en mis propósitos. Gracias por ser mi gran apoyo y estar siempre a mi lado. Mi amor estará contigo por siempre.

**A MIS HIJOS**, porque lo son todo para mí, por el tiempo que no les he dedicado. Los amo.

**A MIS HERMANOS**, con mucho cariño por su apoyo de siempre.

## AGRADECIMIENTOS

**Al Dr. Juan José Peña Cabrialet**, en forma muy especial, por sus consejos que como ser humano he recibido, por el apoyo que siempre me ha brindado, por su paciencia, por su tiempo, su amistad. Gracias.

**Al Dr. Luis Jesús Galán Wong**, por su apoyo de siempre y por sus sugerencias en la revisión de esta tesis.

**Al M.C. José Antonio Vera Nuñez**, por sus valiosas aportaciones, por su gran ayuda en la capacitación del análisis isotópico, de campo y laboratorio durante el desarrollo de la tesis.

**Al Dr. Hugo Alberto Luna Olvera**, por su gran apoyo, su asesoramiento en la elaboración de figuras, además, por sus sugerencias en la revisión de esta tesis, por su amistad.

**Al Dr. Jesús Caballero Mellado**, por su valiosa contribución, sus sugerencias y apoyo en la realización del trabajo experimental.

**A la Dra. Katiushka Arévalo Niño**, por sus sugerencias en la revisión de este trabajo.

**Al Dr. Oscar A. Grageda Cabrera** por su apoyo y sugerencias en el análisis estadístico.

Muy especialmente a la **Biól. Ma. Eduviges Cisneros Valdéz**, "Duvy", por tu ayuda desinteresada en parte del desarrollo experimental, por las experiencias compartidas en trabajo de laboratorio. En esta ocasión, aprovecho este espacio para expresarte mi afecto y amistad sincera. Gracias.

**A la Escuela Superior de biología de la U.J.E.D. en especial al Biól. Hugo López Corrujedo y M.C. Alfonso Gerardo Hernández Escareño**, por el apoyo, gracias.

**A la Facultad de Agricultura y Zootecnia de la U.J.E.D.** en especial al **M.C. Alejandro Martínez Ríos**, **M.C. Misael López Lozano** y **M.C. Manlio Enrique Ramírez Ramírez** por las facilidades otorgadas en el establecimiento del campo experimental. **Al Dr. Enrique Salazar Sosa**, **M.C. Antonio Gallegos Ponce** y **M. C. Miguel Fernando Sánchez** por sus orientaciones en desarrollo del experimento, por sus sugerencias y su gran ayuda en la preparación del terreno y aspectos agronómicos que fueron de gran valía.

**A la Universidad Autónoma de Nuevo León**, por darme la oportunidad de seguir siendo parte de ella.

**Al Laboratorio de Microbiología Ambiental del CINVESTAV-IPN**, Unidad Irapuato, por la disponibilidad del personal, por su compañerismo, además, facilidades de material y equipo de laboratorio en la realización del trabajo experimental.

**Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por contribución económica a través del programa de becas de apoyo al posgrado.**

**A mis compañeros del Laboratorio de Microbiología Ambiental del CINVESTAV-IPN-UI, Rodolfo Farías Rodríguez, Oscar A. Grageda Cabrera, José Antonio Vera Nuñez, Pedro Eduardo Moreno Zacarías, Beatriz Flores Samaniego, Simón Rodríguez Castellanos, Ricardo Torres Martínez, Eduardo Valencia Cantero, Juan José Jiménez Zacarías, Wilfrido Ventura Ortega, Araceli Gerrero Moreno, Alma Lucero Yescas Ortiz, por su amistad y apoyo en la culminación de este trabajo.**

**Al Laboratorio de Micotoxinas, muy especialmente a la Dra. Doralinda Guzmán de Peña, por su compañerismo, solidaridad, atinadas sugerencias, su apoyo y sus finas atenciones, Rosalinda Serrato Flores, Noemí Castañeda Cruz, Débora Gómez Mesinas, por su amistad y compañerismo.**

**A mis compañeros del laboratorio de Ecología Microbiana del CIFN-UNAM: Ma. del Rocío, Jesús, Paulina y Norma, Luis Ernesto, Antonio, Lucía, gracias por todo.**

**A mis compañeros de Laboratorio de Microbiología Industrial y Suelo: Dra. Lilia Hortencia Morales Ramos, Dra. Katiushka Aérvalo Niño, Dra. Patricia Taméz Guerra, Dr. Benito Pereyra Alférez, Carlos Francisco Sandival Coronado, Lucía Leticia Palacios Cortés, Ma. Magdalena Iracheta Cárdenas, Tomás Rangel Galán, Ma. Guadalupe Maldonado Blanco, Josefina Castillo Reyna, Saúl Martínez Sierra, Francisco Real Medina, por lo que hemos compartido.**

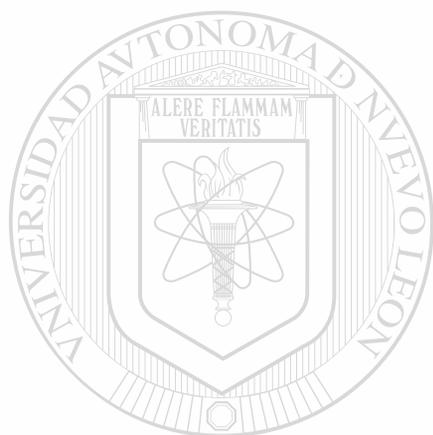
**A todos mis compañeros de trabajo de la Escuela Superior de Biología de la UJED, muy especialmente a Hugo y Erla (Mis Compadres), Alfonso Gerardo, Duvy, Osvaldo, Marco Antonio, Ulises, José Luis, Anselmo, Francisco (Panchito). Gracias por todo.**

**A todos los que de alguna forma tuvieron participación y me ayudaron en este trabajo, en especial a Carlitos, Arnold, Andrés, Gamaliel y Víctor, a los compañeros de trabajo de campo en la FAZ-UJED en Venecia, Dgo. Mil gracias.**

## **RECONOCIMIENTOS**

**Al Dr. Juan José Peña Cabriales**, por sus consejos, por el apoyo que siempre me ha brindado en mi formación profesional, por su paciencia, por su tiempo y su acertada dirección de esta tesis. Además, del gran interés que siempre le ha caracterizado en la formación de sus estudiantes. Por todo esto le hago presente mi admiración sincera.

**Al Dr. Luis Jesús Galán Wong**, por su apoyo de siempre en el aspecto académico y por sus sugerencias en la revisión de esta tesis.



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## ÍNDICE DE CONTENIDO

I	Agradecimientos.....	i
II	Reconocimientos.....	ii
III	Índice de contenido.....	iii
IV	Índice de tablas.....	iv
V	Índice de figuras.....	v
VI	Índice de cuadros.....	vi
VII	Abreviaturas.....	vii
VIII	Resumen.....	viii
IX	Summary.....	ix
1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	Hipótesis.....	3
1.2.	Objetivo general.....	3
1.3.	Objetivos particulares.....	3
2.	ANTECEDENTES.....	4
2.1.	Las zonas áridas de México.....	4
2.2.	La comarca lagunera.....	4
2.3.	Introducción del cultivo de alfalfa en México.....	6
2.4.	Cultivo de la alfalfa en la comarca lagunera.....	7
2.5.	Importancia del nitrógeno.....	12
2.6.	Aportaciones del nitrógeno en el suelo.....	13
2.7.	Fijación biológica de nitrógeno (FBN).....	16
2.8.	Significado agronómico de la FBN.....	19
2.9.	Importancia de la FBN.....	20
2.10.	Importancia de las leguminosas.....	21
2.11.	Microorganismos fijadores de nitrógeno.....	22

2.12.	La FBN en la comarca lagunera.....	23
2.13.	Factores que afectan la FBN.....	23
2.13.1.	Efecto de la desecación del suelo sobre el nódulo y nodulación.....	24
2.13.2.	La temperatura, humedad, pH y desecación del suelo sobre <i>Rhizobium</i> spp.....	26
2.14.	Caracterización de <i>Rhizobium</i> spp.....	27
2.15.	Métodos para medir la FBN.....	34
2.16.	Uso de técnicas nucleares.....	34
2.16.1	Isótopos del nitrógeno.....	34
2.16.2	Dilución isotópica (DI).....	36
2.16.3.	Valor A (VA).....	37
2.16.4.	Abundancia natural (AN).....	38
2.17.	Cultivos de referencia.....	39
3.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	40
3.1	Prácticas de campo.....	40
3.2.	Material biológico.....	40
3.3.	Análisis fisicoquímico del suelo.....	41
3.4.	Diseño experimental.....	41
3.5.	Tratamientos e inoculación.....	42
3.6.	Establecimiento de los cultivos.....	43
3.7.	Aplicación de <sup>15</sup> N.....	43
3.8.	Colecta de nódulos en campo.....	44
3.9.	Medios de cultivo.....	44
3.10.	Aislamiento, purificación y conservación de los aislados.....	44
3.11.	Sensibilidad y resistencia a los antibióticos.....	45
3.12.	Determinación de la movilidad electroforética de enzimas (MLEE).....	45
3.13	Cosecha y preparación de las muestras vegetales.....	46
3.14	Variables en estudio.....	47
3.14.1.	Nitrógeno total.....	47
3.14.2.	Cuantificación de la relación isotópica <sup>14</sup> N / <sup>15</sup> N.....	48

3.14.3. Rendimiento de materia seca (RMS).....	48
3.14.4. Nitrógeno derivado del fertilizante (Nddf).....	49
3.14.5. Rendimiento de nitrógeno (RN).....	49
3.14.6. Nitrógeno derivado de la atmósfera por el método del valor "A" (VA).....	49
3.14.7. Nitrógeno derivado del suelo.....	50
3.14.8. Rendimiento de nitrógeno derivado de la atmósfera o N fijado.....	50
3.15. Nodulación.....	50
3.16. Análisis estadístico.....	50
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	52
4.1. Análisis del suelo de cultivo.....	52
4.2. Pruebas de sensibilidad y resistencia a los antibióticos.....	52
4.3. Corrimiento electroforético de enzimas multilocus (MLEE).....	56
4.4. Nodulación.....	59
4.5. Experimentos con <sup>15</sup> N.....	62
4.5.1. Fuentes de nitrógeno.....	62
4.5.2. Rendimiento de materia seca y nitrógeno.....	69
5. CONCLUSIONES.....	74
6 LITERATURA CITADA.....	75

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

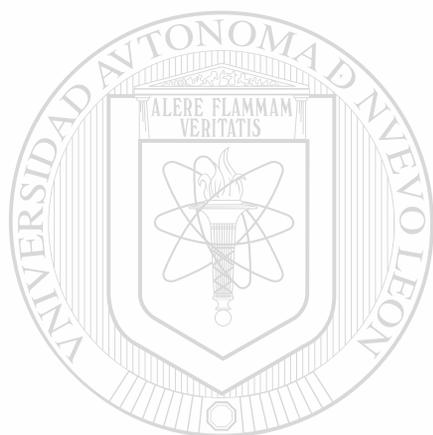
®

## ÍNDICE DE TABLAS

1.	Variaciones del área cultivada de alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> L.) en Nuevo Mexico durante 66 años.....	7
2.	Producción de forrajes en la Región Lagunera.....	8
3.	Rendimiento de cultivos forrajeros para alimentar a 12, 488 cabezas de ganado lechero en la Región Lagunera.....	9
4.	Producción de alfalfa en la Región Lagunera.....	10
5.	Producción de los principales cultivos forrajeros en la Región Lagunera.....	11
6.	Producción de leguminosas cultivadas en la región Lagunera.....	11
7.	Transformaciones microbiológicas del nitrógeno en el suelo.....	14
8.	Balance de nitrógeno en diferentes sistemas de producción agrícola de Guanajuato.....	15
9.	Cantidad de nitrógeno fijado por varios cultivos de leguminosas.....	18
10.	Cantidad de nitrógeno fijado por leguminosas en el estado de Guanajuato.....	18
11.	Isótopos estables utilizados como trazadores en la investigación biológica.....	34
12.	Características de los isótopos de nitrógeno.....	34
13.	Estudio de leguminosas y gramíneas con aplicación de $^{15}\text{N}$ .....	43
14.	Características del suelo de cultivo donde se estableció el experimento.....	52
15.	Distribución de la sensibilidad y resistencia a los antibióticos a 80 aislados de <i>R. meliloti</i> obtenidos en 2 variedades de alfalfa cultivada en la Región Lagunera (Durango).....	54
16.	Diversidad genética entre tipos electroforéticos (ETs) en 13 loci enzimáticos.....	57
17.	Número de tipos electroforéticos (ETs) obtenidos de 13 aislados nodulantes de 2 variedades de alfalfa cultivada en la Región Lagunera (Durango).....	57

18. Nodulación en 2 variedades de alfalfa cultivada en la Región Lagunera (Durango) utilizando un inoculante comercial (Nitragin) y cepas "Elite" de <i>R. meliloti</i> bajo condiciones de campo.....	61
19. Efecto de la inoculación en la nodulación de alfalfa cultivada en la Región Lagunera (Durango).....	62
20. Nitrógeno derivado de la atmósfera utilizando cepas "Elite" y un inoculante comercial de <i>R. meliloti</i> en 2 variedades de alfalfa cultivada en la Región Lagunera (Durango).....	64
21. Fijación de nitrógeno atmosférico en el primer ciclo de producción en 2 variedades de alfalfa cultivada en la Región Lagunera (Durango) empleando un inoculante comercial y cepas "Elite" de <i>R. meliloti</i> .....	66
22. Fijación de nitrógeno atmosférico en el segundo ciclo de producción en 2 variedades de alfalfa cultivada en la Región Lagunera (Durango) empleando un inoculante comercial y cepas "Elite" de <i>R. meliloti</i> .....	66
23. Rangos de nitrógeno fijado utilizando un inoculante comercial y cepas "Elite" de <i>R. meliloti</i> en 2 variedades de alfalfa cultivada en la Región Lagunera (Durango).....	66
24. Rangos de porcentaje de N <sub>dda</sub> , N <sub>dds</sub> y N <sub>ddf</sub> en 2 variedades de alfalfa cultivada en la Región Lagunera (Durango).....	67
25. Efecto de la inoculación comercial y de cepas "Elite" de <i>R. meliloti</i> en la toma de nitrógeno derivado del suelo en 2 variedades de alfalfa cultivada en la Región Lagunera (Durango).....	67
26. Efecto de la inoculación comercial y de cepas "Elite" de <i>R. meliloti</i> en la toma de N <sub>dds</sub> en el primer ciclo de producción en 2 variedades de alfalfa cultivada en la Región Lagunera (Durango).....	67
27. Efecto de la inoculación comercial y de cepas "Elite" de <i>R. meliloti</i> en la toma de N <sub>dds</sub> en el segundo ciclo de producción en 2 variedades de alfalfa cultivada en la Región Lagunera (Durango).....	68
28. Nitrógeno fijado total utilizando diferentes fuentes de nitrógeno (fertilizante, suelo y atmósfera) en la inoculación comercial y de cepas "Elite" de <i>R. meliloti</i> en 2 variedades de alfalfa cultivada en la Región Lagunera (Durango).....	68
29. Efecto de la inoculación comercial y de cepas "Elite" de <i>R. meliloti</i> utilizando diferentes fuentes de nitrógeno (fertilizante, suelo y atmósfera) en 2 variedades de alfalfa cultivada en la Región Lagunera (Durango) durante el desarrollo del cultivo 375 dds) .....	69

30. Efecto de la inoculación comercial y cepas "Elite" de <i>R. meliloti</i> sobre el rendimiento de materia seca en 2 variedades de alfalfa cultivada en la Región Lagunera (Durango) durante el desarrollo del cultivo (375 dds).....	71
31. Efecto de la inoculación comercial y de cepas "Elite" de <i>R. meliloti</i> en el rendimiento de nitrógeno en 2 variedades de alfalfa cultivada en la Región Lagunera (Durango) durante el desarrollo del cultivo (375 dds).....	71
32. Efecto de la inoculación comercial y cepas "Elite" de <i>R. meliloti</i> en el rendimiento de materia seca y nitrógeno en 2 variedades de alfalfa cultivada en la Región Lagunera (Durango) durante el desarrollo del cultivo.....	72



U A N L

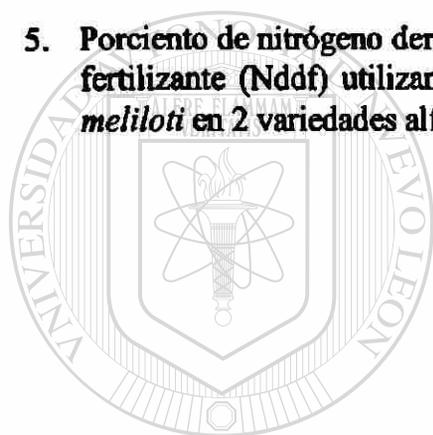
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## ÍNDICE DE FIGURAS

1. Arreglo experimental realizado a nivel de campo en bloques al azar..... 42
2. Relaciones genéticas de los 9 ETs entre 13 aislados recobrados de nódulos de alfalfa cultivada en la Región Lagunera (Durango)..... 58
3. Nitrógeno fijado en 2 ciclos de producción utilizando un inoculante comercial y cepas "Elite" de *R. meliloti* en 2 variedades de alfalfa cultivada en la Región Lagunera (Durango)..... 72
4. Fijación de nitrógeno atmosférico empleando un inoculante comercial y cepas "Elite" de *R. meliloti* en 2 variedades de alfalfa cultivadas en la Región Lagunera (Durango)..... 72
5. Porcentaje de nitrógeno derivado de la atmósfera (N<sub>dda</sub>), del suelo (N<sub>dds</sub>) y del fertilizante (N<sub>ddf</sub>) utilizando cepas "Elite" y un inoculante comercial de *R. meliloti* en 2 variedades alfalfa cultivada en la Región Lagunera (Durango)..... 73



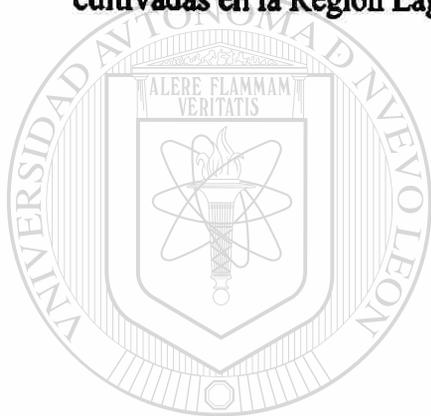
# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## ÍNDICE DE CUADROS

1. Estadísticas de la producción de alfalfa en la Comarca Lagunera..... 12
  2. Distribución de los tratamientos en campo para dos variedades de alfalfa y los cultivos de referencia (sorgo, avena, maíz, triticale, zacate ballico y Zacate Johnson)..... 42
- Distribución de los aislados de *R. meliloti* de acuerdo a la sensibilidad y resistencia a los antibióticos en 2 variedades de alfalfa (SW14 y San Miguelito) cultivadas en la Región Lagunera (Durango)..... 55



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## ABREVIATURAS

**a. e. = átomos en exceso**

**AN = Abundancia Natural**

**Atm = atmósferas**

**DI = Dilución Isotópica**

**dds = días después de la siembra**

**El = cepa "Elite"**

**Ets = Tipos electroforéticos**

**FBN = Fijación Biológica de Nitrógeno**

**g = gramo (s)**

**h = hora (s)**

**ha = hectárea (s)**

**mL = mililitro (s)**

**MLEE = Electroforesis de enzimas multilocus**

**N = Nitrógeno**

**Ndda = Nitrógeno derivado de la atmósfera**

**Nddf = Nitrógeno derivado del fertilizante**

**Ndds = Nitrógeno derivado del suelo**

**Ni = Nitragín**

**RIA = Resistencia intrínseca a los Antibióticos**

**RMS = Rendimiento de Materia Seca**

**RN = Rendimiento de Nitrógeno**

**Si = Sin inocular**

**SM = variedad de alfalfa San Miguelito**

**SW = variedad de alfalfa SW14**

**t = tonelada (s)**

**VA = método del Valor "A"**

**H = diversidad genética**

**N = número de tipos electroforéticos**

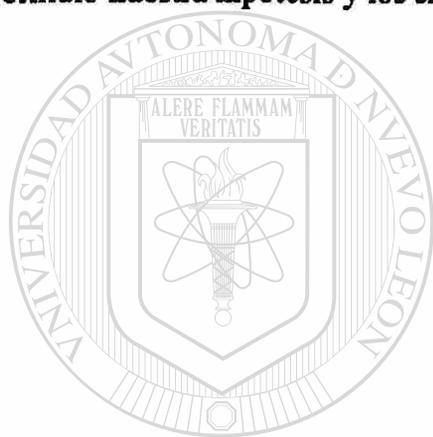
## RESUMEN

La alfalfa (*Medicago sativa*) es uno de los cultivos forrajeros más importantes de México y en especial de la Comarca Lagunera. A pesar de la escasez de agua que se tiene en esta región, este cultivo sigue siendo la principal fuente de vitaminas, minerales y proteínas para el ganado lechero. Una característica de gran relevancia de esta leguminosa es la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico cuando se asocia con bacterias del género *Rhizobium*. Las investigaciones se han enfocado a incrementar la eficiencia de este sistema simbiótico, sin embargo, en La Comarca Lagunera se conoce poco sobre el papel que desempeñan las poblaciones de *R. meliloti* en la economía del nitrógeno. En este sentido, los objetivos principales de este trabajo fueron evaluar mediante la técnica isotópica de  $^{15}\text{N}$  en qué medida las poblaciones de *R. meliloti* contribuyen a la fijación biológica de nitrógeno en simbiosis con el cultivo de alfalfa comparando cepas nativas e introducidas (un inoculante comercial, "Nitragin" y cepa "Elite" de colección) Además, conocer la diversidad de los aislados de *R. meliloti* obtenidos de plantas de alfalfa noduladas en los diferentes tratamientos mediante la determinación de patrones de sensibilidad y resistencia a los antibióticos y de la caracterización por electroforesis de enzimas multilocus (MLEE). Los resultados del análisis de nitrógeno marcado ( $^{15}\text{N}$ ), mostraron que en la variedad SW14 los valores de nitrógeno fijado correspondieron a rangos de 46-159; 23-63 y 30-173 kg N ha<sup>-1</sup> para las cepas nativas, Nitragin y cepa "Elite" respectivamente. Para la variedad San Miguelito los rangos fueron de 29-167 kg N ha<sup>-1</sup> para las cepas nativas, 23-168 kg N ha<sup>-1</sup> para el inoculante comercial "Nitragin" y 29-101 kg N ha<sup>-1</sup> para la cepa de colección "Elite". Estos datos muestran una alta eficiencia en la fijación de nitrógeno. La caracterización de los aislados indicó que existe una gran diversidad de cepas nativas capaces de fijar nitrógeno atmosférico en varios genotipos de alfalfa. Esto se manifestó en 10 patrones de sensibilidad y resistencia a los antibióticos evaluados de 80 aislados provenientes de 2 variedades de alfalfa (San Miguelito y SW14). La electroforesis de MLEE, de 11 aislados nodulantes en 2 variedades de alfalfa colectadas en diferentes regiones geográficas, así como 2 cepas catalogadas como *R. meliloti* expuestas a 13 enzimas reveló la existencia de 3 divisiones que divergen profundamente. Los datos revelaron una amplia diversidad genética (0.793) entre la colección de aislados analizados. Esto indica la existencia de más de una especie bacteriana capaz de nodular alfalfa con una clona predominante y ampliamente dispersa en diferentes regiones geográficas. En cuanto a nodulación, no se encontró diferencia estadística entre tratamientos y variedades. El promedio de 2 fechas de muestreo fue de 48, 27 y 30 nódulos/planta para las cepas nativas el inoculante comercial y cepas "Elite" respectivamente para la variedad SW14. Para la variedad San Miguelito las cifras fueron 39, 26 y 37 para los mismos tratamientos, Nitragin y "Elite" (cepa de colección). No obstante que en los alfalfares de la Comarca Lagunera existe una diversidad de cepas de *R. meliloti* con capacidad de nodular y fijar nitrógeno en diferentes genotipos de esta leguminosa, se requiere de más investigación para optimizar este importante proceso.

## INTRODUCCIÓN

En México las zonas áridas y semiáridas abarcan el 40% de la superficie total del país. De aquí la importancia de adaptar o generar tecnología para explotar racionalmente esta área (Molina, 1983). Debido a las condiciones de producción y manejo de las zonas áridas así como las altas temperaturas, estos suelos son extremadamente pobres en nitrógeno (N), en comparación con los suelos húmedos (West, 1979). En México, la alfalfa (*Medicago sativa* L.) es cultivada a partir del siglo XVI, y actualmrnte es uno de los principales forrajes para la alimentación del ganado lechero. A excepción de las zonas tropicales, está ampliamente distribuida en México y ocupa una superficie estimada de 200,000 ha sembradas bajo riego (Martínez, 1986). Su demanda se ha incrementado notablemente por su excelente calidad, pues sobre este cultivo se basa la producción lechera del altiplano central (Zacatecas, Jalisco, Guanajuato, San Luis Potosí) y el norte del país. En Guanajuato se estima que existen al rededor de 34,000 ha establecidas con alfalfa que representan el 16% de la superficie nacional dedicada a este cultivo. La producción de forraje verde en el Estado que se calcula en 1'000, 000 de t equivalente al 19% de la producción nacional (CIAB, 1981). El nitrógeno, componente esencial de las proteínas, los ácidos nucleicos y otros componentes celulares, es un elemento imprescindible para el crecimiento de todos los organismos. Una de las grandes ironías de la naturaleza es que, la mayoría de los seres vivos, incluyendo las plantas y los animales, son incapaces de fijar N, el cual conforma el 80% de la atmósfera para sus procesos bioquímicos vitales. Solamente las plantas son capaces de utilizarlo en forma de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) o de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) pero estos compuestos están presentes en el suelo en cantidades limitadas, además de que se pierden fácilmente por lavado en los suelos y por la reducción biológica de nitratos. La fijación biológica de nitrógeno (FBN) se define como la reducción de nitrógeno atmosférico a amonio realizada por un grupo de bacterias las cuales han evolucionado sistemas enzimáticos complejos para la reducción de N a  $\text{NH}_4^+$ .

La investigación sobre la FBN ha avanzado sustancialmente en los últimos años debido al esfuerzo de diferentes laboratorios en todo el mundo. Algunos de los puntos importantes que ahora se conocen sobre esta área incluyen: estructura de la nitrogenasa; genes bacterianos específicos que participan en la FBN (genes *nif*) y en la interacción simbiótica con las plantas; circuitos regulatorios que sensan condiciones ambientales (temperatura, desecación, concentración de O<sub>2</sub>, el N fijado, etc.) y que disparan la FBN. Este crecimiento contrasta con la escasa información existente entre la FBN en los cultivos de alfalfa en la Comarca Lagunera. En este sentido, es de vital importancia encaminar estudios que nos muestren resultados precisos sobre el impacto que tiene la FBN en esta región, en especial la alfalfa por ser uno de los cultivos forrajeros mas importantes. Basándose en anterior se formuló nuestra hipótesis y los siguientes objetivos.



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## **Hipótesis**

**La fijación biológica de nitrógeno (FBN) en los cultivos de alfalfa en la Comarca Lagunera puede aumentarse significativamente a través del uso de cepas de *Rhizobium meliloti*. de reconocida eficiencia.**

## **Objetivo general**

- **Evaluar la fijación biológica de nitrógeno en cultivos de alfalfa en una de las regiones altamente productoras “La Comarca Lagunera, México.**

## **Objetivos particulares**

- **Quantificar la fijación biológica de nitrógeno en el cultivo de alfalfa establecido en la región bajo condiciones naturales utilizando la técnica de dilución isotópica de  $^{15}\text{N}$ .**
- **Estimar la diversidad de cepas de *Rhizobium meliloti* establecidas en cultivos de alfalfa de la región lagunera.**

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN<sup>®</sup>  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## **ANTECEDENTES**

### **2.1. Las zonas áridas de México.**

En México las zonas áridas y semiáridas abarcan el 40% de la superficie total. De aquí la importancia de adaptar o generar tecnología para explotar racionalmente ésta área (Molina, 1983). Debido a las condiciones de producción y manejo de las zonas áridas así como las altas temperaturas, estos suelos son extremadamente pobres en nitrógeno, en comparación con los suelos húmedos (West, 1979).

### **2.2. La Comarca Lagunera.**

La Comarca Lagunera forma parte de las zonas áridas y semiáridas del país, localizándose en la parte central de la porción norte de la República Mexicana (parte sur del desierto Chihuahuense). Esta región se encuentra en la parte sur occidental del Estado de Coahuila y en la media oriental del Estado de Durango, está ubicada entre los meridianos 102° 22' y 104° 47' W de G longitud Oeste, y los paralelos 24° 22' y 26° 23' latitud Norte, cuenta con una extensión montañosa y una superficie plana donde se localizan las áreas de cultivo, así como las áreas urbanas. Se trata de una de las pocas regiones que se ve beneficiada por la presencia de importantes corrientes de agua superficiales (el río Nazas principalmente), esto, aunado al aprovechamiento de los acuíferos locales. Esta situación contrasta con lo que ocurre en la mayor parte de las zonas áridas donde predomina la economía campesina de subsistencia, con escasa dotación de recursos y fuerte tendencia a la marginación social. La zona está conformada por 15 municipios: Matamoros, Torreón, Viesca, Francisco I. Madero y San Pedro pertenecientes al estado de Coahuila; Gómez Palacio, Lerdo, Mapimí, Tlahualilo, Nazas, Rodeo, San Pedro del Gallo, San Luis del Cordero, Simón Bolívar y San Juan de Guadalupe en el Estado de Durango. La altitud de toda la comarca fluctúa entre los 1,050 y 1,300 metros sobre el nivel del mar (msnm); su topografía es de planos inclinados con pendientes de 0 a 5 %, y se encuentra rodeada de pequeñas sierras y lomeríos con una limitada cubierta vegetal. (SARH, 1991). Abarca un territorio de

4'788,750 ha de las cuales 53.99% pertenecen al Estado de Durango y el restante 46.01% al Estado de Coahuila. El clima y la vegetación, según datos regionales del Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI), es extremoso clasificado como desértico, con una precipitación que en raras ocasiones supera los 300 mm/año. Además, los índices de evapotranspiración son elevados por lo que la vegetación natural existente solo es apropiada para la recolección forestal no maderable (lechuguilla, candelilla, orégano etc.). Así mismo, datos obtenidos en 1979 por la Secretaría de Agricultura de Recursos Hidráulicos y la comisión técnico consultiva para la determinación de coeficientes de agostadero (SARH-COTECOCA) (Anónimo, 1980), la vegetación nativa en la Comarca Lagunera esta compuesta por matorrales desérticos micrófilos y vegetación halófila propia de suelos salinos, Además, menciona que los pastos establecidos en forma natural son escasos y de mala calidad alimenticia. Por ejemplo, en la parte occidental de la región (Mapimí, Tlahualilo, Gómez Palacio y Lerdo) se producen en condiciones de vegetación "buena" un promedio de 136.81 kg/ha de materia seca utilizable, que equivale a un coeficiente de agostadero anual de 36 ha/unidad animal. En similares condiciones se encuentra el resto de la Comarca Lagunera (Mazcorro *et al.*, 1991).

De una superficie de 249,660 ha que se encuentran en agricultura bajo riego 62,091 ha son de riego por bombeo. Esta superficie se destina a la ganadería y agricultura locales, actividades que dentro de la economía de la región mantienen un lugar importante y tradicional. El área temporalera es mínima. En los meses de marzo a junio se cuenta con el agua liberada por las presas. Esto representa una solución parcial en los cultivos que favorecen la economía regional. Una de las alternativas es adaptar de la mejor manera posible el calendario de riego de las presas a las necesidades agrícolas, con cultivos de una mayor rentabilidad entre los que destaca la producción de alfalfa. El uso del suelo por actividad agrícola muestra que existe una superficie de 313,757 ha (6.5 %), de las cuales 249,660 ha son de riego y 64,097 ha de temporal; para actividad forestal se tienen 875,210 ha (18.3 %); para uso múltiple (forestal y agostadero) 3'554, 606 ha (74.2 %) y 44,177 (1.0 %) destinadas zonas urbanas además de pequeños bolsones de recursos minerales, siendo en total 4'708, 750 ha en total (Mazcorro *et al.*, 1991). Estudios obtenidos por la Comisión Nacional del Agua (CONAGUA, 1991), indican que en ésta región se explotan 1,299 pozos agrícolas en Durango y 197 en Coahuila, con un volumen de extracción autorizado de 693'624,763 m<sup>3</sup> y una extracción real de 1,185'000,52 m<sup>3</sup>, que representan un 77.25 % de 1,534 millones de m<sup>3</sup> como total del volumen anual extraído del subsuelo de la región

(Aguilar *et al.*, 1994).

Estudios realizados para conocer las condiciones fisicoquímicas de los suelos en donde se cultiva la alfalfa y definir a futuro las prácticas de fertilización en estos cultivos y particularmente, para determinar si las recomendaciones actuales de fertilización son las adecuadas o necesitan modificación. Desde 1988, se iniciaron estudios con muestreos de suelo y plantas durante el período primavera-verano en 28 predios forrajeros de la Comarca Lagunera, se determinó que los suelos donde se produce alfalfa destacan aquellos de pH alcalinos con altos contenidos de carbonatos totales de calcio y magnesio, observándose que hay predios que ya rebasan los límites permisibles de salinidad y/o sodicidad con 4 mmhos/cm<sup>2</sup>, y 15 % respectivamente. Igualmente se ha comprobado que la mayoría de los suelos son pobres en materia orgánica con una fertilidad natural medio baja. También se encontró que resaltan las grandes cantidades de potasio disponible, con lo que se asume que existen pocas posibilidades de encontrar respuesta a la aplicación de este elemento. Para la producción de forraje como extracción de nutrientes se encontró que la alfalfa es una especie que tiene una alta demanda de elementos mayores como nitrógeno, fósforo y potasio. De este último, sin embargo, no se requiere aplicación considerando su presencia natural en los suelos. En general, se ha notado que a una mayor aplicación, corresponde una mas alta extracción de nutrientes del suelo, lo que indica que para definir un programa de fertilización en este cultivo, hay que considerar varios factores como la inoculación de la semilla al momento de la siembra y la aplicación en función de la calidad de suelo y del potencial de rendimiento esperado (Cueto-Wong, 1990).

### **2.3 Introducción del cultivo de alfalfa en México.**

La alfalfa (*Medicago sativa* L.) fue introducida en México por los españoles a mediados del siglo XV. Migraciones subsecuentes establecieron la alfalfa en Chile, Perú, Uruguay y Argentina, años después fue establecida en Norteamérica (Barnes, 1977 y Graber, 1950). Investigaciones realizadas, dan crédito de las variedades de semilla introducida en California comerciando desde Chile por el año de 1851(Graber, 1950). Sin embargo, la introducción de la alfalfa en Nuevo Mexico data de cerca 250 años antes de ser introducida en California. En 1958, la alfalfa junto con varios tipos de ganado y otras

cultivos fue llevado de México a Nuevo Mexico por el colonizador Juan de Onate (Sheck, 1977). Originalmente fue sembrada cerca de los canales de riego para facilitar su irrigación, usándose para la alimentación del ganado. Las estadísticas agrícolas muestran que en 1920 se cultivaron 128,000 acres de alfalfa en Nuevo Mexico (tabla 1), declinando en 1935 a 80,000 acres.

Tabla 1. Variaciones del área cultivada de alfalfa en Nuevo Mexico\*.

AÑOS CULTIVADOS	ACRES/AÑO
1920	128, 000
1925	118, 000
1930	95, 000
1935	80, 000
1940	135, 000
1945	120, 000
1950	110, 000
1955	160, 000
1960	150, 000
1965	190, 000
1970	195, 000
1975	220, 000
1980	240, 000
1983	250, 000
1986	240, 000

\* Melton, 1988.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



#### 2.4. Cultivo de la alfalfa en la Comarca Lagunera.

La introducción de la alfalfa en la comarca, ha tenido una trayectoria sobresaliente sin importar las variaciones en cuanto a superficie cultivada y volumen cosechado. Siempre se ha considerado como el cultivo forrajero mas rentable, pasando por alto las necesidades de agua que se tienen en la región y los grandes volúmenes que se requieren para su desarrollo. De las características fisicoquímicas que presentan sus suelos, los requerimientos mas apremiantes y los tipos de fertilización nitrogenada utilizada (Quiroga, *et al.*, 1991). Así mismo se hace énfasis que el consumo de alfalfa verde es el

método de mayor utilización de las explotaciones pecuarias, principalmente en ganado bovino para leche, ya que en algunos casos la alfalfa alcanza hasta el 50 % de la composición de la ración alimentaria diaria para este tipo de ganado, debido a su contenido de proteínas, vitaminas y minerales (Meyer, 1959). Los principales cultivos forrajeros en la región son: alfalfa, avena, sorgo, maíz, zacate ballico y Sudán (tabla 2)( Mazcorro *et al.*, 1991).

Tabla 2. Producción de forrajes en la Región Lagunera\*.

CULTIVO	1967		1972		1981	
	ha	t	ha	t	ha	t
ALFALFA	7,200	591,660	12,725	827,125	23,848	1'786,840
SORGO	900	54,700	338	13,686	2,462	91,271
MAÍZ	-	-	-	-	12,479	534,787
Z. BALLICO	-	-	-	-	3,632	209,135
AVENA	1,000	1,000	1,465	57,270	8,747	348,846
Z. SUDÁN	-	-	148	ND	222	ND
CEBADA	-	-	491	ND	250	ND

\* Mazcorro *et al.*, 1991. ND = no determinado.

La alfalfa es el principal forraje que se siembra en la región; en 1988, ocupó el 41% de la superficie destinada a la alimentación animal, aporta el 67% del volumen de forraje producido en verde. Se emplea como alimento del ganado lechero durante casi todo el año y solo de 2 a 3 meses en invierno es alimentado con forrajes henificados. La cuantificación del déficit de forraje varía de una fuente a otra, pero el dato más reciente proporcionado por la SARH regional lo ubica en un 40% de los requerimientos anuales de forrajes verdes; considerando un hato de 125 mil animales con un consumo promedio por cabeza en ton/año, 15.9 para alfalfa, 4.5 para ballico y para avena respectivamente (Mazcorro *et al.*, 1991).

**Tabla 3. Rendimiento de cultivos forrajeros para alimentar a 12,488 cabezas de ganado lechero en la Región Lagunera\***

CULTIVOS	CONSUMO t/año	PRODUCCIÓN t/año	DÉFICIT t/año
ALFALFA	1'985,607	1'572,653	412,953
Z. BALLICO	561,965	171,011	390,954
AVENA	562,965	111,871	450,074
TOTAL	3'109,537	1'855,535	1'253,981

\* Mazcorro *et al.*, 1991.

La alfalfa es un cultivo tradicional en la zona, para 1945 se reporta una superficie cosechada de 2 468 ha y a mediados de los años cincuentas se registra un aumento considerable debido al fuerte impulso de la ganadería lechera (tabla 4). Aunado a lo anterior, la incorporación de mejoras tecnológicas y la expansión del alfalfar en una parte de las tierras con mejores recursos, repercute en un aumento considerable de los rendimientos y en general de la protección de alfalfa a nivel local. Aunque los rendimientos regionales pueden ser mejorados, son aceptables y como el cultivo presenta beneficios como no requerir de fertilizante nitrogenado por ser una leguminosa, ni presentar acumulaciones tóxicas de nitratos, además es ideal para rotaciones de cultivos, tanto por aportar cierta cantidad de nitrógeno residual como por contribuir al desarrollo del suelo por sus cualidades radiculares. En el cultivo de la alfalfa, la superficie sembrada se incrementó de 7 500 ha en 1965 a 24 436 ha en 1983, lo que representa el 300 % y su rendimiento es de 75 t/ha/año de forraje verde, las cantidades de nitrógeno fijado varía con el tipo de planta, la cepa usada, las condiciones climáticas, la nutrición de la planta hospedera, la magnitud del día, la temperatura, la intensidad de luz, la concentración de CO<sub>2</sub>, el pH de suelo, la sequía, la presencia de nitrógeno combinado, fósforo, potasio, calcio, molibdeno y zinc entre otros, así como la salinidad han sido reportadas como los principales factores que influyen en la cantidad de nitrógeno fijado (Cano *et al.*, 1984).

**Tabla 4. Producción de alfalfa en la Región Lagunera\***

AÑO	SUPERFICIE ha	VOLUMEN t/ha	RENDIMIENTO t
1945	2,468	145,612	59.0
1950	2,630	149,910	57.0
1955	2,507	147,913	59.0
1959	4,203	310,419	2.9
1966	7,500	590,100	78.7
1970	10,328	814,185	78.8
1975	15,650	1'176,462	75.2
1980	21,234	1'602,670	75.5

\* Mazcorro *et al.*, 1991.

Trabajos realizados señalan que la alfalfa es el forraje que tiene mayor valor nutritivo en comparación con todos los cultivos que se explotan para heno. El contenido de proteína digestible de alfalfa es de 2 a 4 veces mayor que el trébol y que el maíz ensilado respectivamente. Así como también se menciona que la alfalfa es rica en minerales y que contiene por lo menos 10 proteínas diferentes, de las cuales predominan la vitamina A. Estas consideraciones hacen que el heno de alfalfa sea un componente valioso en las raciones consumidas en la mayoría de los establos del país (Hanson *et al.*, 1966).

Por otro lado, el cultivo de la alfalfa ha sido "injustamente satanizado" en nuestra región por el hecho de ser una desperdiciadora de agua en un área desértica, donde el vital líquido tiene un valor inestimable (Aguilar *et al.*, 1994). Según datos obtenidos del Anuario Estadístico de Producción Agropecuaria de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo rural en nuestra región, las características de producción de los principales forrajes durante los últimos 10 años en la región (tabla 5), estos datos indican que la alfalfa sigue siendo el cultivo forrajero más explotado, además, de 1988 a 1997, se muestra una comparación de la producción de alfalfa con otras leguminosas (tabla 6). Así mismo se observa la producción de alfalfa por cada uno de los 15 municipios que conforman la región lagunera (cuadro 1).

**Tabla 5. Producción de los principales cultivos forrajeros en la Región Lagunera\***

AÑOS	ALFALFA	MAÍZ	BALLICO t/año	AVENA	SORGO	SUDÁN
1988	1,476,490	285,595	115,767	96,571	225,350	1,536
1989	1,292,168	344,413	135,92	145,355	242,461	6,381
1990	1,517,671	186,488	232,892	223,859	315,931	14,755
1991	1,411,179	308,192	150,199	84,764	247,300	7,262
1992	1,340,927	288,917	125,369	123,058	136,796	5,993
1993	2,076,770	286,992	113,604	81,784	160,430	3,464
1994	2,055,240	415,899	101,898	60,501	121,594	2,570
1995	2,047,410	231,774	177,260	96,128	109,442	2,307
1996	2,127,064	282,382	119,816	130,928	381,171	4,150
1997	2,517,506	753,957	91,169	175,217	2,417	5,309

\* SAGAR, 1997

**Tabla 6. Producción de leguminosas cultivadas en la Región Lagunera\***

AÑOS	ALFALFA	FRIJOL t/año	CACAHUATE
1990	1,517,671	9,040	350
1991	1,411,179	23,861	236
1992	1,340,927	26,194	517
1993	2,076,777	33,590	601
1994	2,055,240	3,702	303
1995	2,047,410	26,210	361
1996	2,127,064	5,047	583
1997	2,517,506	15,222	646

\* SAGAR, 1997

**Cuadro 1. Estadísticas de la producción de alfalfa en la Comarca Lagunera\*.**

MUNICIPIOS	EJIDAL		P. PROPIEDAD		GRAN TOTAL	
	ha	t/año	ha	t/año	ha	t/año
Lerdo	6,531	488,904	1,764	134,321	8,295	623,225
Gómez Palacio	958	2,777	3,232	252,212	4,190	325,989
Mapimí	178	8,124	1,378	93,549	1,556	101,62
Nazas	1,286	77835	442	26,007	1,728	103,842
Rodeo	326	14,394	53	2,945	379	1239
Tlahualilo	715	71,054	1,307	71,701	2,022	142755
Simón Bolívar	504	43,123	185	16,520	689	59,643
San Juan de Guadalupe	57	1,098	58	1,392	115	2,490
San Luis del Cordero	-	-	16	490	16	490
San Pedro del Gallo	18	775	-	-	18	775
REG. LAG. DURANGO	10,52	779,084	8,435	599,137	19,008	1,378,221
Matamoros	1,989	124,127	3,036	203,412	5,025	327,539
San Pedro	847	59,493	1,402	101,725	2,249	161,218
Torreón	924	70,056	1,276	115,012	2,200	185,068
Francisco I. Madero	954	63,438	685	59,400	1,639	122,838
Viesca	1,617	121,496	2,953	221,126	4,570	342,622
REG. LAG. COAHUILA	6,331	438,610	9,352	700,675	15,683	1,139,285
REGIÓN LAGUNERA	16,904	1,217,694	17,787	1,299,812	34,691	2,517,506

\* SAGAR, 1997

## 2.5. Importancia del nitrógeno.

El N como factor limitante de este tipo de zonas (áridas y semiáridas), es el que mas efecto tiene sobre las plantas y animales. Aunque el N es un elemento abundante en la atmósfera, pero no puede ser aprovechado por la mayoría de las organismos, pues es inerte y solamente se incorpora a los sistemas biológicos cuando es fijado o combinado con otros compuestos (Brill, 1980). Asimismo, es uno de los elementos mas importantes para la vida de nuestro planeta, este, puede existir en tres formas, molecular gaseoso, orgánico e inorgánico (Lehinger, 1978).

Debido a las condiciones socioeconómicas de las regiones semiáridas, el uso de fertilizantes se ve limitado por sus altos costos. Aún así, la agricultura intensiva acentúa el consumo de este elemento esencial. Sin embargo, solo una parte del nitrógeno que se requiere para satisfacer las necesidades agrícolas se debe a fertilizantes químicos, una segunda parte es por precipitación de formas de

nitrógeno, por medio de las descargas eléctricas de la atmósfera (Alexander, 1980).

## 2.6. Aportaciones de nitrógeno al suelo.

Existen diversos factores que limitan la producción agrícola; el N y el agua son los más comunes. El suministro de N en la producción de cultivos y en la fertilidad de los suelos, es indispensable, ya que las deficiencias de este elemento reducen los rendimientos y la calidad de las cosechas. Las formas de adicionar nitrógeno al suelo pueden ser agregando materia orgánica (residuos de cosecha, abonos verdes y estiércoles), fertilizantes químicos, fijación no biológica de nitrógeno (lluvia) y la fijación biológica de nitrógeno, ya sea fijación libre, asociativa y simbiótica (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 1985). El mayor aporte de N en la agricultura se da a través de la adición de fertilizantes nitrogenados, el cual se obtiene por síntesis química y es adicionado en forma de nitratos, urea, sales de amonio etc. (Black, 1975). La demanda de N en la agricultura mundial, se ha incrementado en una tasa, aproximadamente equivalente, al incremento de la población mundial, *i.e.* alrededor del 2 %. Sin embargo, la cantidad de nitrógeno disponible no se encuentra en dicha tasa, en virtud de la continua disminución de la capacidad de suministrar nitrógeno a los suelos agrícolas (Herridge *et al.*, 1995).

Los compuestos nitrogenados presentan un fuerte impacto ambiental dentro del amplio universo que abarca la microbiología del suelo, indiscutiblemente que el estudio de los microorganismos en relación con el nitrógeno es de vital importancia por múltiples razones. Dada la gran diversidad microbiana presente en el suelo y tal como se observa en la tabla 7, las diferentes formas químicas del nitrógeno ahí presentes pueden servir lo mismo de aceptores finales de electrones que de fuente de energía, y aún sus formas más inertes como el nitrógeno molecular, ser introducidas al sistema suelo a través de la fijación biológica de nitrógeno.

Tabla 7. Transformaciones microbiológicas del nitrógeno en el suelo\*

TRANSFORMACIÓN	REACCIÓN	IMPLICACIÓN ECOLÓGICA
Inmovilización	$N \rightarrow N \text{ Inorgánico}$	Competencia entre microorganismos y plantas.
Mineralización		
a. Amonificación	$N \text{ org.} \rightarrow NH_4^+$ $NH_4^+ \rightarrow NO_3^-$	Descomposición de residuos y lluvia ácida. Eutroficación y contaminación de acuíferos por $NO_3^-$ . Efecto invernadero y destrucción de acuíferos por NO y $N_2O$ .
b. Nitrificación		
Desnitrificación	$NO_3^- \rightarrow N\acute{o}x. \rightarrow N_2$	Efecto invernadero, destrucción de ozono, balance del ciclo del nitrógeno
Fijación Biológica	$N_2 \rightarrow N \text{ orgánico}$	Incremento de nitrógeno en el suelo, disminución del uso de fertilizantes químicos.

\* Peña-Cabriales y Grageda-Cabrera, 1997.

Se estima que para el año 2025, tan solo un 28 % de las necesidades alimenticias de la población serán satisfechas a través de una ampliación de la superficie agrícola; el 72 % restante deberá generarse a través del desarrollo de una agricultura cada vez más tecnificada e intensiva, lo que deberá basarse en un uso más eficiente de los fertilizantes. Dado que el nitrógeno frecuentemente es el elemento más importante para el desarrollo de las plantas, la aplicación de fertilizantes nitrogenados deberá incrementarse de cuatro a cinco veces en los próximos 20 años (Saad *et al.*, 1993).

En la región del Bajío ( $5 \times 10^5$  ha), anualmente se aplican alrededor de 150 000 t de N. Al realizar un análisis de las entradas y salidas de N de los principales sistemas de producción (maíz, trigo, sorgo y brócoli), se puede observar que la cantidad de fertilizante aplicado y el manejo de los residuos de cosecha son diferentes, lo que influye en la cantidad de nitrógeno no contabilizado en cada uno de ellos (tabla 8). En términos generales se desconoce el paradero 66 000 ton N año<sup>-1</sup>, lo que significa que no se puede justificar el destino de cerca 100 kg N ha<sup>-1</sup>. El análisis demuestra que en muchos sistemas de cultivo, la eficiencia en la toma de nitrógeno proveniente del fertilizante es menor al 50 %, datos que confirman estos resultados han sido obtenidos en estudios en los cuales se emplearon fertilizantes enriquecidos con <sup>15</sup>N en la región del Bajío Guanajuatense, donde las mayores eficiencias registradas

son menores al 45 % (Peña-Cabriales y Grageda-Cabrera, 1997).

Tabla 8. Balance de nitrógeno en diferentes sistemas de producción agrícola de Guanajuato<sup>a</sup>

	MAÍZ	TRIGO	SORGO	BRÓCOLI
	t/año			
<b>ENTRADAS</b>				
Mineralización de residuos	110	281	622	392
- Fertilizante	13 105	45,470	8,394	38,000
<b>SALIDAS</b>				
- Grano	5 072	15,630	19,684	-
<b>PAJA</b>				
- Extracción	2 725	0	0	-
- Quema	-	5,627	13,242	-
- TALLOS Y HOJAS	-	-	-	1,750
- FLORETE	-	-	-	2,450
Paradero desconocido	15418	26,287	-	24,392

<sup>a</sup> = medidas anuales de reportes de SARH (1985-1995) e INIFAP (1985-1995), Grageda -Cabrera *et al.*, 1996).

## 2.7. Fijación biológica de nitrógeno (FBN).

La fijación biológica de nitrógeno se define como la reducción de nitrógeno atmosférico a amonio realizada por un grupo de bacterias las cuales han evolucionado sistemas enzimáticos complejos para la reducción de  $N_2$  a  $NH_4^+$ . Estos microorganismos incluyen dos variedades: los fijadores de nitrógeno de vida libre que utilizan amonio para su propio uso, y los fijadores de nitrógeno simbióticos que fijan nitrógeno asociados con plantas que proveen a la planta de nitrógeno a cambio de carbono y de un hábitat de protección. Esta última variedad incluye las bacterias gram negativas: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*, que se asocian con algunas plantas leguminosas; la bacteria gram positiva *Frankia* que se asocia con árboles y las cianobacterias que se asocian con helechos (CIFN-UNAM, 1993). En el proceso simbiótico *Rhizobium*-leguminosa, la bacteria infecta a las raíces de la planta y se forma una estructura conocida como nódulo, en el nódulo, la bacteria diferenciada a

bacteroide reduce el nitrógeno atmosférico a amonio, el cual es excretado a la célula vegetal. Esta simbiosis es un proceso específico, una cierta especie de *Rhizobium* puede nodular únicamente a cierto tipo de planta leguminosa. Por ejemplo, *Rhizobium phaseoli* nodula a frijol (*Phaseolus*) y *R. meliloti* nodula a alfalfa (*Medicago* spp) (CIFN-UNAM, 1993).

La FBN es un proceso reductor que depende de la degradación de azúcares para obtener poder reductor y energía:  $N_2 + 6e + 12 ATP \longrightarrow 2 NH_3 + 12 ADP + 12 PO_4$  (Askins, 1986).

Los organismos capaces de llevar a cabo la fijación de nitrógeno, son procariotes de vida libre (fijación no simbiótica, asociativa y los que viven asociados simbióticamente (Sprent, 1979, Drevon, 1983). La meta de la fijación biológica de nitrógeno es contribuir al desarrollo de la agricultura. Actualmente, ya se producen grandes cantidades de *Rhizobium* como inoculantes efectivos para ciertos cultivos de leguminosas. Esta valiosa contribución a la agricultura es una potencial alternativa ya que nos permite en gran medida poder disminuir la dependencia de los fertilizantes químicos (procesos contaminantes y altamente consumidores de energía) (CIFN-UNAM, 1993).

El proceso opuesto a las pérdidas gaseosas de nitrógeno, y sin duda uno de los grandes beneficios lo constituye la FBN, ya que este elemento también puede ser obtenido por los cultivos a través de este fenómeno, el cual representa una alternativa importante no solo por reducir los costos de energía en la producción de fertilizantes nitrogenados, sino también para el desarrollo de una producción agrícola sostenible. Las leguminosas en simbiosis con bacterias del género *Rhizobium* son el sistema más conocido de FBN. A través del uso de cultivos fijadores de nitrógeno se puede: (i) disminuir la dependencia de fertilizantes químicos y por consecuencia mantener la calidad del entorno; (ii) aumentar la producción de proteínas, ya que las leguminosas tienen una alta concentración de estos compuestos en sus semillas, (iii) contribuir con nitrógeno a los cultivos subsecuentes cuando sus residuos se adicionan al suelo, y (iv) mejorar la fertilidad y estructura del suelo. También, se ha motivado el desarrollo de tecnologías conducentes a suministrar nitrógeno a las plantas de fuentes diferentes a los fertilizantes químicos, Vázquez-Navarro *et al.*, (1994), empleando técnicas isotópicas con  $^{15}N$  en estudios sobre fuentes alternativas de nitrógeno para los cultivos, encontraron que la incorporación de abonos verdes provenientes de sistemas fijadores de nitrógeno (*Azolla fuliculoides*), son fácilmente mineralizados y el nitrógeno que contienen se torna rápidamente disponible para las plantas, siendo equivalente al nitrógeno proveniente del fertilizante sulfato de amonio. Este tipo de

fuentes alternativas de nitrógeno son muy apreciadas en sistemas de producción agrícola sostenible (Bowen y Danso, 1990).

Tabla 9. Cantidad de nitrógeno fijado por varios cultivos de leguminosas\*.

LEGUMINOSA	NITRÓGENO FIJADO (kg ha <sup>-1</sup> ciclo <sup>-1</sup> o año <sup>-1</sup> )
Haba ( <i>Vicia fava</i> L.)	45–552
Chícharo ( <i>Pisum sativum</i> L.)	52–77
Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> L.)	229–290
Cacahuete ( <i>Arachis hypogaea</i> L.)	72–124
Lenteja ( <i>Lens esculenta</i> M.)	88–114
Soya ( <i>Glycine max</i> L.)	50–90
Frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	40–70

\* FAO, 1984.

La medición de la fijación de nitrógeno es un aspecto muy importante en los esfuerzos por incrementar la contribución del nitrógeno atmosférico a la nutrición de las plantas y la fertilidad del suelo. Es importante destacar que de todos los métodos disponibles, la técnica isotópica <sup>15</sup>N es la más apropiada para cuantificar la cantidad de nitrógeno fijado, ya que proporciona una medida integrada del nitrógeno en la planta que proviene tanto del suelo, fertilizante y atmósfera (Danso *et al.*, 1993). A través del empleo de estas técnicas, se han encontrado grandes diferencias en cuanto a efectividad de fijar nitrógeno en diferentes especies de leguminosas y sus microsimbiontes (tabla 9) (FAO, 1984).

**Tabla 10. Cantidad de nitrógeno fijado por leguminosas en el Estado de Guanajuato<sup>A</sup>**

LEGUMINOSA	NITRÓGENO FIJADO (kg ha <sup>-1</sup> año <sup>-1</sup> )
Haba*	53
Chicharo*	153
Garbanzo*	31
Jícama*	75–192
Frijol*	33–68
Alfalfa	260
Lenteja	77
Soya	60–80

<sup>A</sup> = Peña-Cabrales *et al.*, 1997.

\* determinado por la técnica de dilución isotópica de <sup>15</sup>N

Así mismo, estudios realizados en leguminosas cultivadas en el Bajío Guanajuatense, muestran tasas de fijación de nitrógeno muy contrastantes (tabla 10). Los resultados obtenidos han ayudado a establecer estrategias cuyo propósito es incrementar la FBN y así reducir el empleo de fertilizantes nitrogenados.

Por ser el agua un recurso limitante, costoso y en constante abatimiento en las zonas áridas; Además de la baja permeabilidad al agua, la aireación del suelo, gases y excesiva compactación, provocan un efecto negativo en las plantas. En este sentido, se busca que las especies cultivadas muestren todo su potencial de producción, la fijación biológica de nitrógeno en las leguminosas resulta ser una línea de investigación muy importante. La investigación sobre la FBN en las leguminosas cultivadas se ha realizado primordialmente en zonas templadas, y recientemente se ha abordado con mayor profundidad en las zonas tropicales, pero en los climas calientes y secos la investigación ha sido muy limitada (Castellanos-Ramos, 1985).

## 2.8. Significado agronómico de la FBN.

Por su capacidad fijadora de nitrógeno atmosférico, las leguminosas juegan un papel mayor en los

sistemas de cultivo, especialmente porque son excelentes cultivos como cabeza de rotación (Wery y Grignac, 1995). Por las predicciones de aumento de la población en los próximos 50 años, el poder duplicar el suministro de alimentos, requerirá del empleo de fertilizantes nitrogenados y ello equivale a tener que quemar 500 millones de Tm de carbón o su equivalente, con una consecuente reducción del recurso natural y serias consecuencias ambientales. La FBN puede reducir sustancialmente estos requerimientos. Una mayor contribución sin ninguna entrada adicional por parte del agricultor se lleva a cabo con el solo hecho de optimizar la proporción de N derivado de la fijación en las leguminosas. Tan solo en el caso de frijol, aumentar ésta a un 90% permitirá alcanzar hasta 440,000 t de N/año en los suelos, satisfaciendo los niveles de producción actuales (Fried, 1995).

De igual forma, uno de los requisitos indispensables para la agricultura sustentable es el mantenimiento de la fertilidad del suelo. Aunque las deficiencias de nitrógeno es un factor clave en la producción de cultivos, el uso de fertilizantes nitrogenados es necesariamente obligado en las economías pobres de muchos países en vías de desarrollo. Las diversas estimaciones indican que la FBN contribuye con más N para la planta que los fertilizantes nitrogenados, por lo tanto es indiscutible la importancia de la FBN en un sistema de agricultura sustentable. Aunque para poder aumentar la fertilidad de N del suelo, es necesario que la proporción de N total de la planta debe ser mayor que el índice de cosecha de nitrógeno o al N en el material cosechado. Así mismo, el cultivo de una planta fijadora de nitrógeno podrá resultar en una pérdida de N del suelo después de la cosecha (Danso, 1995; Giller y Cadish, 1995, People *et al.*, 1995, Wani *et al.*, 1995).

## 2.9. Importancia de la FBN.

Estudios realizados en invernadero para determinar las características que debe ser consideradas como indicadores de la FBN en alfalfa se recurrió a un proceso de selección de genotipos para incrementar esta forma de fijación. Para tal efecto de variación de los genotipos de alfalfa y las cepas de *Rhizobium*, los parámetros que se evaluaron fueron: peso y número de nódulos, peso seco y fresco del follaje y raíces, así como porcentaje de nitrógeno total como indicadores de la proporción de la reducción de acetileno (Duhigg *et al.*, 1979). Se considera que para el agricultor, es más ventajoso, económicamente

sembrar leguminosas, ya que estas plantas bajo ciertas condiciones podrán abastecerse ellas mismas del nitrógeno requerido para dar un buen rendimiento (Valdés y Humbell, 1974). La FBN es un proceso con un alto potencial de explotación en los sistemas agrícolas de México, mediante la inoculación adecuada de leguminosas, la cual puede ser un seguro contra la pérdida de las cosechas por falta de suficiente nitrógeno. El costo de agregar rizobios a las semillas es bajo, además, la inoculación requiere de poco tiempo y trabajo. El papel de las leguminosas en la agricultura es importante, principalmente por ser una fuente de proteínas de buena calidad (Hughes *et al.*, 1976).

La inoculación de leguminosas es una práctica agrícola que debe ser mejorada, ya que la ausencia a la respuesta de inoculación puede deberse entre otros factores, al gran número de cepas existentes competitivas, pero generalmente poco efectivas, o que éstas, introducidas en el inoculante no esten en el sitio preciso para nodular y fijar nitrógeno compitiendo pobremente (Peña-Cabriales, 1989).

Los estudios sobre FBN en leguminosas cultivadas en México, permiten identificar con mas confiabilidad los cultivos y/o condiciones que requieren de atención y estudio para la optimizar del sistema simbiótico en el campo. En este sentido y con base en resultados generados en nuestro país se ha logrado estimar que alrededor de  $131 \times 10^3$  t de nitrógeno entran anualmente al sistema agrícola vía FBN, considerando exclusivamente a las leguminosas cultivadas. Entonces, lograr un aumento del 10% de la tasa global de fijación de nitrógeno a nivel nacional se justifica plenamente este esfuerzo (Peña-Cabriales, 1989).

En alfalfa existe un gran número de evidencias experimentales dirigidas hacia el mejoramiento de la capacidad de fijación de nitrógeno, demostrando que esta capacidad de fijar nitrógeno es una perspectiva fisiológica para aumentar la producción de alfalfa, además de que este proceso metabólico puede ser modificado por interacciones morfológicas y fisiológicas, siendo afectadas por el medio ambiente y las etapas de desarrollo de la planta (Heichel *et al.*, Heichel 1981;, 1982). El proceso de FBN juega un papel importante en los sistemas agrícolas ya que además de reducir los costos de producción, evitan la contaminación de aguas subterráneas, aumentan la producción de proteína (al incrementar la concentración de proteína de las leguminosas), contribuyen con nitrógeno para cultivos sucesivos y fortalecen la fertilidad de los suelos (Hardarson, 1984b). En la agricultura, específicamente dos ejemplos de fijación biológica están siendo explotados de manera satisfactoria. Éstos son las cianobacterias (algas azul-verdes), importantes en el cultivo del arroz a nivel mundial,

seguidas por las bacterias del género *Rhizobium*, que se encuentran representadas globalmente en zonas templadas, tropicales forestales y suelos cultivables (Jones, 1991).

#### **2.10. Importancia de las leguminosas.**

De los aproximadamente 700 géneros y 20,000 especies, las leguminosas constituyen el grupo de plantas más importantes por su habilidad para fijar N atmosférico en sus raíces noduladas con bacterias de género *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* y debido a su alto valor nutritivo en muchos países son la principal fuente de proteína (de 20 a 40 % la mayoría y de 40 a 60 % unas cuantas) y un componente esencial en la dieta para la alimentación humana y animal. Son cultivadas en un amplio rango climático; tropical, sub-ártico, húmedo, árido y algunas son acuáticas (Bliss y Hardarson, 1993). La familia Leguminosae se divide en tres subfamilias; Caesalpinioideae, Mimosoideae y Papilionideae, la última es la más numerosa de ellas y comprende vegetales de gran importancia económica, como frijol alfalfa, haba, chícharo, garbanzo, jícama etc. La nodulación ha sido encontrada en el 90% de las plantas examinadas de las subfamilias Mimosoideae y Papilionideae y solo un 30% de la Caesalpinioideae (Alexander, 1980; Vincent, 1982). A nivel mundial se ha estimado que las leguminosas fijan 80 millones de toneladas de nitrógeno anualmente (FAO, 1984) y se asume que la fijación biológica de nitrógeno es tres o cuatro veces mayor que la fijación de nitrógeno en forma industrial ( $5 \times 10^7$  ton/ha) (Horst-Marschner, 1993).

#### **2.11. Organismos fijadores de nitrógeno.**

La fijación biológica de nitrógeno (FBN), es una de las reacciones bioquímicas más importantes. En la atmósfera, el N es una molécula muy estable. De algún modo debe perder su estabilidad y dividirse antes de su reducción a amonio. La transformación es efectuada por ciertas bacterias que viven en el suelo como *Azotobacter* y *Clostridium*, así como por ciertas asociaciones de bacterias que viven en los nódulos de las leguminosas. La asociación de dos organismos para beneficio mutuo se denomina

simbiosis. Puesto que ni *Rhizobium* ni la planta hospedera pueden por sí solas fijar N atmosférico, el complejo biológico en el nódulo debe ser considerado como una asociación simbiótica (Ortiz-Villanueva *et al.*, 1984).

La capacidad de fijación biológica de N<sub>2</sub> restringida a los procariotes llamados bacterias y algas verde-azules (Cyanophyceae). Algunas especies de 11 de las 47 familias bacterianas y otras de las especies de las ocho familias Cyanophyceae son capaces de fijar nitrógeno atmosférico (Werner, 1980, citado por Horst-Marschner, 1993). Algunas de éstas, como las algas verde-azules, son de vida libre en ecosistemas terrestres y acuáticos; otras viven en asociación (*Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Spirillum*, etc.). Los microorganismos mas importantes en la fijación viven en simbiosis (*Rhizobium*, *Frankia*, *Anabaena*, etc.) (Horst-Marschner, 1993; Werner, 1992).

## 2.12. La FBN en la Comarca Lagunera.

En la región lagunera se han realizado algunos estudios preliminares para evaluar cepas introducidas de *R. meliloti* en cultivos de alfalfa, indicando que no esta bien establecido el efecto que puedan tener los inoculantes comerciales en estas leguminosas (Quiroga, 1981). Algunas determinaciones llevadas a cabo muestran que el 61% de los productores de alfalfa de la región lagunera utilizan fertilizantes nitrogenados, siendo que esta actividad puede ser innecesaria en aquellos suelos donde se lleve a cabo la fijación biológica de nitrógeno (Rodríguez, 1985). Estudios preliminares en una variedad de suelos de la comarca Lagunera para determinar el efecto de la fertilización nitrogenada, se evaluó la fertilización bajo condiciones de invernadero, valorando la aplicación de N y la inoculación de un producto comercial de *Rhizobium meliloti*. No se observó respuesta a la inoculación comercial y se presentó un incremento del 25 % mediante la aplicación de nitrógeno. De esta forma se menciona que al cuantificar y evaluar la efectividad de inoculantes comerciales en condiciones de invernadero y suelos de la región lagunera indican: i). la inoculación no incrementó el rendimiento en comparación con el testigo, ii). se presentó nudulación en todos los tratamientos, incluyendo los no inoculados, comprobándose con ello la presencia de cepas nativas de *Rhizobium meliloti* en los cultivos de alfalfa. Sin embargo, en el tratamiento inoculado el número de nódulos fue siempre más alto, no obstante esto

no significó un mayor rendimiento, iii). No hubo diferencia estadística entre los tratamientos tanto en rendimiento como en contenido de N, debido probablemente a que el suelo contiene suficientes rizobios efectivos como para abastecer de N a la planta (Castellanos-Ramos y Rodríguez, 1986), esto indica que probablemente las cepas contenidas en el inoculante comercial no son lo suficientemente efectivas por lo que es necesario buscar regionalmente cepas nativas a las que se les deberá estudiar su efectividad y realizar el estudio bajo condiciones de campo. Por lo anterior los autores concluyen que es necesario proseguir investigaciones en los mismos suelos tratando de mejorar de esta forma el rendimiento del cultivo de alfalfa, (Castellanos-Ramos y Rodríguez, 1986).

### **2.13. Factores que afectan la FBN.**

Entre los principales factores que rigen la fijación de nitrógeno se encuentran: el tipo de leguminosa, la efectividad de la bacteria y las condiciones del suelo. Además de otros factores como el contenido de nitrógeno inorgánico en el suelo, el nivel de fósforo, calcio, hierro, cobalto y molibdeno. Los factores climáticos y estacionales que tienen gran influencia en las ganancias de nitrógeno, pero estos afectan más a la fisiología del hospedero que a la simbiosis (Alexander, 1980). Las cantidades de nitrógeno fijado varían con la especie de planta, la cepa usada, las condiciones climáticas, la nutrición de la planta hospedera, la magnitud del día, la temperatura, la intensidad de la luz la concentración de CO<sub>2</sub>, el pH del suelo, la presencia de nitrógeno combinado en el medio de cultivo, fuentes de nitrógeno, fósforo, potasio, calcio y zinc entre otros, así como la salinidad y la sequía han sido reportados como los principales factores que influyen en la cantidad de nitrógeno fijado (Castellanos-Ramos, 1985). Aunque en otros trabajos no se encontraron diferencias significativas en la susceptibilidad a la desecación entre los rizobios de crecimiento rápido y los de crecimiento lento (Peña-Cabriales y Alexander, 1979).

### **2.13.1. Efecto de la desecación del suelo sobre el nódulo y la nodulación.**

Después de la etapa de la sequía, la actividad del nódulo es restaurada mediante el riego. La habilidad de la planta para recuperarse y el tiempo que toma la recuperación está relacionado con la duración de la presión por sequía. En *Trifolium repens* la actividad meristemática del nódulo se inicia después del riego y se desarrollan nuevas zonas de tejido de fijación (Engin y Sprent, 1992). Cuando el estrés por sequía se presenta en un estrato de la raíz, hay transferencia de agua de estratos inferiores a través de la raíz y la actividad del nódulo no es inhibida (Sprent, 1972). Así, en las zonas áridas bajo riego y semiáridas de temporal existen varios factores como alta temperatura y sequía, elevado pH y bajo contenido de materia orgánica. Estos factores pueden ser limitantes para el desarrollo de los procesos de infección, efectividad y persistencia de *Rhizobium* en el suelo (Castellanos-Ramos, 1985).

Un estudio morfológico durante el proceso de infección y nodulación en trébol (*Trifolium subterraneum*) mostró que los nódulos formados a 20°C mostraron buen desarrollo y abundantes bacteroides de 8 a 10 veces más grandes que las células bacterianas, mientras que las plantas sometidas a 30°C mostraron en las células de la raíz, hilos de infección ramificados; bacteroides distorcionados, de tamaño no mayor que las bacterias; degeneración rápida de bacteroides, lo que significa una reducción en el período de actividad del nódulo. Se presume que las cepas de *Rhizobium* capaces de comportarse efectivamente a altas temperaturas retrasan la degeneración del nódulo más que las cepas que no resisten altas temperaturas. Así mismo, experimentos con varias leguminosas en condiciones controladas muestran que la formación de nódulos y la fijación de nitrógeno es considerablemente reducida a niveles de oxígeno menores de 0.21 atmósferas (atm), y que déficit de oxígeno relativamente pequeños afectan más la fijación de nitrógeno que a la respiración. También se ha observado que las respuestas de las plantas abastecidas con N combinado en condiciones restringidas de oxígeno fue mucho menos marcada en plantas abastecidas con N (Lie *et al.*, 1976). Aunado a esto, el oxígeno del suelo es absolutamente necesario para asegurar la respiración de la raíz, del tejido nodular y por ende la suplementación de energía, es imprescindible en el proceso de fijación de nitrógeno. Así mismo, niveles altos de oxígeno también inhiben marcadamente la fijación de nitrógeno sin afectar la respiración, esto se debe al efecto negativo del oxígeno sobre la actividad nitrogenasa. Se reporta que durante la iniciación de la formación del nódulo parece haber más tolerancia a bajas

tensiones de oxígeno que durante las etapas subsecuentes de funcionamiento del nódulo (Pate, 1976). En el intento por resolver estos problemas, en las últimas décadas se han dirigido esfuerzos para entender la manera en que los factores ambientales limitan el éxito de la inoculación; es importante hacer mención que la mayoría de estos estudios se han realizado con organismos alóctonos a los ecosistemas donde se tratan de introducir, y como menciona Alexander (1971), sus posibilidades de éxito son muy reducidas prueba de ello es la falla en la inoculación con *Rhizobium* en la mayoría de los casos, donde las cepas introducidas solo llegan a formar del 5 al 10% de los nódulos presentes en una planta (Hardarson *et al.*, 1982). El efecto de los factores bióticos sobre la respuesta a la nodulación, diversos estudios han permitido conocer que las cepas nativas son un obstáculo para encontrar una respuesta positiva a la nodulación. Resultados obtenidos con cepas de *Rhizobium* (cepas "Elite") en un período de 15 años (1975-1990), demostraron que solo el 11% de los ensayos tuvieron mayor rendimiento comparados con el tratamiento no inoculado, con lo cual es factible la explotación comercial de esta estrategia en tales condiciones (Castellanos-Ramos *et al.*, 1995), lo que apoya la idea de que el incremento de las cepas nativas de *Rhizobium*, disminuye el porcentaje de éxito por las cepas introducidas (Thies *et al.*, 1992). Entre los factores bióticos, se han sugerido la predación por protozoarios (Habte y Alexander, 1992). Aunque otros estudios mencionan la participación de *Bdellovibrio*, bacteriófagos y microorganismos productores de antibióticos que reducen las poblaciones de *Rhizobium* en suelo, estos no parecen ser tan importantes (Keya y Alexander 1975 a,b).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

### **2.13.2. Efecto de la temperatura, humedad, pH y desecación del suelo sobre *Rhizobium* spp.**

La sobrevivencia de *Rhizobium* es mejor a temperaturas bajas, de 50 a 70°C por 5 a 10 minutos, Vincent (1975 y 1977), las reporta como mortales para la bacteria. Además, bajo condiciones de laboratorio la temperatura recomendada para el desarrollo de *Rhizobium* es de 28°C. Para *Rhizobium meliloti* la máxima temperatura a la cual creció una variedad de cepas, estuvo en el rango de 36.5 a 42.5°C (Castellanos-Ramos, 1985).

Estudios realizados en relación al patrón de reducción en la población de varias especies de *Rhizobium* en suelo incubado a 30°C, mostraron que la población de rizobios inicialmente cae en forma abrupta

conforme el suelo se deseca, y esta etapa es seguida por un período de lenta reducción en la viabilidad. También reportan que los residuos vegetales tienen poca influencia en la sobrevivencia de rhizobios durante la desecación del suelo (Peña-Cabriales y Alexander, 1979).

En algunas regiones, el efecto de la temperatura sobre la inoculación y siembra suele ser particularmente crítico, tal es el caso de leguminosas de semilla cuya siembra se hace en seco y suelen pasar de uno a dos días hasta que se aplica el agua. Entre tanto los rhizobios están expuestos a la insolación, alta temperatura y desecación. Se ha demostrado que la nodulación en frijol se redujo considerablemente cuando las raíces fueron expuestas a 30°C durante tres días posteriores a la inoculación y luego retornadas a la temperatura óptima de 25°C (Vincent, 1977). Además, otro problema serio en las zonas áridas es la conservación y manejo del inoculante con un buen nivel de viabilidad, debido a las altas temperaturas que generalmente se presentan. La mejor forma de conservación del inoculante, es a bajas temperaturas; se reporta que *Rhizobium meliloti* a 5°C mantuvo un tiempo de recuperación decimal de 18 semanas, mientras que a 25°C dicho tiempo fue de solo 8 semanas. Las temperaturas de algunas zonas del norte de México pueden llegar a los 40 o 50°C durante el verano, por lo que el transporte, almacenamiento y manejo del inoculante es de particular importancia (Vincent, 1977). El caso de la desecación del suelo ha sido reconocido por mucho tiempo como un factor que determina la sobrevivencia de *Rhizobium* en este medio, especialmente en ausencia de la planta huésped. Se ha observado que cuando un suelo se seca, ocurre una reducción del número de rhizobios de manera rápida al inicio de la pérdida de agua del suelo y después más lenta, coincidiendo también con la lenta pérdida de agua del suelo (Bushby y Marshall, 1977 b).

En suelos inundados a temperaturas de 35°C se ha observado un efecto severo sobre las poblaciones de *Rhizobium*, aunque algunas cepas son más susceptibles que otras (Boonkerd y Weaver, 1982). Cuando este suelo se somete a ciclos de humedecimiento y secado, la población disminuye en cada ciclo, este efecto dañino se ve fuertemente reducido cuando el suelo es rico en materia orgánica/arcillas (Bushby y Marshall, 1977a; Peña-Cabriales y Alexander, 1979).

Uno de los fracasos en el establecimiento de *Rhizobium* se adjudica pH del suelo y en particular a la acidez del mismo. Bryan (1923) de muestra como los suelos ácidos de pH de 4.5 o menos, inoculados con *Rhizobium meliloti* no nodulan alfalfa. Mientras que a esos mismos valores de pH, *Rhizobium*

*japonicum* sí nodula soya (Lowendorf, 1980).

#### **2.14. Caracterización de *Rhizobium*. spp.**

El aislamiento de un microorganismo, se define como el procedimiento, mediante el cual una especie dada de microorganismo presente en una muestra particular se obtiene en cultivo puro, mientras que una cepa, se considera como una célula o población particular o especie (Singleton y Salisbury, 1981). La identificación de cepas es uno de los mayores problemas en experimentos de inoculación en campo cualesquiera de las diferentes especies de *Rhizobium*. En donde aparecen o se cultivan regularmente, existen normalmente algunos rhizobios que las nodulan. Es por lo tanto aconsejable, desarrollar técnicas simples para identificar dichas cepas rhizobiales. Para que tales procedimientos sean útiles, deben ser razonablemente específicos y confiables, pero lo suficientemente simples para ser aplicados a un gran número de cepas. Más aún, no debieran depender de factores que pudieran afectar el comportamiento de las cepas en campo (Beringer, 1978).

En algunos casos, el reconocimiento de cepas a nivel de laboratorio, puede realizarse por características morfológicas. Una determinada cepa tiene una respuesta específica al hospedero tal como: nodulación efectiva o inefectiva, distribución de nódulos en la planta, forma característica de los mismos y su coloración e incluso morfologías coloniales inusuales. Ninguna de esas características, es de aplicación general, aunque pueden ser útiles como criterios secundarios (Pastorini, 1992; Singleton y Tavares, 1986; Vicent, 1975).

La sistemática bacteriana, se puede definir como el estudio científico de la diversidad de organismos y sus interrelaciones, con el objeto final de caracterizar y arreglar a éstos de una manera ordenada. La taxonomía también se usa como sinónimo para sistemática y consiste en la identificación, clasificación y nomenclatura. Al arreglo ordenado de unidades taxonómicas definidas (por ejemplo especie), se denomina clasificación. Una serie de diferentes métodos se emplean para la caracterización de un organismo, por lo tanto, una adecuada colección de datos describe sus propiedades. Estas comprenden: características morfológicas, propiedades fisiológicas, composición química de la pared celular, membranas o contenidos genómicos de ácidos dexosirribonucleicos (ADN), contenidos de bases

nitrogenadas guanina + citocina (G + C), perfiles de proteínas celulares totales, fragmentos de restricción del ADN y datos moleculares de secuencia (Ludwing y Sleifer, 1994).

Los microorganismos fijadores de nitrógeno involucrados en la nodulación influyen en el porcentaje de N fijado por la simbiosis leguminosa-*Rhizobium*. Al respecto, cabe mencionar que la rizosfera de las leguminosas favorecen el crecimiento y el intercambio de material genético de estas bacterias, lo cual abre la posibilidad de una rápida evolución hacia nuevas cepas bacterianas, aumentando por otro lado la dificultad de su estudio y clasificación. Recientemente, empleando técnicas de biología molecular basadas en pruebas de ADN y marcadores genéticos, se ha realizado una reclasificación de las especies de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*. Estos estudios, también ponen de manifiesto que los centros de diversificación de las bacterias simbióticas coinciden con los centros de origen de las leguminosas. Asimismo, las prácticas agrícolas han sido promotoras de la diversificación y selectividad de rhizobia por algunas plantas, lo que ha generado rangos muy estrechos de hospedaje y alta especificidad por determinadas plantas (Martínez-Romero y Caballero-Mellado, 1996).

Normalmente, muy poca o ninguna variación se encuentra dentro de las secuencias de la subunidad 16S del ácido ribonucleico y ribosomal (rRNA) dentro de una especie, pero diferentes especies, generalmente presentan, secuencias diferentes. No todos los genes o macromoléculas son marcadores filogenéticos útiles, y no todas las moléculas marcadoras filogenéticas son útiles para el análisis de grupos de bacterias o al nivel filogenético de interés (Schleifer y Ludwing, 1994). Sin embargo, recientemente se ha considerado, la posibilidad de que en el caso de la rhizobia, por transferencia horizontal, los genes ribosomales están participando de manera tal que generen una amplia diversidad, para éste tipo de especie en particular (Eardly *et al.*, 1995; Ueda *et al.*, 1995). Poco tiempo de haberse descrito las especies de bacterias que nodulan raíces, éstas fueron asignadas a géneros muy diferentes (Young, 1994). Esta situación es inestable y fue cambiada, tanto por el mejoramiento en la caracterización de las bacterias y con los cambios en la idea de la naturaleza de un género bacteriano y que se agrava por la lenta diseminación de la información. De ésta forma, se genera un período estacionario, pero las bacterias que nodulan las raíces, se encuentran actualmente en activa revisión (Martínez-Romero *et al.*, (1991), con la propuesta de una nueva especie de *Rhizobium* que nodula frijol en México, así como el cambio de nombre de la especie definida como *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*

por *Rhizobium etli*, la cual nodula al frijol de América (Segovia *et al.*, 1993). El genoma de *Rhizobium* está formado por un cromosoma y varios plásmidos de peso molecular muy alto. Uno de estos plásmidos es conocido como plásmido simbiótico (pSym) y contiene la mayor parte de los genes específicos que participan en la nodulación y en la fijación de nitrógeno, sin embargo, otros replicones tienen también información genética que participa en la simbiosis. Actualmente, se pretende establecer la estructura del genoma simbiótico de *Rhizobium*, Además de como definir unidades evolutivas que lo integran y el intercambio de información genética en diferentes cepas en la naturaleza (CIFN-UNAM, 1993).

La diversidad biológica, comprende toda las especies de plantas, animales y microorganismos y al ecosistema y procesos ecológicos de los cuales forman parte. Por lo tanto, esta diversidad genética es la suma total de información genética contenida en los genes individuales de plantas, animales y microorganismos que habitan la tierra (McNeely *et al.*, 1990), se habla de una comunidad alfa, cuando se estudia la diversidad de especies dentro de un hábitat o comunidad particular (Lincoln *et al.*, 1995) Una de las formas de demostrar la diversidad genética, es mediante el estudio de las variantes electroforéticas de actividad enzimática (Segovia *et al.*, 1991), sin embargo, no se ha correlacionado con la efectividad de las cepas bajo condiciones de invernadero. De manera general, se ha considerado a *Rhizobium* con una de la más alta diversidad reportada, incluyendo a especies de bacterias bien estudiadas como la *Escherichia coli*. Esta diversidad cromosómica, sugiere en el caso de *Rhizobium* que nodulan frijol común, que es una mezcla polifilética de cepas (Martínez-Romero *et al.*, 1988). Por el contrario, los estudios de *Rhizobium* asociados a *Phaseolus coccineus*, presentaron bajo nivel de intercambio genético, con otras poblaciones del suelo y una baja diversidad (Arredondo-Peter y Escamilla, 1993). Sin embargo, esto se atribuye a que los aislados fueron obtenidos de una estrecha área geográfica del sureste mexicano, resultados similares fueron encontrados en estudios realizados en Inglaterra por Young (1985).

Se considera que en los centros de origen y domesticación de las leguminosas, tendrán los más altos niveles de diversidad genética de la especie de *Rhizobium* correspondiente y dentro de la enorme riqueza genética se podrán encontrar cepas capaces de fijar nitrógeno y nodular en diferentes hábitat con una alta eficiencia (Souza *et al.*, 1994).

La identificación de cepas de *Rhizobium* que ocupan los nódulos, es obligada en estudios que tienen

por objeto evaluar la competitividad y el efecto de las cepas específicas, sobre el desarrollo de las leguminosas (Kremer y Peterson, 1982). Dentro de los métodos más comúnmente empleados se tienen:

i).- resistencia a antibióticos ("inducida e intrínseca), el término "inducir", se refiere a que no es el antibiótico el que convierte a la cepa en resistente, sino que, actúa como presión selectiva que hacen que se expresen los mutantes espontáneos. La resistencia inducida se logra, al someter a las bacterias a diferentes concentraciones de antibióticos hasta obtener mutantes espontáneas con un alto grado de resistencia (Bushby, 1982; KuyKendall, 1987). La resistencia se debe a la aparición de mutaciones espontáneas en condiciones normales, una de cada 116 bacterias mutan y, se convierten en resistentes (Amabille, 1988). Actualmente, se sabe que la resistencia generalmente esta codificada en plásmidos y que éstas moléculas de ADN se pueden transferir a otros microorganismos.

El empleo de cepas de *Rhizobium* resistentes a altas concentraciones de antibióticos en estudios de ecología fueron propuestos por Obaton (197; Kuykendall y Weber, 1978). La mas obvia aplicación de la técnica se da en los estudios de sobrevivencia, colonización y competitividad, que son procesos asociados con la introducción de cepas al suelo (Cooper, 1979). En otro sentido, el marcaje con resistencia a antibióticos es una técnica utilizada con éxito en cepas de *R. meliloti*. Así mismo, recientemente se han observado variaciones en patrones de resistencia a antibióticos que marcaron diferencias entre cepas de *R. phaseoli*. Sin embargo, el empleo de mutantes inducidos plantea algunos problemas (Bushby, 1982), ya que fallan en la formación de nódulos competitivamente con *R. leguminosarum* *bv. trifolii* (Jones y Bromfield, 1978), *R. phaseoli* (Mathieu, 1982), *R. leguminosarum* (Turci *et al.*, 1986) o no se encuentran diferencias en la capacidad de nodular competitivamente entre las mutantes de *R. leguminosarum* *bv. trifolii* o las cepas efectivas en donde se originan (Amarger, 1981).

En otros trabajos, Ramos *et al.* (1987), encontraron que poblaciones rizobiales nativas de parcelas sin encalar, fueron mas tolerantes a condiciones ácidas y menos tolerantes a cloranfenicol, kanamicina que las poblaciones aisladas en parcelas encaladas. Las diferencias en resistencia a antibióticos fue mayor en parcelas sembradas cinco veces con frijol que en aquellas tomadas de parcelas donde nunca se había tenido frijol. De igual forma Scitti *et al.* (1982), reportaron que el encalado incrementa la resistencia de cepas de *Rhizobium* a a estreptomycin. Así mismo, con el encalado en soya, se produjo baja nodulación por las cepas inoculadas (29W y 587), se encontró que eran resistentes a 80-160 µg

de estreptomycin, mientras que las cepas que fueron inefectivas fueron mucho más sensibles a antibióticos. De la misma forma observaciones hechas con cepas de *R. meliloti* en laboratorio mostraron que en general fueron mas resistentes que otras especies de *Rhizobium* (Handarson *et al.*, 1982; Kremer y Peterson, 1982). Esta técnica también se utilizó como un método de identificación de cepas de *Rhizobium* el cual ha tomado mucha atención en la diferenciación de cepas de *Rhizobium meliloti* en nódulos de *Medicago sativa* L., bajo condiciones de laboratorio. Así mismo se usó la susceptibilidad a antibióticos como criterio complementario en agrupaciones de *Rhizobium* del grupo *Lotononis* introducidas en campo. En otros estudios realizados se agruparon varias cepas de *R. leguminosarum* y *R. phaseoli* contra diferentes concentraciones de ocho antibióticos, encontrando un único patrón de resistencia a antibióticos (Kremer y Peterson, 1982).

También se menciona en resultados obtenidos que de 300 aislados de una colección, las cuales fueron divididos en 7 grupos basados en las características intrínsecas de resistencia a antibióticos con 204 y 55 aislados colocados en dos grupos, C y F respectivamente, en donde los aislamientos del grupo C dominaron los nódulos radiculares de 8 a 9 cuadrantes analizados, además, este fue uno de los grupos mas dominantes encontrados en nódulos de plantas crecidas en donde el suelo fue inoculado mediante diluciones en un experimento de prueba (Jenkins *et al.*, 1985).

En caso de *Rhizobium meliloti*, se han diferenciado cepas aisladas de nódulos bajo condiciones de laboratorio, observándose que los niveles de resistencia a los antibióticos (Kanamicina y estreptomycin), fueron iguales (Márquez-Pinto *et al.*, 1974). Por otra parte, Josey *et al.* (1979), seleccionaron varias cepas de *Rhizobium leguminosarum* y *Rhizobium phaseoli* evaluadas para la tolerancia a diferentes concentraciones de ocho antibióticos, encontrándose patrones únicos para cada cepa. Cortez-Morales (1987), determinó los patrones de resistencia con 14 antibióticos de 13 cepas de *Rhizobium leguminosarum*. Encontró diferentes patrones de resistencia y con excepción de la cepa C-2, el resto de las cepas resistentes a penicilina, dicloxaciclina y eritromicina.

En otros estudios, se empleó la susceptibilidad a antibióticos para medir la resistencia de 49 cepas de *R. meliloti* a 9 antibióticos. Las cepas fueron clasificadas en 12 grupos. El grupo mas grande contenía el 74% de las cepas, pero 9 cepas (2 muy efectivas, 4 efectivas y 3 inefectivas) mostraron

un único patrón de resistencia formando 9 grupos distintos. Las cepas de *R. meliloti*, en general, mostraron una alta resistencia a 9 antibióticos probados. Así mismo, se determinó en condiciones de laboratorio, que cepas de *R. meliloti* pueden ser identificadas mediante susceptibilidad a antibióticos descritos para bacterias de importancia clínica. (Anton *et al.*, 1982). Así mismo se determinó la cantidad y diversidad de poblaciones rizobiales en cultivos de cowpea con patrones de resistencia-susceptibilidad a antibióticos, se obtuvieron 13 patrones encontrados en 128 aislamientos. El patrón mas común (32 %) fue resistente a todos los antibióticos probados. Cada población analizada fue diferente expresando de 6 a 8 patrones de resistencia y solo una población fue relativamente homogénea, 68 % de estos miembros mostraron un solo patrón, demostrando una correlación entre la resistencia y el tipo de colonia por un amplio grupo de rizobios, siendo este método, práctico, rápido y confiable para la identificación de grupos dentro de poblaciones de rizobios. Otros métodos usados son: Serológicos (aglutinación, inmunodifusión, inmunofluorescencia y ELISA), patrones de proteínas totales, perfiles de plásmidos y métodos moleculares REP y ERIC, PCR así como MLEE, etc., (Sinclair *et al.*, (1980).

### **2.15. Métodos para medir la FBN.**

La medición de la fijación de nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) en plantas, es un paso importante en los esfuerzos por incrementar la contribución de  $N_2$  en la nutrición vegetal y la fertilidad del suelo. Aunque hay varias metodologías para medir fijación de nitrógeno en plantas (tamaño, color, peso seco y número de nódulos en la planta; técnica de reducción de acetileno (ARA); materia seca; determinación de nitrógeno total; solutos en el xilema etc.), ninguna de ellas mide el nitrógeno fijado con absoluta exactitud. Las ventajas y las limitaciones de cada método han sido descritas y discutidas en varias revisiones (Bremner, 1977; Burris, 1974; Danso, 1985; Hardy *et al.*, 1992; y Knowles, 1981).

## 2.16. Uso de técnicas nucleares.

Casi todos los elementos de importancia en la investigación biológica tienen al menos dos isótopos estables, de los cuales el isótopo mas pesado (el que tiene átomos con un número de masa mayor) se presenta de manera natural en pequeñas cantidades. Los isótopos pesados suelen utilizarse como trazadores en los sistemas biológicos.

Tabla 11. Isótopos estables utilizados como trazadores en la investigación biológica

ELEMENTO	ISÓTOPOS ESTABLES	
	Pesados	Ligeros
H	$^2\text{D}$ (0.0156 %)	$^1\text{H}$ (99.9844 %)
N	$^{15}\text{N}$ (0.366 %)	$^{14}\text{N}$ 99.634 %
C	$^{13}\text{C}$ (1.108 %)	$^{12}\text{C}$ (98.892 %)
S	$^{36}\text{S}$ 0.02 %	$^{32}\text{S}$ (95.02 %)
	$^{34}\text{S}$ (4.22 %)	
	$^{33}\text{S}$ (0.75 %)	
O	$^{18}\text{O}$ (0.204 %)	$^{16}\text{O}$ (99.759 %)
	$^{17}\text{O}$ (0.037 %)	

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

### 2.16.1. Isótopos del nitrógeno.

Se conocen diversos isótopos radiactivos y estables del nitrógeno, con números de masa que fluctúan entre los 12 y 17. El isótopo radiactivo del N de período de vida media más largo es el  $^{13}\text{N}$ , con un período de semidesintegración muy corto de solo 10.05 minutos. Esto limita considerablemente su aplicación en la investigación agrícola por su corta duración, el N tiene dos isótopos estables, a saber,  $^{14}\text{N}$  y  $^{15}\text{N}$ .

Tabla 12. Características de los isótopos del nitrógeno

Número de masa	Abundancia natural %	Período de Semidesintegración
12	-	0.0126 s
13	-	10.05 m
14	99.634	-
15	0.366	-
16	-	7.36 s
17	-	4.14 s

La composición isotópica del  $^{15}\text{N}$  en la atmósfera es de aproximadamente 0.366 % del N total, en tanto que la de  $^{14}\text{N}$  es de alrededor de 99.634 %. Para cada átomo de  $^{15}\text{N}$  en la atmósfera existen  $272 \pm 0.3$  átomos de  $^{14}\text{N}$ . La relación mas o menos constante de  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$  en la atmósfera o de sustancias naturales permite que materiales de N artificialmente enriquecidos o empobrecidos con  $^{15}\text{N}$  se utilicen como trazadores en muchos estudios. Debido a que el  $^{14}\text{N}$  y el  $^{15}\text{N}$  no son radiactivos, el uso de las relaciones  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$  en la investigación no entraña riesgos, ni peligros para la salud y su naturaleza estable permite realizar experimentos a largo plazo (Axmann y Zapata, 1990).

El uso inicial del isótopo de  $^{15}\text{N}$  para estudiar la FBN fue aplicado por Burris y Miller (1941). En este sentido, ante los métodos actualmente disponibles, las indicaciones son de que las técnicas de enriquecimiento del suelo con  $^{15}\text{N}$  son las mas confiables para cuantificar el nitrógeno fijado en cultivos desarrollados en condiciones de campo (Duhoux y Dommergues, 1985; Duque *et al.*, 1985; Hardarson *et al.*, 1984b; Rennie, 1982; 1984; Vose *et al.*, 1982; West y Wedin, 1985). Tales técnicas con  $^{15}\text{N}$  son particularmente útiles ya que pueden en una sola cosecha, medir las cantidades totales de nitrógeno asimiladas por las plantas crecidas en condiciones de invernadero y campo, además, de determinar la contribución de nitrógeno del suelo o de fuentes fertilizantes (Danso, 1985; Fried *et al.*, 1983; Vose y Victoria, 1986). Los métodos basados en los isótopos y las radiaciones han sido muy útiles en las investigaciones agrícolas. Por lo tanto, estas técnicas son de gran valía en los programas que tienen como principal objetivo el incrementar el  $\text{N}_2$  mas que el nitrógeno del suelo o del fertilizante aportado para obtener altos rendimientos. Consecuentemente, la literatura revela un incremento en el

uso de técnicas isotópicas con  $^{15}\text{N}$  para medir el nitrógeno fijado en varios cultivos y sistemas agrícolas (Chalk, 1985; Weaer, 1986). De la misma forma, para asegurar un manejo apropiado y aprovechar plenamente los beneficios de esta asociación planta-microorganismo es necesario estimar la cantidad de nitrógeno fijado bajo diferentes condiciones de campo (Bergensen, 1980; Hardarson, 1987; Hardarson, 1990; Peoples *et al.*, 1989).

### 2.16.2. Método de dilución isotópica (DI).

El uso de fertilizantes o sustratos enriquecidos con  $^{15}\text{N}$  involucra el crecimiento de plantas fijadoras de  $\text{N}_2$  y plantas de referencia no fijadoras en suelos fertilizados con fertilizantes orgánicos o inorgánicos enriquecidos con  $^{15}\text{N}$ . El método está basado en la dilución diferencial en la planta del fertilizante marcado con  $^{15}\text{N}$  por el nitrógeno del suelo y el fijado (Fried y Middelboe, 1977; McAuliffe *et al.*, 1958). El uso de fertilizantes marcados con  $^{15}\text{N}$  provee una medida integrada de la cantidad de nitrógeno fijado acumulado por el cultivo durante el ciclo de crecimiento. Hay dos variaciones principales de este método isotópico *i. e.*, el método de dilución isotópica y el método del valor "A". El método de dilución isotópica, tanto las plantas fijadoras como las plantas de referencia, son cultivadas en un suelo al cual se ha aplicado la misma cantidad de fertilizante enriquecido con  $^{15}\text{N}$ . En la ausencia de cualquier otro aporte de nitrógeno que el del suelo y el fertilizante marcado con  $^{15}\text{N}$ , ambas plantas deben poseer la misma relación de  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ , dado que están absorbiendo N de composición  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  similar, pero no necesariamente la misma cantidad total de N. Sin embargo, en la presencia de N, la planta fijadora presenta una relación  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  aún mas baja debido a la incorporación de nitrógeno del aire no marcado, mientras que esto no ocurre en la planta de referencia. El cálculo del % N derivado de la atmósfera (% N<sub>dda</sub>) se puede efectuar mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{N}_{\text{dda}} = \frac{(1 - \% \text{N}_{\text{ddf}_f})}{\% \text{N}_{\text{ddf}_{\text{NF}}}} \times 100 \quad (1)$$

donde  $\% \text{N}_{\text{ddf}_f}$  y  $\% \text{N}_{\text{ddf}_{\text{NF}}}$  son los porcentajes de N derivado del fertilizante por las plantas fijadoras (leguminosa) y no fijadoras (gramínea) respectivamente.

La ecuación (1) está derivada de las siguientes (Fried y Middelboe, 1977 y Harbaron (1990).

$$\% \text{Nddf}_{\text{NF}} + \% \text{Ndds}_{\text{NF}} = 100 \quad (2)$$

$$\% \text{Nddf}_{\text{F}} + \% \text{Ndds}_{\text{F}} + \% \text{Ndda} = 100 \quad (3)$$

$$\% \text{Nddf}_{\text{NF}} = \% \text{Nddf}_{\text{F}} \quad (4)$$

$$\% \text{Ndds}_{\text{NF}} = \% \text{Ndds}_{\text{F}} \quad (5)$$

donde:  $\% \text{Ndds}_{\text{F}}$  y  $\% \text{Ndds}_{\text{NF}}$  son los porcentajes de N derivado del suelo en los cultivos fijador y no fijador, respectivamente. La ecuación (4) representa la única asunción hecha en el método de dilución isotópica  $^{15}\text{N}$ , *i. e.*, que ambos cultivos fijador y no fijador toman el N del suelo y fertilizante en la misma proporción. Para que esto sea verdad, los cultivos fijador y no fijador deben coincidir en lo siguiente, *i. e.*, (a) ya sea, la distribución del fertilizante es homogénea con la profundidad o la leguminosa y los cultivos de referencia deben tener un sistema radical y perfiles de absorción de nutrientes similares a través del tiempo y (b) el enriquecimiento del sustrato deberá mantenerse constante con el tiempo o los cultivos de leguminosa y de referencia presentar modelos similares de absorción de N (Witty, 1984).

### 2.16.3. Método del valor A (VA).

En el método del valor A se aplican diferentes cantidades de fertilizante nitrogenado a las plantas fijadoras y no fijadoras. Es necesario aplicar una alta dosis al cultivo de referencia, no fijador, para promover su crecimiento adecuado, especialmente en suelos con baja fertilidad. Sin embargo, al incrementar los niveles de nitrógeno inorgánico se puede abatir la fijación de nitrógeno. Por esta razón resulta impráctico aplicar una dosis razonable de fertilizante marcado con  $^{15}\text{N}$  (14-80 kg N/ha) al cultivo de referencia, mientras que el cultivo fijador recibe una baja cantidad (5-20 kg N/ha) (Fried y Broeshart, 1975). El porciento de Ndda se puede calcular empleando la siguiente ecuación:

$$\% \text{Ndda} = \frac{(1 - \% \text{Nddf}_{\text{F}})}{n \% \text{Nddf}_{\text{NF}}} + \% \text{Nddf}_{\text{F}} (1/n - 1)$$

donde: n es el factor relativo de las cantidades de fertilizante N aplicado, *i. e.*, n = cantidad de fertilizante nitrogenado aplicado al cultivo F (fijador) dividido por la cantidad aplicada al cultivo NF (no fijador) (Harparon *et al.*, 1991).

#### **2.16.4. Método de la abundancia natural (AN).**

Como resultado de los efectos discriminatorios entre isótopos que ocurrieron durante la formación del suelo, muchos suelos presentan una abundancia de  $^{15}\text{N}$  ligeramente superior a la atmósfera. Debido a esta diferencia en abundancia de  $^{15}\text{N}$  entre el N del suelo y el atmosférico, se ha establecido que las plantas fijadoras de nitrógeno tienen un enriquecimiento más bajo de  $^{15}\text{N}$  que las no fijadoras; por lo tanto esto ha sido usado para medir la fijación biológica de nitrógeno (Amarger *et al.*, 1979; Kohl *et al.*, 1980).

Las técnicas de enriquecimiento del suelo con  $^{15}\text{N}$  son las más confiables para cuantificar el nitrógeno fijado en cultivos desarrollados bajo condiciones de campo (Duque *et al.*, 1985; Danso *et al.*, 1993).

Los compuestos nitrogenados que se usan frecuentemente como fertilizantes enriquecidos con  $^{15}\text{N}$  son: Sulfato de amonio (21.20 % de N), Urea (46.64 % N), Cloruro de amonio (26.19 % N), Nitrato de amonio (35.00 % N), Nitrato de sodio (16.48 % N), Nitrato de potasio (13.85 % N) (Axmann y Zapata, 1990; Zapata, 1990b). La cantidad de N aplicada depende tanto de la tasa de aplicación de N así como del enriquecimiento (% de átomos de  $^{15}\text{N}$  en exeso) del fertilizante marcado con  $^{15}\text{N}$  que se haya empleado. La cantidad la determinan diversos factores, tales como: el propósito de estudio, tipo de cultivo, duración del experimento y equipo para determinar la relación isotópica. En estudios sobre aprovechamiento de fertilizantes nitrogenados, los cultivos anuales requieren de 1 a 2 kg de  $^{15}\text{N ha}^{-1}$ ; en estudios sobre el movimiento descendente del fertilizante, pérdidas por volatilización, lixiviación, escorrentía y otros requieren por lo menos 50 kg de  $^{15}\text{N ha}^{-1}$  (Zapata, 1990b).

En estudios sobre FBN, a fin de que se pueda efectuar la detección, es suficiente aplicar la cantidad de 0.1 g de  $^{15}\text{N m}^{-2}$ , es decir, 20 kg de N  $ha^{-1}$  de 1% de átomo en exeso de  $^{15}\text{N}$  (Hardarson y Danso, 1990).

#### **2. 17. Cultivos de referencia.**

Para una cuantificación exacta de  $\text{N}_2$  fijado, se requiere siempre de un cultivo de referencia satisfactorio, aún cuando los errores inducidos por la desigualdad entre el cultivo de referencia y la planta fijadora hayan sido frecuentemente sobre valorados. Se han calculado valores por la ecuación de la técnica de dilución isotópica (Fried y Middleboe, 1977; McAuliffe *et al.*, 1958) usando valores

hipotéticos de enriquecimiento de  $^{15}\text{N}$  más o menos un 10% de error en los enriquecimientos de  $^{15}\text{N}$  absorbido por cultivos de referencia ficticios y un solo valor de enriquecimiento de  $^{15}\text{N}$  ( $0.2 + 0.02\%$   $^{15}\text{N}$  a. e.) en el cultivo fijador (Hardarson *et al.*, 1988). Los errores son altos para bajas tasas de fijación, por ejemplo: por debajo del 30% N<sub>dda</sub>, se vuelven más pequeños al incrementarse la fijación, y por arriba del 80% los errores son tan pequeños que éstos no importan estadísticamente. Por lo tanto, la precisión de la metodología se mejora grandemente en cuanto aumenta la fijación de  $\text{N}_2$ . Reichardt *et al.* (1987), han proporcionado evidencias experimentales para apoyar ésta hipótesis. Por ello, a diferencia de aquellas especies de leguminosas y variedades en las cuales la fijación de  $\text{N}_2$  ha mostrado ser consistentemente alta, tal como en muchas leguminosas forrajeras en las cuales el %N<sub>dda</sub> está cercano al 90% ó más (Haystead y Lowe, 1977; Henzell *et al.*, 1968; Ledgard *et al.*, 1985; Vallis *et al.*, 1977), ó en donde R es más o menos estable con el tiempo (Butler, 1987; Poth *et al.*, 1986), esta falta de sincronización entre el cultivo de referencia y el cultivo fijador pudiera normalmente dar como resultado pequeñas desviaciones de los valores verdaderos del  $\text{N}_2$  fijado (Hardarson *et al.*, 1988). En situaciones donde la fijación de  $\text{N}_2$  es baja, por ejemplo, cuando las plantas han sido cosechadas tempranamente (antes de que se haya fijado mucho  $\text{N}_2$ ), y también la disminución de R es rápida, la selección de un cultivo de referencia bien sincronizado es más crítica para la cuantificación de la fijación de  $\text{N}_2$  (Danso *et al.*, 1993).

## MATERIAL Y MÉTODOS

Con la finalidad de conocer el estado actual de la fijación de nitrógeno en los cultivos de alfalfa de la Región Lagunera (en el Estado de Durango), se estableció un experimento de campo para cuantificar el aporte de N por este proceso simbiótico bajo las condiciones naturales del cultivo.

El experimento consistió en medir la capacidad de fijación de nitrógeno en los cultivos de alfalfa y tener un conocimiento más cercano del comportamiento de las cepas de *Rhizobium meliloti* presentes en estos cultivos utilizando diferentes variables.

### 3.1. Prácticas de campo.

El experimento de campo se estableció en el periodo abril de 1997 a julio de 1998 en el campo experimental de la Facultad de Agronomía y Zootecnia de la Universidad Juárez del Estado de Durango (FAZ-UJED) ubicado en el ejido Venecia, Municipio de Gómez Palacio, Durango. Previo al experimento se realizó un análisis fisicoquímico del suelo para tener una referencia del mismo. Al momento de la siembra se aplicó una fertilización inicial del área experimental con el producto comercial fosfato diamónico (DAP), con la relación nutrimental 10-50-00 (nitrógeno, fósforo y potasio, respectivamente). Una vez fertilizado se procedió a realizar la siembra al voleo con diferentes dosis de aplicación de semilla dependiendo del cultivo en cuestión. El manejo de los cultivos y los riegos se realizaron de acuerdo con las recomendaciones para la región (Salazar-Sosa 1997).

### 3.2. Material biológico.

Se utilizaron dos variedades de alfalfa (*Medicago sativa* L.), la SW14 comúnmente sembrada en la Región Lagunera y la variedad San Miguelito (SM), principal cultivar de alfalfa en el Estado de Guanajuato. En el empleo de técnicas isotópicas para medir la fijación biológica de nitrógeno, se

recomienda utilizar plantas que no realicen ésta actividad, o sea, que funcionen como cultivos de referencia (Hardarson, 1985). En este trabajo se utilizaron como cultivos referencia sorgo forrajero (*Sorghum bicolor*) var High-Energy, maíz forrajero (*Zea mays*) var San Lorenzo, donadas por la FAZ-UJED; también se sembró avena forrajera (*Avena sativa*) var Cuauhtémoc, triticale (*Xtritico secale*), zacate ballico (*Lolium perenne*) var Wulf, además se utilizó zacate Johnson (*Sorghum halepense*), este último es una gramínea que crece como maleza en la región y que funciona como alimento para el ganado, la semilla de avena forrajera, alfalfa variedad San Miguelito y el zacate ballico fueron donadas por el laboratorio de Microbiología Ambiental del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato (CINVESTAV-IPN-UI). Tanto la variedad de alfalfa SW14 como el inoculante Nitragin por ser los que mas se utilizan en la región fueron obtenidos en un centro de agroquímicos. También se utilizó una cepa de colección de *R. meliloti* (cepa "Elite") elegida por su alta efectividad en estudios anteriores realizados bajo condiciones naturales en el Bajío Guanajuatense y donada por el Laboratorio de Microbiología Ambiental del CIVESTAV-IPN, Unidad Irapuato.

### **3. 3. Análisis físicoquímico del suelo.**

Las muestras se molieron ligeramente con un rodillo de madera y se tamizaron en una malla N° 20 de acero inoxidable. La textura, se determinó mediante el método del hidrómetro de Bouyoucos; el pH del suelo se determinó con un potenciómetro digital Coleman 500, el contenido de nitrógeno total por el método de Kjeldahl y la materia orgánica fue analizada por el método de Walkley Black.

### **3.4. Diseño experimental.**

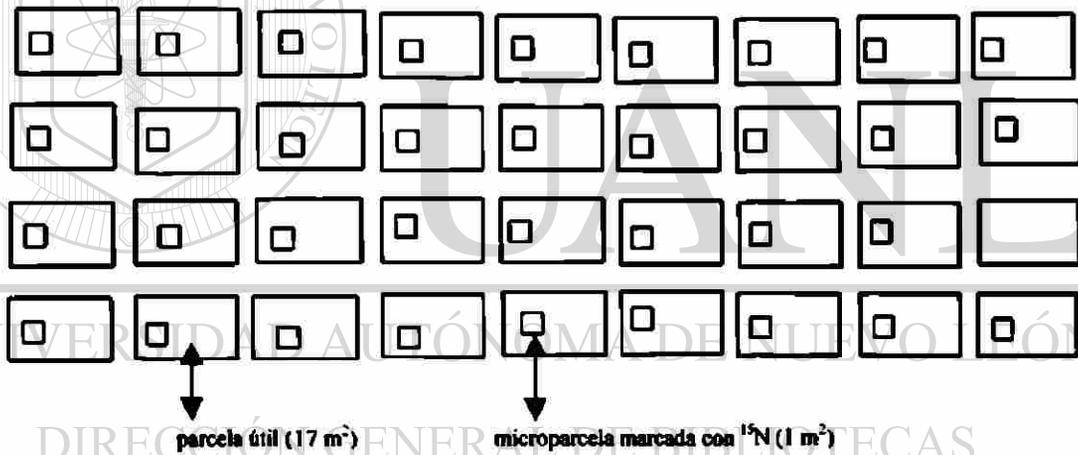
El área experimental fue de 648 m<sup>2</sup>, en un arreglo de 36 parcelas con dimensiones de 3 m de ancho por 6 m de largo cada una (8m<sup>2</sup>/parcela), la distribución del experimento se realizó mediante bloques al azar con cuatro repeticiones; se utilizaron dos variedades de alfalfa SM y SW (cuadro 2).

**Cuadro 2. Distribución de los tratamientos en campo para dos variedades de alfalfa y los cultivos de referencia (sorgo, avena, maíz triticale, zacate ballico y Zacate Johnson).**

ALFALFA	NÚMERO DE SIEMBRAS DE LAS GRAMÍNEAS							REPETICIONES			
	1	2	3	4	5	6	7	I	II	III	IV
SW14 <sup>A</sup>	Sorgo*	Sorgo*	Triticale	Triticale	-	Sorgo	Sorgo	9	3	9	8
SW14 <sup>B</sup>	Ballico*	Ballico*	Ballico	Ballico	-	Maíz	Maíz	3	9	8	5
SW14 <sup>C</sup>	Maíz*	Maíz*	Avena	Avena	-			6	2	4	7
SM <sup>A</sup>								1	7	1	2
SM <sup>B</sup>								2	1	7	3
SM <sup>C</sup>								8	4	2	4
								4	8	6	6
								5	6	3	1
								7	5	5	9

\* incluye cosecha de Z. Johnson a = sin inocular b = inocular con Nitragin c = inocular con cepas Elite

**Figura 1. Arreglo experimental realizado a nivel de campo en bloques al azar**



### 3.5. Tratamientos e inoculación.

Se aplicaron tres tratamientos para las 2 variedades de alfalfa: a) el inoculante comercial (Nitragin), usado comunmente en la región, b) la cepa de colección "Elite" de *R. meliloti* y c) testigo sin inocular. En los cultivos de referencia únicamente se aplicó la fertilización nitrogenada. Para la inoculación en

los cultivos de alfalfa, en el caso de Nitragín, la semilla fue previamente impregnada con un adherente (sacarosa), posteriormente se le aplicó el inoculante. Tanto la semilla como el inoculante se agitaron fuertemente hasta que quedó completamente mezclado con la semilla (semilla peletizada). La cepa “Elite” de *Rhizobium meliloti* se aplicó directamente a la semilla momentos antes de la siembra, teniendo una densidad celular de  $1.5 \times 10^8$  células /mL.

### 3.6. Establecimiento de los cultivos.

Para el diseño y establecimiento de los cultivos, después de la siembra de alfalfa se realizaron seis cortes y seis siembras para las diferentes gramíneas establecidas, tabla 13, además de dos aplicaciones de  $^{15}\text{N}$ .

Tabla 13. Estudio de leguminosas y gramíneas con aplicación de  $^{15}\text{N}$ .

APLICACIONES DE $^{15}\text{N}$	Cosechas de alfalfa	Cosecha de gramíneas
Primera aplicación	1	Sorgo, Maíz, Ballico y Johnson
	2	Sorgo, Maíz, Ballico y Johnson
	3	Triticale Ballico y Avena
Segunda aplicación	4	Triticale, Ballico y Avena
	5	Sorgo y Maíz
	6	Sorgo y Maíz

### 3.7. Aplicación de $^{15}\text{N}$

Una vez que el cultivo de alfalfa quedó plenamente establecido se realizó el primer corte en las 24 parcelas de alfalfa, se aplicó el fertilizante nitrogenado marcado con  $^{15}\text{N}$  en forma de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  en solución al 10.075 % de  $^{15}\text{N}$  átomos en exceso (a. e.), al igual que en los cultivos de referencia con 15-20 días después de la siembra (dds), para esto, se delimitaron microparcelas isotópicas en una

superficie de 1.0 m<sup>2</sup> de cultivo en cada una de estas parcelas. La dosis de aplicación del fertilizante marcado [(<sup>15</sup>NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] a las microparcelas fue de 50 kg N/ha para las gramíneas (cultivos de referencia), para la alfalfa se aplicaron 10 kg N/ha. Estas mismas dosis se usaron en los 2 ciclos de aplicación de <sup>15</sup>N (150 y 270 dds) en cada una de las parcelas.

### **3.8. Colecta de nódulos en el campo.**

Para el muestreo de cada una de las plantas de alfalfa, a estas se extrajeron utilizando palas rectas y bolsas de polietileno, previamente etiquetadas e inmediatamente transportadas del campo al laboratorio y almacenadas en cuarto frío a 4°C, después fueron lavadas sus raíces cuidadosamente hasta que quedaron libres de suelo y extendiéndola sobre una mesa de laboratorio se obtuvieron los nódulos. Se realizaron dos colectas de nódulos en 2 etapas de desarrollo del cultivo de alfalfa. La primera fue a los 50 dds, se tomaron tres muestras de cada parcela; y se les contaron los nódulos a 3 plantas de las cuales se obtuvo el promedio de nódulos/planta. El segundo muestreo se realizó a los 120 dds, llevándose a cabo el mismo procedimiento anterior. Posteriormente se realizaron los respectivos aislamientos según Vincent (1970 y 1977); Peña-Cabriales *et al.* (1989).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

### **3.9. Medios de cultivo.**

Los medios utilizados para los aislamientos fueron: extracto de levadura manitol (ELM) el cual contiene los siguientes componentes: 10 g de manitol, 0.5 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2 g de MgSO<sub>4</sub>, 0.1 g de NaCl, 1.0 g de extracto de levadura. El medio ELM con agar (ELMA), mantuvo los mismos componentes que el medio ELM, además de 18 g de agar/L. El medio extracto de levadura peptona (PY), el cual se compone de 3.0 g de extracto de levadura, 5.0 g de peptona de caseína, 10 mL de CaCl<sub>2</sub> (10.47 g/100 mL) por litro de medio líquido, si se desea sólido, se le agrega 18 gr de agar por cada litro a preparar. En todos los casos se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos.

### **3.10. Aislamiento, purificación y conservación de los aislados.**

Se seleccionaron los nódulos de apariencia efectiva (de color rojo o rosa) obtenidos a partir de la separación cuidadosa de las raíces de las plantas. Todos los nódulos fueron esterilizados superficialmente con etanol al 95 % v/v y cloruro de mercurio al 0.1 % acidificado (Somasegaran y Hoben, 1985; Vincent, 1970, 1975). Cada nódulo se trituró sembrándose sobre la superficie de placas con medio ELMA y PY, incubando a 28°C por 48 h. (Márquez-Pinto *et al.*, 1974; Peña-Cabriales *et al.*, 1989; Vincent, 1970, 1975). La purificación se llevó a cabo mediante resiembras subsecuentes hasta que los aislados presentaron uniformidad en las características de crecimiento y morfología colonial. Después de ser purificados cada aislamiento fue crecido a 28° C por 48 h en tubos con tapón de rosca de 16x150 mm con medio ELMA y PY inclinado, después de esto se conservaron en refrigeración a 4° C para posteriores estudios (Márquez-Pinto *et al.*, 1974; Peña-Cabriales *et al.*, 1989; Vincent, 1970, 1975).

### **3.11. Sensibilidad y resistencia a los antibióticos.**

Cada aislado se activó durante 24 h en 2.5 mL de medio líquido ELM tomándose una alícuota de 0.5 mL, extendiéndose sobre la superficie de una placa con medio ELMA, una vez extendido el inóculo se colocaron cada uno de los siguientes antibióticos (multidiscos), Amikacina (30 mg), Ampicilina (10 mg), Cefalotina (30 mg), Ceftriaxona (30 mg), Cloranfenicol (30 mg) Dicloxacilina (1.0 mg), Enoxacina (10 mg), Eritromicina (15 mg), Gentamicina (10 mg), Netilmicina (30 mg), Penicilina (10 U), Trimetropin-Sulfametoxazol (25 mg), marca Sanofi Diagnostics Pasteur específicos para microorganismos Gramnegativos. Todos los aislados a los que se les probó la sensibilidad y resistencia a los antibióticos se incubaron a 28°C por 24-72 h, cada una de las pruebas fue realizada por triplicado, al término de las cuales se realizó el registro correspondiente ordenándose en grupos de acuerdo a la resistencia y/o sensibilidad a los antibióticos que fueron expuestos (Anton *et al.*, 1982; Hagedorn, 1979; Kremer *et al.*, 1982; Sinclair *et al.*, 1980).

### 3.12. Determinación de la movilidad electroforética de enzimas (MLEE).

El corrimiento electroforético de enzimas (MLEE), distingue entre diferentes alelos en un locus particular sobre la movilidad de proteínas en un campo eléctrico. De cada aislamiento se tomaron 40 mL de cultivo bacteriano crecidos en medio PY durante 24 h. Las células fueron cosechadas por centrifugación a 10 000 rpm durante 7 minutos a 4 °C, el paquete celular fué suspendido en 40 ml de lisosima en  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  mM, posteriormente fueron incubadas 10 minutos. Las muestras fueron congeladas a  $-70$  °C por 15 minutos y descongelados, este último paso fue repetido varias veces hasta obtener los lisados, los cuales fueron almacenados a  $-70$  °C. El procedimiento utilizado para la electroforésis en geles de almidón y tinción selectiva de enzimas, aplicada al estudio de genética de poblaciones y sistemática bacteriana se realizó según lo describe Selander *et al.*, 1986. Se probaron 12 enzimas en la construcción del dendograma, estos son: malato deshidrogenasa (MDH), alcohol deshidrogenasa (ADH), isocitrato deshidrogenasa (IDH), glucosa 6-P deshidrogenasa (G6P), fosfoglucoisomerasa (PGI), fosfoglucomutasa (PGM), indofenol oxidasa (IPO), aconitasa (ACO), esterasa (EST), leucina deshidrogenasa (LED), lisina deshidrogenasa (LYD), enzima málica (EM). El sistema de Buffer usado fue tris-citrato (pH 8.0). Se determinó la movilidad electroforética de enzimas para cada aislado. El nivel de diversidad genética fue calculada para cada enzima (Selander *et al.*, 1986).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

### 3.13 Cosecha y preparación de las muestras vegetales.

Una vez realizada la cosecha en todas las parcelas y microparcels con los diferentes tratamientos, se tomaron muestras de cada una y se procesaron para hacer evaluaciones de N y medir de esta forma la FBN además de otros estudios. Como el objetivo principal de las microparcels marcadas con  $^{15}\text{N}$  es obtener una estimación precisa de la FBN. En muchas ocasiones, se hacen varias cosechas durante el período que abarca el experimento para estudiar la cinética de absorción del nutrimento (Zapata, 1990a). En este experimento, cada una de las microparcels isotópicas ( $1.0 \text{ m}^2/\text{microparcels}$ ) se realizaron los cortes en la etapa de madurez fisiológica de las plantas. Estas se cortaron a nivel de

suelo, se colocaron en bolsas de polietileno debidamente etiquetadas por tratamiento y número de repetición. En cada muestreo de los cultivos de alfalfa también se cosechó la parcela útil (17 m<sup>2</sup>) para estimar el rendimiento. Para conocer la dinámica de desarrollo de los cultivos de referencia en relación con las leguminosas realizaron muestreos en las parcelas no marcadas.

Las muestras de las plantas cosechadas de las microparcels isotópicas se transportaron del campo al laboratorio, el material fresco de todas las muestras isotópicas se cortaron en trozos de 5 cm. Después el material picado se mezcló bien colocándolo sobre la superficie de una mesa (1.0 m<sup>2</sup> de área), se removió sobre sí mismo en todas direcciones. Cuando cada muestra ya estuvo bien mezclada se dividió en cuatro partes, se separaron dos partes opuestas, se dividieron de nueva cuenta en cuatro partes, tomando otra vez los cuartos opuestos. Este procedimiento se repitió con las 2 submuestras que quedaron hasta que el tamaño de la muestra se haya reducido de 300 a 400 g de peso fresco. Todas las muestras se colocaron en bolsas de papel, se registraron todos los pesos de las submuestras, fueron debidamente etiquetadas y puestas a secar en un horno de circulación forzada a 70 °C (marca Heraus UT 200), hasta que estuvieron completamente secas, alcanzando un peso constante. Se les tomó el peso seco a cada una de ellas. Las muestras ya secas fueron molidas finamente en un micromolino (marca Thomas Wiley) (Axmann *et al.*, 1990),

#### 3.14. Variables en estudio.

En las parcelas no marcadas con <sup>15</sup>N se midieron las siguientes variables: Rendimiento de materia seca y fresca. en la planta. Las microparcels marcadas con <sup>15</sup>N se consideraron las siguientes variables: Rendimiento de materia seca, porcentaje de nitrógeno total (% N total), porcentaje de átomos de <sup>15</sup>N en exceso (%<sup>15</sup>N a. e.), porcentaje de nitrógeno derivado del fertilizante (%Nddf), porcentaje de nitrógeno derivado del suelo (%Ndds), porcentaje de nitrógeno derivado de la atmósfera (%Ndda) y nitrógeno fijado (Hardarson y Danso, 1990).

### 3.14.1. Nitrógeno total.

La determinación de N total de las muestras se realizó por el método de Kjeldahl en el cual se basa en el principio de la digestión para convertir el nitrógeno orgánico e inorgánico en sales de amonio. La digestión se realizó con ácido sulfúrico concentrado (5 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) mas catalizadores (1.5 g de mezcla reactiva de Selenio), como se muestra en la siguiente ecuación:



Para que la digestión se lleve a cabo se requiere temperaturas de 390-410°C durante 3 h. utilizando un digestor Tecator 1016.

En la destilación las sales de amonio (30 mL NaOH 35% p/v). En presencia de una solución alcalina, para este paso se utilizó un destilador (Tecator 1002, la cuantificación del N total se realizó con NaOH 0.1 N (1 mL), medio ácido (20 mL HCl 0.1 N) con indicador mixto rojo de metilo-azul de metileno utilizando una bureta Brinkman/Brad digital (Axman *et al.*, 1990). En este paso se producen las siguientes reacciones:



### 3.14.2. Análisis de la relación isotópica <sup>14</sup>N / <sup>15</sup>N.

Una vez determinado el N total de la parte aérea de la planta, la muestra se acidificó con HCl 0.1 N y se concentró (digestor Labconco 60300) con una temperatura promedio de 120 °C a 1.0 mg N mL<sup>-1</sup>.

Para la determinación de la relación isotópica <sup>14</sup>N / <sup>15</sup>N (Axman *et al.*, 1990) por medio de espectrometría de emisión (Axman y Zapata, 1990). Los datos de la cuantificación de la relación isotópica <sup>14</sup>N / <sup>15</sup>N fue medida en un espectrómetro de emisión óptica (modelo NOI-6e marca FAN), cuyo principio de medición se basa en aplicar una alta frecuencia al N<sub>2</sub> generado por oxidación Rittenberg con hipobromito de sodio 0.07 M, las moléculas absorben diferentes cantidades de energía y al desexcitarse emite radiación electromagnética de diferentes longitudes de onda y los valores son proporcionales al tipo de molécula y cantidad de átomos, determinándose así el espectro de la banda del segundo sistema positivo del N y cuantificándose la relación <sup>14</sup>N / <sup>15</sup>N en % <sup>15</sup>N a. e (Axman y

Zapata, 1990).

### 3.14.3. Rendimiento de materia seca (RMS).

Esta variable ( $\text{g/m}^2$ ) se midió en la muestra-submuestra de la parte aérea de la planta. Los cálculos son:

$$\text{RMS (Kg/ha)} = \frac{\text{peso fresco} \times \text{área cosechada}^* \times \text{peso fresco de la submuestra (kg)}^{**}}{\text{área cosechada}^* \times \text{peso seco de la submuestra (kg)}^{**}}$$

\* el área cosechada fue de  $1.0 \text{ m}^2$  \*\* se utilizó la técnica del cuarteo (OIEA, 1987).

### 3.14.4. Nitrógeno derivado del fertilizante (Nddf).

Esta variable se determinó dividiendo el  $\%^{15}\text{N}$  a. e. del fertilizante nitrogenado marcado ( $10.075\%^{15}\text{N}$  a. e.) que se aplicó en los diferentes tratamientos. Los cálculos son como sigue:

$$\% \text{Nddf} = \frac{\%^{15}\text{N a. e. de la muestra de planta} \times 100}{\%^{15}\text{N a. e. del fertilizante aplicado}}$$

donde: Nddf es el N derivado del fertilizante

### 3.14.5. Rendimiento de Nitrógeno.

El rendimiento de N ( $\text{g N/m}^2$ ) fue calculado multiplicando el porcentaje de N total por el rendimiento de materia seca. Cálculos: RN (Kg/ha) de la parte de la planta:

$$\text{RN (kg/ha)} = \text{R M}_s \times \frac{\% \text{N}}{100}$$

donde: RN es el rendimiento del N y MS es el Rendimiento de la materia seca.

### 3.14.6. Nitrógeno derivado de la atmósfera por el método del valor "A" (VA).

La cantidad de nitrógeno fijado por la leguminosa (cultivo fijador = F), se requiere tener un cultivo de referencia no fijador (una gramínea = NF), para conocer éste valor se utilizó la siguiente ecuación:

$$\%Ndda = 100 \frac{(1 - \%Nddf_F)}{n(\%Nddf_{NF})} + \%Nddf_F (1/n - 1)$$

donde: n = relación de dosis aplicada de N total (en este caso fue de 50 kg/ha en gramíneas y 10 kg/ha para leguminosas).

### 3.14.7. Nitrógeno derivado del suelo.

Para conocer la relación del N derivado del suelo se aplicaron las siguientes ecuaciones.

$$\% Ndds_F = 100 - \% Nddf_F - \% Ndda_F \quad \text{ó} \quad \% Nddf_{NF} / \% Ndds_{NF} = \% Nddf_F / \% Ndds_F$$

### 3.14.8. Rendimiento de nitrógeno derivado de la atmósfera o N fijado.

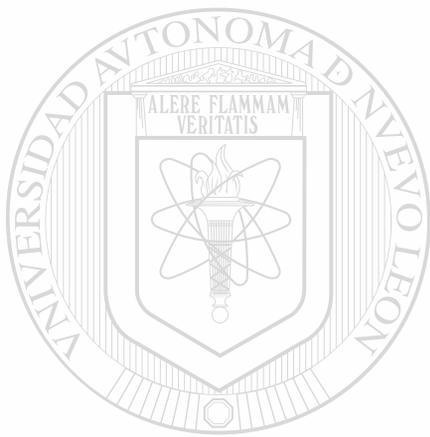
En esta variable ( $g \cdot N/m^2$ ) el cálculo se realizó multiplicando el porcentaje de nitrógeno derivado de la atmósfera por el rendimiento del N en la parte aérea de la planta. El cálculo se puede efectuar mediante la siguiente ecuación:

$$RNdda = \frac{\%Ndda}{100} \times RN \quad \text{donde: \% Ndda} = RN$$

Aquí se asume que la proporción de N disponible del suelo y del fertilizante es la misma para el cultivo fijador y no fijador, además que deben tener perfiles similares en la toma de N (Hardarson, 1985).

### 3.16. Análisis estadístico.

De acuerdo al diseño experimental de bloques al azar, para cada uno de los parámetros determinados en el experimento en cada una de las etapas de muestreo, o las variables que mostraron, en el análisis de varianza, diferencia estadística significativa con un nivel de probabilidad de  $p \leq 0.05$  se les practicó una prueba de comparación de medias por medio de la prueba de Tukey (Steel y Torrie, 1960).



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## RESULTADOS Y DISCUSION

### 4.1. Análisis del suelo de cultivo.

Los resultados del análisis fisicoquímico del suelo experimental lo caracterizan como un suelo arcilloso limoso, con un pH alcalino, pobre en nitrógeno y materia orgánica.

Tabla 14. Catacterísticas del suelo de cultivo donde se estableció el experimento.

Muestra	Textura	pH	Mat. Orgánica %	Nitrógeno total %
1	Arcilloso limoso	8.5	1.06	0.95
2	Arcilloso limoso	8.8	0.98	0.80
3	Migajón limoso	8.5	0.85	0.76
4	Migajón limoso	8.0	1.25	0.92
5	Arcilloso limoso	8.8	0.64	0.50
6	Arcilloso limoso	8.5	0.90	0.79
7	Arcilloso limoso	8.3	1.40	0.98
8	Arcilloso limoso	8.6	0.96	0.83
9	Arcilloso limoso	8.2	1.31	1.0
<b>PROMEDIO</b>		<b>8.47</b>	<b>1.03</b>	<b>0.84</b>

### 4.2. Pruebas de sensibilidad y resistencia a los antibióticos.

En los resultados de este estudio se encontró que de 80 aislados nodulantes obtenidos de las dos variedades de alfalfa se agruparon en 10 diferentes patrones de resistencia y sensibilidad a 12 antibióticos (tabla 15), mientras que 12 aislados pertenecientes al grupo III fueron sensibles a todos los antibióticos, así mismo, se observó que la mayoría de las cepas fueron sensibles a 6 de los 12 antibióticos probados y a las concentraciones especificadas (Amikacina, Ceftriaxona, Cloranfenicol, Enoxacina, Gentamicina y Trimetropin-Sulfametoxazol) y sólo tres cepas que representan el patrón X de la variedad (SM) fueron sensibles a Cloranfenicol y resistentes a los 11 antibióticos restantes.

Una de las formas más comúnmente empleadas para demostrar la diversidad genética en bacterias, es el estudio de la resistencia intrínseca a los antibióticos (RIA). En *Rhizobium* se ha demostrado que existe una gran heterogeneidad en la obtención de grupos o patrones (Chanway y Holl, 1986; Kremer y Peterson, 1982; Stein *et al.*, 1982;). Existen otras técnicas para determinar diversidad como es el caso del estudio de variantes electroforéticas de actividad enzimática (Segovia *et al.*, 1991), datos moleculares de secuenciación de ADN (Ludwing y Schleifer, 1994, etc.), sin embargo, la técnica de RIA se ha seguido utilizando en diversas líneas de investigación como son en pruebas de sobrevivencia, dominancia y competitividad (Stein *et al.*, 1982) y en la determinación de poblaciones de *Rhizobium* en diferentes tipos de suelos (Ramos *et al.*, 1987). Al respecto, los datos obtenidos por Jenkins *et al.* (1985), donde obtuvo 7 patrones diferentes de 300 aislados realizados, en donde el patrón C incluía a 208 aislados que presentaron gran dominancia en la mayoría de los nódulos. De la misma forma Josey *et al.* (1982), probó la resistencia y sensibilidad de 49 aislados a 9 antibióticos obteniendo 12 grupos de *R. meliloti*. Esta resistencia intrínseca a los antibióticos puede atribuirse entre otros factores a que muchos microorganismos producen antibióticos en el suelo (Eaglesham, 1987). En este trabajo, la diversidad de cepas encontrada en aislados, tomando en cuenta el número de patrones obtenidos de los 80 aislados, contrasta con los resultados obtenidos por Olalde-Portugal y Peña-Cabriales (1989), donde obtienen 10 patrones de sensibilidad y resistencia a los antibióticos de 1000 aislados de *R. meliloti* obtenidos en los sitios muestrados con los alfalfares en el Estado de Guanajuato.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**Tabla 15. Distribución de sensibilidad y resistencia a los antibióticos de 80 aislados de *R. meliloti* obtenidos en 2 variedades de alfalfa cultivada de la Región Lagunera (Durango).**

Pa	Ai	AK	AM	CF	CRO	CL	DC	ENX	E	GE	NET	PE	SXT
I	6	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-
II	8	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-
III	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IV	7	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-
V	6	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-
VI	11	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-
VII	7	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+
VIII	15	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-
IX	5	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-
X	3	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+

Pa = Patrón

Ai = Aislados

+ = Resistente

- = Sensible

AK = Amikacina 30 mg

AM = Ampicilina 10 mg

CF = Cefalotina 30 mg

CRO = Ceftriaxona 30 mg

CL = Cloranfenicol 30 mg

DC = Dicloxacilina 1 mg

ENX = Enoxacina 10 mg

E = Eritromicina 15 mg

GE = Gentamicina 10 mg

NET = Netilmicina 30 mg

PE = Penicilina 10 U

SXT = Trimetoprim-  
Sulfametoxazol 25 mg

La mayoría de los aislados fueron obtenidos de la variedad SW14 con un total de 52 aislados (65 %) y 28 aislados (35 %) en la variedad (SM) (cuadro 3). En la variedad SW14 se obtuvieron 9 patrones de resistencia y sensibilidad a los antibióticos y 8 patrones en la variedad SM, de los cuales 7 fueron comunes en las dos variedades, de acuerdo como aparecen en el cuadro 3. Sin embargo, estudios realizados en el Bajío Guanajuatense se determinó que de 1000 aislados solo 2 cepas (GTO1 y GTO2) están ampliamente distribuidas en aproximadamente el 85 % de los 52 sitios de muestreo. Se sugiere que en la Región Lagunera (parte del estado de Durango), la diversidad genética encontrada se debe principalmente a las cepas nativas (tratamiento sin inocular), datos que son apoyados por los resultados de nodulación. Además, la prueba de RIA mostró la preferencia que tienen los 52 aislados (9 patrones) que comprenden un 65 % en la variedad SW14. En la variedad SM, se encontró una menor diversidad (28 % de las cepas aisladas). Resultados similares de

Hardarson (1981) y Marquez-Pinto (1974) muestran evidencias de la preferencia de algunos genotipos de alfalfa sobre cepas de *R. meliloti*.

Cuadro 3. Distribución de aislados de *R. meliloti* de acuerdo a la sensibilidad y resistencia a los antibióticos en dos variedades de alfalfa (SW14 y San Miguelito) cultivadas en la Región Lagunera (Durango).

Patrones	Aislados	Aislados en SW14 <sup>a</sup>	Aislados en SM <sup>b</sup>
I	6	<b>3, 4, 5, 6, 10</b>	<b>2, 56, 60,</b>
II	8	15, 18, 22, 23, 24, <b>26, 28</b>	<b>58, 65</b>
III	12	7, 8, 13, 14, 37, 44	57, 59, 70, 76
IV	7	16, 20, <b>25, 39, 49, 71</b>	
V	6	<b>27, 29, 30, 31, 41, 77</b>	
VI	11	9, 11, 12, 17, <b>32, 34</b>	61, 64, 72, 75, 80
VII	7	<b>19, 21, 33, 36, 47,</b>	63, 73, 74
VIII	15	38, 40, 42, 45, 46, 48, 51	53, 54, 62, <b>66, 67, 68, 69</b>
IX	5	<b>1, 35, 43, 50</b>	52
X	3		55, 78, <b>79</b>
<b>Total</b>	<b>80</b>	<b>52 (65 %)</b>	<b>28 (34 %)</b>

<sup>a</sup>Los números remarcados y de mayor tamaño se usaron como representantes de cada patrón en otras pruebas

## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



Con relación al uso de procedimientos de identificación se han desarrollado varias metodologías para seleccionar o verificar la identidad de aislados de *Rhizobium* spp, una de estas es la resistencia y sensibilidad a los antibióticos (Schwinghamery Dudman, 1980), aunado a esto, *R. meliloti* ha sido un organismo problema. Aunque los métodos serológicos usados muestran que presentan niveles antigénicos muy heterogéneos (Stevens, 1923, 1925; Vincent 1941) en suelo y en la planta (Hughes y Vincent, 1942; Purchase *et al.*, 1951). Aún y con todo esto, los marcadores de resistencia a los antibióticos han sido frecuentemente utilizados en cepas de *R. meliloti* (Danso y Alexander, 1974; Hardarson *et al.*, 1981 y Obaton, 1971). Recientemente, los patrones de resistencia intrínseca a los antibióticos han sido usados para diferenciar cepas de *R. phaseoli*. Interesantes observaciones

llevadas a cabo con *R. meliloti* mostrando mayor resistencia los antibióticos que otros aislados *Rhizobium* de crecimiento rápido fueron hechos por Schwinghamer y Dudman (1973). De la misma forma se han caracterizado cepas de *Rhizobium* que nodulan alfalfa mediante la técnica de tolerancia a ácidos las cuales, los autores menciona que no perdieron la capacidad de nodular y fijar nitrógeno atmosférico (Del Papa *et al.*, 1999).

#### **4.3. Corrimiento electroforético de enzimas multilocus (MLEE).**

Mediante el uso de electroforesis de enzimas metabólicas (multilocus) fueron analizadas 13 enzimas de un total de 13 aislados recobrados de nódulos de 2 variedades de alfalfa cultivada en la Región Lagunera, entre los que se incluyen las cepas 2011 y "Elite" de *R. meliloti*. Las 13 enzimas analizadas fueron polimórficas. El número promedio de alelos fue de 4.4, en el rango de 3 a 6 alelos por locus, con un nivel de diversidad genética promedio de 0.793 para las enzimas ensayadas (tabla 16). Un total de 9 grupos electroforéticos (ETs) diferentes fueron identificados entre los aislados de alfalfa analizados (tabla 18). La mayoría de los ETs identificados están representados por un solo aislado, excepto el ET 2 que representa a 4 aislados (2, 3, 4, y "Elite") y el ET 1 que representa a los aislados 26 y 65. Las relaciones genéticas entre los aislados nodulantes de la alfalfa son ilustrados mediante un dendograma (figura 2). El análisis de agrupamiento de los ETs revela 3 divisiones primarias (A, B, y C en figura 2) a una distancia genética de 0.812 entre la división A y B, las cuales divergen de la división C a una distancia genética de 0.920. La división A incluye a los ETs que representan la mayoría de los aislados nodulantes de la alfalfa, incluyendo la cepa "Elite de *R. meliloti*, en tanto que la división C representa a pocos aislados pero incluye a la cepa 2011 de *R. meliloti* usada como inoculante comercial para alfalfa. Tomando en cuenta que el método de electroforesis de enzimas multilocus (MLEE) ha sido ampliamente utilizado en la genética y sistemática de eucariotes. Durante los últimos 20 años esta metodología ha sido incorporada en el campo de la microbiología para estimar la diversidad genética y estructura de las poblaciones naturales de especies bacterianas (Selander *et al.*, 1986), siendo la mas apmliamente usada con este fin (Martínez-Romero y Caballero-Mellado, 1996).

La electroforésis de enzimas multilocus de 11 aislados nodulantes de 2 variedades de alfalfa colectadas en diferentes regiones geográficas, así como 2 cepas catalogadas como pertenecientes a la especie de *R. meliloti* reveló la existencia de 3 divisiones que divergen profundamente. Considerando que coeficientes de diversidad genética mayores de 0.5, derivados de ensayos de MLEE, han sido tomados como criterio para la definición de especies (Musser *et al.*, 1987; Selander *et al.*, 1985). Los resultados obtenidos sugieren que el grupo de aislados nodulantes de la alfalfa analizados en este trabajo representa al menos 3 especies de rhizobia diferentes. El grupo de cepas representados por los ET 1 y ET 2 agrupados en la división A, corresponden a la misma especie. De acuerdo con la identificación de la cepa "Elite" mediante criterios fenotípicos (Olalde-Portugal *et al.*, 1989), este grupo de aislados pertenecen a la especie *R. meliloti* (actualmente reclasificada como *Sinorhizobium meliloti*). No obstante, debido a que la cepa 2011 de *R. meliloti* ha sido ampliamente analizada por criterio fenotípicos y genotípicos y se encuentra a distancias genéticas mayores de 0.900 de la cepa "Elite", consideramos que los aislados agrupados en el ET 1 y ET 2 pertenecen a otra especie diferente, pero capaz de nodular alfalfa. Será importante analizar mediante criterios genotípicos a este grupo de aislados para determinar con exactitud su "status" a nivel de especie. Es considerado que los ETs representan clonas (Selander *et al.*, 1990a. y 1990b). Sobre esta base y de los resultados derivados del análisis de MLEE, es claro que la cepa "Elite" nodulante de alfalfa es una clona predominante y ampliamente distribuida geográficamente, ya que esta cepa fue aislada en la región del Bajío Guanajuatense a principios de los '80s y las cepas 2, 3 y 4 fueron aisladas recientemente en plantas de alfalfa cultivada en la Región Lagunera (en el Estado de Durango). Desde el punto de vista de la ecología microbiana es de interés conocer la dispersión geográfica representada por el ET 2. Previamente, fueron analizados 232 aislados recobrados de nódulos de alfalfa cultivada en diferentes regiones geográficas del mundo (Eardly *et al.*, 1990). En este estudio fueron detectados mediante ensayos de MLEE, 2 grandes grupos que divergen a distancias genéticas de 0.830, concluyendo los autores que los aislados analizados pertenecen a *R. meliloti* y a otra especie diferente. En el estudio presente, las divisiones A y C parecen coincidir con los resultados obtenidos por Eardly *et al.* (1990), sin embargo, es importante destacar la existencia de aislados nodulantes de alfalfa (ETs 4, 5 y 6) que divergen profundamente de la clona "Elite" (división A). Este resultado sugiere fuertemente la existencia de una especie intermedia entre *R. meliloti* y la Clona "Elite"

predominante. Un análisis más profundo amerita llevarse a cabo con los aislados 25 (ET 8) y 27 (ET 9). No obstante, el aislado 25 parece pertenecer a la especie *R. meliloti* dada la cercanía genética con la cepa 2011.

Resumiendo los resultados, se puede decir que la amplia diversidad genética (0.793) observada entre la colección de aislados analizados, indica la existencia de una especie bacteriana capaz de nodular la alfalfa, con una clona predominante y ampliamente dispersa en diferentes regiones geográficas.

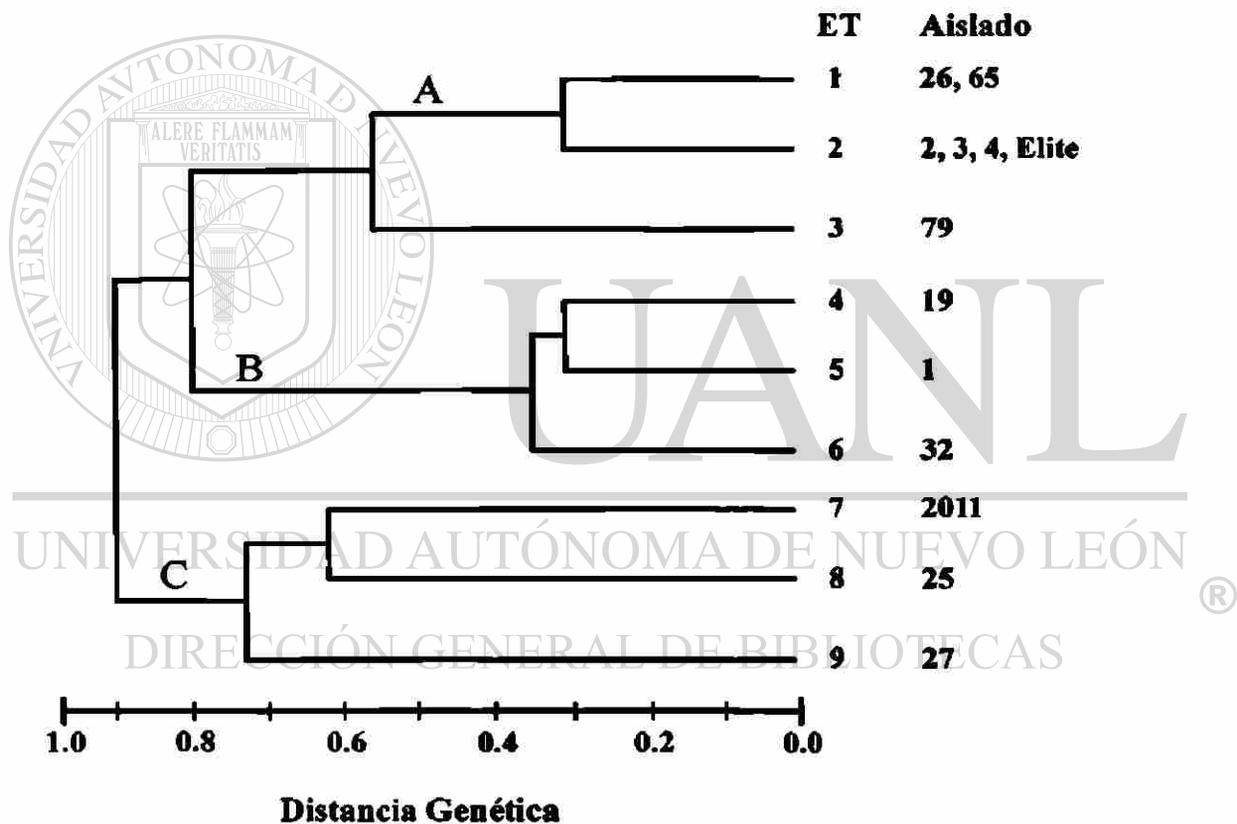


Figura 2. Relaciones genéticas de los 9 ETs identificados entre 13 aislados recobrados de nódulos de 2 variedades de alfalfa cultivada en la Región Lagunera (Durango).

**Tabla 16. Diversidad genética entre tipos electroforéticos (ETs) en 13 loci enzimáticos.**

Locus	Nº de alelos	h
MDH	4	0.806
EM	5	0.806
IDH	4	0.583
G6P	5	0.861
PGI	6	0.889
PGM	5	0.861
IPO	5	0.806
UDH	4	0.806
ACO	5	0.833
EST	5	0.806
LED	3	0.750
LYD	3	0.750
ADH	3	0.750
Media	4.4	0.793

$h = (1 - \sum x_i^2) [n/(n-1)]$  donde h es la diversidad genética  $x_i$  es la frecuencia del alelo "i-ésimo" n es el número de ETs

**Tabla 17. Número de tipos electroforéticos (ETs) obtenidos en los 13 aislados nodulantes de 2 variedades de alfalfa cultivada en la Región Lagunera (Durango).**

Tipo electroforético (ET)	Nº de aislados incluidos	Clave del aislado
ET1	Dos	26, 65
ET2	Cuatro	2, 3, 4, "Elite"
ET3	Uno	79
ET4	Uno	19
ET5	Uno	1
ET6	Uno	32
ET7	Uno	2011
ET8	Uno	25
ET9	Uno	27

#### 4.4. Nodulación.

Se realizó un muestreo de nódulos para conocer la capacidad de nodulación de los tratamientos Sin inocular, Nitragín y "Elite" en los dos genotipos de alfalfa. El muestreo de nódulos se realizó en dos

etapas de desarrollo de la planta, a los 50 y 120 días después de la siembra (dds). Los datos de nodulación de las 2 fechas de muestreo indican que al comparar el número de nódulos de las 2 variedades de alfalfa, no se observó diferencia estadística entre ellas (tabla 18), así como entre los tratamientos de ambas variedades. Los resultados muestran que el tratamiento sin inocular presenta el mayor número de nódulos en las 2 variedades, esto nos indica que probablemente las responsables de dicha nodulación son las cepas nativas, además, comparando el número de nódulos de los tratamientos, sin inocular, Nitragín y "Elite", muestra que estos 2 últimos presentan valores más bajos (157 y 200 nódulos respectivamente). El hecho de que en Nitragín y "Elite" se hayan presentado valores más bajos en nodulación puede deberse a que las cepas nativas presentan un efecto negativo sobre las introducidas impidiendo su establecimiento o que las cepas introducidas no estén en el sitio adecuado para nodular. Al respecto, trabajos realizados por Thies *et al.* (1992), mencionan que el incremento de las poblaciones nativas de *Rhizobium* disminuye el porcentaje de éxito de las cepas introducidas. Además Olalde-Portugal y Peña-Cabrales (1989) observaron que según la edad del cultivo, la dominancia de algunas cepas en particular, se ve afectada; si los cultivos de alfalfa son menores de 18 meses la dominancia es más marcada. Así mismo, es bien conocido que en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa donde las cepas introducidas al suelo por su alta efectividad simbiótica para fijar nitrógeno, generalmente, fallan en colonizar y persistir en los suelos en condiciones naturales, siendo varias limitantes ecológicas las que mantienen a estos organismos bajo control Alexander, (1985). Por otro lado, Castellanos (1985), menciona que las zonas áridas bajo riego y semiáridas de temporal existen varios factores tales como la temperatura y sequía, elevado pH y bajo contenido de materia orgánica, los cuales pueden ser limitantes para el desarrollo de los procesos de nodulación, efectividad y persistencia de *Rhizobium* en el suelo. En el presente trabajo se observó que la variedad SW14 presentó una mayor nodulación tanto a los 50 como 120 dds, siendo el tratamiento sin inocular en donde se observó el mayor número, con 176 y 210 (número total de nódulos/planta/tratamiento) respectivamente, mientras que los valores más bajos se presentaron con el tratamiento nitragín en los dos genotipos de alfalfa. Estos datos indican la presencia de rhizobios nativos y que en cierta forma pudieran ser las responsables de la nodulación en las variedades de alfalfa probadas. Resultados similares se observaron en la variedad SM donde el tratamiento Nitragín presentó la menor respuesta a la nodulación en todos los tratamientos. Un

dato interesante fue que la cepa "Elite" presentó un mayor número de nódulos con la variedad SM en comparación con la variedad SW14 a los 50 y 120 dds, probablemente ésta relación simbiótica se debe a una gran especificidad entre el microsombionte y el genotipo de alfalfa. Datos obtenidos en el Bajío Guanajuatense mencionan que es probable que esta relación de las diferentes cepas "Elite" en simbiosis con alfalfa SM se estableció desde tiempos de la conquista, fecha en que se cree se introdujo el cultivo de esta variedad de alfalfa en ésta región (Olalde-Portugal y Peña-Cabriales 1989). Los resultados obtenidos en la Región Lagunera indican que no está bien establecido el efecto que puedan tener los inoculantes comerciales en esta región (Quiroga, 1981). Para otro tipo de leguminosas, se ha demostrado en suelos de una de las principales regiones productoras de frijol en México (Zacatecas) donde se encontró que sólo el 10 % de los nódulos formados en estas plantas de frijol inoculadas, pertenecen a las cepas introducidas (Aguilar *et al.*, 1996), al parecer éstas son desplazadas por las cepas nativas (Olsen y Beken, 1987). De la misma forma, estudios realizados por Castellanos (1986) para evaluar el efecto de un producto comercial de *R. meliloti* en condiciones de invernadero en la Región Lagunera, indican que se presentó nodulación en el tratamiento no inoculado, sin embargo en el tratamiento inoculado el número de nódulos fue siempre más alto, no obstante esto no significó mayor rendimiento, indicando que probablemente las cepas contenidas en el inoculante no son lo suficientemente efectivas, por lo que es necesario buscar regionalmente cepas nativas y probar su efectividad bajo condiciones de campo. Finalmente, el mismo autor menciona que no hubo diferencia estadística entre los tratamientos tanto en rendimiento como en contenido de nitrógeno.

Los resultados aquí reportados, aunque numéricamente sí mostraron diferencias en la nodulación en las dos variedades de alfalfa con todos los tratamientos, el análisis estadístico no muestra diferencia significativa entre tratamientos, ni entre las variedades de alfalfa (tabla 19 y 28).

Tabla 18. Nodulación en 2 variedades de alfalfa (*Medicago sativa* L) utilizando un inoculante comercial (nitragin ) y cepas "Elite" de *R. meliloti* bajo condiciones de campo cultivadas en la Región La gunera (Durango).

TRATAMIENTO	SW14		SM	
	nódulos/planta			
	50	120	50	120
	dds			
Sin inóculo	38	50	35	43
	40	47	42	38
	53	50	42	56
	45	63	38	49
	<b>Total</b>	<b>176</b>	<b>210</b>	<b>157</b>
<b>Promedio</b>	<b>44</b>	<b>52</b>	<b>39</b>	<b>50</b>
Nitragin	36	36	30	28
	24	37	20	30
	38	29	29	32
	27	32	20	19
	<b>Total</b>	<b>125</b>	<b>134</b>	<b>99</b>
<b>Promedio</b>	<b>21</b>	<b>34</b>	<b>25</b>	<b>27</b>
Cepa "Elite"	32	23	34	38
	26	36	45	43
	30	38	39	39
	28	29	26	33
	<b>Total</b>	<b>116</b>	<b>126</b>	<b>144</b>
<b>Promedio</b>	<b>29</b>	<b>32</b>	<b>36</b>	<b>38</b> ®

dds = días después de la siembra.

**Tabla 19. Efecto de la inoculación sobre la nodulación de alfalfa cultivada en la Región Lagunera (Durango)**

Alfalfa	Edad de la planta	Tratamiento	Número de nódulos	Promedio	Grupo Estadístico
SW14	50 días	Si	156	39	A
		El	125	31	A
		Ni	136	34	A
	120 días	Si	90	23	A
		Ni	94	24	A
		El	83	22	A
SM	50 días	El	129	32	A
		Si	59	15	A
		Ni	187	47	A
	120 días	El	106	27	A
		Si	49	13	A
		Ni	125	31	A

Si = in inocular    Ni = Nitragin    El = cepa "Elite"    Significancia a  $p \leq 0.05$

#### 4.5. Experimentos con $^{15}\text{N}$ .

La medición en la fijación de nitrógeno es un aspecto muy importante en los esfuerzos por incrementar la contribución de nitrógeno atmosférico, en la nutrición de las plantas, y en la fertilidad del suelo. Es importante destacar que de todos los métodos disponibles, la técnica isotópica de  $^{15}\text{N}$  es la más apropiada para cuantificar la cantidad de nitrógeno fijado, ya que proporciona una medida integrada del nitrógeno de la planta que proviene tanto del suelo, fertilizante y atmósfera a lo largo de todo el ciclo de cultivo (Danso y Zapata, 1993). A través del empleo de estas técnicas se han encontrado grandes diferencias en cuanto a tasas de fijación de nitrógeno en diferentes especies de leguminosas y sus microsimbiontes (FAO, 1984). Además, varios estudios indican estimaciones puntuales en las cantidades de nitrógeno fijado son obtenidas mediante la técnica de dilución isotópica de  $^{15}\text{N}$  (Rennie, 1984; Ruschel *et al.*, 1979; Vose *et al.*, 1982).

#### 4.5.1. Fuentes de nitrógeno.

Los resultados obtenidos en este experimento en la toma de nitrógeno derivado de la atmósfera (N<sub>da</sub>) muestran que no hubo diferencia significativa entre las 2 variedades de alfalfa, ya que en la variedad SW14 se obtuvieron valores con rangos de 46-159 kg N ha<sup>-1</sup> en el tratamiento sin inocular, 23-163 kg N ha<sup>-1</sup> en Nitragín, y 30-173 kg N ha<sup>-1</sup> con la cepa "Elite", como se puede apreciar en esta variedad no se presentó diferencia estadística entre tratamientos. En la variedad SM los rangos fueron 29-167, 29-166 y 29-101 kg N fijado ha<sup>-1</sup> para los tratamientos sin inocular, nitragín y "Elite" respectivamente (tabla 20 y 23), la literatura reporta datos de estudios realizados en el Bajío Guanajuatense con diferentes leguminosas y en especial con alfalfa reportando rangos de 29-260 kg N ha<sup>-1</sup> de nitrógeno fijado (Olalde-Portugal, 1986), mientras datos sobre N<sub>da</sub> en alfalfa cultivada en Uppsala, Suecia alcanzaron 242 kg N ha<sup>-1</sup> en 1982 y 319 kg N ha<sup>-1</sup> en 1983 (Wivstad *et al.*, 1987), el mismo autor menciona que trabajos realizados en trébol (*Trifolium mediterraneum*) la porción de N<sub>da</sub> fue de 65-95 % entre sitios, tratamientos y tiempos de muestreo. Bolger *et al.*, (1995) reporta en trabajos realizados en trébol, cantidades de nitrógeno fijado con rangos de 50-125 kg N ha<sup>-1</sup>, mientras otros estudios obtuvieron en trébol (*Trifolium pratense* L.) rangos de 148-178 kg N ha<sup>-1</sup> en el primer año, 29-65 kg N ha<sup>-1</sup> en el segundo año (Mallarino y Wedin, 1990). De la misma forma, Stanford *et al.* (1994), muestra datos con rangos de 0-100% con un mínimo de 72%, además, se discute que en general esta especie de trébol tiene la capacidad de fijar nitrógeno derivado de la atmósfera con un promedio de 69-99%.

En el presente estudio, al comparar el promedio de N<sub>da</sub> acumulado en cada tratamiento del primer ciclo (150-225 dds) con los datos del segundo ciclo (270-375 dds) tablas 21 y 22, se observa una gran diferencia en los kg N ha<sup>-1</sup> fijados en este último el cual se incrementó 2.5 veces. Este incremento en los valores se presentó en cada tratamiento en ambas variedades; estas diferencias entre los dos ciclos de desarrollo se deben a que el cultivo a los (270 dds) estaba plenamente establecido, lo cual se ve reflejado en la producción de materia seca (tabla 30). Al analizar los valores de nitrógeno en los 2 ciclos de corte en cada tratamiento en las 2 variedades se observan variaciones en el nitrógeno derivado de la atmósfera a lo largo del desarrollo del cultivo (tabla 20, 21 y 22). Estas diferencias sugieren un efecto de las condiciones ambientales en el sitio de estudio, las cuales fueron muy contrastantes, influyendo en los rendimientos nitrógeno fijado. Además, en

el experimento se utilizaron diferentes cultivos de referencia (maíz, sorgo, ballico, avena, triticale y Johnson) lo cual limita el realizar comparaciones. Esto ha sido explicado en otros estudios realizados para evaluar diferentes cultivos de referencia que indican que los valores-A fueron bastante diferentes entre los diversos cultivos de referencia (434-705 kg N ha<sup>-1</sup>) (Wagner y Zapata, 1982 citados por Danso y Hardarson, 1993). En cuanto al % de Ndda, la variedad SW14 (tabla 24) muestra rangos de 47-95% para el tratamiento sin inocular, 24-94% para nitragín y 29-92% en el tratamiento con la cepa "Elite". Para la variedad SM los rangos fueron 28-93%, 26-94% y 29-91% para los tratamientos sin inocular, Nitragín y cepa "Elite", respectivamente. Datos obtenidos por Wivstad *et al.* (1987) reportan un 70 % en 2 años de estudio (1982 y 1983).

Los resultados obtenidos en este trabajo, del Ndds y Nddf no mostraron diferencias significativas entre variedades y tratamientos con lo que se puede establecer que estas fuentes de nitrógeno contribuyeron en una mínima parte al desarrollo del cultivo de alfalfa (tablas 25, 26 y 27).

Tabla 20. Nitrógeno derivado de la atmósfera utilizando cepas "Elite" y un inoculante comercial de *R. meliloti* en 2 variedades de alfalfa cultivada en la Región Lagunera (Durango).

Aplicación de <sup>15</sup> N	dds	Variedad de alfalfa					
		SW14			SM		
		Si	Ni	El	Si	Ni	El
kg N fijado ha <sup>-1</sup>							
CICLO 1	150	46	23	30	29	29	29
	180	59	51	50	50	23	37
	225	84	106	87	89	79	93
CICLO 2	270	159	154	173	167	166	62
	330	124	163	88	133	49	79
	375	120	125	101	111	96	101
	Promedio	99	104	88	97	74	67

Si = Sin inocular    Ni = Nitragín    El = cepa "Elite"    dds = días después de la siembra

**Tabla 21. Fijación de nitrógeno atmosférico en el primer ciclo de producción en 2 variedades de alfalfa cultivada en la Región Lagunera (Durango) empleando un inoculante comercial y cepas "Elite" de *R. meliloti*.**

dds	Variedad de alfalfa					
	SW14			SM		
	Si	Ni	El	Si	Ni	El
Kg N fijado ha <sup>-1</sup>						
150	46	23	30	29	29	29
180	59	51	50	50	23	36
225	84	106	87	89	79	93
<b>Promedio</b>	<b>63</b>	<b>60</b>	<b>56</b>	<b>56</b>	<b>42</b>	<b>53</b>

Si = Sin inocular Ni = Nitragin El = cepa "Elite"

**Tabla 22. Fijación de nitrógeno atmosférico en el segundo ciclo de producción en 2 variedades de alfalfa cultivada en la Región Lagunera (Durango) empleando un inoculante comercial y cepas "Elite" de *R. meliloti*.**

dds	Variedad de alfalfa					
	SW14			SM		
	Si	Ni	El	Si	Ni	El
kg N fijado ha <sup>-1</sup>						
270	159	154	173	167	166	62
330	124	163	88	133	48	79
375	120	125	101	111	96	101
<b>Promedio</b>	<b>134</b>	<b>147</b>	<b>121</b>	<b>137</b>	<b>103</b>	<b>81</b>

Si = Sin inocular Ni = Nitragin El = cepa "Elite" dds = días después de la siembra

**Tabla 23. Rangos de nitrógeno fijado utilizando un inoculante comercial y cepas "Elite" de *R. meliloti* en 2 variedades de alfalfa cultivada en la Región Lagunera (Durango).**

Tratamiento	Variedad de alfalfa	
	SW	SM
	kg N fijado ha <sup>-1</sup>	
Si	46-159	29-167
Ni	23-163	29-166
El	30-173	29-101

**Tabla 24. Rangos de porcentaje de Ndda, Ndds y Nddf en 2 variedades de alfalfa cultivada en la Región Lagunera (Durango)**

Variedad	Fuente de nitrógeno								
	Ndda			Ndds			Nddf		
	Si	Ni	El	Si	Ni	El	Si	Ni	El
	%								
SW14	47-95	24-94	29-92	4-52	6-75	7-64	0.1-1.0	0.1-1.0	0.1-1.0
SM	28-93	26-94	29-91	6-71	6-67	8-70	0.1-1.0	0.1-1.0	0.1-1.0

Ndda = Nitrógeno derivado de la atmósfera    Ndds = Nitrógeno derivado del suelo

Nddf = Nitrógeno derivado del fertilizante

**Tabla 25. Efecto de la inoculación comercial y de cepas "Elite" de *R. meliloti* en la toma de nitrógeno derivado del suelo en 2 variedades de alfalfa cultivada en la Región Lagunera (Durango)**

Aplicación de <sup>15</sup> N	dds	Variedad de alfalfa					
		SW14			SM		
		Si	Ni	El	Si	Ni	El
		Kg N ha <sup>-1</sup>					
CICLO 1	150	71	67	55	54	52	51
	180	34	46	34	6	19	72
	225	30	12	12	10	10	12
CICLO 2	270	3	3	3	6	6	2
	330	82	121	9	15	9	36
	375	0.1	0.3	1	1	0.7	1
	<b>Promedio</b>	<b>37</b>	<b>42</b>	<b>19</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>29</b>

Si = Sin inocular    Ni = Nitragin    El = cepa "Elite"    dds = días después de la siembra

Tabla 26. Efecto de la inoculación comercial y cepas "Elite" de *R. meliloti* en la toma de Ndds en el primer ciclo de producción en 2 variedades de alfalfa cultivada en la Región Lagunera (Durango)

dds	Variedad de alfalfa					
	SW14			SM		
	Si	Ni	El	Si	Ni	El
	kg N ha <sup>-1</sup>					
150	71	67	55	54	52	51
180	35	46	34	6	19	72
225	30	12	12	10	10	12
<b>Promedio</b>	<b>45</b>	<b>42</b>	<b>34</b>	<b>23</b>	<b>27</b>	<b>45</b>

Si = Sin inocular Ni = Nitragin El = "Elite" dds = días después de la siembra

Tabla 27. Efecto de la inoculación comercial y de cepas "Elite" de *R. meliloti* en la toma de Ndds en el segundo ciclo de producción en 2 variedades de alfalfa cultivada a en la Región Lagunera (Durango).

dds	Variedad de alfalfa					
	SW14			SM		
	Si	Ni	El	Si	Ni	El
	kg N ha <sup>-1</sup>					
270	3	3	3	6	6	2
330	82	121	9	15	9	36
375	0.1	0.3	1	1	1	1
<b>Promedio</b>	<b>24</b>	<b>41</b>	<b>4</b>	<b>7</b>	<b>5</b>	<b>13</b>

Si = Sin inocular Ni = Nitragin El = cepa "Elite" dds = días después de la siembra

Tabla 28. Nitrógeno fijado total utilizando diferentes fuentes de nitrógeno (fertilizante, suelo y atmósfera) en la inoculación comercial y cepas "Elite" de *R. meliloti* en 2 variedades de alfalfa cultivada en la Región Lagunera (Durango).

Variedad	Fuente de nitrógeno								
	Ndda			Ndds			Nddf		
	Si	Ni	El	Si	Ni	El	Si	Ni	El
	kg N ha <sup>-1</sup>								
SW14	592	622	529	223	250	114	4	5	3
SM	579	441	401	93	97	173	3	3	4

Ndda = N derivado de la atmósfera Ndds = N derivado del suelo Nddf = N derivado del fertilizante

Tabla 29. Efecto de la inoculación comercial y cepas "Elite" de *R. meliloti* con 3 diferentes fuentes de nitrógeno (fertilizante, suelo y atmósfera) en 2 variedades de alfalfa cultivada en la región lagunera (Durango) durante el desarrollo del cultivo (375 dds).

dds	Trat.	Fuente de nitrógeno					
		Ndds		Nddf		Ndda	
		kg N ha <sup>-1</sup>	%	Kg N ha <sup>-1</sup>	%	Kg N ha <sup>-1</sup>	%
150	SWSi	71 a	52 a	1 a	1 a	46 a	47 a
	SWNi	67 a	75 a	1 a	1 a	23 a	24 b
	SWEI	55 a	64 a	1 a	1 a	30 a	29 ab
	SMSi	54 a	71 a	1 a	1 a	29 a	28 ab
	SMNi	52 a	67 a	1 a	1 a	29 a	26 b
	SMEI	51 a	70 a	1 a	1 a	29 a	29 ab
180	SWSi	35 ab	38 a	1 ab	1 a	59 a	61 a
	SWNi	46 a	46 a	1 a	1 a	51 ab	53 b
	SWEI	34 ab	40 a	1 ab	1 a	50 ab	59 b
	SMSi	6 c	11 b	0.2c	0.3 b	50 ab	88 a
	SMNi	19 bc	46 a	1 bc	1 a	23 b	53 b
	SMEI	7 c	16 b	1 c	0.4 b	37 ab	84 a
225	SWSi	30 a	10 a	0.1a	0.1 a	84 a	89 a
	SWNi	11 a	6 a	0.2a	0.1 a	106 a	94 a
	SWEI	12 a	11 a	0.1a	0.1 a	87 a	89 a
	SMSi	10 a	9 a	0.1a	0.1 a	89 a	91 a
	SMNi	10 a	9 a	0.1a	0.1 a	79 a	91 a
	SMEI	11 a	9 a	0.1a	0.1 a	93 a	91 a
270	SWSi	3 ab	7 a	1 a	1 a	159 a	92 a
	SWNi	3 ab	8 a	1 a	1 a	154 a	91 a
	SWEI	3 ab	7 a	1 a	1 a	173 a	92 a
	SMSi	6 a	6 a	1 a	1 a	167 a	94 a
	SMNi	6 a	6 a	1 a	1 a	167 a	94 a
	SMEI	2 b	8 a	1 a	1 a	62 a	90 a
330	SWSi	82 b	40 a	1 a	1 a	124 a	59 b
	SWNi	121 a	32 ab	1 a	1 a	163 a	67 ab
	SWEI	9 c	11 b	0.1a	0.1 b	88 a	89 a
	SMSi	15 c	11 b	0.2a	0.1 b	133 a	89 a
	SMNi	9 c	19 ab	0.1a	0.3 b	48 a	81 ab
	SMEI	36 c	32 ab	1 a	1 a	79 a	68 ab
375	SWSi	0.1 c	4 b	0.1c	0.1 c	120 ab	95 a
	SWNi	0.3 c	11 ab	0.3bc	0.3 bc	125 a	88 ab
	SWEI	1 ab	12 ab	1 ab	1 ab	101 ab	87 ab
	SMSi	1 a	22 a	1 a	1 ab	111 ab	80 b
	SMNi	1 a	24 a	1 a	1 a	96 b	77 b
	SMEI	1 ab	19 a	1 ab	1 ab	101 ab	75 b

dds = días después de la siembra. TRAT = tratamientos SWSi = SW14Sin inocular SWNi = SW14 Nitragin  
 SWEI = SW14 "Elite" SMSi = SM sin inocular SMNi = SM Nitragin SMEI = SM "Elite"

#### **4.5.2. Rendimiento de materia seca y nitrógeno.**

Aunque los valores obtenidos de rendimiento de materia seca nitrógeno y presentaron una ligera diferencia en los tratamientos de las dos variedades a los 180 dds, se observó que la variedad SW14 presentó cantidades mas altas de materia seca en todos los tratamientos con la edad del cultivo. Esta misma tendencia se observa con la variedad SM (tabla 30). Sin embargo, desde el punto de vista estadístico estos no presentó una diferencia significativa en el rendimiento de materia seca (tabla 32). Si comparamos los rendimientos de materia seca y nitrógeno a lo largo del desarrollo del cultivo de alfalfa (tablas 30 y 31) se puede observar que la materia seca presentó incrementos considerables en las 2 variedades, lo cual no se aprecia en el rendimiento de nitrógeno, donde por lógica se esperaría un incremento proporcional, o sea, al incrementar el rendimiento de materia seca, se incrementa el rendimiento de nitrógeno. Sin embargo, esto no fue así, se sugiere que sea debido al efecto de otros factores asociados a las condiciones ambientales presentes durante el desarrollo de la leguminosa. Resultados previos muy parecidos se obtuvieron en 1987, en Uppsala, Suecia, donde el rendimiento de materia seca y nitrógeno se incrementaron de un año a otro (12 % en 1982 y 15 % en 1983, respectivamente), los autores hacen énfasis en que estos resultados ilustran la fuerte influencia del medio ambiente en la capacidad de alfalfa tanto para la producción de materia seca como de nitrógeno (Wivstad *et al.*, 1987).

Tabla 30. Efecto de la inoculación comercial y cepas "Elite" de *R. meliloti* sobre el rendimiento de materia seca en 2 variedades de alfalfa cultivada en la Región Lagunera (Durango) durante el desarrollo del cultivo (375 dds).

Aplicación de <sup>15</sup> N	dds	Variedad de alfalfa					
		SW14			SM		
		Si	Ni	El	Si	Ni	El
		kg ha <sup>-1</sup>					
CICLO 1	150	3333	3500	3067	3033	3150	3200
	180	3333	3500	3066	2023	1600	1476
	225	3277	3463	3133	3443	3493	2313
CICLO 2	270	3333	3500	3067	3033	3150	3200
	330	5110	5943	5597	5257	5223	5217
	375	2763	2873	2713	3110	2833	2750
	Promedio	3525	3797	3441	3317	3242	3026

Si = Sin inocular Ni = Nitragin El = "Elite" dds = días después de la siembra

Tabla 31. Efecto de la inoculación comercial y cepas "Elite" de *R. meliloti* sobre el rendimiento de nitrógeno en 2 variedades de alfalfa cultivada en la Región Lagunera (Durango) durante el desarrollo del cultivo (375 dds).

Aplicación de <sup>15</sup> N	dds	Variedad de alfalfa					
		SW14			SM		
		Si	Ni	El	Si	Ni	El
		kg ha <sup>-1</sup>					
CICLO 1	150	95	98	85	87	87	86
	180	95	98	85	56	44	43
	225	111	111	96	106	104	100
CICLO 2	270	94	98	85	87	87	86
	330	222	244	97	149	57	116
	375	126	140	128	146	127	127
	Promedio	124	132	96	105	86	76

Si = Sin inocular Ni = Nitragin El = "Elite" dds = días después de la siembra

Tabla 32. Efecto de la inoculación comercial y cepas "Elite" de *R. meliloti* en el rendimiento de materia seca y nitrógeno en 2 variedades de alfalfa cultivada en la Región Lagunera (Durango) durante el desarrollo de cultivo.

dds	Tratamiento	Materia Seca (kg ha <sup>-1</sup> )	Nitrógeno (kg ha <sup>-1</sup> )
150	SWSi	3333 a	95 a
	SWNi	3500 a	98 a
	SWEl	3067 a	85 a
	SMSi	3033 a	87 a
	SMNi	3150 a	87 a
	SMEl	3200 a	86 a
180	SWSi	3333 a	95 a
	SWNi	3500 a	98 a
	SWEl	3066 ab	85 ab
	SMSi	2023 abc	56 bc
	SMNi	1600 bc	44 c
	SMEl	1476 c	43 c
225	SWSi	3277 a	111 a
	SWNi	3463 a	111 a
	SWEl	3133 a	96 a
	SMSi	3443 a	106 a
	SMNi	3493 a	104 a
	SMEl	2313 a	100 a
270	SWSi	3333 a	94 a
	SWNi	3500 a	98 a
	SWEl	3067 a	85 a
	SMSi	3033 a	87 a
	SMNi	3150 a	87 a
	SMEl	3200 a	86 a
330	SWSi	5110 a	222 a
	SWNi	5943 a	244 a
	SWEl	5597 a	97 a
	SMSi	5257 a	149 a
	SMNi	5223 a	57 a
	SMEl	5217 a	116 a
375	SWSi	2763 a	127 a
	SWNi	2873 a	140 a
	SWEl	2713 a	128 a
	SMSi	3110 a	146 a
	SMNi	2833 a	127 a
	SMEl	2750 a	127 a

Si = sin inocular Ni = nitragín (inoculante comercial) El = cepa "Elite" \* = significancia a  $P \leq 0.05$

dds = días después de la siembra

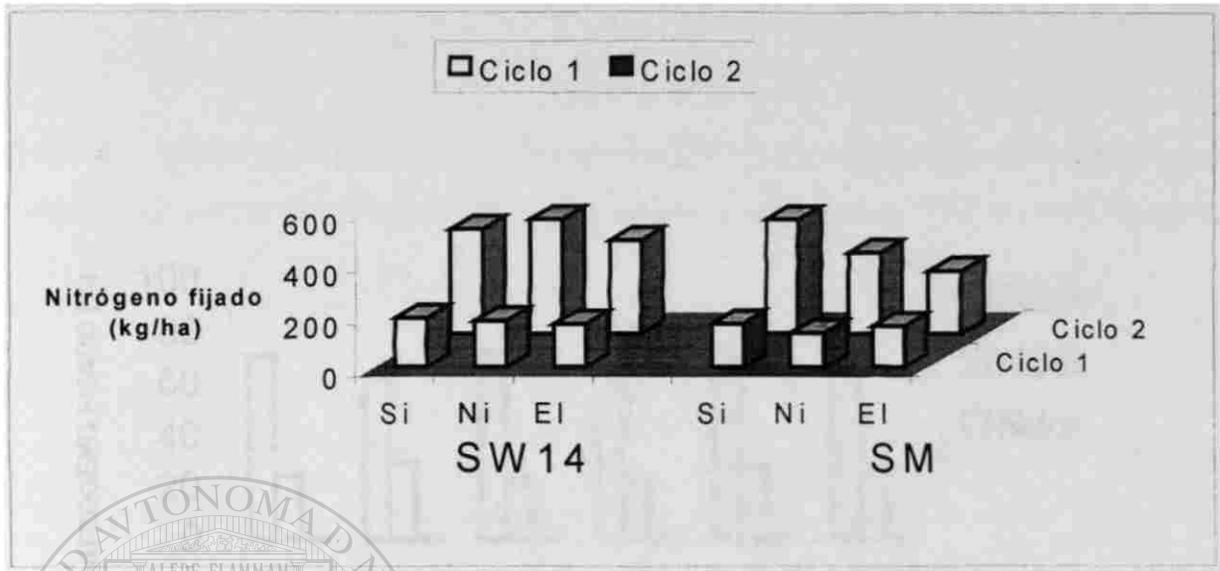


Figura 3. Nitrógeno fijado en 2 ciclos de producción utilizando un inoculante comercial y cepas "Elite" de *R. meliloti* en 2 variedades de alfalfa cultivada en la Región Lagunera (Durango).

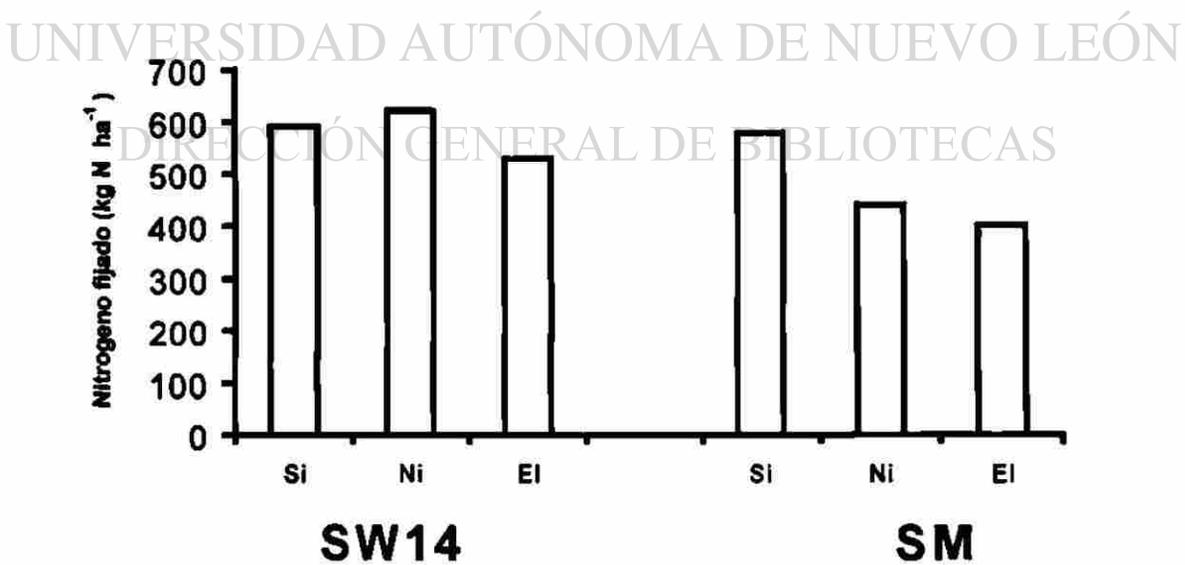


Figura 4.- Fijación de nitrógeno atmosférico empleando un inoculante comercial y cepas "Elite" de *R. meliloti* en 2 variedades de alfalfa cultivadas en la Región Lagunera (Durango).

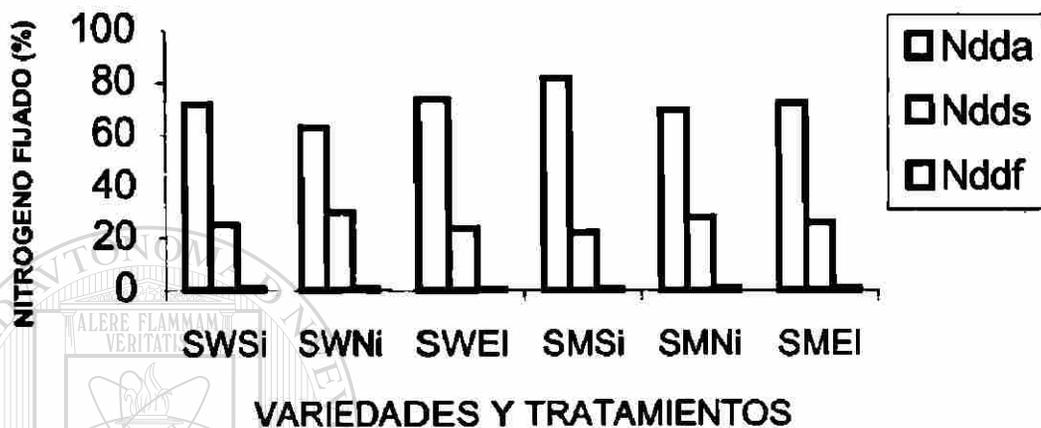


Figura 5.-Porcentaje de nitrógeno derivado de la atmósfera (Ndda), del suelo (Ndds) y del fertilizante (Nddf) utilizando cepas "Elite" y un inoculante comercial de *R. meliloti* en en 2 variedades de alfalfa cultivada en la Región Lagunera (Durango) durante el desarrollo del cultivo.

## CONCLUSIONES

1. La fijación biológica de nitrógeno en alfalfa cultivada en la región bajo condiciones naturales expresado en porcentaje de nitrógeno derivado de la atmósfera (Ndda) fue de 24 – 95 %, lo que representa de un 23 – 167 kg N ha<sup>-1</sup>
2. El cultivo de referencia utilizado en el experimento fue el sorgo, ya que los rendimientos de nitrógeno y materia seca fueron similares al cultivo de alfalfa.
3. Los aislados de *R. meliloti* nodularon en forma eficiente las 2 variedades de alfalfa empleadas en el experimento.
4. Se observó una amplia diversidad genética ( $h = 0.793$ ) entre la colección de aislados analizados, lo que insinúa la existencia de más de una especie bacteriana capaz de nodular alfalfa con una clona predominante y ampliamente dispersa en diferentes regiones geográficas.

## LITERATURA CITADA

**Aguilar, V. A.; Cabral, M. A.; Gómez, E. S.; Rodríguez, M. F.; Luévano, G. A.; Rosales, C. S.; Carlo, R. Z.; Rivera, E. J. L.; Maroun, C. V. 1994. Impacto Social y Económico de la Ganadería Lechera en la Región Lagunera. Torreón, Coah., México.**

**Aguilar-Zacarías, C.; Peña-Cabriales, J.J. 1996. Diversidad y caracterización de una población nativa de *Rhizobium* sp. Que nodula frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en el estado de Zactecas. In: Felipe Zapata y Peña-Cabriales, J.J. (Eds.). Aumento de la fijación biológica de nitrógeno en frijol común en América Latina. F kluwer Academic Publisher. (en Prensa).**

**Alexander, M. 1971. Microbial ecology. John wiley & Sons. New York**

**Alexander, M. 1980. Introducción a la Microbiología del Suelo A.G.T. Ed. S.A. México.**

**Alexander, M. 1985. Ecological constraints on nitrogen fixation in agricultural ecosystems. Adv. Microb. Ecol. 8: 163-181.**

**Amarger, N.; Mariotti, A.; Mariotti, F.; Dorr, J. C.; Bourguignon, C.; Lagacheri B. 1979. Estimate of symbiotically-fixed nitrogen in field-grown soybeans using radiations in the nitrogen-15 natural abundance. Plant and soil. 52:269-280.**

**Anton, H. L.; Bordeleau, M.; Prevost, D. 1982. Strain identification in *Rhizobium meliloti* using the antibiotic disk susceptibility test. Plant and soil. 66:45-50.**

**Axman, H.; Zapata, F. 1990. Stable and radioactive isotopes. In: Hardarson, G. (ed.). Use of nuclear techniques in studies of soil-plant relationships. Training course series No. 2. International Atomic Energy Agency. Vienna, pp. 41-53.**

**Axman, H. ; sebastianelli, M. ; Arrillaga J. L. 1990. Sample preparation techniques of biological material for isotope analisis. En: Edit. Hardarson, G. Use of nuclear techniques in studies of soil-plant relationships. Training course series N°. 2. International Atomic Energy Agency. Vienna, pp. 41-53.**

**Barnes, D. K.; Seetin, M.W. 1977. Variation among alfalfa genotypes for rate of acetilene reduction. Corp Science. 17:783-787.**

**Barnes, D.K.; E.T. Bringhan; R.P. Murphy; O.J. Hunt; D.F. Beard; W.H. Skardla & R.L. Teuber 1977. Alfalfa germplasm in the Unites States: Genetic vulnerability, use, improvment and maintenance. 1571. In: Memoir Series Numer 8. College of Agriculture and Home Economics. New Mexico State University Editor. Alfalfa in New Mexico and the New Mexico alfalfa breeding program USDA, ARS Tech. Bull (Bill Melton Author).**

- Bergersen, F. J.** 1980. *Methods for evaluating biological nitrogen fixation*. Wiley Chichester. 701 p.
- Bergersen, F. J.** 1974. Formation y function of bacteroides. *In: A. Quispel (ed.). The biology of nitrogen fixation*. North-holland. Publishing Co. Amsterdam. pp, 42-498.
- Black, C. A.** 1975. Relación suelo-planta. Hemisferio Sur. Argentina., p. 75.
- Bliss, A. F.; Hardarson, G.** 1993. Enhancement of biological fixation of common bean in Latin America. Ed. Kluwer Academic. Publishers. 160 p.
- Bolger, T. P.; Pate, J. S.; Unkovich, M. J.; Turner, N, C.** 1995. Estimates of seasonal fixation of annual subterranean clover-based pastures using  $^{15}\text{N}$  natural abundance technique. *Plant and Soil*.175:57-66.
- Boonkerd, N.; Weaver, R.W.** 1982. Survival of cowpea rhizobia in soil as affected by soil temperature and moisture. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 585-589.
- Bremner, J. M.** 1977. Use of nitrogen-tracer techniques for research on nitrogen fixation. *En: Biol. Nitrogen Fixation Farming Systems of the Tropics*. Eds. A. Ayanaba and P. J. Dart. pp, 335-352. Wiley, Chichester, Uk.
- Brill, W. J.** 1980a. Biochemical aspects of nitrogen fixation. *Microbiol. Rev.* 44: 449-467.
- Brill, W. J.** 1980b. Nitrogen. *In: Carlson P. S. (ed.). The biology of crop productivity*. Academic Press. N.Y.
- Brockwell, J.; A. Diatloff, A.; Roughley; R. J.; Date R. A.** 1982. Selection of rhizobia for inoculants, p, 12-188. *In: J. M. Vincent (ed.) Nitrogen fixation in legumes*. Academic Press, London.
- Brockwell, J. ; Schwinghamer, E. A.; Gault, R. R.** 1977. Ecological studies of root-nodule bacteria introduced into field environmental. A critical examination of stability of antigenic and streptomycin-resitant markers for the identification of strains of *Rhizobium trifolii*. *Soil Biol. Biochem.* 9:19-24.
- Bryan, O. C.** 1923. Effects of acids soils on nodule-forming bacteria. *Soil Sci.* 15:37-40.
- Bueno, J. H.** 1981. Efecto de tres inoculantes y sus alteraciones con niveles de nitrógeno y fósforo sobre el rendimiento y contenido de proteína de soya (*Glycine max L.*) var. *Tropicana*. Tesis de Maestría. Colegio de Posgrado. Chapingo. México.
- Burris, R. H. ; Miller, C. E.** 1941. Aplicacion of  $^{15}\text{N}$  to the study of biological nitrogen fixation. *Science.* 93:114-115.
- Burris, R. H.** 1974. Biological nitrogen fixation. *Plant Physiol.* 54:443-449.

**Bushby, H. V. A.; Marshal, K. C. 1977a.** Some factors affecting the survival of root-nodule bacteria on desiccation. *Soil. Biol. Biochem.* 9:143-147.

**Bushby, H. V. A.; Marshal, K. C. 1977b.** Water status of rhizobia in relation to their susceptibility to desiccation and to their protection by montmorillonite. *J. Microbiol.* 99:19-27.

**Butler, J. H. A. 1987.** The effect of defoliation on growth and N<sub>2</sub> fixation by *Medicago* sp grown alone or with ryegrass. *Soil Biol. Biochem.* 19: 22-279.

**Cano, S. G.; Castellanos-Ramos, J. Z.; Hoyos, G.; Valdez, T. 1984.** La alfalfa. Forraje por excelencia en la Comarca Lagunera. CAELALA. Hoja desplegable No. 2. Matamoros, Coah., México.

**Casse, F.; Boucher, C.; Julliot, J. S. ; Michel, M. ; Denaire, J. 1979.** Identification and characterization of large plasmids in *R. meliloti* using agarose gel electrophoresis. *J. Gen. Microbiol.* 113:229-242.

**Castellanos-Ramos, J. Z. ; Rodríguez, R. 1986.** Estudio preliminar sobre la respuesta de alfalfa en suelos de la región Lagunera. Memorias y Resúmenes del Primer Congreso Nacional de la Fijación Biológica de Nitrógeno. Xalapa, Ver., México.

**Castellanos-Ramos, J. Z. 1985.** Fijación biológica de nitrógeno en las zonas áridas. Seminarios Técnicos. Centro de investigaciones Agrícolas del Norte. Instituto Nacional de investigaciones Agrícolas (CIAN-INIA). Vol. 9, No. 2. Matamoros, Coah., México.

**Castellanos-Ramos, J. Z. 1986.** Efecto de la aplicación de nitrógeno en 20 suelos sembrados con alfalfa. CIAN. Matamoros, Coah., México.

**Castellanos-Ramos, J. Z. Peña-Cabriales, J. J.; Rojas-Martínez, I. 1995.** Análisis retrospectivo del uso de inoculantes con cepas "Elite" en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en México. Turrialba. 45: 89-99.

**CIAB. 1981.** Centro de Investigaciones Agrícolas del Bajío. Guía para cultivar alfalfa en Guanajuato. Celaya, Gto., México.

**Clair, St. D. A.; Wolyn, D. J.; DuBois, J.; Burris, R. H.; Bliss, F. A. 1988.** Field comparison of dinitrogen fixation determined with nitrogen-depleted and nitrogen-15 enriched ammonium sulphate in selected inbred backcross lines of common bean. *Crop Sci.* 28:72-778.

**Cooper, J. E. 1979.** Rapid method for counting antibiotic resistant Rhizobia in soil. *Soil Biol. Biochem.* 11:433-435.

**Cueto-wong, J. A.; Quiroga-Garza, H. M.; 1990.** Nutrientes que demanda el cultivo de la alfalfa en la Comarca Lagunera. CIAN. Matamoros, Coah., México.

**Chalk, P. M. 1985.** Estimation of N<sub>2</sub> fixation by isotope dilution: An appraisal of techniques involving <sup>15</sup>N enrichment and their application. *Soil Biol. Biochem.* 17:389-410.

Chanway, C. P. y Holl, F.B. 1986. Suitability of intrinsic antibiotic resistance as a method of strain identification in *Rhizobium trifolii*. *Plant Soil*. 93:287-291,

Chatel, D. L.; Greenwood, R. M.; Parker, C. A. 1968. Saprophytic competence as an important character in the selection on *Rhizobium* for inoculation. *Trans. 9th. Intern. Congr. Soil Sci.*, Adelaide 2:65-2.

Danso S. K. A. 1985. Methods of estimating biological nitrogen fixation. *In: Biological Nitrogen Fixation in Africa*. Eds. Ssali H. & Keya S. O., pp. 213-244. MIRGEN, Nairobi.

Danso, S. K. A.; Hardarson, G.; Zapata, F. 1993. Miscoceptions and practical problems in the use of  $^{15}\text{N}$  soil enrichment techniques for estimating  $\text{N}_2$  fixation. *Plant and soil*. 152:25-52.

Dart, P. J.; Day, J. M.; Harris, D. 1972. Assay of nitrogenase activity by acetylene reduction. *In: FAO/IAEA (ed.). Use of isotopes for study of fertilizer utilization by legume crops*. Vienna., pp. 85-100.

Dart, P. J. 1977. Infection and development of legumes nodules. *In: A treatise on dinitrogen fixation*. Section III. Biology. Edited by R. W. F. Hardy and W. S. Silver. Wiley, New York. Pp, 367-472.

Dazzo, F. B. ; Hubbell, D. H. 1975. Antigenic differences between infective and noninfective strains of *Rhizobium trifolii*. *Appl. Microbiol. Aus.* 30:172-177.

Del Papa, M. F.; Balagué L. J.; Sowinski, C. S.; Wegener, C.; Segundo, E.; Martínez, A. F.; Toro, N.; Niehaus K.; Puhler, A.; Aguilar O. M.; Martínez-drets, G.; Lagares A. 1999. Isolation and characterization of alfalfa-nodulating rhizobia present in acidic soils of central Argentina and Uruguay. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(4):1420-1427.

Dowling, D. N. ; Broughton, W. J. 1986. Competition for nodulation of legumes. *Ann. Rev. Microbiol.* 40:131-157.

Duhigg, P. D.; Cash, D.; Hoffman, B. M.; Baltensperger, A. 1979. Relationships among indices for estimating nitrogen fixation in alfalfa. *Bulletin 669. Agricultural Experiment Station. New Mexico State University. Las Cruces, New Mexico.*

Duhoux, E.; Dommergues, Y. 1985. The use of nitrogen fixing trees in forestry and soil restoration in the tropics. *In: Biological Nitrogen Fixation in Africa*. Eds. Ssali H. & Keya S. O., pp. 384-400. Mirgen, Nairobi.

Duque, F. F.; Neves, M. C. P.; Franco, A. A. Victoria, R. L.; Bodey, R. M. 1985. The response of field grown *Phaseolus vulgaris* to *Rhizobium* inoculation and the quantification of  $\text{N}_2$  fixation using  $^{15}\text{N}$ . *Plant Soil*. 88:333-343.

- Eardly, B. D.; Materon, L. A.; Smith N. H.; Johnson D. A.; Rumbaugh, M. D.; Selander R: K. 1990.** Genetic structure of natural populations of the nitrogen fixing bacterium *Rhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:187-194.
- Eastin, E. F. 1978.** Total nitrogen determination for plant material. *Anal. Biochem.* 85:591-594.
- Engin, M. ; Sprent, J. I. 192.** Effects of water stress on growth and nitrogen-fixing activity of *Trifolium repens*. *New Phytol.* 72:117-126.
- Espinoza-Victoria, D.; Quezada-Pascual, F.; Ferrara-Cerrato, R. 1989.** Caracterización de 11 cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* mediante la técnica de inmuno-electrotransferencia (Westerns Blot). Tesis Maestría. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México.
- Espinoza-Victoria, D.; Quezada-Pascual, F.; Ferrara-Cerrato, R. 1989b.** Inconvenientes en el uso de la técnica ELISA convencional con propósitos de identificación de cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli*. II Congreso Nacional sobre fijación biológica de Nitrógeno. Guadalajara, Jal., México.
- FAO. 1984.** Legume inoculants and their use. FAO, Italy.
- Faust, H. ; Sebastianelli, J. A.; Axmann, H. 1989.** Manual de laboratorio. Curso interregional de entrenamiento sobre el uso de  $^{15}\text{N}$  en ciencias de suelos, nutrición vegetal y biotecnología agrícola. FAO/OIEA. Vienna.
- Food and Agriculture Organization of United nations. 1984.** Legume inoculant and their use. FAO. Rome, Italy., pp. 1-3.
- Fried, M. ; Broeshart, H. 1975.** An independent measurement of the amount of nitrogen fixed by a legume crop. *Plant and Soil.* 43:707-711.
- Fried, M.; Danso, S. K. A.; Zapata, F. 1983.** The methodology of measurement of  $\text{N}_2$  fixation by non-legumes as inferred from field experiments with legumes. *Can. J. Microbiol.* 29:1053-1062.
- Fried, M.; Middelboe, V. 1977.** Measurement of amount of nitrogen fixed by legume crop. *Plant and Soil.* 47:713-715.
- García, M. E. 1988.** Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köpen. Quinta edición. México, D. F. pp. 85.
- Giller, K. E. ; Witty, J. F. 1987.** Inmovilized  $^{15}\text{N}$ -fertilizer sources improve the accuracy of field estimates of  $\text{N}_2$ -fixation by isotope dilution. *Soil Biol. Biochem.* 19:459-463.
- Graber, L.F. 1950.** A century alfalfa culture in America. *Agron. J.* 42:525-533. *In: alfalfa in New Mexico and the New Mexico alfalfa breeding program* (Bill Melton Author). Memoir Series Numer 8. College of Agriculture and Home Economics. New Mexico State University Editor.

**Grageda-Cabrera, O. A.** 1990. Cinética de la fijación de nitrógeno en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Tesis de Maestría. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), Irapuato, Gto., México.

**Graham, P. H.** 1981. Some problems of nodulation and symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L. Rev. Field Crops Research. 4:93-112.

**Hagedorn, C.** 1979. Relationship of antibiotic resistance to effectiveness in *Rhizobium trifolii* populations. Soil Sci. Soc. Am. J. 43:921-925.

**Ham, G. E.** 1980. Isotope Techniques in research on biological dinitrogen fixation by legumes. In: IAEA (ed.). Nuclear techniques in the development of management practices for multiple cropping systems. Vienna. pp, 85-94.

**Hansen, J. B. ; Olsen, R. H.** 1978. Isolation of large bacterial plasmids and characterization of the P2 incompatibility group plasmids pMG1 and pMG5. J. Bacteriol. 135:227-238.

**Hanson, C. H.; Tysdal, H. M.; Davis, R. L.** 1966. Alfalfa In: "Forrajes, la ciencia de la agricultura en la producción de pastos". Traducción de la 2a. Edición en inglés por José Luis de la Loma. México. Continental, pp, 151-162.

**Hardarson, G.; Danso, S. K. A.** 1993. Methods for measurement Biological nitrogen fixation in grain legumes. Plant Soil. 152:19-23.

**Hardarson, G.; Danso, S. K. A.; Zapata, F.** 1987. Biological nitrogen fixation in field crops. In: Handbook of Plant Science in Agriculture. Ed. B. R. Christie. pp, 165-192. CRC Press. Inc. Boca Raton, FL.

**Hardarson, G.; Danso, S. K. A.; Zapata, F.** 1991. Measurements of nitrogen fixation in fababean at different N fertilizer rates using the <sup>15</sup>N isotope dilution and 'A-value' methods. Plant and Soil. 131:161-168.

**Hardarson, G.; Heichel, G. H.; Vance, C. P.; Barnes, D. K.** 1981. Evaluation of alfalfa of *Rhizobium meliloti* for compatibility in nodulation and nodule effectiveness. Crop. Sci. 21:62-567.

**Hardarson, G.; Heichel, G. H.; Vance, C. P.; Barnes, D. K.** 1982. Rhizobial strain preference of alfalfa populations selected for characteristics asociated with N<sub>2</sub>-fixation. Crop. Sci. 22:55-58.

**Hardarson, G.; Zapata, F.; Danso, S. K. A.;** 1984b. Field evaluation of symbiotic nitrogen fixation by rhizobial strains using <sup>15</sup>N methodology. Plant and Soil. 82:397-405.

**Hardarson, G.; Zapata, F.; Danso, S. K. A.; Golbs, M.** 1988. Effect of N fertilization on N<sub>2</sub> fixation in fababean (*Vicia faba* L. var *minor*). In: Nitrogen Fixation: Hundred years after. Eds. G. Bothc. F. G. de Bruijn & W. E. Newton. Gustav Fischer, Stuttgart. 814 p.,

**Hardarson, G.; Zapata, F.; Danso, S. K. A. 1988. Dinitrogen fixation measurements in alfalfa ryegrass swards using nitrogen-15 and influence of the reference crop. Crop Sci. 28:101-105.**

**Hardarson, G. 1985. The use of  $^{15}\text{N}$  methodology to assess  $\text{N}_2$  fixation and guidelines for improvement of  $\text{N}_2$  fixation in grain legumes. FAO/IAEA. 25 pp.**

**Hardarson, G. 1993. Methods to enhancing symbiotic nitrogen fixation. Plant Soil. 152:1-19.**

**Hardarson, G. Ed. 1990. Use of nuclear techniques in studies on soil-plant relationships. Training Course Series No. 2. IAEA. Vienna, 223 p.**

**Hardy, R. W. F.; Burns, R. C.; Olster, R. D. 1972. Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. Soil Biol. Biochem. 5:47-48.**

**Haystead, A.; Lowe, A. G. 1977. Nitrogen fixation by white clover in hill pasture. J. Br. Grassl. Soc. 32:57-64.**

**Heichel, G. H.; Barnes, D. K.; Vance, C. P. 1981. Nitrogen fixation of alfalfa in the seeding year. Crop Sci. 21:330-335.**

**Heichel, G. H. 1982. Breeding alfalfa for improved nitrogen fixation a physiological perspective Iowa State J. of Research. 56:255-280.**

**Henzell, E. F.; Martin, E. A.; Ross, P. J.; Haydock, K. P. 1968. Isotopic studies on the uptake of**

**Herridge, D. F.; Marcelos, H.; Felton, W. L.; Turner, J. L.; Peoples, M. B. 1995. Chickpea increases soil-N fertility in cereal systems through nitrate sparing and  $\text{N}_2$ -fixation. Soil Biol. Biochem. 27:545-551.**

**Herridge, D. F. 1982a. Assessment of nitrogen fixation, pp, 123-137.**

**Horst-Marschner. 1993. Mineral nutrition of higher plants. Ed. Acad. Press. Great Britain. 674 p.**

**Hughes, H.; Metcalfe, S. 1976. Forrajes. Traducción al Español. Editado por C.E.C.S.A.México.**

**I.A.E.A. 1990. International Atomic Energy Agency. A guide to nitrogen-15 and radioisotopes in studies of plant nutrition: calculation and interpretation of data. Vienna.**

**International Society of Soil Science- International Soil Reference and Information Centre-Food and Agriculture Organization of the United Nations. 1994. World reference base for soil resources. Rome, Italy. Edt. Food and Agriculture Organization and International Soil Reference and Information Centre. pp. 161.**

**Jenkins, M. B.; Bottomley, P. J. 1985.** Composition and field distribution of the population of *Rhizobium meliloti* in root nodules of inoculated field-grown alfalfa. *Soil Biol. Biochem.* 17:12-179.

**Jhonson, H. S.; Hume, D. J. 192.** Comparison of nitrogen fixation estimates in soybeans by nodule weight, leghemoglobin content, and acetylene reduction. *Can. J. Microbiol.* 23:1424-1432.

**Jones, D. G. 1991.** Symbiotic nitrogen fixation-exploitation an unchieved potential. *Ann. Appl. Biol.* 118:249-259.

**Kado, C. I.; Liu, S. T. 1981.** Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 145:1365-1372.

**Kamicker, B. J.; Brill, W. J. 1986.** Identification of *Bradyrhizobium japonicum* nodules isolates from Wisconsin soybean farms. Methods to alter the recovery and nodule location of *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strains of field-grown soybeans. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:487-492.

**Keya, S. O.; Alexander, M. 1975a.** Factors affecting growth of *Bdellovibrio* on *Rhizobium* Arch. *Microbiol.* 103:37-43.

**Keya, S. O.; Alexander, M. 1975b.** Regulations of parasitism by host density: The *Bdellovibrio-Rhizobium* interrelationship. *Soil Biol. Biochem.* 7:231-237.

**Knowles, R. 1981.** The measurement of nitrogen fixation. *In: Current Perspectives in nitrogen fixation. Proceedings of the Fourth International Symposium on Nitrogen Fixation.* Eds. A. H. Gibson and W. E. Newton., pp, 327-333. Elsevier, North Holland Biomedical Press. Amsterdam.

**Kohl, D. M.; Shearer, G. 1980a.** Estimation of nitrogen fixation based on differences in the natural abundance of <sup>15</sup>N in nodulating and non-nodulating isolines of soybeans. *Plant Physiol.* 66:61-65.

**Kremer, R. J.; Peterson, H. L. 1982.** Nodulation efficiency of legume inoculation by intrinsic antibiotic resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 43:636-642.

**Kuykendall, L. D.; Weber, D. F. 1978.** Genetically marked *Rhizobium* identifiable as inoculant strains in nodule of soybean plant grown in fields populated with *Rhizobium japonicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 36:916-919.

**Ledgard, S. F.; Simpson, J. R.; Bergensen, F. J. 1985b.** Field evaluation of <sup>15</sup>N techniques for estimating nitrogen fixation in legumes-grass associations. *Aust. J. Agric. Res.* 36:247-258.

**Lehninger, A. L. 1978.** *Biochemistry.* Second Ed. Worth Publishers. New York.

**Lie, T. A. D.; Lambers, H. R.; Houwers, A. 1976.** Symbiotic specialization in pea plants: some environmental effects on nodulation and nitrogen fixation. *In: Symbiotic nitrogen fixation.* I. B. P. No. 7. Ed. P. S. Nutman. Cambridge University Press., p. 319-333.

Lincoln, R. J.; Boxshall, J. K.; Clark, P. F. 1995. Diccionario de ecología, evolución y taxonomía. Fondo de Cultura Económica. México.

Lowendorf, H. S. 1980. Factors affecting survival of *Rhizobium* in soil. *Adv. Microbiol. Ecol.* 4:87-124.

Ludwing, W.; Schleifer, K. H. 1994. Bacterial phylogeny based on 16 S and 23 S rRNA sequences analysis. *FEMS Microbiology Reviews.* 15:155-12.

Márquez-Pinto, C.; Yao, P. Y.; Vincent, J. M. 1974. Nodulating competitiveness among strains of *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium trifolii*. *Australian Journal of Agricultural Research.* 25:317-329.

Martínez, G. R. 1986. Comportamiento de la nodulación de alfalfa (*Medicago sativa* L.) bajo dos condiciones de humedad del suelo. Tesis profesional de licenciatura. Escuela de Agronomía y Zootecnia. Universidad de Guanajuato. Gto., México.

Martínez-Romero, E.; Palacios, G. 1990. The *Rhizobium* genome. *CRC Critical Review. Plant Sci.* 9:59-93.

Martínez-Romero, E.; Segovia, F.; Martins-Mercante, F.; Franco, A. A.; Pardo, M. A. 1991. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L., beans and *Leucaena* sp trees. *Intr. J. Syst. Bacteriol.* 41:417-426.

Martínez-Romero, E. 1994. Recent developments in *Rhizobium* taxonomy. *Plant Soil.* 161:11-20.

Martínez-Romero, E.; Caballero-Mellado, J. 1996. *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetics diversity. *Crit. Rev. Plant Sci.* 15:113-140.

Mazcorro, V. E.; De La Fuente, H. J.; Jiménez, M. L.; González M. 1991. La producción agropecuaria en la Comarca Lagunera 1960-1990. Universidad Autónoma de Chapingo, México.

McAuliffe, C.; Chamblee, D. S.; Uribe-Arango, H.; Woodhouse Jr, W. W. 1958. Influence of inorganic nitrogen on nitrogen fixation by legumes as revealed by <sup>15</sup>N. *Agron. J.* 50:334-337.

McNeely, J. A.; Miller, K. R.; Reid, W. V.; Mittermeir, R. A.; Werner, T. B. 1990. Conserving the world's biological diversity. World Bank. Washington.

Mercado-Blanco, J.; Toro, N. 1996. Plasmid in rhizobia: The role of nonsymbiotic plasmids. *Mol. plant Microbe Interactions.* 7:535-545.

Meyer, J. H. 1959. Influence of the method of preparation on the feeding value of alfalfa. *J. Anim. Sci.* 18:976-982.

**Meyers, J. A. ; Sánchez, D. Elwell, L. P.; Falkow, S. 1976. Simple agarose gel electrophoretic method for identification and characterization of plasmid desoxirbonucleic acid. J. bacterol. 127:1529-1537.**

**Michels, J.; Vanderleyen, J. 1994. Molecular basis of the establishment and functioning of a N<sub>2</sub>-fixation root nodule. World J. Microbiol. Biotech. 10:612-630.**

**Molina, J. D. 1983. Recursos agrícolas de zonas áridas y semiáridas de México. Simposium. Centro de Genética. Colegio de Posgrado. Chapingo, México.**

**Musser, J. M.; Bemis, D. A.; Ishikawa, H.; Selander, R.K. 1987. Clonal diversity and host distribution in *Bordetella bronchiseptica*. J. Bacteriol. 169:2793-2803.**

**Obaton, M. 1983. General information on nitrogen fixing symbiosis *Rhizobium*-legume. FAO/GRET. 1/4p.**

**OIEA/FAO. 1992. Organismo Internacional de Energía Atómica/Organización para la alimentación y Agricultura de las Naciones Unidas. Atomos para una mayor productividad del suelo. Viena, Austria. International Atomic Enrgy Agency/Food and Agriculture Organization of United Nations. Boletín informativo. pp. 8.**

**Olalde-Portugal, V. 1986. Comportamiento ecológico de cepas nativas de *Rhizobium meliloti*. Tesis Doctoral. CINVESTAV-IPN-UI. Irapuato, Gto., México.**

**Olalde Portugal, V.; Peña-cabriales, J.J. 1989. Poblaciones nativas de *R. meliloti* en el Bajío, México, I: Diversidad, dominancia y efectividad. Rev. Later-mer. Microbiol. 31:279-283.**

**Olsen, R.A. and Beken L.R. 1987. Viability of soil bacteria: Optimization of plate-couting technique and comparison between total counts and plate counts within different size group. Microb. Ecol. 13:59-74.**

**Ortiz-Villanueva, B.; Ortiz-Solorio, C. A. 1984. Edafología. Universidad Autónoma de Chpingo. p. 345-353. Chapingo, México.**

**Pastorini, D. 1992. Métodos de identificación de rhizobios. ALAR. 16:12-20.**

**Pate, J. S. 1976. Physiology of the reaction on nodulated legumes to environment. In: Symbiotic fixation in plants. I.B.P. No. 7. Ed. P.S. Nutman. Cambridge University Press. p.335-360.**

**Patterson, T. G.; LaRue, T. A. 1983. Nitrogen fixation by soybeans: Seasonal and cultivar effects and comparison of estimates. Crop Sci. 23:488.492.**

**Peña-Cabriales, J. J. 1989. La fijación de nitrógeno en México Resúmenes del 2o. Congreso Nacional de la Fijación Biológica de Nitrógeno. Guadalajara, Jal., México.**

**Peña-Cabriales, J. J.; Alexander, M. 1979.** Survival of *Rhizobium* in soils undergoing drying. *Soil Sci. Am. J.* 43:962-966.

**Peña-Cabriales, J. J.; Alexander, M. 1983b.** Growth of *Rhizobium* in soil amended with organic matter. *Soil Sci. Soc. AM. J.* 47:241-245.

**Peña-Cabriales, J. J.; Grageda-Cabrera, O. A ; Kola, V.; Hardarson, G. 1993.** Time course of N<sub>2</sub> fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Soil.* 152:115-121.

**Peña-Cabriales J. J. y Grageda-Cabrera O. A. 1997.** Dinámica del nitrógeno en el ecosistema agrícola. In: José Ruiz Herrera, Doralinda Guzmán de Peña y Juan José Peña Cabriales (eds.). *Perspectivas de la Microbiología en México.* IPN.

**Peña-Cabriales, J. J.; Olalde-Portugal, V.; Montoya, C. L. 1989.** Manual práctico de fijación biológica de nitrógeno. Curso precongreso. 2o. Congreso de la Fijación Biológica de Nitrógeno. Guadalajara, Jal., México.

**Peoples, M. B.; Faizah, A. W.; Rerkansen, B.; Herridge, D. F. 1989.** Methods for evaluating nitrogen fixation by nodulated legumes in the field. Australian Centre for International Agricultural Research. Canberra. 76 p.

**Piñero, D.; Martínez, E.; Selander, R. K. 1988.** Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2825-2832.

**Poth, M.; La Favre, J. S.; Focht, D. D. 1986.** Quantification by direct <sup>15</sup>N dilution of fixed N<sub>2</sub> incorporation into soil by *Cajanus cajanum* (Pigeon pea). *Soil Biol. Biochem.* 18:125-127.

**Pozo, M. del, 1977.** La alfalfa, su cultivo y aprovechamiento. 2a. edición. Mundi Prensa. Madrid.

**Quiroga, G. H. M.; Cueto-Wong, J. A.; Nava, C. A.; Castro, M. E.; Moreno, A. L. M. 1991.** Guía para el estudio de la alfalfa en la Comarca Lagunera. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Centro de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (SAH-INIFAP-CIFAP). Folleto para productores No. 2. Centro Agrícola Experimental La Laguna (CAELALA). Matamoros, Coah., México.

**Quiroga, V. B. 1981.** Fijación biológica de nitrógeno. Proceso simbiótico. Seminario técnico de investigaciones agrícolas del norte. CIAN. 6: 3. Matamoros, Coah., México.

**Rathore, T. R.; Chankar, P. K.; Sachan, R. S.; Ghildyal, B. P. 1981.** Effect of soil moisture stress on legume *Rhizobium* symbiotic in soybeans. *Plant Soil.* 60:445-450.

**Rawn, J. D. 1989.** Bioquímica. Vol. II. 1ª. Edición. Interamericana. McGraw-Hill., pp, 992-999.

- Reichardt, K.; Hardarson, G.; Zapata, F.; Kirda, C.; Danso, S. K. A. 1987.** Site variability effect on field Measurement of symbiotic nitrogen fixation using the  $^{15}\text{N}$  isotope dilution method. *Soil Biol. Biochem.* 19:405-409.
- Rennie, R. J.; Dubetz, S.; Bole, J. B.; Muendel, H. 1982.** Dinitrogen fixation measured by nitrogen-15 dilution in 2 Canadian soybean (*Glycine max*) cultivars. *Agron. J.* 74:725-20.
- Rennie, R. J.; Dubetz, S. 1986.** Nitrogen-15 determined nitrogen fixation in field-grown chickpea, lentil, fababean and field pea. *Agron. J.* 78:654-660.
- Rennie, R. J.; Kemp, G. A. 1983a.**  $\text{N}_2$  fixation in field beans quantified by  $^{15}\text{N}$  isotope dilution. I. Effect of strain of *Rhizobium phaseoli*. *Agron. J.* 75:640-644.
- Rennie, R. J.; Kemp, G. A. 1983b.**  $\text{N}_2$  fixation in field beans quantified by  $^{15}\text{N}$  isotope dilution. II. Effect of strain of *Rhizobium phaseoli*. *Agron. J.* 75:645-649.
- Rennie, R. J.; Kemp, G. A. 1984.**  $^{15}\text{N}$ -determined time course for  $\text{N}_2$  fixation in two cultivars of field beans. *Agron. J.* 76:146-154.
- Rennie, R. J. 1979.** Comparison of  $^{15}\text{N}$ -aided methods for determining symbiotic dinitrogen fixation: *Rev. Ecol. Biol. Sol.* 16:455-463.
- Rennie, R. J. 1982.** Quantifying dinitrogen ( $\text{N}_2$ ) fixation in soybeans by nitrogen-15 isotope dilution: The question of the non fixing control plant. *Can J. Bot.* 60:856-861.
- Rodríguez, M. R. 1985.** Estudios sobre la fijación biológica de nitrógeno en alfalfa (*Medicago sativa* L.) en la Comarca Lagunera. Tesis de Licenciatura. Escuela Superior de Biología. Universidad Juárez del Estado de Durango. Gómez Palacio, Dgo., México.
- Rosas, J. C. 1983.** Partitioning of dry matter, nitrogen fixation and seed yield of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) influenced by genotype and nitrogen fertilization. Ph. D. Thesis. Univ. Wisconsin, Madison. 121 p.
- Rosswall, T.; Paustian, K. 1984.** Cycling of nitrogen in modern agriculture systems. *Plant and soil.* Royal Netherlands Society of Agricultural Science/Martinus Nijhoff & W. Junk/Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Netherlands. Bimonthly Publ. 76 (1):3-21.
- Ruschel, A. P.; Vose, P. V.; Victoria, R. L.; Salati, E. 1979.** Comparison of isotope techniques and non-nodulating isolines to study the effect of ammonium fertilization on the dinitrogen fixation in soybean, *Glycine max*. *Plant and Soil* . 53:513- 525.
- SAGAR. 1997.** (Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural). Anuario Estadístico de la Producción Agropecuaria. Región lagunera, Durango-Coahuila.

Salazar-Sosa, E. 1997. Comunicación personal. Facultad de Agronomía y Zootecnia. Universidad Juárez del Estado de Durango.

Sánchez, C. A.; Blackmer, A. M.; Horton, R.; Timmons, D. R. 1987. Assesment of errors associated with plot size and lateral movement of  $^{15}\text{N}$  when Studying fertilizer recovery under field conditions. Soil Science. Williams & Wilkins. Baltimore, Maryland, USA. Monthly publ. 144 (5):344-351.

Sánchez, F. 1985. Fijación simbiótica de nitrógeno: bioquímica, biología molecular y perspectivas de la ingeniería genética. In: Perspectivas de la biotecnología en México. Fondo Javier Barrios Sierra. México., pp. 413-433.

Segovia, L.; Piñero, D.; Palacios, R.; Martínez-Romero, E. 1991. Genetic structure of a soil population of nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum*. Appl. Environ. Microbiol. 57:426-433.

Segovia, L.; Yung, J. P.V.; Martínez-Romero E. 1993. Reclassification of american *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. Inter. J. Syst. Bacteriol. 43:32-378.

Selander, R. E.; Cauganth, D. A.; Ochman, H.; Musser, J. M.; Gilmour, M. N.; Whittman, T. S. 1986. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematic. Appl. Environ. Microbiol. 51:82-884.

Selander, R. K. ; McKinney, R. M.; Whittam T. S.; Bibb, W. F.; Brenner, D. J.; Nolte, F. S.; Pattison P. E.; 1985. Genetic structure of populations of *Legionella pneumophila*. J. Bacteriol. 163: 1021-1037.

Selander, R. K.; Beltran, P.; Smith, N. H.; Barker, R. M.; Crichton P. B.; Old, D. C.; Musser, J. M.; Wittam, T. S.; 1990a. Genetic populations structure, clonal phylogeny and pathogenesis of *Samonella paratyphi*. B. Infect. Inmun. 58: 1891-1901.

Selander, R. K.; Beltran, P.; Smith, N. H.; Helmuth, R.; Rubin F. A.; Kopecko, D. J.; Ferris, K.; Tall, B.D.; Cravioto, A.; Musser, J. M. 1990b. Evolutionary genetic relationships of clones of *Salmonella* serovars that cause human typhoid ans other enteric fevers. Infect. Inmun. 58:2262-2275.

Selander, R. K.; Caugant, D. A.; Ochman, H.; Musser, J. M.; Gilmour, M. N.; Wittam, T. S. 1986. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. Appl. Environ. Microbiol. 51:873-884.

Shech, Ree. 1977. Agriculture made in New Mexico possible. N. Mex. Agric. Exp. Sta. Ext. Ser., and NMDA.42:525-533. In: alfalfa in New Mexico and the New Mexico alfalfa breeding program (Bill Melton Author). Memoir Series Numer 8. College of Agriculture and Home Economics. New Mexico State University Editor

Sicardi, M.; Castells, A. 1972. Características simbióticas de *Rhizobium meliloti* en la zona del Basalto. VI reunión Latinamericana sobre *Rhizobium*. Montevideo, Uruguay.

- Sinclair, M. J.; Eaglesham, A. R. L. 1980.** Intrinsic antibiotic resistance in relation to colony morphology in three populations of west african *Rhizobia*. *Soil Biol. Biochem.* 16:247-251.
- Singlenton, P. W.; Sainsbury, D. 1981.** Dictionary of microbiology. Wileyand Sons. New York.
- Singlenton, P. W.; Tavares, J. W. 1986.** Inoculation response of legumes in relation to the number and effectiveness of indigenous *Rhizobium* populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:1013-1018.
- Somasegaran, P. Hoben, J. H. 1985.** Methods in legume *Rhizobium* technology. Niftal. Hawaii. USA.
- Souza, V.; Eguiarte, L.; Avila, G.; Capello, R.; Gallardo, C.; Montoya, J.; Piñero, D. 1994.** Genetic structure of *Rhizobium etli* bv. *phaseoli* associated with wild and cultivated bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. and *Phaseolus coccineus*) in Morelos, Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1260-1268.
- Souza, V. 1990.** Genética y ecología de poblaciones en *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* asociadas a *Phaseolus vulgaris* y a *Phaseolus coccineus* silvestres y cultivados en Morelos, México. Tesis Doctoral. UNAM, México.
- Sprent, J. I. 1972.** The effect of water stress on nitrogen-fixing root nodules. *New Phytologist.* 70:9-17.
- Stanford, P.; Pate, J. S.; Unkovich, M. J. 1994.** A survey of the proportional dependence of subterranean and other pasture legumes on N<sub>2</sub> fixation in south-west Australis utilizing <sup>15</sup>N natural abundance. *Aust. J. Res.* 45:165-181.
- Steel, R. G.; Torrie, J. H. 1960.** Principles and procedures of statistics. First edit. Mc Graw-Hill Inc. New York, N. Y., pp. 481.
- Stein, M.; Bromfield, E. S. P.; Dye, M. 1982.** A assessment of a method based on intrinsic antibiotic resistance identifying *Rhizobium* strains. *Ann. Appl. Biol.* 101:261- 267.
- Thies, J. E.; Singleton, P. W.; Bohlool, B. B.; 1992.** Environmental effects of competition for nodule occupancy between introduced and indigenous rhizobia and among introduced strains. *Can. J. Microbiol.* 39:493-500.
- Valdez, M. 1980.** Avances para una mejor utilización de la fijación biológica de nitrógeno como un recurso biótico. *In: Memorias del Seminario Interamericano sobre recursos bióticos nuevos y subutilizados.* Medellín, Colombia.
- Valdez, M. y Humbell, D. H. 1974.** Fertilizantes naturales para plantas leguminosas (inoculación). Instituto Politécnico Nacional. México.
- Vallis, I.; Haydock, K. P.; Ross, P. J.; Henzell, E. F. 1967.** Isotopic studies on the uptake of nitrogen by pasture plants. *Aust. J. Agric. Res.* 18:865-877.

Vallis, I.; Haydock, K. P.; Ross, P. J.; Henzell, E. F. 1977. Uptake of soil nitrogen by legumes in mixed swards. *Aust. J. Agric. Res.* 28:413-425.

Vasilas, B. L.; Ham, G. E. 1984. Nitrogen fixation in soybeans: An evaluation of measurement techniques. *Agron. J.* 76:759-764.

Vásquez-Arroyo, J. 1996. Fijación biológica de nitrógeno en frijol de temporal y la diversidad genética de las poblaciones nativas de *Rhizobium*. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. San Nicolás de los Garza, N. L. México.

Vásquez-Avila, M. E. 1996. Comunicación Personal. Autor del "Plan M. E. V. A. Agua para La Laguna. Torreón, Coah., México.

Vincent, J. M. 1970. A manual of practical study of root nodule bacteria. Biological program Handbook No. 15 Blackwell Scientific Publications Oxford.

Vincent, J. M. 1975. Manual práctico de Rhizobiología. Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina.

Vincent, J. M. 1976. Nitrogen fixation in legumes. ed. Academic. Press. Australia. 285 p.

Vincent, J. M. 1977. *Rhizobium*: General microbiol. En: A treatise on dinitrogen fixation. Ed. R. W. F. Hardy y J. W. Silver. Sec. III Biology. Wiley-Interscience, p. 277-367.

Vose, P. B.; Ruschel, A. P.; Victoria, R. L.; Saito, S. M. T.; Matsui, E. 1982. Nitrogen-15 as a tool in the biological nitrogen fixation research. *In: Biol. nitrogen fixation Technol. Trop. Agric.* Eds. H: Graham & S. C. Harris., pp, 575-592.

Vose, P. B.; Victoria, R. L. 1986. Re-examination of the limitations of nitrogen-15 isotope dilution technique for the field measurement of dinitrogen fixation. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 677:23-41.

Wagner, G. H.; Zapata, F. 1982. Field evaluation of reference crops in the study of nitrogen fixation by legumes using isotope techniques. *Agron. J.* 74:607-612.

Weaver R. W. 1986. Measurement of the biological dinitrogen fixation in the field. *In: Field Measurement of Dinitrogen Fixation and Denitrification.* Eds. R. D. Hauck and R. W. Weaver. , pp, 1-10. SSSA Special Publication No. 18.

Werner, D. 1992. Symbiosis of plants and microbes. Ed. Chapman and Hall. Germany. 389 p.

West, C. P.; Wedin, W. F. 1985. Dinitrogen fixation in alfalfa-orchard grass pastures. *Agron. J.* 77: 89-94.

West, N. E. 1979. Nutrient cycling in desert ecosystems *In: arid land ecosystems.* Vol. 1. Ed. B. W. Goodall y R. A. Perry. I. B. P. No. 16. Cambridge University Press.

**Westerman, D. T. Porter, L. K.; O'Deen, W. A. 1985. Nitrogen partition and mobilization patters in bean plants. Crop Sci. 25:225-229.**

**Witty, J. F.; 1983. Estimation of N<sub>2</sub>-fixation in the field using <sup>15</sup>N-labelled fertilizer: Some problems and solutions. Soil Biol. Biochem. 15:631-640.**

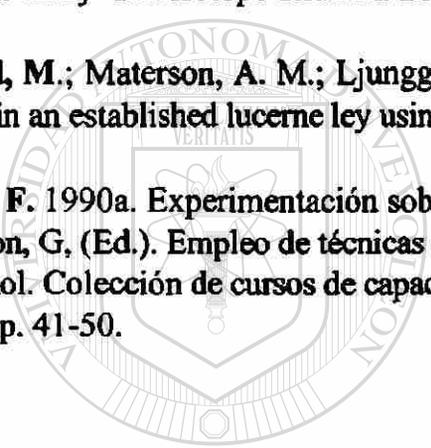
**Witty, J. F.; Minchin, F. R. 1988. Measurement of nitrogen fixation by the acetilene reduccion assay; myths and mysteries. In: Nitrogen Fixation by Legumes in Mediterranean Agriculture. Eds. D. P. Beck & L. A. Materon., pp 331-344. Martinus Nijhoff Publishers, dordrecht.**

**Witty, J. F.; Ritz, K. 1984. Slow-release nitrogen-15 fertilizer formulations to measure nitrogen fixation by isotope dilution. Soil Biol. Biochem. 16:657-661.**

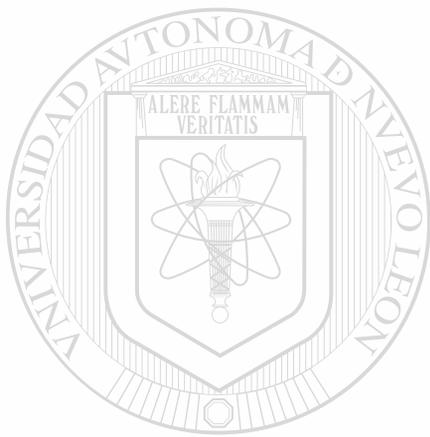
**Witty, J. F. 1984. The validity of some assumptions inherent in the application of the acetylene reduction assay and isotope dilution. Biological N<sub>2</sub> fixation Newsletter. 12:1-3.**

**Wivstad, M.; Materson, A. M.; Ljunggren, H. D. 1987. Field measurement of symbiotic nitrogen fixation in an established lucerne ley using <sup>15</sup>N and an acetylene reduccion. Plant and Soil. 97:93-104.**

**Zapata, F. 1990a. Experimentación sobre terreno en estudios realizados con ayuda de isótopos. In: Hardarson, G, (Ed.). Empleo de técnicas nucleares en los estudios de la relación suelo-planta. Versión en español. Colección de cursos de capacitación No. 2. Organismo Internacional de energía Atómica. Viena, pp. 41-50.**



UANTL  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN®  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



