UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE AGRONOMIA



EFECTO DE DIFERENTES NIVELES DE MOLIBDENO EN LA NODULACION Y DESARROLLO DEL FRIJOL (Phaseolus vulgaris L.)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO AGRONOMO FITOTECNISTA

PRESENTA

ALFREDO CAMPOS CONTRERAS

MARIN, N. L. ABRIL DE 1987

T
SB327
C34
c.1


1080061021

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE AGRONOMIA

EFECTO DE DIFERENTES NIVELES DE MOLIBDENO EN LA NODULACION Y DESARROLLO DEL FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO AGRONOMO FITOTECNISTA

P R E S E N T A

ALFREDO CAMPOS CONTRERAS

MARIN, N. L. ABRIL DE 1987

007251

F
SB327
.634

Biblioteca Central
Magna Solidaridad
F. Tesis

BU Raúl Rangel Frías
UANL
FONDO
TESIS LICENCIATURA

040.635
FA5
987
C.5

ESTE TRABAJO FUE DESARROLLADO DENTRO DEL PROYECTO DE INVESTIGACION "FIJACION BIOLOGICA DEL NITROGENO" DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON (CIA-FAUANL).

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE AGRONOMIA

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

"Efecto de diferentes niveles de Molibdeno en el Desarrollo y Nodulación del Frijol (Phaseolus vulgaris L.)"

Tesis que presenta **ALFREDO CAMPOS CONTRERAS** como requisito parcial para optar por el título de INGENIERO AGRONOMO FITOTECNISTA

COMISION REVISORA:

ING. RONALD J. LECEA JUAREZ
Asesor Principal

ING. M.C. MAURO RODRIGUEZ C.
Asesor Auxiliar

ING. M.C. FRANCISCO RODRIGUEZ E.
Asesor Auxiliar

MARIN, N.L.

MARZO DE 198

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a las siguientes personas:

Ing. Ronald J. Lecea Juárez

M.C. Mauro Rodríguez Cabrera

M.C. Francisco Rodríguez E.

por su gran apoyo y orientación para realizar el presente trabajo.

A mi Escuela

Al Proyecto de Fijación Biológica del Nitrógeno

DEDICATORIA

A MIS PADRES:

Sr. Luis Campos Martínez

Sra. María Contreras de Campos

Como un reconocimiento justo a los sacrificios y privaciones que pasaron para que saliera adelante.

A MIS HERMANOS:

Maricela

José Luis

María del Rosario

Antonio

Guadalupe

Juan Carlos

Vicente

Jorge Eduardo

Por su ejemplo y ayuda desinteresada.

A todos mis familiares, compañeros, amigos y a todas las personas que intervinieron directa o indirectamente en el desarrollo de este trabajo.

Para Angélica:

Con todo cariño por ser alguien muy especial en mi vida.

INDICE

Página

I. INTRODUCCION. 1

II. REVISION DE LITERATURA. 3

2.1. Origen del frijol. 3

2.1.1. Características botánicas. 4

2.1.2. Importancia mundial. 6

2.1.3. Importancia nacional. 6

2.1.4. Importancia regional y local. 7

2.2. El metabolismo del Nitrógeno. 10

2.2.1. Importancia del Nitrógeno en las plantas. . . 10

2.2.2. Formas de Nitrógeno disponibles para la planta. 11

2.2.3. Etapas esenciales del ciclo del Nitrógeno. . 12

2.2.4. Aminización o aminificación. 13

2.2.5. Amonificación. 13

2.2.6. Nitrificación. 14

2.2.7. Desnitrificación. 15

2.2.8. Perdidas de Nitrógeno aprovechable. 15

2.3. Características de Rhizobium sp. 18

2.3.1. Clasificación taxonómica. 18

2.3.2. Descripción morfológica. 20

2.4. La relación Planta-Bacteria. 21

2.4.1. Principios que explican la relación Rhizobium -Leguminosa. 21

2.4.2. Infección y formación de nódulos. 22

Página

2.4.3. Infectividad y efectividad. 29

2.5. Bioquímica de la Fijación de Nitrógeno. 30

2.6. Factores que afectan a la relación Rhizobium-Leguminosa. 35

2.6.1. Factores físicos. 36

2.6.1.1. Temperatura. 36

2.6.1.2. Reacción del Suelo. 38

2.6.1.3. Humedad. 39

2.6.1.4. Luz. 39

2.6.2. Factores Químicos. 40

2.6.2.1. Nitrógeno. 40

2.6.2.2. Fósforo. 42

2.6.2.3. Potasio. 43

2.6.2.4. Azufre. 43

2.6.2.5. Calcio. 43

2.6.2.6. Fierro. 43

2.6.2.7. Cobalto. 44

2.6.2.8. Cobre. 44

2.6.2.9. Boro. 44

2.7. Elementos tóxicos en la nodulación. 45

2.8. Importancia del Molibdeno (Mo). 45

2.8.1. Formas en el suelo. 46

2.8.2. Interacción con otros elementos. 48

2.8.3. Deficiencias y toxicidad. 49

2.8.4. Fertilizantes con Mo. 50

2.9. Función en la planta. 51

2.10. Hidroponia. 54

Página

III. MATERIALES Y METODOS. 57

IV. RESULTADOS Y DISCUSION. 62

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES. 64

VI. RESUMEN. 66

VII. BIBLIOGRAFIA. 67

VIII. APENDICE. 73

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadros del Texto Pág.

1 Principales países productores de frijol en el mundo. . . 8

2 Principales estados productores de frijol en México.. . . 9

Cuadros del Apéndice

1 Análisis de varianza para el número de hojas. 74

2 Análisis de varianza para el número de flores. 74

3 Análisis de varianza para el número de botones. 74

4 Análisis de varianza para el peso fresco. 75

5 Análisis de varianza para el peso seco. 75

6 Análisis de varianza para el porcentaje de nitrógeno fijado por la planta. 75

7 Análisis de varianza para gramos de nitrógeno fijado por planta. 76

8 Análisis de regresión para gramos de nitrógeno por planta. 76

Figuras del Texto

1 Representación esquemática del ciclo del nitrógeno. . . . 16

2 Etapas de la formación de un nódulo radical. 23

3 Ciclo de Rhizobium leguminosarum mosirando su plemorfismo. 24

4 Ciclo de BISSET 24

Figuras del Texto Pág.

5 Interacción entre la bacteria Rhizobium y las raíces de la leguminosa antes de la infección. 26

6 Fijación de nitrógeno en la bacteria. 33

7 Esquema de la fijación de nitrógeno por el nódulo de una leguminosa. 34

8 Efecto de la temperatura en la sobrevivencia de Rhizobium meliloti en un suelo de arena fino franca. 37

9 Curva de regresión para la toxicidad por Molibdeno y gramos de nitrógeno por planta. 65

INTRODUCCION

El conocimiento sobre el papel de los micronutrientes en suelos, plantas, nutrición animal y alimentos para el hombre se ha incrementado rápidamente en los últimos años. La experiencia de diversas disciplinas científicas, combinada con los instrumentos sofisticados ha extendido el conocimiento acerca de los micronutrientes en plantas y suelos a niveles moleculares y a los microambientes de las raices del suelo. La aplicación de micronutrientes a suelos deficientes ha producido incrementos notables en los rendimientos por hectárea y, en muchas áreas del mundo, los suelos pueden aún ser deficientes en uno o varios micronutrientes.

Por otra parte, la creciente escases de fertilizante, el alto requerimiento de energía para su fabricación y principalmente el incremento de su producción, han producido gran interés en la búsqueda de tecnologías y alternativas para obtenerlo.

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

Desde el punto de vista agronómico, la asociación simbiótica

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

El presente trabajo tiene como objetivos:

1. Obtener una dósis óptima fisiológica de Molibdeno (Mo).
2. Comprobar si el Mo considerado como un microelemento esencial en la nutrición produce el efecto deseado.

HIPOTESIS

Ho_1: No existe diferencia significativa en la aplicación de diferentes dosis de molibdeno y por lo tanto todos los tratamientos son iguales.

HA_1: Al menos un tratamiento es diferente de los demas en cuanto a la aplicación de molibdeno.

Ho_2: El Mo influye en la nodulación y fijación de nitrógeno.

HA_2: No existe influencia del Mo en la nodulación y fijación de nitrógeno.

II LITERATURA REVISADA

2.1. Orígen de Phasolus vulgaris L.

Los centros de orígen tienen gran importancia por que vîncula a - las especies bajo cultivos con sus progenitores silvestres, lo que permite disponer de una fuente de genes útiles que, o bien ya se - perdieron en el cultivo, o nunca se ha encontrado con ellos y que sería útil introducir. (16)

Esta especie tiene su centro de orígen en el área occidental y sur de México, en Guatemala y en Honduras. Las formas silvestres de Phaseolus vulgaris en México, crecen a lo largo de una franja - de transición ecológica entre los 500 y 1,800 msnm.

Se han encontrado restos de Phaseolus vulgaris con una antigue dad de 6000 a 7000 años antes del presente en Tehuacan, Pue., México, 1000 a 2500 años antes del presente, en el suroeste de América.

Se han encontrado restos de Phaseolus coccineus en tres locali dades: región de Ocampo, Tamaulipas, con una antiguedad de 7500 a - 9000 años antes del presente; 2200 años del presente en Tehuacan, - Pue., y 1300 años antes del presente en Rio Zape, Sonora.

El número de especies que pertenecen al genero Phaseolus es - desconocido; sin embargo estas investigaciones consideran que po-- dría contener alrededor de 1500 especies. (25)

En México el número de especies fructua alrededor de 50 y entre ellas figuran las cuatro especies que ha domesticado el hombre como son: Phaseolus vulgaris L., Phaseolus coccineus L., Phaseolus lunatus L., y Phaseolus acuatifolius Gray.

Phaseolus vulgaris es una especie que se considera como autogama - debido a que la estructura floral impide la polinización cruzada - del frijol y esto se debe a que las anteras generalmente dejan caer el polen sobre los estigmas antes de que abra la flor, realizandose de esta forma la autopolinización.(35)

No obstante que la quilla proteje a los estambres y el pistilo, existen muchos factores como: la variedad, condiciones ambientales, época del año, etc., que hacen posible el crusamiento natural y se ha encontrado los siguientes porcentajes de entrecruza- - miento: 0 a 13%. 1 a 8.26% 1.2 a 4.5%, 1.2 a 7% y 6.2 a 10% respectivamente. (25)

2.1.1. Características botánicas

Principales especies:

Phaseolus vulgaris L. (frijol común).

Phaseolus coccineus L. (frijo acoyote).

Phaseolus lunatus L. (frijol lima).

Phaseolus acuatifolius Gray (frijol tepary).

La especie más importante desde el punto de vista agrícola es Phaseolus vulgaris L. o frijol, judía, alubia, abichuelas, porotos, etc.,(35,37)

La planta es herbácea y anual, presenta una raíz típica o pivotante ramificada en su orígen, en la que después se notan nudosidades bacterianas que fijan nitrógeno atmosférico. Los tallos son - herbáceos de crecimiento determinado o indeterminado. Las hojas, - las dos primeras son simples y a partir del tercer par son hojas -

compuestas, alternas y pecioladas de color verde claro, con tres - foliolos cordiformes (trifoliadas), y provistas de estípulas y estípulillas persistentes.

La infloresencia es un racimo, las flores son pediceladas, tienen forma amariposada, presentan un color variable en las distintas especies (rojo, blanco, morado, etc.); la flor consta de cinco sépalos, cinco pétalo, diez estambres y un pistilo. (35)

2.1.2. Importancia mundial

Se ha observado que cuatro especies de Phaseolus han venido proporcionado alimentos a los pueblos de América desde antes de la llegada de Colón, y en la actualidad se cultivan en forma extensiva en todo el mundo. (16)

Se reportó que la superficie a nivel mundial de frijol en 1980 fué de 26 286 millones de hectáreas, las cuales produjeron 14.7 millones de toneladas de frijol.

En el cuadro 1 se muestran los principales productores de frijol en el mundo, se observa que cerca de un tercio de la producción mundial de frijol proviene de América Latina, superando a México, en este Continente Americano solamente por Brasil.

En cuanto a la superficie sembrada, en este mismo cuadro, México se situa en un cuarto lugar a nivel mundial con respecto a sus hectáreas cosechadas, superado solo por la India, Brasil y China.

En cuanto a su rendimiento, México ocupa el vigésimo primer - lugar con 551 kg/ha.

2.1.3. Importancia nacional

Se reportó que la superficie cosechada de frijol en 1982 fué de -- 1'771,978 hectáreas bajo condiciones de temporal como en riego con un rendimiento promedio de 638 kg/ha. Y una producción de 1'093,079 toneladas. Sin embargo esta producción no fue suficiente debido a que el consumo nacional fue de 1'204,492 toneladas de frijol y esto trajo como consecuencia la importación de 147 000 toneladas de grano en 1982 para satisfacer la demanda de esta leguminosa a nivel nacional. (48)

Los principales estados productores, superficie cosechada, rendimiento por hectárea y el valor de la producción se presentan en el cuadro 2 . Los estados de mayor superficie cosechada y producción obtenida de frijol son: Zacatecas, Durango, Chihuahua, Sinaloa, Nayarit y Jalisco. Además de los estados de Nayarit, Sinaloa y Chihuahua que destacan por su alto rendimiento unitario.

2.1.4. Importancia regional y local

El estado de Nuevo León cuenta con una superficie total de 6'455,500 hectáreas de las cuales 322,680 has. son cultivables y se cosechó una superficie total de 229,730 has., de éstas, 137,899 fueron de riego y 91,831 bajo condiciones de temporal en 1983.

Estas superficies se siembran principalmente con cultivos como: maíz de grano, trigo, sorgo de grano, naranja y el quinto lugar el frijol con una superficie de 9,456 has., en el estado, de las cuales 7,313 fueron bajo condiciones de temporal y 2,274 bajo condiciones de riego, con un rendimiento promedio global de 0.454 ton/ha.

En el distrito de riego 004 "Don Martín" Coahulia y Nuevo León, se siembra una superficie anual aproximada de 26,951 has. dependiendo del volúmen de agua almacenada.

En la presa "Venustiano Carranza", se cuenta con un número aproximado de 1903 usuarios. Los principales cultivos anuales que se siembran son: trigo, sorgo, maíz, frijol y cultivos forrajeros (plan de investigación del programa de frijol 1983).

De la superficie antes mencionada, solamente se dedican alrededor de 1,500 a 2,000 ha . bajo condiciones de riego a esta leguminosa con un rendimiento medio alcanzado de 0.8 ton/ha., en la región de Anáhuac (distrito de riego 004) (48).

Cuadro

PRINCIPALES PAISES PRODUCTORES DE FRIJOL EN EL MUNDO,
SARH-DGEA, 1980

CONTINENTE Y PAIS	SUP. COS. MILES DE HAS.		REND. KG/HA.	PROD. MILES TON.	
América					
México	1,763	6.70	551	971	6.62
Argentina	205	0.78	1,146	235	1.60
Brasil	4,306	16.38	459	1,975	13.47
Colombia	118	0.45	695	82	0.56
Chile	111	0.42	757	84	0.57
E.U.	743	2.83	1,594	1,184	8.08
Guatemala	116	0.44	690	80	0.55
Africa					
Burundi	258	0.98	671	173	1.18
Camerún	154	0.58	636	98	0.67
Rwnada	216	0.82	815	176	1.20
Tanzania	300	1.14	500	150	1.02
Uganda	360	1.37	500	180	1.23
Zaire	166	0.63	566	94	0.64
Asia					
Birmania	312	1.19	593	185	1.26
China	4,152	15.83	806	3,355	22.88
India	8,700	35.10	322	2,800	19.09
Iran	94	0.36	1,064	100	0.68
Japón	95	0.36	1,716	163	1.11
Tailandia	425	1.62	647	875	1.88
Turquia	103	0.39	1,553	160	1.09
Europa					
España	128	0.49	633	81	0.55
Italia	49	0.19	1,673	82	0.56
URSS	50	0.19	1,800	90	0.61
Yugoslavia	149	0.57	1,074	160	1.09
Resto del Mundo	3,203	12.19	540	1,731	11.81
Total Mundial	26,286	100.00	558	14,664	100.00

Cuadro 2

PRINCIPALES ESTADOS PRODUCTORES DE FRIJOL EN MEXICO, SARH-DGEA
1982

COSECHA	SUP. COS HAS.	REND. TON/HA.	PROD. TON.	VALOR MILES DE LA COSECHA
Zacatecas	428,156	0.471	201,731	4'256,524.00
Durango	181,051	0.270	49,262	947,988.00
Chihuahua	165,751	0.334	55,324	1'173,286.00
Sinaloa	149,233	1.092	162,972	2'674,600.00
Nayarit	116,178	1.293	150,243	2'403,699.00
Jalisco	90,438	0.356	32,234	820,373.00
Veracruz	65,284	0.615	40,128	656,272.00
Chiapas	58,821	0.809	47,594	1'037,702.00
Tamaulipas	53,747	0.530	28,491	563,148.00
San Luis Potosí	51,032	0.533	27,189	488,734.00
Puebla	35,989	0.465	16,770	578,377.00
Michoacán	31,097	0.532	16,540	381,959.00
Sub-total	1'261,032			
Otros	450,946			
T O T A L	1'711,978			

2.2. El metabolismo del nitrógeno

2.2.1. Importancia del nitrógeno en las plantas

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

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

Independientemente de la forma absorbida, el nitrógeno es transformado en el interior de las plantas en bases nitrogenadas (-N=, -NH- o NH_2). De esta forma el nitrógeno interviene en la formación de aminoácidos, luego éstos entran en la síntesis de prótidos y de proteínas vegetales. (43)

Además el nitrógeno se encuentra en moléculas tan importantes como las purinas, las pirimidinas, porfirinas y coenzimas. Las purinas y pirimidinas se encuentran en los ácidos nucleicos RNA Y DNA esenciales para la síntesis de proteínas. El anillo de la porfirina se encuentra en compuestos tan importantes desde el punto de vista metabólico, como las clorofilas y las enzimas del grupo de los citocromos, esenciales para la fotosíntesis y la respiración.(14)

Un adecuado suministro de nitrógeno está asociado con vigorosos crecimientos vegetativos y un intenso color verde, así como con un aumento en corpulencia de los granos.(9,43)

Sin embargo existen diferentes efectos negativos que se presentan debido a la aplicación de cantidades excesivas de nitrógeno, entre estos efectos encontramos los siguientes:

a) Prolongación del período de crecimiento y retrazo de la madurez.

b) Excesivo crecimiento de los entrenudos que formas así un largo y débil tallo.

c) Puede hacer bajar la calidad del grano, debido a la falta óptima de sequedad del mismo.

d) En ocasiones puede suprimir la resistencia a enfermedades y plagas. Esto es debido a la suculencia que presentan los tejidos.

2.2.2. Formas del nitrógeno disponible para la planta (9).

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

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

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

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

3. Nitrógeno en forma orgánica. En las plantas superiores el - - aprovechamiento del nitrógeno orgánico, se da en muy baja escala puesto que queda sujeto principalmente a organismos inferiores. El nitrógeno - orgánico puede ser representado por la entrada de algunos aminoácidos y algunas sales orgánicas como la Urea.

4. Nitrógeno molecular (N_2). Esta forma es la más abundante ya que se encuentra en un 79% en la atmósfera, sin embargo las plantas no pueden aprovecharla en forma directa, sino que necesitan de algunos microorganismos para poder obtenerla.(5)

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

2.2.3. Etapas esenciales del ciclo del nitrógeno

En todos los suelos existen al cabo del año considerables entradas y salidas de nitrógeno acompañadas de muchas transformaciones complejas. Algunos de estos cambios pueden controlarse más o menos por el hombre, mientras que otros están mas allá de su control. Esta sucesión de reacciones químicas controladas constituye lo que se conoce con el nombre del "Ciclo del Nitrógeno". Fig.1(9)

En el ciclo del nitrógeno las plantas juegan un papel muy importante ya que contienen proteínas vegetales. Los animales al alimentarse de las plantas transforman estas proteínas a proteínas animales y desechos nitrogenados, los cuales pasan nuevamente al suelo. Otro cambio de este ciclo lo constituye la muerte de las plantas y animales ya que las bacterias y hongos de la putrefacción incorporan nuevamente al suelo el nitrógeno de los primeros. Además de los microorganismos fijadores de nitrógeno atmosférico, las tormentas eléctricas juegan un papel importante en este proceso, gracias a ellas, se combina el nitrógeno con el oxígeno formando nitratos, los cuales se precipitan con la lluvia entrando a través de los estomas, conduciendo a una fertilización foliar en forma natural. Las cantidades fijadas son muy pequeñas, van de 2 a 20 Kg./Ha.

La mineralización de los compuestos nitrogenados orgánicos se produ-

ce etapa por etapa en tres reacciones esenciales: Aminización, Amonitrificación y Nitrificación. Las dos primeras se realizan a través de organismos heterótrofos y la tercera se realiza por organismos autótrofos del suelo. Los heterótrofos requieren como fuente de energía compuestos carbonados orgánicos, los autótrofos obtienen la energía de la oxidación de sales inorgánicas y obtienen el carbono necesario del CO_2 de la atmósfera que lo rodea. (43)

2.2.4. Aminización ó aminificación

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

Se representa esquemáticamente como sigue:

Proteínas y Protenoides $\longrightarrow$ $R\text{-}NH_2 + CO_2 + E +$ Otros productos

Donde E = Energía

2.2.5. Amonificación

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

$$R\text{-}NH_2 + HOH \longrightarrow NH_3 + R\text{-}OH + \text{Energía}$$

Combinación Amino

$$2NH_3 + CO_3 \longrightarrow (CO_3)\ (NH_4)_2 \longrightarrow 2NH_4^+ + CO_3$$

El amoníaco así liberado sufre destinos diversos en el suelo:

1. Puede ser convertido por nitritos y nitratos por el proceso de - nitrificación.

2. Puede ser absorbido directamente por las plantas superiores, esto se logra mediante la reacción con el agua formando hidróxido de amonio, de tal forma que los iones de amonio pueden ser utilizados directamente - como fuente de nitrógeno.

3. Puede ser fijado en una forma no utilizable biológicamente en - ciertos tipos de arcillas en expansión.

4. Puede escaparse al aire. (9,43)

Factores que favorecen la amonificación;

1. Cantidad de carbohidratos disponibles.
2. Composición química del material nitrogenado.
3. Microorganismos involucrados.
4. Acidez, aereación y humedad del suelo. (9)

2.2.6. Nitrificación

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

$$2NH_4^+ + 3O_2 \longrightarrow 2NO_2^- + 2H_2O + 4H^+ + \text{Energía}$$

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

sentarse como sigue:

$$3NO_2^- + O_2 \longrightarrow 2NO_3^- + \text{Energía}$$

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

En primer lugar la reacción requiere oxígeno molecular (O_2), por lo tanto se llevará a cabo en una forma más efectiva en suelos con una buena aereación. Un segundo punto es que la reacción libera iones de hidrógeno (H^+). La liberación de estos iones da como resultante la acidificación - del suelo cuando los fertilizantes son convertidos a nitratos. Un tercer punto es que, puesto que está implicada la actividad microbiana, la rapidez y extensión de la transformación estará influenciada de gran manera - por las condiciones ambientales del suelo, así como por la humedad y la - temperatura. (9,43)

2.2.7. Pérdidas del nitrógeno aprovechable

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

1. La desnitrificación que es la reducción bioquímica de los nitratos bajo condiciones anaeróbicas.

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

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

007251

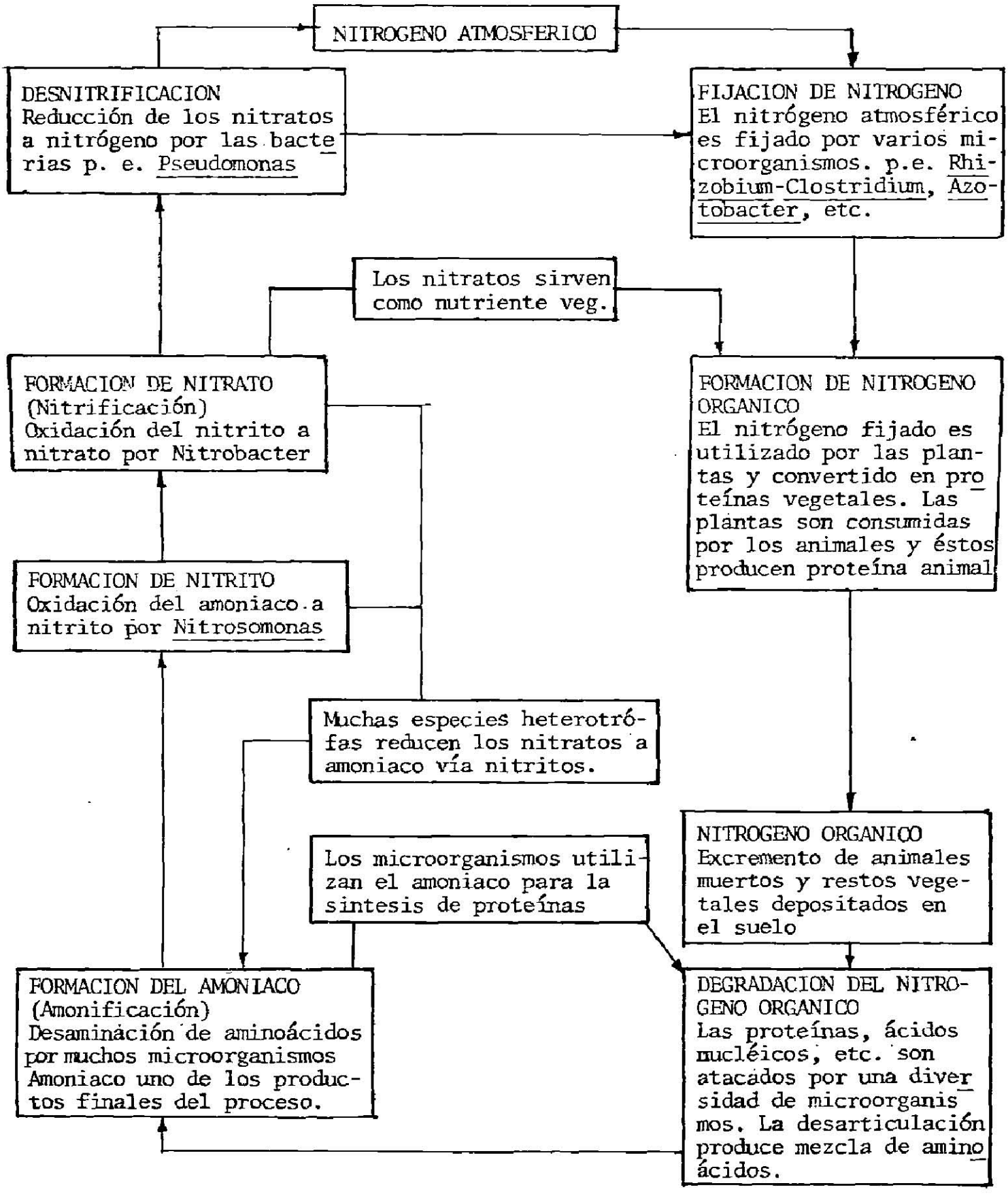


FIGURA 1. Representación esquemática del ciclo del nitrógeno.

2.2.7. Desnitrificación

Cuando los suelos se encharcan, el oxígeno es excluido y entonces se implanta la descomposición anaeróbica. Los microorganismos que intervienen son llamados bacterias desnitrificantes, siendo Bacterium desnitrificans una de las especies mejor conocidas. Estas bacterias extraen el oxígeno de los nitratos y nitritos. Más que usar el oxígeno atmosférico, este oxígeno es utilizado para oxidar el hidrógeno de los alimentos orgánicos, formando agua, óxido nitroso (N_2O) y nitrógeno molecular (N_2). - - Otras pérdidas pueden ser debido a: la erosión, lixiviación, volatilización. (9,36)

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

2.3. Características de Rhizobium sp.

2.3.1. Clasificación Taxonómica.

Reino:	Vegetal
Subreino:	Thalophita
División:	Schizophita
Clase:	Chizomycetes
Orden:	Eubacteriales
Familia:	Rhizobiaceae
Género:	Rhizobium
Especies:	leguminosarum, phaseoli, trifolii, lupini, japonicum y meliloti (40)

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

Se reconocen seis grupos de inoculación cruzada, basados en el supuesto de que todas las cepas que forman un grupo, podrían infectar todas las especies de plantas dentro del grupo y nunca fuera de él. Se considera - que cada especie de Rhizobium sp infecta a diferentes especies de leguminosas dentro de cada grupo.(38)

Hay casi tantas capas de bacterias radícolas como plantas sensibles. Hay que conjugar la pareja adecuada; la planta y el rizobio han de ser -- perfectamente compatibles. (40)

Regularmente se reconoce seis grupos de inoculación cruzada: el grupo alfalfa, frijol de vaca, lupino, chícharo, trébol y soya. (43)

TABLA 1

Esquema de clasificación de las asociaciones Rhizobium-leguminosa(43)

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

2.3.2. Descripción morfológica

Se describe a Rhizobium como una bacteria aerobia capaz de producir nódulos en las diferentes raíces de las leguminosas, son Gram negativas, miden de 0.5 a 0.9 por 1.2 a 3 micras; son móviles cuando jóvenes comunmente cambian a formas bacteroidales en un cultivo artificial que contiene alcaloides o glucósidos, o debido a un incremento en la acidez, o bien durante la simbiosis dentro del nódulo. La temperatura óptima en que viven es de 25°C. Es una bacteria de tipo heterotrófica. (42)

Generalmente las bacterias se producen asexualmente por división sencilla (fisión), división del cuerpo progenitor de dos parte hijas más o menos iguales. (40)

Los bacilos de Rhizobium tienen dos a cinco flagelos perítricos sobre la superficie y uno de ellos subpolar, en la mayoría de los casos los flagelos perítricos se desprenden fácilmente lo que no sucede con el flagelo subpolar. (31)

En medios de cultivos in vitro pueden ser conservados fácilmente dadas las características heterotróficas.

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

Aunque la mayoría de los autores reconocen que Rhizobium es Gram negativa, se han encontrado nódulos de algunas leguminosas silvestres, formas Gram positivas semejantes a la del género Basillus sp que producen cocoides (formas muy pequeñas de bacterias) y endosporas resistentes. Crecen en medios que contenga agua de levaduras, manitol, extractos de plantas, malta y otros materiales. Reducen ligeramente los nitratos y no utilizan los nitritos. (15,31)

2.4. La Relación Planta-Bacteria

2.4.1. Principios que explican la relación Rhizobium-Leguminosa

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

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

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

Algunos autores han sugerido a la relación Rhizobium-leguminosa como un caso de parasitismo, la leguminosa efectúa el papel de hospedero y la bacteria el papel de parásito. La simbiosis es un caso especial de parasitismo en el cual se establece una lucha entre el parásito y el huésped; de esta lucha resulta un equilibrio funcional, que una vez obtenido permite al huésped vivir a expensas del parásito contra el cual se defiende y al parásito existir a expensas del huésped. Algunas veces el equilibrio se rompe, pues en ciertas ocasiones se ha hecho constar que la planta mata a las bacterias y viceversa; éstas en condiciones apropiadas se reproducen con gran intensidad, que invaden todas las raíces y la leguminosa - llega a sucumbir. (37)

En la asociación Rhizobium-leguminosa ambos organismos se benefician, por lo tanto el parasitismo no interviene en este fenómeno, la simbiosis

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

2.4.2. Infección y formación de nódulos

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

Las raíces de las leguminosas segregan diversos materiales orgánicos que estimulan el crecimiento de una microflora en la rizósfera. Alrededor de la parte exterior de la raíz de la leguminosa se forma una capa específica membranosa, el objeto de esta membrana es evitar que las secreciones de la raíz escapen de la región inmediata adyacente a esta y que - la flora de la rizósfera quede así concentrada en esta zona, si en el suelo hay rizobios, crecen en la rizósfera y producen altas densidades de población. (8)

Dentro de los exudados radicales se han encontrado aminoácidos, azúcares, enzimas y vitaminas, siendo mayores las cantidades en las leguminosas. Así mismo se menciona que la biotina pudiera ser el factor de crecimiento más importante de los exudados ya que está en cantidades suficien-

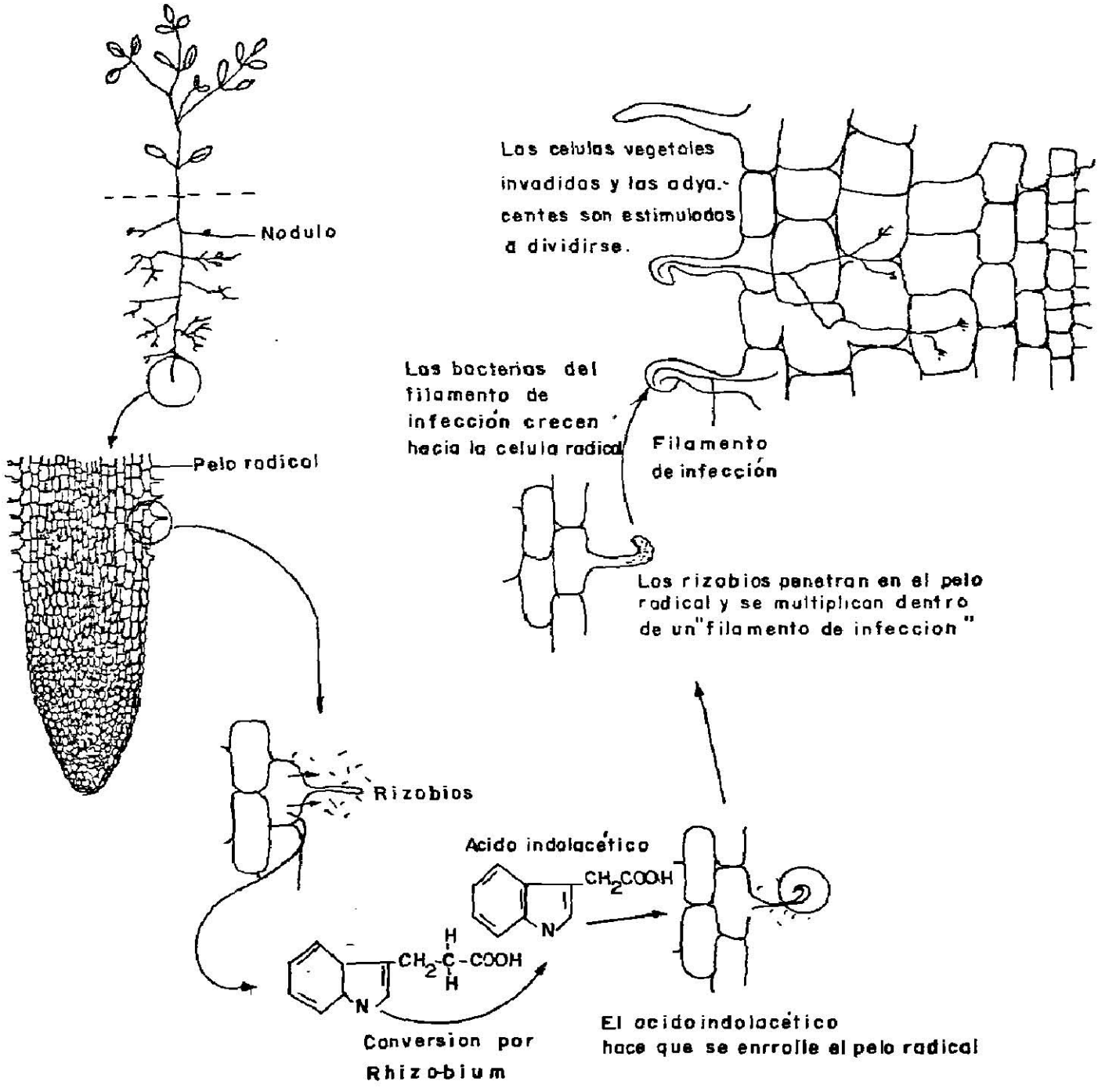


FIGURA 2 . Etapa de formación de un nódulo radical.

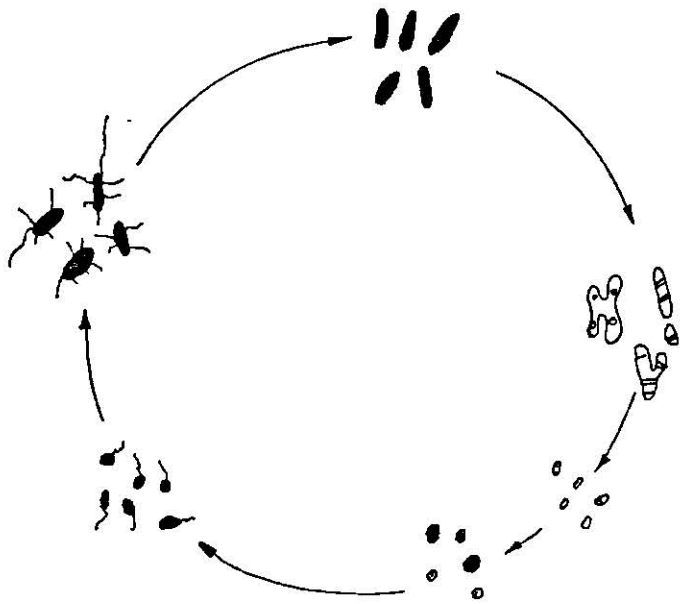


FIGURA 3 . Ciclo de Rhizobium leguminosarum mostrando su pleomorfismo

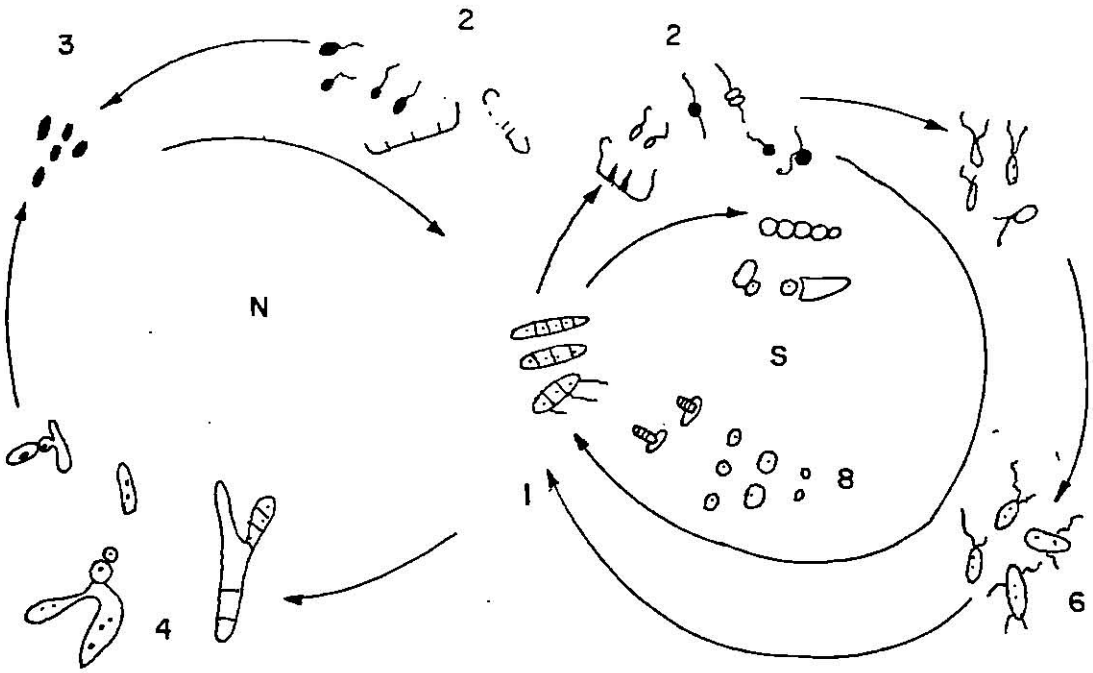


FIGURA 4 . Ciclo de Bisset. N. en el nódulo pequeñas bacterias pasan a bacterioides (4). S. en el suelo endosporas (8) o swarmers (2) que se forman de bacilos grandes (1-2). Los "swarmers" se transforman en pequeños bacilos (5-6), los cuales pueden atacar los pelos de las raíces de plantas susceptibles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

tes para influir en los organismos de la rizósfera. Las secreciones radicales de las leguminosas estimulan cepas efectivas y no efectivas de Rhizobium y en menor grado otros microorganismos de diferentes especies. (31)

Las bacterias existen en el suelo probablemente en una fase cocoide inmóvil, llamada también premóvil y luego pasan a la forma flagelar de manera que están en condiciones de movilizarse y poder penetrar en los pelos absorbentes (Fig. 3 y 4). (15)

La infección de la raíz se produce a través de los pelos radicales. Una de las secreciones de la raíz es el triptofano que se transforma en la hormona vegetal ácido indolacético (IAA) por los Rizobios. (8)

Resumiendo el presente estado de conocimiento concerniente en los sucesos de la rizósfera antes de la infección por Rhizobium, se emite un esquema de la interacción entre las bacterias y las raicillas. En la Fig. 5 se distinguen una serie de nueve etapas. Las primeras seis afectan a la reacción de enrizado del pelo radicular de la leguminosa y las últimas tres son asociadas con la etapa preliminar específica de infección. Primero existe una secreción de la raíz, esto influye en una multiplicación de la bacteria, a su vez la planta secreta triptofano y la bacteria lo oxida a ácido indolacético (IAA), que con la ayuda de un cofactor no conocido segregado por la planta, produce un enrizado en la misma, posteriormente la bacteria produce un polizacárido que induce a la secreción de poligalacturasa por la planta, luego se produce la infección. En este momento pueden producirse enzimas que disuelven el material cementante que mantiene juntas las microfibrillas de la celulosa del pelo radical y penetran en el citoplasma. Entre los sistemas de enzimas poligalacturonásicos se encuentran la B-1, 3- glucanasas y pectinasas. Estas enzimas afectarían las fracciones pécticas de las paredes celulares componentes mayori-

tarios, en este caso facilitando de esta manera la penetración física de la bacteria. (28,13) .

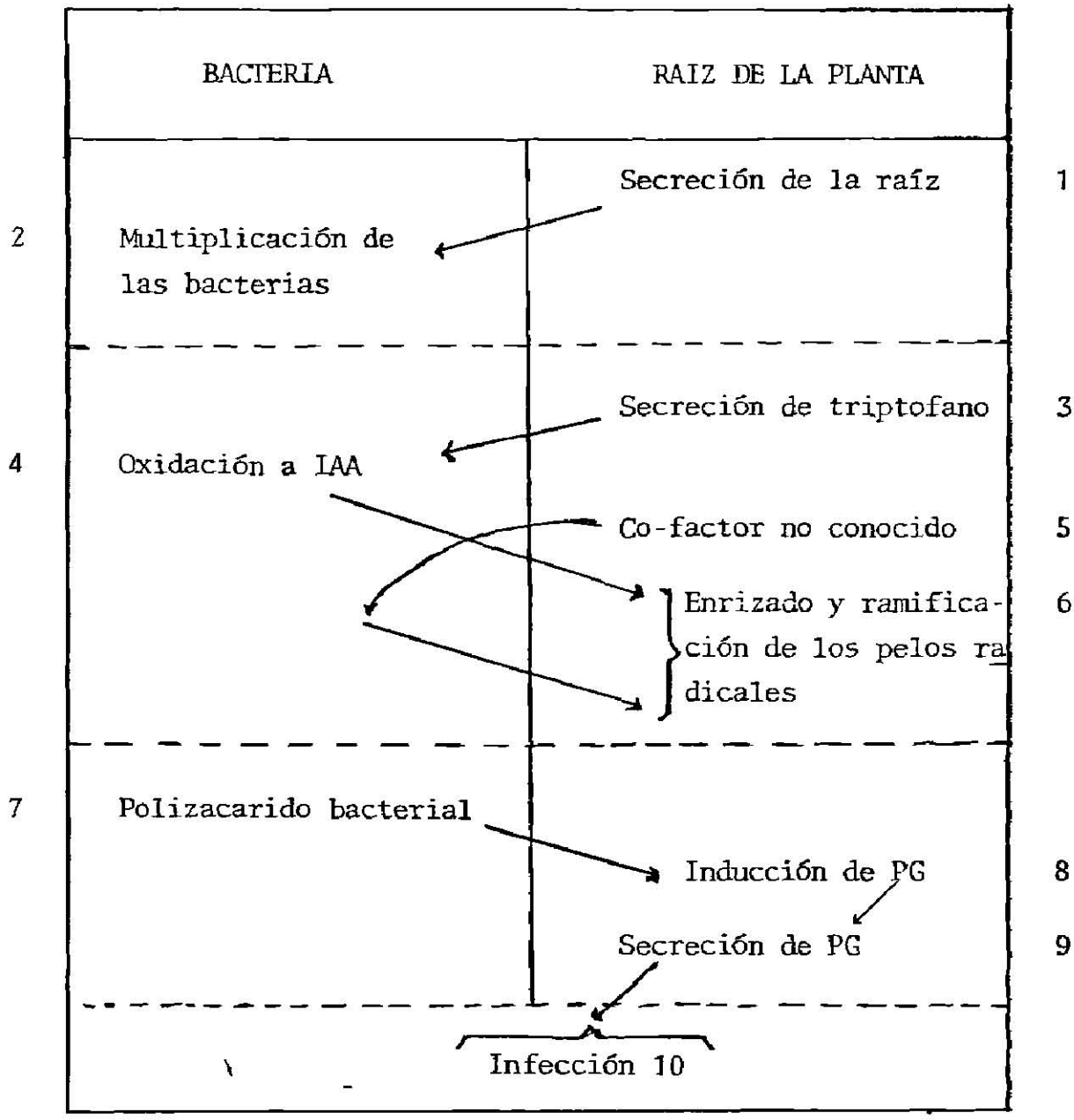


Fig. 5 Interacción entre la bacteria Rhizobium y las raíces de la leguminosa antes de la infección

Una vez dentro de la raíz, las bacterias se multiplican con gran rapidez y forman largos filamentos en esos pelos y hacia el interior del parénquima radical. Estos filamentos son llamados "Filamentos de Infección" La progresión de este cordón infectante va acompañada de síntesis activa de celulosa y hemicelulosas, depositadas longitudinalmente al camino de penetración, de tal manera que el cordón bacteriano queda envuelto en una rígida vaina polisacárida. Estas bacterias originan una rápida proliferación de los tejidos circundantes en las células corticales más internas de la raíz y así se inicia la formación del nódulo. Este esbozo empuja hacia afuera el parénquima y la epidermis y produce una tumefacción lateral en la raíz; el nódulo consiste en una masa de células parenquimatosas de fina membrana generalmente llenas de germen específico. En estas etapas las bacterias ya perdieron sus flagelos y se transformas en las formas llamadas bacteroides, que aparecen en el interior de las células huésped con aspectos irregulares (Formas de X, Y, estrellas, clavas, bastones piriformes, hinchados o ramificados) y generalmente rodeados de una masa mucosa Fig. 4 .(15)

Si la célula infectada es una célula diploide normal habitulamente es destruida por la infección sufriendo necrosis y degenera, sin embargo si es una célula tetraploide puede ser el predecesor de un nódulo, ya que las divisiones progresivas de tales células conducen a la aparición de éste. (8)

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

Se menciona que la producción de citocininas en forma exógena por la planta es la responsable de alteraciones morfológicas de la raíz antes de

la nodulación. Así mismo se ha comprobado que en la producción de estos fitoreguladores es necesaria la presencia de ambas partes; bacteria y - - planta.

Las leguminosas proveen a los bacteroides con carbohidratos los cuales oxidan. Varios de los electrones y ATP obtenidos durante esta oxidación son usados para reducir N_2 a NH^+ este convertido en los otros compuestos nitrogenados, la mayoría de los cuales son absorbidos por las células cercanas y traslocados a otros organismos. (39)

En frijol)Phaseolus vulgaris L.) se ha encontrado que la actividad de fijación de nitrógeno por Rhizobium sp, comienza a ser efectiva cuando la planta tiene de dos a tres pares de hojas y se han sintetizado todos - los componentes nodulares. Ella se incrementa rápidamente hasta la etapa de floración y decrece hasta llegar a cero antes de la madurez fisiológica. A partir de la madurez fisiológica, el nódulo empieza a deteriorarse en especies anuales, lo cual no sucede en especies perenes ya que se ha encontrado que un mismo nódulo puede durar varios años. Una vez que el - nódulo se desintegra, libera bacterias al suelo. Las formas bacteroidales son incapaces de dividirse, pero siempre hay un pequeño número de células bacilares que han permanecido inactivas; éstas proliferan ahora - - usando como nutriente algunos de los productos del nódulo deteriorado, y pueden iniciar un proceso de infección en otras raíces o pueden llevar una existencia libre en el suelo. (34,6)

En resumen, el rizobio pasa por un ciclo especial que comprende cinco o seis fases: estado cocoide, fase cocoidea premóvil con organismos de diámetro mayor que los anteriores, fase móvil monoflagelar, fase móvil peritrical, fase de bastones no flagelados y por último, fase bacteroide -- con formas vacuolizadas o con cromatina en bandas. Fig. 3 y 4. (41)

2.4.3. Infectividad y efectividad

Hay dos conceptos básicos que nos sirven para comprender la producción de nódulos, por la relación bacteria-hospedero, así como la eficiencia de estos nódulos en el proceso de fijación biológica del nitrógeno. - Ellos son la infectividad y la efectividad. Cepa infectiva es aquella capaz de infectar una cierta leguminosa pero no siempre es capaz de producir nódulos fijadores de nitrógeno, por lo tanto estos nos pequeños de color blanco verdoso. Cepa efectiva es aquella capaz de producir una eficiencia en cuanto a la fijación de nitrógeno. El mejor elemento visual de la eficiencia de los nódulos es su color. Un nódulo eficaz presenta un - centro rosado o rojizo, además es generalmente grande y se encuentra en - una menor proporción en la raíz concentrado en las raíces principales, en tanto que los nódulos ineficaces están concentrados en las raíces laterales son pequeños y numerosos. Podemos encontrar nódulos eficaces e ineficaces en una misma planta. (6)

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

sa es infectada con dos especies de Rhizobium, se forma la misma leghemoglobina. (8)

2.5.Bioquímica de la fijación del nitrógeno

En el proceso de fijación el nitrógeno es reducido a amoníaco y este es convertido en la forma orgánica. El proceso de reducción es catalizado por la enzima nitrogenasa, que consiste en dos componentes proteicos separados (I y II). Los dos componentes contienen hierro y el componente I contiene además molibdeno. Los componentes de la nitrogenasa son inactivados por el oxígeno incluso si son aislados a partir de un aerobio. Debido a la estabilidad del enlace N_N el nitrógeno es extremadamente inerte y su reducción es un proceso que requiere mucha energía. Por otro lado, la nitrogenasa no es una enzima muy activa y es por lo tanto requerida en grandes cantidades (1-2% de la proteína celular total) además que es una enzima que requiere grandes cantidades de energía (24-36 ATPs por cada molécula de N_2 reducida a NH_3). Además tienen que transferirse seis electrones por la ferredoxina para la reducción del nitrógeno (Fig. 6),(7) pueden suponerse varios pasos intermedios, pero puesto que nunca se han aislado intermediarios, actualmente se supone que los tres pasos de reducción sucesivos tienen lugar con los intermediarios firmemente unidos a la enzima. La fijación de nitrógeno es de naturaleza altamente reductora y el proceso es inhibido por el oxígeno. En las bacterias aerobias la fijación de N_2 tiene lugar en presencia de oxígeno en las células enteras, pero no en las preparaciones enzimáticas purificadas, y se cree que la nitrogenasa de las células se haya en un microambiente protegido del oxígeno. Precisamente el papel de la lehgemoglobina es impedir que el oxígeno desactive la nitrogenasa. Algunas bacterias que pueden crecer tanto anaeróbicamente como aeróbicamente, fijan N_2 sólo en condiciones anaeróbicas.

Los electrones para la reducción del nitrógeno son transferidos a la nitrogenasa desde la ferredoxina, el transportador de electrones es de bajo potencial redox. (De hecho, la ferredoxina se descubrió primeramente en las bacterias fijadoras de nitrógeno al realizar estudios sobre la naturaleza del transportador de electrones en la fijación del nitrógeno y luego se encontró que estaba también presente en los organismos no fijadores nitrógeno). (8,7)

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

La nitrogenasa no es específica para el N_2, sino que también reduce el cianuro (CN^-), el acetileno (HC CH) o C_2H_2 y varios compuestos, la reducción del acetileno probablemente no tiene ninguna finalidad práctica para la célula, pero proporciona al experimentador una manera simple de medir la actividad de los sistemas fijadores de nitrógeno ya que es fácil medir la reducción del acetileno a etileno (H_2C CH_2). Esta técnica se emplea actualmente para detectar la fijación de nitrógeno en sistemas desconocidos. Otro método consiste en mostrar un incremento neto en el contenido total de nitrógeno del medio más el de los organismos después de la incubación; debería suponerse que el nitrógeno incrementado sólo podría proceder del N_2 del aire. Un procedimiento más sensible es utilizar un isótopo del nitrógeno N^{15} como trazador (El N^{15} no es un isótopo radiacti

vo, sino estable y su presencia puede detectarse por el espectofotómetro de masas). El procedimiento consiste en la activación de la atmósfera del suelo con N_2^{15} durante cortos períodos de tiempo, medición del aumento del N^{15} en las plantas y cálculo del nitrógeno total durante este período. Los primeros resultados obtenidos con plantas de frijol (Phaseolus vulgaris L.) y trébol (Trifolium sp) demostraron que después de siete horas de incubación, pudieron medirse cantidades significantes de N^{15} en las plantas, permitiendo la determinación precisa de la relación C_2H_4/N_2. Durante períodos más largos de tiempo, tales cantidades son de gran importancia para seguir el modelo de distribución de N de los nódulos hacia los órganos reproductivos de las plantas. Sin embargo, el método de reducción de acetileno es un procedimiento todavía más sensible y está sustituyendo rápidamente al método del N^{15}, más dificultoso. El cultivo extracto celular es incubado con acetileno y la mezcla de reacción es luego analizada por cromatografía en fase gaseosa para la producción de la substancia gaseosa de etileno. Este método es mucho más simple y rápido que los demás.(23,8)

La Fig. 6 muestra un esquema de la fijación de nitrógeno, y la Fig. 7 muestra un esquema del proceso general de fijación de nitrógeno.(8)

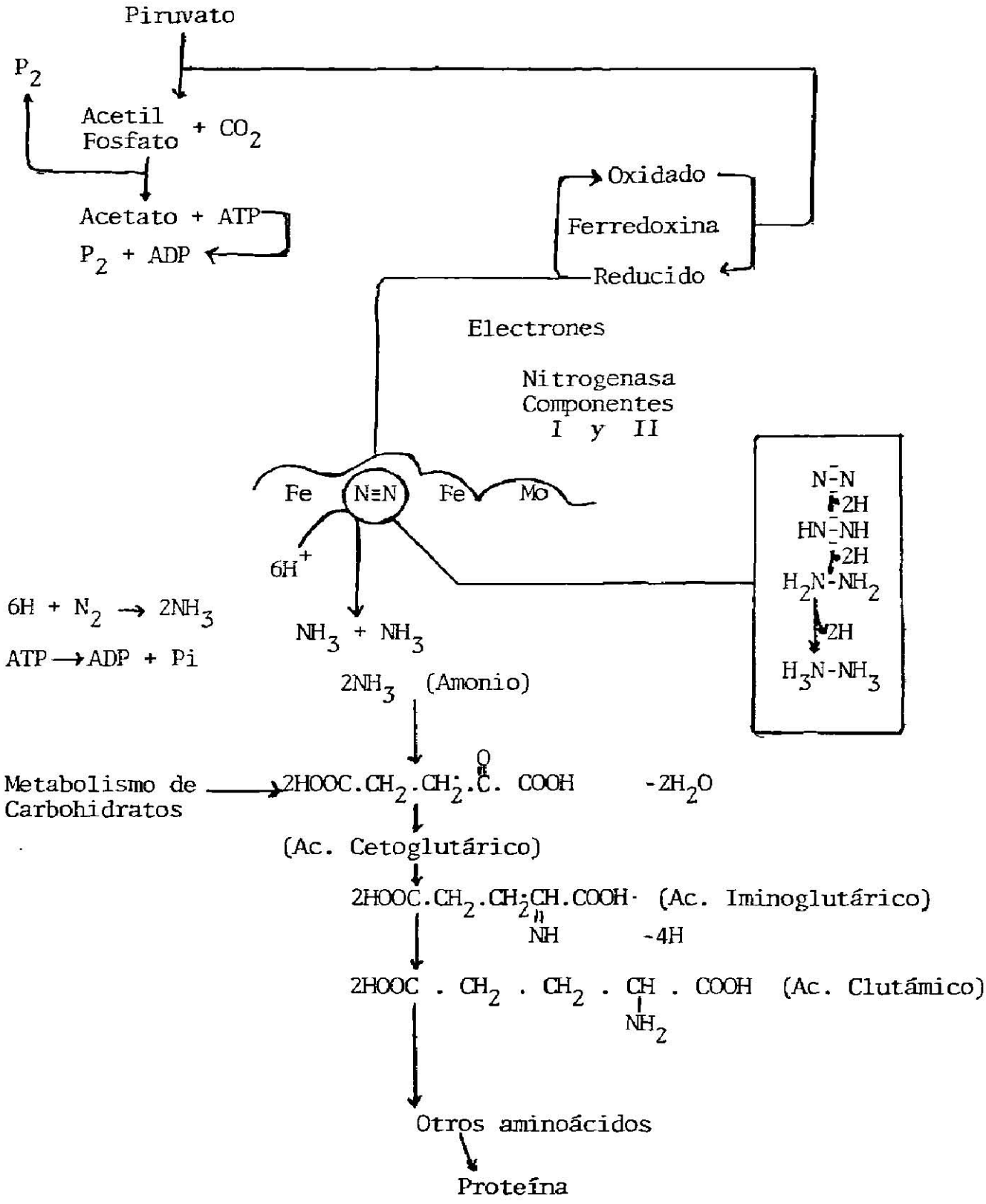


Fig.6 . Fijación de nitrógeno de la bacteria. (23,8)

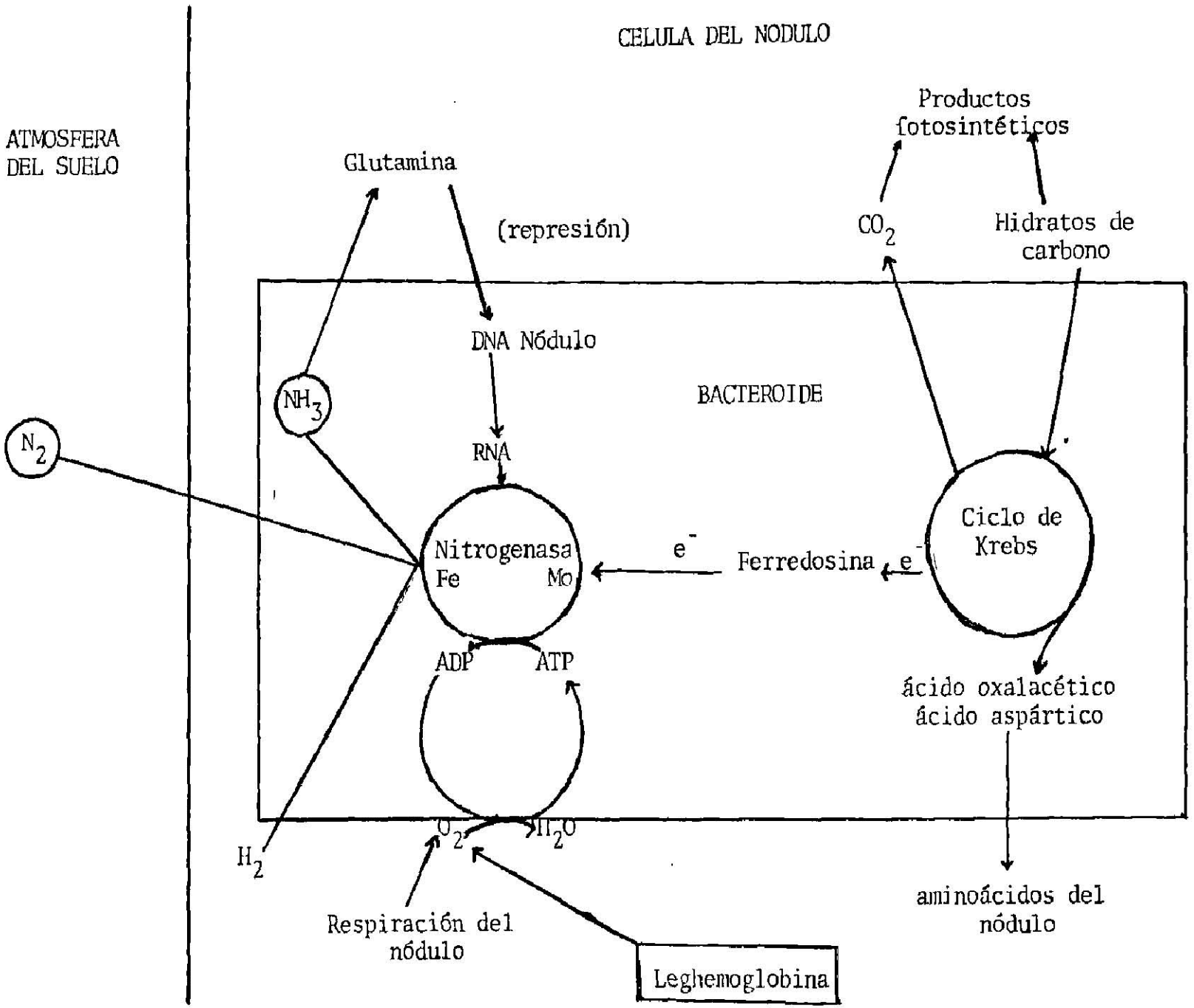


Fig. 7. Esquema de la fijación de nitrógeno, por el nódulo de una leguminosa.[36]

2.6. Factores que afectan a la relación Rhizobium-Leguminosa

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

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

b) Factores Exógenos. Se refieren a las condiciones del medio ambiente que inciden en el sistema raíz-bacteria y definen la intensidad de la infección, nodulación y fijación activa de nitrógeno. Algunos de los más importantes son: temperatura, humedad, oxígeno, pH, disponibilidad de nutrimentos y otros. (2)

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

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

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

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

2.6.1. Factores físicos

2.6.1.1. La temperatura es un factor importante en la supervivencia de la bacteria, tanto en el suelo como en la planta, y algunos aspectos de la simbiosis afectados por la temperatura son:

1. El crecimiento y supervivencia del rizobio en la rizósfera Fig. .
2. La unión de células rizobiales con las células de los pelos radicales.
3. La formación de filamentos de infección.
4. El contenido de leghemoglobina en los nódulos.
5. La formación de pelos radicales.
6. La actividad de la enzima nitrogenasa.
7. Y consecuentemente el contenido de nitrógeno y producción de materia seca en la planta. (27)

En un experimento en frijol con el fin de medir el efecto de la materia orgánica, pH y la temperatura del suelo sobre la nodulación causada por Rhizobium phaseoli, encontró que la nodulación fue mayor a una temperatura de 30°C. que a 40°C. Y una disminución de 5°C. en la temperatura óptima - ocasiona una reducción de un 5% en la cantidad de nitrógeno fijado, en cambio cuando aumenta 4°C., la fijación se reduce un 50%. Temperaturas abajo - de 6.5°C. no afectan el poder infectante. Y la temperatura óptima está entre 20 y 24°C. (18)

El proceso de iniciación nodular es más susceptible a bajas temperaturas (alrededor de 28°C.) que a temperaturas medianamente altas (33°C.), así mismo durante esta temperatura, las colonias muestran un mayor peso nodular y actividad de nitrogenasa. (27)

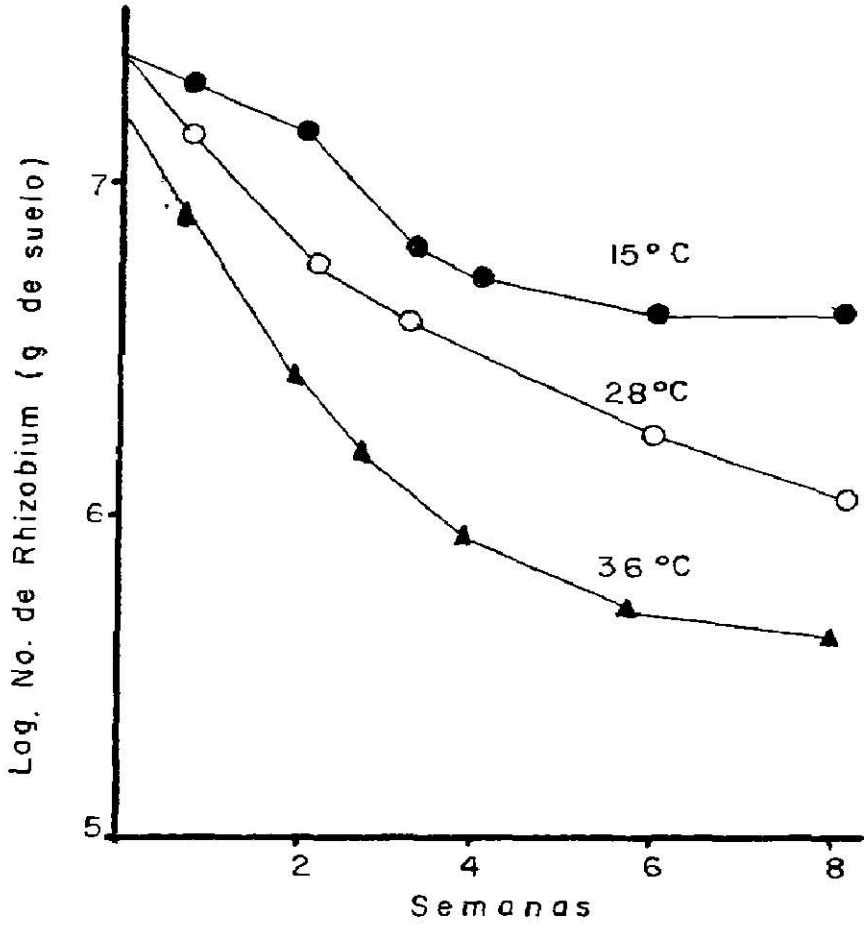


FIGURA 8 . Efecto de la temperatura en la sobrevivencia de Rhizobium meliloti en un suelo de arena finofranca (CIAT, 1980).

2.6.2.2. Reacción del suelo

La reacción del suelo es de gran importancia, no sólo afecta el desarrollo del rizobio y la producción de nódulos, sino también el crecimiento y captación de nitrógeno por las plantas. Los suelos ácidos generalmente causan escasez de elementos básicos como calcio, magnesio, potasio y frecuentemente fósforo y nitrógeno, además pueden originar liberación de elementos tóxicos como aluminio y manganeso. (41)

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

Se ha encontrado que todos los rizobios muestran la misma tolerancia a la alcalinidad con un límite aproximado de pH igual a 9.6; sin embargo la acidez les afecta en una forma variable siendo Rhizobium meliloti el menos tolerante, con un límite aproximado de pH igual a 5.0; los más tolerantes con un pH igual a 3.2 - 4.2 son R. lupini y R. japonicum. (47)

El efecto del pH puede estar correlacionado con otros factores. En un experimento con frijol (Phaseolus vulgaris L.) con el propósito de medir el efecto de la materia orgánica, pH y temperatura del suelo sobre la nodulación causada por R. phaseoli, se encuentra que la nodulación es mayor con los factores; temperatura del suelo a 30°C., pH 7.3 y presencia de materia orgánica, sin embargo cuando la temperatura del suelo fue de 35°C, el mayor número de nódulos correspondió a los factores pH 7.8 y sin materia orgánica. (18)

2.6.1.3. Humedad

El efecto de la humedad del suelo, en la nodulación de las leguminosas es manifiesto, ya que ésta puede ser demorada o inhibida completamente en -- los suelos expuestos a sequía o a períodos secos y húmedos alternos. La humedad no es sólo un factor importante en el desarrollo de la planta hospedera, sino también en la supervivencia de Rhizobium sp tanto en el suelo como en la semilla inoculada. Se sabe que esta bacteria es extremadamente sensible a la sequía, solamente unas cuantas células pueden sobrevivir cuando la mezcla del suelo contiene aire seco, por otro lado un exceso de agua puede - limitar la aereación y por lo tanto inhibir el crecimiento de las bacterias. De ahí que en las regiones áridas es importante inocular con cepas nativas y no con cepas importadas debido a la adaptabilidad de las primeras. (24,41)

2.6.1.4. Luz

El número de nódulos radiculares fijadores de nitrógeno, está controlado por el fotoperíodo que actúa a través de las hojas de la planta, puesto - que la bacteria necesita energía alimenticia manufacturada por las hojas para realizar su labor, cuanto más luz y clorofila haya tanto más alimento se le proporciona a la bacteria, así pues la coordinación máxima entre la planta y la bacteria se ve reforzada por el regulador fotoperiódico. Estas ob-- servaciones son hasta cierto punto verdaderas ya que es ampliamente conocido el hecho de que la bacteria necesita de fotosintatos para su mantención, si una planta en proceso de nodulación es puesta en la oscuridad, la formación de nódulos cesa y los ya formados degeneran, la hemoglobina se destruye y da origen a pigmentos verdes. Esto se puede explicar debido al déficit de fotosintatos, ya que la planta en ausencia de luz no los produce y por lo tanto

la bacteria degenera. Con un aumento en el número de horas luz, hay más alimento para la bacteria y su eficiencia en la fijación es mayor, sin embargo en la práctica se ha encontrado lo contrario. En el efecto de la luz en la nodulación de trébol se encontró que ésta fue inferior en fotoperíodos de 9, 11 y 24 horas luz en comparación a la obtenida por el fotoperíodo que variaba de 12 a 15 horas; así mismo se encontró que tanto los días cortos como la intensidad de luz limitaron la nodulación y fijación de N, los nódulos desarrollados en días cortos desaparecieron durante la floración y formaron otros nuevos durante el desarrollo de las vainas, excepto con una cepa de Rhizobium. Por otro lado, un exceso de luz trae consecuencia la formación excesiva de carbohidratos, lo cual produce una disminución en la fijación de nitrógeno. (29,41)

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

2.6.2. Factores químicos

2.6.2.1. Nutrientes

Nitrógeno. Se ha observado que existe una gran influencia de la cantidad de nitrógeno que se encuentra en el suelo, en la nodulación causada por Rhizobium sp. Cuando un cultivo se fertiliza con una fuente nitrogenada (p.e. sulfato de amonio) y se inocula simultáneamente, la cantidad de nitrógeno simbiótico fijado disminuye a medida que el nitrógeno disponible en el suelo o el fertilizante nitrogenado aumenta. Así mismo en suelos deficien-

tes de nitrógeno, una baja tasa de fertilización con este elemento, asegura un crecimiento inicial vigoroso aunque no siempre aumenta el rendimiento de la semilla. Respecto a otras fuentes de nitrógeno se ha encontrado un efecto similar, en un ensayo de inoculación de Phaseolus vulgaris con - Rhizobium sp, se aplicó cuatro niveles de nitrógeno (utilizando como fuente el nitrato de sodio a 0, 8.4, 16.8 y 42 ppm) a una solución nutritiva, encontrando que el nitrógeno aplicado inhibió la nodulación y fijación de nitrógeno, sin embargo, es necesario una primera dósis para el desarrollo de la planta. Mediante el estudio de diferentes niveles de NH_4 y NO_3 so-- bre la nodulación, eficiencia de fijación de nitrógeno y rendimiento de -- frijol, se encuentra el peso y número de nódulos reprimidos por los niveles altos de nitrógeno N (45 y 60 ppm), durante las etapas iniciales de su -- formación y crecimiento. Habiéndose detectado que existe una acción diferencial entre las dos fuentes estudiadas encontrándose una represión más - evidente para los nitratos. (46)

Posiblemente el efecto depresor del nitrógeno, sea debido a la rela-- ción carbohidratos-nitrógeno en la planta, como consecuencia de que ésta - no suministra suficiente cantidad de carbohidrato a la raíz. Si esta relación C/N se prolonga durante mucho tiempo se inicia la degeneración del nódulo, en tales circunstancias, la presencia del nódulo en el hospedero es más perjudicial que útil, ya que los rizobios entran en una fase parasitaria. Por el contrario, cuando el suelo contiene poco o ningún nitrógeno - asimilable y las plantas dependen por completo de la fijación simbiótica, después de la germinación y antes de que se haya establecido el sistema de simbiosis, la planta entra en un período de hambre de nitrógeno en que utiliza todas las reservas de la semilla durante una semana o más, hasta que

empieza la fijación, si no se recurre a la inoculación.

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

Se ha observado que cuando los niveles de fósforo en el suelo son muy bajos, los rizobios pueden penetrar a la raíz de las leguminosas; pero la infección se mantiene latente y los nódulos no se desarrollan. (41)

El fósforo en su papel de nutriente esencial, tiene influencia directa en las ganancias del nitrógeno y en la producción de las leguminosas; las respuestas de la fijación de nitrógeno y de los mecanismos de nodulación hacia la fertilización con fósforo, están asociadas con el vigor y la salud del hospedero, más que ser los reflejos de una estimulación específica de la simbiosis. (3)

Se menciona que en los tejidos meristemáticos (entre ellos los de la raíz), sede de un activo crecimiento, se encuentran fuertes concentraciones de fósforo, que intervienen en la asociación de nucleoproteínas. Este elemento tiene una gran influencia en el crecimiento y desarrollo de los sistemas radiculares, lo cual beneficia al hospedero para efectuar una mejor relación planta-bacteria. (14)

El fósforo forma parte de la molécula de ATP (trifosfato de adenosina), este compuesto sirve como portador de energía liberada durante la descomposición de productos alimenticios producidos en la fotosíntesis. El ATP le confiere energía a la enzima nitrogenasa que es un complejo que logra la reducción del nitrógeno atmosférico (N_2) convirtiéndose en amoníaco, forma ampliada para su incorporación en aminoácidos Fig. 7. (1)

2.6.2.3.Potasio.Se ha encontrado que no hay estimulación en la fijación de - nitrógeno por el fósforo, si no existe en los suelos adecuada cantidad de - potasio, pero no así en el peso de los nódulos . Sin embargo, el potasio - no afecta la formación de los nódulos. (41)

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

La aplicación de azufre aumenta el contenido de nitrógeno en la planta, así como su fijación. También tiene gran influencia en el aumento de la metionina en las proteínas. (20)

2.6.2.5.Calcio.Este elemento tiene influencia en la reacción del suelo, de - ahí su importancia en el desarrollo de la planta y sobrevivencia de los rizobios. Se ha encontrado que las aplicaciones de cal al suelo generalmente favorecen el crecimiento y nodulación de Glycine max cuando nodula en suelos bajos de clacio y con un pH de 5.3. (21)

Se efectuó un experimento con el fin de observar la influencia del pH y la nutrición mineral en la nodulación y fijación de nitrógeno por el frijol cultivado en solución nutritiva. Entre algunas de las variables bajo - estudio, se suministró seis niveles de calcio (o.01, o.05, 0.25, 0.50, 1.25 y 2.5 mM/1), actuando bajo cuatro rangos de pH (4.0, 5.0, 6.0 y 7.0), observando un efecto del calcio en los parámetros bajo estudio hasta un nivel de 1.25 mM/1.

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

El fierro forma parte de la enzima nitrogenasa que está formada por dos unidades distintas, la primera de ellas que contiene fierro y molibdeno en - su molécula, toma los electrones directamente de la ferredoxina (Fig. 7.), - reduciendo ésta para sederlos posteriormente a la segunda subunidad que contiene exclusivamente fierro, esta es la auténtica proteína reductora del nitrógeno atmosférico. (13)

2.6.2.7.Cobalto.El cobalto forma parte de la vitamina B_{12}, que es indispensable en la síntesis de leghemoglobina.

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

Cuando existe una deficiencia de Boro, el tejido vascular de los nódu-- los se desarrolla en forma anormal afectando el aspecto bacteroide. Otro - - efecto que causa esta deficiencia es la acumulación de carbohidratos en la - planta, lo cual disminuye la fijación de nitrógeno. (41)

2.6.2.9.Cobre.La planta necesita pequeñas cantidades de cobre para su buen desarrollo y cuando este elemento es deficiente, el metabolismo de los carbohidratos se altera. Cuando hay deficiencia de cobre se forma una menor cantidad de hemoglobina. Otro de los efectos es una pobre síntesis de proteínas.

2.7.Elementos Tóxicos en la Nodulación.

Se ha encontrado que elementos como el Aluminio, Manganeso y el Cadmio inhiben la nodulación, el crecimiento de las raíces pequeñas y la fijación - de Nitrógeno.

La toxicidad de los elementos como manganeso y aluminio así como la disponibilidad de otros, puede deberse a los efectos de la acidez del suelo y - deficiencias de calcio. (26)

2.8. Importancia del Molibdeno (Mo)

El Mo se requiere en muy pequeñas cantidades, pero su efecto es muy marcado en la parte baja de la escala de concentraciones, el Mo esta presente en plantas sanas a concentraciones aproximadas a 0.03- ppm. (en base seca). Sin este elemento, no habría plantas y éste no puede ser substituido por nada. Esto define al Mo como un elemento esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas superiores.

Los analisis de suelo para este elemento, muestran un amplio - rango de concentración generalmente menor de cinco ppm., como regla general, la disponibilidad de Mo es elevada en suelos alcalinos, suelos ricos en materia organica y suelos jovenes derivados de roca volcanica, mientras que los suelos de podsol y aquellos desarrollados - en rocas de fierro tienen valores particularmente bajos.(22, 26).

Han sido reportadas concentraciones notablemente elevadas de este elemento en suelos Hawaianos, promediando de 15 a 30 ppm.

Se demostró que a 20 ppm. se obtuvo la mejor dosis de Mo en la fijación y acumulación de nitrógeno mineral en un suelo bajo condiciones de invernadero.(19).

La descomposición de residuos de cosechas y desperdicios orgánicos por los miroorganismos permite la liberación de cantidades significativas de elementos traza, con lo cual se completa el ciclo de los micronutrientes como puede observarse en la tabla el contenido de micronutrientes de estiercol de granja es hasta cierto grado mayor que el de pastizales. (26).

El Mo es el único entre los microelementos que con cantidades -

tan pequeñas como 0.5 ug de Mo por semilla de chicharo y frijol pueden producir plantas maduras.

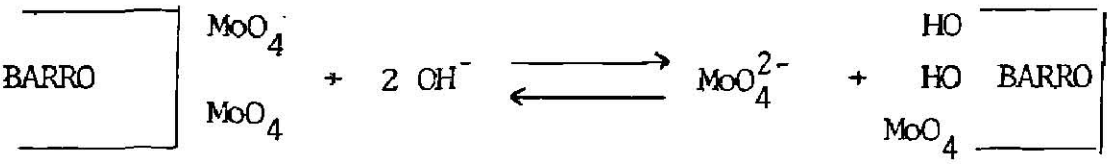
Se mostró que a 48 ppm., de Mo en semillas de soya podían satisfacer los requerimientos del crecimiento de la planta en un suelo deficiente de Mo. (44).

2.8.1. Formas en el suelo

Las reacciones del Mo en los suelos no son bien conocidas, se ha sugerido que este elemento puede estar presente como: I) una parte del reticulo cristalino de los minerales primarios y secundarios, en cuya forma no es disponible para las plantas, 2) Como MoO adsorvido, el cual es retenido por los barros y es disponible para las plantas, 3) Como una parte de la materia orgánica del suelo, y 4) Como compuestos de Mo hidrosolubles. (26).

El Mo en los suelos es ampliamente no disponible, un trabajo con la solución extractora de oxalato amonico ha demostrado que los suelos con un contenido total de Mo de 0.24 a 4.45 ppm. tan solo podrían ser extraidos de o.024 ppm. Es sabido desde hace algún tiempo que la disponibilidad del Mo aumenta con el pH del suelo. Esto como es lógico, es lo contrario de lo que es cierto para la mayoría de los microelementos.

Si el MoO_4^{2-} es adsorvido por los barros, de una forma similar a como el sulfato (SO_4^{2-}) es retenido, un aumento en su disponibilidad con valores aumentados de pH., podría verdaderamente explicarse al menos en parte por la siguiente ecuación:



Esta ecuación nos ilustra el comportamiento del Mo en el campo.

Otros investigadores han sugerido que el Mo se halla en los suelos como: I) Sales solubles, 2) Oxido de Mo y 3) Oxidos reducidos tales como MoO_5 y MoO_2 han manifestado que MoO_2 son convertidos muy lentamente a sales solubles de molibdato. La converción del oxido de Mo. a sales solubles de molibdato es favorecida por una reacción alcalina, y esto sugiere que este mecanismo podría también explicar la disponibilidad amuentada de este elemento en suelos con altos valores de pH.

Además del pH del suelo, la presencia en el suelo de oxidos de hierro, de aluminio y de titanio, aumenta también la adsorción de Mo.

Parte del contenido de Mo en el suelo se encuentra en forma de tres trioxido de Mo (MoO_3), bioxido de Mo (MoO_2) y pentoxido de Mo. (Mo_2O_5), en estas formas, en Mo no puede ser absorvido por la planta

Esto es especialmente cierto para los oxidos mas reducidos (MoO_2 y Mo_2O_5), pero el trioxido puede pasar facilmente a forma absorbible por reacción de Ios cationes del suelo.

Entre los minerales mas comunes de rocas igneas, la biotita muestra la concentración más alta de Mo. En rocas sedimentarias el Mo esta mas concentrado en los esquistos.(26).

No se conoce ningún mineral de molibdato de Fe tal ves porque -

el Fe reduce al MoO_4^{2-} en soluciones acidas.

El ión molibdato como la mayoría de los aniones, es adsorvido - preferentemente en partículas coloidales que presentan una carga positiva a un pH de 5 y practicamente no hay adsorción arriba de un pH de 8.

El Mo es facilmente detectable en cantidades pequeñas en el suelo y en el agua y es agrupado con los metales pesados mas móviles.

2.8.2. Interacción con otros elementos

Ha sido observado que aplicaciones fuertes de fertilizantes fosforicos aumentan el consumo de Mo por las plantas, por otra parte - aplicaciones fuertes de sulfatos tienen un efecto depresor a causa - de que una alta concentración de SO_4^{2-} puede esperarse que reeplace - algo de MoO_4^{2-} adsorvido, esta observación es una parte dificil para ser explicada. Esto podría resultar de una competición iónica en la superficie de la raíz, porque los iones MoO_4^{2-} y So_4^{2-} son de tamaño y cargas similares.

En suelos alcalinos y calcareos hay interacción Fe-Mo, y el azufre disminuye la disponibilidad de Mo.

Niveles altos de Mo en tomate asentúan la deficiencia de Fe -- cuando no se agregan sulfatos mientras que cuando sucede lo contrario se observa la disponibilidad de Fe, Mg, y Zn respectivamente porque los iones sulfato disminuian la cantidad del Mo obtienen dose incrementos en el rendimiento. (26).

El P. podría estimular la captación del Mo debido a la formación de un anión complejo fosfo-molibdato absorbido mas facilmente por la planta.

El contraste al P, la captación del Mo por las plantas es reducido por el azufre por una competencia directa entre dos aniones divalentes del mismo tamaño al aplicar S como $CaSO_4$ y se observó que - reducía el rendimiento y la concentración de N en chicharos cultivados en suelos con bajo contenido de Mo, estas interacciones entre S y Mo sugieren que debe tenerse cuidado en la utilización de fertilizantes con alto contenido de S. Cuando el Mo este presente en concentraciones limitantes en las plantas. (26).

2.8.3. Deficiencias y Toxicidad

La deficiencia de Mo es generalmente asociada con valores de pH menores de 5.5 y puede ser causada por disminución de la solubilidad y reacciones con Fe y Al.

Los sintomas de deficiencia difieren con los diferentes cultivos, pero como regla se observan primero como una clorosis intervenal, las leguminosas se vuelven amarillo pálido, sintomas caracteristicos de una deficiencia de N., además de clorosis general, hojas marchitas con moteados cloroticos que producen puntos necroticos, acorchamiento de la hoja y, acoplamiento de las hojas (menor crecimiento en los margenes que producen el efecto de cuchara).

Excesivas cantidades de Mo son tóxicas, especialmente para los - animales de pastoreo donde los suelos son localmente altos en Mo., - generalmente ocurre en la mayoría de las plantas cuando la concentración de este elemento es de .10 ppm. de Mo en la materia seca, los - niveles de toxicidad no han sido establecidos, estos niveles pueden exceder varios cientos de ppm sin afectar aparantemente en forma significativa el crecimiento de la planta. Sin embargo, las concentraciones elevadas de Mo en plantas forrageras son tóxicas al ganado a niveles mayores de 15 ppm de Mo. (26).

La práctica de usar cal en muchos programas de manejo de suelos ha enmascarado las deficiencias de Mo.

El Mo puede ser detectado por métodos colorimetricos, de absorción atómica, emición y espectroscopía de rayos X.

En analisis foliar la concentración de 0.1 ppm produce deficiencias, y los niveles óptimos son de 5 ppm.

El Mo es absorvido por el sistema vascular eficientemente y unicamente una parte de una planta deficiente puede requerir tratamiento para asegurar la recuperación de toda la planta en chicharo y frijol.

2.8.4. Fertilizantes con Mo

En Australia se mezclan solamente 670 gr. de oxido de Mo por cada tonelada de superfosfato antes de su aplicación al suelo.

El problema de mezclar uniformemente 676 gr. en una masa de una tonelada es evidente.

Fuente	Formula	% de Mo aprovechable
Molibdato de Na	$Na_2MO_4\ 2H_2O$	39
Molibdato de amonio	$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$	54
Trioxido de Mo	MoO_3	66
Sulfuro de Mo	MoO_2	60

Estos materiales son mezclados con los fertilizantes N-P-K, y son aplicados en proporciones que van desde 2 onzas (56,69 gr.) a 2 Lb. (0.906) kg. por acre. (26).

En áreas inaccesibles en las que el transporte y aplicación

de grandes tonelajes son dificiles y caros, el Mo ha sido de gran valor. Se encontro que al empapar la semilla de trébol en una solución de Mo sodico antes de plantar las semillas fué tan eficáz como aplicar el Mo en el fertilizante.

Los tratamientos a la semilla puede ser mas uniforme que los tratamientos al suelo, los tratamientos a la semilla han variado de aproximadamente 50 g./Ha. de Mo a 900 g./Ha. deberían ser evitados los tratamientos exesivos en Mo aplicado a la semilla porque se ha demostrado que tasas por encima de 450 g./Ha. disminuyen la viabilidad de la semilla.

Una aplicación de Mo a una tasa de 143 g/Ha. permanecia efectiva para la mayoría de las plantas de cosecha por varios años sin embargo, los suelos acidos que contienen oxidos de Fe y Al fijan fuertemente el Mo lo que hace que se requieran aplicaciones frecuentes. (26).

2.9. Función en la Planta

El Mo ha sido conocido desde hac tiempo como requerido para la asimilación normal de nitrógeno en las plantas. De las cuatro enzimas encontradas que contienen Mo: aldehido oxidasa, xantino oxidasa, nitrogenasa, y nitrato reductasa, únicamente las dos últimas se han encontrado en plantas. El Mo en estas cuatro enzimas parece tener funciones catalíticas similares y aún las proteinas de estas enzimas tienen características fisicoquímicas similares.

La nitrato reductasa, se encuentra en la mayoría de las especies de plantas, así como hongos y bacteris y es probablemente un factor clave en la dispersión de plantas bajo ambiente que varían en nitrógeno. El requerimiento incrementado de Mo de la mayoría de las plantas que

crecen en NO_3-N, pueden ser casi completamente responsable por el Mo en la nitrato reductasa, esta enzima es esencial en la asimilación de nitrato, ya que cata liza la primera etapa de reducción de NO_3 a NH_3. Es inductible en la presencia de su sustrato y del metal desapareciendo rápidamente cuando los nitratos son removidos del medio.

La actividad de la enzima "In vitro", es proporcional a su contenido de Mo hasta que la proteina es saturada. El Mo reducido artificialmente, tiene también la capacidad de reducir el NO_3, parecería entonces que la nitrato reductasa actúa como una enzima regulatoria en el metabolismo del nitrato, ya que: i) es inductible; ii) cataliza un paso principal en una vía metabólica importante; iii) tiene una velocidad de reemplazo rápida y iv) es suficientemente grande para estar constituída de varias subunidades. Entonces, cualquier cambio en cualquiera de estos factores, podría alterar la actividad de la enzima y por lo tanto, el metabolismo correcto de la planta.

Otra molibdenoproteína importante para las plantas, la nitrogenasa fija N_2 como NH_3, el cual es entonces asimilado por la planta. Está constituída por lo menos de dos proteínas teniendo ambas un requerimiento de Fe y una de ellas mostrando un requerimiento de Mo. El mecanismo catalítico exacto es desconocido, pero los datos disponibles sugieren que es similar al de nitrato reductasa. La molécula de N_2, está probablemente en contacto íntimo con el metal y el flujo de electrones pasa a través del metal. (26).

Ya que existe un pequeño requerimiento de Mo cuando las plantas crecen en NH_3, NO_2 ó $Co(NH_2)_2$ como fuente de nitrógeno, debe haber por lo

menos un papel adicional además de los ya descritos.

También lo requieren las plantas no leguminosas para la reducción del nitrato.

La fijación, asimilación y reducción del nitrógeno son, desde luego, requisitos previos a la síntesis de aminoácidos y proteínas y una deficiencia de Mo tiene sobre ellos, adversos efectos. También interviene en la acumulación de nitratos y en un evidente descenso en la actividad de la oxidasa del ácido ascórbico.

Si el Mo es esacaso, el que existe en la planta se concentrará en los nódulos en vez de las raíces o en las partes aéreas.

Los nódulos de alfalfa tienen que contener de 10 a 25 ppm y los de trébol de 4 a 8 ppm de Mo en un tejido nodulador seco (26).

2.10. Hidroponia

Cultivos en soluciones Nutritivas.

No tardaron mucho los científicos en darse cuenta de la imposibilidad de emplear suelos como medio para el crecimiento si se quería realizar algún tipo de estudio serio del contenido mineral de las plantas.

Las soluciones de cultivo representan en exelente medio para regular la cantidad y la proporción relativa de las sales minerales suministradas a las plantas en cualquier experimento.

Pueden hacerse buenos estudios cuantitativos sobre las necesidades nutricionales de las plantas empleando agua como medio de cultivo. Sin embargo, es necesario prestar atención a pequeños detalles si se quieren alcanzar buenos resultados. Si tenemos en cuenta que se puede lograr un crecimiento satistactorio con cantidades extremadamente pequeñas de oligoelementos, se presentan siempre problemas de contaminación. Alguno de los agentes de contaminación son: el medio que rodea a las raices, los reactivos empleados los recipientes, el agua, instrumentos de corte, semillas e incluso el polvo de la atmósfera ambiente.

Claro esta, la eliminación total de estas influencias contaminantes es imposible, pero se pueden reducir al mínimo.

Diversos estudios han demostrado que los mejores recipientes para las soluciones de cultivo son los de vidrio de borosilicato o los de polietileno. Sin embargo, incluso con el empleo de estos materiales, debe tenerse en cuenta que se producira una cierta contaminación

tal como la presencia de boro en el vidrio de borosilicato y, quizá de Mo y de Co en los de polietileno.

Se ha de tener muy presente las dosis de nutrientes que deben añadirse, de acuerdo con la edad de la planta, velocidad de crecimiento - del vegetal, condiciones que están ligadas a la climatología y a la especie cultivada, de ahi que, al proyectar los experimentos de cultivo, no solo es importante la composición inicial de la solución, sino también la capacidad que tenga de mantener el suministro deseado. O sea, que se deberá tener en cuenta el volumen de la solución con la cantidad de plantas, la velocidad de crecimiento y su grado de desarrollo. (50).

SOLUCION PATRON

		g/lt
1. Fosfato ácido de amonio	$NH_4H_2PO_4$	23
2. Nitrato de amonio	NH_4NO_3	40
3. Nitrato de calcio	$Ca(NO_3)_2$	189
4. Cloruro de calcio	$CaCl_2$	29
5. Cloruro de magnesio	$MgCl .6H_2O$	41
6. Nitrato de magnesio	$Mg(NO_3).6H_2O$	51
7. Sulfato de magnesio	$MgSO_4.7H_2O$	99
8. Fosfato ácido de potasio	KH_2PO_4	27
9. Nitrato de potasio	KNO_3	121
10. Sulfato de potasio	K_2SO_4	87
11. Acido bórico	H_3BO_3	0.72
12. Sultado de cobre (cristales)	$Cu_2SO_4.H_2O$	0.02
13. Sulfato ferroso (cristales)	$Fe_2SO_4.H_2O$	0.70
14. Cloruro de manganeso (cristales)	$Mn Cl . H_2O$	0.45
15. Sulfato de zinc (cristales)	$ZnSO_4.H_2O$	0.06
16. Acido molíbdico (85% MoO)	$H MoO.H_2O$	0.01

Solución nutritiva usada en este experimento a excepción del ácido molíbdico (50).

III. MATERIALES Y METODOS

Este experimento fué efectuado en el invernadero de la Facultad de Agronomía de la UANL, el cual se encuentra ubicado en la carretera Zuazua-Marín km. 17, siendo sus coordenadas geográficas 25°53' Latitud Norte y 100°03' Latitud Oeste, con una altura de 367 msnm.

Para este experimento se ocuparon los siguientes materiales:

Material biológico:

- Semilla de frijol "Canario 101"
- Cepa de bacterias Rhizobium phaseoli

Instrumental:

- 30 frascos de 3 litros cada uno
- Solución nutritiva
- Hielo seco
- Bolsas de polietileno negro
- Charola de propagación
- Perlita
- 5 motores (bombas de aereación)
- Agua destilada
- Manguera de 4 mm de diámetro
- Vasos deprecipitados
- Pipetas

Utilizamos una metodología cuyas características fueron accesibles en todos los aspectos a nuestras posibilidades, la cual pudiera reportar datos suficientes para apreciar los resultados de dicha experiencia.

en sus dos aspectos, tanto del cultivo como de las determinaciones del laboratorio.

Dentro de la metodología se llevaron a efecto los siguientes puntos:

Desarrollar el cultivo de frijol utilizando una técnica de hidropónia, lo que permitirá entre otras cosas, ejercer un control cuantitativo de las substancias preporcionadas a las plantas, utilizando una solución nutritiva cuya concentración en ppm de Mo, fluctuaría a razón de 0, 20, 40, 60, 80 y 100 ppm respectivamente, con cinco repeticiones por tratamiento.

El diseño experimental fue un diseño completamente al azar con cinco repeticiones.

El modelo estadístico es el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T\,i + Eij \qquad i = 1, 2, \ldots 6 \qquad j = 1, 2, \ldots r$$

Donde:

Y_{ij} = es el valor observado de la variable bajo estudio en el tratamiento i de la repetición j.

μ = media general

Ti = efecto del i-ésimo tratamiento

E_{ij} = es el error aleatorio que surge por el efecto conjunto de todos los factores no controlados por el diseño y que causan heterogeneidad en el experimento.

Se sembró el frijol en una charola de propagación con un medio inerte (perlita) inoculandolas previamente con la bacteria Rhizobium phaseoli y hasta que la mayoría de las plántulas midieron 10 cm fueron transplantadas a los frascos tomando las plantas más vigorosas. Los frascos con la solución nutritiva y el tratamiento, fueron de tres litros, cubriendose con bolsas de plástico negro para evitar daños a la raíz y a la bacteria por efecto de la luz.

El medio de sostén de la planta fue el hielo seco que sirvió también como tapa de cada frasco.

La cepa que se usó fue proporcionada por el Proyecto de "Fijación Biológica del Nitrógeno", al cual pertenece este trabajo y se aplicó por contacto directo con la semilla humedecida previamente al momento de la siembra en la charola.

La solución nutritiva (tabla) se preparó con los reactivos y la balanza analítica del Laboratorio de Suelos, así como también las determinaciones de los resultados. Como medida precautoria, se diluyó cada reactivo en agua destilada con el fin de evitar otro tipo de reacciones al disolverlos todos juntos, esta solución se aplicó cada 24 horas con el fin de mantener cada frasco con la planta a un aforo de tres litros según se consumía ésta.

En lo que respecta a aereación del medio radical, se usaron los motores electricos que estuvieron funcionando durante todo el ciclo del experimento, revisando constantemente la oxigenación en cada frasco, el desarrollo de la planta y la presencia de plagas y/o enfermedades además de posibles contraminaciones de la solución nutritiva.

El registro de datos en el experimento se llevó a cabo sólo hasta floración, ya que en el invernadero por falta de ventilación la temperatura llegó a 29°C, provocando la caida de las flores.

Las variables bajo estudio fueron:

X01: Cantidad de nódulos por planta

X02: Número de hojas

X03: Número de botones

X04: Número de flores

X05: Peso fesco de la planta

X06: Peso seco de la planta

X07: Porcentaje de nitrógeno fijado en la planta

X08: Gramos de nitrógeno fijado por planta

Para la cantidad de nódulos por planta (X01), se hicieron observaciones directas a la raíz.

En cuanto a la variable número de hojas (X02) se efectuó un recuento general incluyendo las de los cotiledones hasta el fín del experimento.

Para las variables número de botones (X03) y número de flores (X04), se efectuó un recuento total.

Para la variable peso fresco (X05), se extrajeron todas las plantas y se dejaron escurrir y posteriormente se pesaron en una balanza analítica con todo y raíz.

La variable peso seco de la planta (X06), éstas se pasaron a una estufa durante 40 horas a una temperatura de 50°C pesándose inmediatamente todas las plantas completas.

La variable X07 (Porcentaje de nitrógeno fijado por la planta), éste se calculó en base al peso seco de la planta y a la relación C:N (carbón-nitrógeno) de la misma.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

Como el tratamiento 1 (0 ppm de Mo) presentó diferencia altamente significativa para todos los parametros a medir se observa que las dosis de Mo que se probaron son niveles altamente tóxicos que hacen que los componentes del rendimiento se vean afectados grandemente.

Debido a que el margen extremo de toxicidad se encuentra a 34 ppm de Mo. se observa en la figura 9 que es el nivel de tolerancia del cultivo del frijol variedad "canario 101" por lo que se tomará en cuenta para un posterior experimento.

Esta toxicidad se encuentra en base exclusivamente a la planta de frijol de la variedad mencionada.

En cuanto a la fijación de nitrógeno se presentó un desequilibrio en la relación bacteria-planta por toxicidad a la segunda que causó que la fijación de nitrógeno se viera afectada desafortunadamente por lo que se tiene que el rango óptimo de fijación se encuentra dentro del rango de tolerancia de la planta, todo esto es debido a que las medias de tratamientos se presentan en forma decresiente a medida que aumenta la cncentración de Mo.

Para el porsentaje de nitrógeno fijado, obtuvimos la variable x08: gramos de nitrógeno fijado en la planta, a la cual se le efectuó un análisis de varianza siendo el efecto entre tratamientos altamente significativo y además, un análisis de re-

gresión para observar el comportamiento dela curva en la grá fica cuya ecuación es:

$$y = 0.236811 - 0.005620648\ (x)\ x0.00037656\ (x^2)\ ,$$

donde

y = gramos de nitrógeno por planta

x = ppm de Mo.

La cantidad de nodulos por planta en los tratamientos T1 (Oppm de Mo) y T3 (20 ppm de Mo) no se efectuó porque al ser los nodulos inmaduros, estos no tenían capacidad para fijar el nitrógeno por lo que se cree que la infección se mantuvo latente y los nodulos no se desarrollaron (6,41).

Otra posible causa por la que no se desarrolló la nodulación, fué porque la solución nutritiva contenía el nitrógeno suficiente para el desarrollo de la planta y por lo tanto, el número de nodulos son reprimidos por el nitrógeno (2).

La alta temperatura (39°C) también influyó en forma negativa, ya que se ha comprobado que a temperaturas de 36°C en el suelo, la mayoría de las bacterias de Rhizobium mueren (CIAT 1980).

La caida de flores y de botones se debió posiblemente a la alta temperatura y poca usutilación del medio ambiente por lo que no se forma la vaina (14).

La coeficiente de variación fueron altas debido a la muerte por toxicidad de las plantas a partir del tratamiento # 3 (40 p.p.m.).

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Del presente trabajo, se concluye lo siguiente:

Respecto al contenido de nitrógeno fijado en la planta, éste se obtuvo de la solución nutritiva y no de las bacterias, ya que los nodulos no maduraron por no presentar la coloración típica rosa por la presencia de la leg-hemoglobina por lo que se presume un parasitismo.

En cuanto a las dósis mayores de 40 ppm de Mo, éstas mostraron síntomas de toxicidad, ya que se observó que se detuvo el crecimiento, siguiendole una clorosis general muu fuerte y después una necrosis muriendo la planta.

En este trabajo, la temperatura alta no se pudo controlar y afectó a la mayoría de las bacterias, así como a la caída de flores.

Se recomienda efectuar un trabajo similar, pero ahora con una solución nutritiva con menos nitrógeno en el medio de cultivo.

Tomar un rango de concentraciones de ppm de Mo entre 0-40.

Controlar los factores ambientales tales como la temperatura, la higiene del área de trabajo y las plagas y enfermedades.

Como se observa en los resultados, la mejor dosis para el rendimiento y para el nitrógeno fijado es la de 0 pp de Mo (testigo) seguida de la de 20 ppm de Mo.

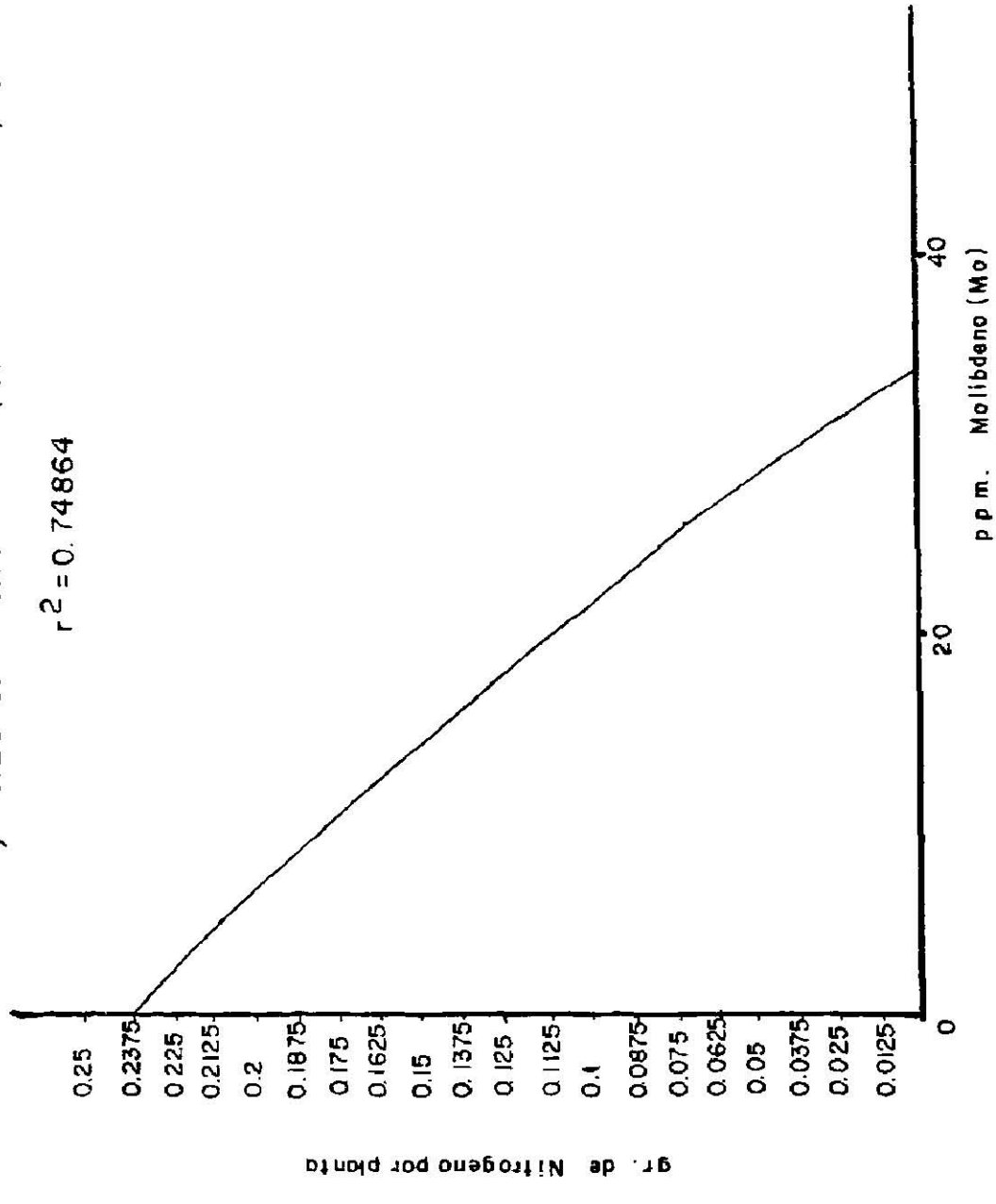


FIGURA 9. Curva de regresión para la toxicidad por Molibdeno y gramos de nitrógeno por planta.

VI. RESUMEN

En el Ciclo Primavera-Verano de 1986 en el invernadero de la Facultad de Agronomía, se realizó un experimento para determinar una dósis óptima fisiológica de Molibdeno y observar el comportamiento de éste en cuanto a nodulación y desarrollo de la planta

El experimento se realizó bajo un diseño completamente al azar con cinco repeticiones y seis tratamientos.

Los tratamientos fueron: T_1 Oppm (testigo), T_2 20 ppm, T_3 40 ppm, T_4 60 ppm, T_5 80 ppm y T_6 100 ppm respectivamente.

El medio de cultivo fue el de hidroponia y como fuente de Molibdeno se usó ácido molibdico, la variedad usada fue "Canario 101".

Por los resultados experimentales se pudo observar que si hubo diferencias significativas entre tratamientos para el número de hojas, número de flores, número de botones, peso seco, peso fresco, porcentaje de nitrógeno fijado por la planta y granos de nitrógeno por planta, siendo el testigo (T_1 = 0 ppm de Mo) el más significativo.

La nodulación solo se observó en los tratamientos T_1 = 0 ppm de Mo y T_2 20 ppm de Mo, encontrándose éstos en forma inmadura.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Alamong y Mertens. 1974. Energía de los procesos biológicos. Fotosíntesis y respiración. 1a. Ed. Limusa. México p. 39.

2. Alcantar, G.G. 1978. Estudio del efecto de diferentes dósis de nitrógeno en fuentes sobre los procesos de nodulación, fijación de nitrógeno y rendimiento de frijol (Phaseolus vulgaris) E.N.A.

3. Alexander, M. 1980. Introducción a la microbiología del suelo. 1a. edición. Ed. AGT. México, pp. 327-338.

4. Baker, F.K. 1981. The U.C. System for Producing Healthy Container-Growing Plants. University of Calif. U.S.A. P. 107.

5. Benavides, J.de D. 1982. Curso sobre Fisiología Vegetal. FAUANL. apuntes sin publicar.

6. Balck, C.A. 1975. Relaciones Suelo-Planta. 1a. ed. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina. pp. 545-556

7. Brill, W.J. 1979. Nitrogen fixigen maize? Simposio Internacional Sobre Transplante y Movilización de Genes. México. CONACYT.

8. Brock, T.D. 1970. Biología de los Microorganismos. 2a. ed. Editorial Omega. Barcelona, España. pp. 160, 442-446.

9. Buckman, H.O. y N.C. Braoy. 1977. Naturaleza y propiedades de los suelos. Montiel & Simons. Barcelona, España.

10. Carranza, G.E. 1984. Inoculación de 17 cepas de Rhizobium phaseoli en tres variedades de frijol (Phaseolus vulgaris) bajo condiciones de invernadero. Tesis FAUANL. Marín, N.L.

11. Cochran, W.G. y Cox, G.M. 1981. Diseños experimentales. 7a. ed. Editorial Trillas, México. p. 373.

12. Conn, E.E. y P.K. Stumpf. 1973. Bioquímica Fundamental. 2a. ed. Editorial LIMUSA. méxico. pp. 383-384.

13. Cordova, V.C. 1976. Fisiología Vegetal. 1a. ed. Edit. Blume. Madrid, España. pp. 258-260.

14. Devlin, R.M. 1980. Fisiología Vegetal. 3a. ed. Editorial Omega. Barclona, España. pp. 304-306.

15. Echegaray, A.A. 1958. Microbiología General y Agrícola. ITESM. Monterrey, N.L. México. pp. 111-112.

16. Engleman, E.M. 1979. Constribuciones al conocimiento del frijol en México. 1a. ed. E.N.A. Conlegio de Postgraduados Chapingo, México. p. 20.

17. Gilbert, A.F. 1953. Mineral nutrition of plants and animals. University of Oklahoma. p. 85.

18. Gómez, A.A. 1963. Efecto del pH, Mo y la temperatura del suelo sobre la nodulación en el frijol (Phaseolus vulgaris) causado por Rhizobium phaseoli. Tesis sin publicar. E.A.G. ITESM.

19. Havelka, V.D. y Boyle, M.G. 1979. Biological nitrogen fixation. Central Research and Development Department. Wiminton, Delaware.

20. Janssen, K.A. 1972. Effect of physical and nutrition al factors of the environment on nitrogen fixation, plant composition and yield of dark kidnsy beans (Phaseolus vulgaris). PhD. Thesis East Lansing Michigan State University.

21. Lerma, H.E. 1977. Efecto del Molibdeno en la nodulación y fijación del nitrógeno en la leguminosa Glycine wightii var tinaroo con la bacteria Rhizobium japonicum. Tesis sin publicar ITESM Monterrey, N.L. México.

22. López, R.J. y Lómez, M.J. 1978. El diagnóstico de suelos y plantas 3a. ed. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España.

23. Montage, D.; F.R. Warembourg; R., Bardin. 1981. Utilization on 15 N_2 for estimer la fixation d'azote et sa repartition chez les legu mineuses. Plant And Soil 63(2):131-139 Kes. Fr. Traduc. esp.

24. McKee, G.W. 1961. Somo effects of liming, fertilization and soil moisture on seedling growth and nodulation of birosfoot. Agronomy Journal 53:237-240.

25. Miranda, C.D. 1967. Origen de Phaseolus vulgaris L. Agrociencia. Escuela Nacional de Agricultura. C. de P. Chapingo, México.

26. Nortvet, A.F.; Giordano, E.M. y Lindsay, G.C. 1972. Micromutrientes en la agricultura. Soil Science Society of America, Inc. Madi son, Wisconsin, U.S.A.

27. Muevar, F. and A.G. Wollum II. 1981. Effect on high root temperature on Rhizobium strain on nodulation, nitrogen fixation and growth of soybean. Soil Science. A.J. 45:113-120.

28. Nujman, P.S. 1963. The relation between nodule bacteria and legume host in the rhizophere in the process of infection. Ecology soil borne plant pathogens. An International Symposim of plant pathogens in soil held at the University of Catolina, Barkley, U.S.A.

29. Odum, E.P. 1982. Ecología. CECSA. México pp. 128.

30. Patil and Single. 1983. Effect of Molibdeno on nitrogen fixation and accumulation of mineral nitrogen in soil. Abstract No. 53396 Vol. 76 No. 7 p. 5825

31. Pérez, T.H. 1980. Algunos aspectos biológicos de la asociación simbiótica P. vulgaris R. phaseoli. Tesis M.C. Colegio de Postgraduados, Chapingo, México.

32. Puppo, A. and J. Rigava. 1978. Cytorinins and morphological aspects of french bean roots in presence of Rhizobium. Physiology plantarum. 42:202-206. Ingl. Res.

33. Ray, P.M. .La planta viviente. CIA. Editorial Continental México p. 141.

34. Rivero, C.R. y C.T. Gildardo. 1976. Comparación de la nodulación y fijación de nitrógeno por Rhizobium en frijol (Phaseolus vulgaris L.) y soya (Glycine max. L. Merril). Tesis Palmira. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias pp 44.

35. Robles, S.R. 1982. Producción de granos y forrajes. 3a. ed. Editorial Limusa. México.

36. Rojas, G.M. 1981. Fisiología Vegetal Aplicada. 2a. ed. Editorial McGraw-Hill. México, D.F. pp. 89, 97, 101, 226.

37. Ruíz, O.M.; D. Nisto, E.I. Larios. 1979. Tratado elemental de Botánica. 15a. ed. ECLALSA. México. pp. 322, 323, 373, 419.

38. Russell, E.W. 1961. Soil conditions and plant grwoth. Ninth ed. Published by Lon.

39. Salisbury, B.F. y C.F. Ross. 1978. Plant Physiology. 1a. ed. Editorial Wadsworth, USA. Pp. 192-196.

40. Salle, A.J. 1965. Bacteriología. 2a. ed. Editorial Gustavo Gili. Barcelona, Espa.a, pp. 679-724.

41. Sánchez, M.A. 1964. Microbiología Agrícola. Escuela Nacional de Agricultura. Colegio de Postgraduados, Chapingo, México. pp. 128-232.

42. Tanner, F.W. and F.W. Tanner Jr. 1948. Bacteriology. John Willey & Sons. New York. USA. pp. 123-124.

43. Tisdale, S.L. y W.L. Nelson. 1982. Fertilidad de suelos y fertilizantes. 1a. ed. Editorial UTEHA, S.A. México. pp. 138-200.

44. Velázquez, H.A. y Chavez, R.S. 1981. Aplicación de Fe, S_1 y Mo a suelos calcareos de Matamoros, Tamps. bajo condiciones de invernadero. XVI Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo, S.L.P. p. 461 Tomo I.

45. Vige, G.T.; I.L. Pepper and D.F. Bezdiecek. 1981. The effect of casmium on nodulation and $N_2(C_2H_2)$-fixation by dry beans (Phaseolus bulgaris L.) Journal of Environmental Quality. 10(1): 87-90.

46. Westerman, D.T. et al. 1981. Nitrogen sources for bean seed production. Agronomy Journal. 73:660-664. Res. Ingl.

47. Whyte, R.O. y H.C. Trumble. 1968. Las leguminosas en la agricultura 2a. ed. FAO. Estudios Agropecuarios. Yugoslavia. pp. 193-203.

48. SARH. 1981. Producción agrícola nacional. Anuario estadístico. Subsecretaría de Agricultura y Operación. Dirección General de Economía Agrícola.

49. Anónimo. 1982. Consumos aparentes de productos agrícolas. Econotécnia Agrícola. Dirección General de Econotécnia Agrícola. Vol.V No. 7. SARH. México. pp. 37-38.

50. Anónimo. 1983. Nutrient solution culture of plants. The pennsylvania State University. College of Agriculture, Extension Service, University Park, Pennsylvania, USA.

VIII. A P E N D I C E

CUADRO 1. Análisis de varianza para el número de hojas

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.cal.	F.tab. 0.05	F.tab. 0.01
Media	1					
Tratamiento	5	100,973.195	20,194.639	61.460	4.26	7.82
Error	24	7,886.016	328.584			
Total	30	108,859.211	3,753.766			

$$\% \quad CV = \frac{328,584}{56.4} \quad X\ 100 = 32.13$$

CUADRO 2. Análisis de varianza para el número de flores.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.cal.	F.tab. 0.05	F.tab. 0.01
Media	1					
Tratamiento	5	2,211.900	442,380	9,432	4.26	7.82
Error	24	1,125.600	46,900			
Total	30	3,337.500	115.086			

$$\% \text{ C.V.} \quad \frac{49.900}{5.5} \quad X\ 100 = 128.43$$

Cuadro 3. Análisis de varianza para el número de botones

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.cal.	F.tab. 0.05	F.tab. 0.01
Media	1					
Tratamiento	5	4,161.767	832.353	11.795	4.26	7.82
Error	24	1,693.599	70.567			
Total	30	5,855.366	201.909			

$$\% \text{ C.V.} \quad \frac{70.567}{10.233} \quad x\ 100 = 82.09$$

CUADRO 4. Análisis de varianza para el peso fresco.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F. cal.	F.tab 0.05	0.01
Media	1					
Tratamiento	5	15,291.538	3,058.308	19.848	4.26	7.82
Error	24	3,698.034	154.085			
Total	30	18,989.572	654,813			

% C.V. $\frac{154.085}{59.688}$ x 100 = 20.79

Cuadro 5. Análisis de varianza para el peso seco

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F. cal	F. tab. 0.05	0.01
Media	1					
Tratamiento	5	2,442.230	488,446	19.927	4.26	7.82
Error	24	588.271	24.411			
Total	30	3,030.5	104.5			

% C.V. $\frac{24.511}{23.877}$ x 100 = 20.73

Cuadro 6. Análisis de varianza para el porcentaje de nitrógeno fijado por la planta.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.cal.	F. tab. 0.05	0.01
Media	1					
Tratamiento	5	0.478	0.096	20.170	4.26	7.82
Error	24	0.114	0.005			
Total	30	0.592	0.020			

% C.V. $\frac{0.005}{0.334}$ x 100 = 21.17

CUADRO 7. Análisis de varianza para gramos de nitrógeno fijado por planta.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.cal.	F.tab. 0.05	F.tab. 0.01
Media	1					
Tratamiento	5	0.168	0.034	16.411	4.26	7.82
Error	24	0.049	0.002			
Total	30	0.217	0.007			

% C.V. $\frac{0.002}{0.014}$ x 100 = 319.43

Cuadro 8. Análisis de regresión para gramos de nitrógeno por planta.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.cal.	F. tab. 0.05	F. tab. 0.01
Tratamiento	5	0.168	0.034	16.441	2.62	3.90
Lineal	1	0.12071	0.12071	60.355	4.26	7.82
Cuadrático	1	0.0236	0.023625	11.8125	4.26	7.82
Cúbico	1	0.00562	0.005625	2.8125	4.26	7.82
Error	24	0.049	0.002			
De más	2	0.018035	0.0090178	0.45	3.40	5.61

Ejecución ajustada: $Y = Bo + B_1 X_1 + B_2 X_1^2$

$r^2 = 0.74864$

ppm Tratamiento	Número hojas	Número flor	Número botón	Peso fresco	Peso seco	% de N fijado	Gr. de N. por planta
T1	163	27	51	81.52	32.61	0.4565	0.1489
0	147	49	31	121.80	48.52	0.6820	0.3309
	140	12	16	96.22	38.59	0.5380	0.2076
(Testigo)	148	9	34	113.42	45.37	0.6351	0.2881
	169	17	21	108.17	43.27	0.6057	0.2621
T2	57	11	23	62.67	15.07	0.3509	0.0880
	138	8	17	110.25	44.10	0.6117	0.2698
	148	16	23	59.72	23.89	0.3341	0.0798
20	142	4	16	62.32	24.13	0.3378	0.0815
	108	12	23	72.50	29.00	0.406	0.1177
T3	35		19	50.72	20.29	0.2840	0.0576
	61		33	54.82	21.93	0.3070	0.0673
40	15			50.67	20.37	0.2937	0.0578
	29			47.60	19.04	0.2665	0.0507
	44			47.35	18.94	0.2651	0.0502
T4	4			50.27	20.11	0.2815	0.0566
	17			44.02	17.61	0.2465	0.0434
60	11			47.00	18.81	0.2632	0.0495
	13			44.62	17.85	0.2499	0.0446
	29			44.02	17.61	0.2465	0.0434
T5	4			43.95	17.58	0.2461	0.0433
	13			44.25	17.70	0.2478	0.0439
80	4			46.05	18.42	0.2578	0.0475
	8			44.75	17.91	0.2507	0.0449
	9			45.17	18.07	0.2529	0.0457
T6	6			57.37	22.95	0.3213	0.0737
	11			43.75	17.50	0.245	0.0429
	9			45.80	18.32	0.2569	0.0471
	4			20.25	8.10	0.1134	0.0092
	6			31.62	12.65	0.1771	0.0224

FE DE ERRATAS

	PAGINA	RENGLON	DICE	DEBE DECIR
1.	3	20	1500	150
2.	18		capas	cepas
3.	50	Tabla	MoO_2	MoS_2
4.	51	7	900	90
5.	51	24	bacteris	bacterias

007251