

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE SUELOS

Efecto de rizobacterias aisladas de malezas sobre trigo (*Triticum aestivum* L.) var. Pavón F-76 bajo condiciones controladas.

POR:

RENÉ GUZMÁN CORCHADO

**Que somete a consideración del H. Jurado Examinador como requisito parcial
para obtener el título de:**

INGENIERO AGRÓNOMO EN SUELOS

Aprobada
Presidente del jurado

MC. Víctor S. Peña Olvera

Sinodal

Sinodal

MC. Blanca A. Valdivia Urdiales

Dr. Edmundo Peña Cervantes

Ing. Juan Francisco Martínez Ávalos
Coordinador de la División de Ingeniería

Buenavista, Saltillo, Coahuila.
Noviembre de 1997

AGRADECIMIENTOS

A la MC. Blanca Valdivia por darme la oportunidad de trabajar en parte de su proyecto doctoral y por ese impulso hacia el trabajo y constancia, además, por su amistad y confianza.

Al MC. Víctor Samuel Peña por su asesoría en la presente investigación y el apoyo en la realización del mismo.

Dr. Edmundo Peña por sus sugerencias y revisión a este trabajo.

A la TLQ. Margarita Castillo del laboratorio de Microbiología de Suelos por su colaboración durante el desarrollo este trabajo.

A la TLQ. Laura del laboratorio de Biotecnología del Departamento de Horticultura por su valiosa colaboración en los análisis de nitrógeno.

A la Q.F.B. Karina Alcalá Aguilar en una parte de los análisis microbiológicos.

A Patricia Herrera, a la secretarias Lilia García y Ma. del Rosario Alvarez, a la generación LXXXII.

Gracias a todos por su confianza.

DEDICATORIA

A mis padres:

J. Dolores Guzmán Hernández

Ma. del Carmen Corchado Valencia

Por haberme dado la mejor herencia: una profesión. Por todo apoyo para lograr este objetivo. Por la esperanza.

A mis hermanos:

Noé, Lorena y familia, Leticia, Chabelo, José, Alejandro y Javier.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
1. El Cultivo de Trigo	6
1.1. Descripción Botánica	6
1.2. Etapas de Crecimiento del Trigo: Escala de Feeke	8
1.3. Adaptación del Trigo	9
1.3.1. Temperatura	9
1.3.2. Fotoperiodo	10
1.4. Nutrición de la Planta de Trigo	11
2. Nitrógeno en la Planta	13
3. Nitrógeno del Suelo	15
4. Rizósfera.....	16
4.1. Rizodeposición.....	17
4.2. Microorganismos de la Rizósfera	18
4.3. Factores que Afectan a la Población Rizosférica	19
5. Rizobacterias	21
5.1. Inoculación de Rizobacterias	22
5.2. Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal	23
5.3. Fijadores de Nitrógeno Asimbióticos	25
6. Malezas	28
MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
1. Localización del Sitio Experimental	30
2. Aislamiento de Bacterias	30
2.1. Recolección de la Muestra	30
2.2. Preparación de Medios de Cultivo	31
2.2.1. Esterilización del Material de Vidrio y Medios Nutritivos	32
2.3. Aislamiento Bacteriano.....	32
2.4. Cultivo Puro.....	33

3.	Preparación del Inóculo e Inoculación	34
4.	Preparación de Unidades Experimentales.....	34
4.1.	Ensamblaje de las Unidades.....	36
4.2.	Solución Nutritiva para las Plantas.....	36
5.	Siembra de Trigo	37
6.	Etapas de Muestreo.....	38
7.	Descripción de Tratamientos	38
7.1.	Unidades Experimentales	39
8.	Variables Evaluadas	39
9.	Interpretación de Resultados	40
9.1.	Análisis Estadístico	40
	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
1.	Las Rizobacterias en Trigo	42
2.	Evaluación al Amacollamiento (EF5)	44
2.1.	Producción de Biomasa	44
2.2.	Nitrógeno total.....	48
3.	Evaluación al Espigamiento (EF10.5).....	54
3.1.	Producción de Biomasa	54
3.2.	Nitrógeno Total.....	58
4.	Efecto Total sobre Producción de Biomasa.....	63
5.	Efecto Total sobre Nitrógeno Total	63
	CONCLUSIONES	67
	LITERATURA CITADA	68
	APÉNDICE.....	74

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Escala de Feeke.	8
Cuadro 2. Composición del medio Ashby.	31
Cuadro 3. Solución mineral Jensen para plantas.	37
Cuadro 4. Tratamientos utilizados en el cultivo de trigo var. Pavón F-76.	39
Cuadro 5. Estimación bacteriana de las rizobacterias presentes en la raíz de trigo en la etapa de espigamiento (EF10.5).	43
Cuadro 6. Efecto de la inoculación de rizobacterias sobre la producción de biomasa (g) de trigo variedad Pavón F-76 al amacollamiento (EF5).	44
Cuadro 7. Efecto de la inoculación de rizobacterias sobre nitrógeno total (%) de trigo variedad Pavón F-76 al amacollamiento (EF5).	48
Cuadro 8. Efecto de la inoculación de rizobacterias sobre la producción de biomasa (g) en trigo variedad Pavón F-76 al espigamiento (EF10.5).	54
Cuadro 9. Efecto de la inoculación de rizobacterias sobre nitrógeno total (%) de trigo variedad Pavón F-76 al espigamiento (EF10.5).	58
Cuadro A. 1. Análisis de varianza para materia seca de planta (mg) de trigo var. Pavón F-76 al amacollamiento (EF5).	75
Cuadro A. 2. Análisis de varianza para materia seca de planta (mg) de trigo var. Pavón F-76 al espigamiento (EF10.5).	75
Cuadro A. 3. Análisis de varianza para por ciento de nitrógeno total de planta de trigo var. Pavón F-76 al amacollamiento (EF5).	75
Cuadro A. 4. Análisis de varianza para por ciento de nitrógeno total de planta de trigo var. Pavón F-76 al espigamiento (EF10.5).	76
Cuadro A. 5. Análisis de varianza para contenido de nitrógeno total de planta de trigo var. Pavón F-76 al amacollamiento (EF5).	76
Cuadro A. 6. Análisis de varianza para contenido de nitrógeno total de planta de trigo var. Pavón F-76 al espigamiento (EF10.5).	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Jarra de Leonard ensamblada.	35
Figura 2.	Efecto de la inoculación de rizobacterias en la producción de materia seca en raíz y hoja de trigo var. Pavón F-76 al amacollamiento (EF5).	45
Figura 3.	Efecto de la inoculación de rizobacterias sobre la producción de biomasa en la planta de trigo variedad Pavón F-76 al amacollamiento (EF5).	47
Figura 4.	Efecto de la inoculación de rizobacterias sobre el porcentaje de nitrógeno total en raíz y hoja de trigo var. Pavón F-76 al amacollamiento (EF5).	49
Figura 5.	Efecto de la inoculación de rizobacterias sobre el contenido de nitrógeno total en raíz y hojas de trigo var. Pavón F-76 al amacollamiento (EF5).	51
Figura 6.	Efecto de la inoculación de rizobacterias en el contenido de nitrógeno total de planta de trigo variedad Pavón F-76 al amacollamiento (EF5).	52
Figura 7.	Efecto de la inoculación de rizobacterias sobre la producción de materia seca en raíz, hoja, tallo, espiga de trigo var. Pavón F-76 al espigamiento (EF10.5).	55
Figura 8.	Efecto de la inoculación de rizobacterias sobre la producción de biomasa de trigo var. Pavón F-76 al espigamiento (EF10.5).	57
Figura 9.	Efecto de la inoculación de rizobacterias sobre el por ciento de nitrógeno total en raíz, tallo, hoja y espiga de trigo var. Pavón F-76 al espigamiento (EF10.5).	59
Figura 10.	Efecto de la inoculación de rizobacterias sobre el contenido de nitrógeno total en partes de planta de trigo var. Pavón F-76 al espigamiento (EF10.5).	61
Figura 11.	Efecto de la inoculación de rizobacterias en el contenido de nitrógeno total de planta de trigo variedad Pavón F-76 al espigamiento (EF10.5).	62
Figura 12.	Efecto de la inoculación de rizobacterias sobre la producción de biomasa (A) y por ciento de nitrógeno total (B).	65
Figura 13.	Efecto de la inoculación de rizobacterias sobre el contenido de nitrógeno total de planta de trigo var. Pavón F-76 en amacollamiento y espigamiento.	66

RESUMEN

Se realizó un experimento en el que se inocularon rizobacterias (RB) en plantas de trigo con el objetivo de evaluar su efecto sobre la producción de biomasa y nitrógeno total. Las rizobacterias aisladas de malezas extraídas del Bajío de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro y crecidas en un medio sin nitrógeno (Ashby) se inocularon a la rizósfera en plántulas de trigo cultivadas en un medio semihidropónico (jarras de Leonard), con solución nutritiva de Jensen. Los tratamientos consistieron de la inoculación de cuatro rizobacterias en forma individual y dos combinaciones de ellas. Las variables evaluadas fueron la producción de biomasa y nitrógeno total en dos etapas fenológicas, amacollamiento y espigamiento.

Las rizobacterias aisladas de cuatro malezas (gualda, *Reseda luteola* L.; cebollín, *Asphodelus fistulosus* L.; nabo silvestre, *Eruca sativa* Mill. y tres barbas *Aristida* sp.) e inoculadas en plántulas de trigo colonizaron la rizósfera. Los tratamientos a los que se inocularon las RB aisladas de nabo silvestre (crucífera) y tres barbas (gramínea) incrementaron la producción de biomasa (36 y 13 por ciento, respectivamente) en la etapa de amacollamiento aunque estadísticamente no hubo diferencia significativa entre ellos y el control. Al espigamiento, sólo la RB aislada de tres barbas produjo 12.7 por ciento más materia seca que el control. Las inoculaciones no tuvieron efecto sobre la cantidad de materia seca de la raíz de las plantas de trigo en las dos

etapas evaluadas. La RB aislada de cebollín y las inoculaciones combinadas mostraron un efecto negativo sobre la producción de biomasa tanto al amacollamiento como al espigamiento.

El por ciento de nitrógeno al amacollamiento fue estadísticamente igual para el control y los tratamientos RB1, RB2 y RB4; sin embargo, el control mostró el mayor por ciento para el amacollamiento. Al espigamiento, los tratamientos RB2, RB3 y las inoculaciones combinadas presentaron el mayor por ciento de nitrógeno.

En cuanto a contenido de nitrógeno total (mg) en la planta al amacollamiento, el tratamiento con RB3, aislada de nabo silvestre, fue mayor en 12.5 por ciento con respecto al control. En contenido de nitrógeno total, los mayores efectos se observaron con el tratamiento RB4 (rizobacteria aislada de tres barbas) que produjo un incremento de 48 por ciento con respecto al control, y con RB3 (rizobacteria aislada de nabo silvestre) 13 por ciento mayor al control.

INTRODUCCIÓN

Los sistemas agrícolas actuales buscan maximizar el rendimiento de los cultivos mediante la aplicación, en ocasiones excesiva, de fertilizantes de origen inorgánico. El uso de altas dosis de fertilizantes nitrogenados no implica que el cultivo los absorba totalmente, sino que muchos de los nutrimentos adicionados se pierden, pudiendo causar alteraciones de las condiciones naturales del suelo que repercuten en el sistema suelo-planta. Actualmente existe la tendencia de buscar y encontrar nuevas alternativas en la producción agrícola que estén acordes con el medio ambiente.

Los microorganismos del suelo intervienen en la mayoría de las transformaciones bioquímicas de la materia orgánica y consecuentemente muchos elementos esenciales quedan en forma disponible para las plantas, manteniendo de esa forma la fertilidad biológica del suelo. La importancia de los microorganismos dentro del sistema suelo-planta radica en que pueden provocar cambios significativos al promover el crecimiento del cultivo.

En la región de la rizósfera, la población microbiana interactúa con la raíz de diferentes plantas. Si la interacción es positiva, aumenta la disponibilidad o absorción de nutrimentos, que se refleja en el incremento de la producción del cultivo. Los mecanismos bacterianos responsables de estos cambios son variados, e incluyen: fijación de nitrógeno, producción de sustancias como ácido indolacético, que estimulan el crecimiento vegetal, sideróforos y liberación de antibióticos, que reducen el efecto nocivo de la microflora nativa, entre otros.

Se han utilizado bacterias con estas características para inocular plantas y sostener o aumentar su rendimiento aún con dosis reducidas de fertilizantes nitrogenados. Los estudios más frecuentes se realizan en cultivos como el trigo, importantes en la alimentación humana.

Por otra parte, las malezas son vegetales que se presentan en forma no deseada en las áreas de cultivo y prosperan en todo tipo de condiciones climáticas y edáficas, y son fuente de vida de una población microbiana nativa que interviene en los diferentes procesos de transformación y reciclado de nutrimentos.

En el presente trabajo se inocularon rizobacterias aisladas de malezas comunes del área de influencia de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, en Saltillo, Coahuila, en trigo var. Pavón F-76 cultivado en un medio

semihidropónico para determinar el efecto sobre su crecimiento. Para lo cual se plantearon los siguientes:

Objetivos:

1. Evaluar el efecto de la inoculación de las rizobacterias aisladas de malezas crecimiento del trigo (*Triticum aestivum* L.) variedad Pavón F-76.
2. Seleccionar las rizobacterias que muestren un efecto positivo en el trigo.

Hipótesis:

Las rizobacterias inoculadas en trigo incrementan el crecimiento de la planta.

REVISIÓN DE LITERATURA

1. El Cultivo de Trigo

1.1. Descripción Botánica

El sistema radical del trigo está compuesto por raíces primarias producidas cuando la semilla de trigo germina y por raíces permanentes o adventicias que nacen de los nudos inferiores de los tallos. Las raíces adventicias al principio no se ramifican y están cubiertas de pelos radicales en toda su longitud, después aparecen ramificaciones y los pelos radicales desaparecen, pero no totalmente, pues se mantienen en la zona apical a fin de cumplir su misión de pelos absorbentes. Un máximo de cinco a siete raíces seminales puede funcionar durante toda la vida de la planta de trigo. Las raíces se desarrollan a partir de los nudos del eje principal o sus ramificaciones cerca de la superficie (Soldano, 1978).

El tallo principal nace del embrión, y los macollos nacen de las yemas que se encuentran en los nudos basales del tallo principal, a su vez, estos macollos pueden dar lugar a nuevos macollos. La cantidad depende de la variedad del trigo, época y densidad de siembra, fertilidad del suelo y condiciones climáticas (Martín, 1990).

En estado de plántula, los nudos están muy juntos y cerca de la superficie del suelo; a medida que va creciendo la planta ésta se alarga y emite brotes que dan lugar a otros tallos que son los que constituyen los macollos. Cada macollo forma de sus nudos basales, su propio sistema radical adventicio. La hoja de trigo es lanceolada, compuesta por vaina y limbo. La espiga está formada por espiguillas dispuestas alternadamente en un raquis o eje central.

1.2. Etapas de Crecimiento del Trigo: Escala de Feeke

Large (1954), describió las diferentes fases de crecimiento de los cereales de grano pequeño de acuerdo a lo establecido por Feeke. Estas fases o etapas fenológicas son: amacollamiento, elongación del vástago, espigamiento, floración y madurez; a su vez, cada una fue dividida en estados que se describen en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Escala de Feeke.

Etapa	Estado	Descripción
Amacollamiento	1	Primer tallo
	2	Principio de amacollamiento
	3	Amacollamiento formado por, hojas con frecuencia enrolladas
	4	Principia erección del pseudotallo, la envoltura de la hoja comienza a crecer
	5	Pseudo-tallo (formado por las envolturas de las hojas) fuertemente erectos
Elongación del Vástago	6	Primer nudo del tallo visible en la base
	7	Segundo nudo del tallo formado, apenas visible
	8	Última hoja visible, pero aún enrollada, principia el crecimiento de la espiga
	9	Lígula de la última hoja apenas visible
	10	Embuchamiento, envoltura de la última hoja formada completamente, engrosamiento de la espiga aún no visible.
Espigamiento	10.1	Barbas apenas apareciendo
	10.2	Floración :25 por ciento de las espigas fuera de la hoja bandera
	10.3	Floración :50 por ciento de las espigas fuera de la hoja bandera
	10.4	Floración :75 por ciento de las espigas fuera de la hoja bandera
	10.5	Floración :95 por ciento de las espigas fuera de la hoja bandera
Floración	10.5.1	Principia polinización
	10.5.2	Polinización en la parte superior de la espiga
	10.5.3	Polinización en la parte basal de la espiga
Madurez	11.1	Estado lechoso del grano
	11.2	Contenido de germen suave pero seco
	11.3	Germen duro

1.3. Adaptación del Trigo

El trigo se produce en regiones templadas y frías localizadas desde 15 a 60° de latitud norte y de 27 a 40° de latitud sur. En las regiones con climas cálidos, el trigo se cultiva en altas latitudes o en la estación fría (Leonard y Martin, 1967).

1.3.1. Temperatura

El trigo es un cultivo de estación fría; la mínima temperatura de crecimiento del trigo es de 3 a 4 °C y la óptima de 30 a 32 °C. El contenido mínimo de humedad para la germinación del trigo es de 35 a 45 por ciento del peso seco del grano. La germinación puede ocurrir a temperaturas entre 4 y 37 °C y la óptima de 12 a 25 °C. El trigo de invierno es más resistente al frío que la cebada de invierno o la avena.

Las mejores temperaturas para una buena producción de trigo oscilan entre 10 y 25 °C con las condiciones de las regiones trigueras de México (Martín, 1990). Las temperaturas cálidas durante el crecimiento inicial del trigo pueden retardar el espigamiento. Las altas temperaturas combinadas con alta humedad pueden fomentar el desarrollo de royas o provocar una reducción en el rendimiento.

1.3.2. Fotoperiodo

El desarrollo de las plantas de trigo de la etapa vegetativa a la etapa reproductiva depende de la intensidad así como de la duración diaria de iluminación. Los días largos aceleran la formación de inflorescencias y los días cortos aumentan el crecimiento vegetativo de la planta de trigo. Los trigos de primavera generalmente pueden llegar a la inflorescencia a cualquier longitud del día, pero el proceso es acelerado con un incremento en la longitud del día, más en trigo de primavera que en variedades de invierno. El trigo de primavera completa su ciclo de vida rápidamente cuando se presentan días largos con temperaturas de 20 °C o más. El trigo de invierno generalmente completa su ciclo de vida más rápidamente a bajas temperaturas durante las primeras etapas de crecimiento, pero con días largos en las últimas etapas. Los fotoperíodos que acortan el período vegetativo del trigo de primavera o verano reducen el número de entrenudos y hojas en cada vástago (Leonard y Martin, 1967).

En México, debido a la gran amplitud de adaptación, se han formado variedades que son insensibles al fotoperíodo, con madurez temprana y buen rendimiento en una amplia gama de latitudes (Martín, 1990).

1.4. Nutrición de la Planta de Trigo

Los principales nutrimentos absorbidos por las plantas de trigo incluyen nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, azufre y pequeñas cantidades de otros elementos. Las cantidades dependen de la disponibilidad de los nutrimentos y la etapa de crecimiento de la planta. El nitrógeno es un constituyente esencial del protoplasma y es un componente de las proteínas y de la molécula de clorofila. El fósforo promueve el rápido crecimiento y la madurez temprana. El potasio promueve la síntesis de proteínas. El azufre entra en la composición de las proteínas. El calcio es necesario para el desarrollo normal y madurez de la planta de trigo. El magnesio forma parte de la molécula de clorofila. El fierro es esencial para la formación de clorofila y el manganeso es necesario en el metabolismo de los carbohidratos y en el desarrollo de la semilla (Peterson, 1965).

Muchos de los minerales, excepto el nitrógeno, son absorbidos antes o durante la floración, pero la transferencia a la espiga puede ocurrir hasta alrededor de una semana antes de la cosecha. Las plantas de trigo absorben mucho de su nitrógeno, generalmente en forma de nitrato. La cantidad de nitrógeno en los tallos y hojas llega a su punto máximo al espigamiento, después el nitrógeno comienza a incrementarse en las espigas y decrece en los tallos y hojas. La cantidad en el grano incrementa desde el comienzo de su formación hasta su madurez. En las variedades con alto o bajo contenido de proteína antes del espigamiento no hay diferencias en el contenido de nitrógeno

total de las partes vegetativas, pero después de esto el nitrógeno incrementa más rápidamente en las espigas de las variedades de alto contenido proteínico (Leonard y Martin, 1967).

El principal compuesto proteico en el grano de trigo es el gluten. Otras proteínas son albúmina y globulina. El contenido normal de proteínas en el grano va de 10 a 15 por ciento. El gluten es formado en el desarrollo del grano de la translocación de aminoácidos y amidas. Estos compuestos más simples de nitrógeno predominan en la formación inicial del grano, pero son rápidamente convertidos a proteínas (Soldano, 1978).

El fósforo es importante en la nutrición de la planta de trigo, aunque la cantidad total en la parte aérea nunca alcanza el uno por ciento en peso seco. La absorción de este nutrimento es muy rápida. La máxima cantidad de fósforo en la planta se alcanza dos semanas antes de la cosecha.

El potasio es esencial para la nutrición de la planta, particularmente durante la formación activa de carbohidratos. La absorción de potasio incrementa marcadamente tan pronto como comienza el crecimiento rápido. En la planta alcanza su máxima cantidad siete semanas antes de la cosecha. Se ha observado una pérdida considerable de potasio durante las últimas seis semanas antes de la maduración del grano, cuando las hojas se secan.

El máximo porcentaje de azúcares en la planta de trigo ocurre durante las primeras etapas de crecimiento. En las espigas, el mayor porcentaje en la primera etapa de formación y disminuye con algunas fluctuaciones hasta la cosecha. La máxima cantidad de azúcares en las plantas es alcanzada en la etapa lechosa del grano.

Muchas de las pérdidas de carbohidratos tienen lugar durante las tres últimas semanas antes de la cosecha. Las mayores pérdidas en los tallos y hojas son observadas cuando ocurre el mayor incremento en la espiga. El porcentaje de almidón en los vástagos, hojas y cubierta del grano raramente excede al dos por ciento. El almidón en el grano inmaduro puede variar de 27 a 37 por ciento (Leonard y Martin, 1967).

2. Nitrógeno en la Planta

El amoníaco (NH_3^+) producido por la fijación de nitrógeno o por la fertilización se convierte rápidamente en nitrato (NO_3^-) por la acción de las bacterias del suelo, así que la mayor parte del nitrógeno útil para la planta está en forma muy oxidada de ion nitrato (Simmons, 1987). Dado que casi todos los compuestos orgánicos nitrogenados contienen o se constituyen por nitrógeno completamente reducido, la planta debe reducir los nitratos para poder utilizarlos en las síntesis orgánicas (Bidwell, 1990).

El nitrógeno tomado por la planta es reducido a amonio (NH_4^+) por dos enzimas, nitrato reductasa (que reduce nitrato a nitrito) y nitrito reductasa (nitrito a amonio). La reducción puede ocurrir en raíces o vástagos, dependiendo de la especie, pero la reducción en tallos es probablemente más importante cuantitativamente. El amonio así producido es incorporado como aminoácidos (Leonard y Martin, 1967).

Austin *et al.* (1977) establecen una fuerte asociación positiva entre la acumulación de materia seca de la planta y la acumulación de nitrógeno, ambas antes y después de la antesis. Simpson *et al.* (1983), encontraron que en plantas de trigo cultivado bajo ambientes controlados sin ninguna aportación exógena de nitrógeno y después de la emergencia de la hoja bandera, el nitrógeno se redistribuye extensivamente de las partes vegetativas al grano; las hojas pueden contribuir con 40 por ciento, los tejidos de la espiga que no son grano 23 por ciento, los tallos 23 por ciento, y las raíces 16 por ciento, este nitrógeno se redistribuye al grano durante la mitad de la etapa de llenado de grano.

En cultivos como en maíz, la absorción de nitrógeno, fósforo y potasio ocurre con anterioridad al desarrollo de la planta. Así, cuando la planta lleva formado solamente un 20 por ciento de la materia seca ya se ha absorbido aproximadamente el 30 por ciento del fósforo, el 45 por ciento del nitrógeno y más del 50 por ciento del potasio. Cuando el crecimiento alcanza el 50 por

ciento, la absorción de elementos totaliza el 60 por ciento del fósforo, el 70 por ciento del nitrógeno y el 85 por ciento del potasio (Domínguez, 1989).

3. Nitrógeno del Suelo

El nitrógeno del suelo se encuentra en forma orgánica e inorgánica. El nitrógeno orgánico ingresa al suelo por los tejidos y órganos de los vegetales y animales y constituye más del 85 por ciento del nitrógeno total existente en el suelo.

Las transformaciones importantes para la nutrición vegetal son predominantemente microbianas, como la mineralización, nitrificación, desnitrificación y fijación de nitrógeno. La materia orgánica es atacada por los organismos del suelo transformándola en sustancias asimilables por las plantas. El nitrógeno orgánico es transformado por bacterias amonificantes en amoníaco y éste es luego convertida en nitrato por las bacterias nitrificadoras.

La materia orgánica contiene un cinco por ciento del nitrógeno total en toda su constitución. Según las condiciones de clima y suelo, las plantas utilizan de este total sólo del uno al cinco por ciento (Rodríguez, 1989).

La mayoría de los sistemas agrícolas tienen una alta demanda de nitrógeno. Los cereales tales como arroz o trigo, por ejemplo, requieren de 20 a

40 kilogramos de nitrógeno por hectárea por tonelada grano producido. Uno de los principales factores limitantes del rendimiento potencial en estos sistemas es la capacidad del suelo para aportar el nitrógeno en la forma disponible para la planta. Desafortunadamente los fertilizantes no son utilizados eficientemente y la asimilación por la planta del fertilizante nitrogenado rara vez excede el 50 por ciento del nitrógeno aplicado. Una de las principales razones de esta reducida eficiencia en el uso de fertilizantes es que una proporción del nitrógeno aplicado (más de 90 por ciento) puede ser perdido del sistema planta-suelo (Peoples *et al.*, 1994).

4. Rizósfera

La rizósfera es considerada como la interfase entre la raíz y el suelo. Está determinada por todas las regiones donde tienen lugar las interacciones entre los organismos del suelo (principalmente microorganismos), las raíces y los constituyentes del suelo (Berthelin *et al.*, 1994).

Los efectos estimulantes de las plantas sobre la abundancia y actividad de los microorganismos son más marcados en la rizósfera; en esta región del suelo adyacente a las raíces se genera un microhábitat enriquecido con nutrientes inorgánicos provenientes de exudados. Los exudados radicales juegan un papel clave en la determinación de las interacciones específicas del hospedero con, y la composición de, la población rizobacteriana (Kieft, 1991; Nehl

et al., 1997). Por lo tanto, todas las especies vegetales interactúan con una gran variedad de microorganismos, así la nutrición vegetal ocurre dentro de un sistema complejo de planta-sustrato y microorganismos (Tinker, 1984).

4.1. Rizodeposición

La superficie de la raíz es un sitio crítico para que se dé una interacción entre los microorganismos y la planta (Paul y Clark, 1989). Lynch y Whipps (1990) estimaron que alrededor del 40 por ciento de la producción primaria de las plantas puede ser perdida por rizodeposición (pérdidas de carbón a través de las raíces), dependiendo de la especie y edad de la planta y condiciones ambientales. Janzen y Bruinsma (1989) estimaron que para trigo, el 50 por ciento del nitrógeno asimilado estuvo presente bajo la superficie y aproximadamente la mitad de éste aparentemente fue liberado por la raíz en la rizósfera. Debido a esta gran disponibilidad de sustrato en la rizósfera, la biomasa y actividad microbiana son generalmente mucho más altas que en el suelo no rizosférico.

La principal fuente de sustratos para la actividad microbiana en la rizósfera son los productos de rizodeposición y, según Lynch y Whipps (1990) consiste en:

- *Exudados*: azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, hormonas y vitaminas liberados por la raíz sin involucrar energía metabólica.

- *Lisatos*: liberados cuando las células mueren, incluyen paredes celulares y, con el tiempo, la raíz completa.
- *Mucílagos*: consisten en polisacáridos hidratados con residuos galactosa y ácido galacturónico.
- *Secreciones*: tales como carbohidratos poliméricos y enzimas que dependen de procesos metabólicos para su liberación, y
- *Gases*: como etileno y bióxido de carbono.

4.2. Microorganismos de la Rizósfera

Los tipos de organismos microscópicos son diferentes en la rizósfera que en el suelo circundante, ésta incluye bacterias, hongos y protozoarios. Las bacterias pueden cubrir del cinco al diez por ciento de la superficie radical, distribuidas en micrositios particulares de la raíz. Los hongos diferentes a las formas micorrízicas presentan una cobertura escasa (Paul y Clark, 1989). Los hongos del suelo generalmente forman la mayor parte de la biomasa microbiana y pueden exceder a las bacterias por factores de tres a diez, aunque en número pueden ser menores a éstas.

Las bacterias tienen un mayor efecto de rizósfera que otros habitantes microbianos. La rizósfera es conocida como hospedera proporcionalmente de más bacterias Gram-negativo en forma de bacilo (*Pseudomonas*, *Achromobacter*) y desnitrificantes y pocos Gram-positivo y Gram-variables como *Bacillus* y

Arthrobacter (Hagedorn *et al.*, 1989; Paul y Clark, 1989). Además, existen relaciones muy específicas como los sistemas simbióticos de los fijadores de nitrógeno, entre ellos *Rhizobium* y algunos actinomicetos y las micorrizas.

La microflora rizosférica puede favorecer el desarrollo de la planta mediante diversos mecanismos tales como (Alexander, 1980; Kloepper *et al.*, 1989):

1. Contribuyendo a la formación de una estructura estable del suelo,
2. Liberando elementos presentes en forma orgánica por medio de la mineralización.
3. Supresión de patógenos causantes de enfermedades.
4. Incremento en la disponibilidad de nutrientes limitantes del crecimiento vegetal tales como nitrógeno y fósforo.
5. Supresión de microorganismos nativos perjudiciales de la rizósfera que reducen el crecimiento de la planta pero no causan síntomas de enfermedad.
6. Producción de sustancias de crecimiento.

4.3. Factores que Afectan a la Población Rizosférica

Los microorganismos de la rizósfera son afectados por la proximidad y la profundidad de las raíces, la edad de la planta y el estado de madurez de la

misma, todo lo cual controla la magnitud del efecto rizósfera y el grado de respuesta por microorganismos específicos.

Debido a que la masa rizobacteriana es muy grande, existe una intensa competencia. En las condiciones de tensión que prevalecen en una gran comunidad, los organismos que crecen con rapidez y los más activos bioquímicamente resultan ser los más favorecidos (Alexander, 1980).

La respuesta de los microorganismos a la presencia de raíces vivas ocurre en una gran variedad de ambientes, pero la planta es el factor principal que tiene influencia sobre la colonización del rizoplano por las bacterias (Pietr y Stantriewicz, 1990; Bashan *et al.*, 1995).

El agua es generalmente considerada como el factor más limitante para la actividad biológica en las regiones áridas; en estas condiciones, las bacterias formadoras de esporas y células vegetativas prevalecen por su alta resistencia a la desecación. La producción de mucigel en la rizósfera de las plantas del desierto, actúa como una barrera retentiva de humedad y también incrementa la cantidad de bacterias fijadoras de nitrógeno no simbióticas.

Se han hecho generalizaciones acerca de los efectos de pH en la distribución y actividad de los microorganismos del suelo: las bacterias tienen un rango más estrecho de tolerancia de pH que los hongos; los hongos son favorecidos sobre las bacterias en ambientes ácidos y los actinomicetos se

desarrollan mejor que los hongos y otras bacterias en condiciones alcalinas (Kieft, 1991).

5. Rizobacterias

Las rizobacterias representan a las bacterias de la rizósfera que tienen la capacidad de colonizar la raíz en respuesta a los exudados (Beauchamp *et al.*, 1991; Kloepper *et al.*, 1980). La rizósfera de las plantas generalmente es ocupada por bacterias nocivas y benéficas con el potencial para influir significativamente el crecimiento de la planta y rendimiento del cultivo (Schippers *et al.*, 1987; Nehl *et al.*, 1997).

El efecto negativo de los microorganismos de la rizósfera puede ser ocasionado por patógenos mayores, o verdaderos, aquellos que provocan síntomas de enfermedad y los patógenos menores. Los patógenos menores de la rizósfera afectan a las plantas por sus metabolitos sin parasitar el tejido (Schippers *et al.*, 1987).

La manipulación de la microflora con objeto de beneficiar el crecimiento de la planta se ha llevado a cabo mediante rotaciones de cultivo apropiadas y manejo del suelo, así como por incorporación de residuos de cosecha e inoculando organismos diferentes a los de la rizósfera (Brown, 1974).

En la rizósfera se encuentran las rizobacterias benéficas, pero debido a las condiciones de competencia, la cantidad de éstas es reducida, por lo que para observar su efecto sobre la planta es necesario incrementar su densidad mediante inoculantes, para que sea capaz de reflejar algún beneficio. La inoculación del suelo o semillas con bacterias fijadoras de nitrógeno simbióticas o de vida libre, bacterias solubilizadoras de fósforo y rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal se han utilizado o propuesto como mejoradores del rendimiento de plantas cultivadas (Fages y Arsac, 1991; Hatzinger y Alexander, 1994).

5.1. Inoculación de Rizobacterias

La efectividad de los bioinoculantes está determinada por su calidad especialmente el número de organismos viables y su capacidad para multiplicarse cuando se aplican a la semilla, raíz o suelo (Brown, 1974). En el establecimiento y mantenimiento de células bacterianas viables en las raíces se involucran diferentes procesos tales como la quimiotaxis, motilidad, tiempo de generación y adhesión (Beauchamp *et al.*, 1991).

En el ámbito experimental, los cultivos bacterianos se aplican directamente a las semillas remojando o asperjándolas. Las raíces de las plántulas se sumergen en una suspensión bacteriana antes de trasplantar y, algunas veces, se aplican al suelo cerca de las plántulas (Brown, 1974).

Fages (1989) desarrolló un inoculante con cepas de *Azospirillum lipoferum*. El proceso involucra la concentración de células vivas en perlas de alginato y su deshidratación. Se obtuvo un inoculante en polvo, que contenía más de diez billones de células por gramo, fácil de almacenar y manejar y puede ser utilizado en campo como microgránulos o cubriendo la semilla. De acuerdo con Bashan *et al.* (1994) las células de *Azospirillum* son generalmente incorporadas dentro de un portador del inoculante compuesto de turba, vermiculita, o materiales sintéticos como alginato. Estos inoculantes posteriormente se mezclan con las semillas antes de la siembra en el campo, o se aplican en el suelo durante la emergencia de la plántula.

5.2. Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) actúan directamente cuando sus metabolitos estimulan el crecimiento de la planta, o indirectamente si desplazan o son antagónicas a la microflora nociva (Beauchamp *et al.*, 1991).

Los mecanismos fundamentales para el control biológico por RPCV involucran la producción de metabolitos que reducen las poblaciones o actividades de patógenos o microflora nociva de la rizósfera. Estos metabolitos incluyen sideróforos, HCN, antibióticos, enzimas líticas y factores antifúngicos

no caracterizados y estimuladores de las defensas naturales de las plantas, es decir, vía resistencia a enfermedades (Weger *et al.*, 1988; Liu *et al.*, 1995).

Freitas y Germida (1992a) inocularon *Pseudomonas* resistentes al ácido rifampicin nalidixico en trigo bajo condiciones controladas en cámara de crecimiento. Estas rizobacterias colonizaron y sobrevivieron en las raíces de las plantas durante los 150 días del experimento. La inoculación afectó la absorción de fertilizantes nitrogenado y hierro del suelo. Algunas cepas nativas y sus mutantes mejoraron la biomasa inicial de las plantas de trigo en un suelo con baja fertilidad.

En condiciones de campo se inocularon *Pseudomonas* que colonizaron las raíces de trigo y sobrevivieron en la rizósfera. Aunque la capacidad de las cepas estudiadas para promover el crecimiento del trigo de invierno mostró variación de sitio a sitio durante los dos años del estudio, la tendencia consistente de algunas cepas para incrementar los rendimientos de la planta demuestran el potencial de estas rizobacterias como inoculantes de campo (Freitas y Germida, 1992b).

La adición de algunas compostas al suelo aumentaron la incidencia en la rizósfera de bacterias que exhiben antagonismo hacia *Fusarium oxysporum*, *Pyrenochaeta lycopersici*, *Pythium ultimum* y *Rizoctonia solani*. Este antagonismo asociado con el incremento de productores de sideróforos,

además, solubilizadores de fosfato y productores de ácido indol acético fue afectado por los tipos de compostas (Brito *et al.*, 1995).

Las bacterias asociadas con la rizósfera y raíces de maíz exhiben varios grados de antagonismo hacia *Fusarium moniliforme*. El 88 por ciento de las bacterias aisladas del género *Pseudomonas* tales como *P. fluorescens*, *P. putida* y *P. cepacia* bajo condiciones *in vitro* mostraron una mayor capacidad inhibitoria hacia *F. moniliforme* que los otros antagonistas; además, se aislaron en altas cantidades tanto de plántulas como de plantas maduras de maíz (Hebbar *et al.*, 1992).

La inoculación de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal estimularon la nodulación de plantas de trébol por *Rhizobium* o *Bradyrhizobium* spp. como resultado de la secreción de vitamina B (Derylo y Skorupska, 1993); asimismo, afectaron el crecimiento y desarrollo, específicamente el incremento en la nodulación y fijación de nitrógeno en plantas de soya, frijol y lenteja (Dart, 1990; Zhang *et al.*, 1997).

5.3. Fijadores de Nitrógeno Asimbióticos

La capacidad fijadora de nitrógeno se ha demostrado sólo en organismos procarióticos de los cuales los representativos son bacterias o algas verde-azul. Las bacterias fijadoras de nitrógeno pertenecen a varios grupos

fisiológicos que incluyen aerobios, anaerobios, bacterias fotosintéticas y especialistas, tales como algunas de las bacterias reductoras de sulfato.

Existe una asociación entre las raíces de algunas especies de plantas superiores y bacterias heterótrofas no simbióticas fijadoras de nitrógeno. A diferencia de *Rhizobium*, estas bacterias no se localizan en nódulos especializados o protuberancias de las raíces, sino que crecen en la superficie radical (Alexander, 1980). Entre las bacterias diazotróficas no simbióticas asociadas con zacates se encuentran *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Azospirillum*, *Klebsiella*, *Bacillus* y *Pseudomonas* (Balandreau, 1986).

Entre las bacterias aerobias se encuentran *Beijerinckia indica* aislada de raíces de caña de azúcar, *Azospirillum lipoferum* de las raíces de *Digitaria decumbens* y *Azotobacter paspali* de *Paspalum notatum*. De las bacterias facultativas anaerobias se pueden citar *Bacillus polymyxa*, *B. macerans*, y *Enterobacter cloacaceae* en trigo y sorgo (Martínez *et al.*, 1985).

El género *Beijerinckia* es más común en suelos arenosos en climas cálidos; *Azospirillum* tiende a ser menos común en suelos templados y ácidos que en suelos tropicales y neutros; *Enterobacteraceae* se encuentra en cualquier lugar mientras que *Bacillus* y *Clostridium* tienden a predominar en suelos ácidos (Balandreau, 1986).

En la fijación biológica de nitrógeno interviene el complejo enzimático clave, referido como nitrogenasa, que es único en microorganismos fijadores de nitrógeno y se ha encontrado, por ejemplo, en bacterias aeróbicas y anaerobias, cianobacterias y nódulos de raíces de leguminosas y no leguminosas.

Se requiere gran cantidad de energía en forma de ATP para la reacción de la nitrogenasa. Los requerimientos de ATP para la fijación de nitrógeno son de 25 a 30 moles por mol de nitrógeno fijado. La nitrogenasa es extremadamente sensible al oxígeno (O₂) (Marschner, 1995).

Se ha demostrado que además de la fijación de nitrógeno por los microorganismos de vida libre, éstos también producen sustancias promotoras del crecimiento vegetal. Las gramíneas que son inoculadas con *Azospirillum* incorporan a su sistema nitrógeno atmosférico. En cultivo, *Azospirillum* produce ácido indol-acético y citoquininas, por lo que se considera que los efectos benéficos de la inoculación de gramíneas con *Azospirillum* en el rendimiento son producidos principalmente por estas sustancias y no por la fijación biológica del nitrógeno, ya que los efectos de la presencia de factores de crecimiento producen un incremento en el crecimiento de la raíz; aumentando de esta manera la absorción de agua y de nutrimentos, lo que permite un incremento en el rendimiento (Okon, 1985; Harari *et al.*, 1988; Chalk, 1991). La producción de fitohormonas por los microorganismos depende de la disponibilidad de sustratos específicos precursores (L-metionina para etileno, L-triptófano para AIA, y adenina para citoquininas). Estos sustratos pueden ser proporcionados por los

exudados de las plantas, materia orgánica del suelo, e incorporación de fertilizantes orgánicos (Marschner, 1995).

La cantidad de auxinas producidas por los cultivos bacterianos de *Azospirillum* se encuentra entre 36.5-77 microgramos por mililitro. Esta concentración está dentro del rango fisiológicamente activo que puede afectar las raíces de las plantas (Mascarua *et al.*, 1988; Baca *et al.*, 1994). Además, *Azospirillum* produce sideróforos (ácido salicílico, 2-3, dihidroxibenzoico) que muestran una actividad antimicrobiana (Shah *et al.*, 1992) y giberelinas en cultivo puro y en cocultivo (Janzen *et al.*, 1992).

6. Malezas

Las malezas son habitantes comunes de las áreas de cultivo y de terrenos abandonados, muchos factores contribuyen a la ocurrencia común de un cultivo con ciertas malezas; entre éstos se encuentran la similitud de tamaño de semillas, tiempo de madurez y germinación. Las características que hacen a estas especies capaces de competir son la alta germinación de semillas bajo condiciones adversas y el rápido desarrollo de un extensivo sistema radical teniendo tanto de raíces superficiales como profundas (Crafts, 1975; Villarreal, 1983).

Kremer *et al.* (1990) aislaron rizobacterias de plántulas de malezas y éstas fueron caracterizadas por su potencial fitopatogénico, resultando el 18 por ciento de todos los aislamientos potencialmente fitopatógenos. La abundancia y composición de rizobacterias variaron entre las diferentes especies de malezas; las *Pseudomonas* fluorescentes representaron de 11 a 42 por ciento del total de las poblaciones rizobacterianas de *Datura stramonium* L. y *Chenopodium album*, respectivamente.

Las bacterias de vida libre fijadoras de dinitrógeno (fijación asociativa), tales como *Streptomyces* y *Spirilla*, se encuentran en la rizósfera de numerosas arbustivas no leguminosas y pastos de climas secos (Paul y Clark, 1989).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Localización del Sitio Experimental

El experimento se estableció en el invernadero de alta tecnología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, la cual se localiza a 25°23' latitud norte, 101°00' longitud oeste, y altitud de 1743 msnm (CETENAL, 1976).

2. Aislamiento de Bacterias

2.1. Recolección de la Muestra

El aislamiento de las bacterias se realizó de la rizósfera de las malezas comunes del área denominada "El Bajío" localizada al poniente de las instalaciones de la UAAAN. Se extrajeron plantas completas (parte aérea y raíz), se envolvieron en papel de estraza y se colocaron dentro de bolsas de plástico para su traslado al laboratorio en donde se mantuvieron a 5 °C hasta el momento del aislamiento bacteriano.

Las malezas utilizadas como fuente de rizobacterias fueron: *Reseda luteola* L. (gualda), *Asphodelus fistulosus* L. (cebollín), *Eruca sativa* Mill. (nabo silvestre) y *Aristida* sp. (tres barbas) de acuerdo a Villarreal (1983).

2.2. Preparación de Medios de Cultivo

El medio de Ashby es un medio selectivo libre de nitrógeno para bacterias y se utilizó para el cultivo de las rizobacterias aisladas de las malezas. Su composición química se muestra en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Composición del medio Ashby.

SUSTANCIA	CANTIDAD
Manitol	15.0 g
Fosfato de Potasio Dibásico (K_2HPO_4)	0.2 g
Sulfato de Magnesio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.2 g
Cloruro de Sodio (NaCl)	0.2 g
Sulfato de Calcio ($CaSO_4 \cdot 2H_2O$)	0.1 g
Carbonato de Calcio ($CaCO_3$)	5.0 g
Agar	16.0 g
Agua destilada	1000.0 ml

Todas las sustancias se colocaron en matraces Erlenmeyer y se disolvieron en agua destilada estéril. El carbonato de calcio se agregó finamente

molido. El medio se esterilizó durante 15 minutos a 121 °C y 15 libras de presión. El vaciado en las cajas de Petri se realizó a una temperatura cercana a 45 °C, para evitar que el carbonato de calcio se precipitara.

Se utilizó agar nutritivo como medio de propagación de las rizobacterias aisladas. El medio se preparó con 15 g de agar bacteriológico y 8 g de caldo nutritivo por litro de agua destilada. Después de disolución completa, el medio se esterilizó y dispuso en cajas de Petri como se describió anteriormente.

2.2.1. Esterilización del Material de Vidrio y Medios Nutritivos

El material de vidrio utilizado (tubos de ensaye, pipetas, cajas de Petri, etc.) y los medios de cultivo y solución nutritiva para plantas se esterilizaron como se describe en el apartado 2.2.

2.3. Aislamiento Bacteriano

El aislamiento de las rizobacterias de cada una de las cuatro malezas colectadas se efectuó por la técnica de diluciones y siembra en placa para lo cual:

- Se pesaron dos gramos de suelo que se encontraba más próximo a la raíz.

- Se agregó el suelo a nueve mililitros de agua destilada estéril y se agitó para homogeneizar la suspensión.
- Con una pipeta estéril, se tomó 0.1 mililitros de la suspensión, se colocó en medio Ashby y se esparció con una varilla de vidrio acodada previamente flameada con alcohol.
- Las cajas de Petri se sellaron con plástico adherente y se incubaron durante 48 horas a 30 °C.
- Las colonias obtenidas se analizaron y se cuantificaron para determinar el número de unidades formadoras de colonias por gramo de suelo analizado.

2.4. Cultivo Puro

Se tomó una asada de las colonias desarrolladas en el medio de Ashby y se inoculó mediante la técnica de siembra por estría, en agar nutritivo. Las colonias que quedaron suficientemente separadas se sembraron en agar nutritivo inclinado para su conservación a 5 °C. De esta manera, se obtuvieron cuatro cultivos puros, uno por cada maleza estudiada (gualda, cebollín, nabo silvestre y tres barbas) que se analizaron microscópicamente.

3. Preparación del Inóculo e Inoculación

De cada uno de los cuatro cultivos puros seleccionados se realizó una siembra masiva en agar nutritivo y se incubó a 30 °C por 48 horas. Después de este período todo el crecimiento se transfirió a un matraz Erlenmeyer que contenía 100 mL de solución buffer fosfatada (g/L: K_2HPO_4 , 1.15; KH_2PO_4 , 0.2; NaCl, 7.5) con pH=7.2. La mezcla se agitó para preparar una suspensión homogénea que se utilizó como inóculo.

De la suspensión correspondiente a cada inóculo se tomaron dos mL con una pipeta estéril y aplicaron en la base del tallo de la plántula de trigo. Enseguida se agregó termolita estéril alrededor de la plántula para reducir la contaminación ambiental.

4. Preparación de Unidades Experimentales

Para el estudio de cultivos agrícolas en medios hidropónicos, se utilizan jarras Leonard. Este sistema permite reducir el riesgo de contaminación externa en la raíz durante el ciclo del cultivo y controlar la cantidad de nutrientes que la planta recibe.

De acuerdo con Luna y Sánchez (1991) las jarras Leonard están constituidas por una botella color ámbar sin fondo, un frasco (de café) de 600

mililitros como base, una mecha de algodón, arena de río lavada y la solución nutritiva (Figura 1). La planta se desarrolla en un sustrato (arena) en la parte superior de la unidad (botella); la botella se ensambla al frasco que contiene solución nutritiva y ésta asciende hasta la planta por medio de una mecha de algodón.

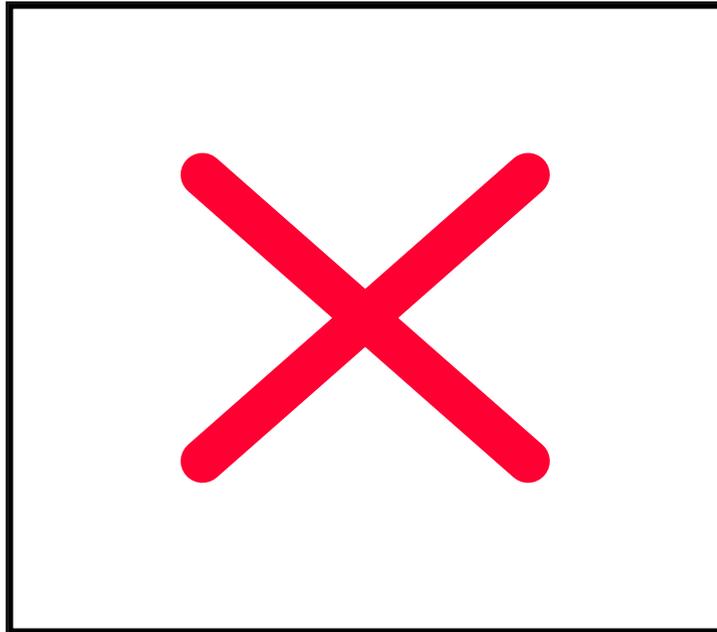


Figura 1. Jarra de Leonard ensamblada.

4.1. Ensamblaje de las Unidades

La mecha de algodón se colocó en la botella y se ajustó al cuello de ésta con algodón para evitar la entrada de arena a la solución nutritiva. La arena se lavó con agua para eliminar la materia orgánica y arcilla y se agregó a la botella manteniendo la mecha en posición central y procurando que llegara hasta la superficie. La parte superior de la botella se cubrió con una tapa de una caja de Petri para evitar contaminación.

En el frasco utilizado como reservorio se agregaron 500 mililitros de solución nutritiva diluida (1:5), que se mantuvo constante durante el transcurso del experimento. El frasco se pintó de color oscuro para reducir la entrada de luz y evitar el crecimiento de organismos en la solución.

4.2. Solución Nutritiva para las Plantas

La composición de la solución nutritiva de Jensen se muestra en el Cuadro 3. La solución se preparó de la manera siguiente: una vez pesados los reactivos, se colocaron en un matraz de dos litros, se aforó con agua destilada a un litro y se disolvió por calentamiento y agitación. El pH de la solución se ajustó a 7.0 con hidróxido de potasio 1N y se adicionó con 30 miligramos de nitrógeno por litro equivalente a 50 por ciento de la dosis de nitrógeno recomendada para la región.

Cuadro 3. Solución mineral Jensen para plantas.

SUSTANCIA	CANTIDAD
CaHPO ₄	1.0 g
K ₂ HPO ₄	0.2 g
MgSO ₄ •7H ₂ O	0.2 g
NaCl	0.2 g
FeCl ₃	0.1 g
Agua destilada	1000 mL
pH	7.0
Micronutrientos	1.0 mL/L
<i>Solución de micronutrientos</i>	
H ₃ BO ₃	0.05%
MnSO ₄	0.05%
Na ₂ MoO ₄	0.005%
CuSO ₄	0.002%

5. Siembra de Trigo

Se utilizó semilla de trigo de la variedad Pavón F-76, del ciclo otoño-invierno 94-95, producida por la sección de cereales del Departamento de Fitomejoramiento de la UAAAN. Es un trigo harinero de hábito de primavera, la planta florea a los 88 días y alcanza su madurez a los 136 días bajo condiciones de campo (SARH, 1980).

La semilla se desinfectó superficialmente con hipoclorito de sodio al 1.2 por ciento durante 15 minutos y después se enjuagó varias veces con agua destilada estéril. Las semillas se colocaron en cajas de Petri con agar agua (1.5 por ciento) durante 48 horas: después de este período las que germinaron y no

presentaban contaminación se pasaron a las jarras de Leonard. Se sembraron cuatro semillas por unidad y posteriormente se aclaró a una planta.

6. Etapas de Muestreo

Después de la inoculación, el experimento se trasladó al invernadero de alta tecnología, que mantiene temperaturas día/noche de 25/19 °C. El experimento permaneció en estas condiciones durante los meses de marzo a mayo de 1997. Durante el ciclo se realizaron dos muestreos. El primero se llevó a cabo al amacollamiento, cuando la planta mostraba un pseudotallo (formado por las envolturas de las hojas fuertemente erectas), correspondiente a la etapa 5 de la escala de Feeke (EF 5) y el segundo al espigamiento que corresponde a la etapa 10.5 (EF 10.5).

7. Descripción de Tratamientos

Los tratamientos consistieron en la inoculación individual o combinada de rizobacterias aisladas de cuatro malezas en la rizósfera de las plantas de trigo cultivadas en medio semihidropónico (jarras de Leonard) y utilizando como fuente de nutrientes la solución de Jensen (Cuadro 3). Los tratamientos fueron designados como RB (rizobacteria) y un número de identificación correspondiente a la maleza de procedencia. En el Cuadro 4 se muestran los

tratamientos con rizobacterias individuales y las combinaciones de las mismas, así como el nombre de la maleza de la cual se aislaron las rizobacterias. Cada tratamiento fue adicionado con 50 de la dosis de nitrógeno recomendado para la región (120 kg N/ha) como urea.

Cuadro 4. Tratamientos utilizados en el cultivo de trigo var. Pavón F-76.

TRATAMIENTO	INOCULACION	ORIGEN DE LA BACTERIA
1 □ 2 □ 3 □ 4 □ 5 □ 6 □	Sin inocular	□ Gualda (<i>Reseda luteola</i>)
7	RB1* □ RB2 □ RB3 □ RB4 □ RB1 + RB2 □ RB3 + RB4	□ Cebollín (<i>Asphodelus fistulosus</i> L.) □ Nabo silvestre (<i>Eruca sativa</i> Mill.) □ Tres barbas (<i>Aristida</i> sp.)

*RB=Rizobacteria

7.1. Unidades Experimentales

La unidad experimental consistió en una planta de trigo desarrollada en una jarra de Leonard. Se establecieron tres repeticiones para cada una de las dos etapas de cosecha (amacollamiento y espigamiento) resultando un total de 42 unidades experimentales.

8. Variables Evaluadas

En cada muestreo se separaron la raíz, tallo, hojas y espiga y se deshidrataron durante 72 horas a 60 °C para determinar peso seco de acuerdo a las etapas de muestreo. Asimismo, se determinó el por ciento de nitrógeno total (Bremner, 1965) en materia seca de cada parte de la planta por el método de Kjeldahl.

9. Interpretación de Resultados

Se utilizó un diseño completamente al azar con tres repeticiones. El modelo estadístico (Ostle, 1965) para este diseño es:

$$Y_{ij} = \mu + \delta_i + \epsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = variable de respuesta

μ = Efecto medio verdadero

δ_i = Efecto del i ésimo tratamiento

ϵ_{ij} = Error experimental. Variación debida al azar o a la variación de muestreo (causas no pertinentes) y es considerado NOI ($0 \sigma^2$).

9.1. Análisis Estadístico

Los datos obtenidos de producción de biomasa y nitrógeno total (concentración (%) y contenido (mg)) y se sometieron a un análisis de varianza (Cochran y Cox, 1983; Olivares, 1990). Además, se compararon las medias de los tratamientos por la prueba de diferencia mínima significativa (DMS) (Reyes, 1980) y se realizó una correlación simple para las variables estudiadas durante las dos etapas de muestreo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para evaluar el efecto de las bacterias aisladas de cuatro malezas sobre la producción de biomasa y nitrógeno total en trigo variedad Pavón F-76 se realizó un experimento en el que se inoculó el trigo con las rizobacterias obtenidas. Se incluyó un tratamiento control constituido por plantas sin inóculo. Las mediciones se hicieron al amacollamiento, correspondiente a la etapa 5 de la escala de Feeke (EF5) y al espigamiento (EF10.5). Las malezas utilizadas como fuente de rizobacterias pertenecen a los géneros (Villarreal, 1983): *Reseda luteola* (gualda), *Asphodelus fistulosus* L. (cebollín), *Eruca sativa* Mill. (nabo silvestre) y *Aristida* sp. (tres barbas).

1. Las Rizobacterias en Trigo

Las rizobacterias aisladas de la rizósfera de las malezas y cultivadas en medio Ashby produjeron colonias grandes, color cremoso y mucilaginosas. Se obtuvieron 100 unidades formadoras de colonias (ufc) por gramo de suelo. El examen microscópico reveló la presencia de bacilos Gram negativos, posiblemente fijadoras de nitrógeno.

En la etapa de espigamiento (EF10.5) se tomó al azar una repetición de cada tratamiento inoculado para determinar la presencia en la raíz de trigo de las rizobacterias inoculadas. Se efectuó una estimación de la población bacteriana, excepto al control, por la técnica de cuenta viable en placa de agar nutritivo y se observó una densidad de 1.5 a 2.5 X 10⁷ unidades formadoras de colonias (ufc) por gramo de raíces fresca (Cuadro 5). El número de rizobacterias recuperadas es menor a la población inoculada, 1.2X10⁹ ufc/ml, debido a que durante el proceso de colonización no todas la rizobacterias se adaptaron o sobrevivieron. Sin embargo, la población recuperada es suficiente para impactar el crecimiento de la planta (Brown, 1974).

La presencia de rizobacterias aisladas de malezas en la raíz del trigo, muestra la capacidad de estas bacterias de colonizar este tipo de plantas.

Cuadro 5. Estimación bacteriana de las rizobacterias presentes en la raíz de trigo en la etapa de espigamiento (EF10.5).

TRATAMIENTO	Ufc/g de raíces
CONTROL	-
RB1	1.98 X10 ⁷
RB2	2.50 X10 ⁷
RB3	1.86 X10 ⁷
RB4	2.07 X10 ⁷
RB1+RB2	1.50 X10 ⁷
RB3+RB4	1.69 X10 ⁷

2. Evaluación al Amacollamiento (EF5)

2.1. Producción de Biomasa

En el Cuadro 6 se muestra la respuesta de trigo a la inoculación rizobacteriana a la producción de materia seca de raíz y hojas en la etapa de amacollamiento (EF5). Los tratamientos no tuvieron efecto en la materia seca de la raíz en esta etapa (EF5). Lo anterior es congruente con Okon y Kapulnik (1986) quienes no encontraron diferencia en peso seco de raíz cuando inocularon *Azospirillum* en trigo aunque sí observaron incremento del número de pelos radicales, ramificaciones de pelos radicales y raíces laterales. La producción de materia seca de hojas de RB3 (rizobacteria aislada de nabo silvestre), RB4 (aislada de tres barbas) y el control no fueron estadísticamente diferentes aunque el efecto de la RB3 fue mayor que el control en 45 por ciento y RB4 en 12 por ciento (Figura 2).

Cuadro 6. Efecto de la inoculación de rizobacterias sobre la producción de biomasa (g) de trigo variedad Pavón F-76 al amacollamiento (EF5).

TRATAMIENTO	RAIZ (g)	HOJA (g)	PLANTA (g)
CONTROL	0.48* a**	0.95 abc	1.43 abc
RB1	0.40 a	0.73 bc	1.13 bc
RB2	0.34 a	0.54 c	0.88 c
RB3	0.57 a	1.38 a	1.95 a
RB4	0.55 a	1.07 ab	1.62 ab
RB1+RB2	0.49 a	0.55 c	1.04 bc
RB2+RB3	0.45 a	0.65 bc	1.10 bc

* Valores promedio de los tratamientos con tres repeticiones cada uno.

** Valores con la misma letra son estadísticamente iguales DMS ($p < 0.05$).

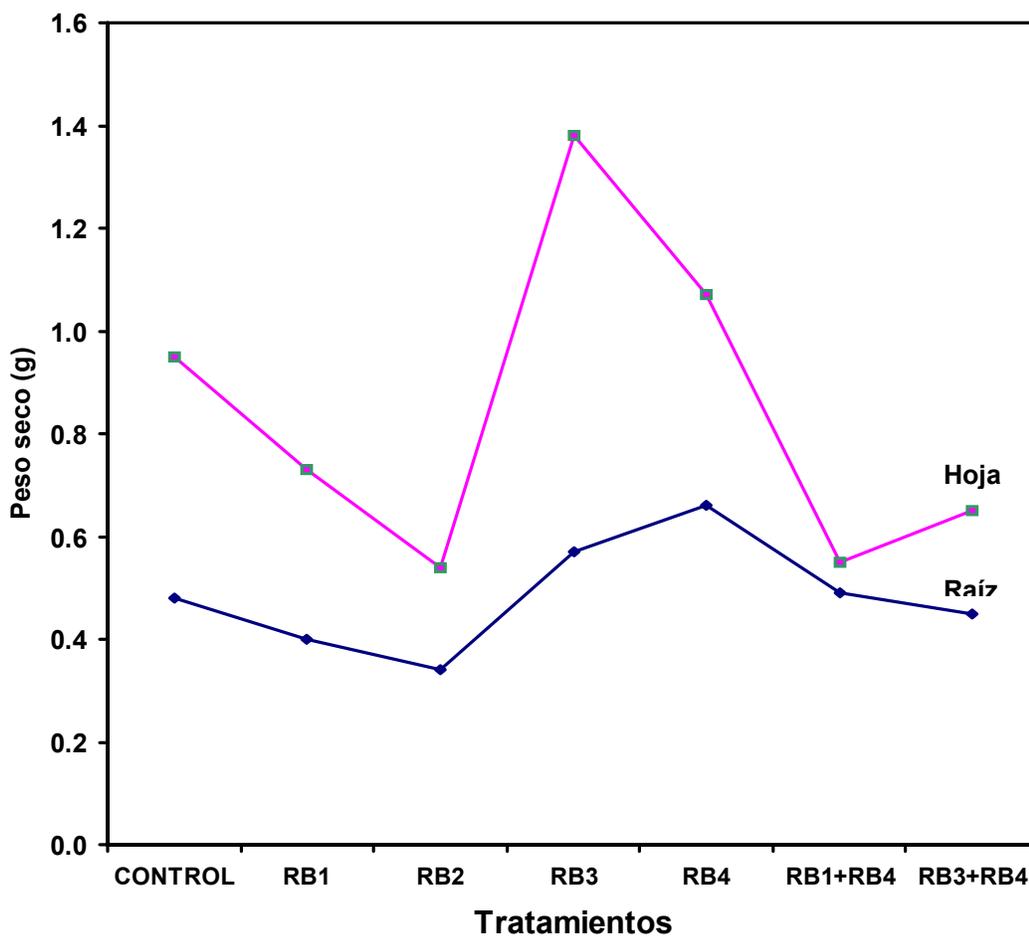


Figura 2. Efecto de la inoculación de rizobacterias en la producción de materia seca en raíz y hoja de trigo var. Pavón F-76 al amacollamiento (EF5).

RB: Rizobacteria

Control, con nitrógeno y sin bacteria; RB1, Gualda; RB2, Cebollín; RB3, Nabo silvestre; RB4, Tres barbas; RB1+RB2, Combinación de RB aisladas de Gualda y Cebollín; RB3+RB4, Combinación de RB aisladas de Nabo silvestre y Tres barbas.

Respecto al efecto de las rizobacterias sobre la producción de biomasa en la planta completa de trigo al amacollamiento (EF5) se encontró diferencia significativa entre los tratamientos. En la Figura 3 se observa la respuesta de la producción de materia seca de la planta a la inoculación de las rizobacterias, los tratamientos con RB3 (aislada de nabo silvestre) y RB4 (aislada de tres barbas) fueron superiores al control en 36 y 13 por ciento, respectivamente aunque estadísticamente los tres tratamientos no fueron diferentes. Es probable que este efecto se deba a que las rizobacterias reconocieron los exudados radicales del trigo y los transforman en fitohormonas que la planta utiliza, incrementando su producción de biomasa y de nitrógeno total (Brown, 1974; Baca *et al.*, 1994). Los efectos positivos sobre plantas cultivadas se han observado en tomate, papa, remolacha, girasol, rábano, maíz, trigo, lechuga (Kloepper *et al.*, 1980; Suslow y Schroth, 1982; Fages y Arsac, 1991; Gagne *et al.*, 1993).

Los tratamientos con las rizobacterias combinadas RB1+RB2 y RB3+RB4 y tratamiento individual RB2 (aislada de cebollín) no mostraron diferencia estadística respecto al control en cuanto a producción de materia seca; sin embargo, los tratamientos RB1+RB2 y RB3+RB4 son menores al control en 37 y 30 por ciento, respectivamente, y RB2 es menor al control en 62 por ciento. En la población rizosférica de plantas cultivadas y no cultivadas, entre ellas las malezas, existen tanto rizobacterias benéficas como nocivas y aunque éstas últimas no provocan síntomas de enfermedad pero pueden limitar la producción al retardar el crecimiento de la raíz o vástagos (Schippers *et al.*, 1987; Kremer *et al.*, 1990; Kennedy *et al.*, 1991). Lo anterior puede explicar que

el tratamiento inoculado con la rizobacteria RB2 haya provocado la baja producción de materia seca de trigo. Además, los tratamientos con rizobacterias combinadas afectaron la producción de biomasa probablemente por competencia (Alexander, 1980).

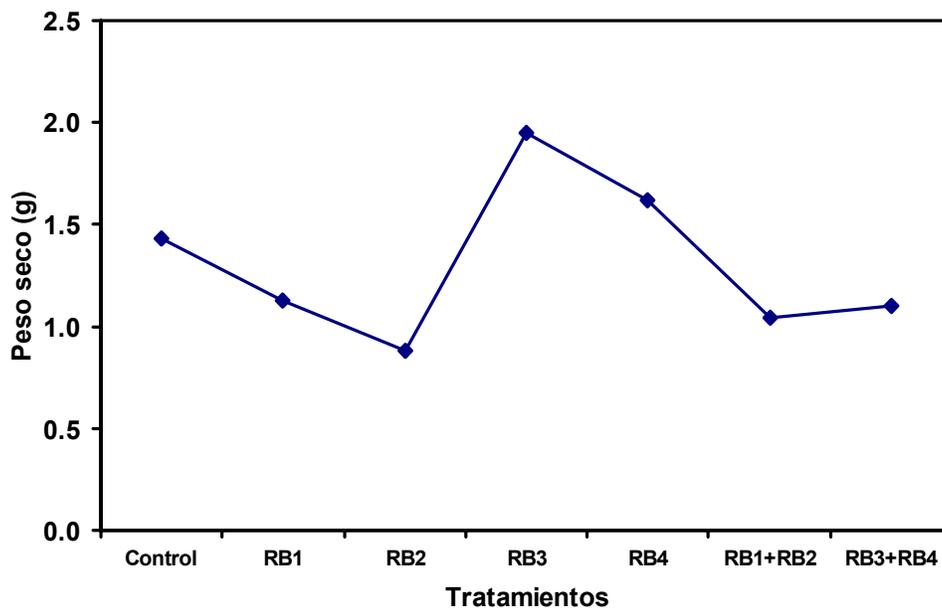


Figura 3. Efecto de la inoculación de rizobacterias sobre la producción de biomasa en la planta de trigo variedad Pavón F-76 al amacollamiento (EF5).

RB: Rizobacteria

Control, con nitrógeno y sin bacteria; RB1, Gualda; RB2, Cebollín; RB3, Nabo silvestre; RB4, Tres barbas; RB1+RB2, Combinación de RB aisladas de Gualda y Cebollín; RB3+RB4, Combinación de RB aisladas de Nabo silvestre y Tres barbas.

2.2. Nitrógeno total

La diferencia entre los tratamientos respecto al por ciento de nitrógeno total en raíz y hojas al amacollamiento fue altamente significativa. El por ciento de nitrógeno total de los tratamientos con inóculo individual y el control no mostraron diferencia estadística (Cuadro 7) aunque como se observa en la Figura 4 el control tuvo el mayor por ciento de nitrógeno total para hojas. Foth (1986) reporta que la concentración de nitrógeno es mayor en hojas que en raíz y esto lo observamos en la Figura 4.

Cuadro 7. Efecto de la inoculación de rizobacterias sobre nitrógeno total (%) de trigo variedad Pavón F-76 al amacollamiento (EF5).

TRATAMIENTO	RAIZ (%)	HOJAS (%)	PLANTA (%)
CONTROL	0.90 a	1.80 a	1.35 a
RB1	0.86 a	1.74 a	1.30 ab
RB2	0.92 a	1.44 a	1.18 ab
RB3	0.71 ab	1.46 a	1.08 b
RB4	0.82 a	1.59 a	1.20 ab
RB1+RB2	0.58 bc	0.82 b	0.70 c
RB3+RB4	0.47 c	0.90 b	0.69 c

* Valores promedio de los tratamientos con tres repeticiones cada uno.

** Valores con la misma letra son estadísticamente iguales DMS ($p < 0.05$).

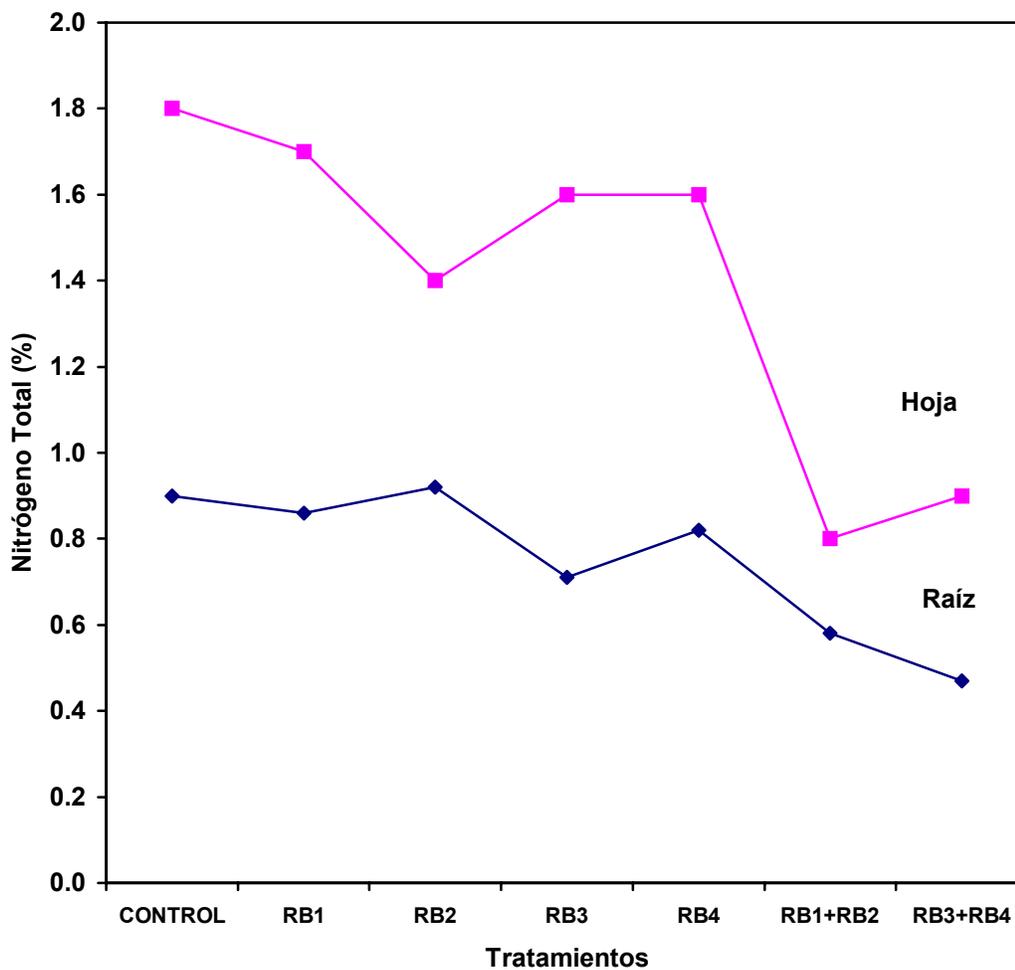


Figura 4. Efecto de la inoculación de rizobacterias sobre el porcentaje de nitrógeno total en raíz y hoja de trigo var. Pavón F-76 al amacollamiento (EF5).

RB=Rizobacteria

Control, con nitrógeno y sin bacteria; RB1, Gualda; RB2, Cebollín; RB3, Nabo silvestre; RB4, Tres barbas; RB1+RB2, Combinación de RB Gualda y Cebollín; RB3+RB4, Combinación de RB aisladas de Nabo silvestre y Tres barbas.

En la Figura 5 se observa el efecto de las rizobacterias sobre el contenido de nitrógeno total (mg) en raíz y hojas. Ningún tratamiento afectó el contenido de nitrógeno en la raíz, pero en la hoja se observó diferencia entre el tratamiento RB3 (nabo silvestre) que fue superior al control 16 por ciento. Los tratamientos RB3, RB4 y control no son diferentes estadísticamente en cuanto a el contenido de nitrógeno en hoja.

La respuesta a la inoculación de rizobacterias respecto al por ciento de nitrógeno total de planta en trigo para el amacollamiento (EF5) fue altamente significativa. Los tratamientos RB1, RB2, RB4 y el control fueron iguales estadísticamente, aunque como se observa en el Cuadro 7 el control tiene la mayor concentración del nitrógeno total (1.35 por ciento); probablemente por que en esta etapa (EF5) los microorganismos compitieron con la planta por este elemento (Alexander, 1980; Brock, 1973). En cuanto a contenido de nitrógeno total de planta el tratamiento RB3 correspondiente a la rizobacteria aislada de nabo silvestre fue el mayor, equivalente a 12.5 por ciento mayor al control (Figura 6).

Los tratamientos con las rizobacterias combinadas (RB1+RB2) y (RB3+RB4) también afectaron negativamente el por ciento de nitrógeno total de planta ya que esta fue menor al control, correspondiente al 92 por ciento (Cuadro 7). Los tratamientos RB2, (RB1+RB2) y (RB3+RB4) tienen el más bajo contenido de nitrógeno total (Figura 6).

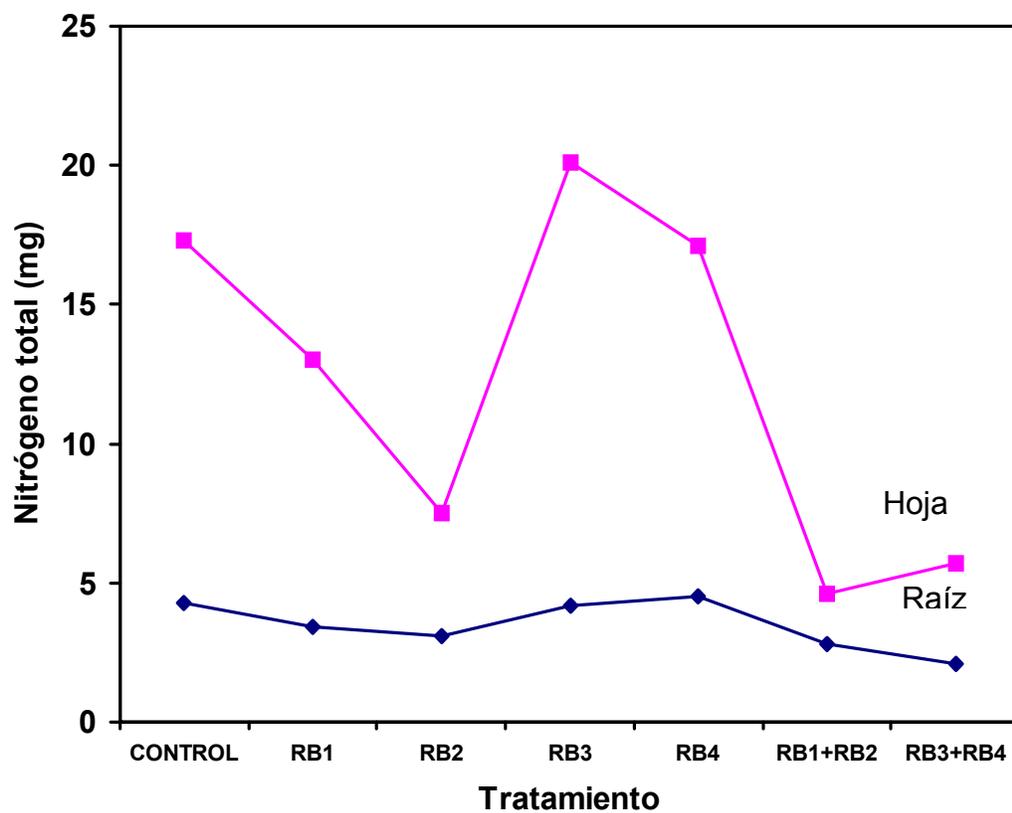


Figura 5. Efecto de la inoculación de rizobacterias sobre el contenido de nitrógeno total en raíz y hojas de trigo var. Pavón F-76 al amacollamiento (EF5).

RB=Rizobacteria

Control, sin bacteria; RB1, Gualda; RB2, Cebollín; RB3, Nabo silvestre; RB4, Tres barbas; RB1+RB2, Combinación de RB aisladas de Gualda y Cebollín; RB3+RB4, Combinación de RB aisladas de Nabo silvestre y Tres barbas.

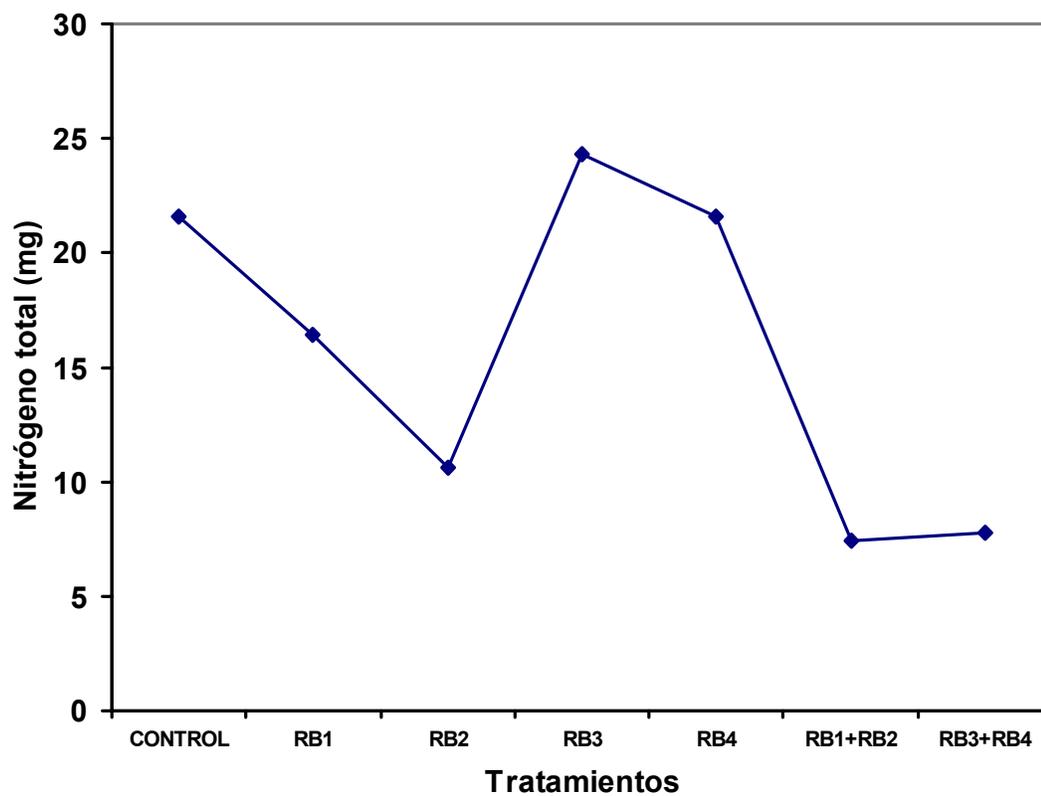


Figura 6. Efecto de la inoculación de rizobacterias en el contenido de nitrógeno total de planta de trigo variedad Pavón F-76 al amacollamiento (EF5).

RB=Rizobacteria

Control, sin bacteria; RB1, Gualda; RB2, Cebollín; RB3, Nabo silvestre; RB4, Tres barbas; RB1+RB2, Combinación de RB aisladas de Gualda y Cebollín; RB3+RB4, Combinación de RB aisladas de Nabo silvestre y Tres barbas.

No se encontró correlación significativa entre biomasa y porcentaje de nitrógeno total ($r=0.128$) (Haahtela *et al.*, 1988). Los tratamientos RB4 y control mostraron la mayor producción de biomasa y por ciento de nitrógeno total de planta aunque estadísticamente estos tratamientos fueron iguales; el tratamiento RB4 produjo el 13 por ciento más que el control. Puesto que esta RB se aisló de la maleza tres barbas, que al igual que el trigo es una gramínea, probablemente existió el reconocimiento de las sustancias liberadas por la raíz y un efecto inmediato sobre la planta de trigo (Haahtela *et al.*, 1988).

Los tratamientos (RB1+RB2) y (RB3+RB4) tuvieron la producción de biomasa y el por ciento de nitrógeno total más bajos respecto al control (Figuras 2 y 4), probablemente debido a que estas rizobacterias afectaron la asimilación de iones provocando la absorción reducida del nitrógeno (Schippers *et al.*, 1987).

3. Evaluación al Espigamiento (EF10.5)

3.1. Producción de Biomasa

En el análisis gráfico de la Figura 7 sobre el efecto de la inoculación rizobacteriana en la producción de materia seca de cada parte de la planta en la etapa EF10.5, también se observaron diferencias entre los tratamientos. En el ANVA para raíz y hojas reveló diferencia significativa y en tallos y espiga la diferencia fue altamente significativa. El comportamiento para cada parte es similar al análisis de planta completa; el tratamiento RB4 es mayor en hojas, tallos y espiga (Cuadro 8). Los valores promedio del control y RB4 fueron los más altos. En el tratamiento RB4, la producción de materia seca de hojas y espiga es mayor en 13.5 y 13.6 por ciento y para tallos en 34 por ciento sobre el control. Las hojas tienen el mayor peso seco respecto a los otros órganos de la planta en esta etapa fenológica.

Cuadro 8. Efecto de la inoculación de rizobacterias sobre la producción de biomasa (g) en trigo variedad Pavón F-76 al espigamiento (EF10.5).

TRATAMIENTO	RAIZ	HOJA	TALLO	ESPIGA	PLANTA
CONTROL	1.02 a	1.33 ab	0.82 ab	0.44 ab	3.61 ab
RB1	0.77 ab	1.17 ab	0.70 abc	0.32 bc	2.96 abc
RB2	0.53 bc	0.80 bc	0.44 bcd	0.27 bcd	2.04 cd
RB3	0.76 ab	0.93 abc	0.42 bcd	0.24 cd	2.35 bcd
RB4	0.96 a	1.51 a	1.10 a	0.50 a	4.07 a
RB1+RB2	0.43 bc	0.50 c	0.39 cd	0.21 cd	1.53 cd
RB3+RB4	0.33 c	0.40 c	0.23 d	0.12 d	1.08 d

* Valores promedio de los tratamientos con tres repeticiones cada uno.

**Valores con la misma letra son estadísticamente iguales DMS ($p < 0.05$).

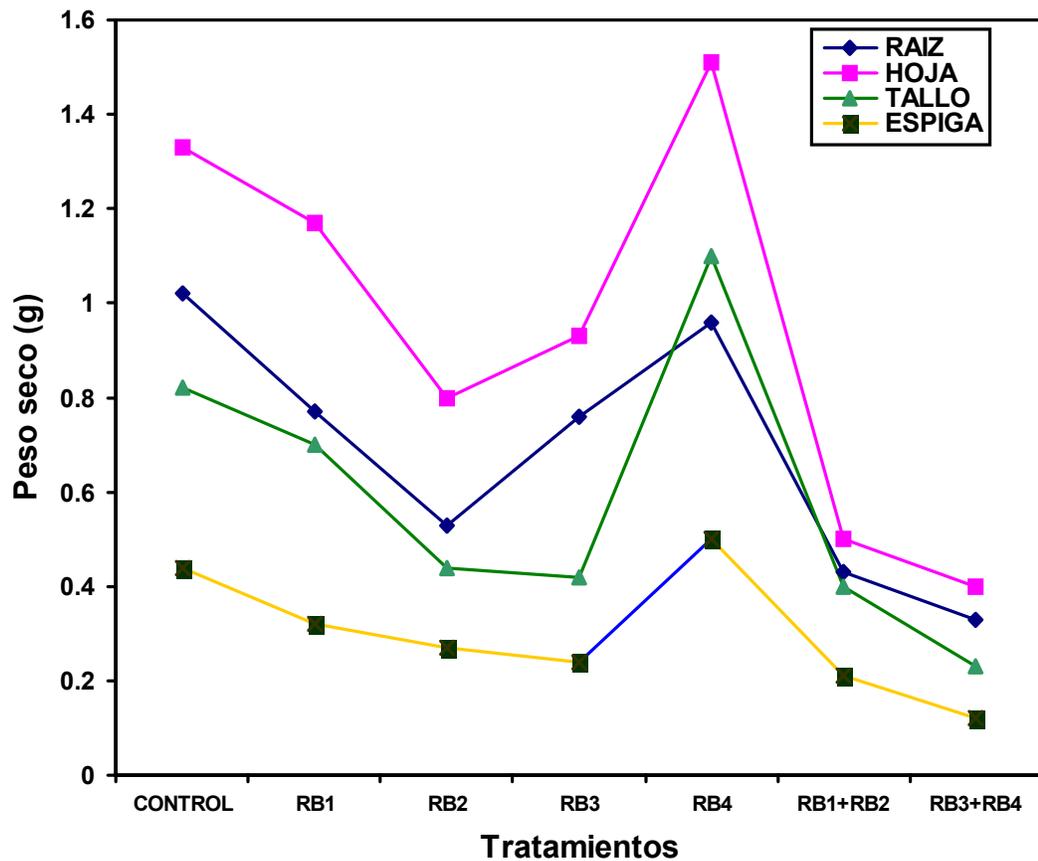


Figura 7. Efecto de la inoculación de rizobacterias sobre la producción de materia seca en raíz, hoja, tallo, espiga de trigo var. Pavón F-76 al espigamiento (EF10.5).

RB=Rizobacteria

Control, con nitrógeno y sin bacteria; RB1, Gualda; RB2, Cebollín; RB3, Nabo silvestre; RB4, Tres barbas; RB1+RB2, Combinación de RB aisladas de Gualda y Cebollín; RB3+RB4, Combinación de RB aisladas de Nabo silvestre y Tres barbas.

En cuanto a la producción de biomasa de planta completa al espigamiento, los tratamientos RB4, control y RB1 son iguales estadísticamente (Cuadro 8); aunque RB4 mostró la producción de biomasa superior al control en 12.7 por ciento (Figura 6). El tratamiento inoculado con la rizobacteria RB1 tuvo efecto sobre la producción de materia seca, lo cual no ocurrió al amacollamiento; debido a que la bacteria tuvo que adaptarse a las condiciones y posteriormente promover el crecimiento (Kipe-Nolt *et al.*, 1985).

En esta misma etapa los tratamientos con rizobacterias combinadas mostraron un efecto negativo sobre la producción de biomasa de planta por lo menos el doble respecto al control no inoculado. El tratamiento con RB2 aislada de cebollín, también fue menor al control en 77 por ciento.

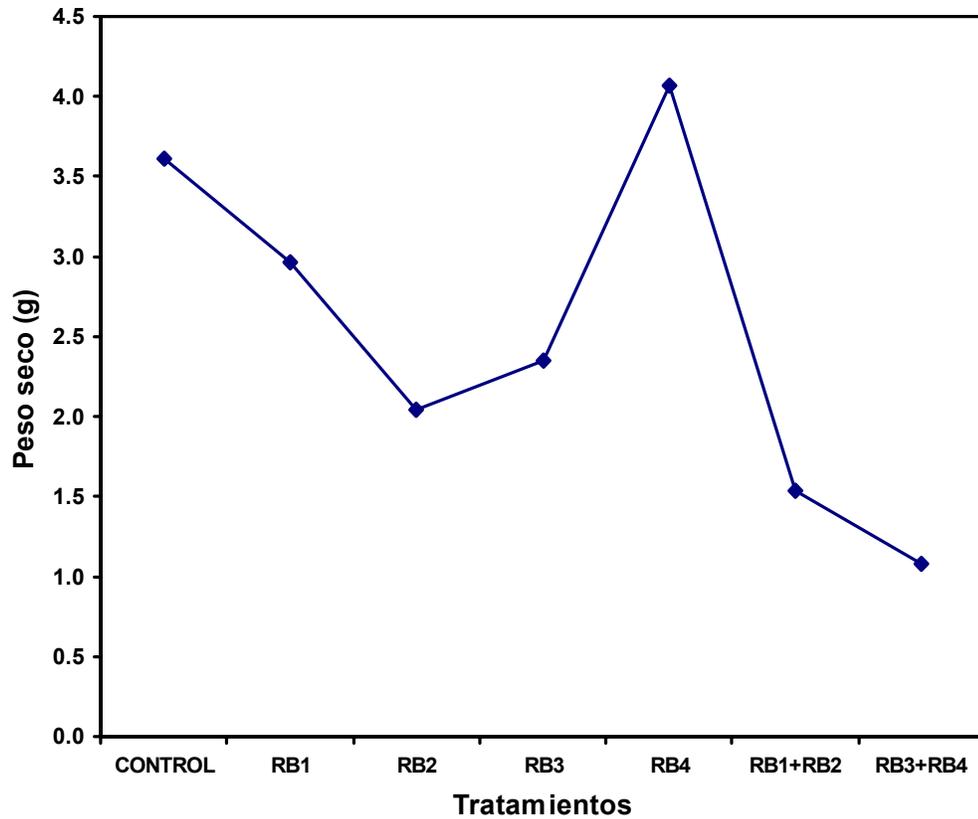


Figura 8. Efecto de la inoculación de rizobacterias sobre la producción de biomasa de trigo var. Pavón F-76 al espigamiento (EF10.5).

RB=Rizobacteria

Control, con nitrógeno y sin bacteria; RB1, Gualda; RB2, Cebollín; RB3, Nabo silvestre; RB4, Tres barbas; RB1+RB2, Combinación de RB aisladas de Gualda y Cebollín; RB3+RB4, Combinación de RB aisladas de Nabo silvestre y Tres barbas.

3.2. Nitrógeno Total

El por ciento de nitrógeno en raíz, hojas, tallo y espigas en la etapa de espigamiento se observa en la Figura 9. Para esta variable no se observó diferencia significativa en raíz (Cuadro 9). El por ciento de nitrógeno total en la espiga fue mayor que en otros órganos de la planta y los tratamientos que contienen la mayor concentración en espiga esta disminuye en la hoja y tallo como resultado de la redistribución en la etapa de espigamiento (Leonard y Martin, 1967; Simpson *et al.*, 1983).

El efecto de las rizobacterias sobre el por ciento de nitrógeno total de la planta completa fue significativo y todos los tratamientos incrementaron sobre el control. Las combinaciones son mayores al control en 50 y 56 por ciento respectivamente.

Cuadro 9. Efecto de la inoculación de rizobacterias sobre nitrógeno total (%) de trigo variedad Pavón F-76 al espigamiento (EF10.5).

TRATAMIENTO	RAIZ	TALLO	HOJA	ESPIGA	PLANTA
CONTROL	0.45 a	0.36 c	0.45 d	1.12 ab	0.60 d
RB1	0.56 a	0.47 bc	0.77 bc	1.31 ab	0.78 bc
RB2	0.70 a	0.45 bc	0.98 ab	1.16 ab	0.82 abc
RB3	0.80 a	0.64 ab	0.94 abc	0.96 b	0.83 abc
RB4	0.58 a	0.45 bc	0.68 cd	1.20 ab	0.73 cd
RB1+RB2	0.84 a	0.77 a	1.07 a	0.92 b	0.90 ab
RB3+RB4	0.84 a	0.64 ab	0.90 abc	1.38 a	0.94 a

* Valores promedio de los tratamientos con tres repeticiones cada uno.

**Valores con la misma letra son estadísticamente iguales DMS ($p < 0.05$).

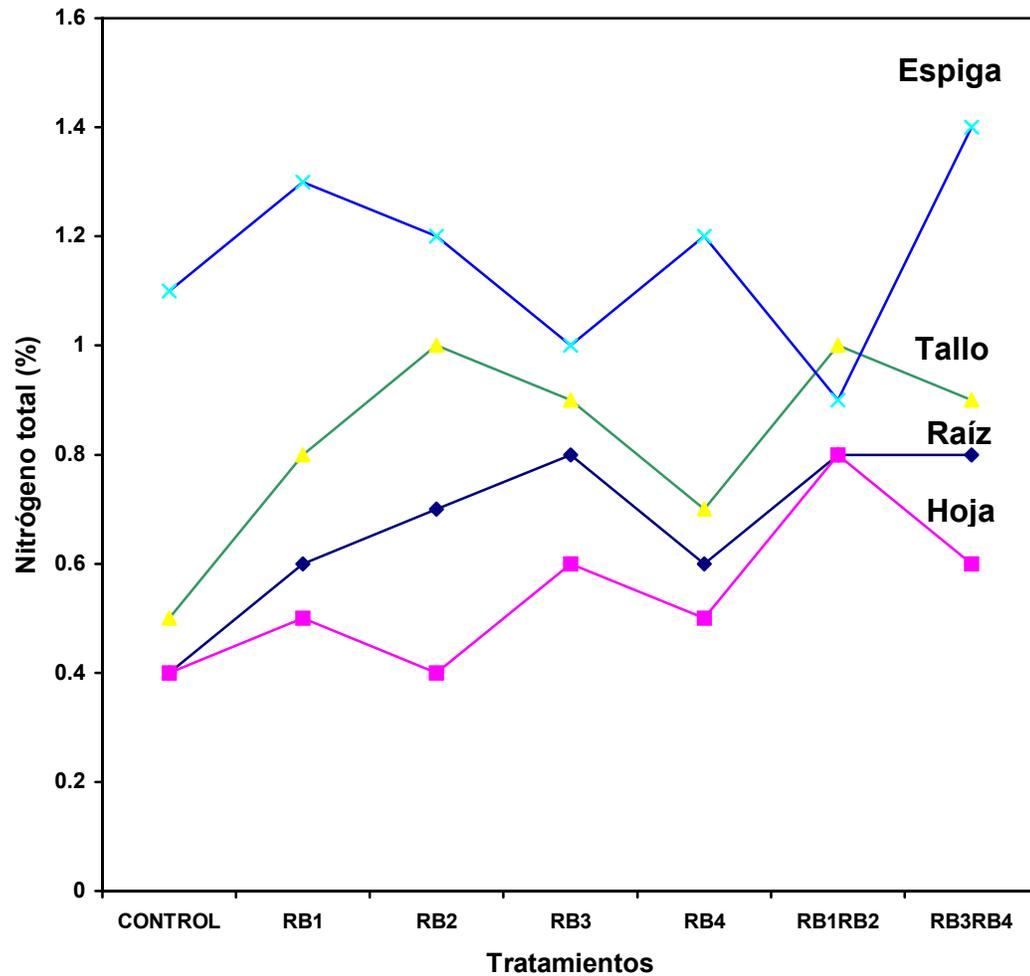


Figura 9. Efecto de la inoculación de rizobacterias sobre el por ciento de nitrógeno total en raíz, tallo, hoja y espiga de trigo var. Pavón F-76 al espigamiento (EF10.5).

RB=Rizobacteria

Control, con nitrógeno y sin bacteria; RB1, Gualda; RB2, Cebollín; RB3, Nabo silvestre; RB4, Tres barbas; RB1+RB2, Combinación de RB Gualda y Cebollín; RB3+RB4, Combinación de RB aisladas de Nabo silvestre y Tres barbas.

El efecto de las rizobacterias sobre contenido de nitrógeno total (mg) en raíz no fue significativo, el mejor tratamiento fue RB4 (aislada de tres barbas) ya que produjo un incremento de 87 por ciento en hojas, 69 para tallos y 20.4 por ciento para espiga (Figura 10).

El contenido de nitrógeno total (mg) de la planta completa al espigamiento se observa en la Figura 11. El tratamiento RB4 incrementó en 48 por ciento y RB3 13 por ciento respecto al control.

Los tratamientos RB4, control y RB1 tuvieron el mayor efecto en cuanto a producción de biomasa al espigamiento, pero son menores en por ciento de nitrógeno total; por que existe correlación negativa entre biomasa y por ciento de nitrógeno total ($r=-0.88$) para esta etapa.

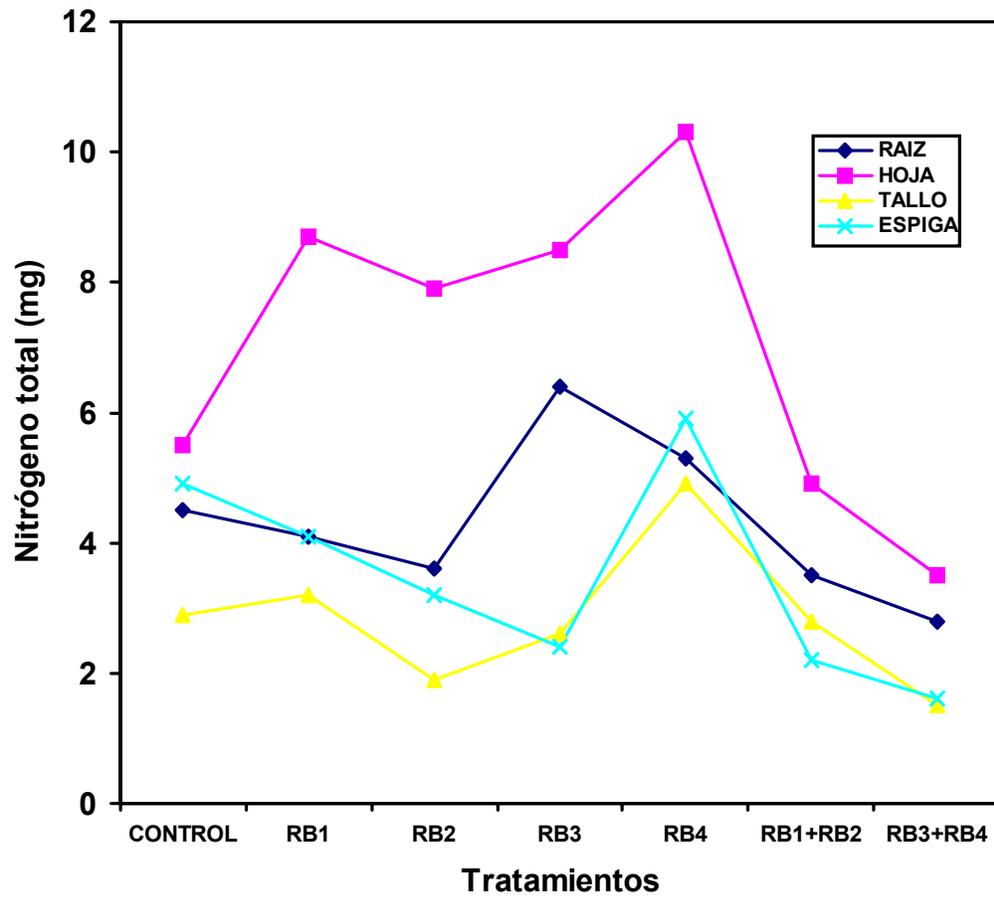


Figura 10. Efecto de la inoculación de rizobacterias sobre el contenido de nitrógeno total en partes de planta de trigo var. Pavón F-76 al espigamiento (EF10.5).

RB=Rizobacteria

Control, sin bacteria; RB1, Gualda; RB2, Cebollín; RB3, Nabo silvestre; RB4, Tres barbas;

RB1+RB2, Combinación de RB aisladas de Gualda y Cebollín; RB3+RB4, Combinación de RB aisladas de Nabo silvestre y Tres barbas.

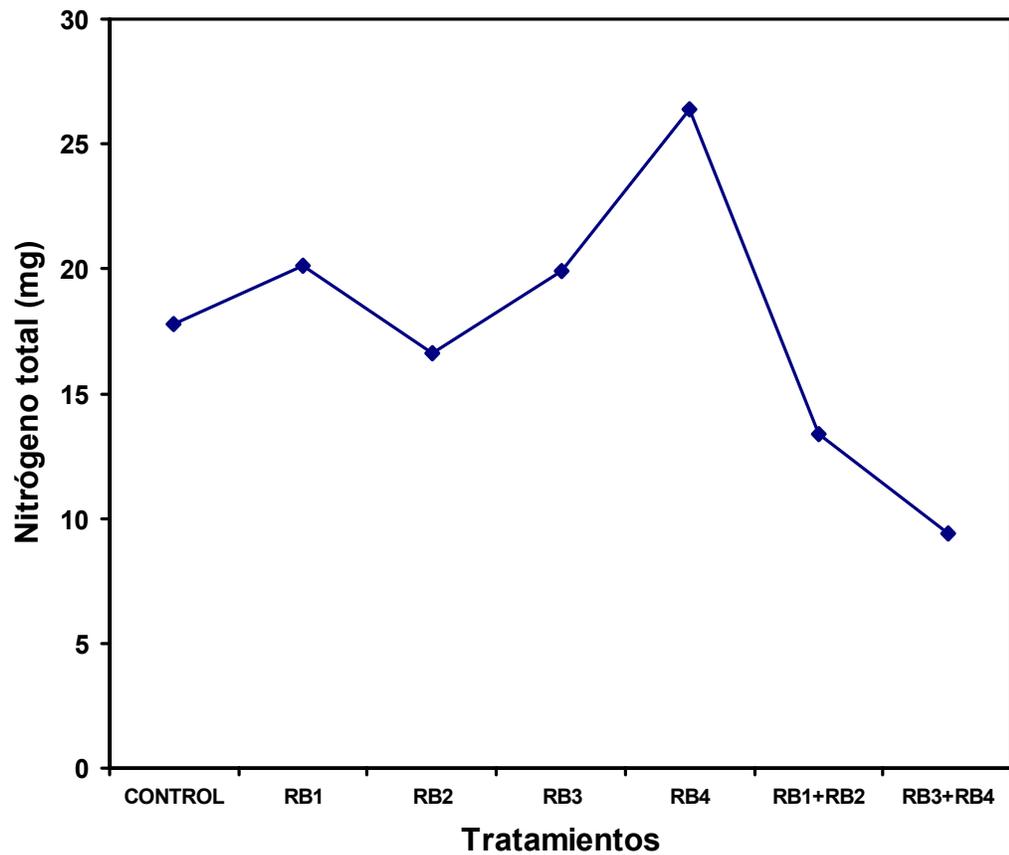


Figura 11. Efecto de la inoculación de rizobacterias en el contenido de nitrógeno total de planta de trigo variedad Pavón F-76 al espigamiento (EF10.5).

RB=Rizobacteria

Control, sin bacteria; RB1, Gualda; RB2, Cebollín; RB3, Nabo silvestre; RB4, Tres barbas; RB1+RB2, Combinación de RB aisladas de Gualda y Cebollín; RB3+RB4, Combinación de RB aisladas de Nabo silvestre y Tres barbas.

4. Efecto Total sobre Producción de Biomasa

La respuesta de producción de biomasa a la inoculación de rizobacterias a través de las dos etapas de evaluación fue la siguiente: RB4 y Control fueron los mejores (Figura 12a). El control con 1.43 y 3.61 gramos para amacollamiento y espigamiento respectivamente y RB4 con 1.62 y 4.07 gramos de peso seco. En ambas etapas no existe diferencia estadística entre los dos tratamientos, pero RB4 es superior (13 por ciento) al control.

5. Efecto Total sobre Nitrógeno Total

La correlación del porcentaje de nitrógeno total de planta en las dos etapas (EF5 y EF10) fue negativa ($r=-0.858$). Por lo que en la Figura 12b se observa que al amacollamiento el por ciento de nitrógeno del control fue mayor y para el espigamiento al parecer todos los tratamientos con algún tipo de bacteria afectaron la concentración de nitrógeno ya que el control quedó por debajo de estos.

Sólo RB2 permanece dentro de los tratamientos con mayor porcentaje de nitrógeno. Para la etapa amacollamiento EF5 el tratamiento RB2 es menor al control en 47 por ciento y en la etapa EF10.5, RB2 es mayor en 37 por ciento al control.

Los tratamientos con rizobacterias combinadas (RB1+RB2) y (RB3+RB4) tuvieron un incremento en el porcentaje de nitrógeno. En la etapa EF5 el nitrógeno total para estos tratamientos fue de 0.7 por ciento y en la etapa EF10.1 fue 0.9 a 0.94 por ciento.

En contenido de nitrógeno total al amacollamiento el control, RB3 y RB4 son estadísticamente iguales, sin embargo, RB3 fue mayor en 12.5 por ciento respecto al control; en espigamiento RB3 y RB4 son diferentes estadísticamente al control, aunque RB4 es mayor al control en 48.3 por ciento y RB3 en 11.7 por ciento (Figura 13).

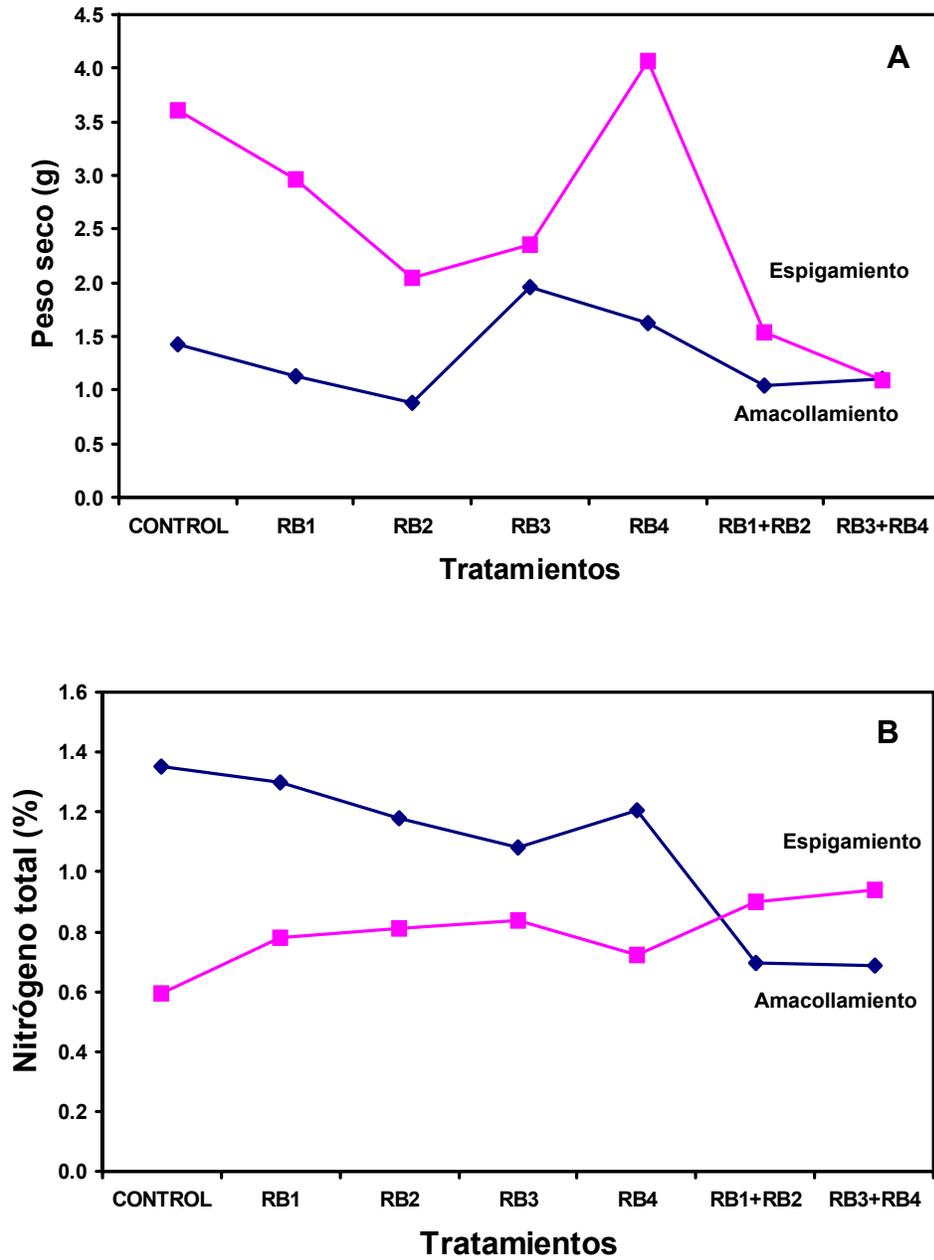


Figura 12. Efecto de la inoculación de rizobacterias sobre la producción de biomasa (A) y por ciento de nitrógeno total (B) en planta trigo var. Pavón F-76.

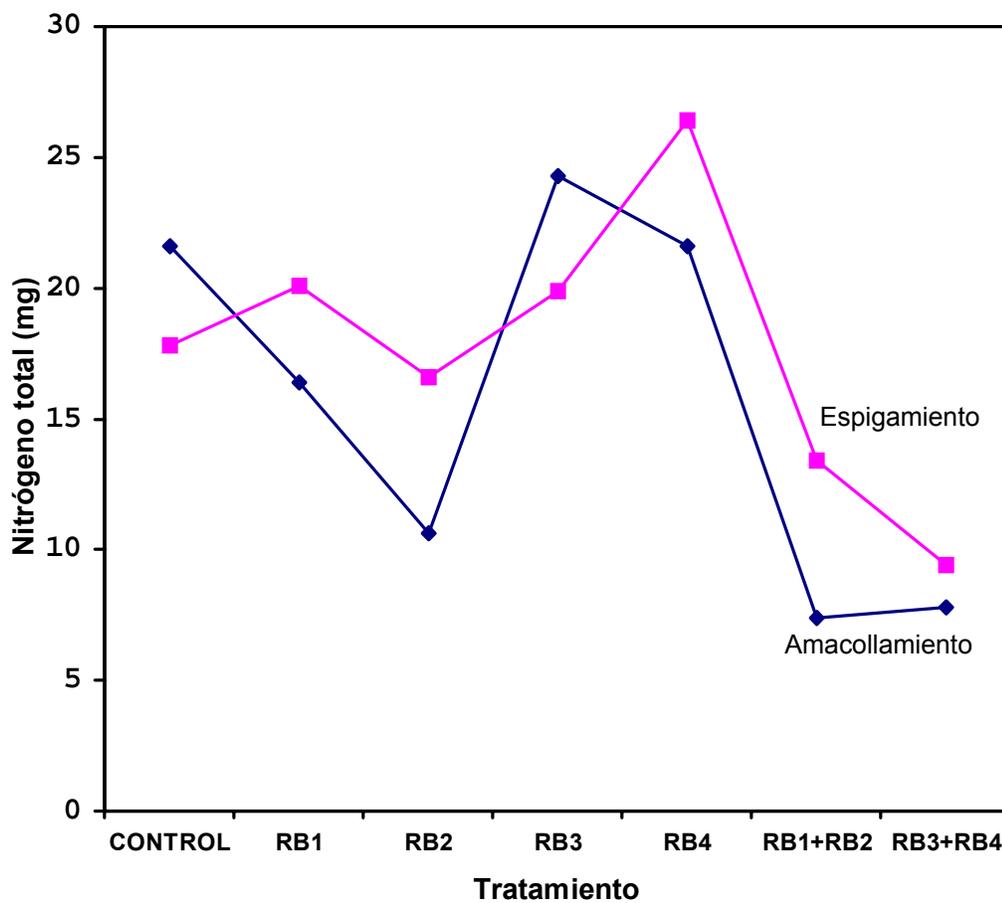


Figura 13. Efecto de la inoculación de rizobacterias sobre el contenido de nitrógeno total de planta de trigo var. Pavón F-76 en amacollamiento y espigamiento.

RB=Rizobacteria

Control, sin bacteria; RB1, Gualda; RB2, Cebollín; RB3, Nabo silvestre; RB4, Tres barbas; RB1+RB2, Combinación de RB aisladas de Gualda y Cebollín; RB3+RB4, Combinación de RB aisladas de Nabo silvestre y Tres barbas.

CONCLUSIONES

Después de analizar los resultados del efecto de la inoculación de las rizobacterias sobre materia seca y nitrógeno total evaluados al amacollamiento y espigamiento podemos concluir lo siguiente:

1. La presencia de rizobacterias aisladas en medio sin nitrógeno a partir de malezas fue reducida en el suelo alcalino del cual se extrajeron.
2. La respuesta a la inoculación de las rizobacterias sobre la producción de biomasa y nitrógeno total de trigo depende de la etapa fenológica evaluada. Al espigamiento la RB4, aislada de tres barbas (*Aristida sp.*), es superior al control en 12.7 por ciento en producción de biomasa. Al amacollamiento los tratamientos no afectaron el por ciento de nitrógeno. El contenido de nitrógeno total RB4 se incrementó en 48 por ciento al espigamiento.
3. La rizobacteria aislada de cebollín (*Asphodelus fistulosus L.*), y los tratamientos con rizobacterias combinadas provocaron una reducción en la producción de biomasa.
4. Las rizobacterias aisladas de malezas colonizaron la rizósfera de plantas de trigo y algunas de ellas tuvieron efecto positivo sobre el crecimiento de la planta ya que incrementaron el nitrógeno total.

LITERATURA CITADA

- Alexander, M. 1980. Introducción a la Microbiología del Suelo. 2ª edición. AGT. México.
- Austin, R.B., M.A. Ford, J.A. Edrich and R.D. Blackwell. 1977. The Nitrogen Economy of Winter Wheat. *J. Agric. Sci.* 88:159-167.
- Baca, B.E., L. Soto U., Y.G. Xochihua C. and A. Cuervo G. 1994. Characterization of Two Aromatic Amino Acid Aminotransferases and Production of Indolacetic Acid in *Azospirillum* Strains. *Soil Biol. Biochem.* 26(1): 57-63. Great Britain.
- Balandreau, J. 1986. Ecological Factors and Adaptative Processes in N₂-fixing Bacterial Populations of the Plant Environment. *Plant Soil.* 90: 73-92. The Netherlands.
- Bashan Y., M.E. Puente, N. Rodríguez M., G. Toledo, G. Holguin, R. Ferrera-Cerrato and S. Pedrín. 1995. Survival of *Azospirillum brasilense* in the Bulk Soil and Rhizosphere of 23 Soil Types. *App. Environ Microbiol.* v 61 (5) p. 1938-1945. USA.
- Bashan, Y., G. Holguin, N. Rodríguez, M.E. Puente and R. Ferrera-Cerrato. 1994. *Azospirillum brasilense*: Root Colonization of Weeds and Crop Plants, Inter-Root Movement and Survival in Soils and Rhizosphere. 15º Congreso Mundial de la Ciencia del Suelo. (4a): 13-29. México.
- Beauchamp, C. J., P. Dion, J. W. Kloepper and A. Antoun. 1991. Physiological Characterization of Opine-Utilizing Rhizobacteria for Traits Related to Plant Growth-Promoting Activity. *Plant Soil.* 132. 273-279. The Netherlands.
- Berthelin, J., C. Leyval and I. Weissenhorn. 1994. Agricultural and Health Impact of Soil Rhizosphere Weathering. ISSS. SMCS. Memorias del 15º Congreso Mundial de la Ciencia del Suelo. (3a): 572-585. México.
- Bidwell, R.G.S. 1990. Fisiología Vegetal. AGT Editor. México. p. 207-244.
- remner, J.M. 1965. Total Nitrogen. En: Black, C. A. (editor). Methods of Soil Analysis. Part 2. Agronomy No. 9. American Society Agronomy, Inc. Publisher. USA. p. 1149-1178.

- Brito, de A.M.A., S. Gagne and H. Antoun. 1995. Effect of Compost on Rhizosphere Microflora of the Tomato and on the Incidence of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(1):194-199. USA.
- Brock, T.D. 1973. Biología de los Microorganismos. Omega. p. 141-143. España.
- Brown, M.E. 1974. Seed Root Bacterización. *Ann. Rev. Phytopathol.* v.12: 311-331.
- Chalk, P.M. 1991. The Contribution at Associative and Symbiotic Nitrogen Fixation to the Nitrogen Nutrition of Non-legumes. *Plant Soil.* 132:233-241. The Netherlands.
- Cochran, W.C. y G.M. Cox. 1983. Diseños Experimentales. Trillas. México.
- Comisión de Estudios del Territorio Nacional (CETENAL). 1976. Saltillo. Carta Topográfica. G14C33. Escala 1:50 000. Color: varios. Secretaria de la Presidencia. México. p 1.
- Crafts, A. S. 1975. Modern Weed Control. University of California Press. Ltd London. England.
- Dart, P.J. 1990. Agricultural Microbiology: Introduction. En: Persley, G.J. (ed.) Agricultural Biotechnology: Opportunities for International Development. CAB International. p. 53-77. U. K.
- Derylo, M. and A. Skorupska. 1993. Enhancement of Symbiotic Nitrogen Fixation by Vitamin-secreting Fluorescent *Pseudomonas*. *Plant Soil.* Kluwer Academic Publishers. 154:211-217. The Netherlands.
- Domínguez, V.A. 1989. Tratado de Fertilización. 2ª edición. Ediciones Mundiprensa. España.
- Fages, J. 1989. An Optimized Process for Manufacturing an *Azospirillum* Inoculant for Crops. *App. Microbiol. Biotech.* 32(4):473-478.
- Fages, J. and J.F. Arsac. 1991. Sunflower Inoculation with *Azospirillum* and other Plant Promoting Rhizobacteria. *Plant Soil.* 137: 87-90. The Netherlands.
- Foth, H.D. 1986. Fundamentos de la Ciencia del Suelo. CECSA. México.
- Freitas de, J.R. and Germida, J.J. 1992a. Growth Promotion of Winter Wheat by Fluorescent *Pseudomonads* under Growth Chamber Conditions. *Soil Biol. Biochem.* 24(11): 1127-1135. Great Britain.

- Freitas de, J.R. and J.J. Germida. 1992b. Growth Promotion of Winter Wheat by Fluorescent Pseudomonads under Field Conditions. *Soil Biol. Biochem.* 24(11):1137-1146. Great Britain.
- Gagne, S., L. Dehbi, D. Le-Quere, F. Cayer, J.L. Morin, R. Lemay and N. Fournier. 1993. Increase of Greenhouse Tomato Fruit Yields by Plant Growth-promoting Rhizobacteria (PGPR) Inoculated into the Peat-based Growing Media. *Soil Biol. Biochem.* Pergamon Press. 25(2):269-272.
- Haahtela, K., T. Laakso, E.L. Nurmiaho-Lassila and K. Timo. 1988. Effects of Inoculation of *Poa pratensis* and *Triticum aestivum* with Root-associated, N-fixing *Klebsiella*, *Enterobacter* and *Azospirillum*. *Plant Soil.* 106: 239-248. The Netherlands.
- Hagedorn, C., W.D. Gould and T.R. Bardinelli. 1989. Rhizobacteria of Cotton and their Repression of Seedling Disease Pathogens. *Appl Environ Microbiol.* American Society for Microbiology. 55(11):2793-2797. USA.
- Harari, A., J. Kigel, and Y. Okon. 1988. Involvement of IAA in the Interaction between *Azospirillum brasilense* and *Panicum miliaceum* Roots. *Plant Soil.* 110: 275-282. The Netherlands.
- Hatzinger, P.B. and M. Alexander. 1994. Relationship between the Number of Bacteria Added to Soil or Seeds and their Abundance and Distribution in the Rhizosphere of Alfalfa. *Plant Soil.* 158:211-222. The Netherlands.
- Hebbar, K.P., A.G. Davey and P.J. Dart. 1992. Rhizobacteria of Maize Antagonistic to *Fusarium moniliforme*, a Soil-borne Fungal Pathogen: Isolation and Identification. *Soil Biol. Biochem.* 24(10):979-987. Great Britain.
- Janzen, H.H. and Y. Bruinsma. 1989. Methodology for the Quantification of Root and Rhizosphere Nitrogen Dynamics by Exposure of Shoots to ¹⁵N-labelled ammonia. *Soil Biol. Biochem.* 21:189-196.
- Janzen, R.A., S.B. Rood, J.F. Dormaar, and W.B. McGill. 1992. *Azospirillum brasilense* Produces Gibberellin in Pure Culture on Chemically-defined Medium and in Co-culture on Straw. *Soil Biol. Biochem.* 24(10):1061-1064. Great Britain.
- Kennedy, A.C., I.F. Elliott, F.L. Young and C.L. Douglas. 1991. Rhizobacteria Suppressive to the Weed Downy Brome. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 55(3): 722-727. USA.
- Kieft, T.L. 1991. Soil Microbiology in Reclamation of Arid and Semiarid Lands and Deserts. En: Skujins, J. Soil Resource and Reclamation. Marcel Dekker, Inc. USA.

- Kipe-Nolt, J.A. U. K. Avalakii and P.J. Dart. 1985. Root Exudation of Sorghum and Utilization of Exudates by Nitrogen Fixing Bacteria. *Soil Biol. Biochem.* 17:859-863.
- Kloepper, J.W., M.N. Schroth and T.D. Miller. 1980. Effects of Rhizosphere Colonization by Plant Growth-promoting Rhizobacteria on Potato Plant Development and Yield. *Phytopathol.* 70: 1078-1082. USA.
- Kloepper, J.W., R. Lifshitz and R.M. Zablotowicz. 1989. Free-living Bacterial Inocula for Enhancing Crop Productivity. *Trends Biotech.* 7:39-44.
- Kremer, R.J., M.F.T. Begonia, L. Stanley and E.T. Lanham. 1990. Characterization of Rhizobacteria Associated with Weed Seedlings. *Appl. Environ. Microbiol.* American Society for Microbiology. 56(6):1649-1655.
- Large, E.C. 1954. Growth Stages in Cereals. *Plant Pathol.* 3:128.
- Leonard, W.H. and J.H. Martin. 1967. Cereal Crops. MacMillan Co. USA.
- Liu, L., J.W. Kloepper and S. Tuzun. 1995. Induction of Systemic Resistance in Cucumber by PGPR. *Phytopathol.* 85:1064-1068.
- Luna, O.H.A. y J.M. Sánchez Y. 1991. Manual de Microbiología del Suelo. 3ª edición. FCB. UANL. p. 101-104. México.
- Lynch, J.M. and J.M. Whipps. 1990. Substrate Flow in the Rhizosphere. *Plant Soil.* 129. 1-10. The Netherlands.
- Marschner, H. 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. Second edition. Academic Press Limited. 862 p.
- Martín, C.A. 1990. En: Robles, S. R. Producción de Granos y Forrajes. 5ª edición. UTEHA. México.
- Martínez, T.M.V., J. González L., T. de la Rubia and A. Ramos C. 1985. Isolation and Characterization of *Azotobater chroococcum* from the Roots of *Zea mays*. *FEMS Microbiology Ecology.* 31: 197-203.
- Mascarua, E.M.A., R. Villa G. and J. Caballero M. 1988. Acetylene Reduction Indolacetic Acid Production by *Azospirillum* Isolates from Cactaceous Plants. *Plant Soil.* 106: 91-95. The Netherlands.
- Nehl, D.B., S.J. Allen and J.F. Brown, 1997. Deleterious Rhizosphere Bacteria: An Integrating Perspective. *Appl Soil Ecology.* 5(1):1-20. The Netherlands.
- Okon, Y. 1985. Azospirillum: as a Potential Inoculant for Agriculture. *Trends Biotech.* 3(9).

- Okon, Y. and Y. Kapulnik. 1986. Development and Function of *Azospirillum*-Inoculated Roots. *Plant Soil*. 90:3-16. The Netherlands.
- Olivares, S.E. 1990. Paquete de Diseños Experimentales FAUANL. Versión 2.0. Facultad de Agronomía UANL. Marín, N. L. México.
- Ostle, B. 1965. Estadística aplicada. Limusa. México.
- Paul E.A. and Clark, F.E. 1989. Soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press Inc. USA.
- Peoples, M.B., D.F. Herridge and J.K. Ladha. 1994. Biological Nitrogen Fixation: An Efficient Source of Nitrogen for Sustainable Agricultural Production. 15° Congreso Mundial de la Ciencia del Suelo. 4a:239-244. México.
- Peterson, R.F. 1965. Wheat. Botany, Cultivation y Utilization. Interscience Publishers Inc. USA.
- Pietr, S.J. and Stankiewicz, M. 1990. Characteristic of Bacteria from the Rizoplane of Selected Crops Cultivated in Different Soil Environments Using Hattori's Equation and by Presence of Different Physiological Groups. *Zeszyty Naukowe Rolniczej we Wroclawiu*. Poland. 196 (53): 63-74.
- Reyes, C.P. 1980. Diseños Experimentales Aplicados. Trillas. México. 344 p.
- Rodríguez, S.F. 1989. Fertilizantes: Nutrición Vegetal. AGT editor. México.
- Schippers, B., A.W. Bakker and P.A.H.M. Bakker. 1987. Interactions of Deleterious and Beneficial Rhizosphere Microorganisms and the Effect of Cropping Practices. *Ann. Rev. Phytopathol.* 25: 339-358.
- Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH). 1980. Descripción de las Variedades Desarrolladas por el CIANO. Publicación especial. Centro de Investigaciones Agrícolas del Noreste. Sonora. p. 19. México.
- Shah, S., V. Karkhanis and A. Desai. 1992. Isolation and Characterization of Siderophore, with Antimicrobial Activity, from *Azospirillum lipoferum* M. *Current Microbiol.* 25(6): 347-351.
- Simmons, S.R. 1987. Growth, Development and Physiology. En: Heyne, E.G. editor. Wheat and Wheat Improvement. American Society Agronomy. Agronomy No. 13. USA.
- Simpson, R.J., H. Lambers and M.J. Dalling. 1983. Nitrogen Redistribution during Grain Growth in Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiol.* 71:7-14.
- Soldano, O.R. 1978. El Trigo. Editorial Albatros. Buenos Aires. Argentina.

- Suslow, T.V. and M.N. Schroth. 1982. Rhizobacteria de Sugar Beets: Effects of Seed Application and Root Colonization on Yield. *Phytopathology*. 72:199-206.
- Tinker, P.B. 1984. The Role of Microorganisms in Mediating and Facilitating the Uptake of Plant Nutrients from Soil. *Plant Soil*. 76:77-91. The Netherlands.
- Weger, L.A. de; Arendonk, J.J.C.M. van; Recourt, K.; Hofstad, G.A.J.M. van der; Weisbeek, P.J. and Lugtenberg, B. 1988. Siderophore-mediated Uptake of Fe³⁺ by the Plant Growth Stimulating *Pseudomonas putida* strain WCS358 and by other Rhizosphere Microorganisms. *J. Bacteriol.* American Society for Microbiology. 170(10):4693-4698. USA.
- Villarreal, Q.J.A. 1983. Malezas de Buenavista Coahuila. UAAAN. 271 p.
- Zhang, F., N. Dashti, R.K. Hynes and D.L. Smith. 1997. Plant Growth-promoting Rhizobacteria and Soybean (*Glycine max.* L.) Growth and Physiology at Suboptimal Root Zone Temperatures. *Annals Botany*. 79(3): 243-249. England.

APÉNDICE

Cuadro A. 1. Análisis de varianza para materia seca de planta (mg) de trigo var. Pavón F-76 al amacollamiento (EF5).

Diseño completamente al azar con tres repeticiones.

FV	gl	SC	CM	Fc	F α	
					0.05	0.01
TRATAMIENTO	6	2585924.0	430987.3	2.8749 *	2.85	4.46
ERROR	14	2098808.0	149914.8			
TOTAL	20	4684732.0				

CV = 29.58 %

Cuadro A. 2. Análisis de varianza para materia seca de planta (mg) de trigo var. Pavón F-76 al espigamiento (EF10.5).

Diseño completamente al azar con tres repeticiones.

FV	gl	SC	CM	Fc	F α	
					0.05	0.01
TRATAMIENTO	6	21187360.0	3531226.75	5.1788**	2.85	4.46
ERROR	14	9546096.0	681864.00			
TOTAL	20	30733456.0				

CV = 32.73 %

Cuadro A. 3. Análisis de varianza para por ciento de nitrógeno total de planta de trigo var. Pavón F-76 al amacollamiento (EF5).

Diseño completamente al azar con tres repeticiones.

FV	gl	SC	CM	Fc	F α	
					0.05	0.01
TRATAMIENTO	6	1.338459	0.223077	12.93**	2.85	4.46
ERROR	14	0.241531	0.017252			
TOTAL	20	1.579990				

CV = 12.26 %

Cuadro A. 4. Análisis de varianza para por ciento de nitrógeno total de planta de trigo var. Pavón F-76 al espigamiento (EF10.5).

Diseño completamente al azar con tres repeticiones.

FV	gl	SC	CM	Fc	F α	
					0.05	0.01
TRATAMIENTO	6	0.236516	0.039419	6.7082**	2.85	4.46
ERROR	14	0.082268	0.005876			
TOTAL	20	0.318784				

CV = 9.59 %

Cuadro A. 5. Análisis de varianza para contenido de nitrógeno total de planta de trigo var. Pavón F-76 al amacollamiento (EF5).

Diseño completamente al azar con tres repeticiones.

FV	gl	SC	CM	Fc	F α	
					0.05	0.01
TRATAMIENTO	6	905.466309	150.911057	7.1285**	2.85	4.46
ERROR	14	296.379395	21.169956			
TOTAL	20	1201.84570				

CV = 29.332947 %

Cuadro A. 6. Análisis de varianza para contenido de nitrógeno total de planta de trigo var. Pavón F-76 al espigamiento (EF10.5).

Diseño completamente al azar con tres repeticiones.

FV	gl	SC	CM	Fc	F α	
					0.05	0.01
TRATAMIENTO	6	521.845703	86.974281	3.5278*	2.85	4.46
ERROR	14	345.160156	24.654297			
TOTAL	20	867.005859				

CV = 28.07 %