

207.21



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**"DETERMINACION DE LA CAPACIDAD COMPETITIVA  
DE TRES CEPAS DE Bradyrhizobium japonicum  
MEDIANTE TECNICAS SEROLOGICAS"**

**TESIS MANCOMUNADA**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A N :  
CASTILLO Y CANO PETRA  
RONZON ROJAS MA. DEL PILAR

MEXICO, D. F.

1987



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

	<u>Página</u>
1. INTRODUCCION . . . . .	3
2. GENERALIDADES . . . . .	6
2.1. Características generales del género <u>Bradyrhizobium</u> . . . . .	6
2.1.1 Morfológicas . . . . .	6
2.1.2 Asociativas . . . . .	6
2.1.3 Taxonómicas . . . . .	6
2.1.4 Importancia Agronómica . . . . .	7
2.2. Inoculantes . . . . .	12
2.2.1 Definición . . . . .	12
2.2.2 Características de un inoculante . . . . .	12
2.3. Selección de cepas . . . . .	13
2.4. Características Serológicas de <u>Bradyrhizobium japonicum</u> . . . . .	15
2.4.1 Naturaleza de los antígenos rhisobiales. . . . .	18
2.4.2 Técnicas de conservación de nódulos . . . . .	19
2.4.3 Serogrupos de <u>Bradyrhizobium japonicum</u> . . . . .	20
2.4.4 Técnicas Serológicas aplicadas a microorganismos fijadores de Nitrógeno . . . . .	21
2.5. Características generales de la Soya . . . . .	25
2.5.1 Importancia de la Soya en México . . . . .	26
2.5.2 Origen de la Soya variedad Júpiter . . . . .	27
3. OBJETIVOS . . . . .	30
4. MATERIAL Y METODOS . . . . .	32
5. RESULTADOS . . . . .	42

6.	DISCUSION DE RESULTADOS . . . . .	60
7.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES . . . . .	64
8.	BIBLIOGRAFIA . . . . .	66
9.	APENDICE . . . . .	72

## 1. INTRODUCCION

El nitrógeno es esencial para el crecimiento de las plantas, y es, de todos los elementos necesarios para el desarrollo vegetal, el más importante y el que interviene en mayor cantidad.

En los países desarrollados, el aumento de la producción por unidad de superficie, con grandes inversiones en fertilizantes, ha sido el camino para satisfacer la creciente exigencia de alimentos.

Los países en desarrollo, con mayores carencias alimentarias y menores recursos económicos, no están en condiciones de adoptar la tendencia al mayor uso de los abonos químicos pero sí pueden aprovechar el gran potencial que representa la obtención de alimentos ricos en proteínas mediante el cultivo de las leguminosas (18).

Más de 10,000 especies de leguminosas son conocidas, solamente 200 son cultivadas y las que más se utilizan como base en nuestra alimentación, como materias primas, como abonos verdes, para la conservación de suelos, forrajeras, etc., son: el frijol, la alfalfa, el cacahuete, el garbanzo, la soya, los tréboles, el haba, la lenteja, el chicharo, el ebo, de las cuales se cultivan diferentes variedades. (19, 22).

Los efectos benéficos de la inclusión de las leguminosas en la rotación de cultivos, fueron conocidos por los griegos, romanos y chinos, siglos antes de que los principios elementa-

les de la fijación de nitrógeno fueran establecidos.

Desde el siglo pasado, el conocimiento de unos pocos aspectos básicos de la fijación simbiótica y la comprensión de la importancia económica de este tipo de proceso en la agricultura estimuló la investigación en este campo.

Las investigaciones desarrolladas en la primera mitad de este siglo condujeron hacia enormes progresos en el conocimiento de la asociación simbiótica, bacteria fijadora de nitrógeno-leguminosa, estableciéndose que ciertos microorganismos tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, este es el caso del género Bradyrhizobium, pero sólo pueden realizar su función cuando se hallan asociados con las plantas pertenecientes a la familia de las leguminosas.

Esta asociación se propicia usando un medio que contenga a la cepa seleccionada, la cual debe reunir ciertas características como son efectividad, competitividad, especificidad e infectividad.

Esta tesis constituye una aportación al proyecto de inoculación en soya en donde los objetivos son obtener cepas de elevada eficiencia en la fijación de nitrógeno en un gran número de variedades de soya, de elevada capacidad competitiva por los sitios de infección radicular y con buena capacidad para colonizar y sobrevivir en el suelo. Siendo el objetivo particular de este trabajo estudiar la capacidad competitiva de tres cepas de Bradyrhizobium japonicum en la infección de raíces de soya de la variedad Júpiter.

Las cepas empleadas fueron seleccionadas por haber mostrado alta eficiencia en siete variedades de soya que son de interés comercial en nuestro país.

## 2. GENERALIDADES.

### 2.1. Características generales del género Bradyrhizobium.

#### 2.1.1 Morfológicas.

Las bacterias del género Bradyrhizobium presentan las siguientes características: bacilos Gram negativos de 0.5-0.9 x 1.2-3.0 micras, no producen esporas, en estado joven son móviles desplazándose por un flagelo polar o subpolar, en condiciones de crecimiento adversas y en cultivos viejos presentan gránulos de poli- $\beta$ -hidroxitirato.

Son aeróbios, utilizan diversos carbohidratos como fuentes de carbono, tales como: glucosa, galactosa, gluconato, glicerol, fructosa, arabinosa y manitol; así como las sales de los siguientes ácidos orgánicos: fumárico, málico, succínico, cítrico y pirúvico.

En algunas ocasiones, las células toman la forma de "estrella" o de "rosetas" debido a la gran cantidad de material mucoso extracelular que producen.

En medios sólidos son colonias circulares, opacas, blancas, convexas y con tendencia a textura granular, alcanzan un milímetro de diámetro en extracto de levadura manitol agar -- (ELMA) dentro de 5-7 días de incubación a 28°C (16, 24).

#### 2.1.2. Asociativas.

Bradyrhizobium es una bacteria que se encuentra normalmente en el suelo en donde crecen leguminosas, estableciendo



asociación con Glycinemax (L) Merril.

Esto es de gran importancia ya que la planta y la bacteria establecen una simbiosis de tipo mutualista en donde la planta y la bacteria actúan conjuntamente en la reducción o fijación de nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) a amoniaco ( $NH_4^+$ ) el cual es usado por la planta y a cambio le proporciona a la bacteria fotosintatos necesarios para su desarrollo.

Los nódulos que tienen aptitud para fijar el nitrógeno se denominan eficaces y desde la década de 1940 se sabe que la eficiencia está asociada con la presencia de un pigmento rojo en los nódulos, que es dado por una hemoproteína bastante parecida a la hemoglobina de la sangre de los mamíferos que se denomina leghemoglobina, cuya función es transportar oxígeno y proporcionarlo a las bacterias en una concentración que es igual a la nitrogenasa (9, 21, 22).

### 2.1.3. Taxonómicas.

En la octava edición del manual de Bergey (1974) Rhizobium fue ubicado en la parte VII como perteneciente a la familia - Rhizobiaceae. Incluyendo dentro de este género a todas las especies capaces de establecer asociaciones mutualistas con las leguminosas, como se exponen en el cuadro I.

Buchan y Gibbons (1974) citado en 17, establecen que la posición taxonómica de Rhizobium es controversial y que la clasificación puede ser considerada como tentativa. Ellos concluyen que la clasificación de Rhizobium basada en la inocula

ción cruzada (o afinidad por la planta) tiene anomalías y no es satisfactoria. Graham (1976) citado en 17, expuso las limitaciones mayores de esta clasificación las que se exponen a continuación:

a) Infección cruzada.- Se establece cuando se induce la nodulación en plantas de un grupo afín por rhizobias de otro. Cada una de las especies muestran cierto grado de infección cruzada.

b) Datos insuficientes de nodulación.- En el manual de Bergey menciona que de 14,000 especies conocidas de leguminosas solamente del 8-9% han sido estudiadas desde el punto de vista de nodulación y solamente del 0.3-0.4% están estudiadas con respecto a sus relaciones simbióticas.

c) Escasez de datos bioquímicos.- Muchos de los datos bioquímicos involucran solamente pocas cepas, dificultando la generalización del significado taxonómico de diferencias bioquímicas.

Por los antecedentes anteriores en la novena edición del manual de Bergey (1984) (24) aparece la nueva clasificación que fue basada en estudios más amplios, tales como:

1. Nutrición.
2. Análisis Adansoniano.
3. Serología.
4. Proporción de bases de DNA.
5. Hibridación de DNA.
6. Y más recientemente, proteínas marcadas (huellas).

De esta forma el género Rhizobium fue separado en dos géneros como se exponen en el cuadro II.

Cuadro I. Especies de Rhizobium y sus características. (17)

Especie	Zona de su ro en leche tornasolada	Reacción da en leche tornasolada	Velocidad de crecimiento	Hospedero nodulado	Nombre común del grupo
* Grupo I. De 2-6 flagelos perfrícticos, contenido de GC en DNA 59.1-63.1 (Tm).					
<u>R.</u> <u>Trifolii</u>	+	-	rápido	<u>Trifolium</u>	Trébol
<u>R. Legumino-</u> <u>sarum</u>	+	-	rápido	<u>Pisum</u> , <u>Lens</u> , <u>Lathyrus</u> <u>Vicia</u>	Chicharo
<u>R.</u> <u>phaseoli</u>	+	-	rápido	<u>Phaseolus</u> <u>vulgaris</u>	Frijol
<u>R.</u> <u>Meliloti</u>	+	-	rápido	<u>Medicago</u> <u>Trigonella</u>	Alfalfa
** Grupo II. Un flagelo polar o subpolar, contenido de GC en DNA 61.6-65.5 (Tm).					
<u>R.</u> <u>japoni</u> <u>cum</u>	-	-	lento	<u>Glycine</u> <u>max</u>	Soya
<u>R.</u> <u>lupini</u>	-	-	lento	<u>Lupinus</u> <u>ornithopus</u>	Lupini
<u>R. spp</u> variable		variable	variable	<u>Vigna</u> , <u>Desmodium</u> <u>Arachis</u> <u>Centrosema</u> <u>Stylosanthes</u>	Misceláneo Cowpea

\* Colonias circulares, convexas, semitranslúcidas, elevadas y mucilaginosas. Usualmente de 2-4 mm de diámetro en ELMA de 3-5 días.

\*\* Colonias circulares, puntiformes, opacas raramente translúcidas, blancas y convexas, granulares, no exceden de 1 mm de diámetro en ELMA a los 5-7 días.

Cuadro II. Nueva clasificación de Rhizobium (17).

Especie	Biovar	Velocidad de crecimiento	Hospedero (s)
<b>Género I Rhizobium</b>			
<u>R.</u>	<u>trifolii</u>		
<u>leguminosarum</u>	<u>phaseoli</u>		
	<u>viciae</u>		
<u>R.</u>			
<u>meliloti</u>			
<u>R.</u>			
<u>loti</u>		rápido	<u>L. corniculatus</u>
			<u>L. densiflorus</u>
			<u>A. vulneraria</u>
			<u>O. sativum</u>
			<u>Cicer, Sesbania</u>
<b>Género II Bradyrhizobium</b>			
<u>B.</u>		lento	<u>Glycine max</u>
<u>japonicum</u>			<u>Lotus uliginosus</u>
			<u>L. pendunculatus</u>
			<u>Vigna</u>
			Incluye cepas que
			nodulan; <u>Cicer,</u>
			<u>Sesbania, Leucaena,</u>
			<u>Mimosa, Lablab,</u>
			<u>Acacia.</u>

Del género Bradyrhizobium únicamente se describe a la especie japonicum y se propone establecer otras especies cuando existan suficientes evidencias que permitan ubicarlas de manera adecuada (17).

#### 2.1.4. Importancia Agronómica.

El nitrógeno del suelo es reemplazado a partir de dos fuentes principales, fertilizantes nitrogenados y fijación de nitrógeno. Los fertilizantes químicos pueden estar en la forma de sustancias orgánicas no proteicas como la urea, o materiales inorgánicos, como el nitrato de amonio o sulfato de amonio. Debido a la naturaleza del proceso de manufactura, los fertilizantes químicos son mucho más caros, teniendo además el inconveniente de estar más sujetos a la pérdida por erosión y desnitrificación.

Las plantas tienen altas demandas de nitrógeno, comparada con los otros requerimientos nutricionales, por otro lado el nitrógeno presente en el suelo se puede perder por erosión, cultivos continuos y desnitrificación, este proceso lo llevan a cabo algunas bacterias del suelo convirtiendo el nitrógeno útil a las plantas en nitrógeno atmosférico, siendo este el proceso contrario a la fijación de nitrógeno efectuado por la asociación Bradyrhizobium-leguminosa (21).

La habilidad de la asociación planta-bacteria en la fijación de nitrógeno atmosférico tiene una considerable importancia económica en la agricultura, de esta forma un buen porcentaje de nitrógeno es reciclado al suelo.

La búsqueda de cepas de Bradyrhizobium japonicum de alta eficiencia en fijar nitrógeno atmosférico continúa siendo una meta importante para aumentar la productividad de soya.

La esencia de la inoculación de leguminosas se basa en el empleo de una gran población de cepas de Bradyrhizobium altamente efectivos en la fijación de nitrógeno que sean compatibles con la variedad de leguminosa hospedera para favorecer el establecimiento de una estrecha relación que se inicia con la infección de la raíz por la bacteria, que fue introducida al suelo y se traduce en incrementos de la producción de grano, los que fluctúan de 150 a 1000 kg./Ha. (12, 18, 21).

## 2.2. Inoculantes

### 2.2.1 Definición.

El término inoculación a leguminosas se refiere a la práctica de introducir una bacteria efectiva, específica dentro del suelo con la semilla de la leguminosa.

Estas bacterias son comúnmente llamadas rhizobias, bacterias de leguminosas o bacterias nodulares, las cuales empiezan la infección en la raíz de la leguminosa.

### 2.2.2. Características de un inoculante.

El principal objetivo de la inoculación de las leguminosas es la de proporcionar suficiente Rhizobium efectivo para favorecer la nodulación del hospedero.

Cien rhizobias por semilla proveen un nivel de inóculo sa-

tisfactorio, pero en donde hay gran número de rhizobia inefectivos y las condiciones son adversas para la sobrevivencia del Rhizobium introducido se recomienda la aplicación de  $10^6$  rhizobia/semilla (Ireland and Vincent 1968 citado en 4).

El número de células que se necesitan para lograr este objetivo depende de varios factores, tales como: forma y edad del inoculante, cepas utilizadas, métodos de aplicación, tipo y tamaño de la semilla, clima, humedad, tipo de suelo, preparación del terreno y posiblemente otros más (18).

En relación a las cepas, éstas deben reunir numerosas características que se determinan a través de estudios secuenciales de selección de cepas y en la producción de inoculantes se deben emplear cepas seleccionadas, que conduzcan a la aplicación de un método simple y económico para mejorar el rendimiento de las leguminosas (20).

### 2.3. Selección de cepas.

La selección de cepas involucra tres factores esenciales que corresponden a la bacteria, al hospedero y al suelo donde se desarrollan.

Con base en lo anterior, los criterios para efectuar la selección de cepas se basan en el comportamiento de éstas respecto a:

1. Eficiencia en la fijación de nitrógeno. Existen numerosas cepas que son inefectivas pero no fijan nitrógeno, por lo que para la producción de inoculantes se seleccionarán cepas -

infectivas y efectivas.

2. Especificidad con el hospedero. La cual está dada por interacciones genotípicas de la bacteria y del hospedero, en donde la planta tiene un papel dominante. En este aspecto se ha observado que algunas cepas presentan un mayor grado de especificidad, como es el caso particular de Bradyrhizobium que es específico para Glycine max, pero determinadas cepas se comportan mejor con ciertas variedades de Glycine max, lo que conduce a la interespecificidad.

3. Capacidad competitiva por los sitios de infección radicular.

En donde también están involucradas las características de la bacteria y de la planta.

Esta característica tiene importancia decisiva en cuanto al éxito de la inoculación, en donde las cepas nativas del suelo lo menos eficientes pueden ser más competitivas que las eficientes introducidas por inoculación y consecuentemente formar mayor porcentaje de nódulos con disminución en la cantidad de nitrógeno fijado y baja en el rendimiento del cultivo (2, 20, 31, 36, 44).

4. Capacidad de sobrevivencia en el soporte del inoculante, sobre la semilla y en el suelo en ausencia del hospedero.

(8).

5. Tolerancia a pHs ácidos y alcalinos, pesticidas, presencia de nitrógeno en el suelo. En relación a este respecto el comportamiento de la bacteria, su interacción con la planta y



la fijación biológica de nitrógeno son afectadas especialmente en el trópico en donde las altas temperaturas, pH bajo y el exceso de Mn o Al pueden afectar la sobrevivencia y competitividad de las cepas inoculadas (7, 8).

Para efectuar la selección de cepas con base en su capacidad competitiva por los sitios de infección radicular y capacidad de sobrevivencia en el suelo se utilizan técnicas de marcaje con antibióticos e identificación por serología.

#### 2.4. Características serológicas de *Bradyrhizobium japonicum*.

Todas las investigaciones hechas acerca de *Bradyrhizobium* que involucran métodos serológicos, inicialmente tuvieron el propósito de ubicar taxonómicamente a estos microorganismos y actualmente estos métodos se emplean para el análisis antigénico y la identificación de cepas provenientes de nódulos (11, - 32). Este último aspecto es de gran interés tanto industrial como agrícola.

Las técnicas que se utilizan para identificación de cepas de rhizobias en nódulos son:

- Resistencia a uno o más antibióticos (25, 35).
- Tipificación serológica, entre estas se cuentan: aglutinación, inmunodifusión en gel e inmunofluorescencia (3,6,10,13, 20,27,28,32,35 a 42).

De éstas, las técnicas serológicas son las más empleadas. La aglutinación en tubo es la técnica de mayor uso y actualmente ha sido reemplazada por la inmunodifusión en gel. En ellas

se emplean como antígenos las células del cultivo o bien bacteroides procedentes del jugo nodular. En este último caso se requiere de nódulos grandes de 2-3 mm o más, para obtener suficiente material antigénico para desarrollar la aglutinación en tubo o la difusión en gel, lo que permite probarlos en contra de uno o más sueros inmunes, mientras que en la técnica de inmunofluorescencia se requiere de un volumen muy pequeño de antígeno (34).

Los métodos serológicos necesitan un suero obtenido de algún animal inmunizado con el antígeno apropiado. El suero es -- preparado generalmente, en conejos, ratones, cuyos, etc. Los conejos son los más utilizados por su fácil cuidado, docilidad, -- por su buena respuesta inmunológica y el volumen razonable de -- suero que se obtiene. Además, si el animal sobrevive a la punción cardiaca, se le pueden dar inmunizaciones a intervalos para mantener el título de anticuerpos y ser sangrado periódicamente, aunque en este caso existe el inconveniente de que la especificidad de los anticuerpos cambia con inmunizaciones prolongadas (42).

La técnica de adsorción de anticuerpos del suero inmune es empleada para demostrar la especificidad e identidad antigénica y obtener un suero noespecífico.

Las técnicas de aglutinación implican antígenos disponibles para reacciones de superficie, las de precipitación para complejos antígeno-anticuerpo en un sistema de difusión en gel y detectan un amplio rango de antígenos internos solubles.

La distinción entre la aglutinación debida a antígenos flagelares y somáticos y la aplicación de la prueba de adsorción - de anticuerpos han proporcionado el entendimiento acerca de la constitución antigénica, definición de serotipos y reconocimiento de cepas.

La técnica de Ouchterlony (immunodifusión en gel) para la detección de antígenos solubles ha sido muy utilizada en el reconocimiento de cepas y para demostrar la presencia de antígenos no detectables por aglutinación. Esta posibilidad se ha extendido por el uso de métodos immunolectroforéticos más sensibles.

Todas las técnicas mencionadas y algunas otras son empleadas para la identificación directa de una cepa, o cepas que ocupan un nódulo.

Los objetivos en el estudio de los antígenos rizobiales son:

- 1) Conocer la naturaleza y localización de los componentes serológicos detectables.
- 2) Asegurar una evidencia de las relaciones taxonómicas.
- 3) Definir cepas en términos de su composición antigénica.
- 4) Obtener marcadores para estudios genéticos y autentificación de mutantes.
- 5) Probar una posible relación entre la composición antigénica y la capacidad simbiótica.

### 2.4.1. Naturaleza de los antígenos rizobiales.

Los antígenos somáticos de superficie de los rhizobia son los más específicos, así que cualquier colección de una especie debe contener muchos patrones de aglutinación.

Los antígenos flagelares son más ampliamente compartidos - entre cepas, dentro de especies o entre especies muy relacionadas y los antígenos internos, no aglutinables, se comparten ampliamente entre cepas de lento crecimiento.

#### **Antígenos flagelares.**

Los antígenos flagelares (H) requieren de reacciones de -- aglutinación para su demostración. El calentamiento de la suspensión antigénica evita la aglutinación flagelar y proporciona antígenos solubles para difusión en gel, por fragmentación de - los flagelos en unidades más pequeñas (más difusibles) y termo-estables.

#### **Antígenos somáticos.**

Las cepas de especies de rhizobios de rápido y lento crecimiento caen dentro de muchos tipos serológicos basados en -- reacciones de aglutinación con antígenos de superficie. Las -- pruebas de adsorción de anticuerpos y la demostración de no -- identidad en algunas reacciones cruzadas, frecuentemente amplían cualquier fórmula mínima antigénica (47).

Los antígenos somáticos insolubles de la superficie de los bacteroides son altamente específicos hacia sus anticuerpos homólogos en la identificación de cepas por inmunofluorescencia

y aglutinación (42).

#### 2.4.2. Técnica de conservación de nódulos.

Originalmente se expuso la necesidad de aislar a los microorganismos de nódulos y cultivarlos en algún medio antes de su identificación serológica, posteriormente se demostró que la -- cantidad de material antigénico obtenido de un nódulo macerado de soya, es suficiente para permitir aglutinaciones directas -- sin la necesidad de aislar a los microorganismos, ahorrándose tiempo y costo (42).

A pesar de esta simplificación se presentó otro problema - referente a la gran cantidad de nódulos que se manejan en experimentos de invernadero y de campo, por lo que fue necesario investigar sobre técnicas que permitieran conservar los nódulos - sin alteración en sus propiedades antigénicas.

Actualmente se recomiendan los siguientes métodos de conservación (42):

- 1) Desecación sobre sílica-gel.
- 2) Secados en horno a 70°C durante 48 horas.
- 3) Congelados.

Los nódulos frescos se utilizan directamente para la identificación de los bacteroides por técnicas de aglutinación en tubo (Means 1964 citado en 42), inmunodifusión (Skrdieta 1969 citado en 42) e inmunofluorescencia (Trinick 1969, citado en 42).

Los nódulos secos en cambio son hidratados colocándolos en agua durante una noche y en refrigeración, tratamiento que fa-

cilita la maceración de los mismos y con el jugo nodular se obtienen títulos mayores de anticuerpos fluorescentes con respecto a los detectados en nódulos frescos o congelados (42).

Otra ventaja que ofrece la utilización de nódulos secos es que se realiza la evaluación del peso seco de nódulos que permite determinar y comparar infectividad y efectividad de las cepas probadas y esta misma muestra de nódulos secos es utilizada para la identificación de cepas y determinación de capacidad -- competitiva y sobrevivencia en el suelo (42).

#### 2.4.3. Serogrupos de Bradyrhizobium japonicum.

El objetivo del estudio de serogrupos de Bradyrhizobium japonicum es investigar la posibilidad de diferenciar especies de este género con base en sus antígenos somáticos termoestables.

En general, estas investigaciones incluyen:

- Obtención del antígeno apropiado para técnicas de inmunización e identificación de cepas.
- Preparación de un suero inmune en contra de varias de las cepas en estudio, siguiendo un esquema de inmunización.
- Adsorción de aglutininas (Edwards P.R. y Ewin W.H. 1955, citado en 29).

Las cepas en estudio se colocan frente a los sueros inmunes obtenidos y por medio de reacciones de aglutinación cruzada y adsorción de aglutininas se forman serogrupos que contienen especies que comparten algunos determinantes antigénicos, obteniéndose de este modo grupos de cepas similares pero antigéni-

camente diferentes ya que no se encuentra ningún antígeno común para todas ellas (40).

Existen numerosos estudios sobre la correlación de la estructura antigénica y diferentes propiedades fisiológicas tales como: parasitismo, clorosis y fijación simbiótica de nitrógeno y se reporta que no existe relación alguna entre estas características (29).

#### 2.4.4. Técnicas serológicas aplicadas a microorganismos fijadores de nitrógeno.

##### **Aglutinación.**

Cuando se mezclan antígenos particulados con un suero inmune específico, las moléculas de anticuerpo forman enlaces entre los antígenos para producir redes tridimensionales. Este método serológico, relativamente simple, es utilizado tanto para determinar niveles de anticuerpos como para comparar e identificar microorganismos (14, 43).

Las bacterias que comparten determinantes antigénicos presentan reacciones de aglutinación cruzada aunque el título en reacciones cruzadas es más bajo que con sus sueros homólogos.

La especificidad de un suero inmune aumenta con la técnica de adsorción (29), en la cual los anticuerpos responsables de la reacción cruzada son adsorbidos selectivamente por la bacteria que presenta dicha reacción.

##### **Precipitación.**

Al mezclar un antígeno soluble con su suero homólogo, la

solución se vuelve turbia y se forma precipitado. En principio es una reacción similar a la aglutinación, excepto que involucra antígenos solubles más que particulados.

Al agregar mayor cantidad de antígeno a un volumen de suero, la cantidad de precipitado aumenta hasta un máximo (zona de equivalencia), pero al adicionar un exceso de antígeno, el precipitado disminuye debido a que el complejo antígeno-anticuerpo, es soluble en exceso de antígeno. Bajo ciertas condiciones (control cuantitativo) la reacción de precipitación es un método --sensible y reproducible para investigación cuantitativa insumo química (43).

Esta reacción es la base de la inmodifusión.

Doble difusión radial (Ouchterlony).

Este es el método de precipitación más ampliamente utilizado y se lleva a cabo en placas de agar en donde se hacen horadaciones (pozos) en los que se colocan separadamente el antígeno y el anticuerpo.

Cuando las placas de agar se colocan en condiciones de temperatura y humedad constantes, los anticuerpos y antígenos solubles, se difunden en el medio y al encontrarse en concentraciones equivalentes se forma una banda de precipitado.

Esta técnica permite la enumeración y comparación de antígenos. El número de bandas es igual al número de determinantes antigénicos solubles presentes (43).



### **Inmunolectroforesis.**

El poder de resolución de la técnica de inmunodifusión - aumenta al someter el antígeno a una separación electroforética, después de la cual el suero se coloca en un canal paralelo a la dirección en la cual se aplica la corriente eléctrica, las placas de agar se incuban como en la inmunodifusión. Cuando la preparación antigénica contiene moléculas con distinta propiedad electroforética, éstas migran a diferentes sitios del agar y cada una da bandas de precipitado en forma de arcos junto al canal (43).

### **Electroinmunodifusión (Laurell).**

Esta técnica se basa en el uso de agarosa especial en la cual se incorpora el anticuerpo, en tanto que el antígeno se pone en movimiento a través del gel por electroforesis y al llevarse a cabo la reacción antígeno-anticuerpo se forman dos bandas de precipitado que convergen en el punto de equivalencia. - La altura de los picos (o líneas) de precipitación es proporcional a la concentración del antígeno (14, 43).

### **Inmunofluorescencia**

La inmunofluorescencia permite investigar los antígenos de una sola célula microbiana.

En la técnica directa los anticuerpos del suero inmune son marcados con una sustancia fluorescente (isotiocianato de fluoresceína) y se aplican a una preparación de células con las que reaccionan específicamente. La preparación se lava para elimi-

nar el exceso de anticuerpos y se examina bajo microscopio de luz ultravioleta (45).

La técnica indirecta utiliza un segundo suero marcado con fluoresceína específico para las globulinas de la especie animal en donde se preparó el suero inmune. Las células reaccionan con los anticuerpos específicos primarios, los cuales se ponen de manifiesto con la anti-globulina marcada (14, 26, 43).

#### Técnica de ELISA

La técnica de ELISA se ha utilizado ampliamente para la detección de rixobias en nódulos (Kishinevsky y Bar-Joseph 1978, citado en 33). En ésta, los anticuerpos específicos se absorben a la superficie sólida de los pozos en placas de microtitulación. La muestra de prueba que contiene los rixobias se incubó en los pozos cubiertos con los anticuerpos específicos y se lleva a cabo el reconocimiento antígeno-anticuerpo. La siguiente reacción del antígeno enlazado, se efectúa con los anticuerpos específicos unidos a una enzima dando lugar a la formación de un complejo que se detecta mediante la adición del sustrato específico para la enzima con la formación de una reacción colorida (33,43).

Una modificación a esta técnica es la propuesta por Barbara & Clark citado en 33, la que se conoce como ELISA indirecto, en ella:

- 1) La fracción  $F(ab)_2$  es adsorbida en la placa de microtitulación, en lugar de IgG.
- 2) El complejo  $F(ab)_2$ - Antígeno se hace reaccionar con el suero inmune (IgG).

3) La IgG es detectada con el complejo, suero anti-Fc-Enzima.

### 2.5. Características generales de la soya.

La soya tiene larga historia en el Oriente, como fuente importante de grasas y proteínas en la dieta. En contraste con -- ello, el mundo Occidental prestó muy poca atención a esta leguminosa. Hasta hace 50 años el cultivo se estableció firmemente en los Estados Unidos y en el Brasil.

Adquirió importancia hace sólo 5-7 años. A pesar de que su contenido de aceite (20%) es solamente la mitad del contenido de proteína (40%), el interés inicial en Occidente hacia la soya fue más como fuente de aceite que como fuente de proteína y aún cuando la adopción de la soya ha sido lenta en los países Occidentales, las estadísticas indican que la producción actual de Occidente sobrepasa la de los países Orientales (48).

El frijol soya es una leguminosa cuya semilla está formada de una cáscara, un hipocotilo y dos cotiledones. La composición en base seca se describe a continuación (48).

	<u>Proteína</u>	<u>Grasa</u>	<u>Cenizas</u>	<u>Carbohidratos</u>
Soya (100)	40	21	5	34
Cáscara (8%)	9	1	4	86
Hipocotilo (2%)	41	11	5	43
Cotiledones (90%)	43	23	5	29

- Descripción de la planta. Es erecta y ramificada semejante al frijol en su etapa inicial de crecimiento. De tallo -- leñoso, alcanza altura de 50 cm hasta 1.80 m dependiendo de la

variedad, el clima y la fertilidad del suelo. Del tronco se derivan 5 ó 6 ramas principales, en donde se desarrolla el follaje y las vainas, generalmente cubiertas de vello. Las semillas son de forma elíptica y variados colores, parecidas con las del frijol (39).

### 2.5.1. Importancia de la soya en México.

No obstante que desde los años veinte se iniciaron intentos para establecer el cultivo de la soya en varias regiones de México, no fue sino hasta 1958 cuando se sembraron en el país - las primeras 300 hectáreas, superficie que fue creciendo paulatinamente y de acuerdo con los datos disponibles obtenidos en las investigaciones llevadas a cabo por el INIA, la superficie cultivable con soya puede extenderse más allá de las 500 hectáreas ya que en México es posible cultivarla en muchas regiones (ver cuadro III).

Cuadro III. Regiones en donde se cultiva o puede cultivarse soya en México (39).

REGION	VARIEDAD ADECUADA
Iguala, Guerrero	Tropicana, Cajeme, Júpiter, Davis.
Apatzingan, Michoacán.	Cajeme, Tropicana, Tetabiate, Jalisco
Centro de Jalisco	Davis, Cajeme, Jalisco.
Delicias, Chihuahua	Conchos 74, Cajeme, Davis, Tetabiate.
La Laguna, Coahuila	Davis, Cajeme, Hood.
Sur de Tamaulipas	Tropicana, Júpiter, Hardee.
Valle del Yaqui, Sonora	Cajeme, Tetabiate, Bacatete, Davis.
Valle de Mexicali.	Cajeme, Lee 68, Davis, Tetabiate.
Culiacán, Sinaloa	Culiacán, Bragg, Corerepe.
Valle del Fuerte, Sinaloa	Corerepe, Davis, Cajeme, Hood, Bragg.
Itsmo de Tehuantepec.	Tropicana, Acadián.
Tapachula, Chiapas	Tropicana, Júpiter.
Veracruz	Tropicana, Acadián.
Yucatán	Tropicana, CIAFY 72, Júpiter.
Costa de Oaxaca	Tropicana

### 2.5.2. Origen de la soya variedad Júpiter.

La variedad Júpiter fue seleccionada en la progenie de la crusa D-49-2491 por Belomi No. 3, hecha en Gainesville, Florida (EUA). La primera generación de esta crusa se manejó bajo condiciones de invernadero.

- Características agronómicas (38).

1. La planta es de crecimiento determinado.
2. En condiciones óptimas, esta variedad alcanza una altura - de 98 cm.
3. Su ciclo vegetativo es de 140-150 días, cuando el mes de - agosto es lluvioso, sin embargo a últimas fechas se ha re- ducido a 120 días.
4. Sus hojas son alargadas y anchas.
5. El color del follaje es verde oscuro.
6. La pubescencia en el tallo, hojas y vainas es de color ca- fé.
7. El color de la flor es morada.
8. Las vainas aparecen en la planta a 18 cm sobre el nivel del suelo en siembras efectuadas en el "lomo del surco" lo cual permite realizar la cosecha en forma mecánica.
9. Está clasificada dentro del grupo de madurez IX.
10. Es resistente al desgrane.
11. Hasta la fecha ha mostrado tolerancia a la enfermedad co- nocida como "pústula bacterial" causada por Xanthomas - - phaseoli.
12. Es susceptible a "tiro de munición" causada por el hongo Corynespora sp.

Por lo anterior se puede decir que la soya:

Como es rica en proteínas, podría elaborarse un producto que fuera fácilmente aceptable por la población, ayudando de - esta forma a aumentar el consumo de proteínas en la población

más desfavorecida económicamente. Lo anterior se puede afirmar debido a que esta proteína es semejante a la proteína animal, - pues contiene casi todos los aminoácidos esenciales.

Además tiene muchas ventajas agronómicas, tales como: responde positivamente a las prácticas de fertilización, manejo -- adecuado del agua, uso de herbicidas e insecticidas.

Es un cultivo mecanizable desde la siembra hasta la cosecha, permite el uso integral de la maquinaria que se emplea para otros cultivos como algodón, trigo, sorgo, maíz, y arroz.

Además comprende un grupo de variedades tan amplio que puede disponerse de la variedad más adecuada para determinada región.

Es más resistente que muchos otros cultivos a la sequía, - vientos fuertes y temperaturas altas y bajas.

Es necesaria la promoción de este cultivo por todas las -- conveniencias antes mencionadas.

Se recomienda la conveniencia de incluir a la soya como - cultivo básico en las regiones que se señalan en el cuadro III.

### 3. OBJETIVOS.

Con base en:

- La importancia del cultivo de la soya en México.
- La importancia de la utilización de inoculantes en la -- producción de soya.
- La importancia de emplear en la producción de inoculantes cepas bacterianas seleccionadas.

El presente estudio pretende contribuir a la selección de cepas de Bradyrhizobium con base en su capacidad competitiva - que es una de las características esenciales que deben tener - las cepas que se emplean en la producción de inoculantes.

#### OBJETIVO GENERAL.

Determinar la capacidad competitiva de tres cepas de Bradyrhizobium japonicum por los sitios de infección radicular.

#### OBJETIVOS PARTICULARES

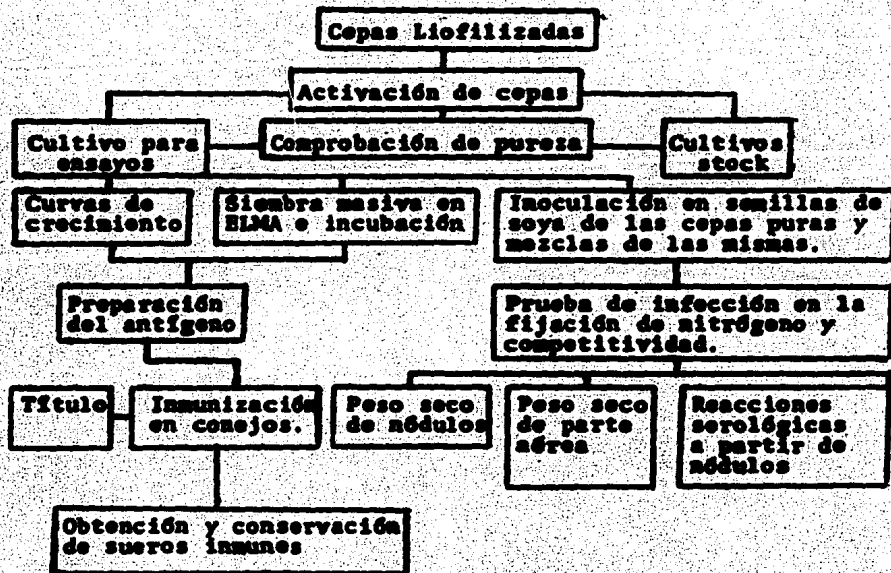
- I. Comparación de dos esquemas de inmunización para la obtención de anticuerpos específicos en contra de las cepas utilizadas.
- II. Obtención de anticuerpos.
- III. Tipificación de tres cepas de Bradyrhizobium japonicum, altamente efectivas en la fijación de nitrógeno.
- IV. Comparación de métodos de conservación de nódulos para tipificación de bacteroides de Bradyrhizobium japonicum.
- V. Determinar el porcentaje de nódulos formados por cada una de las cepas introducidas, mediante tipificación se-



rológica.

VI. Evaluación de la eficiencia en la fijación de nitrógeno:  
peso seco de los nódulos y parte aérea de la planta.

Figura 4.1. Diagrama de Trabajo.



#### 4. MATERIAL Y METODOS

##### 4.1. Activación de las cepas

Las cepas utilizadas corresponden a FQ 9, FQ 17, FQ 18 de la colección de la Facultad de Química, UNAM, en donde se conservan liofilizadas y en refrigeración (ver tabla 2).

Las ampollitas con las cepas liofilizadas se limaron aproximadamente a un tercio de la ampollita y fueron desinfectadas superficialmente con solución de fenol al 5% durante 10 min., - después de los cuales se abrieron en condiciones de asepsia.

El liofilizado se resuspendió en 50 ml de caldo levadura - manitol, contenidos en un matraz de 250 ml y se incubó a 28°C y 200 rpm por un periodo de 7 días.

##### 4.2. Comprobación de pureza.

A cada una de las cepas activadas se le comprobó su pureza mediante tinción de Gram.

##### 4.3. Cultivos Stock.

De los cultivos activos con pureza comprobada, se resembró en medio extracto levadura manitol rojo congo (apéndice 9.1) en tubo inclinado y se incubó durante 7 días conservándose posteriormente en refrigeración a 5°C. Resembrándose cada 3 meses.

##### 4.4. Curvas de Crecimiento.

De los cultivos Stock se inoculó una asada en tubos que - contenían 10 ml de caldo levadura manitol (apéndice 9.2) y se incubaron a 28°C y 200 rpm durante 7 días. Se comprobó pureza

y se procedió a transferir un volumen constante de inóculo (5.0 ml) a matraces nefelométricos que contenían 50 ml de caldo levadura manitol (apéndice 9.2) los que se incubaron en las condiciones antes descritas. Se determinaron las unidades Klett al tiempo cero y cada 12 h hasta el tiempo en que se obtuvo la fase estacionaria.

Tabla 2

Procedencia de las cepas utilizadas.

Género y especie: Bradyrhizobium japonicum, sinónimo: Rhizobium japonicum.

Clave de la cepa en la Facultad de Química UNAM	Recibida como en, de, con clave	Quién recibió de, con clave	Otras claves conocidas	Aislada de	Conservación
FQ 9	<u>R. japonicum</u> 1978-Nittal project, University of Hawaii, USA. TAL 379	Dr. J. Vincent of Sydney Australia CB 1809	- USDA 136B (Beltsville - NTOO1/CB1809 (Australia) - INTEC 149 - INTE 50 - RRC 3407 - CP 18 (Mex.) - CB 2 (Mex.)	Maryland USA	Liofilización y almacenamiento a 4°C.
FQ 17	<u>R. japonicum</u> 1979 Universidad Autónoma de Tamaulipas 311b110	Depto. de Agricultura USA 311b110	- TAL 102 - IITA 9 8 - FQ 8	Florida USA	Liofilización y almacenamiento a 4°C.
FQ 18	<u>R. japonicum</u> 1979 Universidad Autónoma de Tamaulipas 311b136	Depto. de Agricultura USA 311b136		Maryland USA.	Liofilización y almacenamiento a 4°C.

#### 4.5. Producción de Antígeno.

Cada una de las cepas se propagó masivamente, para ello se emplearon botellas de caras planas con el medio extracto de levadura manitol agar (apéndice 9.1) y se incubaron a 28°C durante 5 días la cepa FQ 18 y 7 días las cepas FQ 9 y FQ 17. El tiempo de incubación se varió para la cepa FQ 18 debido a que produce abundantes polisacáridos extra celulares (11).

Las células microbianas se colectaron mediante lavados con solución salina isotónica estéril y perlas de vidrio para facilitar la resuspensión de los microorganismos.

Con el fin de eliminar residuos del medio y metabolitos extracelulares, la suspensión de microorganismos se lavó y resuspendió tres ocasiones con solución salina isotónica estéril.

La suspensión celular se dividió en dos porciones, una de las cuales se ajustó a una concentración de  $1 \times 10^9$  cél/ml y la otra a  $1.5 \times 10^{10}$  cél/ml, usándose la primera para la inmunización de los conejos y la otra para la determinación del título de los sueros inmunes.

#### 4.6. Obtención de sueros inmunes.

Se emplearon conejos hembras de 2.5 kg. de peso y 60 días de edad y se probaron dos esquemas de inmunización.

**Esquema 1. Schmidt, Bankole y Bohlool, 1968 (15,41).**

<b>Día</b>	<b>Procedimiento</b>
1	Inyectar 0.5 ml de antígeno vía intravenosa (IV)
2	Inyectar 1.0 ml de antígeno IV
3	Inyectar 1.5 ml de antígeno IV
4-6	Descansar
7	Inyectar 1.5 ml de antígeno IV
8	Inyectar 2.0 ml de antígeno IV
9	Inyectar 2.0 ml de antígeno IV y 2.0 ml vía subcutánea (SC)
16	Sangría de prueba en la vena marginal de la oreja y determinación del título.
18	Sangría de cosecha por punción cardiaca (30-50 ml)
25	Refuerzo de 2.0 ml SC.
32	Sangría de cosecha (30-50 ml).
39	Refuerzo de 2.0 ml SC.
46	Sangría de cosecha (30-50 ml).

**Esquema 2. Somasegaran 1981 (15, 41).**

<b>Día</b>	<b>Procedimiento</b>
1	Inyectar SC 1.0 ml de emulsión de partes iguales de una suspensión celular y adyuvante completo de Freund.
14	1.0 ml IV (suspensión celular sin adyuvante).
28	Sangrado de prueba en la vena marginal de la oreja y determinación del título.

- 30 Sangría de cosecha por punción cardiaca (30-50 ml).
- 37 Inyectar 1.2 ml IV
- 44 Sangría de cosecha (30-50 ml)

NOTA.- El título de anticuerpos se determinó en el suero que se obtuvo después de separar el coágulo de las paredes del tubo y centrifugar a 1500 rpm durante 10 minutos.

#### 4.7. Conservación de sueros inmunes.

A los sueros inmunes obtenidos se les agregó como conservador timerosal, para obtener una concentración final de 1:2000, se distribuyeron en frascos viales y se mantuvieron en refrigeración.

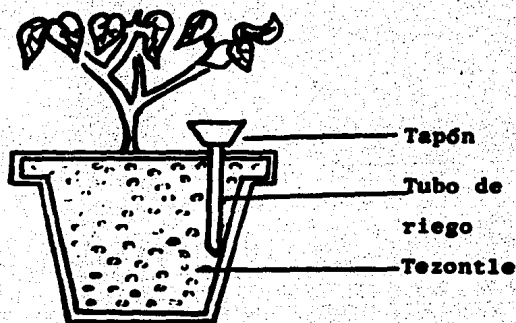
#### 4.8. Determinación del título de los sueros inmunes.

Mediante la técnica de aglutinación en placa se emplearon las diluciones del suero (1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320), junto a ellas se agregó una gota del antígeno se mezcló con un palillo de plástico y con movimientos giratorios de la placa se observó la aglutinación con ayuda de luz difusa. En los casos en que se obtuvo reacción positiva en la dilución 1:320, se probaron diluciones más altas (1:800, 1:1 600, 1:3 200).

#### 4.9. Ensayos de Invernadero.

Se utilizaron macetas de plástico desinfectadas, con 2.5 kg de tezontle estéril, en cada maceta se colocaron las plantas, que fueron regadas con solución de Jensen (apéndice 9.5 y 9.5.1) que se agregó a través de un tubo para evitar contamina

ciones (figura 1).



#### 4.9.1. Preparación de hospederos.

Se utilizó semilla certificada de Glycine max (L) Merrill variedad "Júpiter" que fue desinfectada (Vincent 1970) y germinada en condiciones de esterilidad durante tres días, después de los cuales se transfirieron 4 plántulas a cada maceta (citado en 46).

#### 4.9.2. Inoculación.

Se emplearon cultivos microbianos que se encontraban en la fase logarítmica de desarrollo, ajustándose la densidad de población a  $1 \times 10^9$  c61/ml, agregándose a cada plántula 1 ml de la suspensión bacteriana.

Las unidades experimentales se colocaron en invernadero -- por un periodo de 60 días, a una temperatura de 26-32°C durante el día y de 10-16.5°C durante la noche.

A los 15 días se realizó la eliminación de plantas para de



jar 2 por unidad.

Los tratamientos probados corresponden (37):

- 1.- FQ 9
- 2.- FQ 17
- 3.- FQ 18
- 4.- FQ (9+17) (vol/vol)
- 5.- FQ (9+18) (vol/vol)
- 6.- FQ (17+18) (vol/vol)
- 7.- FQ (9+17+18) (vol/vol)
- 8.- T (+) Sin inoculante y con nitrógeno mineral ( $KNO_3$  0.05% -- que proporciona aproximadamente 70 ppm de nitrógeno) (46).
- 9.- T (-) Sin inoculante y sin nitrógeno mineral.

El diseño experimental fue completamente al azar en donde cada unidad experimental estuvo constituida por una maceta y ca da tratamiento tuvo 3 repeticiones.

#### 4.10. Comprobación de la infectividad y competitividad mediante la determinación de:

- 4.10.1. Peso seco de nódulos: De cada fracción se recolectaron nódulos y se secaron en estufa a 70°C durante 48 h.
- 4.10.2. Peso seco de la parte aérea: A los sesenta días se hizo la cosecha, separándose la zona radicular de la parte aérea que fue secada en estufa a 70°C hasta peso constante.

La zona radicular se fraccionó en 3 partes iguales, como se muestra en la figura 2.

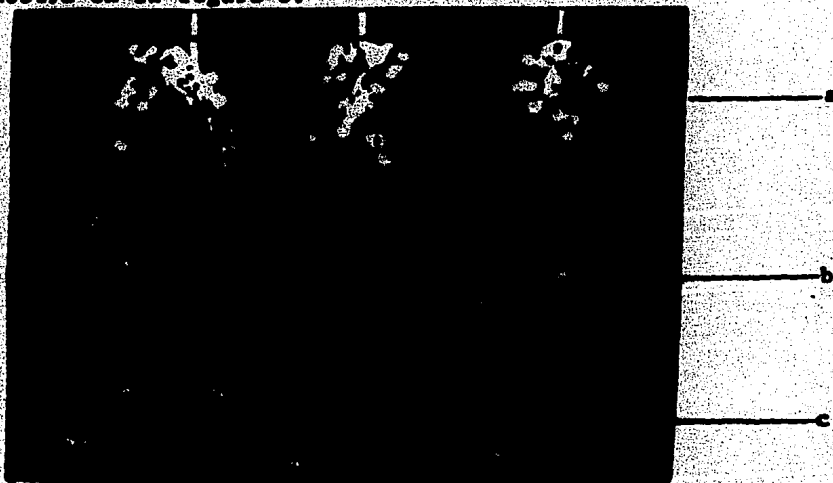


Figura 2.

#### 4.10.3. Tipificación serológica de nódulos.

Se usaron dos técnicas: Aglutinación en placa e inmunodifusión (método de Ouchterlony) (1, 41).

De cada fracción se tomaron al azar 10 nódulos secos y por separado se rehidrataron con 5 gotas de solución isotónica estéril, refrigerando durante toda la noche.

Los nódulos rehidratados se maceraron hasta obtener una suspensión lechosa que se utilizó como antígeno en las reacciones de aglutinación en placa, mediante la técnica descrita en 4.8 y por inmunodifusión.

Se compararon las reacciones de aglutinación con antígenos

obtenidos de nódulos frescos, de nódulos conservados en congelación y por desecación.

En la técnica de inmunodifusión se emplearon cubos de agar bacteriológico que se lavaron con cambios sucesivos de agua destilada durante una semana en condiciones de baja temperatura.

Con ellos se prepararon las placas de agar 1.5% con solución salina isotónica en las que se realizaron las pruebas de inmunodifusión mediante la técnica de Ouchterlony (1, 41, 42).

**Técnica de adsorción de aglutininas.**

Esta técnica se utilizó para eliminar las reacciones de aglutinación cruzada entre las cepas empleadas, y para ello se toman 5 ml del antígeno adsorbente concentrado, se centrifuga para obtener las células a las cuales se les añaden 5 ml del suero diluido 1:10, se incuba a 50°C durante 2 horas.

Después de la incubación se centrifuga y separa el sobrenadante que es el suero, esta operación se repite una vez más.

El suero adsorbido se prueba en contra de un antígeno homologó y la reacción de aglutinación será positiva, al ponerlo frente al antígeno con el cual presentaba reacción de aglutinación cruzada deberá

## 5. RESULTADOS

Tabla 5.1. Comparación de dos esquemas de inmunización

### Esquema 1 (Schmidt, Bankole y Bohlool, 1968)

Día	Tratamiento	Título de anticuerpos en el conejo No.		
		1	2	3
1	Inyectar 0.5 ml IV	0	0	0
2	Inyectar 1.0 ml IV	0	0	0
3	Inyectar 1.5 ml IV	0	0	0
4-6	Descansar			
7	Inyectar 1.5 ml IV	1:800	1:320	0
8	Inyectar 2.0 ml IV	1:800	1:800	1:320
9	Inyectar 2.0 ml IV y 2.0 ml SC	1:800	1:800	1:800
16	Sangría de prueba y determinación de título	1:1600	1:3200	1:800
18	Sangría de cosecha	1:3200	1:3200	1:3200
25	Inyectar 2.0 ml SC	1:3200	1:3200	1:3200
32	Sangría de cosecha	1:4000	1:8000	1:4000
39	Inyectar 2.0 ml SC	1:4000	1:8000	1:3200
48	Sangría de cosecha	1:4000	1:8000	1:4000

#### NOTA:

IV intravenosa

SC subcutánea

**Esquema 2 (Somasegaran, 1981)**

<b>Día</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Título de anticuerpos en el conejo No.</b>		
		<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>1</b>	<b>Inyectar SC 1 ml de emulsión de - partes iguales de antígeno y adyuvan te completo de Freund.</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>14</b>	<b>Inyectar 1 ml IV (sólo suspensión de cultivo)</b>	<b>1:1600</b>	<b>1:3200</b>	<b>1:1600</b>
<b>28</b>	<b>Sangría de prueba y determinación del título.</b>	<b>1:3200</b>	<b>1:3200</b>	<b>1:3200</b>
<b>30</b>	<b>Sangría de cosecha</b>	<b>1:3200</b>	<b>1:3200</b>	<b>1:4000</b>
<b>37</b>	<b>Inyectar 1.2 ml IV</b>	<b>1:3200</b>	<b>1:3200</b>	<b>1:4000</b>
<b>44</b>	<b>Sangría de cosecha</b>	<b>1:4000</b>	<b>1:3200</b>	<b>1:4000</b>

Tabla 5.2. Resultados de la tipificación serológica de tres cepas de Bradyrhizobium japonicum.

Sueros inmunes contra las cepas	C E P A S F O		
	9	17	18
FQ 9 conc.	+	+	+
1:10	+	-	+
1:50	+	-	+
1:100	+	-	+
1:150	+	-	+
1:200	+	-	+
1:250	-	-	-
FQ 17 conc.	+	+	+
1:10	-	+	-
1:50	-	+	-
1:100	-	+	-
1:150	-	+	-
1:200	-	-	-
1:250	-	-	-
FQ 18 conc.	+	+	+
1:10	+	-	+
1:50	+	-	+
1:100	+	-	+
1:150	+	-	+
1:200	-	-	-
1:250	-	-	-
9 ads.c/Ag. 18	-	-	-
18 ads.c/Ag. 9	-	-	-
9 ads.c/Ag. 17	+	-	+

NOTA: + Reacciones positivas usando el método de aglutinación en placa.

**Tabla 5.3. Tipificación serológica por aglutinación en placa de nódulos frescos y conservados por dos métodos.**

Nódulos procedentes de la inoculación con cepas individuales.

Suero inmune contra cepa FQ	N O D U L O S		Secos (70°C/48 hs)
	Frescos	Congelados	
9	++	++	+++
17	++	++	+++
18	++	++	+++

- ++ Bien: La aglutinación es clara aproximadamente a los tres minutos.
- +++ Excelente: La aglutinación es muy clara antes de los tres minutos.

**Tabla 5.4. Tipificación serológica por inmunodifusión de nódulos frescos y conservados por dos métodos.**

Nódulos procedentes de la inoculación con cepas individuales.

Suero inmune contra cepa FQ	N O D U L O S		
	Frescos	Congelados	Secos (70°C/48 hs)
9	++	+	-
17	++	+	-
18	++	+	-

- Bandas de precipitación perfectamente definidas pegadas al pozo del antígeno.
- ++ Bandas de precipitación perfectamente definidas a las 48 horas.
- No hay bandas de precipitación.

Tabla 5.5. Resultados del porcentaje de infección de tres cepas y sus mezclas de B. japonicum en nódulos de soya variedad Júpiter.

Tratamiento	Fracción radicalar	Suero inmune vs cepas PQ			Infección múltiple			
		9	17	18	9+17	17+18	9+18	9+17+18
1 FQ 9	a	100	-	*	-	-	-	-
	b	100	-	*	-	-	-	-
	c	100	-	*	-	-	-	-
2 FQ 17	a	-	100	-	-	-	-	-
	b	-	100	-	-	-	-	-
	c	-	100	-	-	-	-	-
3 FQ 18	a	*	-	100	-	-	-	-
	b	*	-	100*	-	-	-	-
	c	*	-	100*	-	-	-	-
4 FQ (9+17)	a	16.6	76.6	*	6.6	-	-	-
	b	26.6	73.6	*	-	-	-	-
	c	47.68	52.31	*	-	-	-	-
5 FQ (9+18)	a	100	-	*	-	-	-	-
	b	100	-	*	-	-	-	-
	c	100	-	*	-	-	-	-
6 FQ (17+18)	a	*	56.6	30.0	-	13.3	-	-
	b	*	46.6	50.0 *	-	3.3	-	-
	c	*	28.14	65.18	-	6.6	-	-
7 FQ (9+17+18)	a	*	36.6	23.3	-	-	-	20.0
	b	*	36.6	43.3	-	-	-	20.0
	c	*	11.2	46.6	-	-	-	22.2

\* Inmunológicamente iguales.

NOTA: Este es el porcentaje de las tres repeticiones.



Table 3.6. Respuesta de la soya (Glycine max (L) Merril) variedad Júpiter a la inoculación de tres cepas de B. japonicum (promedio de tres repeticiones).

Tratamiento	Peso seco de parte aérea (g) **	Peso seco de nódulos (mg)	% de nódulos infectados por las cepas FQ:			
			9	17	18	Infección múltiple
6 FQ (17+18)	12.12 a	896.6	* 43.78	* 48.32	7.73	
2 FQ (17)	9.64 ab	904.5	- 100.0	-	-	
5 FQ (9+18)	9.57 abc	898.5	100*	-	*	-
3 FQ 18	7.95 abcd	554.5	*	-	100*	-
4 FQ (9+17)	7.89 abcde	657.8	50.29	57.40	*	2.2
7 FQ (9+17+18)	5.81 def	629.1	* 34.8	34.4*	20.73	
1 FQ (9)	2.92 g	618.4	100	-	*	-

\* Inmunológicamente iguales.

\*\* Los que comparten una letra son significativamente iguales entre sí al nivel 5%.

### NOMENCLATURA

$T_t$	Total de tratamientos
$X_t$	Media de tratamientos
$X$	Media principal
GL	Grados de libertad
SC	Suma de cuadrados
CM	Cuadrado medio
F	Valor de F requerido para la significación estadística
p	Posición relativa en la ordenación
R	Valor de R al nivel de 0.05
$DM_n$	Diferencia significativa mínima

Todos los resultados informados son la media aritmética de dos plantas por unidad experimental.

Tabla 5.7. Resultado del peso seco de nódulos (fracción  $\underline{a}$ ) en miligramos.

Tratamientos	Repeticiones				
	A	B	C	$T_c$	$X_c$
1 (FQ 9)	503.5	427.2	547.5	1478.2	4.92.7
2 (FQ 17)	725.6	436.6	630.5	1792.7	597.5
3 (FQ 18)	473.9	542.0	367.2	13.78.6	459.5
4 FQ (9+17)	564.5	298.7	612.6	1475.8	491.9
5 FQ (9+18)	608.5	327.7	1073.5	2009.7	669.9
6 FQ (17+18)	723.7	710.0	827.3	2261.0	753.6
7 FQ (9+17+18)	397.1	310.5	435.5	1143.1	381.0

Total principal 11539.1

media principal 549.4

Análisis de varianza

Punto de variación	GL	SC	CM	Fobs.	Freq. 1%
Total	20	0.7290			
Tratamientos	6	0.3045	0.0507	1.6736	4.46
Error	14	0.4245	0.0303		

No se encuentran diferencias significativas.

Tabla 5.8. Resultado de peso seco de nódulos (fracción b) en miligramos.

Repeticiones.

Tratamiento	A	B	C	T <sub>t</sub>	X <sub>t</sub>
1 (FQ 9)	51.6	163.7	125.6	340.9	113.6
2 (FQ 17)	292.6	185.8	393.1	871.5	290.5
3 (FQ 18)	11.8	68.7	162.3	242.8	80.9
4 FQ (9+17)	123.9	130.5	205.5	459.9	153.3
5 FQ (9+18)	178.6	200.5	262.6	641.7	213.9
6 FQ (17+18)	87.3	194.4	107.3	389.0	129.6
7 FQ (9+17+18)	99.8	62.4	107.1	269.3	89.7
Total principal	3215.1	Media principal 153.1			

Análisis de varianza

Fuente de variación	GL	SC	CM	Fobs.	Freq. 1%
Total	20	0.1567			
Tratamientos	6	0.0167	0.0169	4.3082	4.46
Error	14	0.0550	0.0039		

No se encuentran diferencias significativas.

Tabla 5.9. Resultado de peso seco de nódulos (fracción c) en mi ligramos.

Tratamientos	Repeticiones			$T_t$	$X_t$
	A	B	C		
1 (FQ 9)	-	38.1	-	38.1	12.7
2 (FQ 17)	22.7	19.7	7.2	49.6	16.5
3 (FQ 18)	-	12.7	29.8	42.5	14.1
4 FQ (9+17)	7.1	12.0	18.8	37.9	12.6
5 FQ (9+18)	16.1	16.5	11.8	44.4	14.8
6 FQ (17+18)	10.1	7.5	22.6	40.2	13.4
7 FQ (9+17+18)	14.7	435.5	25.2	475.4	158.4
Total principal	728.1				
				Media principal	34.67

Análisis de varianza

Fuente de variación	GL	SC	CM	Fobs	Freq. 1%
Total	20	0.1706			
Tratamientos	6	0.0536	8.94	1.07	4.46
Error	14	0.1169	8.35		

No se encuentran diferencias significativas.

**5.10. Resultado de peso seco de nódulos (fracciones a, b, c,) en miligramos.**

**Tratamiento 1:**

Fracción	Repeticiones				
	A	B	C	T <sub>c</sub>	X <sub>c</sub>
a	503.5	427.2	566.5	1497.2	499.0
b	51.6	163.7	125.6	340.9	113.6
c	-	38.1	-	38.1	12.7
<b>Total principal 1876.2</b>			<b>Media principal 208.4</b>		

**Análisis de varianza**

Fuente de variación	GL	SC	CM	Fobs	Freq. 1%
Total	8	0.4124			
Tratamiento	2	0.3952	0.1976	68.9	10.9
Error	6	0.0172	0.0028		

**Prueba de comparación múltiple de Duncan**

**Diferencia significativa mínima = 3.3825**

p	2	3	4
R	1.00	1.03	1.05
DM <sub>α</sub>	3.38	3.48	3.55

**Ordenación de las medias de las fracciones en forma ascendente.**

c	b	a
12.7	113.6	499.0

**Comparación de las diferencias de las medias de las fracciones.**

c            b            a

Tabla 5.11. Resultado de peso seco de nódulos (fracciones a,b,c) en miligramos.

Tratamiento 2:

Fracción	Repeticiones			$T_t$	$X_t$
	A	B	C		
a	725.6	436.6	630.5	1792.7	597.5
b	292.6	185.8	393.1	871.5	290.5
c	22.7	19.7	7.2	49.6	16.5
Total principal 2713.8			Media principal 301.5		

Análisis de varianza

Fuente de variación	GL	SC	CM	Fobs.	Freq. 1)
Total	8	0.5719			
Tratamientos	2	0.5064	0.2534	23.39	10.91
Error	6	0.0650	0.1083		

Prueba de comparación múltiple de Duncan

Diferencia significativa mínima = 0.2079

p	2	3	4
R	1.00	1.03	1.05
$DSM_n$	0.2079	0.2141	0.2182

Ordenación de las medias de las fracciones en forma ascendente.

c	b	a
16.5	290.5	597.5

Comparación de las diferencias de las fracciones

c      b      a

Tabla 5.12. Resultado de peso seco de nódulos (fracciones a,b,c) en miligramos.

Tratamiento 3:

Fracción	Repeticiones			$T_t$	$X_t$
	A	B	C		
a	473.9	542.0	362.7	1378.6	459.5
b	11.9	68.7	162.3	242.9	80.9
c	-	12.7	29.8	42.5	14.1
Total principal 1663.9			Media principal 184.8		

Análisis de varianza

Fuente de variación	GL	SC	CM	Fobs.	Freq. 1%
Total	8	0.3745			
Tratamientos	2	0.3461	0.1737	36.58	10.9
Error	6	0.0283	4.73		

Comparación múltiple de Duncan

Diferencia significativa mínima = 4.3452.

p	2	3	4
R	1.00	1.03	1.05
$DSM_n$	4.3456	4.4756	4.5625

Ordenación de las medias de las fracciones en forma ascendente.

c	b	a
14.1	80.9	459.5

Comparación de las diferencias de las medias de las fracciones.

c	b	a



Tabla 5.13. Resultado de peso seco de nódulos (fracciones a,b,c) en miligramos.

Tratamiento 4:

Fracción	Repeticiones			$T_c$	$X_c$
	A	B	C <sup>#</sup>		
a	564.5	298.7	612.9	1475.8	491.9
b	125.9	150.5	205.5	459.9	153.3
c	7.1	12.0	18.8	37.9	12.6
Total principal 1973.6			Media principal 219.2		

Análisis de varianza

Fuente de variación	GL	SC	CN <sup>†</sup>	Fobs	Frog. 1%
Total	8	0.4255			
Tratamientos	2	0.3641	0.1820	17.8	10.9
Error	6	0.0613	0.0102		

Prueba de comparación múltiple de Duncan

Diferencia significativa mínima = 0.2019

P	2	3	4
R	1.00	1.03	1.05
DM <sub>α</sub>	0.2019	0.2080	0.2120

Ordenación de las medias de las fracciones en forma ascendente

c	b	a
12.6	153.3	491.9

Comparación de las diferencias de las medias de las fracciones

c	b	a
---	---	---

Tabla 5.14. Resultado de peso seco de nódulos (fracciones a, b, c) en miligramos.

Tratamiento 5:

Fracción	Repeticiones			$T_c$	$X_c$
	A	B	C		
a	600.5	527.7	1073.5	2009.7	699.9
b	178.6	250.5	262.6	691.6	230.5
c	16.1	16.5	11.8	44.4	14.8
Total principal		2745.7	Media principal		305.0

Análisis de varianza

Fuente de variación	GL	SC	CM	Fobs	Freq. 1%
Total	8	0.9566			
Tratamientos	2	0.6687	0.3343	6.96	10.92
Error	6	0.2878	0.0479		

Prueba de comparación múltiple de Duncan

Diferencia significativa mínima = 0.4379

p	2	3	4
R	1.00	1.03	1.05
$DM_{\alpha}$	0.4376	0.4509	0.4594

Ordenación de las medias de las fracciones en forma ascendente.

c	b	a
14.8	230.5	669.8

Comparación de las diferencias de las medias de las fracciones.

c	b	a
---	---	---

Tabla 5.15. Resultado de peso seco de nódulos (fracciones a,b, c) en miligramos.

Tratamiento 6:

Fracción	Repeticiones			$T_t$	$X_t$
	A	B	C		
a	723.7	710.0	827.3	2261.0	753.6
b	87.3	194.4	107.3	389.0	129.6
c	10.1	7.5	22.6	40.2	13.4
Total principal 2690.0			Media principal 298.9		

Análisis de varianza

Fuente de variación	GL	SC	CM	Fobs	Freq. 1%
Total	8	0.96			
Tratamientos	2	0.95	0.47	192.1	10.92
Error	6	0.0148	0.0024		

Prueba de comparación múltiple de Duncan

Diferencia significativa mínima = 3.1425.

P	2	3	4
R	1.00	1.03	1.05
$DM_{\alpha}$	3.1424	3.2366	3.2995

Ordenación de las medias de las fracciones en forma ascendente.

c	b	a
13.4	129.6	753.6

Comparación de las diferencias de las medias de las fracciones.

c	b	a
---	---	---

Tabla 5.16. Resultado de peso seco de módulos (fracciones a,b, c) en miligramos.

Tratamiento 7:

Fracción	Repeticiones			$T_c$	$X_c$
	A	B	C		
a	397.1	310.5	435.5	1143.1	381.0
b	99.8	62.4	107.1	269.3	89.7
c	14.7	435.5	25.2	475.4	158.4
Total principal 1887.8			Media principal 209.7		

Análisis de varianza

Fuente de variación	GL	SC	CM	Fobs	Freq. 11
Total	8	0.2636			
Tratamientos	2	0.139	0.0695	3.35	10.92
Error	6	0.1214	0.0207		

No hay diferencias significativas estadísticamente.

Tabla 5.17. Resultado del peso seco de la parte aérea en gramos.

Repeticiones					
Tratamiento	A	B	C	T <sub>t</sub>	X <sub>t</sub>
1 (FQ 9)	2.52	2.72	3.52	8.76	2.92
2 (FQ 17)	11.19	7.37	10.37	28.93	9.64
3 (FQ 18)	6.84	9.51	7.50	23.85	7.95
4 FQ (9+17)	8.84	6.41	8.43	23.68	7.89
5 FQ (9+18)	8.80	7.59	12.33	28.72	9.57
6 FQ (17+18)	12.81	10.20	13.36	36.37	12.12
7 FQ (9+17+18)	5.44	3.59	8.42	17.45	5.81
8 T(+)	4.32	2.94	6.0	13.26	4.42
9 T(-)	1.01	1.92	2.62	5.55	1.85

Análisis de varianza

Fuente de variación	GL	SC	CM	Fobs	Freq. 1%
Total	26	323.74			
Tratamientos	8	278.13	34.7	13.7	3.71
Error	18	45.6	2.5		

Comparación múltiple de Duncan

Diferencia significativa mínima = 2.73

p	2	3	4	5	6	7	8	9	10
R	1.00	1.05	1.08	1.10	1.12	1.13	1.13	1.14	1.15
DM <sub>1</sub>	2.73	2.86	2.94	3.00	3.05	3.08	3.08	3.11	3.14



## 6. DISCUSION DE RESULTADOS

### 6.1. Comparación de los dos esquemas de inmunización.

Ciertos autores indican que la respuesta inmunológica depende de varios factores entre los que se cuentan vía de inoculación, dosis y frecuencia de dosis, animal inoculado, inmunógeno utilizado, entre otros, inclusive se reportan variaciones en -- animales de la misma especie y sometidos a las mismas condiciones de experimentación (15, 47). En la tabla 5.1 puede observarse que no hubo diferencias en los títulos de anticuerpos, por lo que se eligió el esquema de inmunización 2, basándose en que éste es menos drástico para los animales.

### 6.2. Resultado de la tipificación serológica de tres cepas de B. japonicum.

Vincent citado en 31, reporta que dos cepas de B. trifolii -- serológicamente idénticas, mostraron diferencias notables en -- cuanto a la habilidad de la fijación biológica de nitrógeno. Casos similares fueron observados por Kleczkowski & Thornton (28). En la tabla 5.2 se observa la similitud antigénica que existe -- entre las cepas FQ 9 y FQ 18, que más tarde fue corroborada con la inmunodifusión al presentarse bandas de identidad y llegando -- se a la conclusión de que son cepas iguales antigénicamente pero no fisiológicamente como lo demuestra el peso seco de parte aérea de las plantas inoculadas con estas cepas.

La cepa FQ 17 comparte una proporción menor de determinantes antigénicos con la cepa FQ 9 y por lo tanto con la cepa FQ

18, ya que al hacer diluciones del suero inmune contra la cepa FQ 17, en la dilución 1:10 se eliminó la reacción cruzada.

Al hacer las adsorciones de los sueros inmunes para eliminar las reacciones cruzadas se ratificó la igualdad antigénica entre las cepas FQ 9 y FQ 18 dándonos títulos cero al hacerlos reaccionar con las cepas respectivas.

### 6.3. Tipificación serológica de nódulos.

En el caso de nódulos frescos, conservados por congelación y secos a 70°C, presentan una buena aglutinación observándose mejores resultados con los nódulos secos a 70°C durante 48 horas (42) tabla 5.3.

En la tabla 5.4 se observa que los bacteroides de nódulos frescos dan lugar a bandas de precipitación perfectamente definidas a las 48 horas, mientras que con los bacteroides de nódulos congelados estas bandas se forman en el pozo del antígeno y no se presentan con los bacteroides de nódulos secos a 70°C durante 48 horas (42).

### 6.4. Competitividad de las cepas

En la tabla 5.5 se observa que en los tratamientos inoculados con las cepas individuales, se detectó, como era de esperarse el 100% de los nódulos formados por la cepa introducida, lo que permitió comprobar la especificidad de la cepa y el manejo del experimento ya que no se detectaron infecciones cruzadas.

Los resultados de las inoculaciones mixtas indican que to



das las cepas son competitivas, observándose que las tres se encontraron en porcentajes elevados sin registrarse un desplazamiento absoluto de alguna de ellas como lo reportan otros autores, los que al emplear inoculantes múltiples encontraron del 92 al 98% de los nódulos infectados por una de las cepas empleadas (44).

Sin embargo, se observa que la cepa FQ 17 es la responsable de la infección temprana, ya que predominó en la sección a de las diferentes fracciones radiculares estudiadas.

Este aspecto es de gran interés, porque existen reportes de que este tipo de cepas al establecer la infección temprana desplazan a la flora nativa del suelo, la que frecuentemente es inefectiva en la fijación de nitrógeno.

En los tratamientos 5 y 7 se observa claramente el fenómeno de infección múltiple ya que en un mismo nódulo se detectó más de una cepa.

#### 6.5. Evaluación de la eficiencia de la simbiosis.

Los resultados del peso seco de la masa nodular indican que las cepas introducidas individualmente o en mezclas indujeron una buena nodulación, los pesos fluctuaron entre 554.5 y 904.5 mg por maceta (ver tabla 5.6) y en el análisis estadístico no se registraron diferencias significativas, lo que confirma la alta infectividad de todas las cepas estudiadas (ver tablas 5.7 a 5.16).

Vidor en 1979 (44), reporta como nodulación adecuada masas nodulares de 810 a 1280 mg por maceta. En relación a la efecti-

vidad en la fijación de nitrógeno por la simbiosis, ésta no fue buena en el tratamiento 1 (FQ 9) ya que se tradujo en un rendimiento en peso seco de la parte aérea que no difiere significativamente del testigo absoluto. En tanto que las cepas FQ 17 y FQ 18 fijaron efectivamente el nitrógeno cuando se inocularon solas o mezcladas con algunas de las otras dos cepas probadas. Observiéndose en la mezcla triple un descenso en la eficiencia de la simbiosis (tabla 5.6). La significancia estadística de las diferencias entre los tratamientos se observa en la tabla 5.17.

Los resultados de las cepas FQ 17 y FQ 18 concuerdan con reportes previos, en tanto que la cepa FQ 9 se comportó atípicamente (S, Mesa y Hernández no publicados).

En los tratamientos 2 y 4 hay una relación entre el porcentaje de la infección de cada una de las cepas y la efectividad de la simbiosis, observándose que cuando se inoculó la mezcla FQ - (9+17) hubo una menor efectividad en la fijación de nitrógeno y por lo tanto menor peso seco de la parte aérea respecto al tratamiento 2 FQ 17, esto puede deberse a que la cepa FQ 9 que formó una tercera parte de los módulos, es menos efectiva.

## 7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

I. Los dos esquemas de inmunización probados resultaron -- eficientes, recomendándose la utilización del esquema 2 por ser menos drástico para los animales de laboratorio.

II. Las tres cepas probadas presentan reacciones de aglutinación cruzada, siendo más marcadas entre las cepas FQ 9 y FQ 18, las que mostraron reacción de identidad en la prueba de inmunodifusión.

Es necesario hacer notar que las cepas se seleccionaron -- con base en su eficiencia en la fijación de nitrógeno en estudios realizados en el laboratorio de Microbiología Experimental, Facultad de Química, UNAM, en donde se recibieron de diferentes colecciones y con diferentes claves, y en 1985 como respuesta -- a las sugerencias dadas en reuniones internacionales sobre fijación biológica de nitrógeno, referente a unificar las claves empleadas en los diferentes ceparios, apareció una publicación en la que se detectó que las cepas FQ 9 y FQ 18 tienen el mismo -- origen.

III. Las reacciones de aglutinación son más claras con los antígenos procedentes de módulos conservados por desecación, en tanto que en estas muestras no se observan reacciones de precipitación.

IV. Se comprobó la utilidad del método de conservación de módulos por desecación, que permite que las muestras conserven sus características antigénicas por períodos prolongados de -- tiempo.

Esto es de particular interés si se considera la gran cantidad de nódulos por tipificar que se generan en experimentos agrícolas, al poco espacio que se ocupa para su almacenamiento, la posibilidad de ser enviados a otras localidades para su tipificación cuando no se cuenta con los medios para realizar este tipo de determinaciones.

V. No se logró cabalmente el objetivo de este trabajo, ya que al resultar serológicamente iguales dos de las cepas estudiadas, no se pudieron diferenciar dentro de los nódulos.

VI. Se recomienda incluir un mayor número de sueros inmunes para la tipificación de las cepas que ofrezca una gama más amplia de diferencias.

VII. Estos resultados preliminares indican que la cepa FQ 17 es más competitiva que las otras dos cepas.

VIII. De las cepas FQ 17 y FQ 18 se corroboró la eficiencia en la fijación de nitrógeno y en la cepa FQ 9 se detectó la pérdida de esta característica.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Acosta, S.M. 1972. Manual de Inmunología General. Facultad de Química, UNAM.
- 2.- Amarger, N. (1981). Competition for nodule formation between effective and ineffective strains of Rhizobium meliloti. Soil Biol. Biochem. 13:475-480.
- 3.- Amarger, N. (1981). Selection of Rhizobium strains on their competitive ability for nodulation. Soil Biol. Biochem. -- 13:481-486.
- 4.- Balatti, A. & Mazza, A. L. (1978). Producción de inoculantes para leguminosas. Rev. Lat. Amer. Microbiol. 20:87-93.
- 5.- Barrios, L.M.T. & Tsusuki, R.M.G. (1980). Selección de cepas efectivas de Rhizobium japonicum para frijol soya variedad "Júpiter". Tesis profesional, Facultad de Química, UNAM.
- 6.- Brockwell, J.E., Schwinghamir, A. & Gault, R.R. (1979). Ecological studies of root-nodule bacteria introduced into field environments. V. a critical examination of the stability on antigenic and streptomycin-resistance markers for - - identification of strains of Rhizobium trifolii. Soil Biol. Biochem. 9:19-24.
- 7.- Burton, C.J. (1979). Rhizobium species. Microbiol Technology. 1:28-57, Academic press. New York, USA.
- 8.- Bushby, H.V. & Marshall, K.C. (1977). Some factors affecting the survival of root-nodule on desiccation. Soil Biol. - - Biochem. 9:143-147.
- 9.- Casadeus, J. & Olivares, J. (1978). Genética de Rhizobium y de la fijación de nitrógeno. An. de Edafología y Agrobiología. Tomo XXXVII No. 9-10. Madrid, España.

- 10.- Cigales, R.N.R. & Cleyet-Marel, J.C. (1985). Aportación de dos técnicas inmunoquímicas al estudio de la ecología de Rhizobium phaseoli en: resúmenes de la Tercera Reunión sobre Fijación Biológica de Nitrógeno. Ed. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología Facultad de Química, UNAM, Colegio de postgraduados Chapingo, Universidad Autónoma de Chapingo, Fertilizantes Mexicanos, S. A. pág. 19.
- 11.- Date, R.A. & Morris, D.A. (1965). Minimal antigenic constitution of 28 strains of Rhizobium japonicum. Canadian Journal of Microbiology. 2:1-8.
- 12.- Date, R.A. (1969). A decade of legume inoculant quality control in Australia. The Journal of the Australian Institute of Agricultural Science. March. pág. 27-37.
- 13.- Diatloff, A. (1977). Ecological studies of root-nodule bacteria introduced into field environments-6. Antigenic and symbiotic stability in Lotoninos rhizobia over a 12 year period. Soil Biol. Biochem. 9:85-88.
- 14.- Dudman, W.F. (1972). Serological methods and their application to dinitrogen-fixing organism., in: primer of serology, -- Chapter 13 pág. 487-509.
- 15.- Dudman, W.F. (1970). Summary of immunization procedures -- used in preparation of antisera to Rhizobium strains. Division of Plant Industry, CSIRO, Canberra, Australia.
- 16.- Elkan, H.G. (1971). Biochemical and genetical aspect of the taxonomy of Rhizobium japonicum. Plant and Soil. Vol. especial: 35-104.
- 17.- Elkan, H.G. (1984). Taxonomy and metabolism of Rhizobium in: Biological Nitrogen Fixation. Edited by Alexander Martin. Plenum press New York and London. pág. 1-37.
- 18.- Guzmán, M.E. (1984). Conferencia, Curso sobre tecnología

de Rhizobium y producción de inoculantes (no publicado), Nitragin de México, S. A.

- 19.- Hallsworth, E.G. (1958). Nutrition of the legumes. Plant and Soil XX, No. 3, pág. 381-396.
- 20.- Herbert, W.F., Means, M. & Weber, C.R. (1965). Competition for nodule sites between strains of Rhizobium japonicum - applied as inoculum and strains in the soil. Agronomy - Journal 57(2): 179-185.
- 21.- Hubbel, D.H. & Thornton, G.D. (1981). Legume inoculation in Florida. Institute of Food and Agricultural Science. Universidad of Florida Gainesville, USA.
- 22.- Hubbel, D.H. (1976). Una revisión de la infección de las leguminosas por Rhizobium. VIII Conferencia Latinoamericana de Rhizobiología, Cali, Colombia.
- 23.- Humphrey, B. & Vincent, J.M. (1973). Differential antibody response to the somatic antigenic determinants of Rhizobium trifolii. Microbios 7:87-93.
- 24.- Jordan, C.D. (1984). Family III. RHIZOBIACEAE Conn 1938, 321<sup>AL</sup>. in: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. -- Vol. I. Editor: Krieg, N.R. & Holt, J.G. Baltimore, USA. - pág. 234-244.
- 25.- Josey, D.P. & Beynon, J.L. (1979). Strains identification in Rhizobium using intrinsic antibiotic resistance. Journal of Applied Bacteriology. 46:343-350.
- 26.- Kingsley, M.T. & Bohlool, B.B. (1980). Release of Rhizobium spp. from tropical soils and recovery for immunofluorescence enumeration. Applied and Environmental Microbiology. Vol.42 (2):241-248.
- 27.- Kishinevsky, B. & Gurfel, D. (1980). Evaluation of Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), for serological identi

- fication of different Rhizobium strains. Journal of - - Applied Bacteriology 49:517-526.
- 28.- Kleczkowski, A. & Thornton, H.G. (1944). A serological study of root-nodule bacteria from pea and clover inoculation -- groups. J. Bacteriol. 48:661-672.
- 29.- Koonts, P.F. & Feber, E.J. (1961). Somatic antigens of - - Rhizobium japonicum. Soil Science 91:228-233.
- 30.- Little, M.T. & Hills, F.J. (1976). Métodos estadísticos para la investigación en la agricultura, Editorial Trillas, México.
- 31.- Materon, L.A. & Hagerdon, C. (1983). Competitiveness and symbiotic effectiveness of five strains of Rhizobium - - trifolii on red clover. Soil Sci. Soc. Am. J. Vol. 47:491-495.
- 32.- Morley, S.G. & Jones, G.D. (1980). A note on a highly - - sensitive modified ELISA technique for Rhizobium strains identification. Journal of Applied Bacteriology. 49:103-109.
- 33.- Nambiar, P.T.C. & Anjalah, H. (1985). Enumeration of rhizobia by Enzyme-Linked immunosorbent assay. J. of Applied Bact. 58:187-193.
- 34.- Norris, D.O. & Date, A.R. (1976). Legume bacteriology in tropical pasture Research principles and methods. Ed. - - Shaw, H.N. and Bryen, W.W., England. Commonwealth Bureau of pastures and Field Crops, Bulletin 51, pág. 134-174.
- 35.- Renwick, A. & Jones, G.D. (1985). A comparison of the - - fluorescent ELISA and antibiotic resistance identification techniques for use in ecological experiments with Rhizobium trifolii. Journal of Applied Bacteriology. 58:199-206.
- 36.- Rodriguez, P.J.R. & Vidor, C. (1980). Selecao de estirpes de Rhizobium japonicum e competitividade por sitios de



- infecção nodular em cultivares de soja (Glycine max (L) -- Merrill). Agronomia Sulriogranda, Porto Alegre. 16(2):205-219.
- 37.- Rodrigues, P.J.R. & Vidor, C. (1981). Seleção entre concentração de células no inoculante a competição por sítios de - - infecção nodular entre estirpes de Rhizobium japonicum em soja. R. Bras. CI. Solo. 4:139-145.
- 38.- SAG. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. (1976). Júpiter variedad de soja para el sur de Tamaulipas. Folleto No. 62. Agosto.
- 39.- SAG. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. (1975). Folleto de divulgación No. 40 (reimpresión) agosto.
- 40.- Skrdleta, V. (1965). Somatic sero-groups of Rhizobium japonicum. Plant and Soil. 23:43-47.
- 41.- Somasegaran, P. & Halliday, J. (1981). Ejercicios prácticos de Tecnología de Rhizobium Leguminosa. Colegio de postgraduados de Chapingo, México.
- 42.- Somasegaran, P., Woolfenden, R. & Halliday, J. (1983). - - Suitability of oven-dried root nodules for Rhizobium strains identification by immunofluorescence and agglutination. Journal of Applied Bacteriology. 55:253-261.
- 43.- Tchan, Y.T. (1982). Application of some newer serological techniques in: Nitrogen Fixation in Legumes. Edited by - - Vincent, J.M. Academic press pág. 27-32.
- 44.- Vidor C., Brose, E. & Pereira, S.J. (1979). Competição por sítios de infecção nodular entre estirpes de Rhizobium japonicum em cultivos de soja (Glycine max (L) Merrill). Agronomia Sulriogranda Porto Alegre. 15(2): 227-238.
- 45.- Vidor, C. & Miller, R.H. (1984). Efficiency of the quantitative fluorescent antibody technique (FA) for ecological studies of Rhizobium japonicum. Department of Agronomy, the Ohio State University.

- 46.- Vincent, J.M. (1970). A manual for the practical study of the root nodule bacteria. IBP Handbook 15. Blackwell Scientific Publications.
- 47.- Vincent, J.M. (1982). The basic serology of rhizobia, in: Nitrogen Fixation in Legumes. Edited by Vincent, J.M. Academic Press. pág. 12-23.
- 48.- Wolf, W.F. (1978). Proteínas comestibles de la soya y sus usos, en: Asociación Americana de la Soya. pág. 1-11.

9. APENDICE

APENDICE 9.1

ELMA + RC. EXTRACTO LEVADURA MANITOL AGAR ROJO CONGO	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	0.2 g
NaCl .....	0.1 g
Manitol .....	10.0 g
Ext. de levadura .....	0.4 g
Agar .....	15.0 g
Rojo congo 1:400 .....	10.0 ml
Agua destilada .....	1000.0 ml
pH .....	7.0

APENDICE 9.1.1.

ROJO CONGO	
Rojo congo .....	1.0 g
Agua destilada .....	400.0 ml

APENDICE 9.1.2.

AZUL DE BROMOTIMOL	
Azul de bromotimol .....	1.0 g
Etanol .....	50.0 ml
Agua destilada .....	50.0 ml

APENDICE 9.2

CELM. CALDO EXTRACTO LEVADURA MANITOL		
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-----	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	-----	0.2 g
NaCl	-----	0.1 g
Manitol	-----	10.0 g
Extracto de levadura	-----	0.4 g
Agua destilada	-----	1000.0 ml
pH	-----	7.0

APENDICE 9.3

CLORURO DE MERCURIO ACIDULADO		
HgCl <sub>2</sub>	-----	1.0 g
HCl al 36%	-----	5.0 ml
Agua destilada	-----	100.0 ml

APENDICE 9.4

SOLUCION SALINA ISOTONICA		
NaCl	-----	8.5 g
Agua destilada	-----	1000.0 ml

APENDICES 9.5 y 9.5.1.

SOLUCION NUTRITIVA DE JENSEN		
CaHPO <sub>4</sub>	-----	1.0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-----	0.2 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	-----	0.2 g
NaCl	-----	0.2 g
FeCl <sub>3</sub>	-----	0.1 g
Agua destilada		1000.0 ml
Micronutrientes	-----	1.0 ml/l
pH	-----	5.6 a 7.0

NICRONUTRIENTES

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	-----	0.05 g
MnSO <sub>4</sub>	-----	0.05 g
ZnSO <sub>4</sub>	-----	0.005g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	-----	0.005g
CuSO <sub>4</sub>	-----	0.002g

APENDICE 9.6

ESCALA DE McFARLAND			
TUBO No.	Sol. Acuosa $H_2SO_4$ 1%	Sol. Acuosa $BaCl_2$ 1%	No. de bact. $10^6/ml$ (aprox.)
1	9.9 <sup>ml</sup>	0.1 <sup>ml</sup>	300
2	9.8	0.2	600
3	9.7	0.3	900
4	9.6	0.4	1200
5	9.5	0.5	1500
6	9.4	0.6	1800
7	9.3	0.7	2100
8	9.2	0.8	2400
9	9.1	0.9	2700
10	9.0	1.0	3000

APENDICE 9.7

**SOLUCIONES PARA LA COLORACION DE GRAM**

**SOLUCION A (cristal violeta)**

Cristal violeta	-----	10.0 g
Oxalato de amonio	-----	4.0 "
Alcohol absoluto	-----	100.0 ml
Agua destilada	-----	400.0 ml

**SOLUCION B (Iugol)**

Yodo	-----	1.0 g
Yoduro de potasio	-----	2.0 g
Alcohol absoluto	-----	25.0 ml
Agua destilada	-----	100.0 ml

**SOLUCION C (Alcohol yodado)**

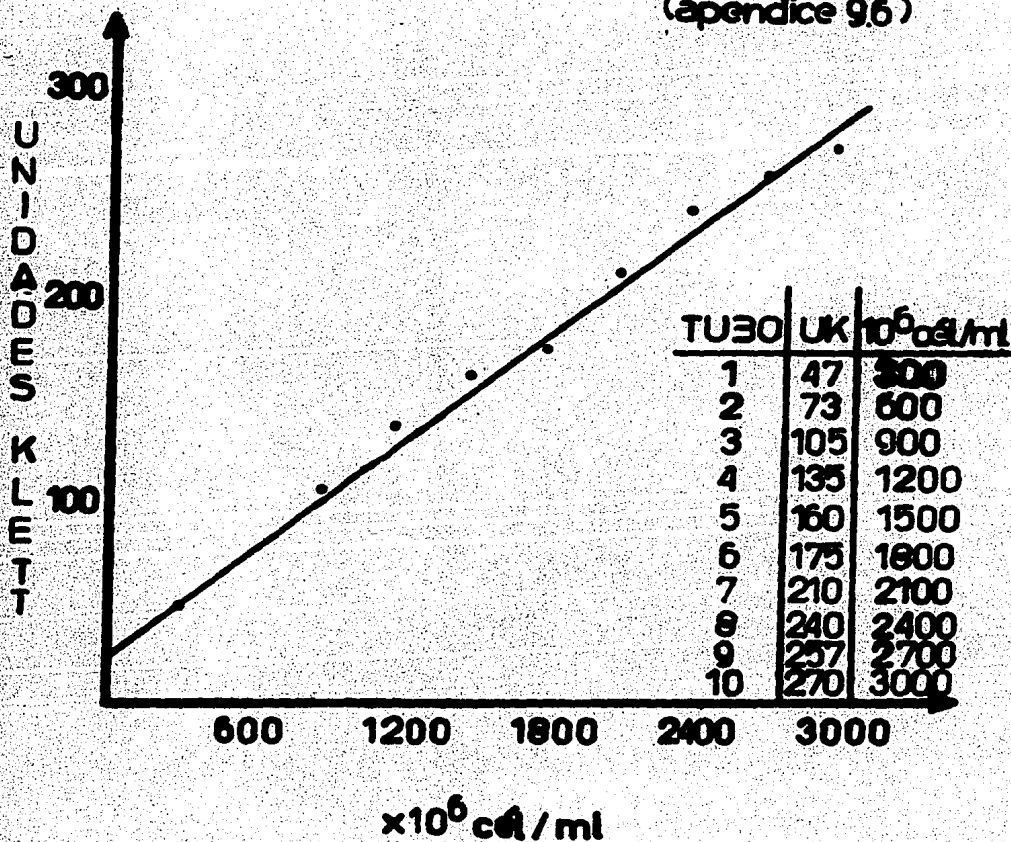
Solución de yodo (B)	-----	5.0 ml
Alcohol absoluto	-----	95.0 ml

**SOLUCION D (safranina)**

Safranina	-----	2.5 g
Etnanol	-----	10.0 ml
Agua destilada	-----	100.0 ml

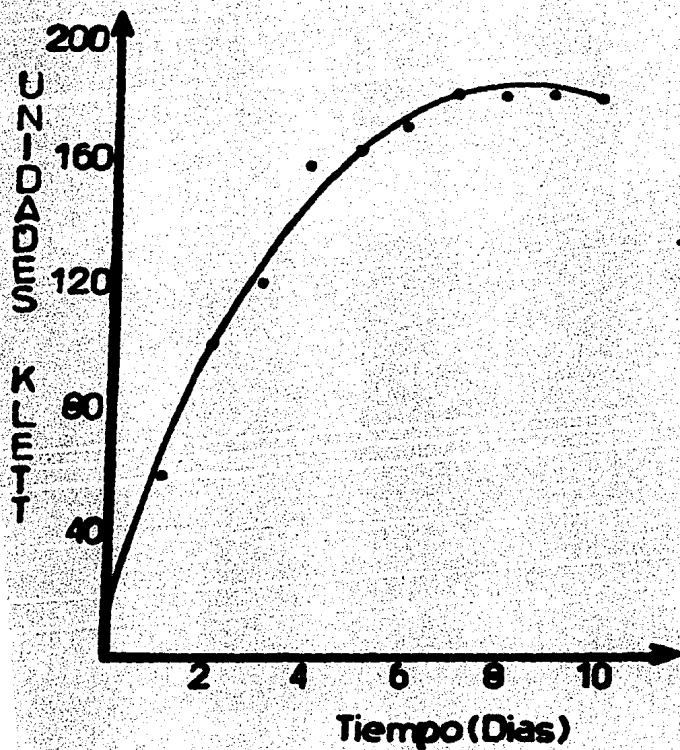
# CURVA DE CRECIMIENTO:

Mc FARLAN  
(apendice 96)



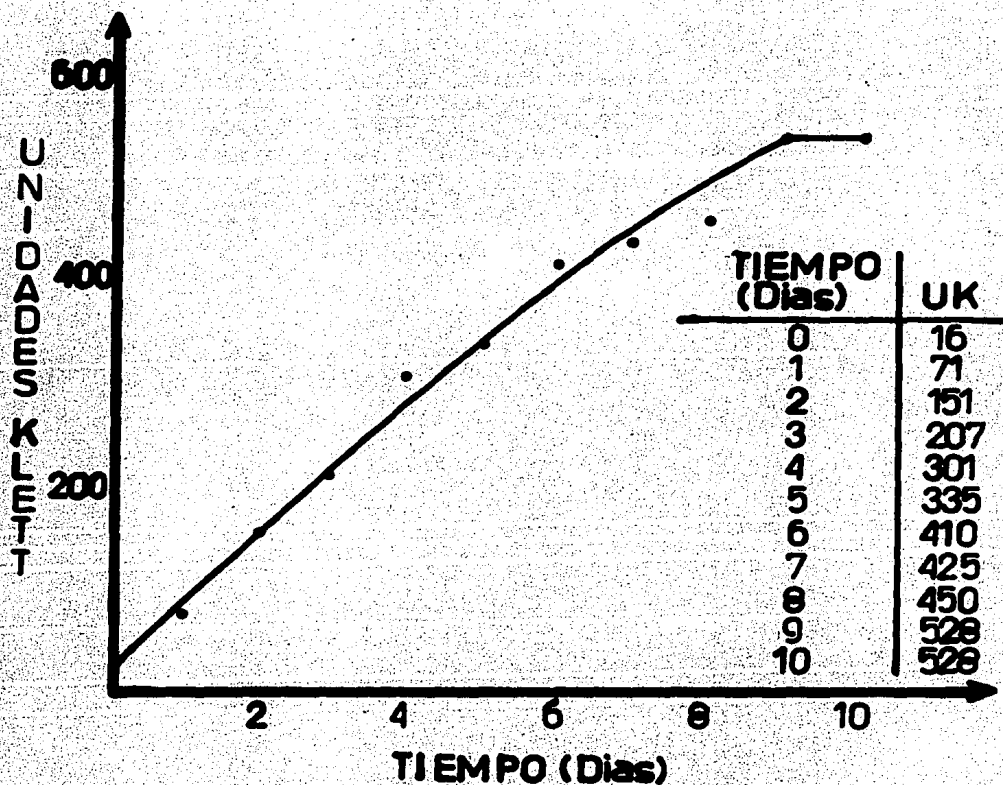


**CURVA DE CRECIMIENTO: Cepa FQ 9  
MEDIO CELM (28°C 200rpm)**



T(Dias)	UK
0	10
1	59
2	101
3	120
4	158
5	165
6	172
7	182
8	180
9	191
10	190

**CURVA DE CRECIMIENTO: CEPA FQ 17**  
**MEDIO CELM (26°C, 200rpm)**



# CURVA DE CRECIMIENTO

Cepa FQ 18

MEDIO CELM (28°C, 200 rpm)

