



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE SUELOS

Centro de Agroforestería para el Desarrollo Sostenible

**Maestría en Ciencias en Agroforestería
Para el Desarrollo Sostenible**

**GERMINACIÓN Y DESARROLLO DE *Myroxylon balsamum* (L.) Harms
Y SU ASOCIACIÓN CON BACTERIAS FIJADORAS DE
NITRÓGENO ATMOSFÉRICO**

T E S I S

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN AGROFORESTERÍA
PARA EL DESARROLLO SOSTENIBLE**

PRESENTA:

LOAYZA CABEZAS SOPHIA CRISTINA

Chapingo, Estado de México, Agosto de 2008.



GERMINACIÓN Y DESARROLLO DE *Myroxylon balsamum* (L) Harms Y SU ASOCIACIÓN CON BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO ATMOSFÉRICO

Investigación realizada por **Sophia Cristina Loayza Cabezas** bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobado por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

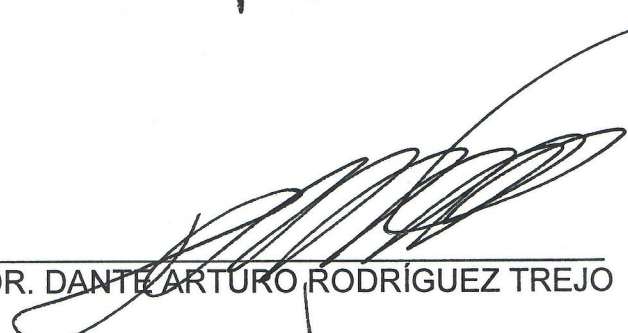
MAESTRO EN CIENCIAS EN AGROFORESTERÍA PARA EL DESARROLLO SOSTENIBLE

DIRECTOR:



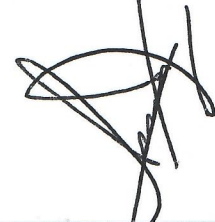
DRA. ELIZABETH HERNÁNDEZ ACOSTA

ASESOR:



DR. DANTE ARTURO RODRÍGUEZ TREJO

ASESOR:



DR. JUAN JOSÉ ALMARÁZ SUÁREZ

**GERMINACIÓN Y DESARROLLO DE *Myroxylon balsamum* (L.) Harms Y
SU ASOCIACIÓN CON BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO
ATMOSFÉRICO**

Investigación realizada por **Sophia Cristina Loayza Cabezas** bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobado por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN AGROFORESTERÍA
PARA EL DESARROLLO SOSTENIBLE**

DIRECTOR: _____
DRA. ELIZABETH HERNÁNDEZ ACOSTA

ASESOR: _____
DR. DANTE ARTURO RODRÍGUEZ TREJO

ASESOR: _____
DR. JUAN JOSÉ ALMARÁZ SUÁREZ

DEDICATORIA

Al pueblo de Ecuador y México

A la gran familia que nos apoyo siempre a la distancia

A mi pequeña familia formada aquí, en el encantador México

A Fabio por fortalecer nuestros proyectos

A mis traviesos **Omar y Adrián**

Gracias por ser parte de

mi vida

AGRADEDIMIENTOS

A la Secretaría de Relaciones Exteriores, Gobierno de México, por haberme otorgado una beca para realizar los estudios de maestría.

A la Universidad Autónoma Chapingo por permitirme continuar mi preparación profesional, facilitarme colegiatura e instalaciones.

Al comité asesor, por haber guiado la investigación: Dra. Elizabeth Hernández Acosta, Dr. Dante Arturo Rodríguez Trejo y Dr. Juan José Almaráz Suárez.

Al M.C. Miguel Uribe Gómez, Coordinador en la Maestría en Ciencias en Agroforestería Para el Desarrollo Sostenible, por el apoyo logístico en viajes de investigación. A Dolores Coronel y Rocío Rodríguez, por su apoyo constante en procesos administrativos. Al Ing. Arturo Peralta, quién fue la persona que me ayudo a enlazarme en un inicio con la Universidad.

A mi profesor Dr. Aurelio Fierros Gonzáles, por su aporte en conocimientos.

A Jorge Alatorre, su apreciada familia, y Fabio Idrovo, quienes colaboraron en la localización de la especie hasta el municipio de San Andrés Tuxtla y Ocampo Loma Larga. Al Sr. Bonifacio Reyes, quién apporto conocimiento, tiempo y fuerza.

A la Biologa Rosamond Coates, Directora de la Estación de Biología Tropical “Los Tuxtlas” del Instituto de Biología de la UNAM, por la útil información de registros de clima en la zona de colecta de semillas.

Al Dr. Dante A. Rodríguez, por permitirme realizar los ensayos de germinación, en el laboratorio de semillas de la División de Ciencias Forestales, de la Universidad Autónoma Chapingo, por el continuo asesoramiento en la etapa de semillas y análisis estadísticos, por el aporte económico en la instalación del experimento en invernadero, Al personal técnico por toda su valiosa ayuda y amistad, Técnicos Gerardo Mendoza y Mary Marcos.

Al Dr. Juan J. Almaráz y Dra. Elizabeth Hernández por guiarme en la etapa de fijación de nitrógeno, permitirme realizar los ensayos en el laboratorio de Fijación de Nitrógeno, del Colegio de Postgraduados. A la M.C. Susana Padrón y Técnicos: Lorenzo Viana, Manuel Solano, Fernando López, Edmundo Martínez por toda la ayuda brindada.

Al M. C. Vicente Sánchez, del Campo Experimental El Palmar del INIFAP, quién colaboró con logística, instalaciones y conocimiento. A la Dra. Elizabeth Hernández, Dr. Juan J. Almaráz, Sras. Dora, Martha y Sr. Cenaido Morales, quienes facilitaron nuestro trabajo de investigación en campo en la localidad del Palmar y un ejido de San Gabriel de Tezonapa. Al Sr. Tomás García, por su servicio de traslado en viajes hacia las localidades de Eyipantla y el Palmar.

A la subdirección de Investigación del Departamento de Suelos y de la División de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma Chapingo, por facilitarme el uso de invernaderos.

A Marcela, Sra. Vicky Domínguez, Paulo, Isabel, Agueda, Blanca, Halah, Ismael, Dolores, Mónica, Rocío, Alma, Miguel, Julio, Jorge, Magda, Alicia, mi sincero aprecio por su amistad y ayuda.

DATOS BIOGRÁFICOS

Sophia Loayza Cabezas, de origen Ecuatoriano, estudió Ingeniería Agronómica en la Universidad Central Del Ecuador (1995-2002). Durante sus estudios, califica para ser voluntaria en el área de plantas y desarrollo agrícola sustentable en la Estación Científica Charles Darwin, Provincia de Galápagos, participa en proyectos de propagación y monitoreo de especies endémicas y nativas, además brinda soporte técnico a agricultores de la zona alta de la Isla Santa Cruz, en cultivo de hortalizas y manejo orgánico (1999-2000).

Como estancias enriquecedoras, participa en el Programa Especial de Seguridad Alimentaria del Ecuador, en comunidades rurales marginadas de la zona del Chota, Provincia de Imbabura (2000). Desarrolla huertos orgánicos con niños de escuelas rurales, dentro del Proyecto UNIR y Fundación Kellogg's (2001).

A partir de septiembre de 2002 a marzo de 2004, con apoyo del Programa de Modernización del Sector Agropecuario y el Centro Científico Río Palenque, Provincia de los Ríos, realiza su investigación de tesis “bioacumulación de alcaloides en el cultivo de *Catharanthus roseus* con manejo orgánico” para obtener en grado de Ingeniera Agrónoma. Participa como investigadora adjunta, en la Estación Científica de la Universidad Central, en proyecto agroforestal con árboles nativos, en la comunidad Oglán Alto, Provincia de Pastaza (2004-2005).

Cursó estudios de Maestría en Ciencias en Agroforestería para el Desarrollo Sostenible en la Universidad Autónoma Chapingo, México (2006 – 2008).

GERMINACIÓN Y DESARROLLO DE *Myroxylon balsamum* (L.) Harms Y SU ASOCIACIÓN CON BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO ATMOSFÉRICO

GERMINATION AND DEVELOPMENT OF *Myroxylon balsamum* (L.) Harms AND ITS ASSOCIATION WITH ATMOSPHERIC NITROGEN FIXING BACTERIA

Sophia Loayza Cabezas¹ Elizabeth Hernández Acosta²

RESUMEN

La especie *Myroxylon balsamum* (L.) Harms, posee potencial en sistemas agroforestales como árbol de uso múltiple (AUM). En la presente investigación se estudiaron la germinación, el desarrollo inicial, indicadores de calidad y relación de la especie con microorganismos fijadores de nitrógeno.

La germinación se incrementó cuando se escarificó el fruto con un corte longitudinal (75.61%) y cuando el embrión fue descubierto (86.63%). La germinación acumulada se anticipó 15 días con el embrión descubierto en comparación con el corte longitudinal y 13 días con la temperatura mayor. No existió efecto directo de la sombra y temperatura en la germinación. Las plantas más altas y el mayor número de hojas al momento del trasplante dentro del invernadero, se obtuvieron con embrión descubierto.

La supervivencia fue de 100% al exponer las plántulas a menor irradiación. El diámetro de tallo más grande a la cosecha se encontró en la interacción, corte longitudinal y 50 % de sombra (3.50 mm) y el número de hojas más alto se observó en el tratamiento con corte longitudinal (62 hojas). La población de microorganismos fijadores de nitrógeno en las condiciones de menor luminosidad fue la más alta (27×10^5 unidades formadoras de colonias ufc por gramo de suelo seco). El coeficiente de esbeltez y la razón de área foliar RAF fueron mayores con 70% de sombra. La relación Peso Seco Aéreo / Peso Seco Subterráneo no tuvo diferencia significativa.

No se conoce con certeza si la leguminosa *M. balsamum* es capaz de formar nódulos con rizobios. A partir de la observación de muestras de raíz de *M. balsamum*, nuestro estudio indicó la presencia de estructuras similares a nódulos, y el análisis microbiológico de su contenido sugirió que las bacterias encontradas son rizobios.

La rizósfera de *M. balsamum* tuvo abundante población bacteriana, en el entorno natural se observaron el mayor número de bacterias totales y fijadoras de nitrógeno que en el campo experimental.

Palabras clave: *M. balsamum*, Germinación, escarificación, temperatura, desarrollo y luz, *Azotobacter* y *Rhizobium*.

ABSTRACT

Myroxylon balsamum (L.) Harms species has potential as a multipurpose tree (MPT) in agroforestry systems. Germination, initial development, quality indicators and the relationship between *Myroxylon* and nitrogen-fixing microorganisms were studied in this research.

Germination was increased when scarification was undertaken by longitudinal cut in the fruit (75.63%) and when the embryo was uncovered (86.63%). Accumulated germination was 15 days early with uncovered embryo in comparison with longitudinal cut and 13 days with the highest temperature. Shade and temperature showed no effect on seed germination. The highest plants and number of leaves at transplanting in greenhouse were obtained with uncovered embryo.

The survival was 100% when seedlings were exposed to lower irradiation regimes. The largest stem diameter was under the interaction longitudinal cut and 50% shade (3.50 mm), and the highest leaves number was under longitudinal cut treatment (62 leaves). The biggest nitrogen-fixing microbial population was found under the treatment with the lowest light condition (27×10^5 colony forming units cfu) per gram of dry soil). Slenderness coefficient and leaf area ratio LAR were higher with 70% shade. The Shoot/Root ratio did not have significant difference.

It is not known with certainty if the legume *M. balsamum* is able to form nodules with rhizobia. From the observation of root samples of *M. Balsamum*, our study indicated the presence of nodule-like structures, and a microbiologic analysis of the tissue content suggested that the bacteria found in this were rhizobia.

The rhysosphere of *M. balsamum* had a large bacteria population; the natural site produced a higher number of total and nitrogen-fixing bacteria than in the research station site.

Keywords: *M. balsamum*, Germination, scarification, temperature, development and light, *Azotobacter* and *Rhizobium*.

¹ Tesista

² Director de tesis

¹Thesis writer

²Thesis director

ÍNDICE

RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	vii
INDICE.....	viii
INDICE DE CUADROS.....	xii
INDICE DE FIGURAS.....	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS.....	4
2.1. Objetivo general.....	4
2.2. Objetivos específicos	4
III. HIPÓTESIS.....	5
IV. REVISIÓN DE LITERATURA	6
4.1. Taxonomía	6
4.2. Ecología	6
4.3. Estatus ecológico.....	7
4.4. Distribución.....	7
4.5. Usos.....	8
4.6. Fenología.....	8
4.7. Importancia de <i>Myroxylon balsamum</i> en sistemas agroforestales	8
4.7.1. Árbol de uso múltiple.....	9
4.8. Propagación por semilla.....	10
4.9. Época de recolección de la semilla	10
4.10. Almacenamiento	11
4.11. Análisis de la semilla	12
4.11.1. Porcentaje de humedad	12
4.11.2. Viabilidad.....	12
4.12. Tratamientos de pre germinación.....	13
4.12.1. Inmersión en agua	13
4.12.2. Escarificación mecánica.....	13

4.13. Condiciones ambientales adecuadas para la germinación y desarrollo.....	14
4.13.1. Intensidad de luz	14
4.13.2. Temperatura	15
4.14. Fijación biológica de nitrógeno.....	16
4.14.1. Microorganismos fijadores de nitrógeno	17
4.14.2. Proceso de infección y fijación del nitrógeno	18
4.14.3. Simbiosis entre rizobios y leguminosas arbóreas.....	20
4.14.4. Relación simbiótica en especies de la sub familia Papilionoideae	21
4.14.5. Fijación de nitrógeno por bacterias de vida libre en leguminosas y no leguminosas.....	22
4.14.6. <i>Azotobacter</i> y otros géneros de bacterias fijadoras de nitrógeno en leguminosas arbóreas tropicales.....	26
4.14.7. <i>Azotobacter</i> como promotor de crecimiento	26
4.14.8. Grado de eficiencia entre la asociación <i>Azotobacter</i> sp. y plantas	28
4.15. Utilización de las leguminosas arbóreas tropicales en sistemas agroforestales	28
V. MATERIALES Y MÉTODOS	30
5.1. Experimentos de germinación con <i>Myroxylon balsamum</i>	30
5.1.1. Ubicación del área de colecta de la semilla	30
5.1.2. Prueba de autenticidad	31
5.1.3. Tratamiento post cosecha y almacenamiento de los frutos después de la colecta	31
5.1.4. Análisis de peso, contenido de humedad y viabilidad de la semilla	32
5.1.5. Germinación.....	33
5.1.5.1. Ensayo con escarificación mecánica e intensidades de luz.....	34
5.1.5.1.1. Establecimiento de tratamientos y diseño experimental	34
5.1.5.1.2. Modelo estadístico	35
5.1.5.1.3. Análisis estadístico.....	35
5.1.5.2. Ensayo con intensidades de luz y regímenes de temperatura	35

5.1.5.2.1.	Establecimiento de tratamientos y diseño experimental	36
5.1.5.2.2.	Modelo estadístico.....	36
5.1.5.2.3.	Análisis estadístico	36
5.1.5.2.4.	Variables en estudio	36
5.2.	Experimentos en invernadero.....	36
5.2.1.	Preparación del sustrato y sus características.....	36
5.2.2.	Propiedades físico-químicas del sustrato	36
5.2.3.	Condiciones de luminosidad en invernadero	37
5.2.4.	Trasplante en invernadero	38
5.2.5.	Preparación del inoculo de <i>Azotobacter beijerinckii</i>	38
5.2.6.	Inoculación de <i>Azotobacter beijerinckii</i> en árboles de <i>Myroxylon balsamum</i>	39
5.2.7.	Cuantificación de microorganismos fijadores de nitrógeno en sustrato de <i>Myroxylon balsamum</i>	39
5.2.8.	Establecimiento de tratamientos y diseño experimental	40
5.2.9.	Modelo estadístico	40
5.2.10.	Análisis estadístico.....	40
5.2.11.	Variables de estudio	40
5.3.	Estudio de la fijación de nitrógeno del material colectado en campo.....	41
5.3.1.	Área de muestreo de raíces de <i>Myroxylon balsamum</i> y suelo rizosférico.....	41
5.3.2.	Propiedades físico-químicas de las muestras de suelo.....	42
5.3.3.	Toma de muestras de raíces y detección de ausencia o presencia de nódulos en <i>Myroxylon balsamum</i>	43
5.3.3.1.	Colecta y observación de raíces en campo y laboratorio	43
5.3.3.2.	Aislamiento e identificación de bacterias presentes en protuberancias de raíces de <i>M. balsamum</i>	44
5.3.3.3.	Caracterización de la morfología de cepas bacterianas encontradas en raíces de <i>M. balsamum</i>	44
5.3.3.4.	Variables de estudio	45
5.3.4.	Bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno en <i>M. balsamum</i>	45

5.3.4.2. Cuantificación de bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno	45
5.3.4.3. Análisis estadístico.....	46
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
6.1. Experimentos de germinación con <i>Myroxylon balsamum</i>	47
6.1.1. Análisis de peso, contenido de humedad y viabilidad de la semilla	47
6.1.2. Germinación.....	48
6.1.2.1. Ensayo con escarificación mecánica e intensidades de luz.....	48
6.1.2.2. Ensayo con intensidades de luz y regímenes de temperatura	50
6.2. Experimentos en invernadero.....	52
Características físico químicas del sustrato.....	52
6.2.2. Condición de escarificación de frutos de <i>M. balsamum</i> y luminosidad	53
6.2.3. Condiciones de escarificación de frutos, luminosidad e inoculación con <i>Azotobacter beijerinckii</i> en invernadero.....	53
6.2.4. Población de microorganismos fijadores de nitrógeno a los tres meses de inocular <i>Azotobacter beijerinckii</i> en <i>M. balsamum</i> en invernadero.....	57
6.3. Estudio de la fijación de nitrógeno del material colectado en campo.....	58
6.3.1. Propiedades físico-químicas de las muestras de suelo.....	58
6.3.2. Colecta y observación de raíces de <i>Myroxylon balsamum</i> en campo y laboratorio.....	58
6.4. Aislamiento y cuantificación de bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno, en suelo rizosférico de <i>M. balsamum</i>	61
VII. CONCLUSIONES.....	63
VIII. LITERATURA CITADA.....	64
VIII. ANEXOS.....	72

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Datos climatológicos durante los meses en que se estableció el ensayo. Observatorio de Chapingo. 2007.	37
Cuadro 2. Características generales de protuberancias extraídas de raíces de <i>Myroxylon balsamum</i> (L.) Harms, en individuos del campo experimental y entorno natural.....	59
Cuadro 3. Caracterización morfológica colonial y microscópica de cepas bacterianas aisladas de protuberancias de raíces de <i>Myroxylon balsamum</i> (L.) Harms, en medio ELMARC para <i>Rhizobium</i> . El Palmar, Veracruz.....	60
Cuadro 4. Poblaciones de bacterias totales y fijadoras de nitrógeno en suelo rizosferico de <i>Myroxylon balsamum</i> (L.) Harms, en dos áreas de muestreo. Tezonapa, Veracruz.....	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Intercambio de señales en el proceso de infección por Rizobios en pelos radicales de leguminosas.	19
Figura 2. Localización geográfica del área de estudio. Salto Eyipantla, San Andrés Tuxtla. Adaptado del mapa de vegetación y uso del suelo. Estado de Veracruz. Semarnat y Instituto Nacional de Ecología. 2000.....	31
Figura 3. Localización geográfica del área de estudio. El Palmar, San Gabriel de Tezonapa. Adaptado del mapa de vegetación y uso del suelo, Estado de Veracruz. Semarnat y Instituto Nacional de Ecología. 2000.....	42
Figura 4. Germinación de <i>Myroxylon balsamum</i> con escarificación.y Régimen de temperatura	48
Figura 5. Germinación acumulada de semillas de <i>Myroxylon balsamum</i> , con escarificación y sombra.....	49
Figura 7. Promedios en la germinación de <i>Myroxylon balsamum</i> , para las combinaciones de los factores temperatura y sombra.....	51
Figura 8. Germinación acumulada de semillas de <i>Myroxylon balsamum</i> , con dos regímenes de temperatura.....	52
Figura 9. Supervivencia en vivero al mes del trasplante de <i>M. balsamum</i> en invernadero con dos condiciones de luz.....	53
Figura 10. Número de hojas a la cosecha de <i>M. balsamum</i> , con dos tipos de escarificación.....	54
Figura 11. Diámetro a la cosecha en <i>M. balsamum</i> , Interacción Sombra x Escarificación.....	55

I. INTRODUCCIÓN

Los bosques tropicales albergan aproximadamente el 50% de todas las especies vegetales y animales conocidas hasta el momento. Una problemática en estas áreas, es la deforestación, principalmente debido al cambio en el uso de suelo para desarrollar ganadería y agricultura. Como efecto de aquellas actividades, la pérdida genética de diversas especies de árboles tropicales nativos, con características prometedoras para ser usados como árboles de uso múltiple en sistemas agroforestales, es progresiva.

Una alternativa es investigar aquellas especies nativas en cada ecosistema, iniciar procesos de domesticación, con la finalidad de incorporarlas para uso agroforestal en fincas y reforestación en zonas degradadas.

Myroxylon balsamum (L.) Harms, es una especie de amplia distribución, desde México, Centro América hasta Sudamérica. Ofrece una diversidad de productos y usos; su bálsamo ha sido utilizado en la industria de la perfumería durante muchos años, sus hojas y corteza poseen propiedades medicinales, y la madera es fina y resistente. Ha sido incorporado como árbol de sombra en sistemas cafetaleros en zonas montañosas de Veracruz, también en recuperación de suelos degradados y restauración de bosques.

En México esta especie es considerada de mediana probabilidad de degradación y pérdida genética a largo plazo en caso de no implementar actividades que fomenten su investigación, conservación y producción. Mientras que en algunos países de Centro América, como Costa Rica, se considera amenazada, debido a que sus poblaciones han disminuido notablemente. En el Salvador, los pocos individuos que se encuentran dispersos en fincas o en remanentes de selvas, han sido manejados inadecuadamente para la

extracción de la resina, además de ser cortados por su fina madera (Navarrete, 2001).

Existen características ideales para considerar a un árbol de uso múltiple en un sistema agroforestal, algunas de ellas son brindar diversidad de productos específicos (madera, resina, medicina y frutos), y de uso amplio (leña, cerca viva, forraje). Además un árbol de uso múltiple ofrece servicios como sombra, recuperación de tierras infértiles y fijación de nitrógeno. Otras características importantes a considerar deben ser: buena capacidad de propagación, eficiencia en la utilización de luz, y producción de biomasa (Wojtkowski, 1998).

Hasta la fecha existe información muy general de *M. balsamum*. Algunos ensayos de propagación de la especie, a través de reproducción sexual por semilla, presentan porcentajes que no superan en 75% de germinación. Al no realizar escarificación del fruto, la germinación potencial se reduce a 50 % de germinación (ICRAF-PROSEA, 2004).

De la rizósfera de algunas especies vegetales como la caña de azúcar, maíz y arroz han sido aisladas especies de bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno como *Azotobacter* spp. Esta relación asociativa no específica, es beneficiosa tanto para las bacterias como para las plantas; las bacterias encuentran en los exudados de las raíces de las plantas el suministro energético para su desarrollo y fijación de nitrógeno; La inoculación de *Azotobacter* sp. en algodón promovió el vigor en plantas germinadas, además incrementó en 19% el número de cápsulas por planta (Bashan *et al.*, 1996). La inoculación en campo con *Azotobacter* sp. en remolacha favoreció el incremento en producción en 26% (Mrkovac̃ki y Milic, 2001). Existe expectativa sobre la inoculación de bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno en plantas perennes leñosas, y su beneficio en cuanto a la producción de biomasa.

Algunos reportes mencionan que el género *Myroxylon*, tiene capacidad de nodular con bacterias simbióticas, sin embargo no existe hasta la fecha un esclarecimiento de dicho proceso. La especie en estudio, al formar parte de la familia Fabaceae, sub familia Papilionoideae (ICRAF-PROSEA, 2004), posee una alta probabilidad de formar una relación simbiótica con cierto tipo de Rizobios; razón por lo cual se realizarán aislamientos, purificación, y algunas pruebas que verifiquen la presencia de dichos microorganismos.

Con los estudios mencionados anteriormente, se pretende generar información con respecto al potencial del árbol como componente agroforestal, su efectiva propagación, desarrollo inicial, y relación con microorganismos fijadores de nitrógeno; para que en el futuro, comunidades cercanas a los remanentes de selvas tropicales lo utilicen en sus plantaciones agroforestales y puedan extraer productos, y servicios específicos de esta especie; convirtiéndose en una fuente de ingresos para las comunidades a mediano y largo plazo.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Estudiar la germinación y desarrollo inicial de *Myroxylon balsamum* (L.) Harms, en condiciones de temperatura, y luminosidad controlada, así como su asociación con bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico, tanto simbióticas y como de vida libre.

2.2. Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de la escarificación mecánica del fruto en la germinación de *Myroxylon balsamum*.
2. Estudiar la influencia de la luminosidad y temperatura en la germinación de *M. balsamum*.
3. Realizar pruebas de viabilidad y contenido de humedad de la semilla de *M. balsamum*.
4. Evaluar el desarrollo inicial de *M. balsamum* en invernadero con diferentes intensidades de luz, escarificación, e inoculación con *Azotobacter beijerinckii*.
5. Medir la población de bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno en la rizósfera de *M. balsamum*, de un entorno natural y perturbado.
6. Evaluar si *M. balsamum*, que crece en forma natural en una selva del sureste de México, forma nódulos con *Rhizobium* spp.

III. HIPÓTESIS

H: El tratamiento pregerminativo de escarificación mecánica del fruto favorece la germinación de las semillas de *M. balsamum*.

H: Las variaciones en intensidades de luz y regímenes de temperatura influyen en la germinación de *M. balsamum*.

H: La sombra, escarificación y la inoculación con rizobacterias en *M. balsamum* en invernadero, mejoran el desarrollo inicial del árbol.

H.: *M. balsamum*, que crece naturalmente en el sureste de México, forma nódulos en simbiosis con rizobios.

H: La población de bacterias libres fijadoras de nitrógeno es más abundante en el entorno natural que en áreas alteradas.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1. Taxonomía

Existen dos especies asignadas al género: *Myroxylon balsamum* (L.) Harms, y *Myroxylon peruiferum* L. f., ambas consideradas dentro de la Familia Leguminosae o Fabaceae, Subfamilia Papilionoideae, tribu Sophoreae (ICRAF-PROSEA, 2004).

La mayoría de la información de *Myroxylon* se reporta para la especie de *M. balsamun*. En “Illustrated guide to the Trees of Peru”, las especies se pueden distinguir por ciertas características en los cotiledones; sin embargo Pennigton (2008) comenta que “la variación es más que nada ecológica de acuerdo al hábitat, y todavía existen dudas si se trata de especies diferentes”.

Las sinonimias más utilizadas son: *Myroxylon pereirae* (Royle), *Myroxylon touleiferum* A. Rich.

4.2. Ecología

Myroxylon balsamum forma parte de selvas altas o medianas subperenifolias, crece en suelos calcáreos o suelos derivados de materiales ígneos, con pendientes entre 20 a 40 %. Su variación altitudinal va desde el nivel del mar hasta los 600 m, sus áreas de distribución tienen una precipitación que va desde los 1300 a los 4000 mm anuales, en donde las temperaturas oscilan entre los 23°C a los 30°C (Cordero y Boshier, 2003; Pennington y Sarukhán, 2005; Salazar, 1999).

Es una especie emergente, posee una regeneración a veces abundante al pie del árbol madre; sin embargo necesita luz o espacios abiertos dentro del bosque para poder sobrevivir, por lo que existen muy pocos individuos en edades intermedias (Jiménez, 1993).

En México la especie se encuentra asociada con *Brosimum alicastrum* (Swarts), *Mirandaceltis monoica* (Hemsl.), *Pseudolmedia oxyphyllaria* (Donn.), *Pseudobombax ellipticum* (Kunth.), *Manilkara zapota* (L.) P. Royen., *Bursera simaruba* (L.) Sarg. (Pennington y Sarukhán, 2005).

4.3. Estatus ecológico

Myroxylon balsamum es una especie tolerante a la sombra en sus primeras etapas de desarrollo, sin embargo al cabo de un año, presenta mayor crecimiento en espacios con más luminosidad. De Carvalho *et al.* (2006) en estudios de comportamiento de la semilla en almacenamiento y su relación con el status ecológico, indica que *M. peruiferum* es una especie climax, tolerante a la sombra.

4.4. Distribución

Myroxylon balsamum, presenta un record de distribución desde el sur de México, Centro América y algunos países de Sur América. Mientras que *Myroxylon peruiferum* L. f. es nativa de Colombia, Guyana, Perú, Bolivia, Brasil, y Argentina (Pennington y Sarukhán, 2005; Villacrés, 1995).

En México, *Myroxylon balsamum* (L.) Harms, se encuentra distribuida en la vertiente del Golfo desde el centro de Veracruz y norte de Oaxaca, al sur de la sierra de Naolinco hasta el sur de la península de Yucatán, y en la vertiente del Pacífico desde Nayarit hasta Chiapas, incluyendo la cuenca del Río Balsas (Pennington y Sarukhán, 2005).

4.5. Usos

El aceite esencial obtenido del bálsamo de *Myroxylon balsamum*, es utilizado en perfumería como fijador de olor (Acosta, 1961). El bálsamo es utilizado en la preparación de jarabes para afecciones generales del aparato respiratorio, también como antiséptico de las mucosas nasales, y enfermedades de la piel. En la industria su resina es utilizada principalmente como saborizante de jarabes para la tos, bebidas, helados, y goma de mascar (Acosta, 1961; ICRAF-PROSEA, 2004).

La madera de *Myroxylon balsamum*, es de muy buena calidad, resistente a daños por hongos, posee acabados finos, moderada para trabajar, ya que es muy dura (ICRAF-PROSEA, 2004). Utilizada para producir estructuras, construcción rural, muebles ligeros, ebanistería fina, instrumentos, artesanía, y pisos (Cordero y Boshier, 2003; Vera y Dorantes, 2003).

4.6. Fenología

Myroxylon balsamum, posee un follaje perennifolio. Las flores aparecen de marzo a mayo y el período de fructificación y maduración se extiende de mayo a septiembre (Vázquez *et al.*, 1999)

4.7. Importancia de *Myroxylon balsamum* en sistemas agroforestales

En el Estado de Veracruz, *Myroxylon balsamum* es utilizado como árbol de sombra en cultivos de café, en zonas de montaña (Vázquez *et al.*, 1999). Además ha sido usado en cultivos intercalados con café como árbol de sombra en el Salvador (ICRAF-PROSEA. 2004).

También utilizada para restauración de bosques de protección, mediante plantación o manejo de la regeneración, y para recuperar suelos degradados (Cordero y Boshier, 2003).

4.7.1. Árbol de uso múltiple

Un árbol de uso múltiple (AUM), es considerado aquel que brinda una serie de productos de uso específico, que no pueden ser remplazados por otras especies dentro de la finca (madera, frutos, medicina), y de uso amplio, que sus productos puedan ser fácilmente sustituidos por otras especies (cerco viviente, sombra, leña, materia orgánica a través de la poda del follaje). La inclusión de los árboles multipropósito en fincas, brindan seguridad alimentaria cuando las cosechas de los cultivos tradicionales han sido afectadas (Wojtkowski, 1998).

Wojtkowski, 1998 y Huxley, 1999; señalan que las características específicas para considerar un AUM en un sistema de finca, especialmente para la producción de biomasa y sombra, son las siguientes:

- a) Habilidad de crecer en suelos pobres
- b) Alta producción de biomasa
- c) Tolerar variaciones de clima
- d) Fácil establecimiento y rápido crecimiento
- e) Bajo costo de producción de plántula
- f) Control y manejo en floración y fructificación
- g) Resistente a plagas y enfermedades
- h) Rápida descomposición del follaje
- i) Tasas altas de fijación de nitrógeno
- j) Densa red de raíces finas y profundas
- k) Hojas pequeñas para minimizar el daño por caída de la gota

- l) Pequeñas hojas que permitan mayor paso de luz
- m) Madera y subproductos apreciados
- n) Buena forma del tronco y resistencia de ramas
- o) Copa abierta que permita la mejor penetración de luz

4.8. Propagación por semilla

Tradicionalmente los árboles tropicales son propagados y conservados a través de semillas, tanto para establecer plantaciones como para promover la regeneración natural. Existen tres principales ventajas de la propagación por semillas (Leakey, 1992).

- Se pueden obtener semillas en cantidades abundantes.
- La semilla disponible puede ser almacenada para uso posterior.
- Variación retenida en las siguientes generaciones.

4.9. Época de recolección de la semilla

La floración y fructificación de muchas especies tropicales no se correlacionan bien con el clima. Para algunas especies se deben acumular las semillas de más de una cosecha para producir un cultivo adecuado de plántulas. También los tiempos de cosecha de una región no son los mismos para otra región, por lo tanto se debe compilar registros fenológicos para la especie en cada región donde se va a realizar la colecta (Wadsworth, 1997).

Existen algunos requisitos previos a la recolección de semillas:

- Elegir una zona donde las semillas sean abundantes (bosques abiertos y bosques vírgenes).
- Sitios libres de enfermedades.

- Selección de árboles madres superiores (árboles semilleros femeninos), llamados también árboles plus, con el objetivo de brindar buenas características de diámetro, altura, rendimiento, germinación, y progenie.
- Momento preciso de recolección. Factor que dependerá de las características individuales de la especie. Algunas investigaciones con especies tropicales como *Cedrela odorata* han determinado que para obtener la mejor germinación, la recolección de los frutos se debe hacer antes de que se abran las cápsulas (un mes antes), mientras que para *Cordia alliodora* la mejor germinación se obtiene al recoger las semillas tres semanas antes de la caída (Wadsworth, 1997).

En México, la época de recolección de frutos de *Myroxylon balsamum* (L.) Harms, inicia cuando empiezan a madurar, desde mayo y finaliza en septiembre (Pennington y Sarukhán, 2005).

4.10. Almacenamiento

Antes de ser almacenadas, las semillas deben ser secadas y limpiadas para que se encuentren libres de desechos, plagas y enfermedades. Las semillas también se almacenan a bajas temperaturas para incrementar la longevidad. Debe tenerse cuidado con las temperaturas elevadas y el alto contenido de humedad (Huxley, 1999).

Muchas de las especies de árboles tropicales poseen un comportamiento muy diverso relacionado a almacenamiento, viabilidad y su respectiva germinación.

Se ha observado que después de haber almacenado los frutos o diásporas de *M. peruiferum* en diferentes temperaturas (-18°C a 5°C) por 90 días, y con porcentajes de humedad de 10.3%, el tiempo de germinación fue de 20 días, y el porcentaje de emergencia de 65% y 64% respectivamente, en temperatura de 25° y luz blanca constante .

Russel (1998) indica que semillas de *Acrocarpus fraxinifolium*, almacenadas por más de un año a temperatura ambiente no perdieron su viabilidad, mientras que al ponerlas a germinar inmediatamente de ser recogidas, su germinación fue de 30-40%.

4.11. Análisis de la semilla

4.11.1. Porcentaje de humedad

Salazar (1999) menciona que con porcentajes iniciales de humedad de 11% y 12 % en semillas frescas de *M. balsamum*, obtuvieron una germinación entre 60 y 75%.

En semillas de *M. peruiferum*, colectadas y almacenadas durante 90 días a 5°C con contenidos de humedad de 31.5%, existió una completa pérdida de viabilidad (0%), resultados que ayudan a clasificar a esta especie como ortodoxa.

4.11.2. Viabilidad

La viabilidad de semillas puede ser afectada adversamente por muchos factores como: condiciones en las cuales las semillas han sido almacenadas y transportadas, semillas atacadas por plagas y enfermedades, y almacenamiento por períodos muy prolongados (Huxley, 1999).

Estudios generales con *M. balsamum*, indican que las semillas almacenadas en condiciones ambientales de seis meses a un año, mantienen la viabilidad. Mientras que semillas en cámaras frías a 5°C y contenido de humedad de 6 a 8% pueden ser almacenadas por tres años (Salazar, 1999).

4.12. Tratamientos de pre germinación

4.12.1. Inmersión en agua

Al realizar un corte longitudinal en la parte inferior e inmersión en agua por 1 día se obtiene 59% de germinación (Salazar, 1999).

4.12.2. Escarificación mecánica

El fruto de *Myroxylon balsamum*, es una legumbre samaroide, indehisciente. La semilla posee una cubierta seminal, hilo, embrión con dos cotiledones, hipocótilo-radícula saliente y plúmula, pericarpio, no posee perispermo ni endoderma, (Niembro, 2000; Camacho, 1994).

Algunas investigaciones mencionan que el bálsamo o resina posee niveles altos de cumarinas y taninos, que al parecer no tienen efectos sobre la germinación de la especie, y más bien pudieran actuar como un factor alelopático (ICRAF-PROSEA, 2004), o de protección contra la descomposición por hongos (Salusso, 2000). Sin embargo, Camacho (1994) menciona que existen ciertos tipos de inhibidores de crecimiento conocidos como compuestos fenólicos, cumarinas o ácido abscísico que pudieran bloquear la germinación.

En el caso de tratar de eliminar la dormancia química es necesario que se desactiven los inhibidores presentes en la cubierta o mesocarpo, por lo que se debe quitar dicha estructura a través de un corte, en donde se deja al descubierto el endocarpo que permite emerger la radícula, o tratar un día o dos en remojo en agua a temperatura ambiente (Camacho, 1994).

Es necesario realizar la escarificación mecánica cuando existe la posibilidad de la existencia de dormancia mecánica, cuando la testa o endospermo son duros, y el endocarpo es grueso e indehisciente. Aquellas estructuras oponen

resistencia mecánica al crecimiento del embrión. Para eliminar la dormición mecánica, es necesario debilitar las cubiertas con la ayuda de pinzas, y mantener las semillas en ciclos de remojo y secado (Camacho, 1994).

Registros en el Forestry Compendium (2005) e ICRAF-PROSEA (2004), mencionan que la extracción de la semillas en *Myroxylon balsamum*, no es viable. Al sembrar los frutos completos, obtienen una germinación de 50% entre los 15 a 30 días.

4.13. Condiciones ambientales adecuadas para germinación y desarrollo

4.13.1. Intensidad de luz

El nivel de irradiación, fotoperiodo y composición del espectro son los factores ecológicos que más influyen en el crecimiento de las plantas. Dependiendo del nivel de irradiación, las plantas responden a través de adaptaciones genéticas y aclimataciones fenotípicas (Lambers *et al.*, 1998).

En semillas de tres especies de árboles subtropicales sometidas a dos regímenes de luz (40 %, y 70 %) y diferentes condiciones de humedad, con protección en invernadero; la germinación cesó después de dos meses y los mejores porcentajes de germinación se obtuvieron con alta intensidad de luz, manteniendo el suelo húmedo, y fueron para *Alnus nepalensis* (80 %), mientras que para *Quercus griffithii* y *Schima khasiana* la germinación fue de 60% (Khan y Tripathi, 1989).

Estudios realizados por Augspurger (1984), reportan buena germinación y sobrevivencia de *M. balsamum* en condiciones de invernadero que simulan la luminosidad existente en pequeños claros abiertos en la selva, así como al interior del bosque. Los individuos expuestos a sombra, presentaron en las primeras semanas mayor altura, sin embargo al cabo del año fueron aquellos

expuestos a mayor radiación, los que superaron en crecimiento; mientras que otras variables evaluadas como número y longitud de hojas fueron no significativas. El autor menciona que pese a ser una especie de colonización tardía, necesita en alguna de sus etapas de crecimiento de espacios abiertos con luz óptima.

La germinación de *Myroxylon balsamum* en el bosque, bajo la copa de los árboles es abundante (80%); sin embargo, diversos hongos fitopatógenos e insectos plaga causan la muerte de muchas plántulas, además que la escasa luz bajo dosel no permite el buen desarrollo de individuos de edad intermedia.

Figliolia *et al.* (2006) realizaron ensayos de germinación con semillas de *Myroxylon peruiferum*, sometidas a un fotoperiodo de 8 horas con luz fluorescente, luz roja y oscuridad absoluta. El porcentaje más alto en germinación (83%) fue en la interacción luz blanca y temperatura constante de 25°C. Sin embargo, con el régimen de temperaturas alternadas los resultados fueron más equilibrados, hubo un buen comportamiento en germinación (66%).

Se ha observado que la tasa de crecimiento relativo y la tasa neta de asimilación en individuos de *M. peruiferum*, a los cien días de sembrados, y sometidos a cuatro mallas de 50% de sombra, en invernadero con temperaturas entre 10 – 37 °C, así como en sombra natural bajo dosel, son menores que en aquellos sometidos a luz plena (fuera del bosque en claros) con temperaturas entre 8 - 38°C. En cambio el área foliar específica y la tasa del área foliar en *M. peruiferum*, en la condición de sombra artificial en invernadero es mayor que en la condición de luz total (Souza y Valio, 2003a).

4.13.2. Temperatura

Las semillas de árboles tropicales poseen la mejor germinación a temperaturas entre 25°C y 35°C (Nuluaem, 2000). Se ha observado que el rango de

temperaturas óptimo para la germinación de *Myroxylon balsamum*, se encuentra entre los 25°C y los 35°C, donde la emergencia se produce al cabo de los 15 a 30 días (Cordero y Boshier 2003; Forestry Compendium, 2005).

Semillas frescas de *Myroxylon peruiferum*, puestas a germinar en incubadora, sin escarificación, a temperatura permanente de 25°C, y condiciones simuladas de noche y luz fluorescente constante de 3.2 W/m², no presentaron diferencias en los resultados de germinación: 67% y 72%, esta especie presentó un 100% de sobrevivencia en ambos micrositios, considerandola muy tolerante a la sombra (Souza y Valio, 2001).

4.14. Fijación biológica de nitrógeno

El mantener la fertilidad del suelo optimizando sus propios recursos orgánicos y bióticos; entender la compleja interacción entre la diversidad de microorganismos presentes en el suelo y las plantas, han permitido que en la actualidad se enfatice el desarrollo de nuevas tecnologías en las que los microorganismos son fundamentales para incrementar la producción en los cultivos.

Es conocida ampliamente la capacidad de las leguminosas de fijar nitrógeno en condiciones limitantes. Además, cultivos que no corresponden a leguminosas, seleccionan grupos de bacterias específicas en la rizósfera, esta selección específica va a depender de la naturaleza y concentración de los exudados que producen las raíces y de la habilidad de la bacteria de utilizarlos como fuente de energía (Tilak *et al.*, 2005).

Las bacterias que viven en el suelo, y que no poseen una actividad cercana a la rizósfera, rizoplano, o tejidos internos de las plantas, son llamadas bacterias de vida libre, estas no dependen únicamente de los exudados de las raíces para sobrevivir, y pueden igualmente fijar nitrógeno, poseen un cierto grado de interacción con las plantas, resultado de una coevolución. Las Rizobacterias

poseen sistemas eficientes para catabolizar los compuestos orgánicos presentes en los exudados de la planta: Algunas viven en el rizoplasma o en el tejido interno de la planta (endofitos). Se ha estimado que la fijación biológica contribuye globalmente entre 180×10^6 toneladas métricas/ año, de las cuales 87% proviene de la asociación simbiótica, mientras que el 13% proviene de los organismos de vida libre o sistemas asociativos (Tilak *et al.*, 2005).

Kanmegne *et al.*, (2006) menciona que la fijación biológica (simbiótica y asimbiótica), es la segunda vía en orden de cantidad de nitrógeno fijado no manejado por los agricultores en sistemas de pequeñas fincas en zonas húmedas tropicales ($6.93 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}$). La principal entrada de nitrógeno en estos sistemas es la captura profunda a través de la descomposición de hojarasca ($16.6 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}$), y el tercero proviene de la fijación atmosférica ($4.3 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}$).

4.14.1. Microorganismos fijadores de nitrógeno

Los microorganismos encargados de fijar nitrógeno de forma simbiótica con leguminosas corresponden a la familia Rhizobiaceae, algunos de los géneros representativos son: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, mientras que en árboles no leguminosos se encuentra a *Frankia*. También son encontrados aquellos microorganismos no simbióticos de vida libre, o asociativos como: *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Acetobacter*, *Azoarcus*, entre otros. Estos microorganismos son de gran significancia agronómica, y su eficiencia en el proceso de fijación de nitrógeno va a depender de la disponibilidad de carbono y del recurso energético del suelo, si es limitado aquel recurso, pueden moverse al área de la rizósfera, rizoplasma e incluso vivir dentro de la raíz como endófitos (Tilak *et al.*, 2005).

4.14.2. Proceso de infección y fijación del nitrógeno

Las leguminosas forman una relación simbiótica con diferentes especies de bacterias llamadas colectivamente como rizobios. En el proceso de infección, la raíz de la planta hospedera a más de producir material orgánico de fácil asimilación para los rizobios, también producen flavonoides que actúan como señales químicas que derivan en la expresión del gen NOD de los rizobios, este a su vez induce la producción de oligosacáridos (factores nod) que expresan genes en la raíz de la planta relacionados con la despolarización de la membrana celular, la deformación de los pelos radicales, así como la formación y función del nódulo. Una vez que los rizobios se adhieren en la zona deformada del pelo radical, inducen una hidrólisis localizada de la pared celular, mientras que la membrana celular se invagina y se sintetiza nueva pared celular, originando al hilo de infección por donde ingresan las bacterias y se liberan dentro del tejido nodular formado simultáneamente en etapas tempranas de la infección (Almaráz y Ferrera-Cerrato, 2007).

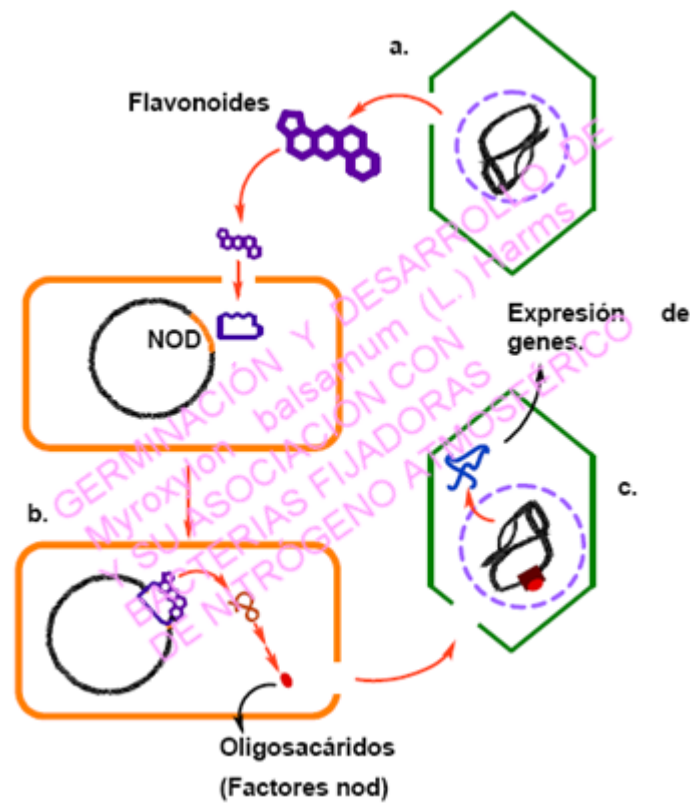


Figura 1. Intercambio de señales en el proceso de infección por Rizobios en pelos radicales de leguminosas.

El nódulo es un sitio activo de fijación y asimilación del nitrógeno, elemento que se reparte directamente a los órganos que más lo demandan en forma de ureidos en leguminosas tropicales y amidas en leguminosas de clima templado (Almaráz y Ferrera-Cerrato, 2007).

El proceso de fijación biológica del nitrógeno es catalizado por el complejo enzima nitrogenasa. Las bacterias que poseen la enzima nitrogenasa ocupan un nicho ecológico indispensable, suministrando el nitrógeno fijado por ellas al ciclo global del nitrógeno. Las bacterias convierten el nitrógeno atmosférico N_2 en NH_4^+ , proceso que requiere elevadas cantidades de energía que es proporcionada por la planta (Halbleib y Ludden, 2000), como se indica en la siguiente ecuación:



Los procesos fisiológicos de fijación de nitrógeno en organismos de vida libre se encuentran afectados por las propiedades y requerimientos de la nitrogenasa. Estos poseen sensibilidad al oxígeno y al contenido de metales como el hierro (Fe), molibdeno (Mo), o vanadio (Va) que son componentes de las proteínas. La energía que mantiene la fijación de N_2 en organismos de vida libre, es generada principalmente por la oxidación de compuestos orgánicos. La óptima condición para la fijación de nitrógeno en los microorganismos diazotrofos es donde el suministro de O_2 apenas cumple con la demanda respiratoria. En las tasas muy bajas de suministro de O_2 la actividad de la nitrogenasa, es energéticamente limitada. De igual forma la tasa alta de aireación la actividad de la nitrogenasa es inhibida (Stacey *et al.*, 1992).

Azotobacter posee la habilidad de ajustar la actividad respiratoria en rangos amplios de suministros de O₂, puede exhibir las más altas tasas de respiración, particularmente cuando fija nitrógeno, pero aquella actividad ocurre a expensas de elevadas tasas de consumo de carbono y energía. La óptima concentración de oxígeno (DOC) para una eficiente fijación de nitrógeno esta cerca de los 10 µM O₂, aunque se ha encontrado que poblaciones estables pueden crecer en medios saturados de O₂ (225 µM O₂) (Stacey *et al.*, 1992).

4.14.3. Simbiosis entre rizobios y leguminosas arbóreas

Alrededor de 3395 especies de la familia Leguminosae se han examinado para determinar si presentan o no nódulos. El porcentaje de nodulación en la sub familia *Caesalpinoideae* es restringido a 23%, mientras que en *Mimosoideae* es del 90% y en *Papilionoideae* ocurre nodulación en el 97% de las especies examinadas (De Faria *et al.*, 1989).

Investigaciones realizadas por Bala y Giller (2006) mencionan que algunas especies de árboles leguminosos usados ampliamente en agroforestería, transferidos a medio libre de nitrógeno a los dos días de germinados, e inoculados con diluciones de muestras de suelo colectadas en bosques secundarios y en áreas de cultivo del trópico húmedo de Africa, Brasil, México, Costa Rica, e Indonesia; nodularon con una diversidad de tipos de rizobios propios de cada tipo de suelo. Encontraron que *Rhizobium tropici* fue la especie de mayor simbiosis efectiva con todas las leguminosas. En *Gliricidia sepium*, la simbiosis con *Sinorhizobium spp.* fue igual de efectiva que con *Rhizobium tropici* en cuanto a fijación de nitrógeno (19.5 mg N/ planta), igual respuesta se obtuvo con *Calliandra calothyrsus* (4 mg N y 5.9 mg N/ planta), y *Leucaena leucocephala* (13 mg N y 9.2 mg N/planta). En *Sesbania sesban*, la simbiosis con *Mesorhizobium spp.* fue igual de efectiva que con *Rhizobium tropici* (10.4 mg N/ planta y 12.2 mg N/planta).

El pH parece estar asociado con la presencia mayor o menor de ciertos tipos de rizobias. En pH menores a 4.2, especies del género *Rhizobium* spp. aparecen dominantes, mientras que la población de *R. tropici* domina en pH entre 4.2 a 5.0. *Mesorhizobium* spp. en pH entre 5.0 – 6.5, y *Sinorhizobium* spp. domina en pH por encima de 6.5 (Bala y Giller 2006).

4.14.4. Relación simbiótica en especies de la sub familia Papilionoideae

Alrededor de 2592 especies dentro de esta sub familia han sido examinadas para observar la existencia de nódulos, esto corresponde a un 21 % del total de especies. El 97 % nodulan, a excepción de las tribus Dipterygeae y Euchrestae (De Faria *et al.*, 1989).

Sprent (2007) mediante análisis moleculares, refiere que algunos grupos dentro de la sub familia Papilionoideae con mayor nodulación son: Swartziaeeae (*Swartzia*, *Ateleia*, *Bobgunnia*, *Cyathostegia*), Dalbergieae (*Dalbergia* spp.), Indigofereae (*Indigofera* L.), Millettieae y Sesbanieae; distribuidos en su mayoría en ecosistemas tropicales y templados. La tribu Sophoreae (*Ormosia* spp.) posee nódulos indeterminados.

Las características morfológicas de nódulos y mecanismos de infección han evolucionado a través de millones de años, de esta forma la tribu Dalbergieae con atributos primitivos, se estima que inicio la simbiosis aproximadamente hace 55.3 millones de años. Actualmente mediante la ayuda de técnicas moleculares, algunos géneros de esta tribu (*Andira* e *Hymenolobium*) se han clasificado dentro de la subfamilia Caesalpinoideae, los mismos que poseen nódulos indeterminados. Tribus recientes (<10 millones de años), como Phaseoleae poseen nódulos determinado de tipo aeschynomenoid y mecanismos claros de infección (Sprent, 2007).

De 68 especies examinadas de árboles tropicales de la sub familia Papilionoideae, a través de pruebas de reducción de acetileno en nódulos o estructuras sospechosas de serlo; además de inoculación con una mezcla de 222 y 209 cepas de *Rhizobium* spp; 46 especies fueron reportadas positivas en nodulación (30 reportadas por primera vez). La presencia de nódulos incluyen algunos géneros de cuatro tribus que poseen atributos primitivos Dalbergieae, Sophoreae, Tephrosieae y Swartzieae, y dentro de estas tribus cuatro géneros *Bowdichia*, *Ateleia*, *Dahlsterdtia* y *Poecilanthe*. De aquellas especies evaluadas a los tres meses de haber inoculado, *Myroxylon peruiferum* L. f, fue reportado negativo en cuanto a nodulación (De Faria *et al.*, 1984).

Brockwell (1991), menciona que *Cajanus cajan* nodula con biovares de *Bradyrhizobium* y fija nitrógeno en suelos arcillosos con pH ácidos entre 5.5 - 6.5, la nodulación es baja en comparación a otras leguminosas, debido a la escasa colonización de la rizósfera y en algunos casos a la presencia de suelos de pH neutro a alcalino. La cepa puede producir altos rendimientos en campo, iguales al fertilizar con 50 kg/ha de nitrógeno.

4.14.5. Fijación de nitrógeno por bacterias de vida libre en leguminosas y no leguminosas

Existen tres subgrupos dentro del grupo de organismos heterótrofos de vida libre. El primer grupo comprende aquellos microorganismos anaerobios obligados, los mismos que usan la fermentación o la respiración anaerobia para fijar nitrógeno y crecer. El segundo grupo corresponde a los anaerobios facultativos (p.e. *Bacillus*), usan la fermentación y en algunos casos la respiración aeróbica para la diazotrofia. El tercer grupo abarca a microorganismos aerobios obligados, los mismos que usan la respiración aeróbica para crecer y fijar nitrógeno, este a su vez comprende a los microaerófilos, pueden ser tolerantes al oxígeno mientras fijan nitrógeno (*Azospirillum*, *Acetobacter*, *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas*; entre otros), y a los

fijadores de nitrógeno aerotolerantes (*Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Azomonas*), sin embargo, algunas cepas como *A. chroococcum* requieren condiciones microaerofílicas para iniciar la diazotropía (Stacey *et al.*, 1992).

Una evaluación del suelo rizosférico en el cultivo de arroz en Colombia, demostró la presencia de 69 grupos de bacterias, 51% eran *Pseudomonas*, 26% del género *Azotobacter*, de las especies *A. vinelandii*, *A. chroococcum* y *A. nigrificans*, estos porcentajes fueron muy similares a los encontrados en la rizósfera del maíz (Torres *et al.*, 2000).

Azotobacter, Fija N₂ en condiciones aerobias, poseen protección para la enzima nitrogenasa, y se desarrollan estrictamente en suelos de pH neutro y ligeramente ácido como en algunos suelos del trópico húmedo (Giller, 2001).

Azotobacter establece una relación asociativa no específica con muchas especies de plantas pertenecientes a diferentes familias botánicas; este género se ha encontrado en la rizósfera de plantas jóvenes de leguminosas como la soya así como en maíz, avena, y algunos pastos; cierta especificidad se ha observado entre *Paspallum* y *Azotobacter paspali* (Bashan *et al.*, 1996). El género *Azotobacter* puede asociarse con la rizósfera de algunas plantas de manera temporal, cuando las condiciones ambientales y de cultivo pudieran ser adversas, con la finalidad de adquirir carbono y suministros energéticos a través de los exudados de las raíces o sustancias provenientes de la descomposición de materiales orgánicos. Su población puede variar especialmente de acuerdo a la especie y edad de la planta, tipo de suelo (Elkan, 1987).

Entre los factores determinantes para la dinámica poblacional e incrementos en la actividad de la nitrogenasa de las bacterias no simbióticas fijadoras de nitrógeno se encuentran: humedad del suelo (no menor al 50% de su capacidad de campo), temperatura (30°C a 35°C), textura (> 50 % de arcilla), cultivos anteriores (por ejemplo, la población de endofitos puede ser < 1x10² bacterias

como número más probable (NMP)/g⁻¹ en cultivos de leguminosas, 1x10⁵ bacterias como (NMP)/g⁻¹ en cultivos de cereales, con alta disponibilidad de rastrojo con relaciones C:N como fuente de carbono, y 1x10² bacterias como NMP/g⁻¹ en zonas con bajas entradas de residuos de plantas) y pH cercanos a la neutralidad. La actividad de la nitrogenasa aumenta considerablemente en estas condiciones ideales (0.75 kg N/ha/día, aproximadamente 3 nmol de acetileno reducido cm²h⁻¹). La contribución de nitrógeno a un cultivo intensivo de trigo por parte de las bacterias no simbióticas de vida libre puede ser hasta 25 kg de N/ha⁻¹/año⁻¹, un 30 a 50 % de la demanda total (Gupta *et al.*, 2006).

Ensayos de inoculación con *Azotobacter chroococcum* en *Setaria italica* en condiciones controladas de invernadero, presentaron incrementos en peso y contenido de nitrógeno en las panículas. No obstante en campo la inoculación no fue significativa. Otros ensayos de inoculación en plantas de avena en macetas no incrementaron el rendimiento, sin embargo el contenido de nitrógeno en el suelo al final del experimento fue significativo, similar a la concentración de N adicionado como fertilizante (Bashan, 1996).

Azotobacter aislado de la caña de azúcar, fija 10 mg de N de la atmósfera por cada gramo de carbono consumido, además de producir reguladores de crecimiento como giberelinas, citocininas y ácido indolacético. Se ha demostrado que induce el crecimiento del sistema radical en caña de azúcar hasta en un 10 % y 35 % en ápices. Esta asociación permite mantener los suelos por décadas, con una baja utilización de fertilizantes sintéticos (Gracioli y Freitas, citado por Arteaga, 1997).

La rizósfera de soya, y otras leguminosas contienen cantidades abundantes de bacterias en relación a suelos adyacentes; la abundancia varía en cada zona de la rizósfera. Algunos cultivos como el girasol, maíz, y remolacha poseen diferentes asociaciones con *Azotobacter*. Así, por ejemplo, el incremento en producción de remolacha en campo inoculada con *A. chroococcum* ha sido hasta

de 26%. El número de bacterias de *Azotobacter* sp. encontradas en la rizósfera de la remolacha se encuentra entre $3 - 12 \times 10^3$ (Mrkovac̃ki y Milic, 2001).

La inoculación de algodón con *Azotobacter* incrementó ligeramente el contenido de aceite de la semilla, además de promover el vigor de las plantas germinadas, y de reducir el número de semillas germinadas anormalmente o muertas. Además se registró un incremento de 19% en el número de cápsulas de algodón por planta (Bashan *et al.*, 1996).

La mayoría de las cepas de *Azospirillum* colonizan el exterior de las raíces, poseen una cercana asociación a dicho órgano; sin embargo, también en algunos casos coloniza como bacteria endófitas; denominada así porque ha sido encontrada en el interior del tejido de la epidermis. Estas son Gram negativas, aerobias, pero fijan nitrógeno en condiciones microaerobias porque no tienen el mecanismo para proteger a la nitrogenasa del O_2 y en su mayoría son endófitos facultativos, capaces de tener una etapa de vida libre en el suelo y poseer una cercana asociación con las raíces de algunos cereales (maíz, sorgo, trigo, arroz, y pastos), y también en no cereales (Giller, 2001).

Cepas de *Azospirillum brasilense*, *A. lipoferum*, *A. amazonense* se han aislado de la rizósfera de raíces de cereales como trigo, arroz y algunos pastos, pero también hay evidencias de que este género coloniza plantas que no son cereales (Hassan *et al.*, 1998). *Azospirillum* hacia pastos tropicales puede fijar entre $30 - 40 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$. La fijación es superior a $200 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ con la asociación entre caña de azúcar y *Azospirillum* (Swedrzynska y Sawicka, 2000).

El 90 % de los suelos tropicales presentan *Azospirillum*, mientras que en suelos templados se reduce su presencia a 60%. La inoculación de maíz con *Azospirillum brasilense*, incremento el vigor de las plantas en campo y se

obtuvo un 17 % más de rendimiento que en aquellos tratamientos sin inocular (Swedrzynska y Sawicka, 2000).

4.14.6. *Azotobacter* y otros géneros de bacterias fijadoras de nitrógeno en leguminosas arbóreas tropicales

Árboles de *Cajanus cajan*, inoculados con rizobacterias promotoras de crecimiento (*Pseudomonas* spp., *Bacillus cereus* y *Azotobacter*), y con una cepa de *Rhizobium* presentaron un incremento significativo de fijación de nitrógeno; la ocupación de nódulos fue de 50% cuando se inoculó *Rhizobium* solo y de 85 % cuando se inoculó *Rhizobium* en conjunto con *Pseudomonas putida* (Tilak et al., 2006).

La inoculación en *Sesbania* spp., con cepas de *Rhizobium sesbani* y *A. chroococcum* y/o *A. vinelandii*, incrementó significativamente la actividad de la nitrogenasa (Bashan, 1996).

4.14.7. *Azotobacter* como promotor de crecimiento

Azotobacter promueve el crecimiento y rendimiento de algunas plantas mediante la producción de hormonas promotoras del crecimiento vegetal. La liberación de estas sustancias depende del estado fisiológico de la bacteria, edad de los cultivos y las cantidades de nitratos presentes en el suelo; el exceso de nitratos inhibe la liberación de auxinas, mientras que la deficiencia de este compuesto incrementa la producción de giberelinas (González y LLunch, 1992).

Azotobacter produce ácido indol-3-acético (IAA) cuando el aminoácido triptófano es añadido al medio de crecimiento. Así mismo se han detectado tres sustancias muy similares a giberelinas en cepas de *A. chroococcum* (0.01 y 0.1 $\mu\text{g GA}_3 \text{ eq ml}^{-1}$). En otras cepas se obtuvieron concentraciones de giberelinas de (9.6-19.8 $\mu\text{g de GA eq L L}^{-1}$ medio). También se ha observado que la rizobacterias producen citoquininas (Mrkovački y Milic, 2001).

La producción de citoquininas, auxinas, y otras sustancias muy similares a las giberelinas por parte de *Azotobacter chroococcum* y *Azotobacter beijerinckii* en la rizósfera de tomate, incrementó la germinación y desarrollo de plántulas (Mrkovac̃ki y Milic, 2001).

La producción de ácido indol-3-acético (IAA) en ensayos realizados con 19 especies de *Azotobacter* spp. aisladas de la rizósfera del cultivo de arroz y sembradas en medios suplementados con triptófano, presentaron concentraciones altas de (IAA). Así, *A. chroococcum* y *A. vinelandii* produjeron (32.2 mg de IAA L⁻¹), mientras que *Enterobacter* sp. produjo 10.2 mg de IAA L⁻¹ (Torres *et al.*, 2000).

La cepa *A. chroococcum* productora de citocinina en combinación con precursores sintéticos de la misma hormona fueron inoculados en plantas de maíz, en macetas en invernadero. Los resultados indicaron que aumentaron hasta en cinco veces los parámetros de crecimiento de las plantas; así como el rendimiento vegetal, que ha sido atribuido principalmente a la producción de dicha hormona de crecimiento por parte de la bacteria (Bashan *et al.*, 1996).

Los incrementos en germinación y desarrollo de algunos cultivos como *Cicer arietinum*, *Phaseolus mungo*, *Vigna catjung*, *Zea mays*, pastos anuales y perennes; son atribuidos más a la capacidad de *Azotobacter* spp. de producir sustancias de crecimiento como el IAA y compuestos quelatantes como el sideróforo azotobactina que a la actividad diazotrófica (Tilak *et al.*, 2005).

Cabe mencionar que los microorganismos promotores de crecimiento además de influenciar directamente el crecimiento de ciertas plantas a través de la producción de fitohormonas e indirectamente a través de la fijación de nitrógeno, producen también agentes de biocontrol en contra de fitopatógenos propios del suelo (Tilak *et al.*, 2006).

4.14.8. Grado de eficiencia entre la asociación *Azotobacter* sp. y plantas

El vínculo entre plantas y cepas de microorganismos va a depender de ciertas características como son: Composición cualitativa y cuantitativa de los exudados de las raíces, especificidad del metabolismo de la cepa, habilidad de sintetizar fitohormonas tanto de la planta como de la cepa, habilidad de producir inhibidores por parte de la cepa, capacidad de colonizar la superficie de la raíz y en algunos casos penetrar al tejido de la planta, influencia de los factores ambientales a nivel de rizósfera (pH, pO₂, CO₂, rH₂) y especificidad del genotipo de la planta considerando la captación y transporte del nitrógeno (Mrkovac̃ki y Milic, 2001).

También la eficiencia de la asociación entre microorganismos y plantas va a depender de la disponibilidad de carbono como recurso energético para los procesos intensivos de fijación de nitrógeno (Tilak *et al.*, 2005) y de la capacidad de los microorganismos de trasladarse de la semilla a las raíces e incrementar su número en la rizósfera (Bashan *et al.*, 1996).

4.15. Utilización de las leguminosas arbóreas tropicales en sistemas

Agroforestales

Los sistemas agroforestales ofrecen una oportunidad única para explotar las cualidades que pueden brindar los árboles o perennes leñosas como fijadores de nitrógeno. Con esta cualidad han sido reconocidas aproximadamente 650 especies de árboles y se sospecha que varios miles también pueden serlo (Nair, 1997).

Algunos árboles además de proveer sombra en algunos cultivos de frutales, fijan importantes cantidades de nitrógeno, a través de la asociación *Rhizobium*-leguminosas. Algunos ejemplos: *Inga jinicuil* en plantaciones de café en México fija 47 kg N₂ ha⁻¹ año⁻¹, además reduce la germinación de malezas y es fuente de leña; *Erythrina poeppigiana* con café fija 330 kg N₂ ha⁻¹ año⁻¹ a través de la

aportación de grandes cantidades de materia orgánica; *Mimosa scabrella*, además de fijar nitrógeno, es utilizado como árbol de sombra y para producción de madera; *Sesbania sesban* en contorno con pasto, aumentó el contenido de proteína en dieta de rumiantes (Bryan, 2000).

Las especies de leguminosas arbóreas más utilizadas en sistemas agroforestales con la finalidad de fijar nitrógeno en el suelo son: *Leucaena leucocephala*, que fija entre 75 a 100 kg N₂ ha⁻¹ año⁻¹ cuando es dispuesta en contorno, además de *Sesbania sesban*, *Gliricidia sepium*, *Albizia lebbeck*, y *Acacia mangium*, que fijan entre 50 a 100 kg N₂ ha⁻¹ año⁻¹ (Young, 1997).

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Experimentos de germinación con *Myroxylon balsamum*

5.1.1. Ubicación del área de colecta de la semilla

El área de colecta fue seleccionada mediante registros de especímenes de *Myroxylon balsamum* (L.) Harms, en el herbario de la Universidad Autónoma de México.

En el estado de Veracruz, fueron determinados dos sitios de colecta; el primero en la localidad de Hueyapan de Ocampo, municipio de Ocampo Loma Larga, donde fueron identificados dos individuos adultos de grandes dimensiones. El segundo sitio de colecta en la localidad del Salto de Eyipantla, Municipio de San Andrés Tuxtla, en donde fueron localizados algunos individuos; sin embargo, el tiempo de colecta (inicios del mes de octubre), no coincidió con los registros bibliográficos de fenología de la especie, razón por la cual se realizó una segunda visita de colecta, únicamente en la localidad del Salto de Eyipantla (Figura 2).

Los frutos colectados presentaron una coloración de verde amarillento a amarillo claro.

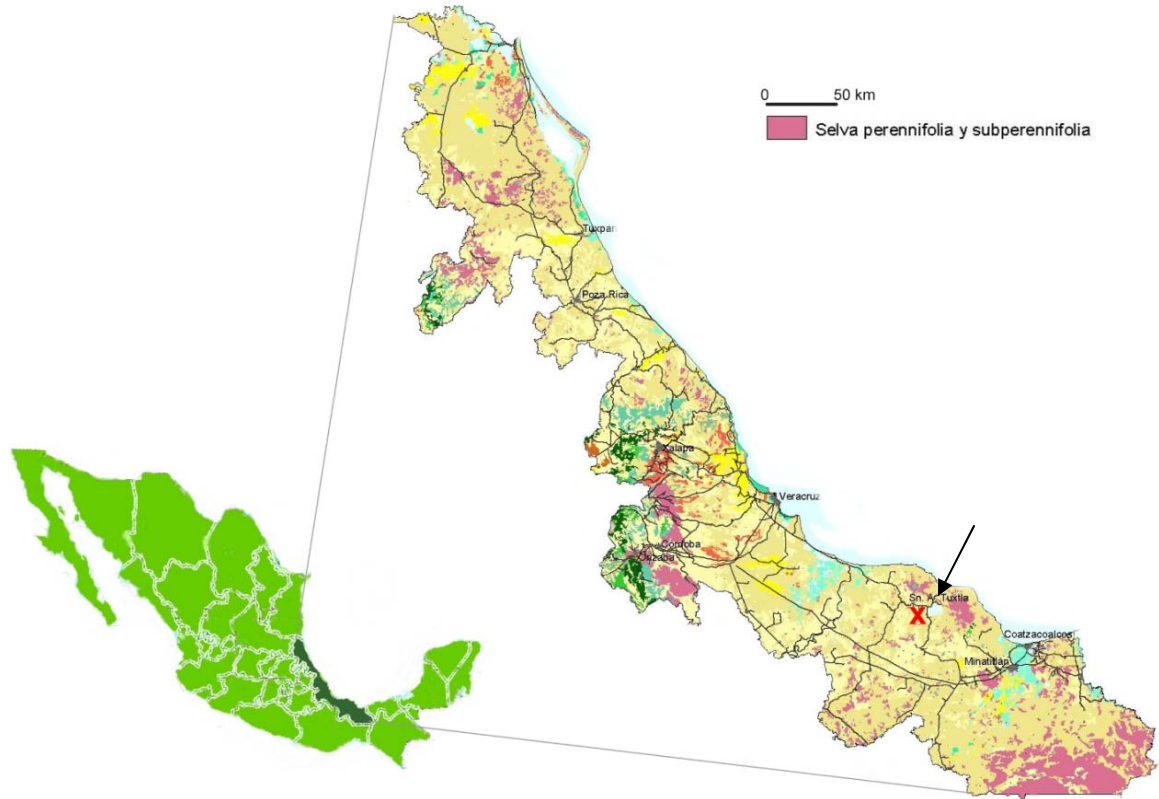


Figura 2. Localización geográfica del área de estudio. Salto Eyipantla, San Andrés Tuxtla. Adaptado del mapa de vegetación y uso del suelo. Estado de Veracruz. Semarnat y Instituto Nacional de Ecología. 2000.

5.1.2. Prueba de autenticidad

La prueba de autenticidad fue a través de la identificación de muestras, en el herbario de la División de Ciencias Forestales de la Universidad Autónoma Chapingo.

5.1.3. Tratamiento post cosecha y almacenamiento de los frutos después de la colecta

Se procedió a separar frutos enfermos y dañados de los sanos; fueron secados bajo sombra, el primer día con ventilador y posteriormente por 10 días en condiciones normales de aireación.

Los frutos fueron almacenados en bolsas de papel, a temperatura ambiente.

5.1.4. Análisis de peso, contenido de humedad y viabilidad de la semilla

El análisis comprende peso de frutos y semillas, contenido de humedad y viabilidad de la semilla.

Para peso de frutos y semillas, en total se tomó una muestra al azar de 40 frutos, posterior se realizó la escarificación de los mismos hasta obtener semilla.

Para el contenido de humedad, primero se pesaron 20 semillas en fresco, y posterior se procedió a la deshidratación al ser introducidas en la estufa a 75°C hasta obtener peso constante. La fórmula para esta determinación, es la siguiente (Bonner, 1993):

$$CH_0 \text{ Base anhidra} = \left[\frac{\text{peso fresco de la semilla} - \text{peso seco de la semilla}}{\text{peso seco de la semilla}} \right] (100)$$

La prueba de viabilidad, fue realizada a través del teñido histoquímico con una solución al 1% de sales de cloruro de 2, 3, 5 trifenil tetrazolio. Previo a realizar la tinción se preparó la semilla, fue retirado el pericarpio para permitir un contacto directo del reactivo con el embrión. Veinte semillas fueron sumergidas en dicha solución y cubiertas con papel aluminio. Las semillas se dejaron en obscuridad por 24 horas y se introdujeron en una cámara de ambiente controlado a 30°C. Se tomaron como viables aquellas semillas en las que se tiñeron el embrión y partes de los cotiledones (Martínez, 1996; Bonner, 1993).

5.1.5. Germinación

Los análisis de la semilla y dos ensayos de germinación fueron realizados en una cámara de ambiente controlado, en el Laboratorio de Semillas Forestales, de la División de Ciencias Forestales de la Universidad Autónoma Chapingo.

Previo a los ensayos de germinación, se esterilizó el sustrato (agrolita) en autoclave a 120°C por tres horas y desinfectó con alcohol los materiales y cámara de germinación. El sustrato fue colocado en envases de vidrio con tapa de 10 cm de alto x 10 cm de ancho. Se humedeció sin inundar, con una solución de captan (3 g L⁻¹).

La germinación fue considerada la variable en estudio, cuando la radícula alcanzó la longitud de la semilla (1 cm–1.5 cm). Las observaciones fueron realizadas diariamente hasta la culminación de dicho proceso.

La energía germinativa fue considerada como el tiempo en días, que tarda la semilla en alcanzar un porcentaje de 70%, con respecto a su germinación potencial. Se utilizó la siguiente fórmula:

$$EG = (\text{Germinación potencial}) \times (0.7)$$

Debido a la presencia permanente de fitopatógenos¹ como *Aspergillus* sp. y *Fusarium* sp., en sus fases sexuales como asexuales, fueron realizados controles sanitarios quincenales con fungicidas como mancozeb (1.5 g L⁻¹) y captan (3 g L⁻¹), además de cambio de sustrato.

¹ Patógenos identificados por la M.C. Silvia García Díaz. Laboratorio de Fitopatología. División de Ciencias Forestales. Universidad Autónoma Chapingo.

5.1.5.1. Ensayo con escarificación mecánica e intensidades de luz

Se realizó la escarificación mecánica de los frutos de *M. balsamum* como tratamientos pre germinativos:

e1= Fruto completo sin escarificación mecánica

e2= Corte longitudinal del fruto en vista hilar

e3= Embrión descubierto

Con la finalidad de no causar ningún daño en la semilla, especialmente en aquella zona vulnerable que da origen a la radícula y plúmula, al momento de la escarificación, fue propuesta una secuencia de pasos:

- 1) Remojo de los frutos en agua por una hora.
- 2) Reconocer en el fruto la zona hilar y dorsal.
- 3) Con la ayuda de una tijera de podar, iniciar el corte del pericarpio en zona dorsal hasta llegar a la cubierta seminal.
- 4) Abrir cuidadosamente la cubierta seminal hasta descubrir a la semilla, en zona dorsal.

Las intensidades de luz a las que fueron sometidas las unidades experimentales dentro de la cámara de germinación fueron relacionadas a la ecología, y estudios realizados por Augspurgeruz (1984), y fueron: s1= 0% de sombra, y s2=70 % de sombra, forrando las cajas petri con malla sombra. El régimen de temperatura utilizado en el ensayo fue de 27°C día y 23°C noche.

5.1.5.1.1. Establecimiento de tratamientos y diseño experimental

Fue empleado un diseño de bloques completamente al azar (DBCA), factorial 3 x 2 (tres niveles de escarificación y dos niveles de sombra). Los datos fueron transformados con arco seno. Se utilizaron cinco repeticiones para cada combinación de los niveles de los factores.

5.1.5.1.2. Modelo estadístico

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\delta)_{ik} + \varepsilon_{ijkl}$$

5.1.5.1.3. Análisis estadístico

El análisis de varianza fue analizado con el programa SAS, versión 8.

5.1.5.1.4. Variables en estudio

Se evaluó germinación y energía germinativa. A los 15 días después de haber germinado las semillas (al momento del transplante al invernadero), se evaluó en las plántulas: altura, número de hojas y diámetro.

5.1.5.2. Ensayo con intensidades de luz y regímenes de temperatura

Los regímenes de temperatura, fueron considerados en base a los promedios de temperatura media, obtenidos desde 1995 al 2005 en los meses de noviembre y mayo.

Las variaciones de temperatura fueron las siguientes en el día y noche:

t1= 23 °C día/19 °C noche

t2= 27 °C día/23 °C noche

Las intensidades de luz a las que fueron sometidas las unidades experimentales dentro de la cámara de germinación fueron relacionadas con la ecología, estatus ecológico de la especie, y estudios realizados por Augspurgeruz (1984), y fueron: sin sombra y con sombra intensa, forrando las cajas petri con malla de 70% de sombra.

En el presente ensayo, los frutos fueron escarificados hasta descubrir completamente al embrión.

5.1.5.2.1. Establecimiento de tratamientos y diseño experimental

Fue empleado un diseño de bloques completamente al azar (DBCA). Factorial 2 x 2 (dos niveles de sombra y dos niveles de temperatura), con cinco repeticiones.

5.1.5.2.2. Modelo estadístico

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \delta_K + (\alpha\delta)_{ik} + \alpha_i(\beta_j)\delta_k + \varepsilon_{ijkl}$$

5.1.5.2.3. Análisis estadístico

El análisis de varianza fue realizado con procedimiento mixto (proc mixed) del programa SAS, versión 8 para microcomputadora.

5.1.5.2.4. Variables en estudio

Se evaluó germinación y energía germinativa.

5.2. Experimentos en invernadero

5.2.1. Preparación del sustrato y sus características

El sustrato utilizado para el llenado de bolsas de polietileno de 10 cm x 20 cm, fue una mezcla de 25% de residuos orgánicos descompuestos por un año, 60% de suelo y 15% de arena de río. El sustrato fue previamente esterilizado con lucafum (N-metil-ditlocarbamato de sodio), con una semana de anticipación.

5.2.2. Propiedades físico-químicas del sustrato

Las propiedades físico-químicas del sustrato, fueron determinadas en el laboratorio de nutrición de cultivos del colegio de Postgraduados y en el laboratorio Central Universitario de la Universidad Autónoma Chapingo. El porcentaje de Nitrógeno Total, fue determinado por arrastre de vapor (Kejdahl),

el porcentaje de Fósforo fue determinado por el método de fotolorimetría, y el porcentaje de Potasio a través del método de espectrofotometría de emisión de flama.

5.2.3. Condiciones de luminosidad en invernadero

La cantidad de sombra utilizada en invernadero, fue relacionada a la ecología, estatus ecológico de la especie, y estudios anteriores con *Myroxylon balsamum* (Augspurgeruz, 1984). Se estableció las condiciones de sombra con malla de 50% y 70%. La radiación fotosintéticamente activa se midió en un día despejado en el mes de junio, con un aparato medidor de fotosíntesis IRGA (BioScientific LTD. USA).

El porcentaje de sombra inicial en invernadero durante el primer mes fue $s_1=0\%$ de sombra y $s_2=70\%$ sombra. Con la finalidad de mantener un número adecuado de unidades experimentales para realizar la inoculación con bacterias fijadoras de nitrógeno, se utilizó a partir del segundo mes y hasta la evaluación final $s_1= 50\%$ de sombra y $s_2= 70\%$ de sombra. Los datos climatológicos durante los meses en que se estableció el ensayo, se presentan en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Datos climatológicos durante los meses en que se estableció el ensayo. Observatorio de Chapingo. 2007.

Meses	Temperatura media (°C)	Temperatura máxima (°C)	Humedad Relativa (%)	Nubosidad [†]
Julio	19.4	24.8	63	MNV - NUB
Agosto	19.0	23.9	65	MNV - NUB
Septiembre	17.9	23.3	68	NUB- MNV
Octubre	17.0	22.6	56	MNV -DSP

[†]: Condiciones de nubosidad: MNV = Medio nublado DSP= Cielo disipado

NUB = Nublado

5.2.4. Trasplante en invernadero

Las plántulas de *M. balsamum* obtenidas a partir de los mejores tratamientos del segundo ensayo de germinación en laboratorio (embrión descubierto y corte longitudinal), fueron trasplantadas a los quince días de iniciada la germinación a condiciones de invernadero.

5.2.5. Preparación del inóculo de *Azotobacter beijerinckii*

El medio utilizado para la multiplicación de *Azotobacter beijerinckii*, fue el de Ashby - Manitol (Anexo 7). Esterilizado en auto clave a 18 atmósferas de presión por 18 minutos. El vaciado del medio a cajas petri fue realizado en condiciones de asepsia en cámara de flujo laminar.

Se usó una cepa pura de *Azotobacter beijerinckii* 11 KMO, procedente de la colección microbiana del laboratorio de microbiología del Colegio de Postgraduados. La cepa se sembró por estría cruzada en el medio, y las cajas sembradas con la cepa se incubaron por 8 días a 28°C.

Colonias aisladas se utilizaron para preparar el inóculo en medio Ashby – Manitol líquido; se utilizaron 10 botellas conteniendo 50 ml de medio; cada botella se inoculó con las muestras de colonias tomadas del medio sólido. El material se llevó a incubación – agitación a 28°C y 150 rpm por ocho días hasta que el medio presentó una coloración blanca turbia. El cultivo bacteriano de las diez botellas se homogenizó para preparar el inóculo.

Antes de usar el inóculo, se tomó una muestra para cuantificar la concentración de bacterias de *A. beijerinckii* presente en el medio. Se tomó 1 ml de inóculo y se realizaron diluciones seriadas, desde 10^{-1} hasta 10^{-7} en un número de tres repeticiones. Un volumen de 0.1 ml de cada una de las diluciones de 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} se sembró y distribuyó homogéneamente en cajas con medio Ashby –

manitol (por triplicado), luego se incubaron las cajas por ocho días a 28°C hasta observar la presencia de colonias. Para el conteo de número de colonias, se utilizó la dilución 10^6 , fue aquella en la que las colonias se encontraban más separadas, y se podían reconocer morfológicamente. La población promedio resultante de las tres repeticiones en la dilución 10^{-6} fue de 54 colonias.

5.2.6. Inoculación de *Azotobacter beijerinckii* en árboles de *M. balsamum*

Al mes del trasplante de *M. balsamum*, se procedió a inocular *Azotobacter beijerinckii*, colocando 10 ml de cultivo, diluido en 10 ml de agua destilada por árbol. El inóculo presentó una población de 5.4×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro de inóculo y 5.4×10^9 unidades formadoras de colonias (UFC) por 10 ml de inóculo (i1= inoculación). También fueron utilizados testigos (i0= sin inoculación).

5.2.7. Cuantificación de microorganismos fijadores de nitrógeno en sustrato de *Myroxylon balsamum*

A los sesenta días de la inoculación en el sustrato, con la finalidad de evaluar la población de bacterias fijadoras de nitrógeno, se extrajo una muestra de sustrato (10 g) de cada una de las unidades experimentales inoculadas como no inoculadas.

Los 10 g de cada una de las muestras de sustrato, se colocaron en botellas con 90 ml de agua destilada estéril, luego se realizaron diluciones seriadas hasta la dilución 10^{-7} . De cada una de las diluciones entre 10^{-4} , 10^{-5} 10^{-6} se tomaron 0.1 ml y se distribuyeron en cajas de petri con medio de Rennie para determinar las poblaciones de microorganismos fijadores de nitrógeno (Anexo 8). Las cajas se incubaron a 28°C, hasta observar la presencia de colonias. Para la cuantificación de colonias se escogió la dilución 10^{-5} .

5.2.8. Establecimiento de tratamientos y diseño experimental

En la etapa de invernadero, se implementó un DBCA, factorial 2x 2 x 2. Cada combinación entre factores fue conformado por ocho unidades experimentales en el primer mes de establecidos y cuatro unidades experimentales hasta el final del ciclo en invernadero.

5.2.9. Modelo estadístico

$$Y_{ijklm} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_l + (\alpha\delta)_{ik} + (\alpha\gamma)_{jl} + \varepsilon_{ijklm}$$

5.2.10. Análisis estadístico

El análisis de varianza fue analizado con el programa SAS, versión 8 para microcomputadora.

5.2.11. Variables de estudio

Al mes después del trasplante en invernadero, una vez establecido el experimento con los porcentajes de sombra de 0% y 70%, fue evaluada supervivencia.

A los sesenta días después de la inoculación en *M. balsamum* en invernadero, se cuantificó la población de microorganismos fijadores de nitrógeno por gramo de suelo seco.

Al final de un ciclo de cuatro meses en invernadero (junio a octubre), con 50% y 70% de sombra, e inoculación con *Azotobacter beijerinckii*, fueron evaluadas las siguientes variables:

a) Variables morfológicas como:

- Peso seco de follaje (g).
- Peso seco de raíz (g).
- Altura de la planta (cm).
- Número de hojas (número).
- Diámetro del tallo (mm).
- Área foliar (cm²).

Además del contenido de nitrógeno en sustrato (%).

b) Índices morfológicos (Rodríguez, 2008):

- Coeficiente de esbeltez (altura en centímetros/diámetro en milímetro).
- Relación PSA/PSS (Peso seco aéreo en gramos/Peso seco subterráneo en gramos).

c) Parámetro de crecimiento (Lambers *et al.*, 1998):

- Razón de área foliar RAF (Área foliar en m²/Peso seco total en kilogramos).

5.3. Estudio de la fijación de nitrógeno del material colectado en campo

5.3.1. Área de muestreo de raíces de *Myroxylon balsamum* y suelo rizosférico

La toma de muestras de raíces y suelo rizosférico de *M. balsamum* fue realizado en el Campo Experimental “El Palmar” y en remanentes de selvas

subperenifolias en el Estado de Veracruz, Municipio de San Gabriel de Tezonapa, septiembre 2007 (Figura 3).

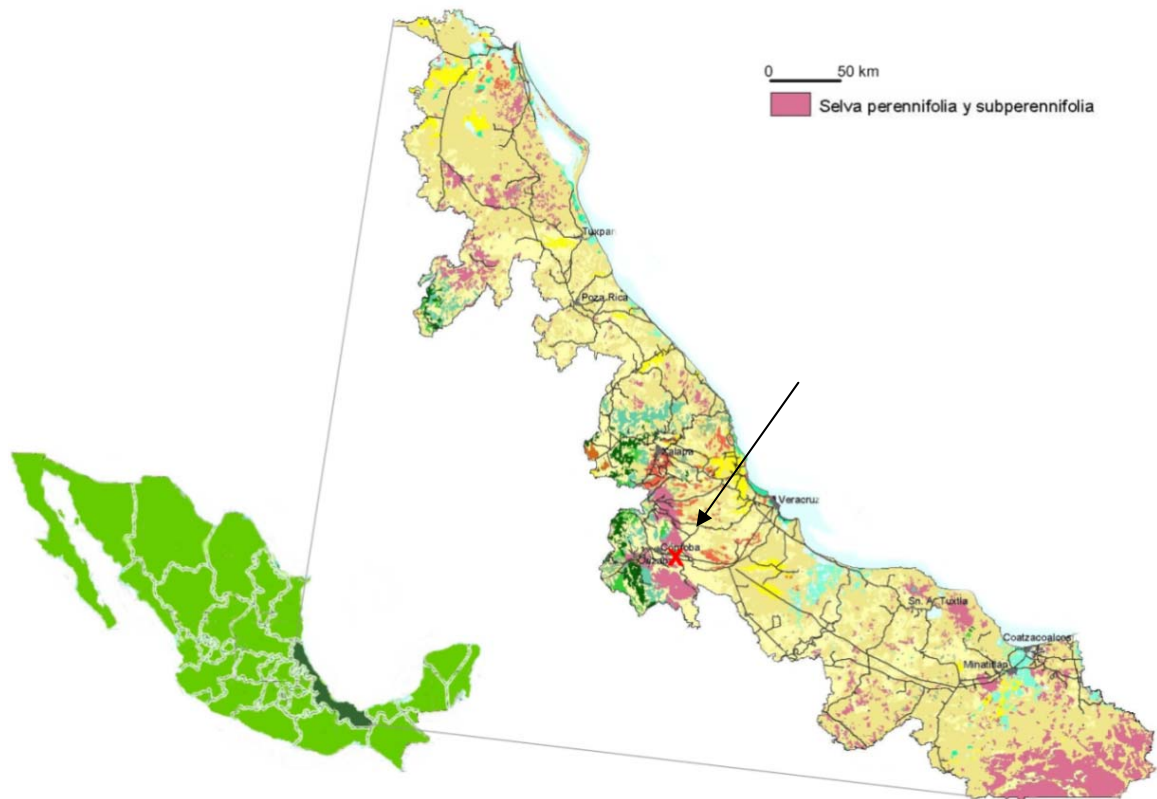


Figura 3. Localización geográfica del área de estudio. El Palmar, San Gabriel de Tezonapa. Adaptado del mapa de vegetación y uso del suelo, Estado de Veracruz. Semarnat y Instituto Nacional de Ecología. 2000.

5.3.2. Propiedades físico-químicas de las muestras de suelo

El análisis de las propiedades físico-químicas del suelo, fueron realizadas en el laboratorio Central Universitario de la Universidad Autónoma Chapingo. El porcentaje de Nitrógeno Total, fue determinado por arrastre de vapor (Kjeldahl), El contenido de Fósforo fue determinado por el método de Bray P-1.

5.3.3. Toma de muestras de raíces y detección de ausencia o presencia de nódulos en *Myroxylon balsamum*

Myroxylon balsamum (L.) Harms es una leguminosa que no se sabe con certeza si forma nódulos, los dos únicos estudios reportados a cerca de la formación de nódulos son contradictorios. En esta parte de nuestro trabajo se realizaron muestreos de raíces de diversos árboles de *M. balsamum* en una línea plantada en el arboretum del campo experimental el Palmar (CE) y en remanentes de selvas altas y medianas subperenifolias, ubicadas a unos pocos kilómetros del campo experimental en su entorno natural.

5.3.3.1. Colecta y observación de raíces en campo y laboratorio

Se eligieron al azar individuos de *M. balsamum* para realizar la colecta y observación de raíces. Lo pronunciado de la pendiente y lo pedregoso del terreno hizo difícil incluir a más individuos.

En los individuos seleccionados, se procedió a realizar una excavación cuidadosa a lo largo de las raíces secundarias con la finalidad de encontrar raicillas jóvenes, en los primeros 20 cm de profundidad. Se extrajeron muestras de raíces y se observaron detenidamente en el campo para detectar si existían algún tipo de estructuras similares a los nódulos que presentan leguminosas tropicales. Las muestras se guardaron en bolsas y se colocaron en una hielera para su conservación y traslado al laboratorio. También se colectaron muestras de suelo rizosférico en los mismos árboles donde se colectaron las raíces y se guardaron junto con éstas para su traslado.

En el laboratorio las raíces se lavaron cuidadosamente y se colocaron en un microscopio estereoscopio para observar las estructuras que presentaban en su superficie y se tomaron fotografías. Posteriormente con la ayuda de un bisturí

se hicieron cortes en las estructuras redondeadas externas que presentaban las raíces, estos cortes se observaron también en el estereoscopio para detectar posibles similitudes con los nódulos redondos que presentan leguminosas tropicales.

5.3.3.2. Aislamiento e identificación de bacterias presentes en protuberancias de raíces de *M. balsamum*

Las protuberancias observadas en las raíces colectadas fueron removidas junto con un pequeño trozo de raíz con la ayuda de un bisturí, luego estas fueron desinfectadas mediante inmersión en alcohol por 30 segundos, después de este proceso el material de tejido se colocó en bicloruro de mercurio (HgCl_2) por 20 segundos (Anexo 9).

En cajas con medio extracto de levadura manitol agar rojo congo (ELMARC) (Anexo 11) se inoculó una pequeña cantidad de macerado, y se distribuyó en la caja por estría cruzada. Las cajas de petri se incubaron a 28°C por 4 días, realizando observaciones diarias.

5.3.3.3. Caracterización de la morfología de cepas bacterianas encontradas en raíces de *M. balsamum*.

Una vez que crecieron colonias de bacterias en medio ELMARC, se determinó la morfología macroscópica (forma, color y tamaño). Mediante toma de muestras en portaobjetos, tinción y observación en el microscopio, fue determinada su morfología microscópica y reacción de Gram.

Para determinar la velocidad de crecimiento de las cepas en medio ELMARC, se realizaron observaciones cada 24 horas. También se realizó la siembra por

duplicado de cada una de las cepas en medio de leche tornasolada e incubación a 28 °C por 7 días.

5.3.3.4. Variables de estudio

Las variables cualitativas en la caracterización de la morfología de cepas bacterianas encontradas en raíces de *M. balsamum* fueron:

- Morfología colonial (elevación, forma y color).
- Morfología microscópica (forma, color en prueba de tinción de Gram).

5.3.4. Bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno en *M. balsamum*

5.3.4.1. Colecta de suelo rizosférico de *M. balsamum*

Se tomaron muestras de 100 g de suelo rizosférico en árboles del entorno natural (a1=entorno natural), y del campo experimental el Palmar (a2=campo experimental). Las muestras de suelo fueron tomadas aproximadamente de los primeros 20 centímetros de profundidad y colocadas en una hielera para mantenerlas a temperaturas frescas durante el traslado a laboratorio.

5.3.4.2. Cuantificación de bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno

Se pesaron 10 g de cada una de las muestras de suelo rizosférico y se colocaron en botellas con 90 ml de agua destilada estéril, luego se realizaron diluciones seriadas hasta la dilución 10^{-5} y se distribuyeron en cajas de petri con medio de Agar Nutriente para determinar las poblaciones de bacterias totales

(Anexo 10) y con medio de Rennie para determinar las poblaciones de bacterias fijadoras de nitrógeno (Anexo 8). Las cajas se incubaron a 28°C y entre los 4 y 5 días se contaron el número de colonias en los medios.

5.3.4.3. Análisis estadístico

El análisis de las poblaciones de bacterias totales y bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre, de muestras obtenidas en las dos áreas de estudio (entorno natural y campo experimental, fue realizado en base a T student.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Experimentos de germinación con *Myroxylon balsamum*

6.1.1. Análisis de peso, contenido de humedad y viabilidad de la semilla

Un kilogramo contiene 107 frutos, con un peso promedio por fruto de 18.716 g; mientras que un kilogramo contiene 733 semillas, con un peso promedio por semilla de 1.41 g.

El contenido de humedad, base anhidra, presente en semillas a los diez días después de la colecta fue de 17.48%, y para las semillas almacenadas por 146 días fue de 5.52%.

La semilla puede comportarse como ortodoxa (Salazar, 1999; De Carvalho *et al.*, 2006), razón por lo cual pueden ser secadas hasta alcanzar los niveles obtenidos en la actual investigación. El metabolismo de la semilla es llevado al mínimo, es decir, se indujo a un estado de reposo hasta brindarle condiciones adecuadas de temperatura, humedad, luminosidad, y escarificación para dar inicio al proceso de germinación.

A los diez días de la cosecha el porcentaje de semillas viables fue de 89.29%, mientras que a los 146 días fue de 73.33%. El tiempo de almacenamiento y los contenidos de humedad presentes en las semillas, afectaron poco la viabilidad.

El contenido de humedad al almacenar semillas de *Myroxylon* sp., es un factor de importancia a considerar. De Carvalho *et al.* (2006), menciona que la germinación de semillas *Myroxylon peruiferum*, almacenadas por 90 días a 5°C

con 10.3% de humedad fue de (64%), mientras que con 31.5% de humedad, almacenadas en las mismas condiciones de temperatura, la germinación fue de 0%.

6.1.2. Germinación

6.1.2.1. Ensayo con escarificación mecánica e intensidades de luz

Se obtuvieron diferencias significativas en el modelo y el factor escarificación (Anexo 1). Se observó la mejor germinación al realizar escarificación total hasta descubrir al embrión (86.63%) y cuando fue realizado el corte longitudinal en vista hilar (75.61%); mientras que la condición en la que se obtuvo la menor germinación fue aquella sin ningún tipo de escarificación (12.83%), (Figura 4).

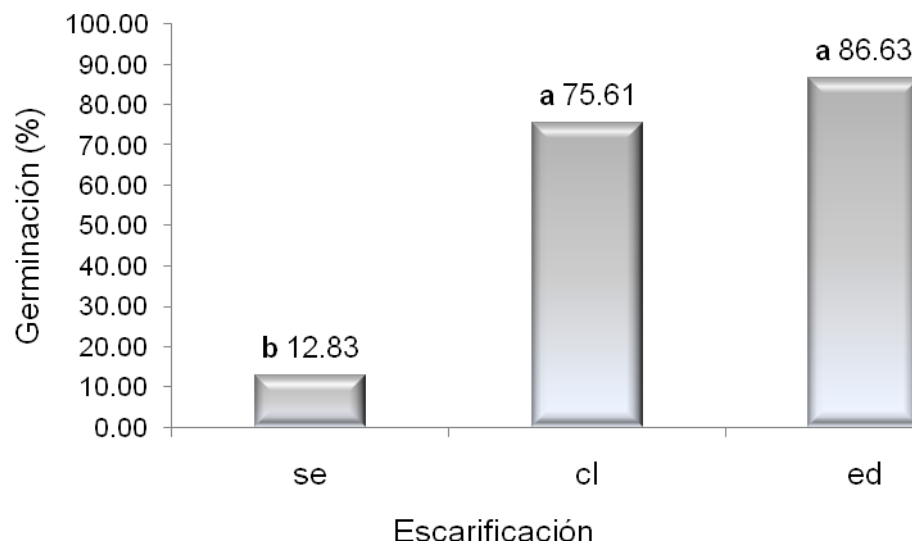


Figura 4. Germinación de *Myroxylon balsamum* con escarificación. se=sin escarificar, cl=corte longitudinal y ed=embrión descubierto. Régimen de temperatura 23/19. Las barras con diferente letra tuvieron diferencias significativas (Tukey, $p \leq 0.05$).

Los resultados obtenidos, superan aquellas respuestas de germinación en semillas de *M. balsamum* con corte en la parte inferior e inmersión en agua por un día 59% (Salazar, 1999).

Souza y Valio (2001) encontraron respuestas similares de germinación con frutos de *M. peruiferum* sin escarificar puestos a germinar en ambiente natural con poca luminosidad o bajo dosel (8.1%) y al borde del bosque (17.5%).

Cabe mencionar que la germinación acumulada y energía germinativa es reducida en número de días al realizar la escarificación completa hasta dejar al embrión descubierto totalmente con sombra y sin sombra.

Para altura y número de hojas al momento del trasplante, se observaron diferencias significativas en el modelo y para el factor escarificación; mientras que para diámetro fue en el factor sombra (Anexo 3). La mayor altura y número de hojas, se obtuvieron cuando se realizó la escarificación hasta descubrir al embrión (5.70 cm y 8 hojas); mientras que la menor altura y número de hojas fue al realizar el corte longitudinal (3.64 cm y 4 hojas), (Figura 6). Al realizar la prueba Tukey para el factor sombra en la variable diámetro, el mayor fue con 0% de sombra (1.77 mm), y el menor diámetro fue con 70% de sombra (1.64 mm).

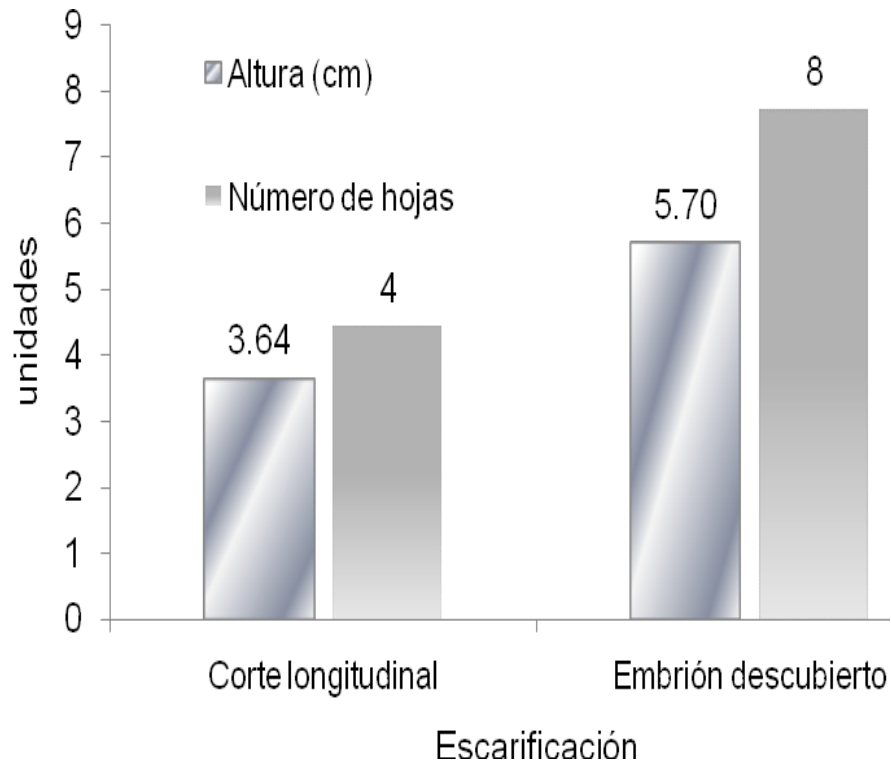


Figura 6. Altura y número de hojas al trasplante de *M. balsamum* al realizar escarificación.

6.1.2.2. Ensayo con intensidades de luz y regímenes de temperatura

No se encontraron diferencias significativas en el modelo y factores en estudio (Anexo 2). Las diferentes condiciones de temperatura y luminosidad utilizadas en el ensayo, pueden ser considerados factores externos que no limitaron dicho proceso (Figura 7).

Figliolia (2006) encuentra que la germinación de *M. peruiiferum* no es afectada por diferentes calidades de luz, sin embargo temperaturas alternas de 20°C-30°C favorecieron a la obtención de resultados más equilibrados de germinación (66%).

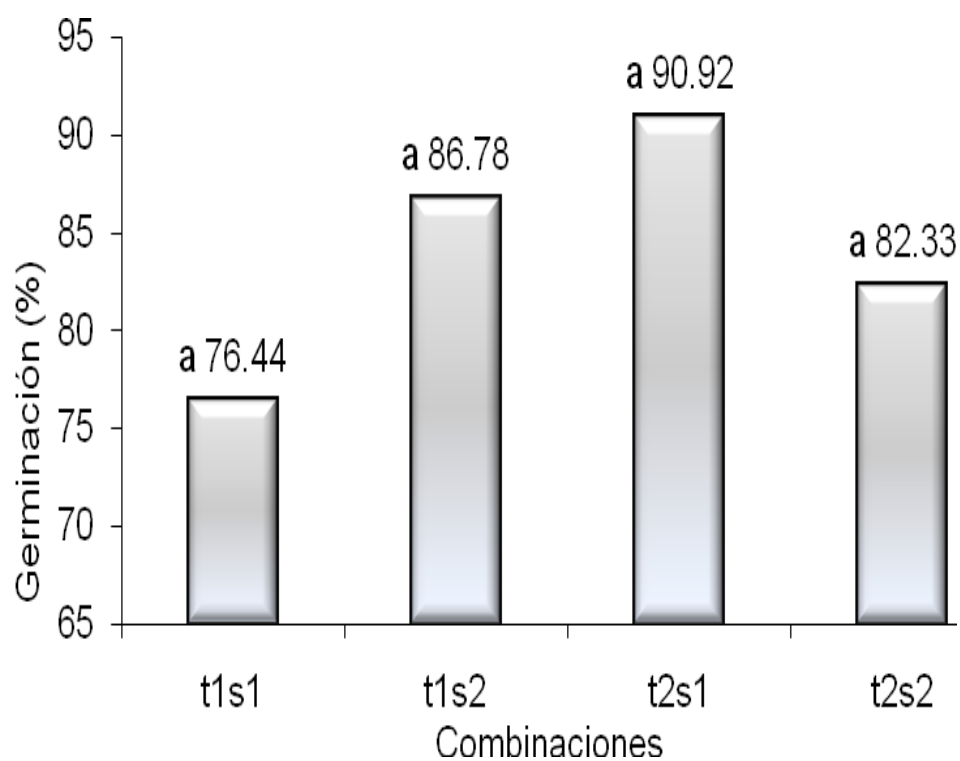


Figura 7. Promedios en la germinación de *Myroxylon balsamum*, para las combinaciones de los factores temperatura.

La germinación acumulada y energía germinativa, es reducida en días a medida que aumenta la temperatura (Figura 8).

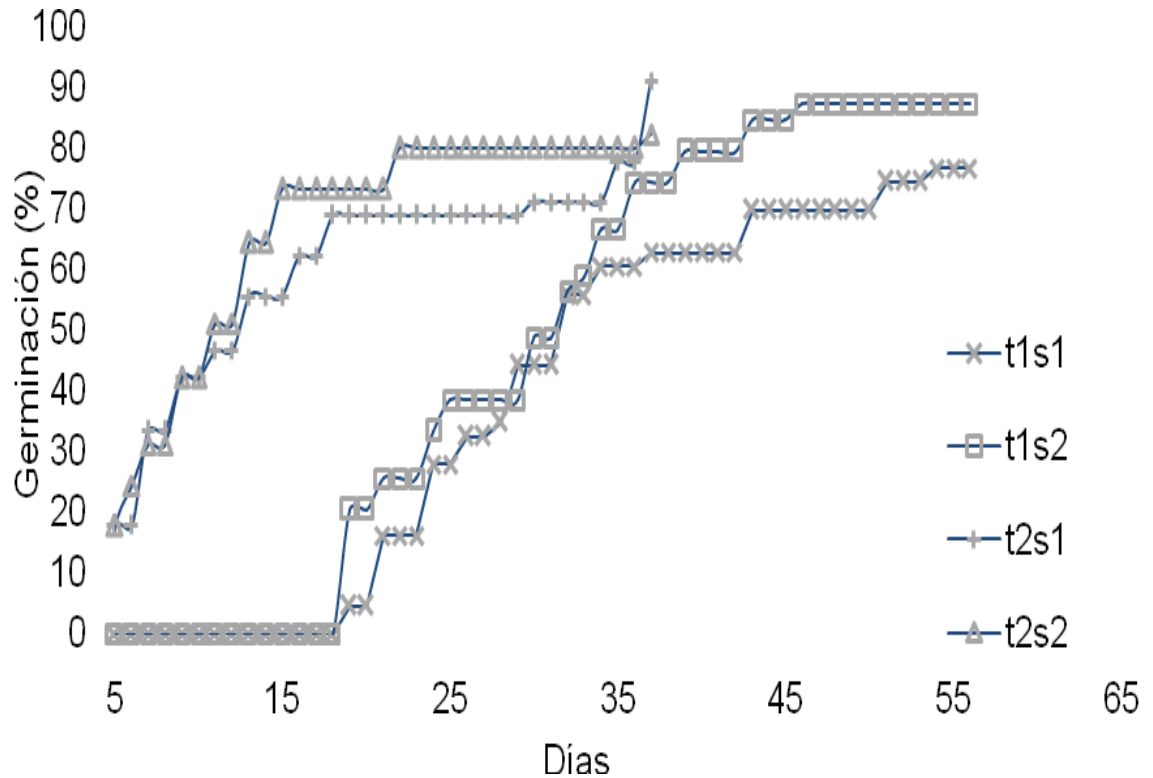


Figura 8. Germinación acumulada de semillas de *Myroxylon balsamum*, con dos regímenes de temperatura.

6.2. Experimentos en invernadero

Características físico químicas del sustrato

El promedio de tres análisis físico – químicos del sustrato utilizado, fueron los siguientes: 0.32 % de nitrógeno total y contenidos de humedad en relación a su capacidad de campo de 53.58%. La fuente de material orgánico utilizado en el sustrato (cachaza de caña de azúcar y cascabillo de café).

6.2.2. Condición de escarificación de frutos de *M. balsamum* y luminosidad

Con relación a supervivencia al mes del trasplante, existieron diferencias significativas para el factor sombra (Anexo 3). La supervivencia fue mayor (100% de supervivencia) al exponer los árboles a menor irradiación, mientras que existió 75% de supervivencia en las condiciones de mayor irradiación (Figura 9). La irradiación existente en laboratorio, del cual provenían las plántulas, fue considerablemente menor a la existente en el ambiente externo, en donde existe mayor exposición a la luz natural.

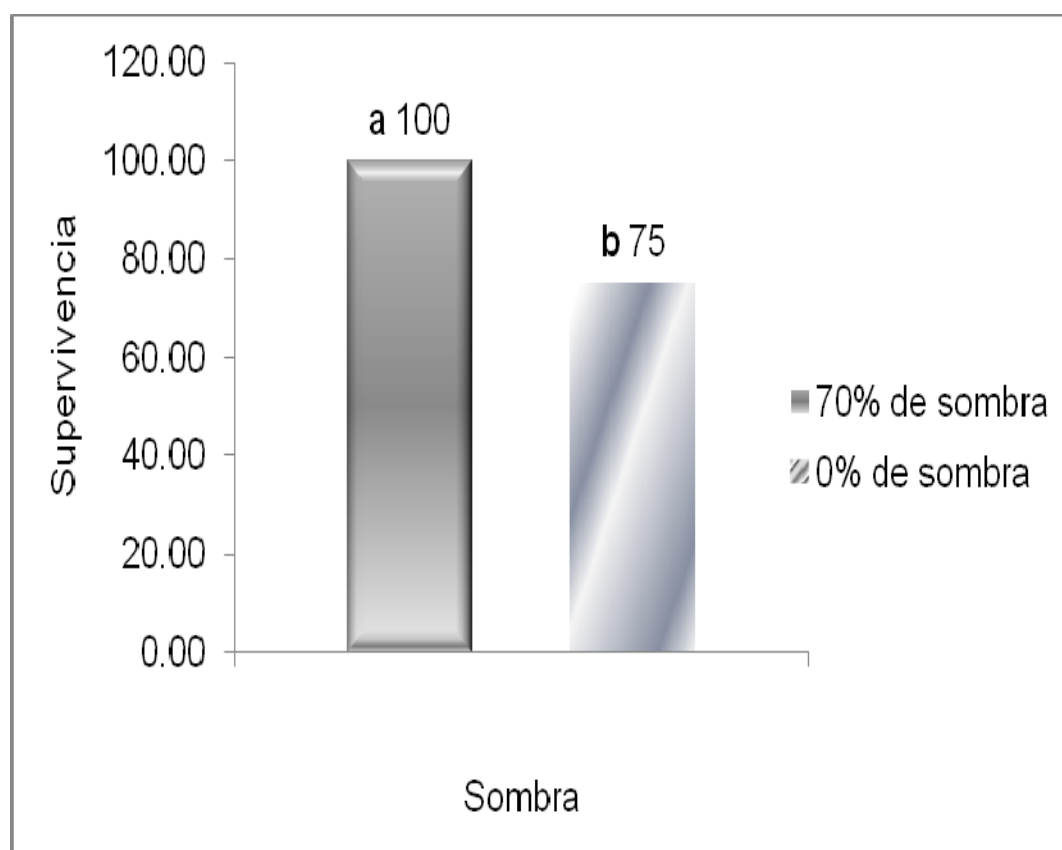


Figura 9. Supervivencia en vivero al mes del trasplante de *M. balsamum* en invernadero con dos condiciones de luz.

6.2.3. Condiciones de escarificación de frutos, luminosidad e inoculación con *Azotobacter beijerinckii* en invernadero

Se observaron significancias estadísticas en el factor escarificación para la variable número de hojas a la cosecha (Anexo 4). El mayor número de hojas fue

cuando se realizó el corte longitudinal en vista hilar (62 hojas) y el menor número de hojas fue con embrión descubierto con 51 hojas (Figura 10).

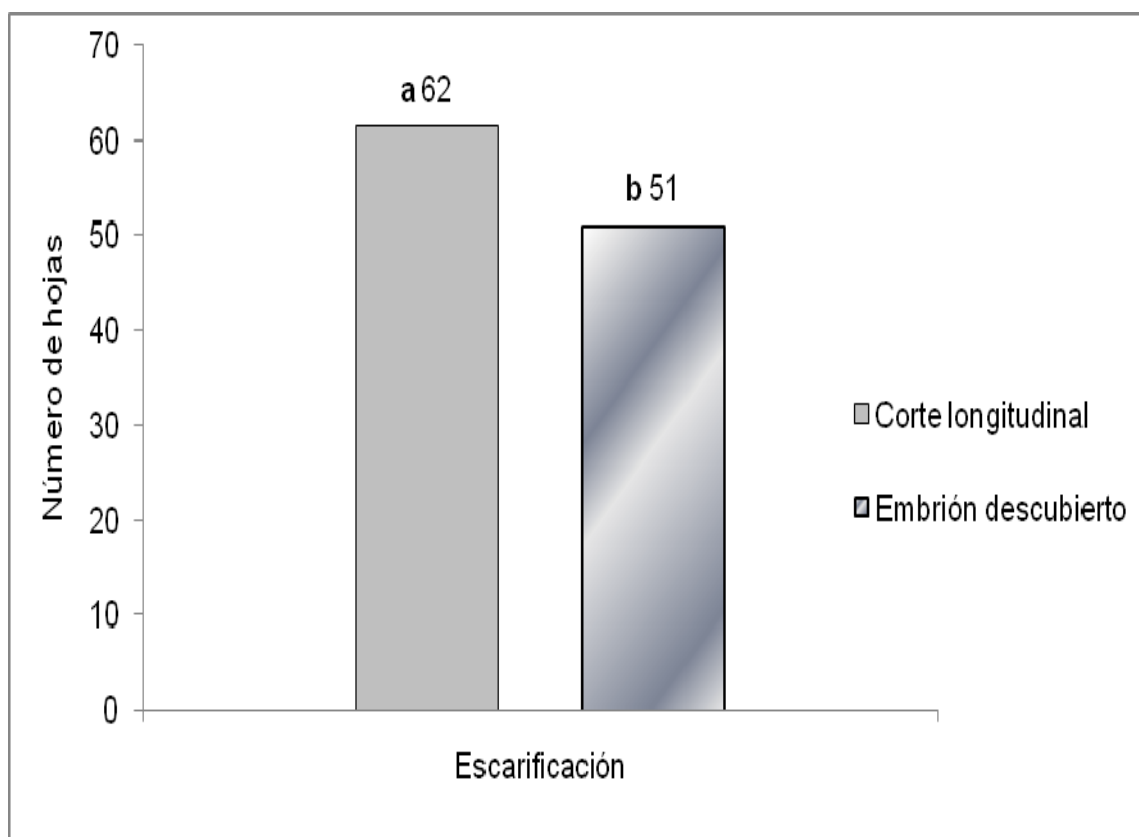


Figura 10. Número de hojas a la cosecha de *M. balsamum*, con dos tipos de escarificación.

En la variable diámetro de tallo a la cosecha, se observaron diferencias significativas para el modelo. La interacción que presentó mayor diámetro, fue al realizar el corte longitudinal con mayor irradiación (3.50 mm); mientras que los menores diámetros fueron con embrión descubierto y 50% de sombra (2.91 mm), (Figura 11).

El mantener parte de la cubierta en corte longitudinal durante aproximadamente tres meses hasta la descomposición de la misma, al parecer tuvo un efecto de protección en la base del cuello de la raíz, por lo que posiblemente pudo favorecer el engrosamiento del mismo.

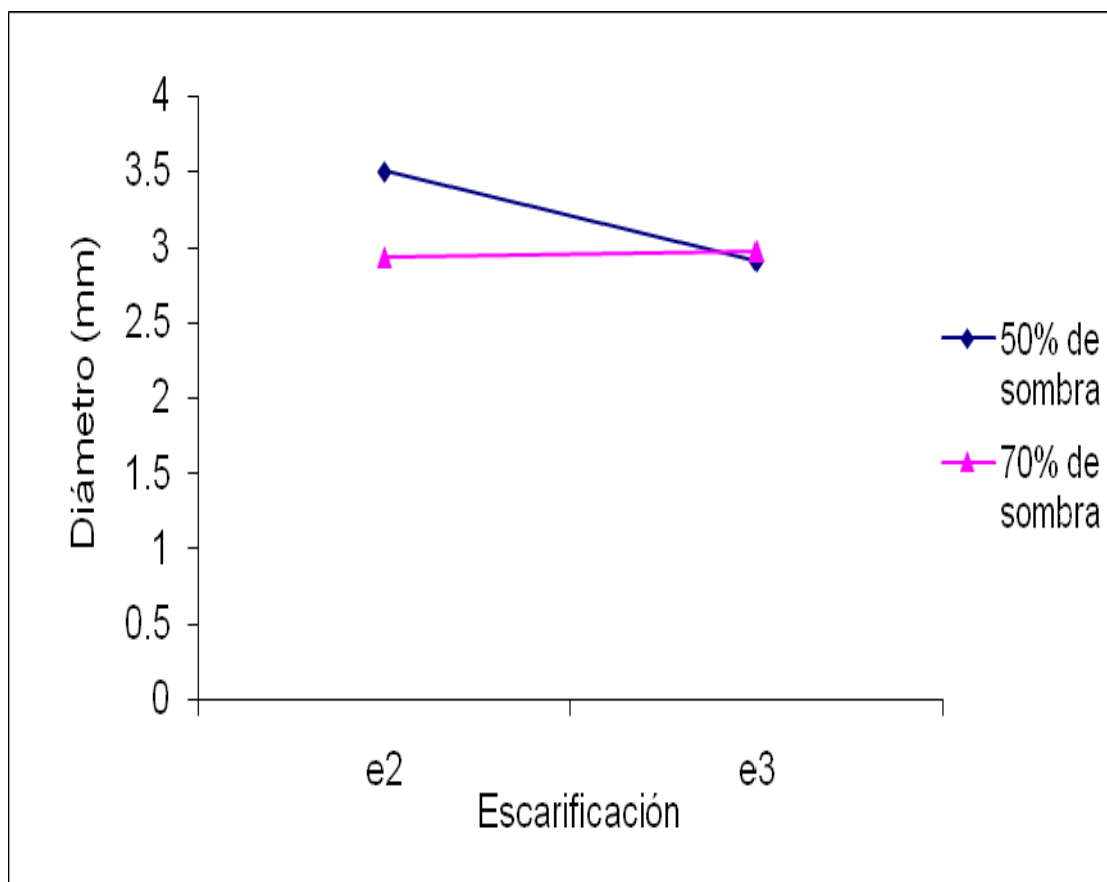


Figura 11. Diámetro a la cosecha en *M. balsamum*, Interacción Sombra x Escarificación. (Tukey, $p \leq 0.05$).

En el coeficiente de esbeltez, se observaron diferencias significativas en el factor sombra (Anexo 5), el valor mayor, fue encontrado con 70 % de sombra (6.55 cm mm^{-1}); mientras que el valor menor fue con 50% de sombra (5.65 cm mm^{-1}), (Figura 12). Los árboles que crecieron con menos sombra, probablemente podrán ser más aptos en desarrollarse en ambientes con menor humedad (Rodríguez, 2008).

En el parámetro de crecimiento razón de área foliar, se observaron diferencias significativas en el factor sombra (Anexo 5). Con 70% de sombra resultó el valor mayor ($12.86 \text{ m}^2 \text{ kg}^{-1}$), mientras que con 50% de sombra fue de $11.15 \text{ m}^2 \text{ kg}^{-1}$ (Figura 12).

Para la relación PSA/PSS (Peso Seco Aéreo/Peso Seco Subterráneo) no se observaron diferencias significativas, hallándose valores promedios de (3.51) con 50% de sombra y de (3.55) con 70% de sombra. (Figura 12).

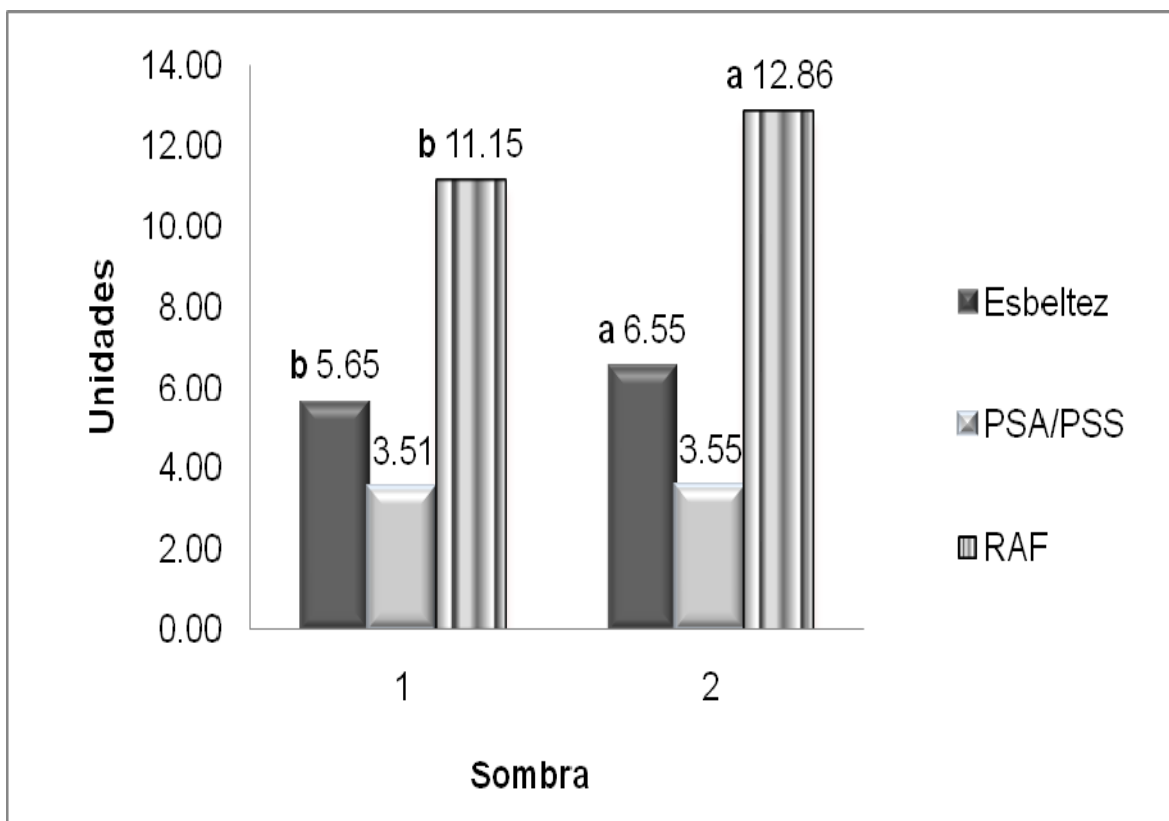


Figura 12. Índices de calidad y razón de área foliar en *M. balsamum* con sombra.

No existieron diferencias significativas ($p > 0.05$) en las variables: Altura de planta, área foliar, peso seco de raíz y follaje, y contenido de nitrógeno en sustrato, (Anexo 4).

La capacidad que tiene *M. balsamum* para establecerse en condiciones de baja irradiación, permitirá ser incorporado desde las primeras etapas de desarrollo en sistemas agroforestales de sombra.

6.2.4. Población de microorganismos fijadores de nitrógeno a los tres meses de inocular *Azotobacter beijerinckii* en *M. balsamum* en invernadero

A los tres meses de la inoculación con *A. beijerinckii* en sustrato, existieron diferencias significativas en el factor inoculación y en la interacción sombra x inoculación (Anexo 4). La interacción con mayor población de microorganismos fijadores de nitrógeno, se observó con 70% de sombra y inoculación (27×10^5 unidades formadoras de colonias UFC por gramo de suelo seco); mientras que la menor población fue con 70% de sombra sin inoculación (6×10^5 UFC por gramo de suelo seco) Figura 13.

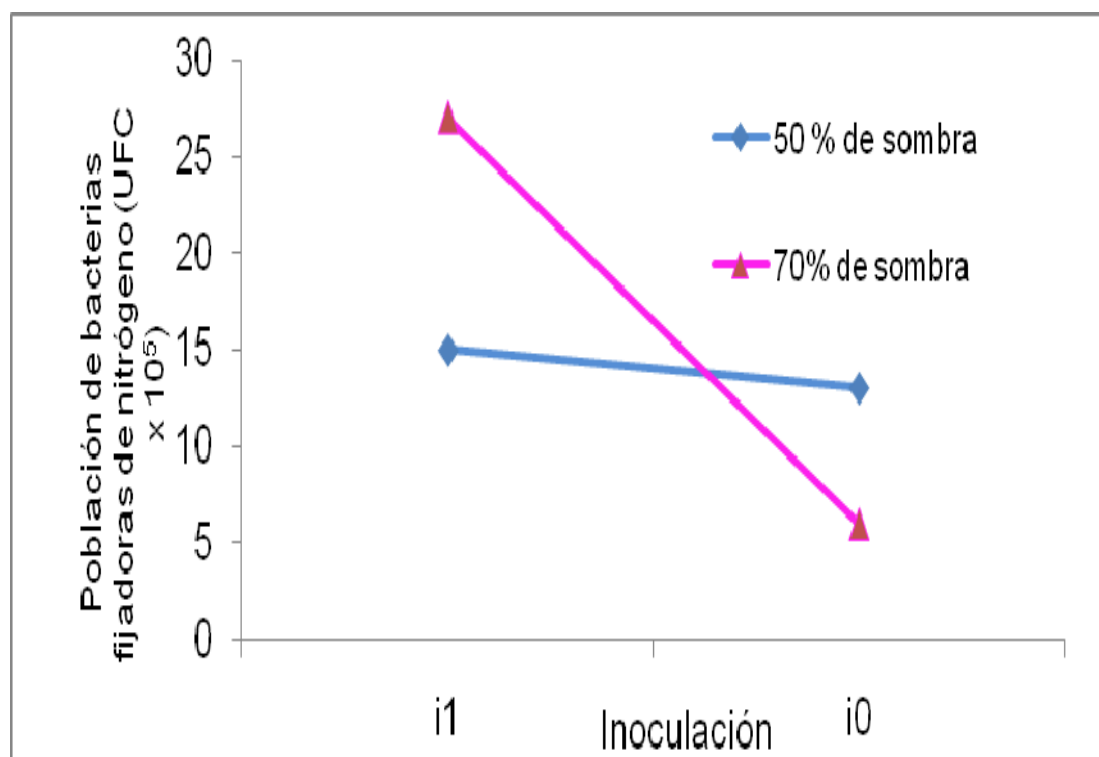


Figura 13. Población de bacterias fijadoras de nitrógeno a los tres meses de la inoculación con *Azotobacter beijerinckii* en *M. balsamum* en invernadero.

En la variable contenido de nitrógeno en el sustrato, no existieron diferencias significativas (Anexo 4). Se observa que el contenido de nitrógeno total en el tratamiento inoculado, en relación a su testigo fue similar. Al parecer la continua

disponibilidad de nitrógeno en el sustrato, posiblemente pudo haber inhibido la capacidad de las bacterias de fijar nitrógeno (Gupta *et al.*, 2006).

La habilidad de colonizar la rizósfera, está relacionada en parte con la naturaleza y cantidad de los exudados de las raíces y edad de la planta (Mrkovac̃ki y Milic, 2001; Elkan, 1987). *M. balsamum* en las primeras etapas de desarrollo, posee un sistema radicular escaso, por lo que la producción de exudados posiblemente debió ser baja.

6.3. Estudio de la fijación de nitrógeno del material colectado en campo

6.3.1. Propiedades físico-químicas de las muestras de suelo

Algunas propiedades físico – químicas de las muestras de suelo poseen las siguientes características: En el campo experimental, la textura fue franco arcilloso, 0.29% de nitrógeno total y 55.04% de humedad. Mientras que en el entorno natural, la textura fue arcillosa, pH de 6.96, 0.40% de nitrógeno total y 74.21% de humedad.

6.3.2. Colecta y observación de raíces de *Myroxylon balsamum* en campo y laboratorio

M. balsamum, se encuentra clasificado dentro la sub familia Papilionoideae, ampliamente conocida por la capacidad de nodular con *Rhizobium*. En la presente investigación, en *M. balsamum* no se observaron el tipo de nódulos característicos de algunas leguminosas tropicales que presentan nódulos redondos bien definidos, y que son representativos del tipo de nódulos conocidos en muchas leguminosas herbáceas o arbustivas (por ejemplo frijol y soya). Se observaron estructuras que sobresalían ligeramente de la superficie de las raíces, como pequeñas protuberancias con un contorno curvo bien definido; no obstante estuvieron presentes en todas las raíces colectadas, tanto

en el campo experimental como en el entorno natural (Cuadro 2). Sprent (2007) señala que hay leguminosas que no forman nódulos, pero el rizobio queda atrapado dentro de la raíz.

Cuadro 2. Características generales de protuberancias extraídas de raíces de *Myroxylon balsamum*, en individuos del campo experimental y entorno natural.

Muestra	Número de Individuo	Estado del Individuo	Característica de raíces y protuberancia
M1	EN 1	joven	Primaria, gruesa
M2	EN2, 2CE, 3CE, 4CE	adultos	Secundarias, Delgadas
M3	EN2, 2CE, 3CE, 4CE	adultos	Secundarias, Delgadas
M4	EN 2	adulto	Secundarias, gruesa

En laboratorio se hicieron cortes de tejido para observar el interior de las protuberancias. El interior del tejido era de un color rosado tenue, lo que pudiera indicar presencia de leghemoglobina, la proteína comúnmente encontrada en nódulos radicales; aunque no se hicieron pruebas para verificar si en verdad se trataba de esta proteína.

6.3.3. Aislamiento y morfología de cepas bacterianas encontradas en protuberancias de raíces secundarias de *Myroxylon balsamum*

De las muestras de tejido se aislaron cepas de bacterias en el medio de extracto de levadura manitol agar (ELMARC), Cuadro 3.

Cuadro 3. Caracterización morfológica colonial y microscópica de cepas bacterianas aisladas de protuberancias de raíces de *Myroxylon balsamum* (L.) Harms. El Palmar, Veracruz.

Cepa	Colonias		Morfología microscópica	Tinción Gram		Leche tornasol		Estado
	Elevación y forma	Color		(-)	(+)	Sin cambio o ligera formación de suero	Cambio de color	
M2R1	plana, circular	rojas	bacilos cortos	x			X	
M2R3	plana, circular	rojas	bacilos cortos	x			X	
M2R4	Convexa, circular	rosa	bacilos cortos	x		x		X
M2R5	Convexa, circular	rosa	bacilos poco alargados	x		X		X
M2R6	Convexa, circular	rosa	bacilos cortos	x		X		X
M3R1	Convexa, circular	rosa obscuro	bacilos cortos	x			X	
M3R1	Convexa, circular	rosa	bacilos cortos	x			X	
M3R2	Convexa. Circular	rosa	bacilos cortos	x		X		X
M3R2	Convexa, circular	rosa	bacilos cortos	x		X		X
M3R3	Convexa, circular	rosa oscura	bacilos cortos	x			X	
M3R4	Convexa, circular	rosa	bacilos cortos	x		X		X
M3R4	Convexa, circular	rosa oscura	bacilos cortos	x		X		X

Algunas cepas presentaron colonias características de los Rizobios; colonias de forma circular, elevación convexa, tamaño de pequeñas a medianas (2-4 mm, aproximadamente), color rosa; el apareamiento de las colonias fue visible a los

3 o 4 días después de la siembra, lo que sugiere que son cepas de crecimiento rápido. Todas las cepas presentaron bacilos cortos Gram negativos, excepto tres de ellas donde las bacterias eran alargadas; estas pruebas indican que las cepas aisladas pertenecen a alguno de los géneros de rizobios que nodulan leguminosas tropicales.

6.4. Aislamiento y cuantificación de bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno, en suelo rizosférico de *M. balsamum*

En el entorno natural, la población de bacterias totales fue mayor que en el campo experimental ($\alpha = \leq 0.05$). En relación a la población de bacterias fijadoras de nitrógeno en suelo rizosférico de *M. balsamum* en las dos áreas de muestreo, solo se encontraron diferencias numéricas entre la población en el entorno natural (21×10^3 unidades formadoras de colonias UFC por gramo de suelo seco) en relación con la población de bacterias en el campo experimental (9×10^3 UFC por gramo de suelo seco), Cuadro 3.

El entorno natural, al ser un ambiente escasamente alterado, posee mayor diversidad de organismos vegetales y microorganismos. Los residuos vegetales incrementan la disponibilidad de residuos orgánicos en el suelo como fuente de energía para los procesos de los microorganismos (Tilak *et al.*, 2005).

La textura del suelo del entorno natural posee un mayor porcentaje de arcillas, mantiene el contenido de humedad adecuado para la vida de diversos microorganismos incluidos los fijadores de nitrógeno, (Davet, 2004).

Cuadro 4. Poblaciones de bacterias totales y fijadoras de nitrógeno en suelo rizosferico de *Myroxylon balsamum* (L.) Harms, en dos áreas de muestreo. Tezonapa, Veracruz.

Área de muestreo	Bacterias totales UFCX10 ³ /g de suelo seco	Bacterias fijadoras de nitrógeno UFCX10 ³ /g de suelo seco
Entorno Natural	275	21
Campo Experimental	21	9

VII. CONCLUSIONES

La germinación potencial y energía germinativa y desarrollo inicial en altura y número de hojas en *Myroxylon balsamum* en condiciones controladas de laboratorio fueron favorecidas al realizar la escarificación mecánica del fruto hasta dejar el embrión descubierto, al realizar el corte longitudinal en vista hilar, también fue favorecida la germinación potencial pero al cabo de un tiempo mayor.

La mayor luminosidad a la que fueron sometidas las plántulas en laboratorio incrementó el diámetro de tallo. No hubo diferencias significativas con los regímenes de temperatura; sin embargo con 27/23°C la energía germinativa fue en un tiempo menor.

Al finalizar el experimento en invernadero los árboles de *M. balsamum* presentaron mejor desarrollo inicial en número de hojas al realizar la escarificación del fruto con corte longitudinal en vista hilar; hubo efecto de la interacción corte longitudinal con 50% de sombra en diámetro de tallo. El coeficiente de esbeltez fue menor con 50% de sombra lo cual indica árboles aptos para desarrollarse en un ambiente con menor humedad. La supervivencia y razón de área foliar fue mayor con 70% de sombra, respuesta característica de la especie al crecer en ambientes con baja luminosidad. La inoculación con *Azotobacter beijerinckii* no presentó un efecto directo sobre las variables e índices morfológicos .

Las muestras de raíz indican que *M. balsamum* posee estructuras similares a nódulos, y el análisis microbiológico del contenido sugiere que las bacterias encontradas son rizobios.

La población de bacterias totales y bacterias fijadoras de nitrógeno en suelo rizosférico de *Myroxylon balsamum*, fue mayor en el entorno natural.

VIII. LITERATURA CITADA

- ACOSTA, M. 1961. Los bosques del Ecuador y sus productos. Ecuador. pp. 273–284.
- ALATORRE, J. 2003. Ecología de la semilla de palma camedor *C. elegans* Mart. Tesis de M. C. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Suelos. Maestría en Ciencias en Agroforestería Para el Desarrollo Sostenible. México. 132 pp.
- ALMARÁZ S., J.J., Y R. FERRERA-CERRATO. 2007. Fijación simbiótica de nitrógeno en leguminosas. *In*: Ferrera-Cerrato, R. y Alarcón, A. (eds.). Microbiología agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico y planta-microorganismo. Editorial Trillas, Mexico. p. 225-238.
- ALVAREZ, R. 1984. Isolation of atmospheric-nitrogen-fixing spirilla from the waters of the Parana delta and other rivers. *Revista Argentina de Microbiología*. 16(2): 93 – 6.
- ARTEAGA, C. 1997. Bacterias fijadoras de nitrógeno de la rizósfera, caulósfera y filósfera de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.). Tesis de M.C. Colegio de Postgraduados. Programa de Edafología. México. pp. 13 – 33.
- BALA, A. and E. GILLER. 2006. Relationships between rhizobial diversity and host legume nodulation and nitrogen fixation in tropical ecosystems. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*. 76: 319–330.
- BASHAN, Y., G. HOLGUIN y R. FERRERA. 1996. Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos. II Bacterias asociativas de la rizósfera. *Revista Terra*. 14:2. pp. 195-210.

- BASHAN, Y., G. HOLGUIN y R. FERRERA. 1996. Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos. III Procedimientos para el aislamiento y caracterización de hongos micorrizicos y rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas. Revista Terra. 14:2. pp. 211- 227.
- BONNER, F. T. 1993. Análisis de semillas forestales. Universidad Autónoma Chapingo. Traducido al español Rodríguez, D. A. Serie de apoyo académico No. 47. 53 p.
- BRYAN, J. A. 2000. Nitrogen Fixation of Leguminous Trees in Traditional and Modern Agroforestry Systems. *In* The silvicultural basis for agroforestry systems. M. Ashton y F. Montegnini. 1th ed. CRC Press LLC. 296 p.
- BROCKWELL, J., , J. A. Andrews., R. R. Gault., L. G. Gemell., G. W. GrifJith., D. F. Herridge., J. F. Holland., S. Karsono., M. B. Peoples., R. J. Roughley., J. A. Thompson., J. A. Thompson and R . J. Troedson. 1991. Erratic nodulation and nitrogen fixation in field-grown pigeonpea *Cajanus cajan* (L.) Millsp. Australian Journal of Experimental Agriculture. 31:653-661.
- CAMACHO, F. 1994. Dormición de semillas: Causas y tratamientos. Trillas. México. 125 p.
- CSPA SOIL AND PLANT ANALYSIS COUNCIL, INC. 1999. Soil Analysis. Handbook of reference methods. pp. 90 - 95
- CORDERO, J. y D. H. BOSHIER. 2003. *Myroxylon balsamum* (L.) Harms. Árboles de Centroamérica. Un manual para extensionistas. Oxford Forestry Institute (OFI)-Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). pp. 727-730

- CROWLEY, D. E. and ALVEY, S. A. 2002. Regulation of Microbial Processes by Soil pH. *In*: R. Zdenko. Handbook of plant growth. Marcel Dekker, Inc. USA. pp. 14.
- DAVET, P. 2004. Microbial ecology of the soil and plant growth. Science publisher. USA. pp. 90.
- ELKAN, G. H. 1987. Symbiotic Nitrogen Fixation Technology. Marcel Dekker, inc. U.S.A. pp. 95 -125.
- FERRERA, R., M. GONZÁLES y M. RODRIGUÉZ. 1993. Manual de agromicrobiología. Trillas. México. pp. 11 – 52.
- FORESTRY COMPENDIUM. 2005. *Myroxylon balsamum*. CAB International.
- GATICA, R. 2005. Fijación Simbiótica de Nitrógeno (FSN) en praderas del sur de Chile. Tesis de Ingeniero Agrónomo. Pontificia Universidad Católica de Chile. Departamento de Ciencias Vegetales. p. 6.
- GONZÁLES, J. y J. LLUNCH. 1992. Interacción planta – microorganismo: metabolismo del nitrógeno. Ed. Rueda. Madrid.
- HALBLEIB, C. and P. LUDDEN. 2000. Regulation of Biological Nitrogen Fixation. The journal of nutrition. pp. 1081-1084.
- HASSAN, U., M. S. MIRZA., S. MEHNAZ., G. RASUL and K. U. MALIK. 1998. Isolation and identification of diazotrophic bacteria from rice, wheat and kallar grass. *In* K. A. Malik., M. S. Mirza and J. K. Ladha. Nitrogen Fixation with non legumes. Kluwer Academic. pp. 197 – 205.
- HERNANDEZ, J. 2005. Degradación de benzo [a] pireno por *Azotobacter*.

Tesis de T.S. Universidad Tecnológica de Tecámac. División de Biotecnología. pp. 26 – 29.

HUXLEY, P. 1999. Tropical Agroforestry Science. Blackwell Science. 371 p.

ICRAF-PROSEA. 2004. Agroforestry tree data base. *Myroxylon balsamum* (L.) Harms. International Center For Research in Agroforestry (ICRAF). Plant Resources of South East Asia (PROSEA).

ILDIS International Legume Database & Information Service. 2005.

Myroxylon balsamum (L.) Harms and *Myroxylon peruiferum* L. f.

INFANTE, M. D y C. P. MORENO. 2005. Efecto del almacenamiento in situ y humedad en la germinación de dos especies tropicales de tierras húmedas. Aquatic botan. 83(3): 206-218.

JIMÉNEZ, Q. 1993. Árboles maderables en peligro de extinción en Costa Rica. 1^{era} edición. Costa Rica. INCAFO. pp. 58-59.

KANMEGNE, J., E. SMALING., L. BRUSSAARD., A. GANSOP-KOUOMEGNE and A. BOUKONG. 2006. Nutrient flows in smallholder production systems in the humid forest zone of southern Cameroon. Nutrient Cycling in Agroecosystems No. 76. pp. 233–248.

KHAN, M. L. y TRIPATHI, R. S. 1989. Efecto de la humedad el suelo, textura del suelo e intensidad de luz en germinación, supervivencia y crecimiento de algunos árboles subtropicales. Indian Journal of Forestry. 12(3):196-204.

KRIEG, R. N. 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams & Wilkins. 1: 234-242

- LAMBERS H., S. CHAPIN III., T. PONDS. 1998. Plant Physiological Ecology. Springer. New York, USA. pp.
- LEAKEY, R. B. 1992. Tropical trees: the potential for domestication and the rebuilding of forest resources. Capture of genetic resources by collection and storage of seed. London. 284 p.
- MARTINEZ, E. 1996. Análisis físico y biológico de semillas. 3^{era} edición. México. pp 192 – 215.
- MATHIAS. L., I. J. C. VIEIRA., R. BRAZ-FILHO., E. R. FILHO. 2000. A New Pentacyclic Triterpene Isolated from *Myroxylon balsamum* (L.) Harms (syn. *Myroxylon peruiferum*). Brazilian Journal of Chemical Society. 11(2): 195-198.
- MONTGOMERY D. C., G. C. RUNGER. 2004. Probabilidad y estadística aplicadas a la ingeniería. Editorial Limusa, S.A. de C.V.México. Segunda edición. pp. 389-391.
- MRKOVAC̃KI, N. and MILIC, V. 2001. Use of *Azotobacter chroococcum* as potentially useful In agricultural application. Annals of Microbiology. 51: 145-158.
- NAVARETTE, N. 2001. Los balsameros: Un tipo de vida a punto de extinguirse en El Salvador.
- NAIR, P. K R. 1997. Agroforestería. México: Universidad Autónoma Chapingo. pp. 351 – 368.

- NIEMBRO, A. 2000. Estructura y morfología de diásporas de árboles y arbustos nativos e introducidos comunes en la República Mexicana. Tesis M. C. División de Ciencias Forestales. Universidad Autónoma Chapingo. México. p. 175.
- PALMAS, M. A. 2007. Evaluación de la calidad de la planta de primavera (*Tabebuia donnell-smithii* Rose) en dos sistemas de producción. Tesis para Ingeniero en Agroecología. Universidad Autónoma Chapingo. p. 14.
- PENNINGTON, T. D y J. SARUKHÁN. 2005. Árboles Tropicales de México. Manual para la identificación de las principales especies. 3^{era}. Edición. México. UNAM y Fondo De Cultura Económica. pp. 262.
- PEPPER, I. and C. GERBA. 2004. Enviromental Microbiology. A Laboratory manual. 2^{da} Edición. U.S.A: Elsevier Academic Press. pp. 37 – 49
- RODRÍGUEZ, D. A. 2008. Indicadores de calidad de planta forestal. México. UACH y Mundiprensa México. pp. 120-124.
- RODRIGUEZ, E. 1982. Improved Medium for Isolation of *Azospirillum* spp. Applied and Environmental Microbiology. 4(44): 990-991.
- RUSSELL, M y M. MENANDRA. 1998. Árboles útiles de la parte tropical de América del Norte. Comisión Forestal de América del Norte. Washington D. C. N° 3. pp. 10 -15.
- RZEDOWSKI, J. 1978. Vegetación de México. LIMUSA, México. pp. 151-158

- SALAZAR, R. 1999. Nota técnica sobre manejo de semillas forestales. *Myroxylon balsamum* (L.) Harms. Turrialba Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) No. 81. 2 p.
- SALUSSO M, 2000. Biodegradation of subtropical forest Woods from north-west Argentina by *Pleurotus laciniatocrenatus*. 38(4):721-724.
- SOUZA, R. P. and F. M. VÁLIO. 2001. Seed Size, Seed Germination, and Seedling Survival of Brazilian Tropical Tree Species Differing in Successional Status. *Biotropica*. 33(3): 447-457.
- STACEY, G., R. BURRIS and H. EVANS. 1992. Biological Nitrogen Fixation. Chapman and Hall. U.S.A. pp. 87-133.
- SWEDRZYNSKA, D and A. SAWICKA. 2000. Effect of inoculation with *Azospirillum* on development and yielding of Maize (*Zea mays ssp. Saccharata* L.) under different cultivation conditions. *Polish Journal of Environmental Studies*. 9(6): 505 – 509.
- TAIZ, L. and E. ZEIGER. 2002. Plant physiology. 3th. ed. Sinauer Associates, Inc. USA. pp. 171 – 192, 314.
- TILAK, K., N. RANGANAYAKI, K. PAL; A. SAXENA, S. NAUTIYAL, S. MITTAL, A. TRIPATHI and B. JOHRIS. 2005. Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Microbial Diversity*. 89(1): 136 -150.
- TILAK, K., N. RANGANAYAKI and C. MANOHARACHARI. 2006. Synergistic effects of plant-growth promoting rhizobacteria and *Rhizobium* nodulation and nitrogen fixation by pigeonpea (*Cajanus cajan*). *European Journal of soil Science*. Vol 57. pp. 67 – 71.

- TORRES, M., S. VALENCIA., J. BERNAL and P. MARTÍNEZ. 2000.
Isolation of Enterobacteria, *Azotobacter sp.* and *Pseudomonas sp.*; Producers of Indole-3-Acetic Acid and Siderophores, from Colombian Rice Rhizosphere. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. Vol. 42 pp. 171-176.
- VARGAS, M y J. ARAYA. 2003. Los árboles del corazón. El chirraco, bálsamo del Perú o sándalo.
- VÁZQUEZ, C., A. I. BATIS., M. I. ALCOCER., M. GUAL y C. SÁNCHEZ.
1999. Árboles y arbustos nativos potencialmente valiosos para la restauración ecológica y la reforestación. Reporte técnico del Proyecto J084. CONABIO - Instituto de Ecología, UNAM. pp. 121.
- VERA, G. 2003. Estado de la diversidad genética de los árboles y bosques en el Sur y Sureste de México. Documentos de Trabajo: Recursos Genéticos Forestales. FGR/61S. pp. 34 – 47.
- VILLACRES, V. 1995. Bioactividad de las plantas amazónicas. Abya-Yala. Ecuador. p. 361.
- WADSWORTH, F. 1997. Producción forestal para América tropical. pp. 39–180.
- WOJTKOWSKI, P. 1998. The theory and practice of agroforestry design. A comprehensive study of the theories, concept and conventions that underlie the successful use of agroforestry. Science Publishers, Inc. U.S.A. pp. 93 – 99.
- YOUNG, A. 1997. Agroforestry for soil management. 2nd ed. CAB INTERNATIONAL. U.S.A. pp. 111 – 136.

III. ANEXOS

Anexo 1. Significancia de los factores sombra y escarificación.

Fuente de Variación	Gl	P
Modelo	5	<.0001 *
Sombra (S)	1	0.0751
Escarificación E	2	<.0001
S x E	2	0.5615
Bloques	4	0.5479
Error	24	
Total	29	
C.V.		29.46

Anexo 2. Significancia de factores individuales e interacción.

Factor o interacción de factor	Gl	P
Sombra (S)	1	0.7755
Temperatura (T)	1	0.5678
S x T	1	0.2246

Anexo 3. Significancia de los factores sombra y escarificación.

Fuente de Variación	G I	Numero hojas		Altura (cm)	
		F	P	F	P
Modelo	3	5.95	0.0254 *	26.29	<.0005 *
Sombra (S)	1	1.32	0.2941	1.46	0.2727
Escarificación	1	26.75	0.0021 *	127.81	<.0001 *
Bloques		0.59	0.5825	0.22	0.8075
S x E	1	0.48	0.5156	1.73	0.2359
Error	8				
Total	1 1				
C.V.			18.0196		6.7581

Anexo 4. Significancia de los factores sombra, escarificación e inoculación, y su interacción a la cosecha de *Myroxylon balsamum*.

Fuente de Variación	gl	Hojas (número)		Altura (cm)		Peso raíz (g)		Peso Aéreo PSA (g)		Área foliar (cm ²)		Bacterias (UFC)		Nitrógeno sustrato (%)	
		F	P > F	F	P > F	F	P > F	F	P > F	F	P > F	F	P > F	F	P > F
Modelo	7	1.01	0.4713	0.75	0.6317	1.15	0.3808	0.82	0.5879	0.41	0.8799	2.05	0.1101	0.68	0.6398
Sombra (S)	1	0.22	0.6431	0.98	0.3363	0.88	0.3625	0.46	0.5048	0.22	0.6453	0.51	0.4865		
Escarificación (E)	1	5.16	0.0382 *	0.88	0.3614	4.04	0.0606	2.15	0.1609	1.15	0.2986	0.09	0.7730		
Inoculación (I)	1	0.65	0.4321	0.06	0.8070	0.03	0.8680	0.45	0.5099	0.18	0.6787	8.29	0.0121 *		
Bloques	2	0.91	0.4244	0.35	0.7096	0.74	0.4931	0.32	0.7308	0.24	0.7912	0.00	0.9969	0.14	0.8731
S x E	1	0.00	0.9927	0.64	0.4333	2.69	0.1190	1.11	0.3070	0.71	0.4106	1.10	0.3107		
S x I	1	0.00	0.9782	0.62	0.4406	0.00	0.9879	0.34	0.5680	0.42	0.5242	5.52	0.0329*		
E x I	1	0.21	0.6561	0.04	0.8365	0.08	0.7742	0.25	0.6237	0.06	0.8100	1.01	0.3298		
Error	16														
Total	23														
C.V.			19.6157		17.580		30.7966		33.4870		33.1149		64.4929		33.8449

Anexo 5. Significancia en índices de calidad y parámetro de crecimiento RFA para *Myroxylon balsamum* en invernadero.

Fuente de Variación	gl	Esbeltez (cm/mm)		PSA/PSS (g g ⁻¹)	
		F	P > F	F	P > F
Modelo	7	1.30	0.3156	1.07	0.4327
Sombra (S)	1	8.42	0.0109	0.02	0.8814
Escarificación (E)	1	0.09	0.7742	0.45	0.521
Inoculación (I)	1	0.21	0.6571	1.55	0.2326
Bloque	2	0.07	0.9369	0.29	0.7496
S x E	1	0.54	0.4725	0.69	0.4186
S x I	1	0.46	0.5081	2.15	0.1635
E x I	1	0.54	0.4725	3.11	0.0983
Error	16				
Total	23				
C.V.			12.4812		15.1554

Anexo 7. Medio Ashby – Manitol para el crecimiento de *Azotobacter beijerinckii*.

MEDIO ASHBY – MANITOL	
REACTIVO	CANTIDAD g/L
Manitol	20.0
K ₂ HPO ₄	0.20
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.20
CaCO ₃	5.0
NaCl	0.20
K ₂ SO ₄	0.10
Agar	15.0
pH 7.4 ± 0.2	

Anexo 8. Medio Rennie (1981) o carbón combinado para el crecimiento de bacterias diazotróficas

MEDIO RENNIE O CARBÓN COMBINADO	
REACTIVO	CANTIDAD g/L
Solución A	
Manitol (<i>Azotobacter</i>)	5.0
K ₂ HPO ₄	0.80
KH ₂ PO ₄	0.20
NaCl	0.10
NaFeEDTA	0.028
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.025
Agar	15.0
Extracto de levadura	0.025
Sacarosa (<i>Azospirillum</i>)	5.0
Lactato de Sódio 60%v/v	0.5
Agua destilada	900 mL

Anexo 9. Solución de bicloruro de mercurio HgCl_2 al 0.1% para desinfección de protuberancias de raíces de *M. balsamum*

SOLUCIÓN DE HgCl_2 al 0.1%	
REACTIVO	CANTIDAD g/L
HgCl_2	1.0
HCl	5.0

Anexo 10. Medio Agar Nutriente para el crecimiento de bacterias totales (Wollum, 1982)

MEDIO AGAR NUTRIENTE	
REACTIVO	CANTIDAD g/L
Peptona	5.0
Extracto de carne	3.0
Agar	15.0
Água destilada	1 L
pH	7.0

A: La solución de biotina y ácido aminobenzoico fueron esterilizadas por 15 min a 15 atmósferas de presión.

B: Se colocan al medio estéril en la cámara de flujo laminar.

Anexo 11. Medio Extracto de levadura manitol agar rojo congo (ELMARC) para el crecimiento de *Rhizobium sp.*

MEDIO ELMARC	
REACTIVO	CANTIDAD g/L
Manitol	9.0
K_2HPO_4	1.0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.18
NaCl	0.20
Extracto de levadura	1.5
Agar	15.0
Rojo Congo 1:400	10 ml
pH	7.0