

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

"Respuesta de plántulas de Erythrina poeppigiana (Walpers)  
O.F. Cook (Poró Gigante) en tres suelos de Costa Rica  
a la inoculación con cepas seleccionadas de Rhizobium spp".

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa  
Conjunto de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Re -  
cursos Naturales de la Universidad de Costa Rica y el Centro  
Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, para optar al  
grado de

Magister Scientiae

por

Lucía Gross Martínez

Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza

Programa de Recursos Naturales Renovables

Turrialba, Costa Rica

1985

## DEDICATORIA

A mis padres y hermanos

A mi esposo

A la familia Mayorga-González

A los investigadores

## AGRADECIMIENTOS

La autora expresa su agradecimiento a las siguientes personas e instituciones que hicieron posible la realización de este trabajo:

Al Dr. Donald Kass, Profesor Consejero, por su amistad, apoyo e interés desde mi ingreso al CATIE.

Al Dr. Carlos Ramírez, miembro del Comité, por su amistad, guía y estímulo a lo largo de mi carrera profesional.

Al Dr. Gerardo Budowski, miembro del Comité, por su constancia colaboración, interés y orientación como maestro y amigo.

Al Dr. Ricardo Russo, miembro del Comité, por su interés, estímulo, y amistad.

Al Dr. Alvaro Cordero, como amigo y profesor desde mis estudios de Grado.

Al M. Sc. John Palmer, por su valiosa ayuda en el análisis de datos.

Al personal del Laboratorio de Microbiología de Suelos del Centro de Investigaciones Agronómicas, y al personal del Laboratorio de Suelos CATIE, por su invaluable ayuda en las diferentes etapas del estudio.

A la fundación DSE de Alemania, por el apoyo económico brindado durante mis estudios.

Al proyecto CATIE-CIID, y CONICIT-AID, por la financiación a este trabajo.

A todas aquellas personas que participaron en los trabajos de campo, laboratorio, invernadero, mecanografía, análisis y edición, y a las que sin querer puedo estar omitiendo.

## BIOGRAFIA

La autora nació en La Ceiba, Honduras.

Realizó sus estudios universitarios en la Facultad de Agronomía de la Universidad de Costa Rica, graduándose de Bachiller en Ingeniería Agronómica con énfasis en Fitotecnia en 1982.

En marzo de 1983 ingresó al Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales de la Universidad de Costa Rica Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (UCR-CATIE) en el Departamento de Recursos Naturales Renovables, obteniendo el grado de Magister Scientiae en Recursos Naturales en diciembre de 1985.

Esta tesis ha sido aceptada en su forma presente por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales, bajo el convenio UCR-CATIE, como requisito parcial para optar el grado de

Magister Scientiae

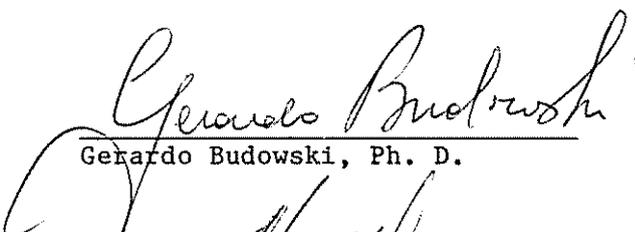
Jurado:

  
Donald Kass, Ph. D.

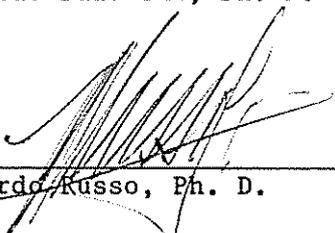
Profesor Consejero

  
Carlos Ramírez, Ph. D.

Miembro del Comité

  
Gerardo Budowski, Ph. D.

Miembro del Comité

  
Ricardo Russo, Ph. D.

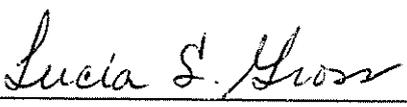
Miembro del Comité

  
Director, Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales UCR-CATIE.

Director, Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales UCR-CATIE.

  
Decano, Sistema de Estudios de Posgrado de la Universidad de Costa Rica.

Decano, Sistema de Estudios de Posgrado de la Universidad de Costa Rica.

  
Lucía Gross Martínez

Candidata

## CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	x
SUMMARY.....	xii
LISTA DE CUADROS.....	xiv
LISTA DE FIGURAS.....	xvi
1. INTRODUCCION.....	1
2. REVISION DE LITERATURA.....	3
2.1. Descripción de <u>Erythrina poeppigiana</u> .....	3
2.1.1. Taxonomía y distribución.....	3
2.1.2. Descripción general .....	3
2.1.3. Usos y aplicaciones.....	4
2.2. Simbiosis entre <u>Rhizobium</u> spp y <u>Erythrina poeppigiana</u> .....	6
2.2.1. Especificidad hospedero-simbionte.....	6
2.2.2. Nódulos en <u>E. poeppigiana</u> .....	8
2.2.3. Factores que afectan la simbiosis.....	9
2.2.4. Problemas del pH, Al y Mn sobre la nodulación.....	11
2.3. Parámetros para cuantificar la fijación biológica nitrógeno.....	12
2.3.1. Método de la diferencia.....	12
2.3.2. Métodos que utilizan <sup>15</sup> N.....	13
2.3.3. Método de determinación de ureídos.....	13
2.3.4. Técnica de reducción de acetileno.....	14
2.3.5. Otros.....	15
2.4. Importancia de la simbiosis <u>Rhizobium</u> -leguminosas arbóreas.....	15
2.5. Selección de cepas.....	17
2.5.1. Terminología.....	17
2.5.2. Metodologías para la selección de cepas....	18

	Página
3. MATERIALES Y METODOS.....	20
3.1. Organización y secuencia.....	20
3.1.1. Ubicación.....	20
3.1.2. Suelos.....	21
3.2. Diseño Experimental.....	23
3.2.1. Diseño y tratamientos.....	23
3.2.2. Variables consideradas.....	25
3.3. Muestreos.....	26
3.3.1. Muestreo de nódulos.....	26
3.3.2. Muestreo del suelo.....	26
3.4. Aislamiento y caracterización de las cepas de <u>Rhizobium</u> spp.....	27
3.4.1. Aislamiento de <u>Rhizobium</u> a partir de nódulos.....	27
3.4.2. Caracterización de las cepas de <u>Rhizobium</u> aisladas.....	27
3.5. Selección de cepas de <u>Rhizobium</u> en jarras de Leonard.....	28
3.5.1. Preparación de las jarras de Leonard.....	28
3.5.2. Esterilización de la semilla y siembra en jarras.....	29
3.5.3. Inoculación.....	30
3.5.4. Prácticas de manejo.....	31
3.5.5. Cosecha.....	31
3.6. Selección en bolsas de suelo no alterado.....	32
3.6.1. Siembra.....	32
3.6.2. Inoculación.....	32
3.6.3. Prácticas de manejo.....	33
3.6.4. Cosecha.....	33
3.7. Análisis.....	35
3.7.1. Análisis de suelo y foliares.....	35
3.7.2. Análisis de datos.....	35

4.	RESULTADOS.....	36
4.1.	Recolección de nódulos de <u>Erythrina poeppigiana</u> , aislamientos y caracterización de cepas de <u>Rhizobium</u> spp.....	36
4.1.1.	Recolección de nódulos y aislamiento de <u>Rhizobium</u> spp.....	36
4.1.2.	Caracterización de cepas de <u>Rhizobium</u> spp aisladas a partir de nódulos de <u>E.</u> <u>poeppigiana</u> .....	37
4.2.	Observaciones cualitativas de la nodulación en <u>E. poeppigiana</u> inoculada con diferentes aisla- mientos de <u>Rhizobium</u> spp.....	40
4.2.1.	Nodulación de <u>E. poeppigiana</u> sembrada en jarras de Leonard.....	41
4.2.2.	Nodulación de <u>E. poeppigiana</u> sembrada en bolsas de suelo.....	44
4.3.	Resultados de la selección de cepas de <u>Rhizobium</u> spp en jarras de Leonard utilizando <u>E.</u> <u>poeppigiana</u> como planta indicadora.....	47
4.3.1.	Peso de biomasa aérea de <u>E. poeppigiana</u> (12 semanas edad) sembrada en jarras de Leonard.....	47
4.3.2.	Peso seco de biomasa nodular de <u>E.</u> <u>poeppigiana</u> sembrada en jarras de Leonard..	50
4.3.3.	Contenido de N-total en <u>E. poeppigiana</u> sembrada en jarras de Leonard.....	52
4.4.	Resultados de la selección de cepas de <u>Rhizobium</u> y respuesta a la inoculación en <u>E. poeppigiana</u> sembrada en bolsas con suelo.....	54
4.4.1.	Peso seco de biomasa nodular de <u>E.</u> <u>poeppigiana</u> sembrada en tres suelos dife- rentes.....	54
4.4.2.	Peso seco de biomasa aérea de <u>E.</u> <u>poeppigiana</u> sembrada en tres suelos dife- rentes.....	60
4.4.3.	Contenido de N-total de plantas de <u>E.</u> <u>poeppigiana</u> sembradas en bolsas de suelo.	63

5.	CONCLUSIONES.....	66
6.	RECOMENDACIONES.....	68
7.	LITERATURA CITADA.....	70
8.	APÉNDICE.....	79
	Apéndice 1A. Diferentes procedimientos evaluados para el aislamiento de nódulos de poró.....	80
	Apéndice 2A. ALM + rojo congo + ciclo heximida.....	81
	Apéndice 3A. Tinción de Gram.....	82
	Apéndice 4A. Preparación del medio Agar-Glucosa-Peptona + púrpura de bromocresol.....	83
	Apéndice 5A. Esterilización de la semilla de <u>E. poeppigiana</u> según tres métodos sugeridos.....	83
	Apéndice 6A. Preparación del medio Agar + Agua.....	84
	Apéndice 7A. Preparación del medio en agar inclinado.....	85
	Apéndice 8A. Nefelómetro de MacFarland.....	85

## RESUMEN

Se aislaron 20 cepas de Rhizobium spp en cinco sitios de la Meseta Central de Costa Rica. Se evaluaron en jarras de Leonard, y se seleccionaron las diez mejores cepas con base a los mejores promedios según las variables de respuesta: biomasa aérea, biomasa nodular, y N- Total. Se seleccionaron las cepas 8,15, y 21 procedentes de Heredia; cepas 5, 11, 14, 16, 17 y 18 de Turrialba; y cepa 24 de Tres Ríos.

Los resultados de la selección en jarras sugirieron la posibilidad de explotar el germoplasma bacteriano más efectivo en la fijación de nitrógeno con la leguminosa arbórea Erythrina poeppigiana. Tal evaluación se realizó en tres suelos no alterados: San José (Typic Eutrandedpt), Puriscal (Ustic Tropohumult), y Turrialba (Typic Humitropept). Los niveles de saturación de aluminio fueron de 1% en el suelo de San José, 37% para el de Puriscal, y 56% en el suelo de Turrialba.

Con base a los resultados obtenidos no hubo respuesta positiva a la inoculación en el suelo de San José, y se observó una alta incidencia de cepas nativas en el testigo absoluto (0,276 g biomasa nodular/planta). Estos resultados se podrían asumir básicamente a tres factores: (a) la abundancia de cepas nativas que muchas veces son responsables de la falta de respuesta a la inoculación, (b) competencia entre cepas nativas y la introducida, y (c) presencia de altos contenidos de nitrógeno en el suelo que afectan el proceso de fijación. No hubo respuesta positiva a la inoculación en el suelo de Puriscal, por el contrario, el testigo absoluto arroja el mayor valor promedio de biomasa aérea (2,24 g/planta), y contenido de N total (56,88 mg N/planta), lo cual podría atribuirse a una mayor demanda energética por parte de las plantas fuertemente noduladas. En el suelo de Turrialba se observó una respuesta positiva a la inoculación con la cepa 5, que obtuvo un incremento de 220 por ciento en biomasa nodular con respecto al testigo absoluto, y 89 por ciento de incremento en el contenido de N total. Estos resultados sugieren que la estrategia de selección de cepas para este género puede ser provechosa, puesto que fueron aparentemente responsables de una simbiosis efectiva en suelos con altos niveles de saturación de aluminio.

Se sugiere continuar ensayos de selección y respuesta a la inoculación bajo diferentes condiciones de campo con las cepas más promisorias (cepa 5 y 16 de Turrialba, y cepa 24 de Tres Ríos). Se sugiere evaluar el efecto de estas bacterias sobre el enraizamiento y establecimiento de estacas en el poró; así como realizar estudios a largo plazo para evaluar el comportamiento de dichas cepas, y lograr su caracterización.

Palabras Claves:

Fijación de nitrógeno, selección de cepas, Erythrina poeppigiana, Rhizobium.

## SUMMARY

"Response of seedlings of Erythrina poeppigiana (Walpers) O. F. (Poró gigante) to inoculation with selected Rhizobium spp. strains in three soils of Costa Rica"

Twenty Rhizobium spp. strains from five different locations were isolated from the Meseta Central of Costa Rica. They were evaluated in Leonard jars and ten strains were selected on the basis of the highest mean values for the following parameters: leaf biomass production, nodule biomass production and total N. The selected strains were: 8, 15, 21 from Heredia; 5, 11, 14, 16, 17 and 18 from Turrialba; and strain 24 from Tres Ríos.

These strains were evaluated for effectiveness of N fixation on the woody legume Erythrina poeppigiana in undisturbed soil cores from three representative Costa Rican soils: San José (Typic Eutrandept), Puriscal (Ustic Tropohumult), and Turrialba (Typic Humitropept). Aluminum saturation levels were 1% in the San José soil, 37% in the Puriscal soil, and 56% in the Turrialba soil indices variancia.

There was no positive response to inoculation in the San José soil, a high incidence of native strains was observed in the control (0,276 g nodular biomass/plant). These results can be attributed basically to three factors: (a) abundance of native strains which are responsible for the lack of response to inoculation in some circumstances, (b) competition between native and introduced strains, and (c) the presence of a high level of mineral nitrogen in the soil that might inhibit the fixation process. There was no positive response to the inoculation in Puriscal soil; furthermore, the control gave the higher average value for leaf biomass (2, 24 g/plant), and total N (56,88 mg N/plant). This might be attributed to the high energy demands of the heavily nodulated plants. There was a significant positive response to inoculation in the Turrialba soil with strain 5, which had a 220 per cent increase in nodular biomass against the control, and an increase of 89 per cent in the total N. This finding suggests that the strategy of strain selection for this genus may be productive, as this strain was apparently responsible for high rates of N

fixation in soils with a high level of Al saturation.

Further research should include continued screening for effective strains under unfavorable soil conditions and field testing of the most promising isolates (strain 5 and 16 from Turrialba, and strain 24 from Tres Ríos). It is possible that these strains might be of value in promoting rooting of cuttings of "Poró". Their long-term behavior in the field should also be characterized.

Key words:

Nitrogen fixation, strain selection. Erythrina poepigiana, Rhizobium

LISTA DE CUADROS

Cuadro No.		Página
1	Análisis físico y químico de los suelos donde se efectuó el ensayo.....	22
2	Caracterización de las cepas de <u>Rhizobium</u> spp aisladas a partir de nódulos de <u>Erythrina poeppigiana</u> .....	38
3	Observaciones de distribución, pigmentación, tamaño y cantidad de nódulos en plántulas de <u>E. poeppigiana</u> (12 semanas de edad) sembrada en jarras de Leonard.....	42
4	Observaciones cualitativa de la nodulación en plantas de <u>Erythrina poeppigiana</u> (16 semanas edad) sembradas en bolsas de suelo.....	45
5	Peso seco de biomasa aérea (g), peso seco de biomasa nodular (g) y plantas de <u>E. poeppigiana</u> (16 semanas edad) sembradas en bolsas con suelo (Typic Eutrandedpt).....	55
6	Peso seco de biomasa aérea (g), peso seco de biomasa nodular (g) y contenido de nitrógeno total (mg) de plantas de <u>E. poeppigiana</u> (16 semanas de edad) sembradas en bolsas con suelo (Typic Humitropept y Ustic Tropohumult).....	56
En el apéndice		
Cuadro		
1A	Solución de nutrimentos libre de nitrógeno.....	87
2A	Peso seco de biomasa aérea y peso seco de biomasa nodular y contenido de N-total de plantas de <u>E. poeppigiana</u> sembradas en jarras de Leonard....	88
3A	Análisis de variancia para la variable peso seco de biomasa aérea (g/2 plantas) de <u>E. poeppigiana</u> (12 semanas) sembradas en jarras Leonard.....	89

Cuadro		Página
4A	Análisis de variancia de la variable peso seco de biomasa nodular (g/2 plantas) <u>E. poeppigiana</u> (12 semanas) sembradas en jarras Leonard.....	89
5A	Análisis de variancia para la variable contenido de nitrógeno (mg N/2 plantas) de <u>E. poeppigiana</u> (12 semanas) sembrada en jarras de Leonard.....	90
6A	Análisis de variancia para la variable peso seco de biomasa aérea (g/planta) de <u>E. poeppigiana</u> (16 semanas) sembrada en bolsa con suelo de San José (Typic Eutrandept).....	90
7A	Análisis de variancia para la variable peso seco de biomasa nodular (g/planta) de <u>E. poeppigiana</u> (16 semanas) sembrada en bolsa con suelo de San José (Typic Eutrandept).....	91
8A	Análisis de variancia de la variable contenido de nitrógeno (mg N/planta) de <u>E. poeppigiana</u> (16 semanas) sembrada en bolsas con suelo de San José (Typic Eutrandept).....	91
9A	Análisis de variancia para la variable peso seco de biomasa aérea (g/planta) de <u>E. poeppigiana</u> (16 semanas) sembrada en bolsas con suelo de Puriscal (Ustic Tropohumult) y Turrialba (Typic Humitropept).....	92
10A	Análisis de variancia de la variable peso seco de biomasa nodular (g/planta) de <u>E. poeppigiana</u> (16 semanas) sembrada en bolsas con suelo de Puriscal (Ustic Tropohumult) y Turrialba (Typic Humitropept).....	93
11A	Análisis de variancia de la variable contenido de nitrógeno (mg N/planta) de <u>E. poeppigiana</u> (16 semanas) sembrada en bolsas con suelo de Puriscal (Ustic Tropohumult) y Turrialba (Typic Humitropept).....	94

LISTA DE FIGURAS

Figura No.		Página
1	Esquema de las jarras de Leonard que se utilizaron.....	29
2	Distribución de nódulos en plántulas de <u>E. poeppigiana</u> .....	34
3	Peso seco de biomasa aérea de plántulas de <u>Erythrina poeppigiana</u> inoculadas con diversas cepas de <u>Rhizobium</u> spp y sembradas en jarras Leonard..	48
4	Peso seco de biomasa nodular de <u>Erythrina poeppigiana</u> inoculadas en diversas cepas de <u>Rhizobium</u> spp y sembradas en jarras de Leonard.....	51
5	Contenido de N total de <u>Erythrina poeppigiana</u> inoculada con diversas cepas de <u>Rhizobium</u> spp y sembrada en jarras Leonard.....	53

En el apéndice

Figura

1A.	Peso seco de biomasa aérea de <u>Erythrina poeppigiana</u> (16 semanas edad) sembrada en bolsa con suelo Typic Eutrandept e inoculada con diferentes cepas de <u>Rhizobium</u> spp.....	95
2A.	Peso seco de biomasa nodular de <u>Erythrina poeppigiana</u> (16 semanas edad) sembrada en bolsa con suelo Typic Eutrandept e inoculada con diferentes cepas de <u>Rhizobium</u> spp.....	96
3A.	Contenido de nitrógeno total de <u>Erythrina poeppigiana</u> (16 semanas edad) sembrada en bolsa con suelo Typic Eutrandept e inoculada con diferentes cepas de <u>Rhizobium</u> spp.....	97
4A.	Peso seco de biomasa aérea de <u>Erythrina poeppigiana</u> (16 semanas edad) sembrada en bolsas con suelo (Typic Humitropept y Ustic Tropohumult) e inoculada con diferentes cepas de <u>Rhizobium</u> spp.....	98

Figura

Página

5A.	Peso seco de biomasa nodular de <u>Erythrina poeppigiana</u> (16 semanas edad) sembrada en bolsas con suelo (Typic Humitropept y Ustic Tropohumult) e inoculada con diferentes cepas de <u>Rhizobium</u> spp.....	99
6A.	Contenido de nitrógeno total de <u>Erythrina poeppigiana</u> (16 semanas edad) sembrada en bolsas con suelo (Typic Humitropept y Ustic Tropohumult) e inoculada con diferentes cepas de <u>Rhizobium</u> spp.....	100

## 1. INTRODUCCION

Tradicionalmente en el cultivo del café en Costa Rica se han utilizado especies arbóreas leguminosas como sombra. Estas especies también juegan un papel importante en la producción del café, cacao y pastos, a través de la adición de nitrógeno vía fijación simbiótica (27, 79, 93). En efecto, los árboles fijadores de nitrógeno tienen un gran potencial de uso, y son de particular importancia en los sistemas agroforestales al contribuir con la producción diversificada (10, 19). Sin embargo, poca o ninguna investigación se ha realizado para cuantificar el aporte de nitrógeno al sistema vía fijación, o en lo referente al estudio de la biología de la simbiosis Rhizobium - leguminosas arbóreas.

Según la literatura (69, 90) la simbiosis Rhizobium- leguminosa en forma generalizada puede aportar de 50 a 200 kg N/ha/año o más, lo cual podría ser una fuente importante y económica de nitrógeno fácilmente disponible para las plantas no fijadoras en los diversos esquemas agroforestales. Este aporte beneficioso de las leguminosas se podría incrementar con un manejo adecuado del sistema suelo-planta-bacteria (42).

De acuerdo a varios autores (3, 31, 41, 80), una estrategia deseable en esta línea sería la selección de cepas de Rhizobium más efectivas en la fijación de nitrógeno atmosférico a partir de la población nativa del suelo, para su posterior utilización en inoculantes.

La inoculación con cepas de Rhizobium seleccionadas ha tenido éxito en especies leguminosas arbóreas tales como Leucaena leucocephala ( 70 ) y Mimosa caesalpinifolia ( 41 ), ésta última del sur de Brasil. No se han realizado estudios de esta naturaleza en Erythrina poeppigiana conocida en Costa Rica como "poró gigante" ó "poró", a pesar de ser esta una especie de múltiples usos y gran potencial (19, 20). Por lo tanto, es importante estudiar la biología de la simbiosis entre Rhizobium - Erythrina, para poder establecer algunas pautas de manejo que puedan aumentar el

beneficio que deriva esta especie de dicha simbiosis.

Los objetivos de esta investigación fueron:

- a) Aislar cepas de Rhizobium spp. a partir de nódulos de árboles de E. poeppigiana (Poró) establecidos en diferentes sitios.
- b) Seleccionar las cepas más eficientes en la fijación de nitrógeno, en jarras de Leonard.
- c) Evaluar la respuesta de la inoculación de poró con estas cepas seleccionadas de Rhizobium spp, en tres suelos de Costa Rica.

Esta estrategia de investigación es un primer paso para establecer las necesidades de inoculación, para eventualmente manipular a través de la misma la simbiosis entre Rhizobium poró, y así aumentar los beneficios de mayor productividad en los diversos sistemas agroforestales en los cuales esta leguminosa es empleada.

Basados en los objetivos del presente trabajo de investigación se plantearon las siguientes hipótesis:

- a) Existen diferencias en la capacidad de fijar nitrógeno entre cepas de Rhizobium spp asociadas con E. poeppigiana, por lo tanto es posible seleccionar cepas de Rhizobium spp aisladas de nódulos de árboles de poró creciendo en diferentes sitios, que fijen más nitrógeno atmosférico que otras.
- b) La inoculación con diferentes aislamientos de Rhizobium spp tiene efecto en la producción de biomasa aérea y contenido de nitrógeno total de plántulas de E. poeppigiana sembradas en tres suelos diferentes.
- c) El tipo de suelo tiene efecto sobre la inoculación con los diferentes aislamientos de Rhizobium spp en plántulas de E. poeppigiana.

## 2. REVISION DE LITERATURA

### 2.1. Descripción de *Erythrina poeppigiana*

#### 2.1.1. Taxonomía y Distribución.

*Erythrina poeppigiana* (Walpers) O.F. Cook) pertenece a la familia Leguminosae, subfamilia Papilionoideae, tribu Phaseolae y subtribu Diocleinae (64, 66).

Conocida entre otros nombres vulgares como "Cachingo" (Huila, Colombia), "Pu-ru-to-kaspi" (indios de Putumayo, Colombia), "chucho" "Rojizo" o "Peonia" (Colombia) ( 66 ); "Poró Gigante" o "Poró extranjero" (Costa Rica) ( 58 ); "Bucare" y "Bucare anauco", o "cachimbo" (Venezuela) ( 66 ). Además se le conoce como "mountain immortelle o coral tree" en inglés ( 9 ).

Es una especie originaria del pedemonte peruano. Hoy su presencia esta muy difundida por acción humana y se reproduce espontáneamente en numerosas regiones tropicales bajas húmedas, como en Cuba, Jamaica, Haití, República Dominicana, Puerto Rico, Guadalupe, Martinica, Trinidad y Tobago, México, Guatemala, El Salvador, Honduras, Nicaragua, Costa Rica, y Panamá (26, 66). Como sombra en café, se ha extendido su distribución hasta 1600 msnm, a veces más (2000 msnm han sido reportados en Colombia), pero no soporta temperaturas frías ( 66 ).

#### 2.1.2. Descripción General.

*E. poeppigiana* es un árbol grande, llegando a alcanzar alturas de 30 m o más y diámetros de hasta 1m algunas veces más. Presenta un fuste raras veces recto, y con abundantes ramas laterales (9, 58), corteza lisa y generalmente con aguijones tanto en troncos jóvenes como en las ramas ( 58 ). Su madera es clara, liviana y de escasa durabilidad ( 26 ).

Es un árbol deciduo; las hojas son trifoliadas alternas y sin estípulas (16, 58) y presentan un par de nectarios extra-florales que son característicos en el pecíolo, y a veces aguijones en el raquis ( 58 ).

Sus flores son color coral (anaranjado-rojizo) brillante, muy vistosas ( 9 ). Presenta inflorescencias terminales con flores zigomórficas completas ( 58 ).

El fruto es una vaina seca, dehiscente, color pardo-claro, de 7 a 11 cm de longitud y de 10 a 14 mm de ancho, generalmente con 2 a 4 semillas reniformes alargadas color pardo-morado ( 58 ).

Según Krukoff ( 66 ), no se conoce el número de cromosomas para esta especie en particular, pero la mayoría en el género Erythrina poseen  $2n = 42$ . La constancia en el número de cromosomas parece indicar que la mutación genética es la responsable de la diversidad de especies en este género, y no la poliploidía.

### 2.1.3. Usos y aplicaciones.

El género Erythrina ha sido ampliamente estudiado entre otros por citotaxónomos y químicos debido a su multiplicidad de usos, teniendo gran importancia en la producción de alcaloides.

E. poeppigiana se emplea principalmente como árbol de sombra en cafetales, donde sus ramas se podan anualmente. Así en la zona de Turrialba en Costa Rica se efectúan dos podas anuales drásticas en el poró (enero-febrero, y julio-agosto) para regular la cantidad de sombra. Sin embargo, se pueden presentar variaciones a este sistema de poda ( 81 ). Los árboles de poró por lo general se plantan a un espaciamiento de 6m x 6m dentro del cafetal, pero esta distancia varía según la densidad de plantación del café, la poda usada y la especie de café. Así, el poró juega un papel importante dentro del ciclo del agroecosistema del café por su posible aporte de nitrógeno vía fijación simbiótica. Según estimaciones de Bornemisza ( 15), una hectárea de café puede recibir unos 100 KgN/ha/año por concepto de fijación simbiótica entre árboles de

sombra y mineralización de la materia orgánica. Russo ( 81 ) registró un aporte de 11800 Kg de biomasa aérea por hectárea proveniente de la poda del poró en un cafetal bajo estudio en Turrialba, lo cual constituye potencialmente una gran fuente de nitrógeno y otros nutrimentos para el suelo. Según estudios realizados por Aranguren, Escalante y Herrera ( 8 ) en café en Venezuela, el flujo de nitrógeno asociado con la caída de hojarasca estaba dominado por la fracción de hojas de los árboles de sombra que contribuyeron con 86 KgN/ha/año del total de 189KgN/ha/año. Estos autores encontraron que el sistema (café-leguminosas de -sombra) puede compensar ampliamente la salida de nitrógeno por cosecha con el subsidio proveniente de los árboles de sombra (Inga y Erythrina):

El género también es utilizada como sombra en cacaotales. Hardy ( 55 ) menciona un aporte de 46 Kg N/ha por árboles de Erythrina en cacaotales en Trinidad y Tobago. Thorold ( 93 ) menciona su efecto benéfico sobre el cacao en Trinidad. Santana y Cabala Rosand ( 82 ) detectaron altas concentraciones de N en muestras de suelo tomadas cerca de los árboles de Erythrina usados como sombra de cacao en Brasil, en promedio los suelos de la zona sombreada contenían 480 mgN/ha por encima del promedio de los suelos en plantaciones sin sombra.

Daccaret y Blydenstein ( 27 ) señalaron el potencial de E. poeppigiana como árbol de sombra en potreros, ya que se aumentó el contenido de nitrógeno en el suelo y forraje cuando se estableció la asociación con el poró. Rodríguez ( 78 ) estudiando la asociación de poró con King grass (Pennisetum purpureum), concluyó que dicha asociación incrementó la producción de biomasa total y proteína cruda total del pasto en un 36 por ciento y 193 por ciento, respectivamente, y la producción de biomasa comestible y proteína cruda de la biomasa comestible en un 18 por ciento y 167 por ciento, respectivamente.

Una de las respectivas utilizaciones del poró es el empleo de su follaje y ramas jóvenes como suplemento proteico en la alimentación

animal. Por sus características cualitativas las hojas de poró constituyen un recurso forrajero proteico de gran valor. En el CATIE se ha utilizado a nivel experimental como parte de la dieta de alimentación de rumiantes menores (cabras y ovejas) (11, 19). De acuerdo con los resultados preliminares obtenidos en esta etapa, su empleo a mayor escala podría llegar a hacerse común en la dieta animal. En el caso del empleo de árboles como fuente de forraje es importante tomar en cuenta que existe gran variabilidad de valor nutritivo entre los diferentes componentes de la rama (hojas, pecíolo, tallo y corteza) y entre las diferentes fracciones de la rama; así, Benavides ( 11 ) encontró los siguientes porcentajes de proteína cruda del poró según la parte de la rama: 31,3 por ciento en las hojas, 12,2 por ciento en el pecíolo, 10,7 por ciento para el tallo y 14,1 por ciento en la corteza. La variabilidad está determinada por las funciones fisiológicas y la edad de cada una de las partes de la rama ( 11 ).

Además, existen antecedentes de la utilización de su madera en la elaboración de celulosa ( 81 ).

## 2.2. Simbiosis entre *Rhizobium* spp y *Erythrina poeppigiana*

Poco se conoce sobre el mecanismo de la simbiosis en la leguminosas arbóreas, y no existen estudios concluyentes sobre los mecanismos de infección y penetración de las bacterias, así como de la formación de los nódulos en árboles. En el presente trabajo no se estudió específicamente la simbiosis; sin embargo, se hizo una sinopsis de la información existente al respecto, por la importancia de este proceso en esta leguminosa.

### 2.2.1. Especificidad hospedero-simbionte.

Según Alexander ( 2 ), la relación entre bacteria-ambiente se debe considerar desde dos puntos de vista: el organismo en el suelo como su hábitat y la bacteria dentro del nódulo. La inclusión de bacterias dentro del género Rhizobium se basa en la capacidad del organismo de formar nódulos en las raíces de plantas leguminosas; la denominación por especie va de acuerdo con el

hospedero que nodulen, o sea, en su especificidad (32, 99). La clasificación de especies por grupos de inoculación cruzada resulta controversial ( 101 ), sin embargo, la idea de agrupar las bacterias de Rhizobium según el ámbito de hospederos que nodulen se hizo con el objeto de presentar al lector las interrelaciones que existen entre las diferentes especies de Rhizobium así como el potencial de rango de hospederos de estas cepas ( 99 ). A continuación se presentan algunos grupos de inoculación cruzada, según Trinick ( 95 ):

Grupo	Género representativo	Especie de <u>Rhizobium</u>
Trébol	<u>Trifolium</u>	<u>R. trifolii</u>
Arveja	<u>Pisum</u> , <u>Lathyrus</u> , <u>Lens</u> , <u>Vicia</u>	<u>R. leguminosarum</u>
Frijol	<u>Phaseolus</u> , <u>Melilotus</u> , <u>Trigonella</u>	<u>R. meliloti</u>
Soya	<u>Glycine max</u>	<u>R. japonicum</u>
Lupus	<u>Lupinus</u> , <u>Ornithopus</u>	<u>R. lupini</u>
Caupí	Un gran número de géneros de las tres subfamilias de Leguminosae	<u>R. spp.</u>
Otros	Pequeños grupos de uno o más géneros o especies que son "específicos" en su <u>Rhizobium</u> i.e. <u>Lotus</u> , <u>Sesbania</u> , <u>Mimosa</u> , <u>Cicer</u> , <u>Leucaena</u> , <u>Coronilla</u> , <u>Onobrychis</u> etc.	<u>R. spp</u>

Dentro del grupo caupí se incluyen todas aquellas bacterias del género Rhizobium que no presentan especificidad, y que por lo tanto pueden nodular a un amplio ámbito de hospederos ( 74, 99 ).

Los primeros informes sobre la nodulación en E. poeppigiana fueron dados por Allen y Allen ( 4 ) en Hawaii, y por De Souza ( 36 ) en Trinidad Tobago.

En una experimento realizado por Allen y Allen ( 4 ) se inoculó E. poeppigiana con inóculo homólogo, y con inóculo de cepas de caupí. Las plantas inoculadas se beneficiaron con su inóculo homólogo lo cual se pudo observar por la abundancia de nódulos formados, así como por el mejor crecimiento y color de las plantas. Los autores concluyeron que si bien E. poeppigiana pertenece al grupo caupí, se ve beneficiada cuando se inocula con Rhizobium homólogo.

### 2.2.2. Nódulos en E. poeppigiana.

Estudios realizado en el estado de plántula en E. poeppigiana demuestran que los nódulos se localizaron principalmente en la raíz principal próximos al cuello. Russo ( 81 ) encontró que, en árboles, los nódulos se hallan en las raíces laterales secundarias y terciarias con un tamaño de 0,2 a 5,5 mm de diámetro, y de forma esférico - ovoidal.

Los pelos radicales son los sitios de infección de Rhizobium en un gran número de leguminosas. Se reporta la excepción de Neptunia oleracea, una leguminosa acuática que carece de pelos radicales; en este caso Rhizobium penetra a través de células epidérmicas. Otra ruta importante de penetración es el punto de emergencia de las raíces laterales ( 30 ), tal como se ha observado en los géneros Erythrina e Inga (\*). Los géneros Sesbania y Aeschaenomyne presentan nódulos en el tallo, características muy particular ( 30 ). La bacteria dentro del nódulo sufre cambios fisiológicos y bioquímicos para transformarse a bacteroide y posteriormente tiene lugar la fijación de nitrógeno si se establece la simbiosis adecuada (29, 36 ). Si solamente penetra una bacteria la población de bacteroides será genéticamente homogéneo, sí son muchas bacterias, la población

(\*) Ramírez, C., y Roskoski, J. Comunicación personal. I Seminario Centroamericano sobre Fijación Biológica de Nitrógeno. Zamorano, Tegucigalpa, Honduras, 24 a 28 de junio de 1985.

será heterogénea ( 29, 53). Johnston y Beringer ( 61 ) han demostrado que en un nódulo hay más de una cepa de Rhizobium, y postularon que la bacteria se puede conjugar durante la infección.

Posteriormente a la formación del nódulo comienza la producción de leghemoglobina, un pigmento que contiene hierro en su molécula y cuya función consiste en transportar oxígeno ( 7 ). Cuando los nódulos están activos se observa una coloración rojiza al partirlos, producto de la presencia de la leghemoglobina. Si se interrumpe la fijación de nitrógeno esta se convierte en legcoleglobina de color verde ( 7 ).

### 2.2.3. Factores que afectan la simbiosis.

Existen abundante información sobre los factores que afectan la simbiosis entre Rhizobium y las leguminosas en general ( 15, 21, 39 ). Sin embargo, es importante enumerar algunos de los aspectos que influyen en el proceso de fijación simbiótica del nitrógeno atmosférico, y que definen el éxito o el fracaso en el establecimiento de las diferentes asociaciones.

Entre los factores que afectan la simbiosis se pueden distinguir los siguientes: factores bióticos, físicos y químicos.

Dentro de los factores bióticos se pueden separar:

- La leguminosas: especificidad, y nodulación ( 2, 101 ).
- La bacteria: potencial genético, capacidad de tolerar condiciones de estrés, competencia entre cepas por sitios de infección (90, 92, 101).
- Otros microorganismos: antagonistas, y depredadores ( 2, 31 ).

Dentro de los factores físicos se pueden citar los siguientes:

- Temperatura: ejerce una influencia en el proceso de infección y formación del nódulo, presentando un óptimo entre 18-28°C (39, 100 ).
- Aereación: la nodulación y fijación se reducen considerablemente a niveles de  $O_2$  inferiores a 0,21 atm ( 50, 100 ).

- Humedad: la sequía afecta en el mismo grado tanto el desarrollo de la planta como la fijación de nitrógeno. La carencia de agua es la mayor causa de falta de nodulación ( 101 ).

Dentro de los factores químicos que afectan la simbiosis se pueden distinguir los siguientes:

- pH: existen diferencias en la capacidad de tolerar la acidez del suelo ( 6, 71, 72 ).
- N : pequeñas cantidades de nitrógeno (de 10 a 30 ppmN) estimulan el crecimiento inicial de plántulas y la nodulación (62, 71). Posteriormente se da un efecto negativo del nitrógeno en la nodulación y fijación que se va acentuando con la edad de las plantas ( 71 ). El efecto inhibitorio del nitrógeno en la fijación biológica depende en gran parte del período de su aplicación, de la cepa de Rhizobium en cuestión, y de la concentración del fertilizante (71, 83, 88).
- Ca : posee un efecto específico en la nodulación ( 6, 94 ); se requiere más calcio para la formación del hilo de infección e iniciación que para el desarrollo del nódulo. La deficiencia mediana de calcio produce un funcionamiento irregular de los nódulos que puede provocar un síntoma de deficiencia de nitrógeno.
- Mg : no es claro si el efecto es directo o si ocurre a través del crecimiento limitado del hospedero ( 94 ).
- P : la aplicación de fósforo ejerce un efecto beneficioso sobre la nodulación ( 94 ). La toxicidad de fósforo reduce el número de nódulos así como la actividad nodular ( 70, 72 ).
- Mo : los requisitos de molibdeno para la fijación de  $N_2$  son mayores que para la nodulación ( 49, 96 ).
- Zn : la deficiencia de zinc reduce el peso de brotes, el peso de nódulos, la concentración de leghemoglobina producida y el N fijado (50).
- Mn : el manganeso interfiere básicamente en el desarrollo de la planta ( 40 ).
- Otros: potasio, azufre, cloro, hierro, boro, cobre, cobalto (45, 71, 94).

#### 2.2.4. Problemas del pH, Al y Mn sobre la nodulación.

El pH afecta el crecimiento y la sobrevivencia de Rhizobium en suelo, afecta la infección de las raíces y el inicio de nódulo, así, como también la eficiencia de la simbiosis y la nutrición de la leguminosa ( 6, 46 ). A pH bajo hay poco calcio disponible y un exceso de  $H^+$ , así como deficiencia de molibdeno ( 6, 40 ).

Existe un fuerte interacción entre el calcio disponible y el pH así el efecto del pH domina sobre la deficiencia de Ca. Basado en esta interacción, Andrew ( 6 ) acota los siguientes puntos:

a) las especies leguminosas difieren en la capacidad de nodular a diferentes sustratos y concentraciones de pH y Ca; b) el crecimiento óptimo de plantas noduladas y la máxima producción de nitrógeno depende del pH y Ca presentes; y c) los efectos del pH y Ca en el crecimiento de las plantas son menores cuando hay suficiente nitrógeno, que cuando el N está ausente.

En relación a las cepas de Rhizobium, estas presentan diferencias en la capacidad de tolerar la acidez del suelo. Las bacterias de crecimiento lento (R. japonicum, R. lupini, caupi) son más ácido resistentes que los tipos de crecimiento rápido (R. meliloti) (95).

El efecto del aluminio en la fijación de nitrógeno se relaciona con el efecto en el crecimiento de las raíces. Según Sartain y Kamprath ( 83 ) a mayor porcentaje de saturación de aluminio se producen pocos nódulos grandes y aparentemente inefectivos, a menor porcentaje de saturación de aluminio se produce una gran cantidad de nódulos pequeños y efectivos. Andrew ( 6 ) menciona que existe una tolerancia diferencial del aluminio por especies, aunque las razones no se conocen bien.

Dobereiner ( 40 ) estudiando el efecto de la toxicidad de manganeso en Phaseolus vulgaris concluyó que el daño depende de la cepa de Rhizobium involucrada. El efecto se manifiesta como una reducción en el número y tamaño de nódulos. De acuerdo con Andrew ( 6 ), las leguminosas son más sensibles a la toxicidad de Mn que las no-leguminosas, según el autor, el problema se relaciona básicamente con

el desarrollo de la planta.

Según Norris y Date (74) las leguminosas tropicales son más tolerantes a la acidez del suelo que las leguminosas de zonas templadas. Al enfocar el problema de acidez del suelo y su relación con la fijación de nitrógeno, se deben distinguir los siguientes efectos: a) el efecto directo del pH per se; b) la deficiencia de calcio y molibdeno; y c) la toxicidad de manganeso y aluminio.

## 2.3. Parámetros para cuantificar la fijación biológica de nitrógeno

### 2.3.1. Método de la diferencia.

El análisis del peso seco de la planta por el método Kjeldahl se ha utilizado para determinar el contenido de nitrógeno total de las plantas ( 37 ). Sin embargo, no es posible distinguir entre el nitrógeno proveniente de la fijación y el nitrógeno (nitrato o amonio) del suelo . El "método de la diferencia" consiste en comparar el N-total de la parte aérea de la leguminosa nodulada y una planta indicadora (no-leguminosa, o bien una leguminosa no nodulada). El N adicional, que se obtiene por diferencia, se considera N fijado ( 12 ). Esta técnica considera que tanto la leguminosa nodulada como la planta indicadora, toman las mismas cantidades de nitrógeno del suelo. Sin embargo, el potencial de asimilación de nitrógeno de una gran parte de plantas no-leguminosas no es tan alto como es el caso de las leguminosas, resultando así en una sobreestimación del N fijado ( 65 ).

Con una ventaja a este método se señala que es una medida directa del crecimiento de las plantas y del ingreso de nitrógeno. La mayor desventaja se presenta en la necesidad de uniformizar las condiciones de crecimiento y capacidad de absorción de nitrógeno de los dos tipos de plantas en estudio, porque de lo contrario se pueden obtener sobre o subestimaciones de la fijación ( 12, 65 ).

### 2.3.2. Métodos que utilizan $^{15}\text{N}$ .

Dilución de isótopos. Consiste en agregar al suelo fertilizante (nitrógeno orgánico o inorgánico) enriquecido con  $^{15}\text{N}$ , y posteriormente se determina la concentración de  $^{15}\text{N}$  en la planta fijadora y la no-fijadora. Por diferencia se determina la cantidad de nitrógeno fijado ( 12 ). Rennie et al ( 77 ) expresaron esa cantidad como:

$$\% \text{N}_2 \text{ fijado} = 1 - \frac{\% \text{ exceso } ^{15}\text{N} \text{ (leguminosa)}}{\% \text{ exceso } ^{15}\text{N} \text{ (no-fijadora)}} \times 100$$

La técnica se basa en que ambas plantas toman el nitrógeno del suelo de la misma composición isotópica, aunque la cantidad total removida pueda ser diferente ( 77 ).

La técnica de dilución de isótopos es potencialmente el método más preciso de determinar la fijación de nitrógeno en el campo. Presenta dos grandes desventajas: una, se relaciona con su alto costo de uso, y la otra, con los aspectos cuantitativos en la determinación de las cantidades de isótopos ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) que toman ambas plantas del suelo ( 12 ).

Método de la abundancia natural. Esta técnica determina la variación de la abundancia natural de  $^{15}\text{N}$  que ocurre por discriminación durante la fijación de  $\text{N}_2$ , y que favorece al isótopo  $^{14}\text{N}$  (12). Shearer et al ( 84 ) demostraron que el isótopo  $^{15}\text{N}$  excede en promedio 9,22 por ciento en una gran variedad de suelos al contenido en la atmósfera. Por lo tanto, las plantas no fijadoras que dependen del nitrógeno del suelo deberían contener más  $^{15}\text{N}$  que las plantas fijadoras. La técnica se encuentra aún en fase de desarrollo, y las ventajas y desventajas que presenta son similares a aquellas mencionadas para el método de dilución de isótopos ( 84 ).

### 2.3.3. Método de determinación de ureído.

Los ureídos, alantoina y ácido alantoico, son sustancias consideradas

como el producto final de la fijación de nitrógeno en algunas leguminosas, y se encuentran en la fracción de nitrógeno soluble de secciones de plantas así como en el xilema ( 68 ). Al determinar los contenidos de nitrato y ureídos se establece la dependencia simbiótica de la planta y proporciona una medición de la planta y proporciona una medición de la fijación de  $N_2$  (12, 68). Entre las limitaciones de este método se mencionan la dificultad en el sitio de muestreo para la determinación de los ureídos, limitación a nivel de campo de obtener los exudados, la distribución de los ureídos en la planta, y la edad de la planta (68, 89). Las ventajas que presenta este método consiste en la facilidad de analizar y separar entre fuentes de N, además, se puede analizar la parte de la planta en el suelo y así se obtiene información por debajo del nivel del mismo (12, 68).

#### 2.3.4. Técnica de reducción de acetileno.

La técnica de reducción de acetileno se basa en que la nitrogenasa (enzima del sistema de fijación de nitrógeno) puede reducir el acetileno o etileno. Así, la actividad de la nitrogenasa es una medida indirecta para determinar la fijación de  $N_2$  (12, 85).

La técnica ha sido ampliamente utilizada entre otros métodos por su rapidez, economía, facilidad de manejo de las muestras y el equipo. Sin embargo, presenta dos grandes limitaciones; 1) Variabilidad debida al muestreo, edad de la plantas y de los nódulos, actividad nodular en relación a la hora del día, recuperación del tejido nodular, efectos de las condiciones climáticas (12, 53), y 2) Interpretación de la tasa de  $C_2H_2$  reducido en términos de fijación de  $N_2$ . Existe un ámbito teórico de 3 moles reducidos  $C_2H_2$ : 1 mol fijado  $N_2$ , pero éste varía ampliamente según las condiciones del experimento. Gibson (53) utilizando la técnica en el campo, con Lupinus, encontró que la tasa de conversión varió de 0,9: 1 a 6,6: 1 según la edad de la planta. Además, se critica el hecho de que el acetileno no es el sustrato real del mecanismo de la fijación simbiótica (12, 85 ).

### 2.3.5. Otros.

La mejor manera de interpretar la eficiencia simbiótica entre las leguminosa y Rhizobium sin recurrir a métodos que muchas veces en nuestro medio resultan poco prácticos por limitaciones de orden económico u otra índole, consiste en la determinación del peso seco de la parte aérea de las plantas y el peso seco de nódulos. Según Van Kessek y Roskoski (98, 79) la biomasa nodular se correlaciona altamente con la biomasa foliar ( $r= 0,73; 0,70; 0,79; 0,96; 0,78$ ). Esto es comprensible puesto que para la nodulación y la fijación de nitrógeno se requiere de fotosíntatos, de ahí que a mayor cantidad de biomasa aérea joven (potencial de fotosíntesis más alto) se espera una mayor biomasa nodular.

Dommergues ( 44 ) cita como otra alternativa de evaluar el potencial de fijación de nitrógeno por árbol, la determinación del peso seco total de nódulos. Según el autor, en el campo se puede evaluar además, el incremento de N del suelo bajo el árbol y el incremento de N inmovilizado en la biomasa de la planta. Dobereiner, Bergallo y De Figueredo ( 43 ) encontraron regresiones significativas entre el logaritmo de N-total de la planta con el peso seco de nódulos.

### 2.4. Importancia de la simbiosis *Rhizobium* - leguminosas arbóreas.

La información disponible sobre la capacidad actual de fijación de nitrógeno por parte de las leguminosas arbóreas es muy limitada. A continuación se presentan algunos de los avances obtenidos por varios autores:

Lindbland y Russo (\*) determinaron la actividad de nódulos de E. poeppigiana asociada con café y obtuvieron valores de reducción de acetileno entre 5,9 y 26,1 nmoles  $C_2H_4$  mg (peso seco nódulos) $^{-1} h^{-1}$ , con un promedio de 15,7 nmoles  $C_2H_4$  mg (peso seco nódulos) $^{-1} h^{-1}$ . Estos valores concuerdan con un ámbito obtenido por Escalante, Herrera y Aranguren ( 47 ) en el sistema E. poeppigiana - cacao en Venezuela .

---

(\*) Lindblad, y Russo, R. Comunicación personal. Fijación de nitrógeno en E. poeppigiana (poró). Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Turrialba, febrero, 1985.

Roskoski ( 79 ) obtuvo un valor promedio de 35 kgN/ha/año fijado por Inga juinicuil en plantaciones de café en México, luego de 13 meses bajo estudio. Este valor podría ser mayor en otras condiciones puesto que los árboles en estudio se encontraron en suelos con altos niveles de N 950 ppm  $\text{NH}_4^+$  y nitrógeno total 0,5 por ciento ). En otro estudio (80) la misma autora encontró que el total de fijación aparente fue mayor en el sitio con I. juinicuil , equivalente a más de 40 kgN/ha/año (asumiendo una relación de 3:1 para  $\text{C}_2\text{H}_2$ :  $\text{N}_2$ ). La fijación de nitrógeno para el sitio con I. juinicuil equivale a 53 por ciento de la cantidad del fertilizante nitrogenado aplicado anualmente, lo cual puede tomarse como indicativo de que la fijación de nitrógeno por leguminosas, adicionales al cultivo, puede ser una fuente importante de N para el café.

Cadimas y Alvim (22 ) en el sistema cacao ÷ E. glauca (= fusca) encontraron que los cacaoteros vecinos a los árboles de sombra produjeron más que los alejados de E. glauca. La diferencia de producción está aparentemente relacionada con algunos factores edafológicos (contenido de elementos nutritivos, N, materia orgánica, densidad real, humedad) de importancia para el crecimiento de los cacaoteros.

Högberg ( 57 ) obtuvo una tasa de fijación de  $110 \pm 30$  KgN/ha/año por reducción de acetileno para L. leucocephala en Tanzania.

Según Santana y Cabala ( 82 ) existe una fuerte evidencia que Erythrina aumenta el contenido de N del suelo en plantaciones de cacao en Brasil, y que la entrada de N al sistema vía hojarasca más lluvia puede ser mayor que la removida por la cosecha de 1500 Kg de grano seco/ha.

Por otro lado, la inoculación con cepas seleccionadas ha tenido éxito en leguminosas arbóreas tales como L. leucocephala (70), y Mimosa caesalpinifolia ( 41 ). Dobereiner ( 41 ) demostró la especificidad para la leguminosa M. caesalpinifolia. Después de siete meses el porcentaje de sobrevivencia de las plantas inoculadas fue de 94 por ciento mientras que en las plantas no inoculadas fue de 52 por ciento. Las plantas inoculadas crecieron más rápido y mejor que las no inoculadas.

## 2.5. Selección de cepas

### 2.5.1. Terminología.

Inoculación: La inoculación es una forma de manejo que asegura la presencia de una cepa adecuada en el momento preciso y en número suficiente para lograr una infección rápida y efectiva en el cultivo en cuestión, y así lograr una mayor fijación de nitrógeno (42, 69). El primer paso para una inoculación efectiva consiste en seleccionar las cepas de Rhizobium apropiadas ( 90 ).

Según Dommergues ( 44 ) la respuesta a la inoculación depende de una cepa adecuada de Rhizobium y de la especificidad de la leguminosa, esto es, en la habilidad de nodular con un amplio ámbito de cepas de Rhizobium, o con una cepa en particular. El autor menciona que, excepto en suelos muy pobres, es poco probable la necesidad de inoculación en árboles leguminosos.

Cepa: Vincent ( 99 ) define una cepa "como cualquier cultivo de Rhizobium que no tenga historial común con ningún otro cultivo y agrega, que la identidad e historial de cada cepa se debe conservar y no debe ser confundida".

Un número de cepas puede ser agrupado de acuerdo a características, por ejemplo, "serotipo" y, según el grado de similitud, forman "tipos" que se mantendrán bajo determinada colección o grupo de cepas. Estas no necesariamente están relacionadas, por lo tanto, sería un error extrapolar de tal grupo para predecir otros aspectos relacionados con el comportamiento de la cepa ( 100 ).

Rhizobium: Las bacterias del género Rhizobium pertenecen a la familia Rhizobiaceae ( 49 ). Son bacilos gram negativo, quimiorganotróficos aeróbicos, generalmente móviles cuando tienen flagelos peritricos, polar o subpolares, sin endosporas, pero poseen granulos provenientes de poli-B-hidroxibutirato, entre otras características ( 99, 100 ).

Por su tiempo de generación se reconocen dos grandes grupos: (1) de crecimiento rápido, y (2) de crecimiento lento. Las bacterias del primer grupo presentan un tiempo promedio de generación de 2-4 horas, forman colonias gomosas y blancas, y alcanzan un diámetro de 2-4 mm en 3-5 días. Las del segundo grupo tienen un tiempo de generación promedio de 6-8 horas, formando colonias pequeñas ( $\leq$  1 mm en 10 días), menos gomosas que las primeras, densas y pegajosas ( 99, 100 ).

Selección de cepas: Las diferentes cepas de Rhizobium varían en su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico en simbiosis con leguminosas. Bajo el término "selección de cepas" se reúnen una serie de metodologías que conllevan a obtener aquellas bacterias que sobresalen por su capacidad de aumentar el rendimiento de las plantas asociadas, así como su contenido de nitrógeno ( 90 ).

De acuerdo con Pereira ( 76 ) la promiscuidad es más común en regiones tropicales que en zonas templadas. Por lo tanto, resulta más difícil introducir cepas eficientes de Rhizobium, y el mismo autor considera que con las leguminosas del grupo caupí se puede obtener una mayor eficiencia simbiótica a través de la introducción de cepas seleccionadas.

Boonker, Weber y Bezdicek ( 13 ) consideran la introducción de cepas más eficientes en la fijación de nitrógeno como una importante meta en el manejo. Dommergues ( 44 ) como resultado de investigaciones preliminares, considera que los requisitos de Rhizobium por árboles leguminosos, son tan complejos como en leguminosas anuales, y que por lo tanto, es necesario realizar más investigación en este campo.

#### 2.5.2. Metodologías para la selección de cepas.

La primera etapa de la investigación sobre la relación simbiótica entre Rhizobium y las leguminosas requiere de una evaluación de la necesidad de inoculación en suelos representativos. Vincent ( 99 ) describe un método para determinar la necesidad de inoculación que

se basa en observar la nodulación de la leguminosa en el área en estudio y así evaluar los siguientes aspectos: la proporción de plantas noduladas; la abundancia o escasez de nódulos en las plantas noduladas; la ubicación de los nódulos en el sistema radical (cuello, distal, raíz principal o lateral); y el color de los nódulos (blanco, rojo, verde) para determinar su funcionalidad.

Date ( 30 ) basa la necesidad de inocular de acuerdo a los resultados que se obtengan en un experimento de tres tratamientos :

1- testigo sin inocular para determinar la presencia de cepas negativas; 2- inoculación con cepas que presentan alto potencial de fijación; y 3- inoculación con la misma cepa más adición de fertilizante nitrogenado.

Para obviar el efecto de la mineralización del nitrógeno debido a la alteración del suelo, Sylvester *et al* ( 91 ) utilizaron un sistema de cilindros de suelo no alterado para evaluar la respuesta de cuatro leguminosas forrajeras a la inoculación y fertilización nitrogenada en Oxisoles de Colombia. Obtuvieron, de esta forma, cepas seleccionadas. Según los mismos autores, los potes de suelo alterado no son tan útiles para la selección de cepas Rhizobium porque la perturbación del suelo causa acumulación de  $\text{NO}_3^-$  en el suelo. El método que utilizaron consistió en la introducción de tubos de PVC (10 cm de diámetro y 25 cm de longitud) en el suelo hasta aproximadamente 1 cm de borde superior. Posteriormente se retiró el bloque entero (suelo, raíces, cilindro) con ayuda de un cuchillo para su posterior traslado al invernadero. Se utilizó un bajo nivel de fertilización pero adecuado para el crecimiento de las leguminosas. El fertilizante nitrogenado (30 kg N/ha urea) se agregó en forma fraccionada, y el inóculo se agregó en forma granular (  $\geq 10^8$  bacterias/g ) ( 91 ).

Según Date ( 31, 33 ) la selección de cepas incluye los siguientes pasos: a) establecer la compatibilidad genética de las mismas con el huésped; b) evaluar la capacidad fijadora en jarras de Leonard; c) inocular en el suelo en vasijas, potes, cilindros, otros, en condiciones de invernadero; y d) ensayos de campo. Existen muchas modificaciones de esta metodología para selección de cepas y ensayos de inoculación.

### 3. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1. Organización y secuencia

Este trabajo de investigación se dividió en tres etapas:

a) primeramente se realizaron trabajos de recolección de nódulos aislamiento y caracterización morfológica de las colonias de Rhizobium spp; b) la segunda etapa correspondió a la selección de cepas de Rhizobium spp en jarras de Leonard ( 99 ); y c) la etapa correspondió a la evaluación en invernadero de la inoculación con cepas de Rhizobium spp sobre E. poeppigiana (poró), utilizando el sistema de suelo no alterado ( 91, 92 ).

A continuación se presenta una descripción de las localidades en las cuales se realizó cada una de las etapas:

##### 3.1.1. Ubicación.

Recolección de nódulos: La recolección de nódulos de poró se efectuó en diferentes sitios del valle intermontano de Costa Rica, a saber: Cabiria y La Montaña en el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Turrialba (600 msnm, 2700 mm ppt prom. anual, 9°5''N y 83°''W) (23); La Unión de Tres Ríos, Cartago (1260 msnm, 2220 mm ppt. prom. anual, 9°54'N y 84°00'W); San Rafael de Escazú, San José (1042 msnm 1712 mm ppt. prom. anual, 9°55'N y 84°08'W); Barrio Sánchez de Curridabat, San José (1250 msnm 2220 mm ppt. prom. anual 9°55'N y 84°00'W); Santa Lucía de Barva, Heredia (1159 msnm, 2000 mm ppt, 10°00'N y 84°07'W); Bo. La Valencia de Santa Rosa, Turrialba (1118 msnm, 2000 mm ppt. 9°58'N y 84°05'W (24, 59).

Aislamiento de colonias: El aislamiento y la caracterización morfológica de las diferentes cepas de Rhizobium spp a partir de nódulos de poró se realizó en el laboratorio de Microbiología de Suelos del Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica, ubicado en Sabanilla de Montes de Oca, San José.

Selección de cepas en jarras de Leonard: La selección en jarras de Leonard se llevó a cabo en los invernaderos del Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica (1305 msnm, 19°C temp. promedio anual, 1712 mm ppt. promedio anual de la zona, y ubicado a 09°56'43" N y 84°01'32" W, según datos del Instituto Meteorológico Nacional) (59).

Selección e inoculación en bolsas con suelo: La evaluación de la inoculación y selección de cepas de Rhizobium spp utilizando suelo como sustrato se llevó a cabo en el invernadero del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza ubicado en Cabiria. La Temperatura anual promedio de la zona es de 26,42°C max. y 18,00°C Min., según datos de la Estación Agrometeorológica del CATIE (23), no se cuenta aún con datos propios del invernadero por ser de reciente construcción.

### 3.1.2. Suelos.

Se muestrearon suelos en Puriscal, Turrialba y San José.

En el cuadro 1 se muestran los resultados de los análisis físico y químico para estos suelos.

El suelo de Puriscal se recolectó en la finca del Ministerio de Agricultura y Ganadería en ese lugar (1200 msnm, 2700 mm ppt promedio anual, 21°C temp. promedio, 0°51' N y 84°18'W ), el cual ha sido clasificado como Ustic Tropohumult ( 5 ).

El suelo de San José se tomó en terrenos de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Costa Rica (1305 msnm, 1712 mm ppt promedio anual, 19,3°C. temp. promedio anual, 9°56' N-84°01'W), clasificado como Typic Eutrandept ( 60 ).

El suelo de Turrialba se tomó de un cafetal en la Montaña, CATIE (600 msnm, 2700 mm ppt promedio anual, 9°5' N y 83°38'W ), el cual ha sido clasificado como Typic Humitropept ( 1 ).

CUADRO 1. Análisis físico y químico de los suelos donde se efectuó el ensayo.

Localidad	pH H <sub>2</sub> O	Ca meg/100 ml suelos	Mg	K	Acidez ext.	P	S mg/ ml suelo	Zn	Mn	Co	M.O. %	N %	Textura
Heredia	5,72	4,75	1,28	0,51	0,45	33,0	32,3	*	*	*	7,30	0,34	Franco
Tres Ríos	6,61	11,71	5,12	1,42	0,05	19,2	23,2	*	*	*	6,97	0,33	Franco arcilloso
Escazú	6,39	10,10	3,26	0,70	0,08	6,7	13,2	*	*	*	6,63	0,29	Franco arcilloso
San José	7,36	11,52	0,87	0,76	0,10	23,8	*	14	1	11	4,89	0,34	Franco
Puriscal	4,71	6,81	2,79	0,19	6,90	22,2	*	5	29	16	4,69	0,27	Franco arcilloso
Turrialba	4,61	1,13	0,32	0,49	3,20	29,3	*	3	9	35	8,04	0,36	Franco

Porcentajes de saturación de	
Aluminio:	Puriscal 37%
	Turrialba 56,3 %
	San José 1%

Análisis realizado en el laboratorio de Suelos del CATIE, Turrialba.

(\*) No se determinó

### 3.2. Diseño Experimental

#### 3.2.1. Diseño y tratamientos.

Para la evaluación en jarras de Leonard se utilizó un diseño irrestrictamente al azar con cuatro repeticiones, y dos plantas por jarra.

Se utilizan 20 cepas de Rhizobium spp de aislamientos homólogos de E. poeppigiana, y cuyo procedimiento se detalla en el acápite 3.4.1. (pág.22); 2 cepas de Rhizobium spp procedentes de colección (6032 "caupí" de Nitragin, USA, y la 6302 "caupí" procedente de Mircen, Brasil); un testigo absoluto (sin Rhizobium sin nitrógeno); y un testigo nitrogenado (sin Rhizobium con 70 ppm N-KNO<sub>3</sub>), como se presenta a continuación:

No. tratamiento	Tratamiento	No. tratamiento	Tratamiento
01	-N - Rh	13	cepa # 19
02	cepa # 14	14	cepa # 02
03	cepa # 07	15	cepa # 13
04	cepa # 23	16	cepa #6302
05	cepa # 01	17	cepa # 34
06	cepa # 05	18	cepa # 11
07	+N - Rh	19	cepa # 17
08	cepa # 15	20	cepa # 22
09	cepa # 03	21	cepa # 20
10	cepa # 21	22	cepa # 18
11	cepa #6032	23	cepa # 16
12	cepa # 10	24	cepa # 08

El modelo estadístico para las diferentes variables consideradas fue:

$$Y_{ij} = u + T_i + E_{ij}; \quad i = 1, 2, 3, 4, \dots, 23$$

$$J = 1, 2, 2, 4$$

Donde:

$Y_{ij}$  = variable considerada'

$u$  = media poblacional

$T_i$  = efecto del  $i$ 'ésimo tratamiento

$E_{ij}$  = error experimental

Para la evaluación en bolsas de suelo no alterado se utilizó un diseño irrestrictamente al azar con cuatro repeticiones, y dos plantas por bolsa de suelo, en un arreglo factorial 3 x 11 (suelo x inóculo), además se incluyó un testigo nitrogenado (50 Kg N/ha urea) en cada suelo. Se obtuvo un total de 36 tratamientos que se muestran a continuación.

No. Tratamientos	Suelo	Inóculo	Nitrógeno
01	Typic Humitropept	-	-
02	Typic Eutrandept	-	-
03	Ustic Tropohumult	-	-
04	Typic Humitropept	-	+
05	Typic Eutrandept	-	+
06	Ustic Tropohumult	-	+
07	Typic Humitropet	cepa # 05	-
08	Typic Eutrandept	cepa # 05	-
09	Ustic Tropohumult	cepa # 05	-
10	Typic Eutrandept	cepa # 08	-
11	Typic Humitropept	cepa # 08	-
12	Ustic Tropohumult	cepa # 08	-
13	Typic Humitropept	cepa # 11	-
14	Typic Eutrandept	cepa # 11	-
15	Ustic Tropohumult	cepa # 11	-
16	Typic Humitropept	cepa # 14	-
17	Typic Eutrandept	cepa # 14	-
18	Ustic Tropohumult	cepa # 14	-
19	Typic Humitropept	cepa # 15	-
20	Typic Eutrandept	cepa # 15	-
21	Ustic Tropohumult	cepa # 15	-
22	Typic Humitropept	cepa # 16	-
23	Typic Eutrandept	cepa # 16	-
24	Ustic Tropohumult	cepa # 16	-
25	Typic Humitropept	cepa # 17	-
26	Typic Eutrandept	cepa # 17	-
27	Ustic Tropohumult	cepa # 17	-
28	Typic Humitropept	cepa # 18	-
29	Typic Eutrandept	cepa # 18	-
30	Ustic Tropohumult	cepa # 18	-
31	Typic Humitropet	cepa # 21	-
32	Typic Eutrandept	cepa # 21	-
33	Ustic Tropohumult	cepa # 21	-
34	Typic Humitropept	cepa # 24	-
35	Typic Eutrandept	cepa # 24	-
36	Ustic Tropohumult	cepa # 24	-

El modelo estadístico para las diferentes variables consideradas fue:

$$Y_{imjk} = u + A_i + B_m + (AB)_{im} + j + E_{imk}$$

$$i = 1, 2, 3$$

$$m = 1, 2, \dots, 11$$

$$j = 1, 2$$

$$k = 1, 2, 3, 4$$

Donde:

$Y_{imjk}$  = variable considerada

$u$  = media poblacional

$A_i$  = efecto del  $i$ 'ésimo suelo

$B_m$  = efecto del  $m$ 'ésimo inóculo

$(AB)_{im}$  = efecto de la interacción suelo x inóculo

$j$  = error de bolsas en tratamientos

$E_{imk}$  = error experimental

Para el sistema de bolsas con suelo no disturbado se utilizaron bolsas negras de polietileno de dos kilos de capacidad. Se consideró como unidad experimental cada bolsa de suelo con dos plantas de E. pöeppigiana (ver sección 3.5.3.)

En el caso de los tratamientos inoculados, esta operación se realizó aparte de aquellos tratamientos que no llevaron inóculo para evitar contaminación; y entre los tratamientos inoculados, se tomó la precaución de inocular una cepa a la vez con el fin de evitar mezclas entre inóculos o contaminación.

### 3.2.2. Variables consideradas.

Las variables evaluadas en el proceso de selección fueron las siguientes:

- Peso seco de biomasa aérea en gramos por planta a las 12 y 16 semanas de edad, según la etapa de la investigación. Para ello se cortó cada planta a partir del punto de unión entre el tallo y la raíz, posteriormente la muestra se secó en estufa a 70°C por 72 horas hasta obtener peso constante.
- Peso seco de biomasa nodular en gramos. Se tomaron todos los nódulos adheridos a las raíces y se secaron hasta obtener peso constante como se mencionó anteriormente.
- Contenido de N-total de biomasa aérea por planta, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{mgN-total/planta} = \text{biomasa aérea (peso seco)} \times \frac{\% \text{ N}}{100} (*)$$

(\*) El porcentaje de nitrógeno se obtuvo por el método de micro-Kjelhdal (37).

Se consideraron otras variables cualitativas (no consideradas para efectos estadísticos) tales como: distribución de nódulos en las raíces, tamaño, color y cantidad de nódulos. Estas variables se tomaron como información adicional con el objeto de facilitar en alguna forma la interpretación de los resultados.

### 3.3. Muestreos.

#### 3.3.1. Muestreo de nódulos.

Para el muestreo de nódulos se identificó primeramente el árbol de E. poëppigiana a muestrear con base en sus características taxonómicas ( 58 ). Una vez que se identificó cada árbol, se seleccionaron aquellos con apariencia sana (libres de patógenos o insectos). Se excavó alrededor del tronco y se extrajeron raíces enteras para observar la nodulación. Los nódulos se encontraron principalmente cerca de la base del tronco (0-1 m) y a unos 0-10 cm de profundidad en las axilas de las raíces jóvenes.

Se procedió a examinar los nódulos (estado: entero, partido, podrido, hueco, seco, turgente; color: café, rojo blanco, verde). Se recolectaron de 5 a 10 nódulos por árbol y de 1 a 2 árboles por sitio según su abundancia. El muestreo de nódulos se realizó por conveniencia, en el mes de enero de 1934. Para el muestreo de nódulos se utilizó la metodología descrita por Date ( 33 ). Posteriormente los nódulos se trasladaron en frascos al laboratorio para proceder con el aislamiento de las colonias.

#### 3.3.2. Muestreo del suelo.

Para el muestreo del suelo se utilizó un cilindro de metal de 10 cm de diámetro y 25 cm de longitud, el cual se introdujo en el suelo hasta unos 20 cm de profundidad, y se extrajo el bloque completo removiendo alrededor con una pala ( 91 ).

Una vez que se extrajo el suelo, se colocó en una bolsa negra de polietileno de 2 kilos de capacidad; y con ayuda de una espátula y dando ligeros golpes al cilindro se depositó el bloque completo de suelo en la bolsa, para su posterior traslado al invernadero. El método que se utilizó en este trabajo de investigación es una modificación del método utilizado por Sylvester et al ( 91 ).

### 3.4. Aislamiento y caracterización de las cepas de *Rhizobium* spp.

#### 3.4.1. Aislamiento de *Rhizobium* a partir de nódulos.

El primer paso para el aislamiento de cepas de *Rhizobium* a partir de los nódulos obtenidos, consistió en la esterilización de la superficie de los mismos con agua destilada estéril. Debido a problemas de contaminación que se presentaron durante el proceso de aislamiento se procedió a evaluar tres métodos descritos en la literatura para el aislamiento de nódulos. El método que se escogió para este trabajo fue el descrito por Vincent ( 99 ); los otros dos métodos se describen en el apéndice 1A. Se utilizó el método de Vincent por ser el que presentaba un alto grado de recuperación de colonias a partir de los nódulos recolectados, y se describe a continuación: una vez esterilizada la superficie externa del nódulo, se colocó en alcohol 95°C durante 5-10 seg., luego en cloruro de mercurio 0,1 por ciento durante 4-5 seg. Posteriormente se transfirió con pinza estéril a tubos de ensayo con agua destilada estéril y se lavó de 5-7 veces, dejándolos unos minutos en el agua del último lavado. Luego se maceró cada nódulo con un policia estéril. Una vez macerado todo el tejido nodular, se tomó 2-3 azadas de suspensión lechosa con una aza bacteriológica, y se colocó en platos de Petri con extracto de agar-levadura-manitol (ALM, ver preparación del medio en el apéndice 2A) para aislar por estría cruzada. Se estriaron cuatro placas por nódulo.

Las placas estriadas se dejaron incubando a temperatura ambiente en cámara de transferencia previamente desinfectada hasta obtener crecimiento visible de las colonias de *Rhizobium*. Este se observó de 7 a 11 días según la cepa (ver cuadro 2. pag. 22 ). Las colonias visibles y libres de contaminación se pasaron a nuevas placas para obtener cultivos puros de las probables cepas de *Rhizobium*.

#### 3.4.2. Caracterización de las cepas de *Rhizobium* aisladas.

Cada colonia aislada se observó al estereoscopio (10X) para determinar su tamaño, forma del borde, superficie, forma de la colonia, color y consistencia ( 99 ).

Posteriormente se realizó la prueba de tinción de Gram de cada una de las colonias aisladas, y cuyo procedimiento se describe en el apéndice 3A ( 86 ).

Se realizó la prueba de caracterización del crecimiento de Rhizobium en agar-glucosa-peptona + púrpura de bromocresol, para la cual se inoculó cada cepa de Rhizobium aislada, en tubo inclinado de A-glu-pept + p. bromocresol y se dejaron en incubación a 30°C por 24 horas. En el apéndice No. 4A se describió la preparación del medio y el procedimiento ( 86 ).

Los resultados de cada una de estas pruebas se muestran en el cuadro No. 2.

Una vez se caracterizaron las probables cepas de Rhizobium se preservaron los cultivos puros en medios de agar en tubos con tapón de rosca a 4°C, y posteriormente se liofilizaron ( 99, 86 ).

### 3.5. Selección de cepas de *Rhizobium* en jarras de Leonard

La segunda etapa de esta investigación correspondió a la selección de cepas de Rhizobium aisladas de nódulos de poró, en jarras de Leonard ( 99 ) bajo condiciones de invernadero. Se utilizó la metodología descrita por Vincent ( 99 ) y Stowers y Elkan ( 90 ).

#### 3.5.1. Preparación de las jarras de Leonard.

En la fig. 1 se muestra un esquema de la jarra de Leonard que se utilizó. Se emplearon botellas de vidrio cortadas. Se colocó arena de río alta en sílice en la parte superior de la jarra, luego se colocó una mecha doble de hilo de algodón para hacer llegar la solución nutritiva por capilaridad. Posteriormente se colocó la jarra completa en una bolsa de papel y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 1 a 2 horas.

Se preparó la solución nutritiva libre de N (ver cuadro 1A) a partir de las soluciones madres estériles, y se agregó aproximadamente 500 ml de solución nutritiva estéril por jarra, además, se agregó 1 ml de solución de  $N-KNO_3$  (15 ppm N) ( 86 ) a cada una de las jarras

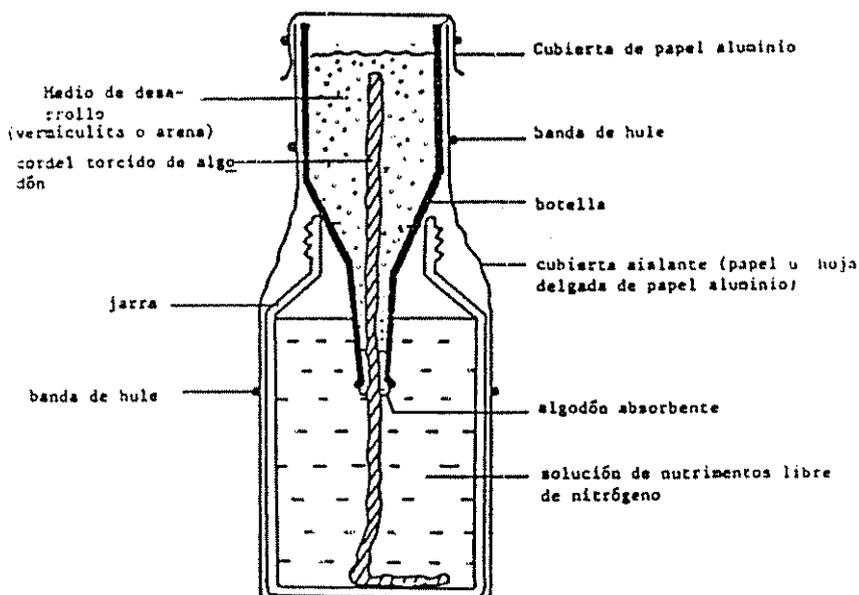


Fig. 1 Esquema de las jarras de Leonard que se utilizaron.

### 3.5.2. Esterilización de la semilla y siembra en jarras.

La semilla de E. poeppigiana se recolectó del suelo en un cafetal en San Rafael de Escazú, San José (1042 msnm, con 1712 mm precipitación promedio anual, 21, 1°C temperatura promedio anual, y a 09°55'55"N y 84°08'05"W) ( 23, 59 ), en Calle Pavas, el 30 de marzo 1984. En este cafetal se observó la presencia de árboles de Tabebuia, Ficus e Inga en su mayoría, y unos cuantos de E. poeppigiana dejados como árboles de sombra en forma dispersa. Por las dimensiones de estos árboles (15-20m de altura y hasta 1,0m de diámetro) se presume que podrían tener por lo menos diez años de edad, y que no han sufrido los efectos de la poda, práctica bastante común en Costa Rica, o bien lo que parece más probable, que se han dejado de podar desde hace varios años.

El porcentaje de germinación de la semilla que se recolectó fue de 95 por ciento en platos de Petri con medio de agar-agua.

Esterilización de la semilla: Para la siembra se utilizó semilla pre-germinada. Debido a la cantidad de patógenos (hongos y bacterias no identificadas) presentes en el interior y exterior de las semillas, se procedió a la evaluación en el laboratorio de tres métodos para su esterilización. A continuación se presenta el método

que se utilizó en este trabajo de investigación (los otros dos se describen en el apéndice No. 5A), debido a que presentó el menor grado de contaminación: se trabajó con cristalería estéril. Se lavó la semilla en grupos de 50 con agua destilada estéril de 4-5 veces. Luego se agregó etanol 95% agitando por un minuto. Después de lavó con cloruro de mercurio 0,5% agitando de 5 a 7 min., luego se hicieron lavados con agua destilada estéril de 6 a 7 veces, espaciados cada uno de 10 a 30 minutos. Se dejaron las semillas en el agua del último lavado por espacio de 24 horas para embeberlas. A las 24 horas se volvió a lavar con etanol 95% y posteriormente se lavó con agua destilada estéril dos a cuatro veces ( 99, 100 ).

Las semillas así esterilizadas se colocaron en platos de Petri con medio de agar-agua al 0,75% (ver apéndice No. 6A) para su germinación a temperatura ambiente en cámara de transferencia.

Siembra: Se sembró el 29 de abril, 1984. Una vez que la radícula alcanzó 1cm de longitud en los platos de Petri (lo cual ocurrió después de cuatro o cinco días), se seleccionaron aquellas que fueron más similares en tamaño y estado, que estuvieran libres de patógenos y con buen color, y se sembraron tres plántulas por jarra con ayuda de pinza y plicia estéril.

La siembra se realizó en cámara de transferencia, y allí se dejaron las jarras durante cinco días antes de pasarlas al invernadero para facilitar la adaptación de las plántulas al nuevo medio.

Una vez pasadas al invernadero se raleó dejando las dos plantas más homogéneas por jarra.

### 3.5.3. Inoculación.

Los cultivos de cada una de las cepas de Rhizobium spp a inocular se establecieron en botellas con agar inclinado (apéndice 7A). Una vez obtenido el crecimiento de la bacteria en el agar se tomó una azada y se realizó la prueba de tinción de Gram para determinar la pureza del inóculo.

A cada botella, con la fuente de inóculo, se le agregó diez perlititas de vidrio estériles más 10ml de solución salina estéril, para romper el crecimiento por agitación de la botella.

Se tomó una alicuota de 1 ml de suspensión lechosa del inóculo, y se inoculó a la base del tallo de cada una de las dos plántulas dejadas por jarra. Se inoculó a los 15 días de la siembra. Para evitar en parte la contaminación, se agregó una capa de piedra y vermiculita esterilizada en autoclave a 121°C por una hora, sobre las jarras. Luego se agregó un poco de agua destilada estéril sobre esta capa de material.

De acuerdo con la comparación visual del Nefelómetro de MacFarland (ver apéndice 8A) se agregó un inoculante que contenía aproximadamente  $3 \times 10^9$  bacterias/ml en cada cultivo.

#### 3.5.4. Prácticas de manejo.

Durante el período de establecimiento hasta la cosecha se llevó una constante supervisión del ensayo. Se agregó solución nutritiva y agua destilada conforme lo demandara el crecimiento de las plantas de poró. La solución nutritiva se agregó cuatro veces - durante la duración del ensayo.

El tratamiento nitrogenado (70 ppm N-KNO<sub>3</sub>) recibió la siguiente fertilización fraccionada: 15ppm N al inicio del ensayo (1ml de solución de N-KNO<sub>3</sub> 0,125 g KNO<sub>3</sub>/ml), 27 ppm N a los 40 días (1,8 ml solución N-KNO<sub>3</sub>), y 28 ppm N a los 58 días.

Al inicio del ensayo se presentó un ataque de "mal de talluelo" provocado por Pythium sp, que se controló con aplicaciones de Benlate (0,6 g Benlate/litro), además, se atomizó con Lannate - (0,6 g Lannate/litro) ante el ataque de Cicadélidos.

#### 3.5.5. Cosecha.

Se cosechó el 31 de agosto, 1984, a las 12 semanas de edad de las plantas. Se procedió a sacar la planta entera de la jarra y se observó la nodulación. Luego se cortó la parte aérea de la raíz

en la base del cuello, y se lavó el sistema radical. Posteriormente se separaron los nódulos.

Se embolsó el material de la biomasa aérea y nódulos obtenidos, y se congeló para su posterior análisis. Se procedió a secar el follaje en estufa a 70°C durante 72 horas, y posteriormente se pesó en balanza analítica. Los nódulos se colocaron en cámaras desecantes hasta obtener peso constante.

La biomasa aérea se molió para determinar el porcentaje de nitrógeno por el método de micro-Kjelhdal ( 37, 38 ).

La selección de cepas se hizo en base a los diez mejores promedios obtenidos por las diferentes variables en estudio, y comparando contra el testigo absoluto.

### 3.6. Selección en bolsas de suelo no alterado

#### 3.6.1. Siembra.

Se sembró el 8 de diciembre, 1984, a partir de plántulas pre-germinadas con radículas de aproximadamente 1 cm de longitud. La semilla se pregerminó en cajas de germinación, desinfectadas con etanol 95% sobre papel de germinación, y se cubrieron con bolsas negras de polietileno manteniendo suficiente humedad. Se atomizó con Benlate (0,6 g/litro) para evitar la proliferación de hongos. Se obtuvo un 62% de germinación de la semilla.

Se sembraron de tres a cuatro plántulas por bolsa y se raleó posteriormente a dos. Se aplicó fertilizante en agua de riego en dosis de 150 Kg  $P_2 O_5$  ha y 1 Kg  $Mo_4 O_7 Na$ /ha (22 g  $P_2 O_5$  + 0,14 g  $Mo_4 O_7 Na$ /4 litros de agua) a todos los tratamientos.

El tratamiento nitrogenado recibió una dosis de 50 KgN/ha fraccionado en tres partes a partir de una solución madre de 0,6 g urea/litro.

#### 3.6.2. Inoculación.

La inoculación de las plántulas en bolsas de suelo se realizó aproximadamente a los 20 días de la siembra según metodología descrita an-

teriormente en el capítulo 3.5.3.

Los tratamientos nitrogenados y testigos absolutos se colocaron aparte de los tratamientos inoculados durante el proceso de inoculación para evitar posible contaminación. Se les agregó una capa de piedra y vermiculita como aislante.

### 3.6.3. Prácticas de manejo.

Las labores de manejo de las plantas en esta etapa de la investigación consistieron en observaciones periódicas del ensayo. Se aplicó riego por aspersión con chorro fino de agua de tubo todos los días. Se deshirió manualmente las malezas que se presentaron.

Se hicieron atomizaciones ocasionales con Benlate y Lannate (0,6 g/litro) para contrarrestar el ataque de insectos (cicadélicos principalmente) y daños sufridos por el ataque de hongos (no se identificaron).

A las ocho semanas de edad de las plantas se atomizaron con abono foliar (Fetrilon combi) en dosis de 23 g/litro, ya que estas presentaban cierta clorosis y síntomas de deficiencias aparente de elementos menores (\*).

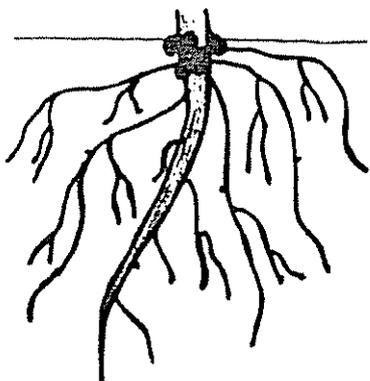
### 3.6.4. Cosecha.

La cosecha se realizó el 28 de abril, 1985, aproximadamente a las 16 semanas de edad de las plantas.

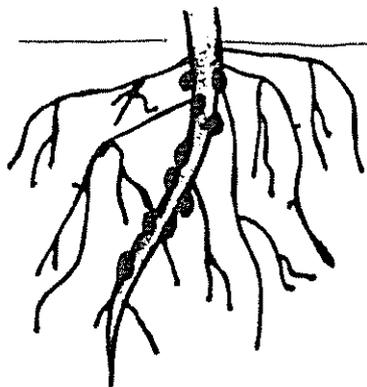
Se extrajo cada planta de la bolsa de suelo. Se limpiaron las raíces y se hicieron las observaciones de la nodulación (figura 2). Posteriormente se cortó la base del tallo y se embolsó el follaje, este se secó en estufa a 70°C durante 72 horas. Se separaron los nódulos de las raíces y se secaron en estufa hasta la obtención de peso constante.

---

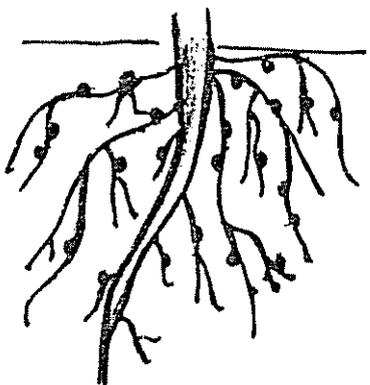
(\*) Kass, D., y Galindo. J. (Especialista en Manejo de Suelos, y Ftopatólogo). Observaciones personales en visita al sitio del ensayo, CATIE, 19 de febrero, 1985.



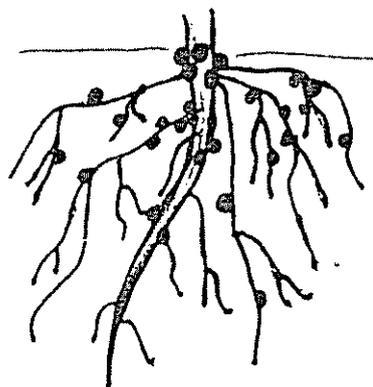
(1) Nodulación en la corona  
o cuello de la raíz



(2) En la raíz principal



(3) En raíces secundarias y  
terciarias



(4) En toda la raíz

Fig. 2 Distribución de nódulos en plántulas de E. poeppigiana

El follaje y los nódulos se pesaron en balanza analítica. La biomasa aérea se molió para posteriormente determinar el porcentaje de nitrógeno por el método micro-Kjelhdal ( 38, 38 ).

### 3.7. Análisis

#### 3.7.1. Análisis de suelo y foliares.

Los análisis de suelo se realizaron en el Laboratorio de Suelos del CATIE, según metodología descrita por Díaz Romeu y Hunter ( 38 ). El porcentaje de nitrógeno de la biomasa aérea se determinó en el mismo laboratorio según el método micro-Kjelhdal ( 37 );

#### 3.7.2. Análisis de datos.

El análisis de los datos obtenidos se realizó en el Centro de Cómputo del CATIE, consistiendo en análisis de varianza de las diferentes - variables en estudio, y pruebas de ámbito múltiple de Duncan (103).

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSION

##### 4.1. Recolección de nódulos de *Erythrina peoppigiana*, aislamiento y caracterización de cepas de *Rhizobium* spp.

###### 4.1.1. Recolección de nódulos y aislamiento de *Rhizobium* spp.

En el caso del presente estudio, la recolección de nódulos se realizó en la época de inicio de la floración del poró, al final de la época de lluvia. Al respecto, Date (33) sugiere que la recolección se realice en la época de mayor crecimiento vegetativo de la planta, durante la época de lluvia, para obtener mayor número de nódulos funcionales.

Una de las razones para proceder al aislamiento en esta época fue el hecho de obtener suficiente número de nódulos activos para el aislamiento de las bacterias, a pesar de estar la actividad nodular probablemente bajo el mayor "estrés" hídrico del año, y el mayor "estrés" nutricional de los nódulos, porque no hay fotosintatos disponibles, y por otro lado, las reservas de la planta son translocadas a la floración, y posteriormente al llenado de las vainas. En futuros trabajos se sugiere realizar el muestreo de nódulos en diferentes épocas del año, con el objeto de evaluar las posibles variaciones estacionales en esta leguminosa arbórea.

Los nódulos se encontraron a poca profundidad del suelo, entre los 0-15 cm, en las raíces jóvenes del poró localizadas próximas al tronco del árbol y hasta 1 m de distancia. Los nódulos eran de color café en su exterior y rojos en su interior, de forma esferoidal con bordes irregulares. Su tamaño varió según el sitio de muestreo (observación personal), así los nódulos recolectados en Heredia y Turrialba presentaron aparentemente los mayores diámetros, desde 0,2 cm hasta 1,5 cm, mientras que los nódulos recolectados en los varios sitios en San José y Tres Ríos presentaron diámetros inferiores a 1 cm.

Resultó difícil aislar bacterias de *Rhizobium* de los nódulos recolectados debido al sobrecrecimiento de otros microorganismos asociados a los mismos. Similarmente Vincent (99, 101) mencionó el problema al

aislar Rhizobium de nódulos de plantas adultas por la razón anteriormente expuesta. Por tal motivo, se procedió a la evaluación de tres métodos sugeridos para el aislamiento de nódulos, ver acápite 3.4, y en el apéndice No. 1A. Como resultado de esta evaluación se obtuvo que el método descrito por Vincent (99) y Date (33) fue el más adecuado en este estudio, según lo observado en el laboratorio, ya que se presentó un alto grado de recuperación de colonias de Rhizobium libres de contaminantes. El resultado se atribuyó a la mayor frecuencia de lavado de los nódulos, así como a una exposición más prolongada de los mismos a los desinfectantes utilizados en este procedimiento.

#### 4.1.2. Caracterización de cepas de Rhizobium spp aisladas a partir de nódulos de E. poeppigiana.

Los resultados obtenidos para las pruebas de laboratorio en el aislamiento de cepas de Rhizobium spp se muestran en el cuadro 2. Esta caracterización se basó en la determinación de varias características morfológicas que llevaron a la denominación de "probable" Rhizobium a aquellas bacterias que cumplieron con los requisitos de dichas pruebas.

Se observó que el ámbito de aparición de las primeras colonias visibles varió de 7 a 11 días (cuadro 2), lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Allen y Allen (4) y Halliday y Somasegaran (54), quienes clasificaron la bacteria que nodula al poró como de crecimiento lento.

El tamaño obtenido por las colonias en ese período osciló entre 0,2 mm de diámetro en el caso de uno de los aislamientos procedentes de San Rafael de Escazú, San José (No. 04), hasta 2,5 mm de diámetro para la cepa No. 20 procedente de un aislamiento de Turrialba (cuadro 2). El tamaño promedio que se obtuvo para todas las cepas fue de 1,07 mm de diámetro. Estos resultados están dentro de los ámbitos normales de tamaño de estas bacterias, si bien Date (33), Vincent (99) encontraron que las colonias formadas por Rhizobium de crecimiento lento alcanzan un diámetro inferior a 1 mm después de cinco días.

Cuadro 2. Caracterización de los cepos de *Rhizobium* spp aisladas a partir de nódulos de *Erythrina poeppigiana*.

Cepo No.	Procedencia	Aparición colonia	Tamaño mm	Forma borde	Superficie	Forma colonia	Color	Consistencia	Gram	A-g-p + p. brom.
01	Turrialba	8 días	0,3	liso	lisa	circular convexa	blanco	gomosa	-	-
2	Escazú	7 días	0,5	liso	lisa	"	rosado blancuzco	"	-	-
4	Escazú	7 días	0,2	"	"	"	"	"	-	-
5	Turrialba	8 días	0,9	"	"	"	blanco	"	-	-
6	Turrialba	8 días	1,5	"	"	"	blancuzco	"	-	-
7	Heredia	9 días	1,2	"	"	"	blanco brillante	"	-	-
8	Heredia	8 días	1,0	"	"	"	blanco	"	-	-
9	Turrialba	9 días	1,0	"	"	"	blanco	"	-	-
10	Turrialba	9 días	2,0	"	"	"	blanco	"	-	-
11	Turrialba	9 días	1,0	"	"	"	"	"	-	-
13	Turrialba	8 días	1,0	"	"	"	"	"	-	-
14	Turrialba	10 días	1,1	"	"	"	"	"	-	-
15	Heredia	8 días	1,9	"	"	"	"	"	-	-
16	Turrialba	7 días	1,5	"	"	"	"	"	-	-
19	Turrialba	7 días	1,2	"	"	"	blanco brillante	"	-	-
21	Heredia	9 días	1,0	"	"	"	blanco	"	-	-
22	Curridabat	7 días	0,8	"	"	"	"	"	-	-
23	Curridabat	7 días	0,6	"	"	"	blanco brillante	"	-	-
24	Tres Ríos	11 días	0,5	"	"	"	brillante	"	-	-
25	Tres Ríos	11 días	0,3	"	"	"	"	"	-	-

En cuanto a características tales como la forma del borde de la colonia formada, superficie, forma y consistencia de la colonia, los resultados presentaron una condición de homogeneidad. Todos los aislamientos presentaron las siguientes características: un borde liso, libre de irregularidades sobre el medio de cultivo - ELM + agar + rojo congo; una superficie lisa, con forma de lente óptico ( 51 ) que es característico de la bacteria creciendo en este medio; forma circular-convexa en todos los casos, así como la consistencia gomosa típica de las bacterias de crecimiento lento ( 99 ).

En relación a la coloración de las colonias de Rhizobium se puede decir, que estas presentan colores de blanco opaco o lechoso brillante cuando proceden de aislamientos de nódulos de la mayoría de las leguminosas ( 86 ). Al respecto, Vincent ( 99 ) menciona que la coloración de las colonias varían del blanco al crema en el caso de Rhizobium que nodula a un gran número de leguminosas, con la excepción de colonias aisladas de nódulos de Lotonis cuyo Rhizobium forma colonias rosadas; o en el caso de colonias aisladas de nódulos de Stylosanthes cuyo color es amarillo ( 33 ). En ocasiones si el medio de cultivo contiene rojo congo, como es el caso del medio que se utilizó en este estudio, las colonias podrían absorber un poco del colorante según su concentración, pero no es la común (86), lo que sí ocurre cuando hay presencia de contaminantes. Al utilizar un medio de cultivo con rojo congo, se pueden descartar por observación visual las colonias formadas por Rhizobium de las colonias formadas por organismos contaminantes, tal como ocurrió en el presente estudio.

La tinción de Gram ( 86 ) es un procedimiento que separa las bacterias en dos grupos: (1) los organismos gram-positivos (contaminantes) que son aquellos que retienen el cristal violeta después de lavarse con alcohol, y presentan coloración violeta al microscopio, y (2) los organismos gram-negativos, que se decoloran con alcohol, y toman la coloración roja de la safranina ( 86 ). Al realizar la tinción de gram se separaron estos dos grupos de organismos, así se obtuvieron las colonias de "probable" Rhizobium y se descartaron las bacterias gram + contaminantes.

Por último, se utilizó el medio diferencial agar-glucosa peptona + púrpura de bromocresol (pH 6,8) como prueba indicadora de que las cepas en estudio fueran "probable" Rhizobium. Según varios autores (31, 68, 99), Rhizobium no se desarrolla bien sobre agar - glucosa - peptona, especialmente cuando se incubaba a 30°C. Por otro lado, las bacterias de crecimiento lento producen álcali en este medio y el viraje del indicador es al azul, mientras que las bacterias de crecimiento rápido producen ácido, tornando el medio de un color amarillo ( 33 ). Con esta prueba fue posible descartar - algunas cepas Gram del grupo originalmente clasificado como "posible" Rhizobium.

Con base en los resultados obtenidos en el laboratorio con las diferentes pruebas realizadas y que se muestran en el cuadro 2 , se obtuvieron 20 "probables" cepas de Rhizobium spp, de las cuales diez procedían de Turrialba, cuatro de Heredia, dos de Tres Ríos, dos de Curridabat, y dos de San Rafael de Escazú. Posteriormente estas cepas fueron evaluadas utilizando el poró como planta indicadora, y cuyos resultados se presentaran posteriormente.

#### 4.2. Observaciones cualitativas de la nodulación en *E. poeppigiana* inoculada con diferentes aislamientos de *Rhizobium* spp.

Para la selección de cepas "superiores" de Rhizobium spp el mejor criterio de efectividad, según varios autores (12, 85) es la variable nitrógeno total. Sin embargo, es importante realizar otras determinaciones tales como la observación del color de la planta (a través de escalas visuales), peso seco de la planta, y características de la nodulación (cantidad, tamaño, color y distribución de nódulos) con el propósito de obtener la información lo más completa posible. En los cuadros 3, 4, 5, 6 y 2A presentan los datos de nodulación, y peso seco de planta respectivamente, para este estudio.

Para este estudio se procedió a determinar las siguientes variables de nodulación: distribución de nódulos en la raíz, número, color, y tamaño de los mismos. Estos resultados se muestran en los cuadros 3 y 4, y en la figura 2 se muestra la distribución en la raíz de los nódulos.

#### 4.2.1. Nodulación de E. poeppigiana sembrada en jarras de Leonard

En el cuadro 3 se muestran los resultados de nodulación por el poró cuando se inoculó con Rhizobium en jarras de Leonard. En los testigos con inoculación, con y sin nitrógeno, los nódulos se localizaron en diferentes partes de la raíz menos en la corona y cuello, resultado que se atribuyó a contaminación con polvo procedente de los alrededores del invernadero, y lo cual fue facilitado por una incubación larga (12 semanas). Según Stowers y Elkan ( 90 ) cuando hay nodulación temprana los nódulos se forman próximos al cuello de la raíz, por el contrario, si la nodulación es tardía los nódulos se forman en puntos alejados de la corona. En efecto cuando se inoculó con las cepas No. 01, 05, 08, 14, 15, 16, y 21, los nódulos se formaron en la corona de la raíz y en otras secciones, lo cual es indicativo de nodulación temprana ( 74 ) producto de una efectiva inoculación. El resto de las cepas inoculadas presentaron nódulos especialmente en la raíz principal y secundarias.

Con base en estos resultados se puede hacer la generalización de que las cepas No. 01, 05, 08, 14, 15, 16, 21 y 24 lograron una nodulación temprana y eficaz por la distribución de los nódulos en la raíz (cuadro 3); y que en el caso de los testigos absoluto y nitrogenado la nodulación pudo ser producto de la contaminación, ya que la distribución de los nódulos no corresponden a una nodulación producto de inoculación. Dentro de las posibles causas de esta contaminación se pueden citar: una alta carga de bacterias presentes en el invernadero y producto de otros experimentos previos, contaminación de algunos de los recipientes utilizados para adicionar solución nutritiva o agua destilada como parte de las prácticas de manejo del experimento, presencia de insectos que pudieran facilitar el transporte de Rhizobium en los tratamientos sin inocular. Además, se debe considerar el período de incubación largo a que estuvo sujeto el experimento. la nodulación en estos testigos se consideró como tardía puesto que los nódulos se localizaron en secciones alejadas del cuello de la raíz.

Cuadro 3. Observaciones de distribución, pigmentación, tamaño y cantidad de nódulos en plántulas de *E. poeppigiana* (12 semanas de edad) sembrada en jarras de Leonard. Los datos son ámbitos de cuatro repeticiones.

Tratamiento	Distribución*	Observaciones de nodulación		
		Pigmentación	Tamaño cm	Cantidad
-N-Rh	2,3	rosado/ blanco	0,3-0,8	0-8
cepa 14	1,2	rojo	0,3-0,8	8-15
cepa 07	3	rosado	<0,8	0-15
cepa 23	2,3	rojo	0,3-0,8	8-15
cepa 01	4	café/ rojo	0,3-0,8	8-15
cepa 05	1,2	rojo	0,3-0,8	0-15
+N-Rh	2,3	rosado/ blanco	>0,8	0-15
cepa 15	1,2	rojo	0,3-0,8	>15
cepa 03	2,3	rojo	0,3-0,8	8-15
cepa 21	1,2	rojo	>0,8	0-8
c. 6032	2	rojo	<0,3	0-8
cepa 10	2,3	rojo	0,3-0,8	0-8
cepa 19	2,3	rojo	0,3-0,8	0-15
cepa 02	2,3	rojo	0,3-0,8	0-15
cepa 13	2,3	rojo	>0,8	0-8
c. 6302	2,3	rojo	0,3-0,8	0-8
cepa 20	2,3	rojo	0,3-0,8	0-15
cepa 24	2,3	rojo	0,3-0,8	0-8
cepa 11	2,3	rojo	0,3-0,8	0-8
cepa 17	2,3	rojo	0,3-0,8	0-15
cepa 22	2,3	rojo	0,3-0,8	0-15
cepa 18	2,3	rojo/ verde	0,3-0,8	0-15
cepa 16	4	verde/ rojo	0,3-0,8	8-15
cepa 08	4	rojo	0,3-0,8	>15

(\*)

Distribución de nódulos (ver fig. 2.). (1) nodulación en la corona, (2) en la raíz principal, (3) raíces secundarias y terciarias, (4) en toda la raíz.

Con respecto a la pigmentación de los nódulos (cuadro 3), predominaron los de coloración rojiza indicando la presencia de leghemo - globina cuya producción comienza cuando el bacteroide inicia el proceso de fijación de nitrógeno ( 7 ). Tanto el testigo absoluto como el testigo nitrogenado presentaron algunos nódulos blancos inefectivos del total de los nódulos que formaron las planta, si bien la biomasa nodular en su mayoría presentó pigmentación roja. En el caso de las cepas No. 01 y No. 11, se observaron unos pocos nódulos de color café en su interior, lo cual podría ser indicativo de senescencia de estos pocos nódulos debido al cese de la actividad de la nitrogenasa ( 7 ). Las cepas No. 16 y No. 18 presentaron - algunos nódulos de color verde en su interior cuando se examinó el total de nódulos en las plantas, según Appleby ( 7 ) cuando se interrumpe la fijación se produce legcoleglobina de color verde, o posiblemente esos nódulos eran de reciente formación y no habían - comenzado el proceso de fijación, o nunca fijaron.

El tamaño promedio de nódulos fue de 0,7 cm variando desde un mínimo de 0,1 cm hasta 1,3 cm de diámetro. Según el tamaño de nódulos se agruparon en tres grupos: menores de 0,3 cm, entre 0,3 cm y 0,8 cm, y mayores de 0,8 cm. La mayoría de las plantas presentaron nódulos entre 0,3 y 0,8 cm de diámetro (cuadro 3). Según Dobereiner, Arrau - da y Penteado ( 43 ) no existe correlación entre el número de nódulos y la fijación de nitrógeno, más si hay existencia de nódulos grandes situados en las raíces primarias este es índice de una simbiosis e - ficiente, como se observó con la inoculación de las cepas 3, 10 y 15 (cuadro 3).

Meisner y Gross ( 69 ) se refieren al hecho de que la distribución y el tamaño de los nódulos pueden ser indicadores de la presencia, número y efectividad de las cepas nativas. Según estos autores, la presencia de nódulos grandes en la raíz principal y próximos a la corona muestran abundancia de cepas competitivas. Por el contrario, nódulos pequeños y distribuidos irregularmente sobre las raíces se - cundarias son índice de nodulación tardía. Aunque aclaran que estas normas no se deben interpretar con mucha rigidez ya que siempre hay excepciones a la regla. Esto corrobora los resultados obtenidos, en este estudio, así los tratamientos testigos con y sin nitrógeno pre-

sentaron nódulos más bien pequeños y distribuidos irregularmente, contrario a la inoculación con las cepas 2, 6, 8, 10 que presentaron nódulos grandes en la corona (cuadro 3).

Para evaluar la cantidad de nódulos del poró sembrado en jarras de Leonard se agruparon en plantas con más de 15 nódulos. Se observó una abundante cantidad de nódulos formados como producto de la inoculación con las cepas 15, 2, 17, 18, 8; por el contrario, se observó una escasa nodulación en los testigos absoluto y nitrogenado así como en el caso de las inoculaciones con las cepas No. 11, 12, 13, 21, 24 y 6032 siendo esta última una cepa procedente de colección del grupo caupí.

Con base en los resultados obtenidos por las diferentes variables de nodulación: color, tamaño, cantidad y distribución de nódulos, se consideró que las cepas NO. 01, 05, 08, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21 y 24 lograron una nodulación temprana y eficaz bajo las condiciones en que se realizó este estudio.

#### 4.2.2. Nodulación de E. poeppigiana sembrada en bolsas de suelo.

Las observaciones cualitativas de la nodulación de poró sembrado en bolsas de suelo sin disturbar se muestran en el cuadro 4. Se puede observar que hubo nodulación en todos los tratamientos evaluados, de esta forma se evidenció la presencia de cepas nativas en cada uno de los suelos. Se observó que los nódulos formados presentan pigmentación roja, indicando la funcionalidad aparente de los mismos ( 7 ).

Cuadro 4. Observaciones cualitativas de la nodulación en plantas de Erythrina poeppigiana (16 semanas edad) sembradas en bolsas de suelos. Los datos son ámbitos de ocho plantas.

Tratamiento suelo inóculo	Distribución de los nódulos (*)	Tamaño nódulos (cm)	Cantidad nódulos	Color nódulos
Turrialba-N-Rh.	2	< 0,3 - 0,8	0 - 20	rojo
San José -N-Rh.	4	> 0,8	> 21	rojo
Puriscal-N-Rh	2	0,3 ≥ 0,8	0 - 8	rojo
Turrialba + N-Rh	2	0,3 ≥ 0,8	0 - 21	rojo
San José + N-RH	2,3	< 0,3 ≥ 0,8	8 - 21	rojo
Puriscal + N-RH	2	0,3 ≥ 0,8	0 - 21	rojo
Turrialba cepa 5	4	< 0,3 ≥ 0,8	> 21	rojo
San José cepa 5	2,3	< 0,3 ≥ 0,8	> 21	rojo
Puriscal cepa 5	4	0,3 ≥ 0,8	0 - 21	rojo
Turrialba cepa 8	4	0,3 ≥ 0,8	8 - 21	rojo
San José cepa 8	2,4	< 0,3 ≥ 0,8	0 - 21	rojo
Puriscal cepa 8	2,4	< 0,3 ≥ 0,8	0 - 21	rojo
Turrialba cepa 11	2	< 0,3 ≥ 0,8	0 - 8	rojo
San José cepa 11	1,2	< 0,3 ≥ 0,8	0 - 21	rojo
Puriscal cepa 11	2	> 0,8	0 - 8	rojo
Turrialba cepa 14	2	> 0,8	0 - 8	rojo
San José cepa 14	2	> 0,8	8 - 20	rojo
Puriscal cepa 14	1,2	0,3 ≥ 0,8	0 - 21	rojo
Turrialba cepa 15	1,2	< 0,3 ≥ 0,8	0 - 21	rojo
San José cepa 15	1,2	< 0,3 ≥ 0,8	0 - 21	rojo
Puriscal cepa 15	2	< 0,3 ≥ 0,8	0 - 20	rojo
Turrialba cepa 16	1,2	< 0,3 ≥ 0,8	8 - 21	rojo
San José cepa 16	2	0,3 ≥ 0,8	0 - 21	rojo
Puriscal cepa 16	2	< 0,3 ≥ 0,8	0 - 21	rojo
Turrialba cepa 17	2,3	< 0,3 ≥ 0,8	0 - 21	rojo
San José cepa 17	4	0,3 ≥ 0,8	8 - 21	rojo
Puriscal cepa 17	2,3	< 0,3 ≥ 0,8	0 - 20	rojo
Turrialba cepa 18	1,2	< 0,3 ≥ 0,8	0 - 21	rojo
San José cepa 18	4	< 0,3 ≥ 0,8	0 - 20	rojo
Puriscal cepa 18	2,3	< 0,3 ≥ 0,8	0 - 20	rojo
Turrialba cepa 21	4	< 0,3 ≥ 0,8	8 - 21	rojo
San José cepa 21	4	< 0,3 ≥ 0,8	8 - 21	rojo
Puriscal cepa 21	4	< 0,3 ≥ 0,8	8 - 21	rojo
Turrialba cepa 24	4	0,3 ≥ 0,8	8 - 21	rojo
San José cepa 24	4	< 0,3 ≥ 0,8	8 - 21	rojo
Puriscal cepa 24	4	< 0,3 ≥ 0,8	0 - 8	rojo

(\*) Distribución de los nódulos (ver fig. 2): (1) nodulación en la corona de la raíz, (2) en la raíz principal, (3) en raíces secundarias y terciarias, (4) en toda la raíz.

Por su distribución en la raíz, los nódulos se localizaron preferentemente en la raíz principal, como en el caso de los testigos absoluto y nitrogenado en los tres suelos en estudio (cuadro 4). Con respecto a la inoculación con los diferentes aislamientos no se encontró una tendencia específica por cepa y suelo, sin embargo, la excepción la presentó la cepa 24 que mostró la misma distribución de los nódulos en los tres suelos estudiados. El resto de los - aislamientos presentó una situación similar a los testigos, ya que los nódulos se localizaron básicamente alrededor de la raíz principal (ver figura 2 ). Algunas cepas, a saber 05, 08, 11, 14, 14, 16 18, y 21, lograron formar nódulos en la zona del cuello o corona de la raíz según el tipo de suelo en que estaban sembradas. Probablemente la inoculación en el suelo de Turrialba produjo nódulos más temprano que en el caso de los otros dos suelos, ya que para el primero el número de plantas con nódulos en el cuello de la raíz fue mayor que en los suelos de San José y Puriscal.

Los nódulos por su tamaño se clasificaron en tres categorías: (1)  $\leq 0,3$  cm de diámetro, (2) de 0,3 cm a 0,8 cm de diámetro, y (3) nódulos con más de 0,8 cm de diámetro. La mayoría de los tratamientos se ubicó en la categoría de tamaño intermedio de nódulos. El tamaño de nódulos fue muy variable entre y dentro de tratamientos, esto podría atribuirse en parte a la presencia de cepas nativas de cada suelo con una población heterogénea, y en parte la presencia de las bacterias producto de la inoculación, y como resultado de estas dos poblaciones se presentaron nódulos de diversos tamaños según la bacteria que formara el nódulo en cada caso. De haberse utilizado algún tipo de técnica de muestreo o seguimiento de las bacterias inoculadas, tales como inmunofluorescencia o producción de anticuerpos ( 2, 86 ), se hubiera podido determinar si las bacterias inoculadas fueron las responsables o no de la formación de nódulos y en que grado lo fueron, pero lamentablemente por limitaciones de tiempo y de orden técnico no fue posible hacer esta determinación; sin embargo es una posibilidad de gran relevancia en futuros trabajos.

En cuanto a la cantidad de nódulos formados por tratamientos, el ámbito fue de 0 a más de 21 (cuadro 4), pero en general hubo abundancia de nódulos con excepción de los testigos absoluto y nitrogenado sembrados en el suelo de Puriscal, y la cepa No. 24 en el suelo de Puriscal.

En el suelo de Puriscal se observó menor cantidad de nódulos en los diferentes tratamientos, en comparación con la cantidad de nódulos formados en el suelo de Turrialba y especialmente en el suelo de San José. Estos suelos por sus características físicas y químicas difieren bastante entre sí, (cuadro 1) estas condiciones, que serán discutidas posteriormente, pudieron afectar la respuesta a la inoculación. Los resultados obtenidos muestran que la respuesta a la inoculación en cuanto a las variables cualitativas de tamaño, cantidad y distribución de los nódulos en la raíz, varía con el tipo de suelo, presentándose interacciones entre cepa y suelo que serán discutidas con mayor detalle en las siguientes secciones que se refieren a la respuesta de las variables biomasa aérea, biomasa nodular y N-total ante la inoculación del poró con diferentes aislamientos de Rhizobium spp.

#### 4.3. Resultados de la selección de cepas de *Rhizobium* spp en jarras de Leonard utilizando *E. poeppigiana* como planta indicadora.

##### 4.3.1. Peso seco de biomasa aérea de *E. poeppigiana* (12 semanas - edad) sembrada en jarras de Leonard.

Los resultados de esta evaluación se muestran en la fig. 3. Se obtuvo un valor máximo de 2,57 g/jarra por la inoculación con la cepa No. 15, y un valor mínimo de 0,68 g/jarra que correspondió al testigo absoluto (-N-Pb). El testigo nitrogenado obtuvo un valor de 3,52 g/jarra. Según Norris y Date ( 74 ) el testigo notrogenado no se debe incluir en el análisis estadístico con los tratamientos inoculados con Rhizobium, por ser estos dos procesos fisiológicos totalmente diferentes, sin embargo, se utilizó este testigo nitrogenado como punto de referencia o comparación de la nutrición adecuada del poró.

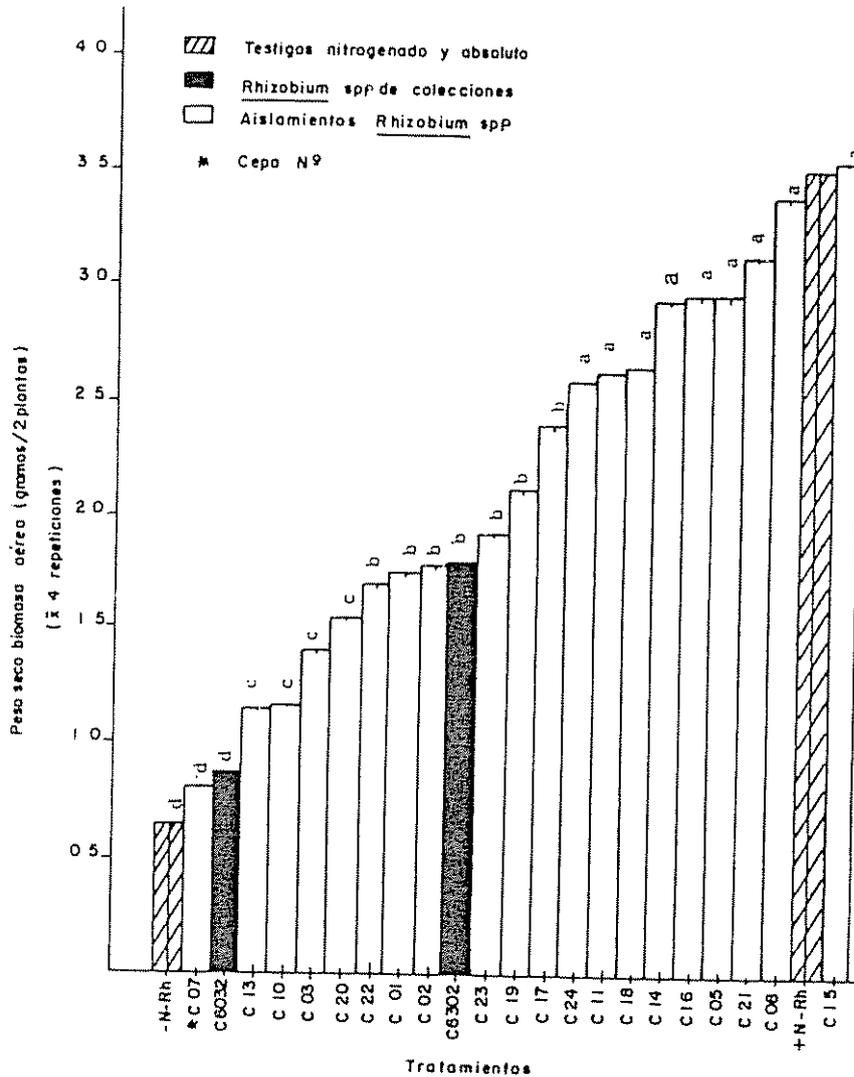


Fig. 1. - Peso seco de biomasa aérea de plántulas de *Erythrina poeppigiana* inoculados con diversas cepas de *Rhizobium* spp y sembradas en jarras Leonard.

Tratamientos seguidos por la misma letra son estadísticamente iguales según prueba de Duncan ( $p < 0,05$ ).

El poró presentó crecimiento diferencial según el aislamiento o cepa inoculada, por lo tanto, la inoculación ejerció efecto sobre las plantas afectando así su producción de biomasa aérea.

Según la prueba de Duncan ( $p < 0,05$ ), la cepa No. 15 dió la mejor respuesta, con un incremento de 420 por ciento contra el testigo absoluto. En orden descendiente los restantes nueve lugares estarían ocupados por las cepas No. 08, 21, 05, 16, 14, 18, 11, 24 y 17.

El comportamiento de las dos cepas "caupí" provenientes de colección indica que el poró presenta cierto grado de especificidad. Date (31) dió una clasificación para las leguminosas forrajeras tropicales basado en la efectividad en la fijación de nitrógeno con un amplio ámbito de cepas de Rhizobium, y las denominó del grupo PE si nodulaban efectivamente con un amplio ámbito de cepas, PI a aquellas que nodulaban con un amplio ámbito de cepas pero frecuentemente inefectivas, y grupos S a aquellas que nodulaban efectivamente con cepas específicas. De acuerdo a esta clasificación y con base a los resultados obtenidos con la inoculación de las dos cepas "caupí" de colección, y los diferentes aislamientos homólogos, el poró estaría dentro del grupo PI, lo cual implica que nodula con varias cepas de Rhizobium spp pero sin establecer una simbiosis efectiva con todas ellas, solamente con algunas. Esto coincidió con los resultados obtenidos por Allen y Allen ( 4 ), los cuales concluyeron que si bien E. poeppigiana pertenece al grupo "caupí" se ve beneficiada cuando se inocula con aislamientos homólogos. De esta manera la estrategia de inoculación y selección de cepas podría ser prometedora en este género.

Los resultados aquí obtenidos son semejantes a los obtenidos por otros autores trabajando con otras plantas indicadoras: Mackie ( 67 ) con Trifolium pratense, Dobereiner ( 41 ) con Mimosa caesalpinifolia Moreno ( 70 ) con Leucaena leucocephala, y Stowers y Elkan ( 90 ) con Arachis hypogaea, entre otros.

Esta variabilidad de Rhizobium en efectividad y capacidad de nodular diferentes especies leguminosas es lo que le da importancia, y de

esta forma se puede ir seleccionando material, especialmente cuando el producto final va a ser la producción de inoculantes tan necesarios de las especies de leguminosas y posterior obtención de cosecha de grano, forraje, abono, proteína, y otros beneficios.

En la fig. 3 se puede apreciar la variable respuesta que dieron - los diferentes tratamientos, y es con base en esta heterogeneidad que se establecen los planes de selección de organismos "superiores", gradualmente en el proceso de selección las respuestas se van haciendo cada vez más homogéneas, hasta el punto en que es posible obtener las bacterias seleccionadas y puras para la elaboración de inoculantes.

#### 4.3.2. Peso seco de biomasa nodular de E. poeppigiana sembrada en jarras de Leonard.

En la figura 4 se muestran los resultados obtenidos para la variable peso seco de biomasa nodular de poró. Se observa que la cepa No. 13 presentó el valor más bajo de biomasa nodular (0,03 g/jarra), y que el valor más alto lo obtuvo la cepa No. 14 0,41 g/jarra.

Las cepas No. 14, 19, 18, 05, 01, 08, 15, 17 y 11 presentaron los mayores valores de biomasa nodular. La cepa No. 14 presentó un incremento de 35 por ciento con respecto al testigo absoluto, sin embargo este incremento no fue significativo.

Con excepción de las cepas No. 13 y No. 6032, el resto de los aislamientos no mostraron mucha diferencia para la variable biomasa nodular, pero se observó la tendencia de ocupar los primeros lugares por las mismas cepas cuando se analizó el peso seco de biomasa aérea. Lo anterior indica que aparentemente existe cierta correlación entre la masa de tejido fijador y la fijación de nitrógeno, tal como fue expuesto por Dobereiner, Arraunda y Penteado ( 43 ) trabajando con frijol común.

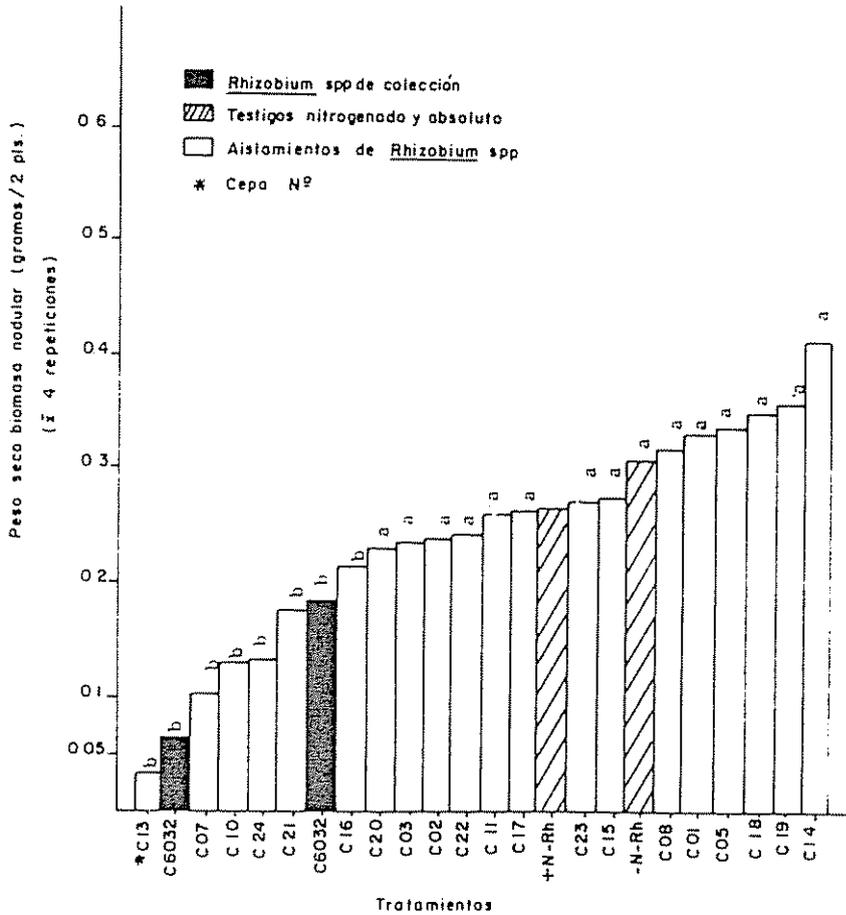


Fig. 4. Peso seco de biomasa nodular de Erythrina poeppigiana inoculada con diversas cepas de Rhizobium spp y sembrada en jarras Leonard.

Tratamientos seguidos por la misma letra son estadísticamente iguales según prueba de Duncan ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3.3. Contenido de N-total en E. poeppigiana sembrada en jarras de Leonard.

En la figura 5 se muestran los resultados obtenidos para la variable contenido de N- total de plantas de E. poeppigiana de 12 semanas de edad.

Las cepas No. 15 y 08 presentaron los mayores valores para esta variable con 115,92 mgN/jarra y 110,15 mgN/jarra respectivamente, contra un valor de 17,68 mgN/jarra obtenido por el testigo absoluto. Esto representó un incremento de 555 por ciento y 523 por ciento de las cepas No. 5 y 08, respectivamente, en relación al testigo absoluto. El testigo nitrogenado obtuvo un valor de 88,2 mgN/jarra, sin embargo hubo aislamientos que permitieron la acumulación de N - por encima y por debajo de este valor, y así se evidenció la variabilidad genética de las cepas de Rhizobium aisladas del poró, para fijar nitrógeno atmosférico con mayor o menor eficiencia.

Las cepas de colección No. 6032 y No. 6302 presentaron diferencias significativas entre ellas. La cepa No. 6302 produjo un menor efecto en el contenido de N-total que la cepa No. 6032, obteniendo esta última igual respuesta que el tratamiento absoluto, este resultado se podría atribuir a la poca adaptabilidad de la cepa 6032 a las condiciones de este experimento.

Las cepas No. 15, 08, 05, 16, 21, 14, 24, 17 y 11 están entre los diez mejores promedios según Duncan ( $p < 0,05$ ). Los resultados obtenidos para el peso seco de biomasa aérea (fig. 3 ) coinciden con los valores de contenido de N-total, y confirman que las cepas anteriormente citadas fueron las diez mejores según las condiciones en que se efectuó este estudio.

De las diez mejores cepas seleccionadas según los valores promedios obtenidos para las diferentes variables estudiadas en esta primera etapa de selección, tres se aislaron de Heredia (No. 08, No. 15 y No. 21), una de Tres Ríos (No. 14), y finalmente seis de Turrialba (No. 05, No. 11, No. 14, No. 16, No. 17 y No. 18 ).

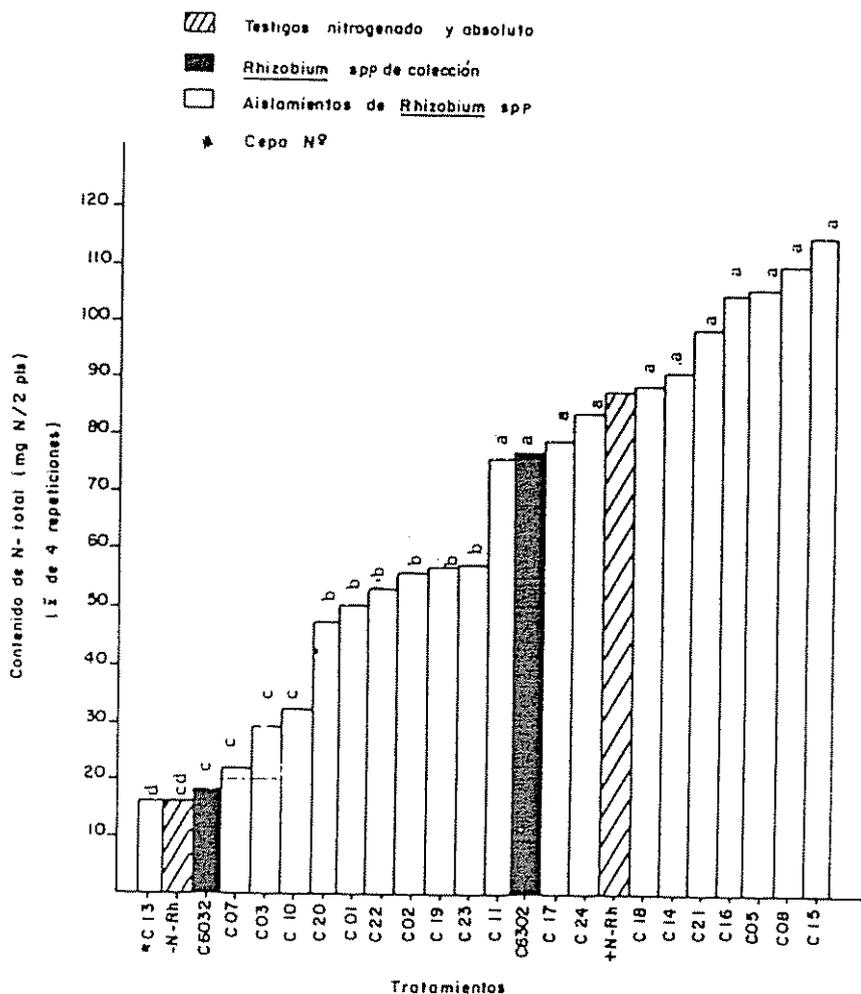


Fig. 5. Contenido de N total de *Erythrina poeppigiana* inoculada con diversas cepas de *Rhizobium* spp y sembrada en jarras Leonard.

Tratamientos seguidos por la misma letra son estadísticamente iguales según prueba de Duncan ( $p < 0,05$ ).

La selección en jarras es una evaluación preliminar de la efectividad e infectividad de las cepas de *Rhizobium* con una especie en particular (90). La evaluación definitiva se debe hacer bajo condiciones más restrictivas como son las encontradas, toxicidad de aluminio, etc.), para así poder establecer el beneficio de las cepas seleccionadas y su eventual incorporación a la producción de inoculantes.

#### 4.4. Resultados de la selección de cepas de *Rhizobium* y respuesta a la inoculación en *E. poeppigiana* sembrada en bolsas con suelo.

La respuesta a la inoculación con Rhizobium depende en gran parte de la presencia de una cepa adecuada y en número suficiente para lograr una infección rápida y efectiva del cultivo en cuestión (69, 90), de ahí la necesidad de contar con material bacteriano efectivo en la fijación simbiótica de nitrógeno, lo cual se logra a través de la selección de cepas. Los resultados de la selección en jarras Leonard (acápite 4.3) sugirieron la posibilidad de explotar el germoplasma bacteriano más efectivo en la fijación de nitrógeno con el poró, puesto que del conjunto inicial de cepas evaluadas se logró obtener algunas con mayor capacidad de fijación que otras bajo las mismas condiciones. Con el fin de examinar también la variabilidad de este grupo de cepas para inducir una respuesta a la inoculación en el poró, se realizó una segunda evaluación empleando en esta oportunidad tres suelos diferentes como sustrato, a saber: Typic Eutrandept (San José), Typic Humitropept (Turrialba), y Ustic Tropohumult (Puriscal).

Es importante señalar aquí que los suelos no fueron esterilizados con el fin de evaluar la presencia o ausencia de poblaciones de Rhizobium ya existentes, y a las que se denominó "cepas nativas"; por otro lado, a las cepas de Rhizobium seleccionadas en jarras Leonard e inoculadas al poró, se les denominó "cepas introducidas o inóculo", a pesar de que probablemente algunas de ellas fueron obtenidas de los suelos en cuestión. Lo anterior viene a reafirmar el concepto de "cepa" descrito por Vincent (99), quien define una cepa "como cualquier cultivo de Rhizobium que no tenga historial común con ningún otro cultivo".

##### 4.4.1. Peso seco de biomasa nodular de *E. poeppigiana* sembrada en tres suelos diferentes.

En los cuadros 5 y 6 se muestran los resultados para la variable peso seco de biomasa nodular en los suelos de San José, Turrialba y Puriscal. El suelo de San José no mostró diferencias significativas entre los diferentes tratamientos evaluados, aunque si hubo respuesta dife-

Cuadro 5. Peso seco de biomasa aérea (g), peso seco de biomasa nodular (g) y contenido de nitrógeno total (mg) de plantas de E. poeppigiana (16 semanas edad) sembradas en bolsas con suelo (Typic Eutrandept). (Los datos son promedios de ocho plantas).

Tratamiento	Biomasa aérea (g/planta)	Biomasa nodular (g/planta)	Contenido N-total (mg/planta)
Cepa (*) 14	2,9112 a	0,2424 a	167,0472 a
08	3,3741 a	0,3132 a	102,2985 b
21	3,1430 a	0,2427 a	84,9434 b
24	3,0866 a	0,2647 a	91,7629 b
17	3,0360 a	0,2345 a	88,5003 b
18	2,9457 a	0,2177 a	78,0485 b
11	2,9397 a	0,2700 a	91,5420 b
05	2,7209 b	0,2072 a	80,3362 b
15	2,6872 b	0,1766 a	71,2463 b
16	2,5600 b	0,2012 a	76,7882 b
-N-Rh ( ** )	3,5677 a	0,2765 a	104,1249 b
+N-Rh ( ***)	4,0020	0,2710	99,7400

(\*) Cepas de Rhizobium spp seleccionados en jarras Leonard.

(\*\*) -N-Rh: testigo absoluto sin Rhizobium sin nitrógeno

(\*\*\*) +N-Rh: testigo sin Rhizobium con nitrógeno (50kg/ha urea).

No se incluye en el análisis estadístico ya que corresponde a un proceso fisiológico diferente al de la simbiosis.

Tratamientos seguidos por la misma letra son estadísticamente iguales según prueba de Duncan ( $p < 0,05$ ).

Cuadro 6. Peso seco de biomasa aérea (g), peso seco de biomasa nodular (g) y contenido de nitrógeno total (mg) de plantas de E. poeppigiana (16 semanas de edad) sembradas en bolsas con suelo (Typic Humitropept y Ustic Tropohumult). (Los datos son promedios de ocho plantas).

Tratamiento suelo cepa (*)	Biomasa aérea (g/planta)	Biomasa nodular (g/planta)	Contenido N-total (mg/planta)	
Typic Humitropept	05	2,2752 a	0,1677 a	63,3554 a
	24	2,1352 a	0,0869 b	51,1886 b
	16	1,9841 a	0,0996 b	52,9922 b
	18	2,0292 a	0,1025 b	48,5914 bc
	21	1,8909 a	0,1590 a	48,6379 bc
	17	1,7919 a	0,0757 b	45,4917 c
	08	1,7896 a	0,0681 b	43,3190 c
	15	1,5927 a	0,0902 b	40,1527 c
	14	1,4619 a	0,0689 b	29,0874 d
	11	1,1297 b	0,0287 b	29,6929 d
	-N-Rh (**)	1,4640 a	0,0494 b	33,5617 c
	+N-Rh (***)	2,0170	0,0880	53,1390
Ustic Tropohumult	21	1,8572 a	0,1118 b	51,4202 b
	18	1,7277 a	0,0830 b	51,0282 b
	08	1,5417 a	0,0765 b	49,3320 bc
	17	1,7236 a	0,0739 b	48,5798 bc
	05	1,5356 a	0,0855 b	48,8963 bc
	11	1,6387 a	0,0685 b	47,9074 bc
	15	1,4092 a	0,0632 b	35,0601 c
	16	1,5197 a	0,0806 b	41,8277 c
	24	1,5486 a	0,0624 b	40,8360 c
	14	1,3139 a	0,0967 b	35,9767 c
	-N-Rh (**)	2,2439 a	0,08	56,8835 b
	+N-Rh (***)	2,1960	0,1080	62,4300

(\*) Cepas de Rhizobium spp seleccionadas en jarras Leonard.

(\*\*) Testigo absoluto: sin Rhizobium sin nitrógeno

(\*\*\*) Testigo sin Rhizobium con nitrógeno (50 kg/ha urea). Por corresponder a un proceso fisiológico diferente al de la simbiosis no se incluye en el análisis estadístico.

Tratamientos seguidos por la misma letra son estadísticamente iguales según prueba de Duncan ( $p < 0,05$ )

rente a la inoculación con respecto a los otros dos suelos. Debido a la influencia del factor suelo en la respuesta a la inoculación se realizaron análisis de variancia por separado, uno para el suelo de San José, y otro para los suelos de Turrialba y Puriscal (cuadros 6A al 11A).

Los mayores valores en biomasa nodular lo obtuvieron los tratamientos en el suelo de San José, con un ámbito que varió desde 0,31 g/planta para la cepa 08, hasta 0,17 g/planta de la cepa 15. Los testigos absoluto y nitrogenado obtuvieron valores de 0,276 g/planta y 0,271 g/planta, respectivamente. Las cepas utilizadas en este ensayo deberían ser evaluadas aplicando nitrógeno de arranque a diversas dosis para evaluar las interacciones cepa-planta-nitrógeno, pues fueron aislamientos procedentes de cafetales donde se da una alta aplicación de fertilizantes nitrogenados (hasta 300 kgN/ha/año) y un manejo intensivo (15), lo cual pudo haber sido un factor de selección de cepas capaces de fijar aún en presencia de altas cantidades de nitrógeno fijo, teniendo como única evidencia en este sentido el que la nodulación en el testigo nitrogenado no se inhibió a pesar de haberse agregado 50 Kg urea/ha. Este germoplasma sería muy valioso en estudios futuros, y desde luego en aplicaciones agrícolas con otras leguminosas del mismo grupo; esto con el propósito de evaluar la respuesta a la inoculación bajo condiciones de altos contenidos de nitrógeno, en aquellos suelos que así lo ameriten, y que no es la norma en América Latina.

Según los resultados mostrados en el cuadro 5, hubo buena nodulación en el suelo de San José, aún en el tratamiento nitrogenado, lo cual indicó la presencia de cepas nativas posiblemente eficientes en la fijación biológica de nitrógeno. Según Boonkerd, Weber y Bezdicek (13) la abundancia de cepas nativas efectivas en determinado suelo pueden ser responsables de la falta de respuesta a la inoculación, posiblemente por competencia por los sitios de infección; esto concuerda con los resultados obtenidos en el suelo de San José donde no se obtuvo respuesta positiva con la inoculación de Rhizobium.

En el cuadro 6 se muestra que hubo diferencias significativas para la variable biomasa nodular entre los diferentes tratamientos en los suelos de Puriscal y Turrialba, por lo tanto, hubo respuesta a la inoculación. Así por ejemplo, la cepa 05 inoculada en el suelo de Turrialba fue significativamente diferente (Duncan  $p < 0,05$ ) al resto de los tratamientos, con un valor de 0,17 g/planta, lo cual representó un incremento de 220 por ciento con respecto al testigo absoluto (0,05 g/planta) y la cepa 21 inoculada en el mismo suelo (0,16 g/planta) con un incremento de 218 por ciento. El resto de los tratamientos no mostraron incrementos significativos con respecto al testigo absoluto, pero no por esto dejan de tener valor potencial en futuras investigaciones, estudiando otros factores que puedan estar limitando la respuesta a la inoculación. Al respecto, Sylvester (92) menciona que la falta de respuesta a la inoculación puede ser debida entre otras causas a la presencia de cepas nativas efectivas, o efectos localizados como la presencia de toxinas o antibióticos, que en esta investigación no fueron determinados.

Los testigos absoluto en ambos suelos presentaron menor valor de biomasa nodular (0,08 g/planta en el suelo de Puriscal, y 0,05 g/planta en el de Turrialba) con respecto a los testigos nitrogenados (0,108 g/planta en el suelo de Puriscal, y 0,08 g/planta en el de Turrialba), lo cual manifestó un efecto estimulador de la fertilización nitrogenada sobre la nodulación. Según Gibson y Nutman (51), Pate y Dart (75), y Dart y Wilson (29) pequeñas cantidades de nitrógeno inorgánico estimulan el crecimiento inicial de plántulas y la nodulación. Como consecuencia a esta respuesta surge la importancia de evaluar en posteriores trabajos el efecto del nitrógeno de arranque a diversas dosis en estas bacterias, y así poder determinar el efecto benéfico de la práctica de inoculación en el poró.

El valor mínimo de biomasa nodular fue obtenido por la cepa 11 (0,028 g/planta) en el suelo de Turrialba, siendo estadísticamente igual a su correspondiente testigo absoluto. Pero estos valores de biomasa nodular en los suelos de Puriscal y Turrialba son bajos si se les compara con los obtenidos en el suelo de San José. Esto puede estar

relacionado entre otras cosas por la acidez del suelo, según Alexander (2) en suelos ácidos se observan bajas densidades de población de Rhizobium, ya que el pH afecta el crecimiento y sobrevivencia de las bacterias, afecta el proceso de infección y por ende la eficiencia simbiótica y la nutrición de la planta hospedera.

El pH del suelo de Puriscal fue de 4,7 y el de Turrialba fue de 4,6, los cuales resultan ser diferentes del pH del suelo de San José que fue de 7,3 (vease cuadro 1), obviamente en este último suelo tanto las bacterias como el poró estaban en ventaja sobre los otros dos.

El testigo absoluto solo fue significativamente diferente de las cepas 05 y 21 inoculadas en el suelo de Turrialba, con esta respuesta se observó poca efectividad y adaptabilidad de las demás cepas inoculadas en estas condiciones, y obviamente pueden existir otros factores no evaluados en este caso, pero que pueden estar directamente relacionados con la falta de respuesta a la inoculación en algunos de los inóculos.

El suelo de Puriscal tuvo pH 4,7 y 37 por ciento de saturación de aluminio (cuadro 1), y el de Turrialba, tuvo pH 4,6 y 56 por ciento de saturación de aluminio. Según Edwards (46) el efecto del aluminio en la fijación de nitrógeno está relacionado con el efecto en el crecimiento de las raíces, ya que la toxicidad de este elemento reduce el número potencial de sitios de infección, afectando adversamente la nodulación, tal como se presentó en el suelo de Puriscal; pero en el suelo de Turrialba se observó un alto grado de adaptabilidad de la cepa 05 a estas condiciones. Por otro lado, el nivel de Mn en el suelo de Puriscal (cuadro 1) a pesar de que no fue tan alto para causar problemas de toxicidad, pudo ser otro de los factores limitantes en la respuesta positiva a la inoculación, sobre todo si se desconocen los requisitos nutricionales del poró, según Dobereiner (40) el exceso de Mn reduce el número y tamaño de los nódulos, afectando la simbiosis entre Rhizobium y Phaseolus vulgaris. Munns y Franco (72) señalan que la toxicidad de Al y Mn promueven un funcionamiento irregular de los nódulos, y limitan el crecimiento de las plantas, aunque en el caso del poró no existen informes de deficiencia nutricionales ni tampoco problemas de toxicidad. Según Andrews (6)

el problema del exceso de Mn radica básicamente en que afecta negativamente el desarrollo de la planta, lo cual al final incide en una simbiosis deficiente.

Para la variable biomasa nodular en el suelo de San José no se presentaron diferencias significativas, por el contrario, hubo buena nodulación en todos los tratamientos incluyendo el testigo ni nitrogenado. En el suelo de Turrialba se presentaron diferencias estadísticamente significativas (Duncan  $p < 0,05$ ). Los mayores valores de respuesta se presentaron en el suelo de San José probablemente debido a su fertilidad. Damirgi, Frederick y Anderson (28) demostraron que una cepa particular de Rhizobium se asociaba con determinados tipos de suelos. Así pues se observa en los cuadros 5 y 6 que la cepa 21 presentó altos valores de biomasa nodular en los tres suelos en estudios; pero la cepa 08 por el contrario, no presentó una respuesta definida, siendo de 3,37g/planta en el suelo de San José, de 0,068g/planta en el de Turrialba, y de 0,076g/planta en el de Puriscal. Sería interesante evaluar la interacción suelo por cepa en futuros trabajos para poder establecer grupos de inoculación en base al tipo de suelo.

#### 4.4.2. Peso seco de biomasa aérea de E. poeppigiana sembrada en tres suelos diferentes.

En los cuadros 5 y 6 se muestran los resultados obtenidos para la variable peso seco de biomasa aérea de poró en tres suelos diferentes Typic Humitropept (Turrialba), Typic Eutrandept (San José), y Ustic Tropohumult (Puriscal), y cuyas características físicas y químicas se presentaron en el cuadro 1 (pág. 22). Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que la respuesta a la inoculación varió con el tipo de suelo.

En el cuadro 5 se observa que hubo diferencias significativas entre algunos de los tratamientos inoculados y el testigo absoluto (3,56 g/planta), este valor fue similar al del testigo nitrogenado (4,0g/planta) en el suelo de San José.

En el cuadro 6 se muestra que la cepa 11 inoculada en el suelo de Turrialba fue el único tratamiento estadísticamente diferente al resto del grupo, con 1,13 g biomasa aérea/planta. Obviamente entre suelos la respuesta fue diferente, así el suelo de San José presentó los mayores valores de biomasa aérea en todos sus tratamientos con respecto a los otros dos suelos.

Por lo general, cuando los tratamientos inoculados superan significativamente la respuesta del testigo absoluto, se atribuye ese incremento de producción a la inoculación (92). Otra de las posibilidades para distinguir el inoculante de las cepas nativas consiste en utilizar técnicas de marcado como la inmunofluorescencia o antisueros (2). Sin embargo en este estudio no fue posible utilizar estos mecanismos. Por otro lado, la falta de respuesta significativa a la inoculación dificultó la identificación del efecto benéfico de esta práctica de manejo en el poró en el suelo de San José y Puriscal.

La respuesta que se obtuvo en el suelo de San José se podría atribuir básicamente a tres factores:

- (a). Presencia de gran cantidad de cepas nativas efectivas. Con base a los resultados obtenidos para la variable biomasa nodular (cuadro 5) se observó que en el suelo de San José hubo buena nodulación en todos los tratamientos, lo cual indicó la presencia de cepas nativas eficientes en la fijación biológica de nitrógeno. Ahora, si se toma en cuenta la alta correlación existente entre la biomasa nodular y la biomasa aérea, y que ha quedado ampliamente demostrada por Van Kessel (98), Roskoski (79, 80), y Dobereiner (41), entre otros, se espera que al haber buena nodulación como en este caso, se presente también mayor biomasa nodular. Si el testigo absoluto presentó abundancia de nódulos y es porque en el suelo habían efectivamente cepas nativas eficientes y en número suficiente como para igualar el efecto del inóculo.

- (b). Competencia entre cepas nativas y el inoculante; al respecto, Sylvester (92) expone que las diferencias en la competitividad de las cepas nativas con los inoculantes también pueden resultar en diferencias en su capacidad de infectar raíces, también Winamo y Lie (104), Mytton y De Felice (73) confirman que al haber competencia por los sitios de infección entre cepas nativas y la introducida se disminuye la eficiencia simbiótica de la fijación.
- (c). La falta de respuesta a la inoculación puede estar relacionada al factor nitrógeno en el suelo; al respecto, Dean y Clark (34) manifiestan que un alto contenido de nitratos pueden provocar una disminución de la eficiencia simbiótica ya que existen menos carbohidratos disponibles para los nódulos, puesto que la planta utilizaría el nitrógeno fácilmente disponible del suelo en detrimento de la simbiosis. Por otro lado, Joseph (62) y Munns (71) mencionan que pequeñas cantidades de nitrógeno estimulan el crecimiento de las plántulas y la nodulación. El suelo de San José, por sus características (cuadro 1), se considera como fértil y en estas condiciones se puede ver afectada la respuesta positiva a la inoculación debido a la competencia entre los dos procesos: fijación simbiótica de nitrógeno, y absorción de nitrógeno fácilmente disponible del suelo. Como apoyo, Roskoski (80) encontró que la eficiencia simbiótica de Inga juinicuil se vió disminuida en presencia de altos niveles de nitrógeno en el suelo. En el suelo de San José no se inhibió la nodulación en el testigo nitrogenado (4,0 g b. aérea/planta), por lo cual sería interesante la evaluación posterior con nitrógeno de arranque para evaluar su posible efecto.

Aunque la biomasa aérea fue significativamente diferente a la obtenida por las plantas en los suelos de Puriscal y Turrialba, entre estos dos últimos no se presentaron diferencias (cuadro 6), con la excepción de la cepa 11 en el suelo de Turrialba.

Sin embargo, se observó que en el suelo de Turrialba, por lo general, los tratamientos inoculados presentaron valores más

que los mismos tratamientos en el suelo de Puriscal.

Por otro lado, los testigos absoluto y nitrogenado en el suelo de Puriscal obtuvieron los valores más altos (2,24 g/planta y 2,19 g/planta, respectivamente) con respecto a los tratamientos inoculados, es decir, hubo una aparente respuesta negativa a la inoculación. Esta situación se presenta cuando existen condiciones que limitan la fijación de nitrógeno; así, la inversión de energía en la formación de nódulos no fijadores pone en desventaja el crecimiento de la planta nodulada con respecto a los testigos, una situación similar a la de este estudio fue obtenida por Sylvester et al (91) trabajando con leguminosas forrajeras.

Obviamente se deben identificar con mayor precisión otros factores nutricionales limitantes en el suelo aparte del pH per se para su posible enmienda o para adoptar una estrategia de selección de germoplasma más adaptado (de plantas y bacterias) a estas condiciones. Algunas de las estrategias a seguir se podrían basar en la obtención de mayor número de cepas y su evaluación en un amplio ámbito de suelos, así como la selección de cepas en los suelos en los cuales fueron obtenidas, así mismo realizar estudios de fertilización que no fueron considerados en este trabajo.

#### 4.4.3. Contenido de N-total de plantas de E. poeppigiana sembradas en bolsas de suelo.

En los cuadros 5 y 6 se muestran los resultados obtenidos para la variable N-total en los tres suelos en estudio. No hubo diferencias significativas en el suelo de San José, con la excepción de la cepa 14 (Duncan  $p < 0.05$ ) que obtuvo un valor de 167 mg N/planta; en algunos casos se obtuvo una respuesta aparentemente negativa como en la cepa 15 (71,24 mg N/planta) con respecto al testigo absoluto (104,12 mg N/planta), o una respuesta aparentemente positiva como en la cepa 14 (167,04 mg N/planta).

Los resultados obtenidos en el suelo de Puriscal y en el suelo de Turrialba muestran diferencias entre suelo e inóculo (cuadro 6). También se presentaron diferencias entre bolsas (cuadro 11 A) lo cual podría atribuirse por un lado a la poca adaptabilidad de algunas cepas

a las condiciones del experimento, y por otro lado, a características propias del genotipo de la planta indicadora, en este caso el poró, que es una especie de polinización cruzada y por lo tanto no garantiza la homogeneidad genética de la semilla evaluada.

La cepa 5 inoculada en el suelo de Turrialba presentó el mayor valor con 63,35 mg N/planta, contra 33,56 mg N/planta para el testigo absoluto, lo cual presentó un incremento de 89 por ciento. En este suelo el resto de los tratamientos inoculados fueron iguales al testigo, excepto las cepas 24, 16, 14 y 11, las dos primeras superaron el testigo absoluto por 52 por ciento y 58 por ciento, respectivamente; las cepas 14 y 11 presentaron respuesta negativa, con 13 por ciento y 11,5 por ciento, respectivamente por debajo del testigo absoluto. Algunas cepas pueden tener un efecto negativo sobre el rendimiento de N en la planta, porque la formación de nódulos requiere energía, y cuando los nódulos no fijan  $N_2$  la planta nodulada crece menos que una planta menos nodulada debido a esta pérdida de energía (92), esta situación se asemeja a la obtenida en este estudio. Por otro lado, en suelos con menos materia orgánica la inoculación tendría un efecto mayor sobre el rendimiento de N, esto por cuanto en la materia orgánica existe nitrógeno que la planta puede tomar más fácilmente sin necesidad de recurrir al nitrógeno producto de la simbiosis (91), en este sentido se establece competencia entre el nitrógeno de la materia orgánica y aquel nitrógeno fijado por el proceso simbiótico. El suelo de Turrialba tenía 8,04 por ciento de materia orgánica (cuadro 1), aproximadamente el doble de lo que tenían los suelos de San José y Puriscal. Si en este suelo de Turrialba el contenido de materia orgánica fuera menor, probablemente la respuesta a la inoculación hubiera sido más significativa, y así el beneficio de la inoculación sería mayor.

Con respecto al suelo de Puriscal, los testigos absoluto y nitrogenado obtuvieron los mayores valores de N-total con 56,88 mg N/planta, y 62,43 mg N/planta, respectivamente, superando de esta forma a los demás tratamientos. Esta situación se podría atribuir a las condiciones de infertilidad del suelo a que estaban sometidas las plantas, y por otro lado, las respuestas negativas se podrían atribuir a las mayores demandas energéticas de las plantas fuertemente noduladas.

Los mayores valores de N-total para el suelo de Turrialba fueron obtenidos por las cepas 05, 16, 24, 21 y 18. Y por las cepas 21, 18, 08, 05 y 17 en el suelo de Puriscal. Según Pereira (76), con el grupo "caupí" se pueden obtener buenos resultados, lo cual implica mayor eficiencia simbiótica, con la introducción de cepas seleccionadas. Posiblemente por razones de competencia entre cepas nativas y/o de adaptabilidad al suelo los incrementos de los diferentes tratamientos no presentaron los aumentos esperados.

Obviamente este es un primer intento para el estudio de la simbiosis Rhizobium- poró, y de acuerdo con los resultados obtenidos, el tipo de suelo definitivamente tiene efecto sobre la inoculación con los diferentes aislamientos de Rhizobium sobre el poró.

Por otro lado, el efecto de la inoculación sobre la producción de biomasa aérea y N-total no está del todo claro, por lo tanto, es conveniente continuar los estudios aumentando el número de cepas y el número de suelos en estudio, así como estudiar las diferentes interacciones entre elementos del suelo (micro y macro) y las fuentes de inóculo, ya que podrían existir otros factores limitantes que enmascaran el efecto de la inoculación.

Es necesario ahora, realizar ensayos, de campo con la cepa 05 (procedente de Turrialba) que dió resultados positivos en el suelo de Turrialba, con el fin de corroborar su efecto benéfico sobre el contenido de N-total del poró. Lo mismo podría hacerse con las cepas 16 y 24 (aisladas de Turrialba y Tres Ríos, respectivamente) que presentan un gran potencial como inoculantes, y se deberían evaluar bajo condiciones de campo.

Resulta atractivo también investigar la influencia de la inoculación con Rhizobium sobre el enraizamiento y nodulación de estacas de poró, fase que es limitante bajo las actuales condiciones de manejo. Además, se podrían ensayar prácticas de inoculación y fertilización que favorezcan esta práctica de manejo, así como estudiar la posibilidad de inocular con Rhizobium antagonista a los hongos que producen la pudrición de estacas de poró.

## 5. CONCLUSIONES

1. Con base a los resultados obtenidos en el proceso de selección en jarras de Leonard se consideró que la metodología utilizada fue adecuada para identificar cepas de Rhizobium spp con mayor capacidad de fijación en asociación con la leguminosa arbórea Erythrina poeppigiana (poró).
2. Se encontró un marcado efecto del tipo de suelo sobre la inoculación de los diferentes aislamientos de Rhizobium spp en el poró. No hubo respuesta a la inoculación en el suelo de San José (Typic Eutrandept ), y se observó una alta incidencia de cepas nativas en el testigo absoluto. Los suelos de Puriscal (Ustic Tropohumult) y Turrialba (Typic Humitropept) presentaron diferencias significativas con respecto al suelo de San José, en cuanto a las diferentes variables evaluadas; así, en el suelo de San José se presentaron los mayores valores promedios de biomasa aérea, biomasa nodular y contenido de N-total en los diferentes tratamientos, con respecto a los otros dos suelos.
3. Con al menos una de las cepas evaluadas (No. 5) se favoreció la nodulación, crecimiento y contenido de N-total del poró en el suelo de Turrialba. Con esta cepa se obtuvo un incremento de 220 por ciento en biomasa nodular con respecto al testigo absoluto, y 89 por ciento de incremento en el contenido de N-total. Esto corrobora el beneficio potencial de esta estrategia de inoculación en el cultivo del poró.
4. La presencia de cepas nativas eficientes fue una de las características más sobresalientes en este estudio, por lo tanto, con los resultados preliminares obtenidos en este primer proceso de selección no es posible establecer respuestas concluyentes o definitivas que puedan ser aplicadas como recomendaciones en el campo. Si bien, se pudo determinar el papel potencial de la inoculación en el poró, es necesario estudiar en detalle los factores nutricionales que limiten

el establecimiento de la simbiosis Rhizobium-poró, así como estudiar las interacciones inóculo x suelo que se encontraron, y llevar el estudio a etapa de campo para dar recomendaciones sobre el establecimiento de la práctica de inoculación y sus implicaciones.

## 6. RECOMENDACIONES

1. Cuando se obtenga material genético caracterizado de Erythrina poeppigiana es aconsejable aislar nódulos de estas mismas plantas e incluirlos en el proceso de selección. De esta forma se trabajaría con un material (planta y bacteria) de historial conocido. En los ensayos de inoculación en el campo, debe incluirse material genético conocido y homogéneo de E. poeppigiana para obviar el posible enmascaramiento de la respuesta a la inoculación con Rhizobium por parte del genotipo de la planta hospedera.
2. En futuros estudios de selección es aconsejable incluir el mayor número posible de cepas de Rhizobium y suelos para ampliar el ambiente de escogencia, y caracterizar de esta forma grupos de bacterias eficientes en fijación simbiótica que puedan ser empleadas posteriormente en la producción de inoculantes para especies afines.
3. Deben iniciarse ensayos con las cepas más promisorias para evaluar el efecto de la inoculación de Rhizobium spp sobre la sobrevivencia y el establecimiento de estacas de poró. A la vez, es deseable incluir en el proceso de selección de cepas el aislamiento de aquellas que sean antagónicas a los hongos patógenos como Rhizoctonia solani, que podrían estar involucradas en la pudrición de las estacas de poró.
4. Deben iniciarse estudios sobre los efectos de la inoculación a largo plazo o en ensayos piloto de producción de campo, con aquellas cepas de Rhizobium que resultaron ser más prometedoras.
5. Deben profundizarse estudios para determinar con más claridad la naturaleza de las deficiencias nutricionales que limiten el establecimiento de una simbiosis eficiente; evaluando las diferentes interacciones que se presentan entre los macro y micro nutrientes y el inoculante.

6. Conviene establecer los patrones de inoculación cruzada de las cepas aisladas utilizando otras leguminosas tropicales, para evaluar su rango de efectividad.
  
7. Conviene establecer estudios de marcación de Rhizobium utilizando las cepas más promisorias, con el fin de identificar los posibles movimientos del inoculante y su efecto en la rizosfera.

## 7. LITERATURA CITADA

1. AGUIRRE, A., V. Estudio de los suelos del área del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, IICA-Turrialba, Costa Rica. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, IICA-CATIE 1971. 138 p.
2. ALEXANDER, M. Ecology of nitrogen-fixing organism. In Ayanaba, A. y Darta, P. J. eds. Biological nitrogen fixation in farming - systems of the tropics. Chichester, Wiley, 1977. pp. 99-114.
3. \_\_\_\_\_. Introduction to soil microbiology. 2 ed. New York, Wiley, 1977. 467 p.
4. ALLEN, O. N. y ALLEN, E. K. Root nodule bacteria and some tropical leguminous plants: I. Cross-inoculation studies with Vigna sinensis L. Soil Science 42 (1): 61-77. 1936.
5. ALVARADO, A., GLOVER, N., y OBANDO, O. Reconocimiento de los suelos de Puriscal-Salitrales y Tabarcia- San Ignacio de Acosta. In Heuvelod, J., y Espinoza, L. eds. El componente arbóreo de Acosta de Puriscal, Costa Rica. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Turrialba, 1983. pp. 102-114.
6. ANDREW, C. S. Legumes and acid soils. In Dobereiner, J. et al. eds. International Latin American Symposium on limitations and potentials for biological nitrogen fixation in the tropics. New York 1978. pp. 135-160.
7. APPLEBY, C. A. Leghemoglobin. In Quispel, A. ed. The biology of nitrogen fixation. Amsterdam, Holland, North-Holland Pub. Co., 1974. pp. 522-554.
8. ARANGUREN, J., ESCALANTE., y HERRERA, E. Nitrogen cycle of Tropical perennial crops under shade trees. Plant and soil 67: 247-258. 1982.
9. BARNEBY, R. C., KRUKOFF, B. A., y RAVEN, P. H. Erythrina IV Symposium. Allertonia 3(1): 1-154. 1982.
10. BEER, J. W., et al. A case study of traditional agro-forestry practices in a wet tropical zone: The "La Suiza" project. In Simposio Internacional sobre las Ciencias Forestales y su contribución al desarrollo de la América Tropical. Editado por M. Chavarría, San José, Costa Rica, CONICIT-INTERCIENCIA-SCITEC, 1981. pp. 191-289.
11. BENAVIDES, J. E. Investigación en árboles forrajeros. In Babbar, L. comp. Curso corto intensivo de Técnicas Agroforestales. Turrialba, Costa Rica, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, 1983. pp. Sl-5.

12. BERGERSEN, F. J. Measurement of nitrogen fixation by direct means. In Bergersen, F. J. ed. Methods for evaluating biological - nitrogen fixation. New York, Wiley, 1980. pp. 65-110.
13. BOONKERD, N., WEBER, D. F., y BEZDICEK, D. F. Influence of Rhizobium japonicum strains and inoculation methods of soybean grown in Rhizobium populated soil. Agronomy Journal 70(4): 547-549. 1978.
14. BORCHERT, R. Phenology and ecophysiology of tropical trees: Erythrina poeppigiana O. F. Cook. Ecology 61(5): 1065-1070. 1980.
15. BORNEMISZA, E. Nitrogen cycling in coffee plantations. Plant and Soil 67: 241-246. 1982.
16. BRILL, W. J. Genetics and regulation of nitrogen fixation. In Dobereiner, J., et al. eds. International Latin American Symposium on limitations and potentials for biological nitrogen fixation in the tropics. New York, Plenum Press, 1978. pp. - 237-245.
17. BROCKWELL, J. Experiments with crop and pasture legumes principles and practices. In Bergersen, F. J. ed. Methods for evaluating biological nitrogen fixation. New York, Wiley, 1980. pp. 417-488.
18. \_\_\_\_\_, et al. Selection of Rhizobia for inoculants. In Vincent J. M. ed. Nitrogen fixation in legumes. Sydney, Academic Press, 1982. pp. 173-192.
19. BUDOWSKI, G. Erythrina spp: multipurpose tress for small farming - systems in the humid tropics. Project proposal. Turrialba, Costa Rica, CATIE, 1982. 37 p.
20. \_\_\_\_\_, KASS, D. C. L., y RUSSO, R. O. Leguminous trees for shade. Pesquisa Agropecuaria Brasileira 19 (s/n): 205-22. 1984.
21. BURNS, R. C., y HARDY, R. W. F. Nitrogen fixation in bacteria and - higher plants. Springer, 1975. pp. 3-12..
22. CADIMAS ZEVALLOS, A., ALVIM, P. DE. Influencia del árbol de sombra Erythrina glauca sobre algunos factores edafológicos relacionados con la producción del cacaoero. Turrialba (Costa Rica) 17(3) : 330-336. 1967.
23. CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA. Resumen acumulado de datos agroclimáticos (1968-1984). Turrialba, Costa Rica, CATIE, 1985.
24. COMISION NACIONAL de división Territorial Administrativa. División Territorial Administrativa de la República de Costa Rica. Imprenta Nacional, La Uruca, San José, Costa Rica, 1981. 126 p.
25. COVAS, G., y GOMEZ, H. Mejoramiento de la aptitud simbiótica de la leguminosa hospedante. In fijación biológica del nitrógeno, Taller de trabajo, Mar del Planta, 1982. Informe. Mar del Planta, Argentina, 1982. pp. 84-84.

26. COZZO, D. Anatomía comparada de las maderas argentinas del género Erythrina L. Darwiniana (Argentina) 7 (2): 175-184. 1946.
27. DACCARETT, M., y BLYDENSTEINS, J. La influencia de árboles leguminosos y no leguminosos sobre el forraje que crece bajo ellos. Turrialba (Costa Rica) 18(4): 405-8. 1968.
28. DAMIRGI, S. M., FREDERICK, L. R., y ANDERSON, I. C. Sero groups of Rhizobium japonicum in soybean nodules as affected by soil types. Agronomy Journal 59: 10-12. 1967.
29. DART, P. J., y Willon, D. C. Nodulation and nitrogen fixation by Vigna sinensis and Vicia atropurpurea: the influence of concentration, form, and site of application fo combined nitrogen Aust. J. Agric. Res. 21: 45-56. 1970.
30. DART, P. Infection and development of leguminous nodules. In Hardy R. W. F. ed. A treatise on dinitrogen fixation. New York, Wiley, 1977. pp. 367-460.
31. DATE, R. A. Criteria for selection of strains. In Vincent, J. M., Whitney, A. S., y Bose, J. eds. Exploiting the legume-  
Rhizobium symbiosis in tropical agriculture. Proceedings Hawaii, College of Tropical Agriculture, Misc. Pub. No. 145, 1976. pp. 300-302.
32. \_\_\_\_\_. The development and use of legume inoculants. In Ayanaba, A., y Dart, P. J. eds. Biological nitrogen fixation in farming systems of the tropics. Chichester, Wiley, 1977. pp. 169-180.
33. \_\_\_\_\_. Collection, isolation, characterization and conervation of Rhizobium. In Vincent, J. M. ed. Nitrogen fixation in legumes. Sydney, Academic Press, 1982. pp. 95-110.
34. DEAN, J. R. y CLARK, K. W. Nodulation, acetylene reduction and yield of fafa beans (Vicia faba) as affected by inoculum concentration and soil nitrate level. Canadian Journal of Plant Science 57(4): 1055-1061.
35. de MOOY, C. J. y PESEK, K. W. Nodulation, acetylene reduction and yield of fafa beans (Vicia faba) as affected by inoculum concentration and soil nitrate level. Canadian Journal of Plant Science 57(4): 1055-1061.
36. DE SOUZA, D. I. A. Nodulation of indigenous Trinidad legumes. Tropical Agriculture (Trinidad) 43: 265-267. 1965.
37. DIAZ ROMEU, R. Determinación de nitrógeno total en suelos; método semi-micro Kjeldahl. Turrialba, Costa Rica, CATIE, 1977. 2 p.

38. \_\_\_\_\_., y HUNTER, A. Metodología de muestreo de suelos, análisis químico de suelos y tejido vegetal e investigaciones en invernadero. CATIE, Turrialba, Costa Rica, Proyecto Centroamericano de fertilidad de suelos, 1978. 2 p.
39. DIXON, R. O. D. Rhizobium (with particular reference to relationships with host plants). Annual Review of Microbiology 23: 137-158. 1969.
40. DOBEREINER, J. Manganese toxicity effects on nodulation and nitrogen fixation of beans (Phaseolus vulgaris L.) in acid soils. Plant and Soil 24(1): 153-166. 1966.
41. \_\_\_\_\_. Efeito da inoculacao de sementerias da sabia (Mimosa caesalpinifolia) no estabelecimento e desenvolvimento das mudas no campo. Pesquisa Agropecuaria Brasileira 2: 301-305. 1967.
42. \_\_\_\_\_. Present and future opportunities to improve the nitrogen nutrition of crops through biological nitrogen fixation in farming systems of the tropics. In Ayanaba, A., y Dart, P. J. eds. Biological nitrogen fixation in farming systems of the tropics. Chichester, Wiley, 1977. pp. 3-12.
43. \_\_\_\_\_., BERGALLO DE ARRAUNDA, Nl., y DE FIGUEREIDO Penteadó, A. Avaliacao da fixacao do nitrogenio, em leguminosas, pela regressao do nitrogenio total das plantas sobre o peso de nodulos. Pesquisa Agropecuaria, Brasileira, 1: 233-237. 1966.
44. DOMMERMUES, Y. Ensuring effective symbiosis in nitrogen fixing trees. In Graham, P., y Harris, S. C. eds. Biological nitrogen fixation technology for tropical agriculture. Cali, Colombia, Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1982. pp. 395-411.
45. DWYNER, J. D. y D'ARCY, W. G. Erythrina. In Flora of Panamá Part V. Annals of the Missouri Botanical Garden 67(3): 686-697. 1980.
46. EDWARDS, D. G. Nutritional factors limiting nitrogen fixed by Rhizobia. In Ayanaba, A., y Dart, P. J. eds. Biological nitrogen fixation in farming systems of the tropics. Chichester, Wiley, 1977. pp. 189-204.
47. ESCALANTE, C., HERRERA, R., y ARANGUREN, J. Nitrogen fixation in shade trees (Erythrina poeppigiana) in cacao plantations in North Venezuela. Pesquisa Agropecuaria Brasileira 19(s/n): 223-230. 1984.
48. FUENTES GODO, R., CASTANY, A., y SILVESTRINI, E. H. Nota acerca de la caracterización ecológica de cepas de Rhizobium spp. In 7a. Reunión Latinoamericana sobre Rhizobium. Argentina, 1974. pp. 141-143.

49. FRANCO, a. A. Micronutrientes requirements of legume Rhizobium symbiosis in the tropics. In Dobereiner, J., et al. International and potentials Latin American Symposium on limitations and potentials for biological nitrogen fixation in the tropics. New York, Plenum Press, 1978. pp. 161-171.
50. GHILDIYAL, M. C., TOMAR, O. P. S., y SIROSHI, G. S. Response of - cowpea genotypes to zinc in relation to photosynthesis, nodulation and dry matter distribution. Plant and Soil 49(3): 505-516. 1978.
51. GIBSON, A. H., y NUTMAN, P. S. Studies on the physiology of nodule formation. VII. A reappraisal of the effect of preplanting. Annals of Botany 24: 420-433. 1960.
52. GIBSON, P. R., y ALSTON, A. M. The acetylene to nitrogen ratio in Lupinus angustifolius L. In Veeger, C., y Newton, W. E. eds. Advances in nitrogen fixation research. The Netherlands, Nijhoff/Junk, 1984. p. 33.
53. GIBSON, A. H. Methods for legumes in glasshouses and controlled environment cabinets. In Bergersen, F. J. ed. Methods for evaluating biological nitrogen fixation. New York, Wiley, 1980. pp. 139-184.
54. HALLIDAY, J., y SOMASEGARAN, P. Nodulation, Nitrogen fixation and Rhizobium. Strain affinities in the genus Leucaena. In International Development Research Center. Leucaena Research in the Asian-Pacific Region. Proceedings. Canadá, IDCR, 1983. pp. 27-32.
55. HARDY, F. La relación carbono: nitrógeno en los suelos de cacao. Turrialba (Costa Rica) 9: 4-11. 1959.
56. HEICHEL, G. H. y VANCE, C. P. Nitrate-N and Rhizobium strain roles in alfalfa seedlings nodulation and growth. Crop Science 19(4): 512-518. 1979.
57. HOGBERG, P. Nitrogen fixation by the woody legume Leucaena leucocephala in Tanzania. Plant and Soil 66: 21-28. 1982.
58. HOLDRIDGE, L. R., y POVEDA, L. Arboles de Costa Rica. v. 1. San José, Costa Rica, Instituto Científico Tropical, 1975. pp. 154-162.
59. INSTITUTO METEOROLOGICO NACIONAL. Resumen de datos acumulados agrometeorológicos (1961-1984). San José, Costa Rica, 1985.
60. JIMENEZ, R. Particularidades pedogenéticas en cuatro andepts de - Costa Rica, Tesis Ing. Facultad de Agronomía, Universidad de Costa Rica, 1979. 64 p.

61. JOHNSTON, A. W. B., y BERINGER, J. E. Genetic studies of Rhizobium. Annual Applied Biology 88(3): 484-487.
62. JOSEPH, R. A. Effect of nitrogen source on nodulation, nitrogen fixation and mineral content of soybean in solution culture. The Madras Agricultural Journal 64(4): 211-217. 1977.
63. KAMPATH, E. J., y FOY, C. D. Lime-fertilizer-plant interactions in acid soils. In Fertilizer technology and use. 2a ed. - Madison, Wisconsin, Soil Science Society of America, 1971. pp. 105-110.
64. KIRKBRIDE JUNIOR, J. H. Legumes of the Cerrado. Pesquisa Agropecuaria Brasileira 19(s/n): 23-46. 1984.
65. KNOWLES, R. The measurement of nitrogen fixation. In Gibson, A. H. y Newton, W. E. eds. Current perspectives in nitrogen fixation. Proceedings. Canberra, Australia, AAS, 1981. pp. 227-333.
66. KRUKOFF, B. A. Supplementary notes on the American species of Erythrina III. Phytologia 19(3): 113-175. 1969.
67. MACKIE MARTINEZ, F. Efectividad y adaptabilidad de cepas de Rhizobium trifolii aisladas de Allpachka (3500-4000 msnm) en arena estéril. Especie indicadora: trébol rojo (Trifolium pratense) In 7a. Reunión Latinoamericana sobre Rhizobium, Argentina, 1974. pp. 238-257.
68. McNEIL, D. L. Quantification of symbiotic nitrogen fixation using ureides: a review. In Graham, P., y Harris, S. C. eds. Biological nitrogen fixation technology for tropical agriculture, Cali, Colombia. Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1982. pp. 609-617.
69. MEISNER, C. A. y GROSS, H. D. Some guidelines for the evaluation of the need for and response to inoculation of tropical legumes North Carolina Research, Serv., Tech. Bul. No. 265, 1980. 59 p.
70. MORENO QUIROS, R. A. Eficiencia de cepas de Rhizobium y efecto de P, Mo, Fe, Co y encalado en la nodulación y producción de biomasa de Leucaena leucocephala (Guaje) en suelos ácidos de Huimanguillo, Tabasco. Tesis Mag. Sc. Instituto de Enseñanza e Investigación de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas, México, 1981. 127 p.
71. MUNNS, D. N. Soil acidity and related factors. In Vincent, J. M., Whitney, A. S., y Bose, J. eds. Exploiting the legume-Rhizobium symbiosis in tropical agriculture. Proceedings. Hawaii, College of Tropical Agriculture, Misc. No. 145. 1976. pp. 305-311.
72. \_\_\_\_\_, y FRANCO, A. A. Soil constraints to legume production. In Graham, P., y Harris, S. C. eds. Biological nitrogen fixation - technology for tropical agriculture. Cali, Colombia, Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1982. pp. 133-152.

73. MYTTON, L. R., y DE FELICE, J. The effect of mixtures of Rhizobium strains on the dry matter production of white clover grown in agar. *Annals of Applied Biology* 87(1): 83-93. 1977.
74. NORRIS, D. O., y DATE, A. R. Legume bacteriology. In Shaw, H. N., y Byron, W. W. eds. *Tropical pastures research: principles and methods*. Bol. 15, Hurley, England, Commonwealth Bureau of Pastures and Field Crops, 1976.
75. PATE, J. S., y DART, P. J. Nodulation studies in legumes IV. The influence of inoculum strain and time of application of ammonium nitrate on symbiotic response. *Plant and Soil* 67: 293-304. 1982.
76. PEREIRA, J. Nitrogen cycling in South American savannas. *Plant and Soil* 67: 293-304. 1982.
77. RENNIE, R. J., RENNIE, D. A., y FRIED, M. Concepts of <sup>15</sup>N usague in dinitrogen fixation studies. In International Atomic Energy Agency. *Isotopes in biological dinitrogen fixation*. Int. - Atomic Energy Ag., Vienna, 1978. p. 107.
78. RODRIGUEZ, R. Producción de biomasa de poró (Erythrina poeppigiana (Walpers) O. F. Cook) y king grass (Pennisetum purpureum P. - typhoides) intercalados en función de la densidad de siembra y la frecuencia de poda. Tesis M. Sc. CATIE-UCR, 1985.
79. ROSKOSKI, J. P. Nodulation and N<sub>2</sub> fixation by Inga junicuill a woody legume in coffee plantations. *Plant and Soil* 59: 201-206. 1981.
80. \_\_\_\_\_. Nitrogen fixation in a Mexican coffee plantation. *Plant and Soil* 67: 283-291. 1982.
81. RUSSO ANDRADE, R. O. Efecto de la poda de Erythrina poeppigiana - (Walpers) O. F. Cook (poró) sobre la nodulación, producción de biomasa y contenido de nitrógeno en el suelo en un sistema agroforestal "café-poró". Tesis M. Sc. CATIE-UCR, Turrialba, Costa Rica, 1983. 108 p.
82. SANTANA, M. B. M., y CABALA-ROSAND, P. Dynamics of nitrogen in a shaded cacao plantation. *Plant and Soil* 67: 271-281. 1982.
83. SARTAIN, J. B., y KAMPRATH, E. J. Effect of liming a highly Al-saturated soil on the top and root growth and soybean nodulation. *Agron. J.* 67: 507-510. 1975.
84. SHEARER, G. B., KOHL, D. H., y CHIEU, S. H. The nitrogen <sup>15</sup> abundance in a wide variety of soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 42: - 899-902. 1978.

85. SILVESTER, W. B. Measurement of nitrogen fixation (Plenary discussion). In Gibson, A. H., y Newton, W. E. eds. Current perspectives in nitrogen fixation. Proceedings. Canberra, Australia, AAS, 1981. pp. 334-337.
86. SOMOSEGARAN, P., HOBEN, H., y HALLIDAY, J. Ejercicios prácticos en tecnología Rhizobium-leguminosa. Trad. el español por M. C. Evangelina Cuantle Fabián. México, 1981. In Curso Regional de entrenamiento sobre la simbiosis Rhizobium y leguminosa tropicales de importancia agrícola, San José, Costa Rica, 1983. Ejercicios. San José, Costa Rica, Centro de Investigaciones Agronómicas, 1983. s. p.
87. \_\_\_\_\_, y HALLIDAY, J. Guidelines for collecting the root nodules of leguminous trees. Nitrogen fixing tree Research Reports 2: 35-37. 1984.
88. SOSULSKI, F., y BUCHAN, J. A. Effects of Rhizobium and nitrogen fertilizer on nitrogen fixation and growth of field peas. Canadian Journal of Plant Science 58(2): 553-556. 1978. (notes).
89. STEWART, W. D. P. Nitrogen fixation in plants. London, Athlone Press, 1966. 168 p.
90. STOWERS, M. A. y ELKAN, G. H. Criteria for selecting infective and efficient strains of Rhizobium for use in tropical agriculture North Carolina Research Serv. Tech. Bul. No. 264, 1980. 73 p.
91. SYLVESTER BRADLEY, R. et al. Use of undisturbed soil cores for evaluation of Rhizobium strains and methods for inoculation of - tropical forages legumes in a Colombian Oxisol, Plant and Soil 74: 237-247. 1983.
92. \_\_\_\_\_. Fijación biológica de nitrógeno por leguminosas: aspectos agronómicos relacionados con su inoculación con Rhizobium. Ponencia. Primer Seminario Regional del Caribe sobre Fijación Biológica de Nitrógeno en la Agricultura. Santo Domingo, República Dominicana, INDOTEC, 1984. pp. 28-35.
93. THOROLD, C. A. Observations on a trial of trees as shade for cacao. Tropical Agriculture (Trinidad) 22(11): 203-6. 1945.
94. TRIGOSO HIDALGO, R. Algunos factores que afectan la fijación simbiótica del nitrógeno. Thesis Mag. Sc., IICA, Turrialba, Costa Rica, 1970. 143 p.
95. TRINICK, M. J. Host-Rhizobium associations. In Vincent, J. M. ed. Nitrogen fixation in legumes. Sydney, Academic Press, 1982. pp. 111-122.
96. TRIPATHI, S. K., y EDWARD, J. C. Response of Rhizobium culture inoculation, zinc and molybdenum application to soyabean - (Glycine max Merrill). Indian Journal of Plant Physiology 21(3): 248-252. 1978.

97. VAN DEN BERG, E. H. R. The effectiveness of the symbiosis of Rhizobium leguminosarum on pea and broad bean. Plant and Soil 48(3): 629-639. 1977.
98. VAN KESSEL, C. H. J. Effect of environmental and physiological factors on  $N_2$  - fixation by Inga juinicuil and Trifolium spp. Thesis 1983. 175 p.
99. VINCENT, J. M. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. IBP Handbook No. 15 Oxford, Blackwell Scientific Pub., 1970. 164 p.
100. \_\_\_\_\_. Rhizobium: general microbiology. In Hardy, R. W. F. ed. A treatise on dinitrogen fixation. Wiley, New York, 1977. pp. 277-358.
101. \_\_\_\_\_. Nature and basic properties of the Rhizobia. In Vincent J. M. ed. Nitrogen fixation in legumes. Sydney, Academic - Press, 1982. pp. 5-12.
102. VOSE, P. B., et al. <sup>15</sup>N as a tool in biological nitrogen fixation research. In Graham, P., y Harris, S. C. eds. Biological nitrogen fixation technology for tropical agriculture. Cali, Colombia, Centro Internacional de Agricultura Tropical. 1982. pp. 575-592.
103. WALPOLE, R. E. y MYERS, R. H. Probability and statistics for engineers and sceintistis. New York, MacMillan Pub. Co., 1978. 580 p.
104. WINARNO, R., y LIE, T. A. Competition between Rhizobium strains in nodule formation: interaction between nodulating and non-nodulating strains. Plant and Soil 51(1): 135-142. 1979.

APENDICE

APENDICE 1A. Diferentes procedimientos evaluados para el aislamiento de nódulos de poró.

I. Método descrito por Vincent ( 99 ) y Date ( 33 ).

El primer paso consiste en lavar la superficie externa de los nódulos y colocarlos sobre papel secante. Posteriormente se lavan con etanol 95% (5 a 10 seg.). Luego se lavan en Cloruro de mercurio ( $\text{HgCl}_2$  0,1%) durante unos cuatro minutos. Seguidamente se realizan lavados consecutivos con agua estéril unas 5-6 veces, y se dejan reposando una hora en el agua del último lavado si son nódulos viejos, o unos minutos si se trata de nódulos frescos. Posteriormente se macera cada nódulo en tubos estériles enl ml de agua destilada estéril con ayuda de un polí-cía estéril. Finalmente se toma de una a tres azadas de suspensión y se deposita sobre platos de Petri con medio ALM+rojo congo+cicloheximida, para rayar por estría cruzada.

II. Método descrito por Norris y Date ( 74 ).

Se lava la superficie externa del nódulo con agua destilada estéril. Se le agrega  $\text{H}_2\text{O}_2$  (peróxido de hidrógeno) por unos segundos para desinfectar, luego se lava con agua destilada estéril unas 4-5 veces. Posteriormente se coloca el nódulo en una placa estéril y se corta con un bisturí estéril para dejar expuesta la superficie interna de la cual se toma un poco de suspensión con una aza o puntero flameado, y se deposita en una placa de Petri con medio de cultivo para rayar por estría cruzada.

III. Método descrito por Somasegaran y Halliday ( 86 ).

Se lavan los nódulos con agua destilada estéril para eliminar residuos de suelo y otras impurezas. Se agrega Lauril Sulfato al 1 por ciento durante dos a tres minutos. Luego se lavan con etanol 79% de tres a cinco segundos, posteriormente se lavan sucesivamente con agua destilada estéril e 5-7 veces. Luego los nódulos se maceran en tubos estériles con lml de agua destilada estéril, se toma un poco de la suspensión lechosa con ayuda de una aza y se deposita en una placa de Petri con medio de cultivo para rayar por estría cruzada.

APENDICE 2A. ALM + rojo congo + cicloheximida ( 86 ).

Agar levadura Mánitol (ALM)

Para preparar un litro:

$K_2HPO_4$	0,5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g
NaCl	0,1 g
Manitol	10,0 g
Extracto de levadura	2,0 g
Agar	15,0 g
Agua	1,0 l

Rojo congo:

Se prepara 1,0 g de rojo congo en 400 ml de agua destilada. Se utilizan 10 ml de esta solución por cada litro de ALM.

Cicloheximida

Se prepara 1,0 g de cicloheximida y se disuelve en 100 ml de agua destilada a 50°C, luego se filtra al vacío. Se utilizan 5 ml de esta solución madre para cada litro de ALM.

Para preparar el medio ELM + agar + rojo congo + cicloheximida, se disuelven todos los reactivos (excepto la cicloheximida) por agitación y calentamiento. Posteriormente se esteriliza en autoclave a 121°C por 15 minutos. La cicloheximida se agrega después que el medio está esterilizado.

### APENDICE 3A. Tinción de Gram ( 86 ).

Es una tinción diferencial que separa dos grupos de microorganismos; los gram + y los gram -. El procedimiento se describe a continuación:

En un portaobjetos se deposita un poco del crecimiento de bacterias, luego se pasa unos segundos bajo el mechero para fijar las bacterias. Luego se le agregan unas gotas de violeta de genciana o cristal violeta y unas gotas de bicarbonato (1 min.), posteriormente se agrega el mordete - (lugol, yoduro de potasio) por unos 2 minutos, luego se lava con agua, y se agrega alcohol durante unos segundos para decolorar. Por último se agrega la safranina ( un minuto ), se vuelve a lavar con agua, y se deja secar a temperatura ambiente para observar posteriormente el frotis al microscopio.

#### Soluciones para la tinción de Gram

##### Solución I (solución de cristal violeta )

Cristal violeta	10 g
Oxalato de amonio	4 g
Etanol	100 ml
Agua (destilada)	400 ml

##### Solución II (solución de Yodo)

Yodo	1 g
Yoduro de potasio	2 g
Etanol	25 ml
Agua (destilada)	100 ml

##### Solución III (alcohol yodado)

Solución de yodo (II)	5 ml
Etanol	95 ml

##### Solución IV (contrastante)

Metanol safranina al 2,5%	10 ml
Agua destilada	100 ml

APENDICE 4A. Preparación del medio Agar- Glucosa- Peptona + púrpura de bromocresol.

Para preparar un litro de AGP. Pesar:

Glucosa	10 g
Peptona	5 g
Agar	15 g

Aforar a 1,000 ml con agua destilada. Se calienta el medio para disolver el agar, y se agregan 10 ml del indicador púrpura de bromocresol de una solución acuosa al 0.1%. Se esteriliza en autoclave a 121°C por 18 minutos. Se distribuye en tubos y se dejan inclinados sobre una mesa para su solidificación.

APENDICE 5A. Esterilización de la semilla de E. poeppigiana según tres métodos sugeridos.

I. Método descrito por Vincent ( 99 )

Se tomaron grupos de 50 a 100 semillas y se lavaron superficialmente con agua destilada estéril. Luego se lavaron agitando, con etanol 95% por unos segundos. Posteriormente se volvieron a lavar esta vez con cloruro de mercurio a 0.5% durante 3-5 minutos. Luego se lavaron con solución salina estéril o agua destilada estéril unas 5 a 6 veces, dejándolas en el agua en el último enjuague durante 24 horas para embeberlas.

II. Método descrito por Ramírez (\*)

Se colocaron 50 semillas en un kitasato estéril y se lavaron con etanol al 95%. Luego se conectó al liofilizador para crear un vacío. Se inyectó cloruro de mercurio 0,5% con una jeringa y se dejó así durante 3 minutos. Posteriormente se hicieron lavados sucesivos (5-6 veces) con agua destilada estéril. Se dejaron las semillas en el agua del último lavado durante 24 horas para embeberlas.

---

(\*) Ramírez, C. Comunicación personal. Procedimiento para la esterilización de semillas. Laboratorio Microbiología de Suelos, Centro de Investigaciones Agronómicas, 14 de mayo de 1984.

III. Método descrito por Somasegaran y Halliday ( 86 ), y modificado.

Se lavaron grupos de 50 semillas de dos a cuatro veces con agua destilada estéril. Posteriormente se les agregó etanol 95% agitando por un minuto. Se lavaron luego con cloruro de mercurio 0,5% agitando de 5 a 7 minutos. Después se lavaron de 6 a 7 veces con agua destilada estéril, espaciando los enjuagues de 10 a 30 minutos. Se dejaron en el agua del último lavado por 24 horas. Luego de este período se lavaron de nuevo con etanol 95% por unos segundos, y luego con agua destilada estéril unas dos o cuatro veces.

Los lavados después de las 24 horas de embibición fue la modificación que se hizo a este procedimiento, la razón para ello fue el sobre crecimiento de hongos y bacterias sobre las semillas que dificultaron su esterilización ( 86 ).

APENDICE 6A. Preparación del medio Agar- Agua ( 86 )

Preparar un medio de agar- agua al 30 por ciento, disolviendo 30 g de agar en 100 ml de agua destilada y calentar hasta ebullición, o hasta que el agar este totalmente disuelto. Luego se esteriliza el medio en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Se chorrea sobre platos de Petri hasta que solidifique.

APENDICE 7A. Preparación del medio en agar inclinado ( 86 )

Para preparar un litro:

CaHPO <sub>4</sub>	1,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2 g
MgSO <sub>2</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,2 g
NaCl	0,2 g
FeCl <sub>3</sub>	0,1 g
Agua	100 ml
Agar	8-15 g
Microelementos*	1,0 ml

\* del patrón que contiene: B<sub>o</sub> 0,05%, Mn 0,05%, Zn 0,005%, Mo 0,005% y Cu 0,002%.

Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos y se distribuyeron volúmenes iguales en tubos. Posteriormente se inclina los tubos sobre una mesa hasta que solidifique el medio.

APENDICE 8A. Nefelómetro de MacFarland ( 86 ).

El Nefelómetro de MacFarland consiste en una comparación u observación visual del cultivo bacteriano contra una serie de tubos patrón para determinar el número aproximado de bacterias por ml. Se utilizan los reactivos cloruro de bario 2 H<sub>2</sub>O al 1 por ciento, y ácido sulfúrico al 1 por ciento.

Tubo #	Cloruro de Bario ml	Acido Sulfúrico ml	Millones bacterias/ ml aproximadamente
1	0,1	9,9	300
2	0,2	9,8	600
3	0,3	9,7	900
4	0,4	9,6	1200
5	0,5	9,5	1500
6	0,6	9,4	1800
7	0,7	9,3	2100
8	0,8	9,2	2400
9	0,9	9,1	2700
10	1,0	9,0	3000

Una vez completado el juego de tubos, se compara el cultivo bacteriano a utilizar con cada una de las diluciones y se determina cual es la dilución que a simple vista se asemeja más con el cultivo, y de esta forma se determina aproximadamente el número de bacterias/ml.

CUADRO IA. Solución de nutrimentos libre de nitrógeno

Soluciones Patrón	Elemento	Micromoles	Forma	PM	g/l	M
1	Ca	1000	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	147.03	294.1	2.0
2	P	500	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	136.09	136.1	1.0
3	Fe	10	Citrato de Fe	355.04	6.7	0.02
	Mg	250	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246.5	123.3	0.5
	K	1500	$\text{K}_2\text{SO}_4$	174.06	87.0	0.5
	S	500				
	Mn	1	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	169.02	0.338	0.002
4	B	2	$\text{H}_3\text{BO}_3$	61.84	0.247	0.004
	Zn	0.5	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	287.56	0.288	0.001
	Cu	0.2	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	249.69	0.100	0.0004
	Co	0.1	$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	281.12	0.056	0.0002
	Mo	0.1	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	241.98	0.048	0.0002

Para cada 10 litros de solución de cultivo concentración total, tomar 5.0 ml de cada una de las soluciones de la 1 a la 4, y ajustar a 5.0 litros de agua, de esta manera diluir a 10 litros.

Para los tratamientos control (\*) de N se adiciona  $\text{KNO}_3$  0.05% dando una concentración de N de 70 ppm. (86).

Cuadro 2A. Peso seco de biomasa aérea, peso seco de biomasa nodular y contenido de N-total de plantas de E. poeppigiana sembradas en jarras de Leonard. Los datos son promedio de cuatro repeticiones.

Tratamiento	Peso seco (g) b. nodular	Peso seco (g) b. aérea	Contenido N-total ng N/ jarra
Inóculo (*)			
15	0,2800 a	3,5708 a	115,9299 a
14	0,4192 a	2,9508 a	91,3875 a
19	0,3612 a	2,1085 b	57,4400 b
18	0,3569 a	2,6300 a	89,0199 a
05	0,3417 a	2,9950 a	106,5649 a
01	0,3379 a	1,7242 b	50,5649 a
08	0,3286 a	3,4042 a	110,9299 a
23	0,2764 a	1,9408 b	57,6500 b
17	0,2688 a	2,4675 a	79,6225 a
11	0,2658 a	2,6275 a	76,2475 a
22	0,2469 a	1,7075 b	53,1750 b
02	0,2428 a	1,7842 b	56,6975 b
03	0,2373 a	1,4375 c	29,5675 c
20	0,2339 a	1,5642 c	47,3600 b
16	0,2191 b	2,9850 a	105,8799 a
6302	0,1864 b	1,8175 b	77,2075 a
21	0,1757 b	3,1708 a	99,8574 a
24	0,1387 b	2,6975 a	84,8925 a
10	0,1382 b	1,1842 c	32,1625 c
07	0,1073 b	0,8258 d	22,6500 c
6032	0,0673 b	0,9175 d	18,7200 c
13	0,0322 b	1,1707 c	16,8600 d
- N - Rh (**)	0,3110 a	0,6808 d	17,6875 d
+N - Rh (***)	0,2700	3,5200	88,2000

(\*) cepas de Rhizobium spp

(\*\*) Testigo absoluto sin nitrógeno sin Rhizobium

(\*\*\*) Testigo nitrogenado con 70 ppmN-KNO<sub>2</sub> sin Rhizobium

Tratamientos seguidos por la misma letra son estadísticamente iguales según prueba de Duncan ( $p < 0,05$ ).

CUADRO 3A. Análisis de variancia para la variable peso seco de biomasa aérea (g/2 plantas) de E. poeppigiana (12 semanas) sembradas en jarras Leonard.

Fuente de variación	GL	CM	F
Inóculo	22	0,2952	7,08 ***
Residuo	69	0,4169	
Total	91		

Media general: 2,09

Error estándar de la media: 0,32

C.V = 15,38 por ciento

CUADRO 4A. Análisis de variancia de la variable peso seco de biomasa nodular (g/2 plantas) E. poeppigiana (12 semanas) sembradas en jarras Leonard.

Fuente de variación	GL	CM	F
Inóculo	22	0,2638	2,16 **
Residuo	69	0,1220	
Total	91		

Media General: 0,29

Error estándar de la media: 0,17

C.V = 59,34 por ciento

CUADRO 5.A. Análisis de variancia para la variable contenido de nitrógeno (mg N/2 plantas) de E. poeppigiana (12 semanas) sembrada en jarras de Leonard.

Fuente de variación	GL	CM	F
Inóculo	22	0,4196	8,64 ***
Residuo	69	0,4856	
Total	91		

Media general: 65,08

Error estándar de la media: 11,01

C.V : 16,93 por ciento

CUADRO 6A. Análisis de variancia para la variable peso seco de biomasa aérea (g/planta) de E. poeppigiana (16 semanas) sembrada en bolsa con suelo de San José (Typic Eutrandedpt).

Fuente de variación	GL	CM	F
Inóculo	10	0,6933	1,41
Repetición	3	0,1650	3,35 *
Bolsa	11	0,9344	0.19
Residuo	63	0,4920	0,10
Total	87		

Media General: 2,99

Error estándar de la media: 0,24

C. V. 8,27 por ciento

CUADRO 7A. Análisis de variancia para la variable peso seco de biomasa nodular (g / planta) de E. poeppigiana (16 semanas) sembrada en bolsa con suelo de San José (Typic Eutrandedpt).

Fuente de variación	GL	CM	F
Inóculo	10	0,1227	1,01
Repetición	3	0,1565	1,28
Bolsa	11	0,2985	0,24
Residuo	63	0,1219	
Total	87		

Media general: 0,2406  
 Error estándar de la Media: 0,03  
 C. V = 16,22 por ciento

CUADRO 8A. Análisis de variancia de la variable contenido de nitrógeno (mg N/planta) de E. poeppigiana (16 semanas) sembrada en bolsas con suelo de San José (Typic Eutrandedpt).

Fuente de variación	GL	CM	F
Inóculo	10	0,5508	1,26
Repetición	3	0,1732	0,40
Bolsa	11	0,3176	0,73
Residuo	63	0,4371	
Total	87		

Media General: 94,23  
 Error estándar de la media: 23,37  
 C.V = 24,80 por ciento

Cuadro 9A. Análisis de variancia para la variable peso seco de biomasa aérea (g/planta) de E. poëppigiana (16 semanas) sembrada en bolsas con suelo de Puriscal (Ustic Tropohumult) y Turrialba (Typic Humi - tropept).

Fuente de variación	GL	CM	F
Suelo	1	0,8014	1,70
Inóculo	10	0,6259	1,33
Repetición	3	0,8254	1,75
Suelo x Inóculo	10	0,7950	1,68
Residuo (1)	63	0,4721	5,75 ***
Bolsa-en-tr	22	0,5807	0,71
Residuo (2)	66	0,8217	
Total	175		

Media general: 1,70

Error estándar de la media: 0,07

C. V = 4,29 por ciento

Cuadro 10A. Análisis de variancia de la variable peso seco de biomasa nódular (g / planta) de E. poeppigiana (16 semanas sembrada en bolsas con suelo de Puriscal (Ustic Tropohumult) y Turrialba (Typic Humitropept)).

Fuente de variación	GL	CM	F
Suelo	1	0,4757	1,74
Inóculo	10	0,1044	3,81 ***
Repetición	3	0,3539	1,29
Suelo x Inóculo	10	0,5308	1,94 *
Residuo (1)	63	0,2738	1,53
Bolsa-en-tr	22	0,2302	1,28
Residuo (2)	66	0,1794	
Total	175		

Media general: 0,08

Error estándar de la media: 0,0056

C.V.: 6,53 por ciento

CUADRO 11A. Análisis de variancia de la variable contenido de nitrógeno (mg N/planta) de E. peóppigiana (16 semanas) sembrada en bolsas con suelo de Puriscal (Ustic Tropohumult) y Turrialba (Typic Humitropept).

Fuente de variación	GL	CM	F
Inóculo	1	0,1709	0,52
Suelo	10	0,6931	2.12 **
Repetición	3	0,5007	1,53
Suelo x Inóculo	10	0,5626	1,72 *
Residuo (1)	63	0,3267	6,48 ***
Bolsa-en-tr	22	0,3730	0,74
Residuo (2)	66	0,5040	
Total	175		

Media general: 45,17

Error estándar de la media: 1,92

C.V = 4,27 por ciento

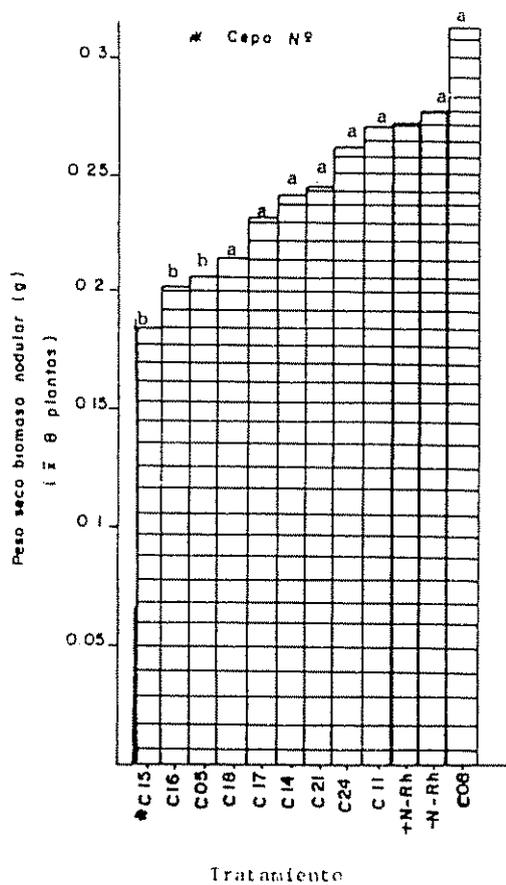


Fig. 1A. Peso seco de biomasa aérea de *Erythrina poeppigiana* (16 semanas edad) sembrada en bolsa con suelo Typic Eutrandept e inoculada con diferentes cepas de *Rhizobium* spp.

Tratamientos seguidos por la misma letra son estadísticamente iguales según Duncan ( $p < 0.05$ )

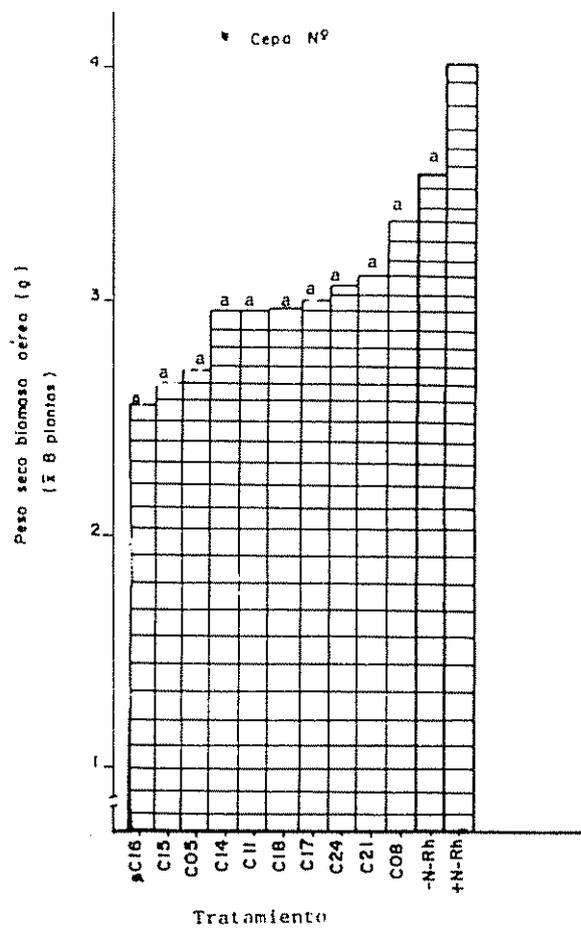


Fig. 2A. Peso seco de biomasa nodular de *Erythrina poeppigiana* (16 semanas edad) sembrada en bolsa con suelo Typic Eutrandept e inoculada con diferentes cepas de *Rhizobium* spp.

Tratamientos seguidos por la misma letra son estadísticamente iguales según Duncan ( $p < 0.05$ ).

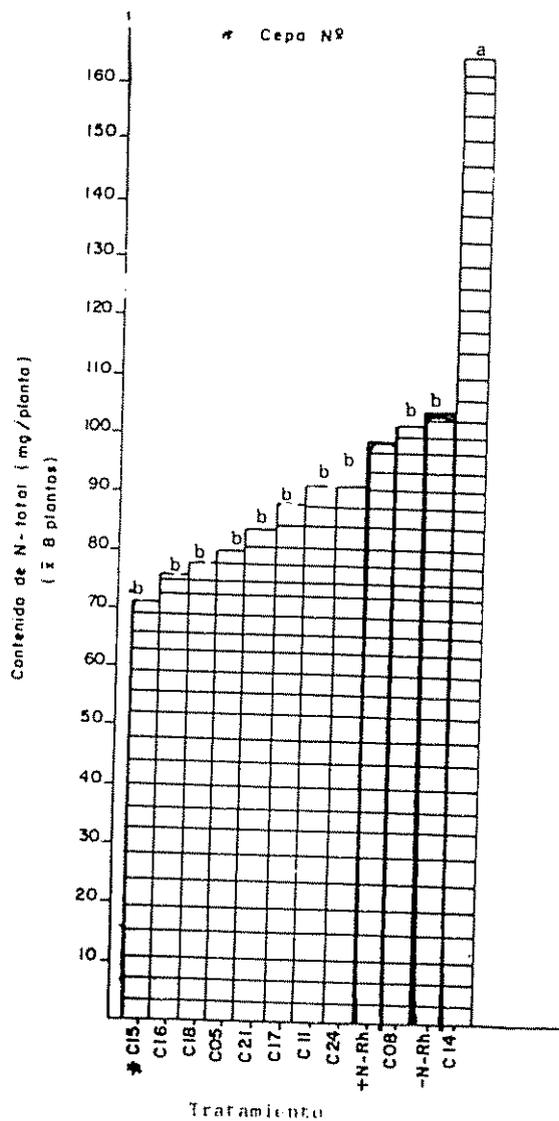


Fig. 3A. Contenido de nitrógeno total de *Erythrina poeppigiana* (16 semanas edad) sembrada en bolsa con suelo Typic Eutrandept e inoculada con diferentes cepas de *Rhizobium* spp.

Tratamientos seguidos por la misma letra son estadísticamente iguales según Duncan ( $p < 0.05$ )

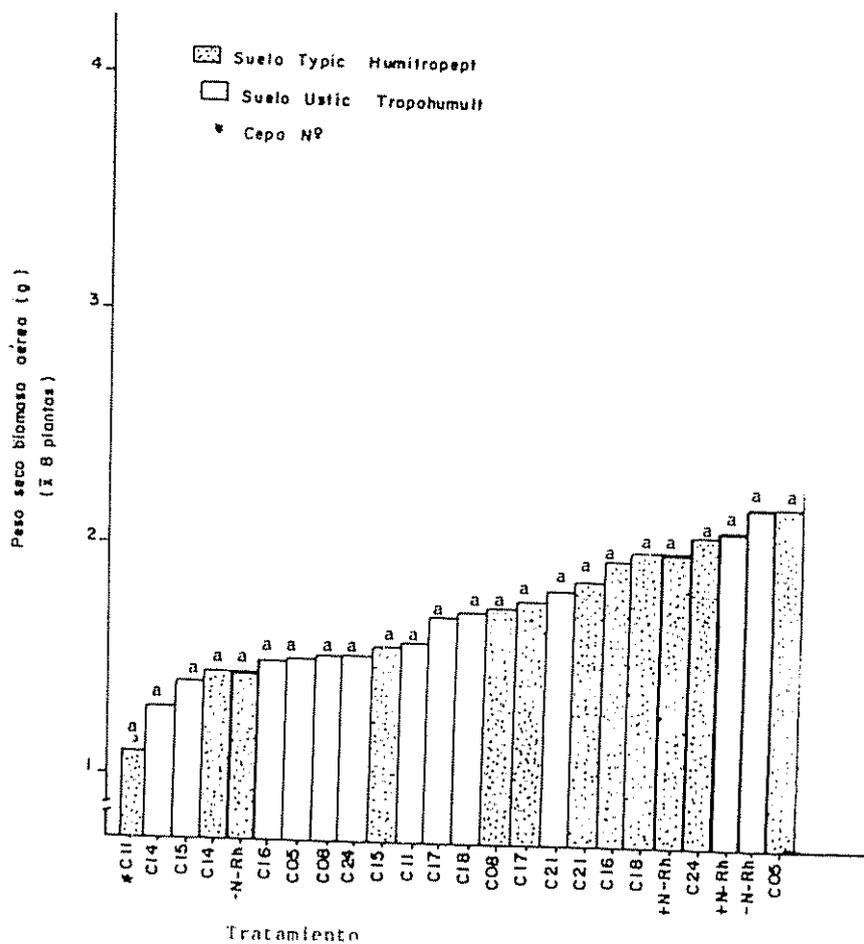


Fig. 4A. Peso seco de biomasa aérea de *Erythrina poeppigiana* (16 semanas edad) sembrada en bolsas con suelo (Typic Humitropept y Ustic Tropohumult) e inoculada con diferentes cepas de *Rhizobium* spp.

Tratamiento seguidos por la misma letra son estadísticamente iguales según Duncan ( $p < 0.05$ ).

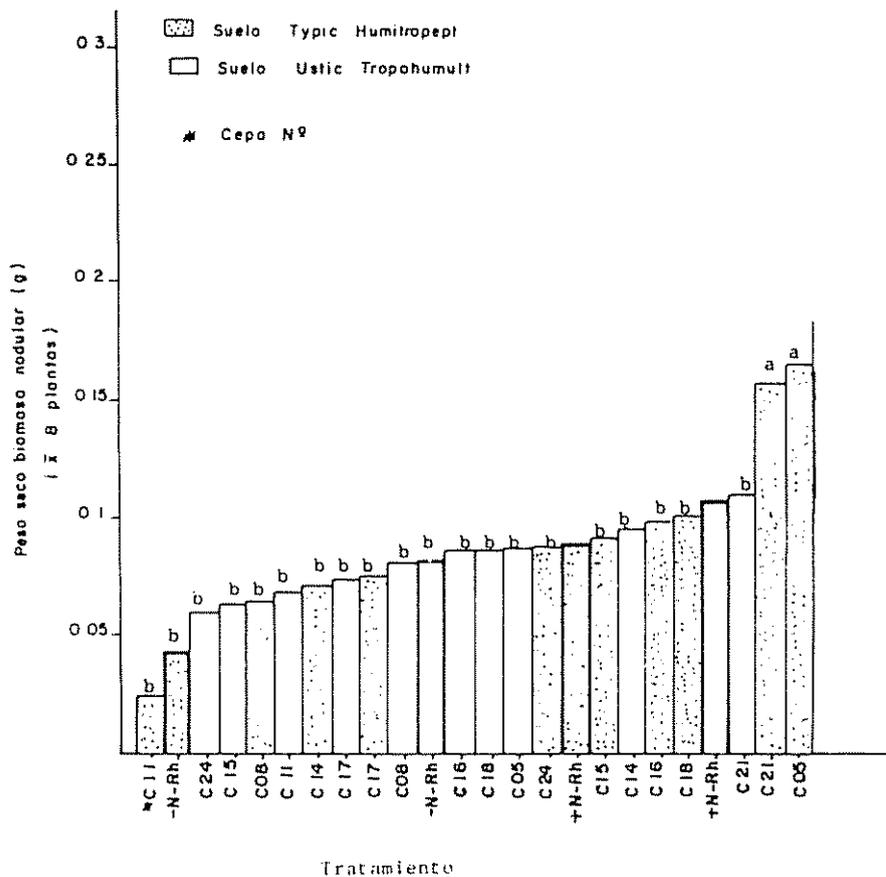


Fig. 5A. Peso seco de biomasa nodular de *Erythrina poeppigiana* (16 semanas edad) sembrada en bolsas con suelo (Typic Humitropept y Ustic Tropohumult) e inoculada con diferentes cepas de *Rhizobium* spp.

Tratamientos seguidos por la misma letra son estadísticamente iguales según Duncan ( $p < 0.05$ ).

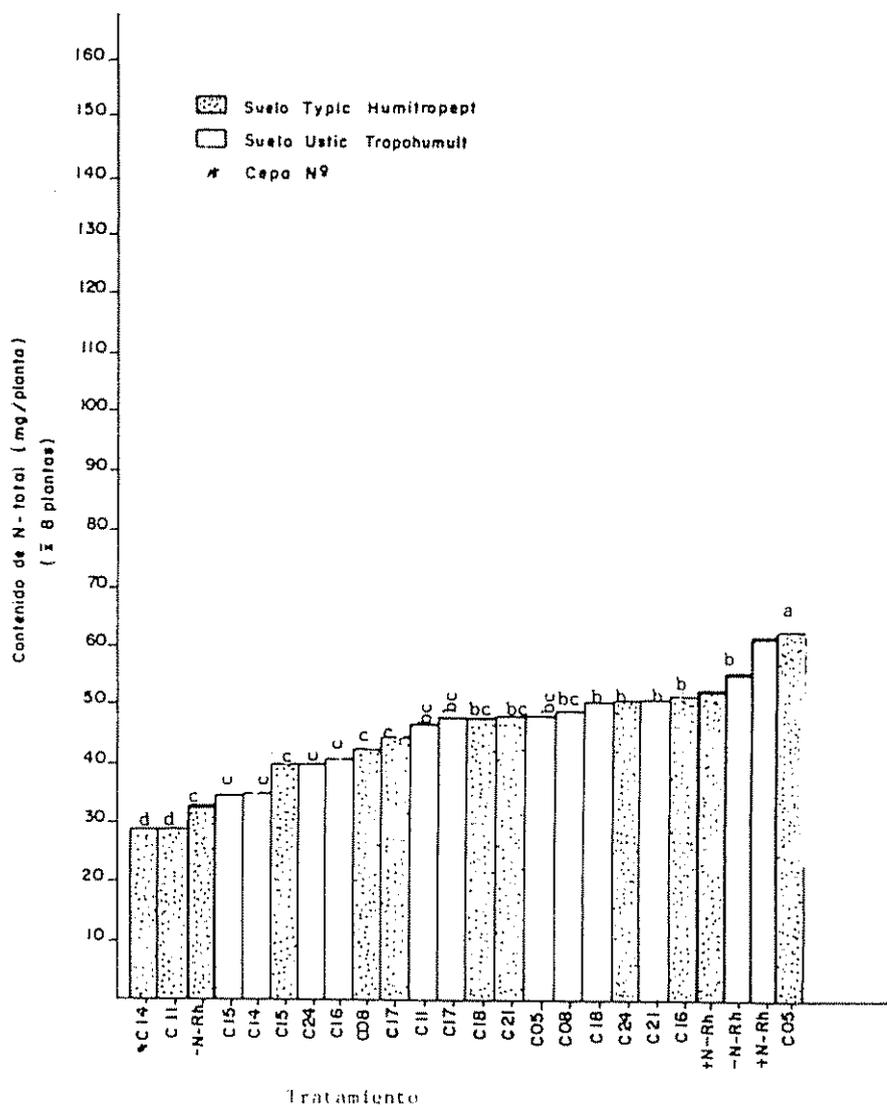


Fig. 6A Contenido de nitrógeno total de *Erythrina poeppigiana* (16 semanas edad) sembrada en bolsas con suelo (Typic Humitropept y Ustic Tropohumult) e inoculada con diferentes cepas de *Rhizobium* spp.

Tratamiento seguidos por la misma letra son estadísticamente iguales según Duncan ( $p < 0.05$ )