

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA
SUBDIRECCIÓN GENERAL ADJUNTA DE ENSEÑANZA
PROGRAMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INFLUENCIA DE LOS RIZOBIOS NATIVOS SOBRE LA RESPUESTA A LA
INOCULACIÓN DE LEGUMINOSAS TROPICALES

Tesis sometida a la consideración del Comité Técnico Académico del Programa de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, para optar al grado de

Magister Scientiae

Por

RAUL MEDINA MENDOZA

C A T I E

Turrialba, Costa Rica

1989

Esta tesis ha sido aceptada, en su presente forma, por la Coordinación del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales Renovables del CATIE, y aprobada por el Comité Asesor del estudiante como requisito parcial para optar el grado de:

MAGISTER SCIENTIAE

COMITE ASESOR:



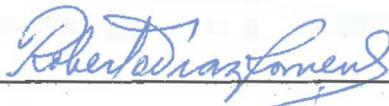
Profesor Consejero Carlos M. Ramirez M. Ph.D.



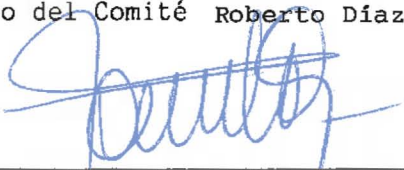
Miembro del Comité Carlos F. Burgos Ph.D.



Miembro del Comité Donald L. Kass Ph.D.



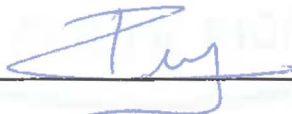
Miembro del Comité Roberto Díaz-Romeu Mag.Sc.



Ramón Lastra Rodríguez, Ph.D.
Coordinador, Programa de Estudios de Posgrado



Dr. José Luis Parisí
Subdirector General Adjunto de Enseñanza



Candidato Raúl Medina Mendoza

DEDICATORIA

A mis pequeños Miguel Angel, Nestor Gabriel y Raúl con monstruoso cariño.

A mis padres José y Antonia por su ejemplo y enseñanzas.

A mis hermanos Salvador, Maria Dolores, José Antonio, Eduardo, Ana Isabel y Susana con cariño.

A mi abuela Elena.

A mi chaparra Xinia Aguilar quien supo entender y atender mis preocupaciones e inquietudes en esta etapa, con invencible cariño.

RECONOCIMIENTO

Al Ph.D. Carlos Ramirez M. por la valiosa dirección de éste trabajo y por la amistad brindada, con su inacabable buen humor, con aprecio.

A los miembros del comité de tesis Ph.D. Carlos F. Burgos, Donald L. Kass y Mag.Sc. Roberto Díaz-Romeu, por sus enseñanzas como profesores y sus valiosas sugerencias.

Un agradecimiento muy especial al Mag. Sc. José Arze Bordas, por su inapreciable contribución que enriqueció grandemente el trabajo.

A las familias Villalobos-Luján, Musalem-Castillejos, Tewolde-Serrano, mexicanos incambiables, por brindarme su hospitalidad, su amistad y su apoyo, con eterno agradecimiento.

A los Ph.D. Eduardo Casas Díaz Nahum Marbán Mendoza por su amistad y apoyo brindado, con aprecio de paisanos.

A José Alfredo Dominguez, Juan Carlos Chacón, Osmar Vilas por su apoyo.

A Carmen Mendoza C. por su desinteresado apoyo.

Al personal del laboratorio de Microbiología del Centro de Investigaciones Agronómicas UCR especialmente a Gabriela Soto y Lidieth por el apoyo brindado.

Al personal del laboratorio de suelos, especialmente Gerardo Cedeño y Carlos Fernandez por su apoyo.

A Rigoberto y Quincho por su apoyo.

A Martha Nuñez, Floribeth Salguero, Rose Mary Garro, Maria Amable Rodriguez, Martha Gonzalez, Marlen Romero, Teresita Rojas, excelentes secretarias y mejores personas.

A Leda y Toño Mata, Lucrecia Salas por su amistad.

Al personal de producción de medios especialmente Domingo Loaiza; Emilio Ortiz, Miguel Cerdas, Francisco Solano, Elí Rodriguez y la siempre responsable Hilda Jiménez, mi eterno agradecimiento.

A Gerardo Martinez, dinámico administrativo en Posgrado y a Jeanette Solano, con aprecio.

Al Gobierno de Inglaterra a través de la Overseas Development Administration, cuyo financiamiento hizo posible mis estudios de posgrado.

Al Instituto Mexicano de Tecnología del Agua por el apoyo financiero otorgado, especialmente a los ingenieros Hector Garduño Vocal Ejecutivo del IMTA y Manuel Contijoch Escontria Coordinador del PRODERITH.

Al proyecto NIFTAL de la Universidad de Hawaii especialmente a Paul Singleton por todo el apoyo brindado.

A mi amigo Francisco Maldonado Tinajero, con aprecio.

A mis compañeros de estudio Agustín Castillo, Denis Salgado, Jorge Hurtado, Eugenia Hidalgo, Francisco Merino y Venacio Izaguirre por todos los momentos compartidos, con aprecio.

TOKANI

Tokani tlakatsin
melauak pil tlayokoltsin
kitoka sintli, kitoka etl
kintoka xochimej, kuatej
uan miak sekinok tlatoktli.

Tokani tlakatsin
kualtsin yaojtekatl,
ichikaualis ken se oselotsin
iakasotilis ken se kuajtsin;
kipia kualtsin itlajlamikilistlen ika tlachixtok
uan ueyi ichikaualis tlen ika motekipanotok.

Tokani tlakatsin
nohipa yolpaktok nemi,
ual mea ika kuikatl
uan kimakaua tonatij ika xochitl uan kuikatl.

Tokani tlakatsin
kikisi ken koyoltototl
kimati sitlalimej inin tlajtol
uan yolpaktok nemi iuaya tonana tlaltipaktli.

EL SEMBRADOR

El sembrador es un hombre sencillo,
modesto y humilde;
siembra maíz, siembra frijol;
siembra flores, árboles y plantas.

El sembrador es un guerrero,
tiene la fuerza de un jaguar
y la sagacidad del águila;
posee la inteligencia para vivir
y la fuerza para construir.

El sembrador es un hombre alegre,
se levanta cantando
y despide al sol con flores y cantos.

El sembrador es un gran soñador;
imita el canto del zentsontle
descifra el mensaje de las estrellas
y vive y convive con nuestra madre tierra.

J.A. Xocoyotsin

BIOGRAFIA

El autor nació en Guadalajara, capital del estado de Jalisco, en México.

Obtuvo el título de Ingeniero Agrónomo orientación suelos, en la Escuela de Agricultura de la Universidad de Guadalajara en el año de 1980.

Se desempeñó como investigador de apoyo en el Centro de Investigaciones para el Desarrollo Rural de 1980 a 1983.

En 1983 ingresó al Programa de Desarrollo Rural Integrado del Trópico Húmedo (PRODERITH), de donde fue jefe del departamento de suelos hasta antes de ingresar al CATIE.

El 16 de Septiembre de 1986 ingresó al Programa de Posgrado en Ciencias Agrícolas del CATIE y obtuvo el grado de Magister Scientiae, el 13 de Enero de 1989.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	xiii
SUMMARY	xv
LISTA DE CUADROS	xvii
LISTA DE FIGURAS	xxii
1. INTRODUCCION	1
2. REVISION DE LITERATURA	4
2.1 El ciclo del nitrógeno	4
2.1.1 Reacciones del elemento en el suelo	4
2.1.2 La fijación biológica del nitrógeno	5
2.1.3 Simbiosis Rhizobium-leguminosas	7
2.1.3.1 Factores bióticos limitantes de la simbiosis	9
2.1.3.1.1 Macrosimbionte: la planta	9
2.1.3.1.2 Microsimbionte: la bacteria Rhizobium	18
2.1.3.1.3 Efectos de microor- ganismos del suelo sobre la simbiosis	20
2.1.3.2 Factores abióticos limitantes de la simbiosis	28
2.1.3.2.1 Factores medioambientales	28
2.1.3.2.2 Factores nutrimentales	34
2.2 La inoculación de las leguminosas como estra- tegia para aumentar la producción	38
3. MATERIALES Y METODOS	41
3.1 Selección de los sitios	41
3.2 Caracterización de los sitios	42
3.2.1 Características fisicoquímicas de los suelos	43

3.3	Determinación del número más probable de los rizobios	43
3.3.1	Componente suelo	45
3.3.2	Componente planta	45
3.3.3	Componente bacterial	47
3.4	Ensayo de invernadero	48
3.4.1	Tratamientos y diseño experimental	48
3.4.2	Recolección del suelo y preparación del material experimental	50
3.4.3	Manejo del ensayo	50
3.4.4	Siembra	52
3.4.5	Cosecha	53
3.5	Experimentos de campo	54
3.5.1	Caracterización preliminar	54
3.5.2	Necesidades de cal y encalado de los suelos	54
3.5.3	Selección de especies leguminosas	55
3.5.4	Manejo de los experimentos	57
3.5.5	Inoculación de las semillas	58
3.5.6	Siembra	59
3.5.7	Control de plagas	60
3.5.8	Cosecha temprana	61
3.5.9	Cosecha final	61
3.5.10	Tratamientos y diseño experimental	62
3.6	Análisis estadístico de los datos	63
3.7	Tipificación serológica de los nódulos	63
4.	RESULTADOS	66
4.1	Caracterización de los sitios	66
4.1.1	Recuento de malezas	66
4.1.1.1	Experimento 1: sitio en barbecho.....	66
4.1.1.2	Experimento 2: sitio recientemente cultivado	68
4.1.1.3	Experimento 3: sitio en barbecho:.....	70
4.1.2	Descripción de perfiles típicos de los suelos	70
4.1.3	Características físicas de los suelos.....	73
4.1.3.1	Textura	73
4.1.3.2	Densidad aparente.....	73
4.1.3.3	Retención de humedad.....	75
4.1.4	Características químicas de los suelos	75

4.1.4.1	pH.....	75
4.1.4.2	Materia orgánica.....	76
4.1.4.3	Nitrógeno total.....	76
4.1.4.4	Nitrógeno NH ⁺ ₄	76
4.1.4.5	Nitrógeno NO ₃	76
4.1.4.6	Capacidad de intercambio ca- tiónica efectiva.....	77
4.1.4.7	Isoterma de sorción de fósforo.....	77
4.2	Determinación del número más probable de rizobios.....	78
4.2.1	Población nativa de rizobios en el sitio 1.....	78
4.2.2	Población nativa de rizobios en el sitio 2.....	78
4.2.3	Población nativa de rizobios en el sitio 3.....	80
4.2.4	Recuento en plato vs. técnica de infec- ción de plantas.....	80
4.3	Análisis estadístico de los datos.....	82
4.4	Ensayo de invernadero.....	82
4.4.1	Materia seca y contenido de nitrógeno total en biomasa aérea.....	92
4.4.2	Número y peso seco de nódulos.....	96
4.4.3	Efectividad de las cepas nativas.....	99
4.5	Experimento de Campo 1.....	99
4.5.1	Materia seca y contenido de nitrógeno total en biomasa aérea.....	99
4.5.2	Número y peso seco de nódulos.....	103
4.5.3	Rendimiento en grano.....	106
4.6	Experimento de campo 2.....	108
4.6.1	Materia seca y contenido de nitrógeno total en biomasa aérea.....	108
4.6.2	Número y peso seco de nódulos.....	114
4.6.3	Rendimiento en grano.....	114
4.7	Experimento de campo 3.....	117
4.7.1	Materia seca y contenido de nitrógeno total en biomasa aérea.....	117
4.7.2	Número y peso seco de nódulos.....	120
4.7.3	Rendimiento en grano.....	124
4.8	Tipificación serológica de los nódulos.....	127

5. DISCUSION	132
5.1 Caracterización de los sitios	132
5.1.1 Recuento y caracterización de malezas	132
5.1.2 Poblaciones nativas de rizobios	135
5.1.3 Correlación entre recuento en plato y técnica de infección de plantas	139
5.2 Respuesta a la inoculación bajo condiciones controladas	140
5.2.1 Efectividad de las cepas nativas y ocupación de los nódulos	144
5.3 Respuesta a la inoculación bajo condiciones de campo	147
5.4 Análisis estadístico de los datos	152
5.5 Modelos de regresión	152
6. CONCLUSIONES	156
7. RECOMENDACIONES	158
8. BIBLIOGRAFIA	159
9. APENDICE	172

MEDINA, R. M. 1989. Influencia de los rizobios nativos sobre la respuesta a la inoculación de leguminosas tropicales. Tesis Mag. Sc., Turrialba, Costa Rica, CATIE. 184 p.

Palabras clave: Fijación de nitrógeno, rizobios nativos tropicales, modelos, *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris*, *Phaseolus lunatus*, *Cicer arietinum*, *Lens culinaris*,

RESUMEN

Para evaluar el posible efecto de rizobios nativos sobre la respuesta a la inoculación de algunas leguminosas tropicales, fue llevado a cabo cuatro ensayos, uno bajo condiciones de invernadero y tres bajo condiciones de campo, en el CATIE, Turrialba, Costa Rica. Los suelos en los tres sitios elegidos correspondieron a un Humitropept típico fino haloisítico isohipertérmico. Dos de los sitios se encontraban en barbecho y el otro bajo cultivación intensiva incluyendo frijol y maíz. Con antelación a los ensayos las poblaciones nativas de rizobios fueron caracterizadas en función de su número, diversidad y efectividad por medio de la técnica del número más probable (NMP) utilizando diversas plantas trampa (12). Así mismo se hizo una caracterización detallada de la población de malezas. Se utilizó cinco especies leguminosas en los experimentos: *Glycine max* (soya), *Phaseolus vulgaris* (frijol común), *P. lunatus* (frijol lima), *Cicer arietinum* (garbanzo) y *Lens culinaris* (lenteja). Las especies fueron seleccionadas basándose en el número contrastante de rizobios indígenas. Los ensayos fueron realizados con fertilidad mejorada. La respuesta a la inoculación, evaluada en términos de producción de materia seca, contenido de nitrógeno total, nodulación y rendimiento en grano, fue variable entre sitios y especies. La respuesta temprana a la inoculación, pareció estar relacionada al

número de rizobios nativos y la respuesta, cuando existió, no se mantuvo hasta la cosecha, aparentemente debido a factores limitantes u otros mecanismos compensatorios del hospedero no claramente entendidos. El frijol común, frijol lima y garbanzo para los cuales había una alta población de rizobios en el suelo, fueron las especies que no mostraron respuesta positiva a la inoculación. Por el contrario la soya y la lenteja mostraron una clara respuesta a la inoculación paralelamente con bajos números de rizobios nativos. Los datos obtenidos fueron usados para correr varios modelos de regresión (15) que relacionaron la respuesta a la inoculación al número de rizobios nativos. El modelo que mejor ajustó los parámetros evaluados con la población nativa de rizobios fue de tipo hiperbólico. La historia reciente de cultivación y/o el manejo del suelo influyó la composición de malezas, la cual a su vez pudo haber influenciado la composición de las poblaciones indígenas de rizobios. Así, las poblaciones nativas de rizobios parecen influenciar negativamente la respuesta a la inoculación de leguminosas tropicales. Esto sugiere que deben emprenderse nuevos enfoques en la tecnología de fijación de nitrógeno, para superar esta importante restricción ecológica.

MEDINA, R. M. 1989. Influence of indigenous rhizobia on the response to inoculation of tropical legumes. Thesis, Mag. Sc., Turrialba, Costa Rica. 184 pp.

Key words: Nitrogen fixation, tropical indigenous rhizobia, models, inoculation, *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris*, *Phaseolus lunatus*, *Cicer arietinum*, *Lens culinaris*.

SUMMARY

In order to evaluate the possible effect of native rhizobia on the response to inoculation of some tropical legumes, four trials were run, one under greenhouse conditions and three under field conditions, in Turrialba, Costa Rica. Soils at the chosen three sites corresponded to a Typic Humitropept Fine Halloysitic Isohypertermic. Two of the sites were under fallow and the other one under intensive cultivation, including beans and maize. Previous to the trial, the indigenous population was characterized in number, host range and effectiveness. The most probable number counting technique was used in conjunction with different trap legumes (12). Also a detailed characterization of the weed population was conducted. Five legumes species were used in the trials, namely *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris*, *P. lunatus*, *Cicer arietinum* and *Lens culinaris*. Species were selected based on the contrasting number of indigenous rhizobia. All trials were conducted under improved fertility status. The response to inoculation measured in shoot dry weight, N content, nodulation and yield, varied between sites and species. Early inoculation response appeared to be related to the number of indigenous rhizobia, this response, however did not hold until harvest apparently to limiting factors or other host compensatory factors not clearly understood. Common beans, lima beans and chick pea rhizobia were in high

number in all the sites, no response to inoculation was observed. On the contrary, for soybeans, and lentils there was a clear response to inoculation which paralleled low numbers of indigenous rhizobia. Data obtained was used to run different models (15) that related inoculation response to the number of indigenous rhizobia. An hyperbolic model was the one that more closely correlated measured parameters with actual numbers of bacteria in the soil. Recent crop history and or/ soil management influenced weed composition which in turn may have influenced the composition of the indigenous population. Thus the indigenous population appear to negatively influence the response to inoculation of tropical legumes. This suggest that new approaches in Nitrogen fixation technology must be taken in order to overcome this important ecological constraint.

LISTA DE CUADROS

En el texto

Cuadro No.	Página	
1.	Metodología de los análisis físico-químicos de los suelos utilizados en el estudio. Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica.....	44
2.	Composición florística de malezas en el sitio 1, Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica.....	67
3.	Composición florística de malezas en sitio 2 (lote No.7), Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica.....	69
4.	Composición florística de malezas en sitio 3 (lote No.1), Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica.....	71
5.	Características físico-químicas de los suelos de sitios estudiados, Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica.....	74
6.	Recuento de rizobios nativos en los tres sitios estudiados, Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica.....	79
7.	Comparación de la técnica de infección de plantas mediante el procedimiento de número más probable y el recuento en plato.....	81
8.	Análisis de varianza del contenido de N total (mg/planta) de las diferentes leguminosas crecidas en invernadero.	84
9.	Análisis de varianza de la producción de materia seca (g/planta) de las diferentes leguminosas crecidas en invernadero.	84

10.	Análisis de varianza del número de nódulos (número/planta) producidos por las diferentes leguminosas cre- cidas en invernadero.	85
11.	Análisis de varianza del peso seco de nódulos (mg/planta) producidos por las diferentes leguminosas cre- cidas en invernadero	85
12.	Análisis de varianza del contenido de N total (mg/planta) de las dife- rentes leguminosas crecidas en el experimento de campo 1.	86
13.	Análisis de varianza de la produc- ción de materia seca (g/planta) de las diferentes leguminosas crecidas en el experimento de campo 1.	86
14.	Análisis de varianza del número de nódulos (número/planta) producidos por las diferentes leguminosas cre- cidas en el experimento de campo 1 ...	87
15.	Análisis de varianza del peso seco de nódulos (mg/planta) producidos por las diferentes leguminosas cre- cidas en el experimento de campo 1 ...	87
16.	Análisis de varianza del contenido de N total (mg/planta) de las dife- rentes leguminosas crecidas en el experimento de campo 2.	88
17.	Análisis de varianza de la produc- ción de materia seca (g/planta) de las diferentes leguminosas crecidas en el experimento de campo 2	88
18.	Análisis de varianza del número de nódulos (número/planta) producidos por las diferentes leguminosas cre- cidas en el experimento de campo 2 ...	89
19.	Análisis de varianza del peso seco de nódulos (mg/planta) producidos por las diferentes leguminosas cre- cidas en el experimento de campo 2 ...	89
20.	Análisis de varianza del contenido de N total (mg/planta) de las dife- rentes leguminosas crecidas en el experimento de campo 3.	90

21.	Análisis de varianza de la producción de materia seca (g/planta) de las diferentes leguminosas crecidas en el experimento de campo 3.	90
22.	Análisis de varianza del número de nódulos (número/planta) producidos por las diferentes leguminosas crecidas en el experimento de campo 3 ...	91
23.	Análisis de varianza del peso seco de nódulos (mg/planta) producidos por las diferentes leguminosas crecidas en el experimento de campo 3 ...	91
24.	Respuesta a la inoculación de especies de leguminosas bajo condiciones de invernadero, CATIE, Turrialba, Costa Rica.....	93
25.	Respuesta a la inoculación (nodulación) de especies de leguminosas bajo condiciones de invernadero, CATIE, Turrialba, Costa Rica.....	97
26.	Respuesta a la inoculación de diversas leguminosas, sitio 1 (lote No.6), Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica.....	100
27.	Respuesta a la inoculación (nodulación) de especies de leguminosas bajo condiciones de campo, sitio 1 (lote No.6), Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica.....	104
28.	Respuesta a la inoculación (rendimiento en grano) de especies de leguminosas bajo condiciones de campo sitio 1 (lote No.6), Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica.....	107
29.	Respuesta a la inoculación de diversas leguminosas, sitio 2 (lote No.7), Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica.....	109

30.	Respuesta a la inoculación (nodulación) de especies de leguminosas bajo condiciones de campo, sitio 2 (lote No.7). Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica.....	112
31.	Respuesta a la inoculación (rendimiento en grano) de especies de leguminosas bajo condiciones de campo sitio 2 (lote No.7), Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica.....	115
32.	Respuesta a la inoculación de diversas leguminosas, sitio 3 (lote No.1), Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica.....	118
33.	Respuesta a la inoculación (nodulación) de especies de leguminosas bajo condiciones de campo sitio 3 (lote No.1), Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica.....	121
34.	Respuesta a la inoculación (rendimiento en grano) de especies de leguminosas bajo condiciones de campo, sitio 3 (lote No.1), Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica.....	125
35.	Modelos de regresión ajustados con los datos de todos los experimentos (1 invernadero y tres de campo) CATIE, Turrialba, Costa Rica.....	128
36.	Modelos de regresión que describen el incremento en rendimiento de algunas variables en relación con la población nativa de rizobios en la Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba Costa Rica (hiperbólico).....	130

APENDICE DE CUADROS

Cuadro No.	Página
1.	173
<p>Solucion nutritiva libre de nitro- geno utilizada en el recuento del numero mas probable de rizobios nativos.....</p>	
2.	174
<p>Número de rizobios estimados por el recuento de infección de plantas (NMP) tomado de Vincent, J. 1970. (Datos para series de cuatro dilu- ciones)</p>	
3.	175
<p>Descripción del perfil represen- tivo de la serie "Instituto". Sitio 3, Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica</p>	
4.	176
<p>Descripción del perfil represen- tativo de la serie "Instituto", fase pedregosa, Sitio 3, Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica</p>	

LISTA DE FIGURAS

En el texto

Figura No.		Página
1.	Vía fotosintética de las malezas encontradas en los sitios de campo 1, 2 y 3 (lotes 6, 7 y 1), Estación Experimental "La Montaña" CATIE, Turrialba, Costa Rica	72
2.	Respuesta a la inoculación de diversas leguminosas crecidas en invernadero en macetas con suelo del sitio 1 (lote No.6). Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica	94
3.	Respuesta a la inoculación (nodulación) de leguminosas crecidas en invernadero en macetas con suelo del sitio 1 (lote No.6). Estación Experimental "La Montaña" CATIE, Turrialba, Costa Rica	98
4.	Respuesta a la inoculación de leguminosas crecidas bajo condiciones de campo sitio 1 (lote No.6). Estación Experimental "La Montaña" CATIE, Turrialba, Costa Rica	101
5.	Respuesta a la inoculación (nodulación) de leguminosas crecidas bajo condiciones de campo, sitio 1 (lote No.6), Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica.....	105
6.	Respuesta a la inoculación de leguminosas crecidas bajo condiciones de campo, sitio 1 (arriba) y sitio 2 (abajo). Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica.....	110
7.	Respuesta a la inoculación de leguminosas crecidas bajo condiciones de campo, sitio 2 (lote No.7), Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica	113

8.	Respuesta a la inoculación de leguminosas crecidas bajo condiciones de campo sitio 2 (lote No.7), Estación Experimental "La Montaña" CATIE, Turrialba, Costa Rica.....	116
9.	Respuesta a la inoculación de leguminosas crecidas bajo condiciones de campo sitio 3 (lote No.1), Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica.....	119
10.	Respuesta a la inoculación (nodulación) de leguminosas crecidas bajo condiciones de campo sitio 3 (lote No.1). Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica.....	122
11.	Respuesta a la inoculación (rendimiento en grano) de leguminosas crecidas bajo condiciones de campo, sitio 3 (lote No.1), Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica	126
12.	Gráfico del modelo de regresión exponencial negativo que muestra el comportamiento de las especies leguminosas en todos los experimentos en relación con la respuesta a la inoculación en competencia con rizobios nativos, CATIE, Turrialba, C.R.....	129
13.	Gráfico del modelo de regresión hiperbólico que muestra el comportamiento de especies leguminosas en relación con la respuesta a la inoculación en competencia con rizobios nativos, CATIE, Turrialba, Costa Rica.....	131

ANEXO DE FIGURAS

Figura No.		Página
1	Procedimiento utilizado para determinar el número más probable (NMP) de rizobios mediante el recuento en planta	177
2	Esquema de la metodología de dilución e inoculación de plantas para el recuento de rizobios nativos mediante la técnica del número más probable (Brockwell, H., 1982).	178
3	Curva de necesidad de cal, suelo Humitropept típico, Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica	179
4	Isoterma de sorción de fósforo suelo del sitio 1 (lote No.6) Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica	180
5	Diagrama de campo Experimento 1 (lote No.6), Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica	181
6.	Diagrama de campo experimento 2 (lote No.7), Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica	182
7.	Diagrama de campo experimento 3 (lote No.1), Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica.	183
8	Diagrama muestreo de las subparcelas ensayos de campo de respuesta a la inoculación de leguminosas, sitios 1, 2 y 3. Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica	184

1.-INTRODUCCION

El nitrógeno es un elemento fundamental para todos los seres vivos, pues forma parte de los ácidos nucleicos, las proteínas y la clorofila. Ningún organismo sea bacteria, hongo, planta o animal puede crecer y desarrollarse bien en ausencia de este elemento. El nitrógeno es suplido a los mismos en diferentes formas químicas: inorgánicas (bacterias, hongos , plantas) y orgánicas (animales).

El nitrógeno abunda sobre la tierra pues el 80% del volumen de gases de la atmósfera está constituido por N_2 molecular, forma muy estable y no disponible sino para un pequeño grupo de microorganismos. El nitrógeno fijo (NO_3^- o NH_4^+) disponible para las plantas, suele ser sin embargo limitante en la mayoría de los suelos y por lo tanto constituye un factor de importancia que limita la producción de los cultivos.

El nitrógeno disponible llega al suelo con la lluvia, los fertilizantes y la fijación biológica del dinitrógeno atmosférico. La precipitación aporta al suelo cantidades insuficientes de este elemento, que no inciden de manera importante en la productividad de los cultivos. El uso de fertilizantes nitrogenados, por otro lado, es una práctica agrícola efectiva para aumentar la producción de los cultivos. Sin embargo a la misma se le puede apuntar algunos inconvenientes, tales como: el pequeño agricultor por falta de recursos no los usa; su fabricación tiene un alto costo energético, así como en el transporte y aplicación; causa contaminación de las aguas (NO_3^-) y de la atmosfera (N_2O). En suelos agrícolas, el proceso de fijación biológica del nitrógeno, especialmente

la asociación simbiótica entre leguminosas y *Rhizobium*, sí aporta cantidades significativas del elemento. Así, el proceso de fijación simbiótica del dinitrógeno atmosférico contribuye de manera importante a reducir las necesidades de fertilizante nitrogenado, como estrategia para aumentar la producción, al menos en algunos cultivos como la soya (*Glycine max*) y en gramíneas cuando éstas se siembran en rotación con las leguminosas fijadoras.

Los rangos de las cantidades de N_2 fijados por las plantas leguminosas, varían desde $50 \text{ kg ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ para algunas leguminosas anuales como el maní (*Arachis hypogaea*), hasta varios cientos de $\text{kg ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ para algunas leguminosas forrajeras en medio ambientes favorables (Burns, R. y Hardy, R. 1975). Es por ello que en los sistemas de producción agrícola, es atractivo incluir, o en su caso, incrementar, la utilización de leguminosas fijadoras de nitrógeno como fuente de proteína para consumo humano y animal, así como para mantener la fertilidad de los suelos. Una de las estrategias para alcanzar este objetivo es mejorando la simbiosis *Rhizobium*-leguminosas, práctica a la cual se dedica actualmente grandes esfuerzos.

Uno de los métodos empleados para mejorar la simbiosis, consiste en inocular las semillas de leguminosas con cepas especialmente seleccionadas por su mayor eficiencia en la fijación del N_2 . Esta práctica es sencilla y considerablemente más barata que la aplicación de fertilizantes. Desafortunadamente en algunas ocasiones, la inoculación no va seguida de una respuesta positiva en crecimiento y producción, debido en gran medida al problema de competencia con cepas nativas. Para

poder predecir la respuesta a la inoculación en algún sitio en particular, es necesario comprender mejor las interacciones que ocurren entre las cepas inoculadas y las cepas indígenas. El presente trabajo de investigación se enmarcó en esta problemática, planteando la hipótesis de que el porcentaje de incremento tanto en biomasa, contenido de nitrógeno, nodulación y rendimiento en grano, estarían en función del número, diversidad como efectividad de las cepas indígenas de rizobios.

Con base en lo anterior se plantearon los siguientes objetivos:

1.- Identificar las características específicas de las poblaciones nativas de *Rhizobium*, que afectan la respuesta a la inoculación de leguminosas en estos suelos.

2.- Contribuir con la información generada en la creación de un modelo predictivo de respuesta a la inoculación, el cual pueda ser usado para ayudar a los productores a decidir el uso de inoculantes en cultivos leguminosos.

2.- REVISION DE LITERATURA

2.1 El ciclo del nitrógeno

2.1.1. Reacciones del nitrógeno en el suelo

El nitrógeno es uno de los elementos más dinámicos en la naturaleza y está sujeto a una gran cantidad de cambios, procesos y transformaciones que lo llevan desde la forma inerte atmosférica (N_2) hasta el humus del suelo y posteriormente por mineralización va a formas inorgánicas que pueden regresar a la atmosfera. Esta serie de cambios, que encierran pérdidas y ganancias del elemento en el suelo, constituyen el "ciclo del nitrógeno".

Este ciclo es de singular importancia para el hombre especialmente en relación con la producción de alimentos, debido a que su disponibilidad limita la fertilidad en vastas áreas del mundo, los científicos del suelo han dirigido su atención hacia la disponibilidad del elemento y hacia los medios para proveerlo, de tal suerte que supla la pequeña cantidad disponible en la mayoría de los suelos (Alexander, M. 1972).

La poca cantidad de nitrógeno en el suelo puede deberse a pérdidas por varios mecanismos: remoción por la cubierta vegetal para satisfacer la demanda nutrimental, volatilización, desnitrificación y lixiviación. Estas pérdidas pueden ser equilibradas en parte por la adición de fertilizantes, por el retorno al suelo de los residuos vegetales o animales, por la fijación del N_2 atmosférico y más recientemente a

través de la influencia de la contaminación (Graham, P. 1972). El proceso que retorna la mayor cantidad del elemento a los ecosistemas terrestres es la fijación del dinitrógeno atmosférico, por lo cual constituye el factor más importante dentro del ciclo del nitrógeno. Por su importancia agronómica y ecológica enseguida se revisa este proceso.

2.1.2 La fijación biológica del nitrógeno

La fijación biológica del nitrógeno es la reducción del N_2 para producir amonio (NH_4^+) el cual es luego aprovechado en la síntesis de aminoácidos y luego en la de otros productos nitrogenados, que son utilizados por los seres vivos en la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos (Mora, N. de 1983). El total de nitrógeno fijado se ha estimado en 265×10^6 Ton año⁻¹ (Burns, R. y Hardy, R. 1975).

El proceso puede ocurrir también abiológicamente en forma natural por descargas eléctricas, combustión y ozonización, para los cuales se ha estimado en conjunto 30×10^6 Ton año⁻¹; también existe la fijación artificial (proceso industrial Haber-Bosch) para el cual se ha estimado un monto de 60×10^6 Ton año⁻¹ (Burns, R. y Hardy, R. 1975). Este proceso industrial requiere de condiciones de alta temperatura y presión, que demanda gran cantidad de energía y resulta, por esta razón costoso, pues ésta proviene de combustibles fósiles cada vez más escasos. Las limitaciones económicas y los problemas ecológicos cada vez más agudizados debido al uso de los fertilizantes nitrogenados, han

estimulado el interés por la fijación biológica del dinitrógeno atmosférico.

Este proceso es una propiedad única, que poseen sólo unos pocos generos de microorganismos , los cuales contienen la información genética para sintetizar la enzima nitrogenasa. Esta enzima cataliza la conversión del N_2 a NH_3^+ bajo condiciones de presión y temperatura normales, y la energía necesaria para ello proviene directamente de la fotosíntesis.

Los microorganismos que poseen la habilidad para fijar N_2 incluyen bacterias y algas azul-verdes (cianobacterias). Estos organismos pueden ser de vida libre o formar asociaciones de beneficio mutuo con plantas superiores (Havelka, U. et al 1982). El nitrógeno fijado biológicamente ha sido estimado en 175×10^6 Ton año⁻¹ (Burns, R. y Hardy, R. 1975); sin embargo estimaciones más bajas han sido mencionadas, por un monto de 122×10^6 (Burris, R. 1980).

La importancia agronómica de este proceso considerado como uno de los fundamentales que ocurren en la naturaleza es enorme. Para objetivizar esta afirmación, basta decir que Martínez, R. (1986) calculó que, junto con los productos agrícolas, se extraen anualmente 100×10^6 Ton de nitrógeno de la superficie terrestre, mientras que el devuelto por los fertilizantes alcanza solo una mínima parte del que se pierde. Si la fijación biológica del dinitrógeno atmosférico no se hubiera realizado continuamente en el transcurso de la explotación agrícola durante milenios, los suelos agrícolas habrían perdido su capacidad de producir desde hace ya mucho tiempo.

2.1.3 Simbiosis Rhizobium-leguminosas

Esta constituye la asociación más elaborada y eficiente entre plantas y bacterias y, por esta razón, ha sido la más estudiada hasta el momento.

- . La fijación del dinitrógeno atmosférico por esta simbiosis es un proceso integrado, en el cual la planta hospedero (macrosimbionte) abastece a la bacteria (microsimbionte) con carbohidratos como fuente de energía y la bacteria a su vez, suministra a la planta el N_2 reducido, el cual es usado primero en la síntesis de aminoácidos, ureídos y amidas y luego en proteínas de la planta (Mora, N. de 1983; Havelka, U. 1982). El monto estimado por esta fijación simbiótica es de 70×10^6 Ton año⁻¹ o sea el 40 por ciento del total de nitrógeno fijado biológicamente cada año (Burns, R. y Hardy, R. 1975).

El establecimiento de esta simbiosis ocurre como resultado de una serie de procesos aparentemente específicos, en los cuales deben intervenir factores genéticos y químicos, tanto de parte de la bacteria como de la planta. Schmidt, E. (1978) menciona que en este reconocimiento mutuo, la raíz de la leguminosa dada reconoce, no solo entre todas las otras bacterias del suelo, sino inclusive otros rizobios vecinos, al tipo de rizobio homólogo y a su vez el rizobio reconoce las señales químicas propias de la raíz de leguminosas a las demás raíces que puedan encontrarse en las proximidades.

Las bacterias que intervienen en el proceso pueden ser infectivas (forman nódulos) y no fijar nitrógeno (inefectivas), o pueden establecer el sistema completo hasta la fijación del dinitrógeno atmosférico en grado alto (eficientes) o en grado bajo (ineficientes). Si la leguminosa se asocia con el rizobio que le sea genéticamente compatible y si la cepa bacteriana es efectiva, la planta recibirá el beneficio de la fijación del nitrógeno (Mora, N. de 1983), si las condiciones ambientales (suelo, clima) son adecuadas.

Los beneficios directos del proceso de fijación simbiótica se derivan de los múltiples usos de las numerosas leguminosas fijadoras ya sea como alimento para humanos (granos), o para animales (forrajes), abonos verdes, maderas, aceites, gomas, colorantes y resinas. Algunas leguminosas se emplean como coberturas y otras como árboles ornamentales y de sombrío (Gomez, A. y Zandstra, H. 1976).

Los beneficios indirectos se derivan del empleo de las leguminosas en cultivos mixtos, por ejemplo pasturas y cultivos asociados, como el tradicionalmente usado en América Latina de maíz y frijol. Otros beneficios indirectos se obtienen cuando las leguminosas o sus residuos se mineralizan en el suelo, contribuyendo así al nitrógeno disponible y reduciendo de esta forma la necesidad de fertilizantes para el cultivo asociado o para un cultivo posterior (Halliday, J. 1981).

La fijación de nitrógeno tal como ocurre en los nódulos de las leguminosas es un proceso que consume mucha energía y por tanto dependiente en última instancia de la fotosíntesis. De esta manera los

factores que controlan las tasas de la misma y/o la distribución de los fotosintatos en la planta, afectan significativamente la fijación del N_2 . Esos factores que se discuten abajo pueden ser bióticos y abióticos.

2.1.3.1 Factores bióticos limitantes de la simbiosis

Estos se refieren tanto a las características propias de los simbioses (planta y bacteria), como a las interacciones entre ambos, así como a la acción de otros microorganismos, incluyendo los propios rizobios, sobre la simbiosis en alguna de sus etapas.

2.1.3.1.1 Macrosimbionte: la planta

De acuerdo con Graham, P. (1982) se pueden agrupar en tres los factores del hospedero, que afectan la fijación simbiótica del N_2 : iniciación, desarrollo y funcionamiento del nódulo, aunque en la práctica es muy difícil mantener este agrupamiento para analizarlos, pues los procesos que desembocan en la fijación del N_2 atmosférico, son una secuencia de pasos los cuales se enlistan a continuación: quimiotaxis de los rizobios, multiplicación de los mismos en la rizosfera; acercamiento a la raíz; unión de los simbioses; reconocimiento de los asociados; penetración o preinfección de los rizobios al pelo radical; encurvamiento del pelo radical; crecimiento del hilo infectivo; estímulo meristemático en la raíz del pelo radical; infección de las células de la corteza; las dos últimas etapas son la inducción de crecimiento

meristemático local en la corteza radical (desarrollo de los nódulos) y el funcionamiento de los mismos.

En las primeras etapas juega un papel aparentemente importante las secreciones del hospedero. Entre las sustancias que pueden jugar un papel en el reconocimiento están las lectinas o fitohemoaglutininas presentes en las raíces de las leguminosas, las que podrían interactuar específicamente con un polisacárido distintivo sobre la superficie de la célula de los rizobios, como un prelude a la nodulación. De esta manera la lectina establecería el vínculo entre las bacterias y la superficie del pelo radical, superficies que tendrían determinantes antigénicos similares. Esta teoría fue desarrollada en 1973 por Hamblin, J. y Kent, S. los que encontraron que los eritrocitos de la sangre se ligaban a los pelos radicales, proceso que atribuyeron a la producción de fitohemoaglutininas o lectinas, presentes también en las semillas de las leguminosas. Bohlool, B. y Schmidt, E. (1974) estudiaron la interacción *Glycine max-Bradyrhizobium japonicum* buscando el papel que juegan estas lectinas en la especificidad hospedero-rizobio y encontraron que existe un antígeno común entre ellos; estos mismos investigadores formalizaron la hipótesis de reconocimiento enunciada un año antes. Posteriormente Bhuvaneswari, et al (1977) confirmaron esas observaciones utilizando una lectina de soya marcada con isotiocianato de fluoresceína. Más recientemente Robert, F. y Schmidt, E. (1985) hicieron una comparación de la actividad lectina-enlace con dos cepas de *B. japonicum* encontrando resultados similares a los anteriores.

Sin embargo, la mayor cantidad de estudios se han dedicado principalmente a la interacción *Rhizobium leguminosarum biovar trifolii*-*Trifolium* sp. (trébol). Así, en 1975 Hubbell, H. y Dazzo, F. encontraron un polisacárido único en *Rhizobium* que fue reactivo antigénicamente con un componente sobre las células epidermiales incluyendo pelos radicales del trébol. En 1978 Dazzo, F. Yanke, W. y Brill, W. purificaron y caracterizaron la lectina del trébol denominandola "trifoliin", que reacciona cruzadamente con el polisacárido bacterial y la superficie de las células epidermiales.

Sin embargo, a pesar de la evidencia experimental acumulada, sobre todo en la asociación arriba mencionada en la actualidad existe controversia sobre si este mecanismo de reconocimiento es generalizable a todas las asociaciones *Rhizobium*-leguminosa. Algunos de sus eventos no están claramente definidos y parece que la interacción entre las lectinas y los rizobios no son las únicas responsables de la especificidad. La principal controversia concierne, a la naturaleza del carbohidrato receptor de la lectina sobre las células del *Rhizobium*; estos receptores fueron identificados como polisacárido celular (Dazzo, F. y Hubbell, H. 1975; Dazzo, F. et al 1988), lipopolisacárido (Wolpert, J. y Albersheim, P. 1976) o un glicano (Planqué, y Kijne, 1977).

Enseguida se presentará una breve reseña de las etapas de desarrollo y funcionamiento del nódulo, para después retomar los primeros eventos que es donde mayor influencia tiene la planta hospedero para limitar la simbiosis.

Así, después del reconocimiento de los simbioses la preinfección o penetración de las bacterias a la planta ocurre normalmente por los pelos radicales o en lesiones de otras células de la raíz de las leguminosas, por su correspondiente especie de *Rhizobium*. Si ésta ocurre a través de los pelos radicales el primer signo parece ser el encurvamiento de los mismos después de que la infección se haya iniciado y antes de la aparición del hilo infectivo. El ácido indolacético producido por la bacteria unida al pelo radical y formado por la oxidación microbiana del triptofano parece ser uno de los responsables del encurvamiento del pelo (Hubbell, D. 1970), aunque puede ocurrir infección sin encurvamiento del pelo (Nutman, 1959). Por su parte Hubbell, D. y Bauer, (1981) consideraron también la función de las enzimas pectolíticas tales como pectinasas, unicelulasas y celulasas, producidas por el *Rhizobium*, las cuales ablandarían la pared celular haciéndola más susceptible al ataque de los rizobios. Martínez-Molina, E. et al (1979), demostraron la acción de las enzimas pectolíticas producidas por el *R. leg. Bvr. meliloti* en la nodulación. Higashi, y Abe,, (1980) describieron la presencia de un compuesto de bajo peso molecular no identificado, en el espacio periplásmico del *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. Este compuesto promovió la infección cuando se aplicó en el inóculo. La entrada de las bacterias al pelo radical puede ocurrir por un proceso de invaginación, pues la bacteria penetra en la pared celular e induce a la pared más interna (plasmolema) a crecer hacia adentro, iniciándose así el hilo de infección dentro del cual están las bacterias. Por otro lado Callahan, D. y Torrey, J. (1981) han propuesto que la infección ocurre como resultado de una degradación de la pared celular por enzimas bacterianas, y que la pared del hilo

infectivo no es resultado de una invaginación, sino del crecimiento centrípeto de la pared celular dentro del pelo radical una vez que el mismo es infectado por las bacterias. Evidencias concluyentes, sin embargo, no han sido obtenidas hasta la fecha, a pesar de ello parece existir consenso que este último mecanismo es el que ocurre.

Posteriormente el hilo de infección crece hacia la base de las células del pelo radical, a menudo con el núcleo en la punta, y entonces pasa a las células corticales adyacentes. Los núcleos de estas células sufren cambios degenerativos excepto en las células tetraploides. Durante años se consideró que existen células disomáticas en la corteza interior que eran centros de iniciación del nódulo (Gibson, A. y Nutman, P. 1960). Evidencias más recientes sugieren que el número múltiple de cromosomas observado en los nódulos es resultado de la infección e inducido por el ácido indolacético y la citoquinina (Gibson, A. 1976). Cuando el ápice del hilo se aproxima a la célula disomática puede estimular el control hormonal que hace dividir las células del parénquima cortical y sus vecinas de la endodermis y periciclo para dar origen al nódulo. Las ramificaciones del hilo de infección penetran las células y descargan las bacterias en el citoplasma y se comienzan a formar tejidos diferenciados, tales como haces vasculares que crecen de la raíz hacia los laterales del nódulo. En la zona central las células están llenas de bacterias que toman la forma bacteroidal. Los principales cambios observados en esta etapa de formación del nódulo son el desarrollo de la nitrogenasa, composición de citocromos, oxidasas y aparición de la leghemoglobina. Desafortunadamente nuestro conocimiento preciso de estos pasos es muy limitado, aunque recientemente se ha puesto énfasis en

estudios sobre regulación génica en plantas, especialmente en los procesos de nodulación utilizando mutantes de *Rhizobium*. Los resultados de tales estudios sugieren la existencia de varias enzimas dentro de los nódulos denominadas nodulinas las cuales se ha demostrado que juegan un papel fundamental en la ontogenia y mantenimiento de los nódulos; entre éstas se encuentra leghemoglobina, uricasa, glutamina sintetasa y sacarosa sintetasa (Lara, M. et al 1988; Morell, M. 1988; Copeland, L. 1985). Algunas de esas nodulinas se ha mostrado que se localizan dentro del compartimiento peribacteroidal adyacente al microsimbionte (Verma, D. et al 1988). Estos mismos autores sugieren diferentes tipos de señales de parte del *Rhizobium* que están involucradas en la expresión de tales nodulinas dependiendo del estado de desarrollo del nódulo.

Cada nódulo está asociado con una infección y sólo en raras ocasiones contiene más de una cepa de bacterias tal como han informado (Moawad, H. y Schmidt, E. 1987) los cuales encontraron infección mixta dentro de nódulos de *Glycine max* crecida bajo condiciones de campo.

En relación con el funcionamiento del nódulo se destaca los siguientes procesos: función del bacteroide; retardo de senescencia; partición de energía; requerimientos energéticos para la fijación del N_2 . Estos aspectos están recibiendo en la actualidad, atención para su clarificación por parte de varios investigadores. Una revisión sobre el tema fue hecha por Gibson, A. y Jordan, D. (1983), la cual contempla los aspectos más relevantes, pero que se enuncian a nivel de hipótesis ante la falta de evidencias concluyentes. Al respecto conviene citar a Vincent, J. (1980) el cual estableció que "algunos de las etapas en el

funcionamiento del nódulo han sido definidas en términos citológicos, particularmente por el uso de formas modificadas genéticamente de ambos simbios (mutantes), pero cualquier explicación fisiológico-bioquímica para la especificidad en la simbiosis, está en un estado decididamente primitivo". Sin embargo en la actualidad se sabe con precisión, que durante todo el proceso de fijación de N_2 estos simbios interactúan a nivel de expresión genética, por transmisión reciproca de señales que activan los genes simbióticos (Wijffelman, C. et al 1988; Verma, D. et al 1988; Lara M. et al 1988).

En este mismo enfoque sobre la especificidad en la simbiosis, recientemente se ha demostrado que los exudados de las plantas contienen polifenoles llamados flavonas que actúan como señales para inducir la expresión de genes de nodulación común, los que se han identificado como nodABC en el *Rhizobium*. Estos genes estimulan las respuestas iniciales de división celular cortical y el encurvamiento de los pelos radicales (Peters, N. et al 1986; Redmon, J. et al 1986; D'arcy, A. y Jay, M. 1987; Jhonston, A.W.B. et al 1988). Así mismo otra línea de investigación postula la posibilidad de que la especificidad de nodulación y otras propiedades simbióticas en *Rhizobium* estén controladas por plasmidos. Esta sugerencia fue introducida por Dunican, L. y Cannon, F. (1971) y Cannon, F. 1972). Recientemente se ha informado hallazgos que confirman esas posibilidades con relación a diversos aspectos de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa (Dunican, L. y Tierney, A. 1974; Sutton, W. 1974; Toro, N. y Olivares, J. 1985)

Volviendo con la influencia de las plantas hospedero en las primeros pasos de la simbiosis, se sabe que las secreciones de sus raíces pueden tener un efecto directamente sobre los rizobios ya sea de carácter estimulador o bien inhibitorio. Sobre el primer aspecto Vincent, J. (1974) anota que la rizosfera de las leguminosas contienen una variedad de compuestos exudados por las raíz, que son un medio quimotáctico diferencial y que puede ser usado por los microorganismos. Entre los compuestos exudados se encuentran aminoácidos, azúcares, enzimas y biotina; esta última parece ser el factor que mayormente estimula el crecimiento de los rizobios. De esta manera la rizosfera de las leguminosas estimularía selectivamente a los rizobios y su población podría llegar a ser 10-20 veces mayor que en el suelo circundante (Schmidt, E. 197).

Contrariamente a lo señalado , mucha información disponible indica que la estimulación rizosférica puede no ser específica, tal como se sugiere en los trabajos clásicos de Tuzimura, K. y Watanabe, I. (1962), los cuales no encontraron evidencia de estimulación específica para *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* y *R. leg. bvr. meliloti* concluyendo que plantas tanto no leguminosas como leguminosas, tuvieron efectos estimuladores del crecimiento de algunos, pero no todas las especies de *Rhizobium*. Robinson, A. (1967) informó resultados de campo similares. Peters, R. y Alexander, M. (1966), no encontraron especificidad relativa a la estimulación de varias especies de *Rhizobium* trabajando con soluciones nutritivas. Todos estos trabajos se realizaron bajo condiciones controladas (in vitro). Los únicos trabajos publicados sobre examinación directa (in situ) de dinámica poblacional de

desarrollo de rizobios en la rizosfera, son los de Schmidt, E. y colaboradores, los cuales usaron técnicas de anticuerpos fluorescentes para monitorear en el suelo las poblaciones de *B. japonicum* (Reyes, V. y Schmidt, E. 1979,1981; Robert, F. y Schmidt, 1985) y *R. leg. bvr. phaseoli* (Robert, F. y Schmidt, E. 1983). Sus hallazgos indicaron que , aunque los rizobios fueron generalmente estimulados en la rizosfera, la estimulación no fue específica para ningún caso particular de asociación leguminosa-*Rhizobium*.

En relación con el efecto inhibitorio del hospedero sobre el rizobios, Thompson, J. (1960) encontró inhibición por producción de sustancias fenólicas (toxinas) de las semillas de leguminosas. Rice, E. (1964, 1968) estudió también este efecto con extractos de plantas encontrando reducción significativa en el número de nódulos por extracto de la maleza *Aristida oligantha* en frijol común (*Phaseolus vulgaris*). Murthy, y Ravindra, (1974) observaron que *Aristida adscendens* una gramínea dominante que crece bajo condiciones secas en el Noroeste de la India, redujo el número de nódulos en *Indigofera cordifolia* la cual está asociada con la gramínea en los estados iniciales de la sucesión. Ellos sugirieron que ésto pudo ser un efecto alelopático. Además Murthy, y Nagodra, (1977) aislaron *Rhizobium* de nódulos de nódulos de *Indigofera cordifolia* y probaron el efecto de extractos de raíces, ramas y hojarazca de *A. adscensionis* y encontraron que los extractos y lixiviados de la gramínea inhibía el crecimiento de *Rhizobium* en condiciones de cultivo en laboratorio. Los extractos de raíces generalmente fueron más efectivo para ello, que aquellos de ramas y hojas. Recientemente Mallik, M. et al (1987) investigaron los efectos de

las plantas en relación con estimular o reducir la nodulación en plantas de soya (*Glycine max*) crecidas en bolsas y caldos de cultivo, encontrando que algunas malezas estimulaban el crecimiento de los rizobios por 3-4 veces después de 48 horas de incubación; así mismo otras malezas presentaron el efecto contrario.

Los efectos de las especies de plantas sobre la densidad de los rizobios en el suelo, también ha recibido atención. Así por ejemplo, Escuder, A. (1972) observó que en campos donde había crecido tabaco por 9 años, los números de *R. leg. bvr. trifolii* fueron 10^6 g^{-1} suelo seco o más; densidades iguales se observó en campos con pastos perennes. Sin embargo ella también notó, que el trébol blanco (*Trifolium repens*) fue una maleza ampliamente extendida en estos campos, con aproximadamente el 15% de la flora en la pastura. Nutman, P. y Ross, G. (1970) estudiaron la presencia de malezas leguminosas en campos donde se había cultivado trigo (*Triticum vulgare*) y tuberculos por 120 años, encontrando que los rizobios en los campos sembrados con la planta de vía fotosintética C_4 (trigo) tuvieron mayor diversidad y no se correlacionó necesariamente con la presencia de malezas leguminosas.

2.1.3.1.2 Microsimbionte: la bacteria Rhizobium

Los rizobios se han dividido en grupos, y se nombran de acuerdo con la planta huésped que infectan. Así se identifican los siguientes de acuerdo con Alexander, M. (1961): *Rhizobium meliloti* (grupo de la alfalfa), *R. trifolii* (grupo del trébol), *R. leguminosarum* (grupo de la

arveja), *R. phaseoli* (grupo del frijol), *R. lupini* (grupo del lupino), *R. japonicum* (grupo de la soya), *R. misceláneo* (grupo del caupí). Modernamente (Bergersen, 19) se identifican genéricamente como *Rhizobium leguminosarum biovar* antepuesto a la especie de cada uno de ellos, excepto para el *japonicum* el cual se denomina *Bradyrhizobium japonicum*. En este trabajo usaremos la nomenclatura moderna para nombrarlos en lo sucesivo. Conviene mencionar que se presenta el caso de rizobios que nodulan leguminosas fuera de su grupo , a este fenómeno se le denomina promiscuidad simbiótica y constituye una objeción a la validéz taxonómica de los grupos.

Las cualidades deseables en el *Rhizobium* son un alto grado de infectividad para un hospedante en particular, efectividad o habilidad para fijar grandes cantidades de nitrógeno, compatibilidad con amplio espectro de especies y variedades y competitividad para inducir nodulación en presencia de otras bacterias en la rizosfera. El principal factor limitante relacionado con el microsimbionte es el grado de especificidad que posee, el cual se puede apreciar no sólo en la habilidad para formar nódulos, sino también en la fijación del N_2 atmosférico. En este respecto conviene recordar lo que se mencionaba líneas arriba acerca de los genes que intervienen y determinan la capacidad simbiótica de los rizobios. Estos genes son extracromosomales y se denominan plásmidos. Actualmente se puede transferir plásmidos de una cepa a otras mediante técnicas de genética bacteriana lo cual puede constituir una posibilidad de futuro para el mejoramiento de la simbiosis, tal como ya fue comentado.

Además de la efectividad, el microorganismo debe tener habilidad para establecerse en el suelo y la rizosfera, competir con cepas indígenas y persistir por un largo tiempo.

2.1.3.1.3 Efectos de microorganismos del suelo sobre la simbiosis

Dado que el *Rhizobium* es un habitante del suelo, se ve afectado por interacciones antagónicas que se dan con otros microorganismos. Los fracasos de leguminosas inoculadas para nodular bien en el campo han sido atribuidos a los efectos de antagonistas microbianos en suelo (Chowdury, M. 1967). El término antagonismo comprende la competencia, amensalismo, explotación y antagonismo postinfección (Chowdury, M. 1976).

El antagonismo microbiano puede ser operativo a través de la competencia, siendo los nutrimentos uno de los factores más importantes. Existe poca información sobre la naturaleza de posibles sustratos usados por los rizobios en suelo y rizosfera o como el rizobio puede competir bien con otras bacterias por tales sustratos. Chowdury, M. (1967) usó la técnica del número más probable para estimar cambios en la población indígena de *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* y *R.leg. bvr. lupini*, después de la adición de glucosa al suelo, no detectándose cambios significativos en su población original. Peña-Cabriales, J. y Alexander, M. (1983) estudiaron la respuesta al crecimiento de rizobios después de la adición al suelo de manitol, concluyendo que el rizobio

fue un pobre competidor por este sustrato a menos que altas cantidades de carbón exógeno fueran adicionadas. Viteri, S. y Schmidt, E. (1987) trabajando con *B. japonicum* proporcionaron la primera evidencia directa que comprueba que los rizobios nativos del suelo pueden competir exitosamente con otras bacterias del suelo por sustratos realmente disponibles en el medio en ausencia de raíces de leguminosas hospederos u otras rizosferas. Germida, J. (1988) confirma estos resultados al establecer la habilidad de cepas indígenas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *Vicia* y *R.leg. bvr. meliloti* para competir exitosamente con otras bacterias del suelo por nutrimentos disponibles, lo que tendría grandes implicaciones para la dinámica poblacional del rizobio al ser un buen competidor en el suelo.

Aparte de competir por sustratos disponibles con la microflora del suelo, los rizobios tienen que competir con otras cepas rizobianas por éstos y por ocupar un sitio en el nódulo. Esta última competencia es un fenómeno complejo que ocurre entre cepas indígenas, entre indígenas e inoculadas, y entre cepas aplicadas en un inóculo mixto (Ham, G. 1980). El éxito relativo de las diferentes cepas de rizobios es resultado de la interacción de muchos factores que afectan tanto la sobrevivencia y colonización de la raíz como la competencia por sitios en los nódulos.

En relación con la competencia entre cepas indígenas, estudios serológicos realizados por Johnson, H. y Means, U. (1963) indicaron que existen diferentes poblaciones de rizobios nativos en nódulos de *Glycine max*; en cinco de seis suelos estudiados, el 49 al 82 % de los aislamientos fueron uno o dos de los grupos predominantes y se tuvo una

alta correlación entre los datos de campo e invernadero. Caldwell, B. y Weaver, D. (1970) encontraron que diferentes fechas de plantación influenciaron la ocurrencia de serogrupos en nódulos de *G. max*; la ocurrencia del serogrupo c3 fue mayor en las fechas de plantaciones tardías que otros serogrupos utilizados, así mismo el serogrupo 110 fue más frecuente en las fechas de plantación tempranas. Weaver, D. et al (1971) hallaron que la distribución serológica también difirió cuando las plantas de soya fueron muestreadas en diferentes estadios de desarrollo.

Sin embargo, la situación más difícil de competencia se establece cuando se usa inóculos de rizobios para introducirlos a un suelo que contiene rizobios nativos tanto de la misma especie, como otras.

Estos estudios de competencia por nodulación han sido bien documentados por Read, M. (1953); Vincent, J. y Waters, L. (1953); Johnson, H. et al (1965); Caldwell, B. (1969); Marques Pinto, C. et al (1974); Labandera, C. y Vincent, J. (1975); Robert, F. y Schmidt, E. (1983). Los resultados mostrados por todos estos investigadores, permiten evidenciar que el establecimiento de rizobios introducidos es particularmente difícil, cuando existen poblaciones nativas o naturalizadas de rizobios. Para que los rizobios introducidos puedan dominar a los indígenas en la competencia por nodulación, es necesario que se adicionen en cantidades más altas a las de la población nativa. Weaver, R. y Frederick, L. (1974) determinaron las relaciones cuantitativas entre suelos e inóculo, de la cepa 138 de *Bradyrhizobium japonicum* en el campo; para que el rizobio inoculado formara 50% o más de los nódulos, una tasa de inóculo

de por lo menos 1.000 veces la población del suelo, debería ser usada; ellos concluyeron también, que quizá con diferentes técnicas de inoculación a la utilizada o rizobios más competitivos en el inóculo, podría reducirse la tasa de inóculo a emplear. Johnston, A. y Beringer, J. (1976) informaron que una cepa inefectiva de *Rhizobium leguminosarum* biovar *vicea* fue más competitiva e influenció los patrones de nodulación, que una cepa efectiva en el mismo sistema radical. Roughley, et al (1976) informaron que hubo marcadas diferencias en habilidad competitiva de cepas introducidas en cinco sitios de Australia, conteniendo población naturalizada de *R.leg. bvr. trifolii*, atribuyendo las diferencias al cultivar hospedero y al sitio.

Moawad, H. (1984) trabajó en campos plantados con *Glycine max* para examinar el tiempo e intensidad de la colonización rizosférica por tres serogrupos indígenas de *B. japonicum* (110,123,138) encontrando que estos serogrupos coexistieron en el suelo, en densidades similares al momento de la siembra y los tres mostraron similar respuesta rizosférica débil, en plantas de una a tres semanas de edad. El mismo autor estableció que el serogrupo 123 se derivó de las poblaciones indígenas el suelo; esto atrajo considerable atención y condujo a establecer posibles bases para la competitividad exitosa de los rizobios indígenas.

Recientemente Schmidt, E. (1985) ha sugerido que el comportamiento del rizobia como bacteria de vida libre, es el principal determinante del éxito en la nodulación de las plantas leguminosas. Sin embargo pocos trabajos se han emprendido para examinar de que manera las poblaciones indígenas de rizobia afectan la respuesta a la inoculación.

Singleton, P. y Tavares, J. (1986) condujeron una serie de ensayos de inoculación en cuatro tipos de suelos de Hawaii, empleando seis especies leguminosas. Los suelos contenían una gran diversidad de rizobios nativos, los cuales fueron caracterizados en términos de número y efectividad de la población para un hospedero particular; los resultados alcanzados por estos investigadores sugieren que la naturaleza del rizobio nativo puede afectar la fijación potencial de dinitrógeno por leguminosas, ya que por ejemplo las respuestas tempranas a la inoculación dependió principalmente del número de bacterias invasivas (introducidas con el inóculo) de la especie leguminosa probada. No se obtuvieron respuestas significativas a la inoculación cuando el número de rizobios indígenas fue mayor o igual a 200 bacterias g^{-1} suelo seco, a menos que dicha población fuera totalmente inefectiva. Singleton, P. et al (1987) encontraron que las respuestas a la inoculación en campo son más probables cuando hay menos que 100 rizobios efectivos g^{-1} suelo seco; se estableció también que la alta frecuencia de formación de nódulos por una cepa inoculada, no garantiza una respuesta a la inoculación cuando la población del suelo contiene algunas cepas altamente efectivas, tal como se observó con *Leucaena leucocephala* la cual no respondió a la inoculación a pesar que la cepa inoculada formó el 76% de los nódulos.

Dowdle, S. y Bohlool, B. (1987) trabajaron con *B. japonicum* y *R. fredii* en dos tipos de suelos: unos sin historia de *Glycine max* y otros sin antecedentes de inoculación, encontrando que la inoculación no resultó en un incremento significativo del número de nódulos sobre las

leguminosas en ambos suelos, comparando así la habilidad competitiva de rizobios introducidos e indígenas.

Con la información anterior se evidencia que la competencia establecida en el suelo entre rizobios, tanto por sustratos disponibles como por ocupación en el nódulo, es muy compleja y deberá dedicarsele considerables esfuerzos en la búsqueda de la optimización de la asociación simbiótica *Rhizobium*-leguminosas.

Por otro lado, el amensalismo se refiere a la forma de antagonismo donde un organismo produce sustancias tóxicas para otro(s). Tales sustancias pueden ser llamadas en términos generales antibióticas (Park, D. 1967).

Muchos investigadores han informado sobre la inhibición de *Rhizobium* creciendo *in vitro*, por bacterias, hongos y actinomicetos, aislados tanto del suelo como de la rizosfera de las plantas (Thornton, G. et al 1949; Patel, J. 1974; Foo, E. y Barma, A. 1976; Pugashetti, B. et al 1982). Es importante sin embargo, tener precaución para extrapolar los resultados de los estudios *in vitro* a la situación en campo tal como ha sido anotado por Trinick, M. y Parker, C. (1982) y Trinick, M. et al (1983). Existe pocos informes sobre la inoculación directa al suelo de hongos o actinomicetos, los cuales pueden reducir la nodulación y la fijación de nitrógeno, entre estos se cuentan los de Damirgí, S. y Johnson, H. (1966) y Angle, J. et al (1981). algunas evidencias sugieren que tal inhibición puede ser debida a la producción *in situ* de antibióticos en el suelo. Hely, F. et al (1957) encontraron que la pobre nodulación de tréboles introducidos en Australia podría ser mejorada

mediante la adición de carbón al suelo, el cual presumiblemente absorbió las sustancias antibióticas inhibitorias. Otros trabajos en el Oeste de Australia mostraron que algunos extractos de suelo tuvieron actividad antibiótica (Holland, A. y Parker, C. 1966; Chatel, D. y Parker, C. 1972.

Scotti, M. et al (1982) informaron que el encalado incrementó la resistencia a la estreptomina de cepas de *Rhizobium* aisladas de *Stilosanthes* en la región central del Brasil; estos autores especularon diciendo que el encalado de suelos vírgenes causó gran incremento en la población de actinomicetos, especialmente en la rizosfera, provocando inhibición de la nodulación de *Glycine max* por cepas de *Rhizobium* sensibles a la estreptomina.

En un estudio realizado sobre el efecto de la cal y mantillo en la nodulación y rendimiento de *Phaseolus vulgaris* hecho por Ramos, M. y Boddey, R. (1987) se encontró que las adiciones de cal incrementaron la nodulación, pero disminuyeron la proporción de nódulos ocupados por la cepa inoculada, atribuyéndose a la proliferación de estreptomycetos que inhibieron a las cepas inoculadas sensibles. Ramos, M. et al (1987) encontraron fuertes evidencias de producción de antibióticos que inhibieron la infección y formación de nódulos de cepas de rizobios sensibles a esos antibióticos.

La información anterior permite anotar que el amensalismo puede provocar una disminución importante de las poblaciones de rizobios que busquen establecerse en algún sitio en particular, sobre todo en aquellos suelos

donde no existan factores que bloqueen las sustancias antibióticas eventualmente producidas (coloides orgánicos e inorgánicos).

Por otra parte en relación con la explotación Park, D. (1960) propone que el término abarque el antagonismo por depredadores, parásitos y virus.

El *Bdellovibrio* ejerce acción depredadora sobre los rizobios, siendo demostrado por Parker, C. y Grove, P. (1970) y Keya, S. y Alexander, M. (1975), los cuales aislaron cepas depredadoras de este microorganismo.

La acción depredadora de protozoarios (*Amoeba*, *Hartmanella*, *Naeglaria*, *Tetramitus*) sobre los rizobios fue demostrada por Danso, S et al (1975). Ramirez C. (1979) y Ramirez, y Alexander, M. (1980) trabajando con *Rhizobium phaseoli* demostraron que la colonización del suelo por los rizobios estuvo inversamente relacionada con la presencia de alto número de bacterias y protozoarios del suelo.

Efectos sobre la nodulación de plantas de *Glycine max* infectadas por virus del mosaico fue demostrada por Tu, J. et al (1970). Resultados similares con virus han sido encontrados por Smith, J. y Gibson, P. (1960) trabajando con *Trifolium repens* y para *P. vulgaris* por Orellana, R. y Fan, F. (1978).

Así mismo, Gibson, A. y Jordan, D. (1983) establecen que aunque partículas de virus han sido encontradas dentro de los nódulos, es probable que el efecto de la acción viral sobre la nodulación y fijación

de nitrógeno sea una consecuencia de la reducción en el vigor fisiológico de los hospederos.

Por otro lado, a pesar de una nodulación exitosa, puede presentarse un antagonismo **postinfección**, el cual incluye ataque por insectos, nematodos y virus sobre el hospedero o el nódulo.

Muchos investigadores han encontrado un número considerable de nematodos parásitos en la zona radical de varias especies de plantas leguminosas. Se ha informado que los géneros *Meloidogyne* y *Heterodera* reducen la nodulación y la producción de cabellos radicales en *Glycine max* (Lehman, P. et al 1971; Balasubramanian, M. 1971). Así mismo Mishustin, E. y Shil'nikova, V. (1971) encontraron que la especie *Ratyllenchnus* interfirió con las funciones de las raíces y nódulos de *Phaseolus vulgaris*, *Trifolium subterraneum* y *Medicago sativa*.

2.1.3.2 Factores abióticos limitantes de la simbiosis

2.1.3.2.1 Factores medioambientales

Los factores medioambientales pueden afectar directamente la simbiosis o ejercer su influencia a través de otros procesos fisiológicos en la planta. Entre los más importantes a nivel de campo se destacan: humedad del suelo, temperatura, luz, oxígeno y pH. Sobre el particular se han hecho algunas revisiones (Lowendorf, H. 1980; Gibson, A. y Jordan, D. 1983) razón por la cual se tratarán brevemente en este trabajo.

Con respecto a la humedad del suelo Gibson, A. y Jordan, D. (1983) mencionan que aunque éste es el principal factor que influencia la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa ha recibido menos atención que otras variables. Así, Worrall, B. y Roughley, R. (1976) encontraron que la nodulación fue afectada por reducción en la infección de los pelos radicales y el desarrollo del nódulo fue suprimido a un bajo potencial de agua del suelo.

El funcionamiento del nódulo se ve severamente restringido por estrés del agua, ya que su escasés induce a una rápida disminución en la fijación de nitrógeno, pero la actividad puede ser restablecida proporcionando este elemento antes de que los nódulos pierdan el 20% o más de su peso fresco (Sprent, J. 1971). Durante un periodo de sequía, puede ocurrir daño osmótico a la fijación debido a la alta concentración de sales, cerca de los nódulos (Sprent, J. 1973).

Así mismo, el exceso de agua es también detrimental, ya que este fenómeno ocasiona una baja disponibilidad de oxígeno dentro del nódulo y las raíces limitando severamente su función (Lowendorf, H. 1980).

Lo anterior pone de manifiesto que el suelo debe mantenerse cerca de su capacidad de campo, para lograr los máximos beneficios de la fijación.

En relación con la temperatura Gibson, A. y Jordan, D. (1983) mencionan que la mayoría de la investigación se ha concentrado en la temperatura de la raíz, que es el sitio de desarrollo nodular, sin embargo, anotan,

que las temperaturas en la biomasa aérea son también importantes para el flujo de asimilados entre el nódulo y la planta. La temperatura opera principalmente a través de una vía no específica en los procesos metabólicos de la planta tales como respiración, fotosíntesis, transporte y transpiración, los cuales al ser afectados por temperaturas extremas impiden la simbiosis.

Las leguminosas de regiones templadas nodulan rápidamente a temperaturas radicales de 28-30°C, no obstante la temperatura óptima para la fijación es 20-24°C. Gibson, A (1967) encontró que para *Trifolium subterraneum* la temperatura mínima fue 7°C. Las leguminosas de origen tropical o subtropical presentan temperaturas óptimas para nodulación y fijación de nitrógeno en el rango de 25-30°C. La temperatura máxima de nodulación es cerca de 36°C y la mínima es 15°C (Gibson, A. 1971; Lindeman, W. y Ham, G. 1979).

La degeneración del nódulo al incrementarse la temperatura es una característica común en todas las leguminosas, pero sorprendentemente se conoce poco sobre las razones fisiológicas para esta senescencia.

Kluson, R. et al (1986) establecieron que la competitividad y crecimiento de dos cepas de *Bradyrhizobium japonicum* se vió fuertemente disminuída al incrementarse la temperatura del suelo. Piha, M. y Munns, D. (1987) estudiaron la sensibilidad de *Phaseolus vulgaris* a las altas temperaturas, comparadas con *Glycine max* y *Vigna unguiculata*, no encontrando diferencias entre las tres especies, siendo igual de sensibles. Olivares, J. (1988) señala que aparentemente las altas

temperaturas provocan que una o más de las enzimas que participan en el reconocimiento entre los simbioses se confunda y no haya reconocimiento, limitandose así la simbiosis.

En relación con el factor luz, ésta afecta la simbiosis principalmente a través de la fotosíntesis, controlando el abastecimiento de fotosintatos para el desarrollo y funcionamiento del nódulo. Así mismo se sabe que existe una relación lineal entre intensidad de luz, la nodulación y fijación de nitrógeno (Lie, T. 1964).

Un efecto adicional de la luz sobre la morfogénesis del nódulo fue demostrado por Lie, T. (1969) el cual en el mismo trabajo, proporcionó evidencias del papel del fitocromo en la formación del nódulo.

El oxígeno es otro de los factores a tomar en cuenta. Sobre el particular puede decirse que la inundación y la pobre estructura del suelo, ocasiona bajos niveles de este elemento en el suelo y de esta manera reduce considerablemente la nodulación de varias especies, tal como fue demostrado por Gibson, A. (1977).

El pH del suelo puede influenciar la simbiosis entre leguminosas y rizobios afectando el crecimiento y sobrevivencia de estos últimos, inhibiendo la infección o a través de un efecto indirecto disminuyendo la disponibilidad de nutrimentos minerales que pueden incluso volverse tóxicos.

Se ha dedicado bastante atención a las condiciones ácidas de los suelos, debido a que grandes áreas en América tropical poseen suelos ácidos. Se ha establecido niveles críticos de pH para la nodulación de un buen número de leguminosas. Munns, D. (1977); Munns, D. et al (1977, 1979) han hecho revisiones bibliográficas donde resumen la información aparecida sobre el tema.

Puede establecerse aquí, que la naturaleza precisa de las razones para la no infección de las raíces de leguminosas, a bajos valores de pH, no han sido claramente determinadas, sin embargo se acepta (Gibson, A. y Jordan, D. 1983) que las pobres condiciones fisiológicas exhibidas por las bacterias en estas condiciones, es el factor principal.

Munns, D. et al (1979) y Keyser, H. et al (1979) trabajando con *Vigna* sp, *Mungo* y *V. unguiculata* concluyeron que hubo una gran y quizá continua variación en tolerancia a la acidéz entre colecciones de cepas. Más aún, la respuesta de una cepa con un cultivar dado, no necesariamente predice la respuesta con otros cultivares, Munns, D. et al (1981) sugieren que los esfuerzos para mejorar la tolerancia a la acidéz deberían concentrarse sobre las leguminosas hospederos.

En general las leguminosas de regiones tropicales son más capaces de nodular a bajos pH que las de regiones templadas, pero hay suficientes excepciones, de tal suerte que es necesario examinar cada especie por separado y bajo condiciones apropiadas. Muchas especies no nodularan a un pH inferior a 4,5 y arriba de este nivel hay considerables diferencias entre las especies y sus respuestas al incrementar el pH del

suelo. La toxicidad por Aluminio y Manganeso tanto para plantas como bacterias son comunes a valores de pH bajos y en el suelo esta toxicidad puede ser más importante que el pH *per se*.

El encalado es una práctica común en suelos ácidos que busca aliviar los problemas de toxicidad para las plantas y esta práctica ha sido examinada desde el punto de vista de la asociación simbiótica. Así Dughri, M. y Bottomley, P. (1984) encontraron que en suelos encalados la dominancia del serogrupo sobre los cultivares fue negativa, en contraste a lo encontrado por Brockwell, J. et al (1982), los cuales hallaron sus resultados trabajando con cepas de *R. leg.bvr. trifolii*. Hay muy pocos casos de leguminosas tropicales que no nodulan; sin embargo algunas han respondido a la aplicación de cal, entre ellas podemos citar el kudzú, *Phaseolus vulgaris*, *Leucaena leucocephala* y *Stylosanthes*. El encalado incrementa la nodulación como resultado de elevar los niveles de calcio y el pH en el suelo, mejorando las condiciones existentes en el medio para los dos simbioses. Bajo condiciones ácidas los requerimientos de calcio por parte de los rizobios son mayores, tal como lo ha señalado recientemente Leung, K. y Bottomley, P. (1987). Los rizobios se ven favorecidos en su multiplicación con el encalado, tanto en la presencia (Róvira, A. 1961) como en la ausencia (Coventry, D. et al 1985) de las plantas hospedero. Recientemente, Almendras, A. y Bottomley, P. (1987) encontraron que la adición de cal y fosfatos a campos sembrados con *Trifolium subterraneum*, mejoró diferencialmente la nodulación por cepas indígenas de *Rhizobium leguminosarum biovar trifolii*.

Wood, M. y Cooper, J. (1988) trabajaron con cepas de *R. leg. bvr. trifolii* a valores bajos de pH utilizando medios de cultivo; estos autores sugirieron que la toxicidad de aluminio sobre *Rhizobium* podría deberse a tres causas: a) un efecto directo del aluminio monomérico; b) un efecto indirecto del aluminio polimérico al provocar reducción en la concentración de fosfato y c) un efecto directo del aluminio polimérico sobre el *Rhizobium*.

A pesar de que la toxicidad para *Rhizobium* en suelos ácidos, se debe a varios mecanismos los cuales estan bien documentados en la literatura, puede establecerse aquí que continúan siendo pobremente entendidos.

2.1.3.2.2 Factores nutrimentales

Estos se refieren a los elementos minerales necesarios en el metabolismo de los dos simbioses. De manera específica para los rizobios se ha identificado a los siguientes elementos como los más comúnmente requeridos: nitrógeno combinado, fósforo, hierro, calcio, magnesio, cobalto, zinc, manganeso y molibdeno. Enseguida se analizará brevemente cada uno de ellos.

El efecto inhibitorio del nitrógeno combinado sobre la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa fue reconocido antes de establecerse que los nódulos eran los agentes de fijación del dinitrógeno atmosférico. Es por esta razón que existe una voluminosa literatura sobre el tema, la cual

ha sido convenientemente resumida por Gibson, A. (1977, 1983). Los resultados obtenidos en todos esos estudios permiten establecer que por lo menos cuatro aspectos de la simbiosis son afectados: infección, desarrollo del nódulo, fijación y la integridad de los bacteroides.

En un estudio reciente Mallik, N. (1987), resume los posibles mecanismos por los cuales la adición de nitratos afectan la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa: a) rompimiento irreversible de la organización de tejidos; b) retardo o inhibición de la infección de los pelos radicales; c) Disminución de nuevos nódulos inhibiendo el acoplamiento de rizobios a la raíz; d) prevención en la inducción del encurvamiento del pelo radical por las bacterias; e) bloqueo en la iniciación del hilo infectivo y f) el desarrollo limitado de la biomasa nodular. Además de mencionar estos mecanismos, los investigadores citados informan que no encontraron correlación entre el grado de inhibición de nódulos de *Glycine max* y la concentración interna de nitratos en la zona radical, concluyendo que el nitrato por sí mismo no es un afectador activo en la inhibición de la infección por rizobios. Estos hallazgos podrían tener grandes implicaciones ya que siempre se ha postulado que los nitratos inhiben en gran medida el proceso de nodulación.

Sobre el fósforo se ha informado que interviene en la efectividad de las cepas. Así, se ha encontrado que su aplicación en forma de fosfatos provocó un incremento de la masa nodular en *Phaseolus vulgaris* (Awonaike, K. et al 1980; Graham, P. y Rosas, J. C. 1979), en *Glycine max* (Meynell, G. y Meynell, E. 1970; Souza E. et al 1978; Sharpe, R. et al 1986) y en otras leguminosas como *Desmodium* sp. (Decena, G. et al

1976), *Phaseolus aureus* (Patil, D. y Sosnwanishi, R. 1982), *Dolichos labrad* (Zaroug, M. y Munns, D. 1979), *Trifolium vesiculosum* (Lynd, J. et al 1984).

De acuerdo con Sawada, S. et al citado por Morales, M. (1987) la insuficiencia de fósforo en frijol disminuye significativamente la actividad fotosintética. Desde este punto de vista, el efecto de la fertilización fosfórica sobre la nutrición de la planta, favorece una relación simbiótica eficiente al aumentarse el suministro de asimilados fotosintéticos al nódulo (Graham, P. y Rosas, J.C. 1979; Awonaike, K. et al 1980).

La influencia del fosfato sobre desarrollo y nodulación por *Rhizobium leguminosarum biovar trifolii* fue estudiada recientemente por Leung, K. y Bottomley, P. (1987) los cuales concluyeron que cepas que tienen baja tolerancia a medioambientes deficientes en fosfatos, pueden tener dificultad en competir con otros rizobios para nodulación. Sobre esta misma línea de trabajo Morales, M. (1987) realizó una selección y evaluación de cepas de *Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli* tolerantes al suministro restringido de fósforo.

Sobre el hierro se encuentra que es esencial para los rizobios, ya que existen evidencias de que es un elemento importante en la formación y preservación de la leghemoglobina, teniendo por tanto un efecto directo sobre la fijación del nitrógeno (Vincent, J. 1977).

Los rizobios necesitan el calcio y magnesio para un buen desarrollo y además juegan un papel específico en las etapas de: preinfección, infección y formación del nódulo (Vincent, J. 1977).

El cobalto es necesario para el desarrollo de los rizobios, lo cual ha sido demostrado convenientemente en estudios in vitro. La necesidad de este elemento es explicada porque su ausencia impide que se sintetice suficientemente la vitamina B₁₂, necesaria para el normal funcionamiento de la metil-malonil-coenzima A mutasa, la cual es necesaria en el proceso de fijación (Hamdi, Y. 1985).

Las cantidades de zinc y manganeso necesarias para el buen funcionamiento de los rizobios son muy bajas en el orden de 0,1 a 1,0 umoles.

Dado que el molibdeno es un componente de la nitrogenasa es un elemento imprescindible para el microsimbionte, pues las plantas leguminosas hospederas no responden a las aplicaciones del elemento. Franco, A. y Munns, D. (1981) estudiaron la respuesta de *Phaseolus vulgaris* L. en soluciones nutritivas e invernadero, a las aplicaciones de Mo en suelos de naturaleza ácida, concluyendo se pueden manipular los controles genéticos y medioambientales sobre la semilla, para ayudar al control de deficiencia; la planta no respondió a las aplicaciones. Así mismo, Graham, L. y Maier, R. (1987) encontraron que el Mo puede afectar significativamente la fijación del N₂, sobre todo en aquellas plantas con nódulos cuyos bacteroides no muestran afinidad por el elemento.

2.2. La inoculación de las leguminosas como estrategia para aumentar la producción

Para lograr un mayor beneficio de la fijación simbiótica de nitrógeno, se utiliza el proceso de inoculación con cepas eficientes, competitivas y resistentes a las condiciones particulares del suelo.

La inoculación es una práctica sencilla y económica que se enmarca en la tecnología de bajos insumos, para apoyar mayormente a los pequeños productores a incrementar la producción. Esta requiere de una tecnología apropiada, que se justifica introducir cuando se ha comprobado la necesidad de ella y los beneficios.

La necesidad de la inoculación en casi todos los suelos del mundo ofrece pocas dudas, especialmente en los cuatro casos siguientes (Hamdi, Y. 1985):

- a) Cuando no se ha utilizado previamente una planta leguminosa.
- b) Cuando la leguminosa previamente cultivada en el terreno no ha tenido buena nodulación.
- c) En un ciclo rotatorio simultáneo, o sucesivo, a una planta no leguminosa.
- d) Cuando la tierra se ha cultivado excesivamente o es una tierra desgastada que ha sido recuperada.

El propósito de la inoculación es colocar un gran número de células bacteriales vivas en el suelo o sobre la semilla de leguminosas en el

momento de la siembra creando así una situación favorable para la infección, nodulación y fijación del dinitrógeno atmosférico. Este propósito se ha buscado alcanzar por los estudios de Weaver, R. y Frederick, L. (1974), los cuales sugirieron que el bajo número de *Rhizobium* en la rizosfera es el factor limitante para obtener mejoras en la nodulación. Por ésta razón el factor más importante a considerar en un inoculante (suponiendo que la cepa de *Rhizobium* es eficiente y totalmente compatible con la leguminosa huésped) es el número de bacterias (Date, D. y Roughley, R. citados por Ramirez, C. 1983).

La manipulación de la rizosfera de las leguminosas a través de los métodos de inoculación, constituye uno de los campos más promisorios para lograr realmente aumentos notables en la producción (Ramirez, C. 1983).

La tecnología de los inoculantes ha avanzado considerablemente y en los enfoques modernos se pone especial énfasis en el control de calidad en las etapas de producción, almacenamiento y distribución de los mismos. Esta tecnología se ha desarrollado rápidamente y se dedican considerables esfuerzos para contar con tecnología de producción en cada país (Munévar, F. 1988). Agencias internacionales han elaborado manuales técnicos para ayudar a difundir conocimientos en esta área. Así, en 1985 la FAO elaboró un manual donde se detallan los pasos a seguir en cada uno de las etapas de esta tecnología.

Finalmente en este punto de la revisión, se debe establecer que la inoculación por sí misma no es la panacea que mágicamente resolverá los

problemas relacionados con el funcionamiento óptimo de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosas. Se debe de considerar paralelamente al uso de esta tecnología, a otros factores como el manejo de la fertilidad del suelo con los nutrimentos que se ha encontrado ser necesarios para el establecimiento exitoso de la simbiosis y así aprovechar todo su potencial.

3. MATERIALES Y METODOS

El trabajo de invernadero y campo se realizó en el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica, y el de laboratorio en el Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA) de la Universidad de Costa Rica, San Pedro, Costa Rica.

Con antelación a la siembra de los ensayos de invernadero y campo, se seleccionó y caracterizó los sitios, y se determinó el número más probable (NMP) de bacterias capaces de nodular diferentes especies leguminosas hospederas.

3.1 Selección de los sitios

Inicialmente se seleccionó dos sitios dentro del campo experimental "La Montaña" del CATIE, en Turrialba Costa Rica. Esta área se encuentra localizada a los 9° 52' latitud N, y 83° 38' longitud O, a una elevación de 590 m.s.n.m., con una precipitación media anual de 2563,4 mm, y una temperatura media anual de 22°C. Esta zona está dentro del Bosque Tropical Húmedo de acuerdo con el sistema de zonas de vida de Holdridge, L. (1982). Uno de los sitios seleccionados no tenía historia reciente de haber sido cultivado con leguminosas (en barbecho por un período de 3 años); el otro sitio últimamente había sido sembrado con frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Posteriormente debió seleccionarse un tercer sitio en barbecho, debido a daños al follaje en la etapa de llenado de grano de algunas parcelas, provocados por un

desafortunado accidente por herbicidas utilizados en un campo adyacente al primer sitio en barbecho.

Es conveniente mencionar que en estos terrenos, se llevó a cabo hace algunos años un programa de investigación sobre inoculación de leguminosas empleándose diversas cepas a través de los inoculantes empleados (Lachmann, K et al 1973).

Esta selección tuvo como propósito contar con terrenos, en los cuales se esperaba encontrar poblaciones de rizobios nativos diferentes en cuanto al número, diversidad y efectividad. Los dos sitios escogidos inicialmente se encontraban contiguos, separados únicamente por un camino de acceso, y el tercero en un lugar más alejado de éstos. La caracterización de los sitios se detalla abajo.

3.2 Caracterización de los sitios

Siguiendo un patrón de enrejado (cuadrícula 9,0 m x 9,0 m), y cubriendo el área total de cada sitio, se obtuvo un total de 25 muestras excavadas a una profundidad de 20 cm. Estas se recolectaron con barreno una vez que se removi6 el primer centímetro de la superficie del suelo, así como la capa de mantillo con una pala. Posteriormente las muestras fueron mezcladas, secadas al aire, pasadas a través de un tamiz con malla de 2,0 mm de diámetro, y finalmente se obtuvo una submuestra de aproximadamente 2,0 kg, para realizar los análisis fisicoquímicos correspondientes. Así mismo otra muestra de 2,0 kg se guardó en

refrigeración antes de secarla al aire, con el propósito de efectuar la determinación del número más probable de bacterias. Además de lo anterior se muestreó y analizó por separado el suelo de muestras obtenidas en zig-zag para identificar si existían o no gradientes de fertilidad en los sitios.

3.2.1 Características fisicoquímicas de los suelos

En el cuadro 3.1 se presenta las determinaciones realizadas para la caracterización fisicoquímica de los tres suelos estudiados, así como la metodología empleada para ello.

3.3 Determinación del número más probable de los rizobios

Para determinar el número de rizobios en la presencia de otros microorganismos del suelo, se utilizó el procedimiento estándar de número más probable (Somasegaran, P., y Hoben, H., 1985). Esencialmente este método consiste en preparar una serie de diluciones de la muestra de suelo bajo estudio, luego se inocula con una alícuota de estas diluciones en las diferentes plantas que se desean probar. Posteriormente se observa la presencia o ausencia de nódulos en las raíces de las plantas, y se anotan los resultados. Con base al número de positivos (presencia de al menos un nódulo por planta) y negativos (ausencia de nódulos), es posible calcular el número más probable de bacterias en la muestra original del suelo en cuestión. Casualmente estos datos se pueden obtener directamente de cuadros de número más

Cuadro 3.1. Metodología de los análisis fisicoquímicos de los suelos utilizados en el estudio. Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica.

Determinación	Metodología	Referencia
Textura	Bouyoucos modificado	Hardy , F. y Bazan R. 1979
Densidad aparente	Cilindros	Olarte, L. et al 1979
Retención de humedad	Membrana de presión	Olarte, L. et al 1979
pH	Suspensión agua y KCl 1:1	Peech, M. 1965
Materia orgánica	Walkley-Black modificado	Saiz del Río, J. y Bornemisza, E. 1961
Nitrógeno total	Microkjeldahl	Bremner, J. 1965
N-Nitratos	Destilación (MgO-Devarda)	Bremner, J. y Keeney, D. 1965
N-Amonio	Destilación (MgO-Devarda)	Bremner, J. y Keeney, D. 1965
Capacidad de intercambio catiónico	Acetato de amonio modificado	Díaz-Romeu, R. y Balerdi, F, 1969
Fósforo	Olsen modificado	Díaz-Romeu y Hunter, A. 1978
Potasio	Extraído con KCl 1 N	Díaz-Romeu y Hunter, A. 1978
Calcio	Idem	Idem
Magnesio	Idem	Idem
Zinc	Idem	Idem
Cobre	Idem	Idem
Hierro	Idem	Idem
Manganeso	Idem	Idem
Retención de fósforo	Isoterma de Langmuir	Fox, R. y Kamprath, E. 1970

probable que se encuentran en la literatura. Los pasos generales que se siguen en ésta técnica se presentan en la figura 1 a.

3.3.1 Componente suelo

Se utilizó una muestra de 20 g de suelo de los dos sitios en barbecho, y otra del sitio cultivado recientemente con frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Los tres sitios taxonómicamente corresponden a la serie de suelos Instituto (Aguirre, V. 1971). Los dos primeros pertenecen a la fase pedregosa, y el tercero a la serie Instituto normal. La clasificación taxonómica actualizada de este suelo de acuerdo con el sistema norteamericano de clasificación es Humitropept Típico Fino Haloisítico Isohipertermico (Soil Conservation Service, 1987)

3.3.2 Componente planta

Las especies de leguminosas probadas fueron:

- a). *Cicer arietinum* L., cv. Giza 519.
- b). *Glycine max* L. Merrill, cv. Ciatsa.
- c). *Lens culinaris* Med., criolla.
- d). *Leucaena leucocephala* L., cv. k8.
- e). *Macroptilium atropurpureum* L, cv. Siratro
- f). *Medicago sativa* L., cv. Florida 77.
- g). *Phaseolus lunatus* L., cv. Henderson's baby.

- h). *Phaseolus vulgaris* L., cv. Negro huasteco.
- i). *Trifolium subterraneum* L., cv. Mt. Baker.
- j). *Vicia sativa* L..

Las semillas de estas leguminosas se esterilizaron en su mayoría con NaOCl al 1%. En el caso de *L. leucocephala* y *M. atropurpureum* se utilizó H₂SO₄ concentrado (Somasegaran, P. y Hoben, H. 1985). Seguidamente se lavaron seis veces en agua destilada y luego se germinaron en platos Petri que contenían agar-agua. Las semillas germinadas fueron transferidas al sistema de crecimiento apropiado a cada una de ellas. Así, el trébol (*T. subterraneum*) y la alfalfa (*M. sativa*), se colocaron en tubos de vidrio de 25 mm de diámetro y 200 mm de altura, en un medio inclinado (45°) de agar más solución nutritiva libre de Nitrógeno (Somasegaran, P. y Hoben, H. 1985). Las demás especies fueron transferidas a bolsas de crecimiento, con 50 ml de la solución nutritiva libre de Nitrógeno (cuadro 4 a.). Seguidamente, con una alícuota (1,0 ml) cada bolsa o tubo se inoculó con la dilución apropiada de suelo (figura 1 a.), se utilizó cuatro repeticiones por dilución y un testigo sin inocular, tanto para las especies crecidas en tubo, como en bolsas. Paralelamente y como control, se diluyeron suspensiones de bacterias crecidas en medio de cultivo de las cuales también se hicieron recuentos en placas de Petri (ver adelante). Las bolsas y tubos se trasladaron posteriormente al invernadero para su completo establecimiento. Durante el tiempo que ahí permanecieron, se le añadió a cada bolsa 50,0 ml de solución nutritiva, y posteriormente agua destilada estéril según las necesidades, hasta la aparición de

nódulos, lo cual ocurrió entre los 20-35 días después de inoculadas las plántulas.

Paralelamente se realizó un recuento de la población bacteriana en platos Petri, que contenían el medio de cultivo agar-levadura-manitol más verde brillante (agar 15 g, extracto de levadura 0,5 g, manitol 10 g, K_2HPO_4 0,5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2 g, NaCl 0,1 g, verde brillante 1,25 ppm, todo en un litro de solución). Para esto se agregó 0,1 ml de la dilución del suelo a cada plato.

Se hizo dos repeticiones por dilución, incubándolas luego en una cámara de crecimiento (26°C), hasta la aparición de las colonias.

3.3.3 Componente bacteriana

Este se refiere al uso de cepas altamente efectivas que sirven como controles positivos en esta técnica de infección de plantas. Para esto se prepararon caldos de cultivo de las cepas adecuadas a las leguminosas bajo estudio, y se hicieron diluciones seriadas inoculando con una alícuota (1,0 ml) a las plántulas crecidas tanto en bolsas, como tubos, similarmente a las diluciones realizadas con suelo, como se describe anteriormente.

También se efectuaron recuentos de estos caldos en platos Petri que contenían el medio de cultivo agar-levadura-manitol más verde brillante.

Las cepas bacteriales utilizadas como controles fueron:

1. TAL 102 para *Glycine max* L. Merrill.
2. TAL 22 para *Phaseolus lunatus* L.
3. CR 409 (CIAT 166) para *Phaseolus vulgaris* L.
4. CR 100 para *Medicago sativa* L..
5. CR 200 (TAL 634) para *Lens culinaris* Med. y *Vicia sativa*
6. CR 100 para *Medicago sativa* L..
7. CR 300 para *Trifolium subterraneum* L..
8. TAL 169 para *Macroptilium atropurpureum* L..
9. TAL 582 para *Leucaena leucocephala* L..
10. TAL 620 para *Cicer arietinum* L.

Al final del período de incubación se registró los datos de las bolsas positivas (noduladas), y negativas (no noduladas). Se utilizó el cuadro 3 a para obtener el número más probable de la población de rhizobia nativo. Así mismo se hicieron correlaciones entre el recuento en plato y la técnica de infección de plantas.

3.4 Ensayo de invernadero

3.4.1 Tratamientos y diseño experimental

En relación con los tratamientos para el ensayo de invernadero se utilizó los siguientes:

- 1.- Con fertilizante N , Sin inoculación (+N , -I).
- 2.- Sin fertilizante N , Con inoculación (-N , +I).
- 3.- Sin fertilizante N , Sin inoculación (-N , -I).

Estos tratamientos se aplicaron a cada una de las leguminosas empleadas. Para el caso del tratamiento inoculado (+I), se utilizó un inoculante preparado localmente a partir de cepas específicas a cada leguminosa. Para ello se utilizó turba esterilizada con rayos como acarreador de las bacterias, y la inoculación se hizo en forma de peletizado siguiendo un procedimiento estandarizado (Somasegaran, P. y Hoben, H., 1985).

Se utilizó un diseño experimental de bloques completos al azar en arreglo factorial de la siguiente manera:

3 tratamientos x 4 especies x 4 repeticiones = 48 macetas.

Los bloques se definieron con base en la distribución de luz en el invernadero durante el día. Cada uno de estos bloques (mesas de madera) constó de 12 macetas (cada maceta fue la unidad experimental), esto es, tres tratamientos por cada una de las cuatro especies de leguminosa empleada.

3.4.2 Recolección del suelo y preparación del material experimental

Después de remover la capa de mantillo y el primer centímetro de la superficie con una pala, se recolectó suelo de seis lugares dentro del sitio elegido en el campo, a una profundidad de 20 cm utilizando para ello un barreno. Las muestras se pasaron a través de un tamiz con malla de 0,5 cm, se mezcló convenientemente, y se puso a secar al aire. Posteriormente se tomó una submuestra y se determinó el contenido de humedad gravimétrica.

Por otra parte, mediante la membrana de presión (Olarte, L. et al 1979) se determinó su contenido de humedad a capacidad de campo (0,033 Mpa de tensión). Se procedió a llenar los maceteros dejando 2 cm del borde libres, y se taparon los hoyos de la parte inferior de los mismos con el fin de evitar pérdidas por el manipuleo. Se determinó el peso neto del suelo secado al aire en cada maceta y considerando el dato de humedad gravimétrica encontrado, se ajustó cada macetero con igual cantidad de suelo.

3.4.3 Manejo del ensayo

Primeramente se realizó una enmienda del pH del suelo, dado que su valor resultó menor de 5,5 (límite para el buen funcionamiento de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa). La enmienda se hizo con Ca(OH)_2 .

después de realizar una curva de titulación del suelo (Shoemaker, H. et al, 1961), de la cual se interpoló para llevar el pH hasta 6,0.

Así mismo, debido a que el ensayo debería ejecutarse bajo condiciones de fertilidad mejoradas, se aplicaron las siguientes dosis de nutrimentos:

Fósforo: 400 mg P kg⁻¹ de suelo seco, adicionado como KH₂PO₄.

Magnesio: 50 mg Mg kg⁻¹ de suelo seco, como MgSO₄.7H₂O.

Nitrógeno: 200 mg N kg⁻¹ de suelo seco, como NH₂-CO-NH₂ dos veces.

Micronutrimentos (Zn, Mo, S, Mn, Fe, Cu, Co, B): 0,25 ml del stock (Somasegaran, P. y Hoben, H., 1985) kg⁻¹ de suelo seco.

Los nutrimentos fueron aplicados en solución antes de la siembra, y posterior a esto cada macetero fue llevado a capacidad de campo con agua destilada.

El Nitrógeno se adicionó en forma de Urea (NH₂-CO-NH₂), 200 mg kg⁻¹ de suelo seco a la siembra y la misma cantidad 20 días después. El propósito de aplicar esta dosis fue para inhibir la nodulación por rizobios nativos.

3.4.4 Siembra

Se sembraron 15 semillas por macetero, y una vez que germinaron, se ralearon hasta dejar 3 plantas uniformes por macetero.

Las especies de leguminosa que se emplearon en este ensayo fueron:

- a). *Phaseolus lunatus* L., cv. Henderson's baby.
- b). *Phaseolus vulgaris* L., cv. Negro huasteco.
- c). *Glycine max* L. Merrill, cv. Ciatsa.
- d). *Glycine max* L. Merrill, cv. Clark isolínea no noduladora.

La soya no noduladora que se empleó sirvió como control absoluto no nodulador, y su crecimiento y desarrollo fue un indicador de la capacidad de la leguminosa para extraer el nitrógeno presente en el suelo.

Por otro lado, el ensayo fue conducido a capacidad de campo del suelo, y la cantidad de agua faltante cada día, se estimó por diferencia de peso y adicionó para su reposición.

Por otra parte, se hizo necesario colocar soportes durante el transcurso del ensayo, debido a que las plantas de *P. lunatus* y *P. vulgaris*, presentaron un tipo de desarrollo trepador, bajo estas condiciones de invernadero.

3.4.5 Cosecha

La cosecha se realizó cuando las diferencias visuales entre tratamientos eran muy evidentes. Esto ocurrió a los 45 días después de la siembra, para el caso de *Phaseolus lunatus* y *P. vulgaris*, y para el caso de *Glycine max* a los 55 días. Las plantas fueron cortadas a ras del suelo, guardadas en bolsas de papel, secadas al horno a 70 °C hasta peso constante, y se determinó la cantidad de materia seca producida. Se molió las plantas y mezcló convenientemente, para determinar el contenido de nitrógeno total en la biomasa aérea por el método Microkjeldahl. Se registró el número y peso seco de los nódulos formados, y de éstos se tomó una submuestra al azar de 40 nódulos (10 por repetición), para los tratamientos no inoculado e inoculado, guardándose para identificación serológica. Otros 40 nódulos (10 por repetición) se separaron para hacer aislamientos. Se determinó la proporción relativa de nódulos efectivos de los tratamientos no inoculados, utilizando para ello una submuestra de 40 nódulos frescos (10 por repetición), registrando los que tenían coloración rojiza en el interior.

3.5 Experimentos de campo

3.5.1 Caracterización preliminar

Para los experimentos de campo se realizó inicialmente un recuento de las malezas presentes, así como su proporción relativa sobre el terreno. Esto se hizo con el fin de tener información que pudiera servir para establecer relaciones entre malezas y los rizobios nativos.

Antes de efectuar cualquier práctica se hizo el muestreo para el recuento del número más probable (NMP), y así se determinó la presencia de rizobios justo antes de la siembra.

3.5.2 Necesidades de cal y encalado de los suelos

Debido a que el pH del suelo resultó inferior a 5,5 en todos los casos (Cuadro 4.4), se hizo necesario encalar los terrenos, lo cual se realizó con un mes de anticipación a la siembra, permitiendo así el conveniente equilibrio en la reacción de encalado. El método empleado para determinar los requerimientos de cal fue el de titulación con Ca(OH)_2 . Bajo este método cantidades conocidas de Ca(OH)_2 fueron adicionadas a recipientes que contenían una cantidad conocida de suelo, y se dejaron en reposo 3-4 días. Posteriormente se tomaron lecturas del pH de las suspensiones suelo:agua y se construyó una curva que relaciona la cantidad de material de encalado, con los valores del pH encontrado.

Tomando como base esta curva (figura 3 a), se interpoló para llevar el pH al valor deseado (6,0).

Se utilizó 984,5 kg de CaCO_3 por experimento para cada uno de los tres sitios, tomando en cuenta la pureza del material empleado y la curva de titulación . No se realizaron curvas para los otros dos sitios por considerar que eran similares en sus características fisicoquímicas, al primer sitio.

3.5.3 Selección de especies leguminosas

Tomando en cuenta los resultados de invernadero, y el recuento del número más probable, se seleccionó las especies leguminosas que se emplearían en los ensayos de campo . Para el sitio en barbecho (experimento 1) estas especies fueron:

- a). *Phaseolus vulgaris* L., cv. Negro huasteco.
- b). *Phaseolus lunatus* L., cv. Henderson's baby.
- c). *Glycine max* L. Merrill, cv. Ciatsa.
- d). *Glycine max* L. Merrill, cv. Clark isolínea no noduladora.

En este experimento se utilizaron las mismas leguminosas que para el ensayo de invernadero. Esto se hizo para observar el comportamiento de las especies bajo dos condiciones diferentes (invernadero y campo).

En el sitio recientemente cultivado con *Phaseolus vulgaris* (experimento 2), se procedió en la misma forma que en el primer experimento. Sin embargo los dos experimentos no pudieron realizarse simultáneamente , debido a que el segundo sitio se encontraba ocupado con el cultivo anterior. Por ello tuvo que postergarse dos meses la siembra en relación con el primer experimento.

Se seleccionó las leguminosas a probar con base en la información del número más probable . Así, las especies fueron:

- a). *Phaseolus vulgaris* L., cv. Negro huasteco.
- b). *Phaseolus lunatus* L., cv. Pinto.
- c). *Glycine max* L. Merrill, cv. Ciatsa.
- d). *Cicer arietinum* L. cv. Giza 519.

Esta última especie no noduló en ninguno de los suelos , tal como puede ser apreciado en el cuadro 4.6.

Para el tercer experimento se seleccionó las siguientes especies de leguminosas:

- a). *Phaseolus vulgaris* L., cv. Turrialba 4.
- b). *Phaseolus lunatus* L., cv. Henderson's baby.
- c). *Glycine max* L. Merrill, cv. Ciatsa.
- d). *Lens culinaris* Med., criolla.

No se encontró rizobios nativos para esta última especie en la determinación del número más probable (cuadro 4.6).

3.5.4 Manejo del experimento

Las prácticas agrícolas realizadas fueron comunes a todas las especies leguminosas. Así, los terrenos se prepararon con arado de discos, y se rastrearon. El encalado se realizó distribuyendo el material al voleo, y se incorporó al suelo por medio de un rotocultivador. Después del tiempo de espera de la reacción de encalado, se volvió a rastrear y se surcó a 0,60 m, y después de uno a dos días se procedió con las siguientes prácticas.

Debido a que los experimentos se harían bajo condiciones de fertilidad mejorada, se aplicó las siguientes dosis de fertilizantes:

K: 200 kg ha⁻¹, aplicando 333,3 kg ha⁻¹ como KCl.

P: 1832 kg ha⁻¹, aplicando 3982,6 kg ha⁻¹ como Ca(H₂PO₄)

N: 900 kg ha⁻¹, aplicando 1956,5 kg ha⁻¹ como NH₂-CO-NH₂.

Mg: 75 kg ha⁻¹, aplicando 750 kg ha⁻¹ como MgSO₄.

Zn: 15 kg ha⁻¹, aplicando 42 kg ha⁻¹, como ZnSO₄.

Mo: 0,5 kg ha⁻¹, aplicado como Na₂MoO₂ · 2 H₂O.

Se aplicó las dosis de fósforo con base en las curvas de sorción, interpolando al valor de 0,2 ug L⁻¹ en la solución del suelo de acuerdo a la técnica de Fox, R. y Kamprath, E. 1972. En efecto se aplicó una alta dosis pues estos suelos tienen una alta capacidad de fijación debido a la presencia de materiales alofánicos.

Así mismo, se adicionó una dosis alta de nitrógeno para inhibir la nodulación por cepas nativas, similarmente al ensayo de invernadero.

Los fertilizantes se mezclaron convenientemente y se aplicaron en el fondo del surco abierto, en bandas concentradas. Después se cubrieron con una capa de tierra de aproximadamente 5,0 cm. El Molibdeno se mezcló con agua y se asperjó en toda la superficie de los experimentos. El nitrógeno se adicionó a una tasa de 150 kg N ha^{-1} cada 2 semanas a partir de la siembra hasta la cosecha; esto se hizo para asegurar un adecuado y consistente nivel del nutrimento en el suelo.

3.5.5 Inoculación de las semillas

Las semillas de las leguminosas fueron inoculadas por medio de la técnica del peletizado utilizando como adherente una solución de goma arábica y agua (1:1). El inoculante se preparó localmente con cepas específicas a cada leguminosa, usando turba esterilizada con rayos como acarreador de las bacterias. Las semillas se sembraron el mismo día de la inoculación.

Las cepas utilizadas para elaborar el inoculante de cada una de las leguminosas en el primer experimento fueron las siguientes:

Cepa NifTAL 22 para *Phaseolus lunatus* L..

Cepa CR 409 (CIAT 166) para *Phaseolus vulgaris* L..

Cepa NIFTAL 102 para *Glycine max* L. Merrill.

Para el segundo experimento (sitio recién cultivado con leguminosa) se utilizó:

Cepa NIFTAL 22 para *Phaseolus lunatus* L.

Cepa CR 409 (CIAT 166) para *Phaseolus vulgaris* L..

Cepa NIFTAL 102 para *Glycine max* L. Merrill.

Cepa NIFTAL 620 para *Cicer arietinum* L..

Finalmente en el tercer experimento (sitio en barbecho) las cepas fueron:

NIFTAL 22 para *Phaseolus lunatus* L..

CR 409 (CIAT 166) para *Phaseolus vulgaris* L.

CR 514 (SEMIA 5019) para *Glycine máx* L. Merrill.

CR 200 (NIFTAL 634) para *Lens culinaris* Med..

3.5.6 Siembra

Para asegurar la densidad recomendada de siembra, se utilizó cintas marcadas a diferentes distancias de acuerdo con la leguminosa. Así, *Phaseolus vulgaris* y *P. lunatus* se sembraron a 5,0 cm de distancia entre plantas, de tal manera de contar con una densidad de 333.333 plantas ha⁻¹. *Glycine Max* se sembró a 5,5 cm de distancia entre plantas,

para obtener una densidad de 300.000 plantas ha^{-1} ; y *Cicer arietinum* y *Lens culinaris* se sembraron a 2,5 cm para tener 666.666 plantas ha^{-1} .

Para prevenir la contaminación de los tratamientos no inoculados, éstos se sembraron en primer término y se cubrieron con tierra.

Inmediatamente después de la siembra se irrigó por aspersión los terrenos, para mantener el suelo lo más cerca de su capacidad de campo. Para lograr lo anterior, se colocaron en sitios estratégicos dentro del terreno dos tensiómetros y se efectuaron lecturas de monitoreo durante el tiempo que duró el experimento. Esta práctica fue realizada únicamente para el primer sitio, ya que en los dos restantes el suelo se mantuvo siempre a capacidad de campo debido a las buenas lluvias (1700 mm de precipitación bien distribuidos en el período enero-agosto 1988).

3.5.7 Control de plagas

En relación con la protección sanitaria del cultivo, se controló las plagas una vez que aparecieron los primeros daños, e inclusive se previnieron éstos por medio de insecticidas sistémicos. Se aplicó Lorsban granulado para plagas del suelo en dosis de 10,0 kg ha^{-1} ; Mirex en dosis de 1,0 kg ha^{-1} para hormiga arriera; Tamarón en dosis de 2,0 lts ha^{-1} para insectos del follaje; Benlate se aplicó también para controlar enfermedades fungosas en dosis de 1,0 kg ha^{-1} .

Las malezas se controlaron manualmente en todos los casos.

3.5.8 Cosecha temprana

Se realizó una cosecha temprana para muestrear biomasa, contenido de Nitrógeno en biomasa aérea y nodulación (número y peso) a los 42 días para el primer experimento. Para el segundo y tercero se hizo a los 40 y 38 días respectivamente, . El área cosechada fue de 3,0 m² (1,2 m x 2,5 m) tal como se muestra en la figura 8 a. Se marcó con estacas el área a cosechar, y las plantas fueron cortadas a ras del suelo, registrándose el número de ellas, y se secaron a peso constante a 70 °C en horno con aire forzado. Posteriormente se pesó, molió y mezcló convenientemente para determinar contenido de nitrógeno en la biomasa aérea, a cada tratamiento, en todas las parcelas.

Así mismo, se seleccionó 10 sistemas radicales de los tratamientos inoculado y no inoculado (I y U). Se excavó y se extrajo, guardándose en bolsas plásticas, luego se removi6 los n6dulos formados para su recuento, secado y pesado. Se seleccion6 40 n6dulos (10 por repetic6n) de cada uno de los tratamientos y en lugar de secarlos en el horno se introdujo en viales con s6lica gel, para deshidratarlos y guardarlos a 26 °C.

3.5.9 Cosecha final

La cosecha final de las leguminosas se realiz6 a madurez de cosecha, en una etapa de desarrollo del cultivo identificada como R9, la cual se

caracteriza porque en ella las plantas inician la decoloración y secado de las vainas. Un cultivo inicia esta etapa cuando la primer vaina inicia su decoloración y secado, en el 50% de las plantas (Fernandez, F. et al 1985). Esto se hizo dentro del área útil como se presenta en el diagrama de la figura 8, a. Las plantas fueron cortadas a ras del suelo, se registró su número, se removi6 las vainas, y finalmente las plantas fueron secadas al horno a peso constante a 70 °C para determinación de materia seca producida. Se removi6 los granos de las vainas y se determinó su contenido de humedad. Así mismo se calculó rendimientos e índice de cosecha por especie.

3.5.10 Tratamientos y diseño experimental

Los tratamientos utilizados en los tres experimentos de campo fueron los siguientes:

1. Con fertilizante N , Sin inoculación (+N , -I).
2. Sin fertilizante N , Con inoculación (-N , +I).
3. Sin fertilizante N , Sin inoculación (-N , -I).

Estos fueron aplicados a las especies leguminosas utilizadas en cada experimento.

Se utilizó un diseño experimental de parcelas divididas en un arreglo factorial, en donde las especies fueron asignadas a la parcela principal, y las tres fuentes de nitr6geno (fertilizante N, inoculado y

no inoculado), se asignaron a las subparcelas. Cada experimento contó con cuatro repeticiones repartidas perpendicularmente al gradiente de fertilidad encontrado. Las figuras 5 a, 6 a y 7 a muestran la distribución de los tratamientos en los tres experimentos efectuados.

3.6 Análisis estadístico de los datos

Se realizó el análisis estadístico para todos los experimentos empleando el programa Statistical Analysis System (SAS) y se determinó análisis de varianzas, comparaciones múltiples de medias por las pruebas Duncan y Tukey. Así mismo se efectuó regresiones entre la cantidad de rizobios nativos y el incremento obtenido en las variables materia seca, contenido de N total y rendimiento en grano, para ajustar un modelo de tipo hiperbólico propuesto por el proyecto NIFTAL de la Universidad de Hawaii de formula general:

$$Y = a + b (1/(\log x + 1))$$

donde x es el numero de rizobios nativos; así mismo se ajustó los datos a otros 14 modelos contenidos en el programa Int2vars del paquete estadístico Palmer's, para encontrar el que se ajustara mejor.

3.7 Tipificación serológica de los nódulos

Se utilizó técnicas serológicas en reacciones de inmunofluorescencia, para identificar el origen (nativas o inoculadas) de las cepas que

colonizaron los nódulos formados tanto en el ensayo de invernadero, como en los experimentos de campo.

Esencialmente esta técnica consiste en utilizar para fines diagnosticos los antígenos superficiales -sustancias que provocan una respuesta inmune cuando se introducen a tejido animal o humano-, y los anticuerpos producidos contra los mismos , cuando se inocula una suspensión bacteriana en un animal generalmente un conejo.. Esta reacción altamente específica, ocurre cuando los anticuerpos reaccionan con el antígeno en este caso superficial que provocó su formación. Los anticuerpos producidos son entonces conjugados con una sustancia capaz de fluorescer cuando se excita con luz azul, el tinte químico isotiocianato de fluoresceína. De esta manera se es posible determinar cual bacteria infectó el nódulo.

Ya se disponía de antisueros marcados para las cepas TAL 102 (*B. japonicum*) , TAL 22 (*R. misceláneo tipo Caupí*) y CR 514 (*B. japonicum*), y para las cepas CR 409 (CIAT 166) de *R. leg. bvr. phaseoli*, y CR 200 para *R. leg bvr.vicea* tuvo que prepararse. El procedimiento general utilizado para la preparación de los antisueros fue el indicado por Somasegaran, P. y Hoben, H. (1985).

Una vez teniendo preparados los antisueros específicos a cada cepa, se procedió a la tipificación de los nódulos siguiendo la técnica de inmunofluorescencia directa para el *Bradyrhizobium japonicum* e indirecta para *R. leg bvr.vicea* Esta técnica consistió básicamente en preparar frotis de bacteroides en portaobjetos, directamente a partir de nódulos

seccionados. Los frotis se pusieron en contacto con el anticuerpo específico marcado con el isotiocianato de fluoresceína. Después de un lavado apropiado de los frotis con solución salina buferizada, se observaron en un microscopio de fluorescencia marca Nikon, Tokio Japon, modelo Fluophot con aditamento para epifluorescencia, marca Nikon Kogaku. Se utilizó un objetivo de fluorita 20X con una apertura numérica de 0,75, que resolvía con facilidad las bacterias y un filtro de excitación IF-420-490, un espejo dicroico DM505 y otro filtro de barrera 515 W. Una fluorescencia naranja-verde, se observó en el caso que hubo reacción con el anticuerpo y ausencia de la misma respectivamente. Se registró el porcentaje de ocupación de los nódulos por cada cepa, en todas las especies leguminosas.

4.- RESULTADOS

4.1 Caracterización de los sitios

4.1.1 Recuento de malezas

Se realizó un recuento de las malezas presentes en los tres sitios, caracterizándose en términos de distribución relativa sobre el terreno, la familia a que pertenecen y su vía fotosintética. Para ello se utilizó un cuadrángulo de 1,0 m por lado y se hizo recuentos de las especies presentes dentro del área comprendida en el cuadrángulo, realizándose en cuatro lugares distintos dentro de cada sitio; posteriormente se calculó los porcentajes relativos de cada especie encontrada. Las dos últimas características se determinaron haciendo uso de la literatura disponible (Downton, W. 1975; Raghavendra, A. et al. 1978). Enseguida se presentan los resultados para cada uno de los sitios.

4.1.1.1 Experimento 1: sitio en barbecho

En el cuadro 4.1 se presenta la lista de malezas existentes en el primer experimento. Se aprecia que *Melampodium perfoleatum*, planta de la familia *Asteraceae* y de vía fotosintética C_3 , fue la maleza predominante con un 30% relativo. *Eleusine indica* de la familia *Poaceae* y vía C_4 ocupó un 15% relativo sobre el terreno, al igual que *Mimosa pudica*

Cuadro 4.1. Composición florística de malezas en el sitio 1*, Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica.

Espece	Proporción relativa sobre el terreno (%)	Familia	Vía Fotosintética
<u>Melampodium perfoleatum</u>	30	Asteraceae	C3
<u>Eleusine indica</u>	15	Poaceae	C4
<u>Mimosa pudica</u>	15	Fabaceae	C3
<u>Bidens pilosa</u>	6	Asteraceae	C3
<u>Cyperus rotundus</u>	6	Cyperaceae	C4
<u>Paspalum sp.</u>	6	Poaceae	C4
<u>Aeschynomine sp.</u>	1	Fabaceae	C3
<u>Browelia americana</u>	1	Solanaceae	C3
<u>Eclipta alba</u>	1	Asteraceae	C3
<u>Digitaria adscendens</u>	1	Poaceae	C4
<u>Emilia fosbergii</u>	1	Asteraceae	C3
<u>Galinsoga ciliata</u>	1	Asteraceae	C3
<u>Pylea Hyalina</u>	1	Urticaceae	C3
<u>Richardia scabra</u>	1	Rubicaceae	C4
<u>Rottboellia cochinchinensis</u>	1	Poaceae	C3
<u>Sida acuta</u>	1	Malvaceae	C4
<u>Spananthe paniculatum</u>	1	Umbelliferae	C4
<u>Xanthosoma robustum</u>	1	Araceae	C3
Total	100 %		

* Sitio 1 (lote N^o 6) en barbecho

familia *Fabaceae* y vía C₃. Con un 6% relativo se presentó *Bidens pilosa* (C₃), *Cyperus rotundus* (C₄) y *Paspalum* sp (C₄). Otras malezas aparecieron con menor densidad que las anteriores, tal como puede notarse en el cuadro mencionado.

4.1.1.2 Experimento 2: sitio recientemente cultivado

Las malezas presentes en el segundo experimento se detallan en el cuadro 4.2. Cabe aclarar que estas malezas crecieron entre el período transcurrido desde la cosecha del cultivo leguminoso anterior (*Phaseolus vulgaris*), hasta la siembra del experimento, en un lapso de 45-50 días, y es precisamente esta población de malezas la que se caracterizó.

Observando el cuadro se aprecia que no hubo predominancia de alguna maleza en particular sobre las demás, siendo las más frecuentes las de la familia *Asteraceae* con un 45%. Las especies *Richardia scabra* y *Drimaria cordata* ocuparon 17% y 15% respectivamente. Así mismo, *M. perfoleatum* maleza predominante en el primer sitio, ocupó esta vez un 10% relativo; todas las malezas antes mencionadas poseen vía fotosintética C₃. Las malezas que aparecieron en menor densidad pueden apreciarse en el cuadro mencionado.

Cuadro 4.2. Composición florística de malezas en el sitio 2 (lote Nº 7) ^{1/}
Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica

Espece	Proporción relativa sobre el terreno (%)	Familia	Vía Fotosintética
<u>Galinsoga ciliata</u>	25	Asteraceae	C3
<u>Synedrella nodiflora</u>	20	Asteraceae	C3
<u>Richardia scabra</u>	17	Rubiaceae	C3
<u>Drymaria cordata</u>	15	Caryophyllaceae	C3
<u>Melanpodium perfoliatum</u>	10	Asteraceae	C3
<u>Brachiaria mutica</u>	4	Poaceae	C4
<u>Borreria laevis</u>	2	Rubiaceae	C3
<u>Digitaria adscendens</u>	2	Poaceae	C4
<u>Commellina diffusa</u>	2	Commelinaceae	C3
<u>Mimosa pudica</u>	1	Fabaceae	C3
<u>Portulaca oleraceae</u>	2	Portulacaceae	C4
Total	100%		

^{1/} Determinación realizada antes de la preparación del terreno para la siembra. Malezas crecieron después de un ciclo de siembra de frijol.

4.1.1.3 Experimento 3: sitio en barbecho

La información sobre malezas del tercer experimento se detalla en el cuadro 4.3. Las plantas de las familias *Poaceae* y *Cyperaceae* fueron las más abundantes con un 60% relativo las primeras y 10% las últimas. Así mismo *Paspalum* sp. ocupó un 7% relativo . Todas las malezas anteriormente mencionadas tienen vía fotosintética C₄. Las especies que se presentaron en menor proporción que las anteriores pueden observarse en el cuadro mencionado.

4.1.2. Descripción de perfiles típicos de los suelos

Para la caracterización de los perfiles típicos de los suelos estudiados, se decidió utilizar la descripción realizada por Aguirre, V. (1971), para la fase pedregosa de la serie Instituto, y la de Rice, O. y Burgos, C. (1982), para la serie Instituto normal. Ambas descripciones se presentan en los cuadros 4 a y 5 a, los cuales no contienen resultados de análisis fisicoquímicos. Para la consecución de los objetivos particulares de este estudio, se efectuaron estos análisis únicamente para los 20 cm superficiales (zona de mayor actividad microbiológica).

Cuadro 4.3. Composición florística de malezas en sitio 3 (lote N^o 1). Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica.

Espece	Proporción relativa sobre el terreno (%)	Familia	Vía Fotosintética
<u>Digitaria adscendens</u>	60	Poaceae	C4
<u>Brachiaria mutica</u>	10	Poaceae	C4
<u>Cyperus rotundus</u>	10	Cyperaceae	C4
<u>Paspalum commersonii</u>	7	Poaceae	C4
<u>Galinsoga ciliata</u>	7	Asteraceae	C3
<u>Aeschynomine sp.</u>	3	Fabaceae	C3
<u>Bidens pilosa</u>	2	Asteraceae	C3
<u>Mimosa pudica</u>	1	FABaceae	C3
Total	100%		

Sitio 3 (lote N^o1) en barbecho

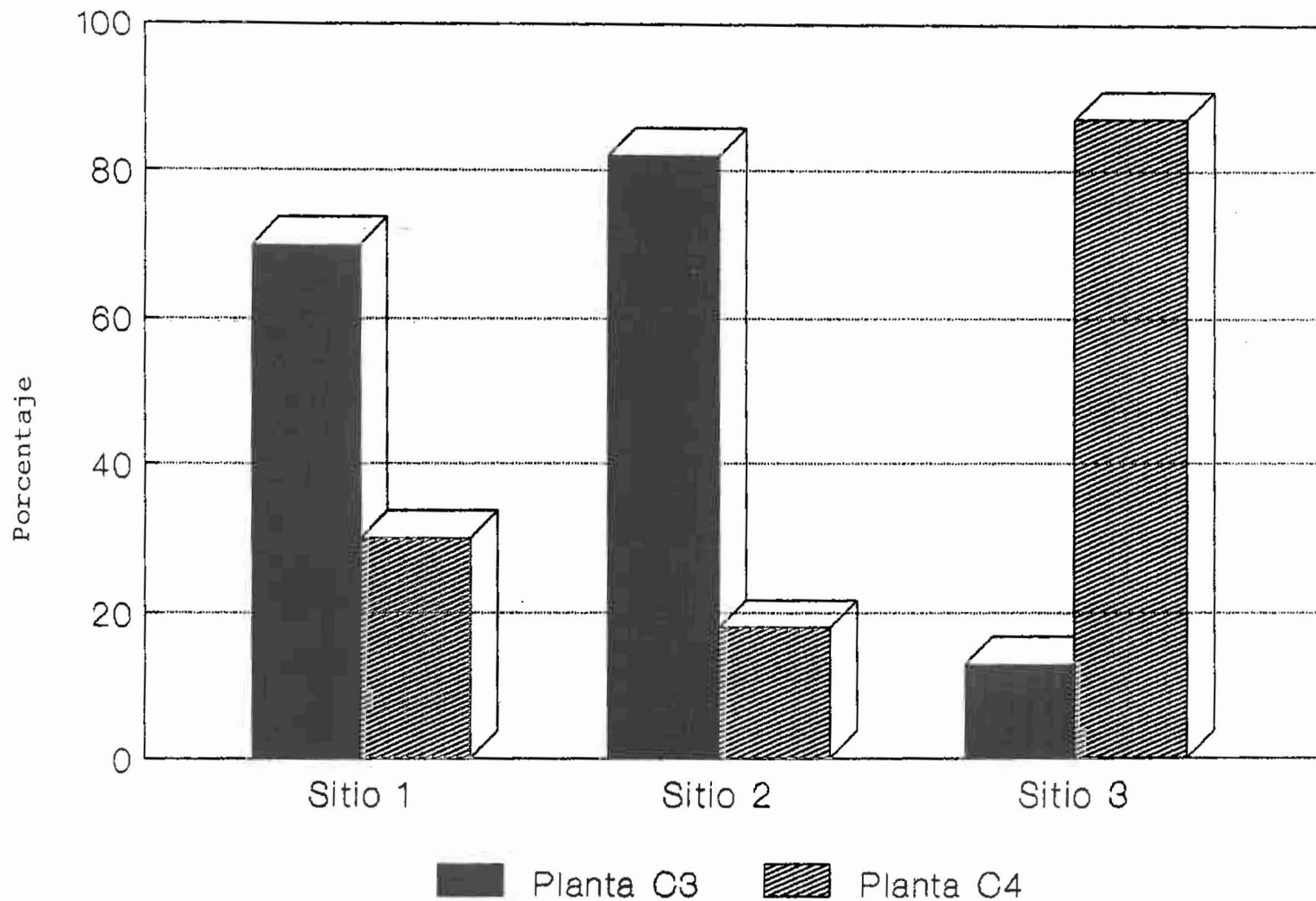


Figura 4.1. Vía fotosintética de las malezas encontradas en los sitios de campo 1, 2 y 3 (lotes 6, 7 y 1); Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica.

4.1.3. Características físicas de los suelos

4.1.3.1 Textura

Los análisis granulométricos de los tres suelos se presentan en el cuadro 4.4. Se nota que los suelos uno y dos (Instituto pedregoso) fueron prácticamente iguales en sus proporciones relativas de arena, limo y arcilla, ubicándose en la misma clase textural: arcilla, mientras que en el suelo tres (Instituto normal) disminuyó el contenido de arena y aumentó la proporción de limo y arcilla, lo que originó que éste suelo se ubicara en la clase textural arcilla-limosa.

Por medio del análisis granulométrico se califica al tercer suelo como de textura más fina que los otros dos, y en consecuencia la difusión de agua a través de él, tenderá a ser un poco más lenta , y así, la humedad en este sitio será mantenida por más tiempo, con el consiguiente beneficio para la actividad microbiana.

4.1.3.2. Densidad aparente

Se observa en el cuadro 4.4 que los suelos en barbecho no difieren grandemente entre sí, y que en relación con el suelo dos (cultivado) muestran una ligera diferencia, aparentemente debido a las labores de mecanización, que aumentan la proporción de poros y en consecuencia el valor de la densidad aparente tiende a bajar, lo que ocasiona que la difusión de agua y aire sea más eficiente en este sitio.

Cuadro 4.4. Características fisicoquímicas de los suelos de sitios estudiados, Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica.

PROPIEDAD	S I T I O		
	1 (Instituto pedregoso)	2 (Instituto normal)	3 (Instituto normal)
Arena %	22,4	22,4	12,5
Limo %	33,6	32,6	40,3
Arcilla %	44,0	45,0	47,2
Clase textural	Arcilla	Arcilla	Arcilla - limosa
Materia orgánica %	4,82	4,89	4,62
$p^H \cdot H_2 O (1:1)$	5,07	5,18	5,27
$p - KCl (1:1)$	3,85	3,99	3,95
Nitrógeno total %	0,3	0,3	0,3
$N - NH_4 + (ug g^{-1})$	1,47	1,13	1,81
$N - NO_3 - (ug g^{-1})$	0,29	0,30	0,50
Fósforo ($ug g^{-1}$)	17,65	17,65	15,13
Potasio $Cmol (+) Kg^{-1}$	0,25	0,27	0,59
Calcio $Cmol(+) kg^{-1}$	4,83	5,17	5,95
Magnesio $Cmol (+) kg^{-1}$	1,04	1,08	1,45
Aluminio $Cmol (+) kg^{-1}$	0,30	0,40	0,50
Acidez extraíble $Cmol (+) kg^{-1}$	0,60	0,55	1,10
Cobre ($ug g^{-1}$)	24,60	25,00	24,30
Zinc ($ug g^{-1}$)	4,07	4,09	6,00
Manganeso ($ug g^{-1}$)	6,50	7,40	41,60
C.I.C.E. $Cmol (+) Kg^{-1}$	6,42	6,92	8,49
Saturación de bases (%)	95,33	94,22	94,11
Densidad aparente ($g cc^{-1}$)	1,13	1,12	1,11
Humedad a 0.33 Kpa (%)	32,00	31,65	32,50
Humedad a 15 Kpa (%)	24,24	24,40	24,60

Sitios 1, 2 y 3 clasificados como Humitropept típico fino haloisítico isohipertérmico

4.1.3.3. Retención de humedad

El agua retenida entre 0,033 y 1,500 MPa de tensión (agua aprovechable) fue baja en los tres suelos (cuadro 4.4), correspondiendo al suelo 3 la mayor cantidad retenida, ya que fue de 7,9% contra 7,76% del suelo uno, y 7,25% del suelo dos. De acuerdo con Kass, D. (1987) esta baja disponibilidad de agua se debe a que existe baja proporción de poros capilares entre los agregados estructurales, en comparación con los macro y microporos, causando con ello menos efectividad para la retención del agua aprovechable.

4.1.4. Características químicas del suelo

4.1.4.1. pH

Los resultados alcanzados para pH en agua (1:1) se aprecian en el cuadro 4.4, siendo ligeramente menos ácido el suelo Instituto normal. Para el caso del pH en KCl 1N (1:1) se observó una disminución promedio de 1,5 unidades en los valores, en relación con la determinación en agua. De acuerdo con Peech, M. (1965) la determinación del pH en KCl 1N refleja mejor las características intrínsecas del suelo, al estar menos influenciado por los cambios en las condiciones biológicas y meteorológicas. La interpretación de los análisis consideran a los tres suelos como moderadamente ácidos.

4.1.4.2. Materia orgánica

Los suelos uno y dos fueron prácticamente iguales en su contenido de materia orgánica (4,82 y 4,89% respectivamente), y el suelo tres mostró valores un poco menores al registrar 4,62%. Así se puede considerar el contenido de materia orgánica de los tres suelos, como alto.

4.1.4.3. Nitrógeno total

Los valores encontrados para los tres suelos fueron prácticamente iguales entre sí, y corresponden aproximadamente a un 0,6% en contenido de nitrógeno total en relación con los valores de materia orgánica, proporción que está dentro del rango informado por Bremner, J. (1965), y aceptado por la mayoría de investigadores.

4.1.4.4. Nitrógeno- NH_4^+

Se nota en el cuadro 4.4 que las cantidades para N-NH_4^+ son muy bajas para los tres suelos, ya que no alcanzaron el valor de 2,0 ppm en todos los casos.

4.1.4.5. Nitrógeno- NO_3^-

Similarmente al caso anterior se aprecia en el cuadro 4.4 que los nitratos estuvieron prácticamente ausentes de los suelos, al presentar valores inferiores a 1,0 ppm en todos los casos.

4.1.4.6 Capacidad de intercambio catiónica efectiva

Con la sumatoria de los cationes Ca^{++} , Mg^{++} , K^+ , Na^+ y la acidez extraíble, se determinó la C.I.C.E., resultando en valores prácticamente iguales para los suelos uno y dos (6,42 y 6,92 meq 100 g^{-1} de suelo correspondientemente), y ligeramente mayor para el suelo tres (8,49 meq 100 g^{-1} de suelo).

4.1.4.7 Isotherma de sorción de Fósforo

En la figura 4 a se presenta la curva de sorción de P para el suelo 1. En la técnica descrita por Fox, R. y Kamprath, E. (1970) se considera que debe existir 0,2 ppm de P en la solución del suelo para no tener deficiencias en la mayoría de los cultivos. Con los resultados obtenidos se representó en papel semilogarítmico el P-adsorbido vs. el P-solución en ug ml^{-1} , y a partir de esta figura se interpoló para obtener la cantidad de P adsorbido por el suelo, encontrando el valor de 400 ug de P. Se transformó a P_2O_5 y posteriormente a kg ha^{-1} , arrojando

un valor de 1832 kg de P_2O_5 a aplicar para superar el mecanismo de retención.

Por considerar que esta cantidad cubría holgadamente los requisitos de todas las especies leguminosas a emplear, no se realizaron isoterms de sorción para los suelos dos y tres.

4.2 Determinación del número más probable de rizobios

4.2.1 Población nativa de rizobios en el sitio 1.

Los resultados obtenidos en el experimento 1, para estimar la población nativa de rizobios, utilizando la técnica de infección de plantas se presentan en el cuadro 4.5. Se aprecia que hubo ausencia de *Rhizobium leguminosarum* biovar *vicea*, *R. leg. bvr. meliloti*, *R. leg. bvr. trifolii* y *R. leg. bvr. lupini*. La población de *Rhizobium phaseoli* registró una densidad de 32.000 bacterias g^{-1} suelo seco; *Rhizobium* misceláneo tipo caupí se presentó con una población de 21.100 bacterias g^{-1} suelo seco, y en menor cantidad se ubicó *Bradyrhizobium japonicum* con una densidad de 2.200 bacterias g^{-1} suelo seco.

4.2.2 Población nativa de rizobios en el sitio 2

Se nota en el cuadro 4.5 que el *Rhizobium* misceláneo tipo caupí fue el más abundante, con una población de 32.100 bacterias g^{-1} suelo seco. El

Cuadro 4.5. Recuento de rizobios nativos en los tres sitios estudiados, Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica.

Sitio	Número de rizobios g ⁻¹ suelo seco x 1.000 ^{1/}						
	<u>Rhizobium</u> <u>legumino-</u> <u>sarum</u> biovar <u>viceae</u>	<u>Bradyrhizobium</u> <u>japonicum</u>	<u>Rhizobium</u> <u>legumino-</u> <u>sarum</u> biovar <u>meliloti</u>	<u>Rhizobium</u> <u>legumino-</u> <u>sarum</u> biovar <u>phaseoli</u>	<u>Rhizobium</u> <u>legumino-</u> <u>sarum</u> biovar <u>trifoli</u>	<u>Rhizobium</u> misceláneo tipo <u>caupi</u>	<u>Rhizobium</u> <u>legumino-</u> <u>sarum</u> biovar <u>lupini</u>
En barbecho (suelo 1)	0	2,2	0	32	0	21	0
Recién cultivado (suelo 2)	0	0,1	0	5,2	0	32	0
En barbecho (suelo 3)	0	0,6	0	52	0	35	0

Suelo 1-lote Nº 6

Suelo 2-lote Nº 7

Suelo 3- lote Nº 1

1/ Valores tienen un 95% de confiabilidad y 2,7 como factor para intervalo de confianza en tablas del número más probable

Rhizobium leguminosarum biovar *phaseoli* registró una densidad de 5.200 bacterias g^{-1} suelo seco; y el *Bradyrhizobium japonicum* fue también en este terreno el menos abundante con una población de 100 bacterias g^{-1} suelo seco. Los otros grupos de *Rhizobium* estuvieron también ausentes en este segundo sitio.

4.2.3 Población nativa de rizobios en el sitio 3

Los resultados alcanzados en el experimento 3 (barbecho) se presentan también en el cuadro 4.5. Se nota la misma tendencia que en el primer sitio en barbecho. Así, *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* fue la bacteria más numerosa con una densidad de 52.000 bacterias g^{-1} suelo seco; *Rhizobium* misceláneo tipo caupí registró una población de 35.000 bacterias g^{-1} de suelo seco, y la densidad más baja correspondió a *Bradyrhizobium japonicum* con 560 bacterias g^{-1} suelo seco. *Rhizobium leguminosarum* biovar *vicea*, *R. leg. bvr. meliloti*, *R. leg. bvr. trifolii* y *R. leg. bvr. lupini* estuvieron también ausentes en este suelo.

4.2.4 Recuento en plato vs. técnica de infección de plantas

Los recuentos de los rizobios utilizando cepas específicas como controles a cada leguminosa hospedero (recuento en plato e infección de plantas) son presentados en el cuadro 4.6. Se observa que las poblaciones de rizobios estimadas por los recuentos en platos, fueron

Cuadro 4.6. Comparación de la técnica de infección de plantas mediante el procedimiento de número más probable y el recuento en plato.

Leguminosa hospedero utilizada	Recuento 1		Recuento 2		Recuento 3	
	(Nº x 10)		(Nº x 10)		(Nº x 10)	
	Recuento de plato	Infección de plantas	Recuento de plato	Infección de plantas	Recuento de plato	Infección de plantas
<u>Glycine max</u>	100	28	200	5	60	1,8
<u>Trifolium subterraneum</u>	50.000	28			15	0,6
<u>Macroptilium atropurpureum</u>	70.000	7	60	1,8	100	1,8
<u>Leucaena leucocephala</u>	200	0.6				
<u>Medicago sativa</u>	50.000	10			100	1,3
<u>Phaseolus lunatus</u>			500	3,5	100	1,8
<u>P. vulgaris</u>			250	7,1	200	1,8
<u>Vicia sativa</u>			2,5	0,9	45	0,5
<u>Cicer arietinum</u>					45	0,6
<u>Leus culinaris</u>					45	1,3

siempre mayores, comparadas con la técnica de infección de plantas. Por ejemplo para *Bradyrhizobium japonicum* (microsimbionte de *Glycine max*) la población estimada por el recuento en plato fue de $1,0 \times 10^9$, y $2,8 \times 10^8$ bacterias g^{-1} de suelo seco por la técnica de infección de plantas, y así en general para las otras especies de rizobios encontrados.

4.3 Análisis estadístico de los datos

En los cuadros 4.7 y 4.8 se presenta los resultados de los análisis de varianza para los datos del ensayo de invernadero, de las variables porcentaje de N en biomasa aérea, materia seca producida, número y peso seco de nódulos. Para las dos variables mencionadas en primer término se realizó una transformación logarítmica de los datos, la cual pudo hacerse dado que las varianzas y las medias de ambas variables se correlacionaron positivamente: el incremento de una se correspondió con la otra. Esta transformación permitió obtener un coeficiente de variación de menor magnitud y un coeficiente de determinación (R^2) más alto, que cuando se analizó los datos sin esta transformación matemática.

En general se rechazó la hipótesis nula de igualdad entre especies leguminosas en relación con cada variable estudiada. Se rechazó la hipótesis nula para igualdad entre tratamientos. Así mismo hubo interacción entre las especies con las fuentes de nitrógeno, lo que justificó realizar el análisis estadístico por separado tal como se

Cuadro 4.7. Análisis de varianza del contenido de N total (mg/planta) de las diferentes leguminosas crecidas en invernadero, CATIE, Turrialba, Costa Rica

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Prob > F
Especie	3	4,3076	1,4358	73,61	0,0001**
Fuente de N	2	3,4209	1,7104	87,68	0,0001**
Bloque	3	0,0077	0,0025	0,13	0,9405NS
Especie *FN	6	0,5896	0,0982	5,04	0,0009*

NS = No hay diferencia significativa

** = Diferencia altamente significativa al 1% de error

* = Diferencia altamente significativa al 5% de error

Cuadro 4.7a. Análisis de varianza de la producción de materia seca (g/planta) de las diferentes leguminosas crecidas en invernadero, CATIE, Turrialba, Costa Rica

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Prob > F
Especie	3	3,2754	1,0918	102,64	0,0001**
Fuente de N	2	0,6949	0,3474	32,67	0,0001**
Bloque	3	0,0245	0,0081	0,77	0,5202NS
Especie *FN	6	0,0452	0,0075	0,71	0,6442NS

NS = No hay diferencia significativa

** = Diferencia altamente significativa al 1% de error

* = Diferencia altamente significativa al 5% de error

Cuadro 4.8. Análisis de varianza del número de nódulos (nódulos/planta) producidos por las diferentes leguminosas crecidas en invernadero, CATIE, Turrialba, Costa Rica

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Prob > F
Especie	3	796,8333	265,6111	0,32	0,8093NS
Fuente de N	2	107473,5833	53736,7916	65,17	0,0001**
Bloque	1	5340,1666	5340,1666	6,48	0,0224*
Especie *FN	2	2436,5833	1218,2916	1,48	0,2596NS

NS = No hay diferencia significativa

** = Diferencia altamente significativa al 1% de error

* = Diferencia altamente significativa al 5% de error

Cuadro 4.8a. Análisis de varianza del peso seco de nódulos (mg/planta) producidos por las diferentes leguminosas crecidas en invernadero, CATIE, Turrialba, Costa Rica

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Prob > F
Especie	3	15965,1250	5321,7083	0,33	0,8057NS
Fuente de N	2	169786,3333	84893,1666	5,22	0,0190*
Bloque	1	344880,3750	344880,3750	21,21	0,0003**
Especie *FN	2	343753,0000	343753,000	10,57	0,0014*

NS = No hay diferencia significativa

** = Diferencia altamente significativa al 1% de error

* = Diferencia altamente significativa al 5% de error

presenta. Se hizo comparaciones múltiples entre las medias de todos los tratamientos por medio de las pruebas Duncan y Tukey.

En relación con los tres experimentos de campo, en los cuadros 4.9 a 4.14, se presenta los resultados alcanzados para el análisis de varianza de las variables porcentaje de N en biomasa aérea, materia seca producida, número de nódulos y peso seco de nódulos. Al igual que para el ensayo de invernadero se realizó la misma transformación matemática en las dos primeras variables mencionadas. Para la variable rendimiento en grano en el experimento de campo 1 tuvo que analizarse como bloques incompletos al estar desbalanceados los datos. Se hizo pruebas de t para las comparaciones múltiples entre las medias de los tratamientos de este ensayo. En los experimentos de campo 2 y 3, las comparaciones múltiples se hicieron por medio de pruebas Duncan y Tukey. Se realizó una regresión entre el número de rizobios nativos y el incremento en cada variable, probándose el ajuste a un modelo hiperbólico obtenido en ensayos similares por otros investigadores (cuadro 4.26). También se probó su ajuste a varios modelos no lineales, los cuales se presentan en el cuadro 4.27. Se aprecia en este último cuadro las ecuaciones generales de los modelos probados, su coeficiente de determinación R^2 y la significancia para cada uno de ellos; así mismo en la figura 4.12 se puede observar la tendencia en el comportamiento de las variables evaluadas contra la población nativa de rizobios utilizando el modelo hiperbólico propuesto; también en la figura 4.13 se puede observar la tendencia en el comportamiento de las variables al utilizar los modelos que mejor ajustaron en términos del coeficiente de determinación R^2 más

Cuadro 4.9. Análisis de varianza del contenido de N total (mg/planta) de las diferentes leguminosas crecidas en el experimento de campo 1, CATIE Turrialba, Costa Rica

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Prob > F
Bloque	3	0,0892	0,0297	1,80	0,1734NS
Especie	3	15,4684	5,1561	312,78	0,0001**
Especie * Bloque	9	1,1704	0,1300	7,89	0,0001**
FN	2	3,6512	1,8256	110,75	0,0001**
Especie* FN	6	0,3266	0,0544	3,30	0,0163*

NS = No hay diferencia significativa

** = Diferencia altamente significativa al 1% de error

* = Diferencia altamente significativa al 5% de error

Cuadro 4.9a. Análisis de varianza de la producción de materia seca (g/planta) de las diferentes leguminosas crecidas en el experimento de campo 1, CATIE, Turrialba, Costa Rica

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Prob > F
Bloque	3	0,0987	0,0329	3,97	0,0197*
Especie	3	15,2743	5,0914	614,65	0,0001**
Especie * Bloque	9	0,7042	0,0782	9,45	0,0001**
FN	2	1,6978	0,8489	102,48	0,0001**
Especie* FN	6	0,1519	0,0025	3,06	0,0229*

NS = No hay diferencia significativa

** = Diferencia altamente significativa al 1% de error

* = Diferencia altamente significativa al 5% de error

Cuadro 4.10. Análisis de varianza del número de nódulos (nódulos/planta) producidos por las diferentes leguminosas crecidas en el experimento de campo 1, CATIE, Turrialba, Costa Rica

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Prob > F
Bloque	3	431,00	143,666	0,83	0,5102NS
Especie	2	10736,583	5368,291	31,01	0,0001**
Especie * Bloque	6	1673,750	278,958	1,61	0,2495NS
FN	1	2948,166	2948,166	17,03	0,0026**
Especie* FN	2	6255,583	3127,791	18,07	0,0007**

NS = No hay diferencia significativa

** = Diferencia altamente significativa al 1% de error

* = Diferencia altamente significativa al 5% de error

Cuadro 4.10a. Análisis de varianza del peso seco de nódulos (mg/planta) producidos por las diferentes leguminosas crecidas en el experimento de campo 1, CATIE, Turrialba, Costa Rica

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Prob > F
Bloque	3	3319,666	1106,555	7,81	0,0071**
Especie	2	1409,2500	704,625	4,97	0,0351**
Especie * Bloque	6	2525,0833	420,847	2,97	0,0694NS
FN	1	580,1666	580,166	4,09	0,737NS
Especie* FN	2	1990,5833	995,291	7,02	0,0145*

NS = No hay diferencia significativa

** = Diferencia altamente significativa al 1% de error

* = Diferencia altamente significativa al 5% de error

Cuadro 4.11..Análisis de varianza del contenido de N total (mg/planta) de las diferentes leguminosas crecidas en el experimento de campo 2, CATIE, Turrialba, Costa Rica

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Prob > F
Bloque	3	0,1742	0,0580	2,58	0,0768NS
Especie	3	14,2369	4,7456	211,07	0,0001**
Especie * Bloque	9	0,3622	0,0402	1,79	0,1228NS
FN	2	3,2580	1,629	72,45	0,0001**
Especie* FN	6	0,4953	0,0825	3,67	0,0099*

NS = No hay diferencia significativa

** = Diferencia altamente significativa al 1% de error

* = Diferencia altamente significativa al 5% de error

Cuadro 4.11a. Análisis de varianza de la producción de materia seca (g/planta) de las diferentes leguminosas crecidas en el experimento de campo 2, CATIE, Turrialba, Costa Rica

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Prob > F
Bloque	3	0,0749	0,0249	1,64	0,2076NS
Especie	3	12,5507	4,1835	273,66	0,0001**
Especie * Bloque	9	0,2445	0,0271	1,78	0,1257NS
FN	2	0,6748	0,3374	22,07	0,0001**
Especie* FN	6	0,1989	0,0331	2,17	0,0821NS

NS = No hay diferencia significativa

** = Diferencia altamente significativa al 1% de error

* = Diferencia altamente significativa al 5% de error

Cuadro 4.12. Análisis de varianza del número de nódulos (nódulos/planta) producidos por las diferentes leguminosas crecidas en el experimento de campo 2, CATIE, Turrialba, Costa Rica

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Prob > F
Bloque	3	1954,50	651,50	1,73	0,2599NS
Especie	1	6400,00	6400,00	16,99	0,0062**
Especie * Bloque	3	1929,50	643,16	1,71	0,2640NS
FN	1	529,00	529,00	1,40	0,2808NS
Especie* FN	1	49,00	49,00	0,13	0,7307NS

NS = No hay diferencia significativa

** = Diferencia altamente significativa al 1% de error

* = Diferencia altamente significativa al 5% de error

Cuadro 4.12a. Análisis de varianza del peso seco de nódulos (mg/planta) producidos por las diferentes leguminosas crecidas en el experimento de campo 2, CATIE, Turrialba, Costa Rica

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Prob > F
Bloque	3	14497,25	4832,416	7,85	0,0168*
Especie	1	27060,25	27060,25	43,98	0,0006**
Especie * Bloque	3	18271,25	6090,416	9,90	0,0097*
FN	1	1444,00	1444,00	2,35	0,1764NS
Especie* FN	1	441,00	441,00	0,72	0,4287NS

NS = No hay diferencia significativa

** = Diferencia altamente significativa al 1% de error

* = Diferencia altamente significativa al 5% de error

Cuadro 4.13 Análisis de varianza del contenido de N total (mg/planta) de las diferentes leguminosas crecidas en el experimento de campo 3, CATIE, Turrialba, Costa Rica.

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Prob > F
Bloque	3	0,4658	0,1552	6,01	0,0033*
Especie	3	21,1604	7,053	273,17	0,0001**
Especie * Bloque	9	0,1593	0,017	0,69	0,7149NS
FN	2	2,9618	1,480	57,35	0,0001**
Especie* FN	6	0,3246	0,054	2,10	0,0915NS

NS = No hay diferencia significativa

** = Diferencia altamente significativa al 1% de error

* = Diferencia altamente significativa al 5% de error

Cuadro 4.13a. Análisis de varianza de la producción de materia seca (g/planta) de las diferentes leguminosas crecidas en el experimento de campo 3 CATIE, Turrialba, Costa Rica

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Prob > F
Bloque	3	0,3634	0,1211	6,33	0,0026*
Especie	3	18,4071	6,135	320,79	0,0001**
Especie * Bloque	9	0,3902	0,043	2,27	0,0530NS
FN	2	0,8927	0,446	23,34	0,0001**
Especie* FN	6	0,1908	0,0318	1,66	0,1735NS

NS = No hay diferencia significativa

** = Diferencia altamente significativa al 1% de error

* = Diferencia altamente significativa al 5% de error

Cuadro 4.14. Análisis de varianza del número de nódulos (número/planta) de las diferentes leguminosas crecidas en el experimento de campo 3 CATIE, Turrialba, Costa Rica

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Prob > F
Bloque	3	111,00	37,00	0,14	0,9340NS
Especie	3	3105,70	1035,23	3,90	0,0490*
Especie * Bloque	9	1331,70	147,96	0,56	0,8020NS
FN	1	3675,30	3675,30	13,83	0,0048**
Especie* FN	2	2454,20	1227,10	4,62	0,0417*

NS = No hay diferencia significativa

** = Diferencia altamente significativa al 1% de error

* = Diferencia altamente significativa al 5% de error

Cuadro 4.14a. Análisis de varianza del peso seco de nódulos (mg/planta) producidos por las diferentes leguminosas crecidas en el experimento de campo 3, CATIE, Turrialba, Costa Rica

Fuente	G.L.	S.C.	C.M.	F	Prob > F
Bloque	3	4938,70	1646,233	1,65	0,2464NS
Especie	3	9057,30	3019,10	3,02	0,0863NS
Especie * Bloque	9	6325,90	702,87	0,70	0,6953NS
FN	1	84,30	84,30	0,08	0,7779NS
Especie* FN	2	5005,70	2502,85	2,51	0,1363NS

NS = No hay diferencia significativa

** = Diferencia altamente significativa al 1% de error

* = Diferencia altamente significativa al 5% de error

alto, de los 14 utilizados existentes dentro del paquete estadístico Palmer's.

El comportamiento general de los tres experimentos de campo fue tal, que se rechazó la hipótesis nula para igualdad tanto entre especies leguminosas, como entre tratamientos para cada variable estudiada.

4.4 Ensayo de invernadero

4.4.1 Materia seca y contenido de Nitrógeno total en biomasa aérea.

La información sobre producción de materia seca total y el contenido de N en biomasa aérea de las leguminosas empleadas en el ensayo de invernadero se presentan en el cuadro 4.15. Se aprecia que en el caso de *Phaseolus vulgaris*, los tratamientos con Nitrógeno adicionado (+N) fueron superiores a los inoculados (I) y no inoculados (U), ya que en producción de materia seca se obtuvo 11 g planta⁻¹ en contraste con 8 y 9 g planta⁻¹ correspondientemente. No se observó diferencias significativas ($P > 0,05$) entre los tratamientos I y U para esta variable. Para el caso de contenido de N total en biomasa aérea, se aprecia también que se registró 343 mg planta⁻¹ contra 190 y 188 mg planta⁻¹ en el mismo orden anteriormente descrito. No se observó diferencias significativas entre los tratamientos I y U para esta variable.

Cuadro 4.15. Respuesta a la inoculación de especies de leguminosas bajo condiciones de invernadero*, CATIE, Turrialba, Costa Rica ^{1/}

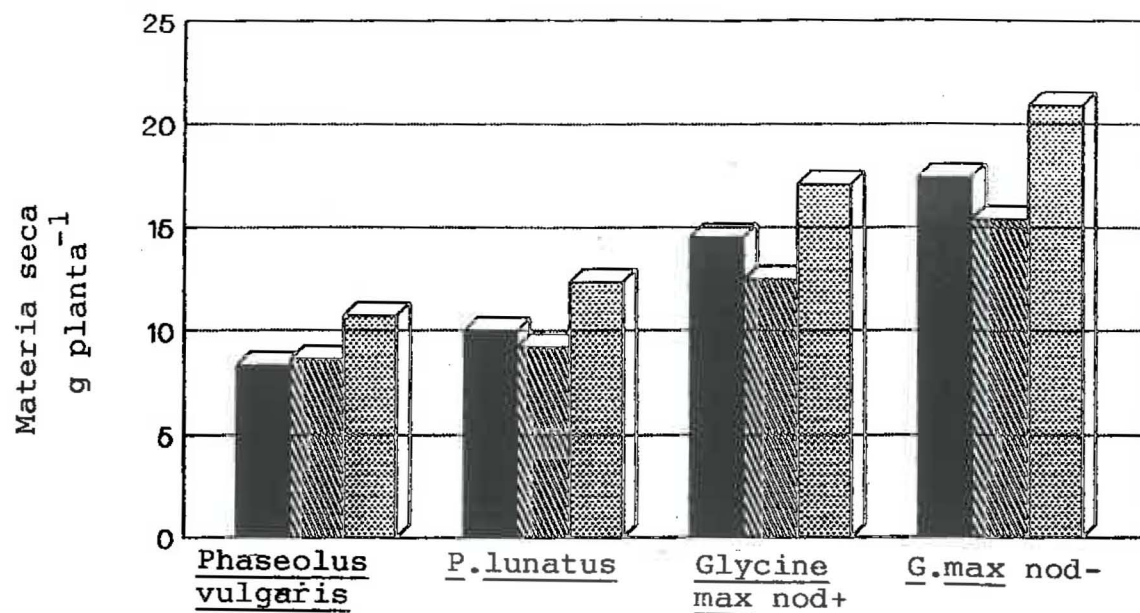
ESPECIE	MATERIA SECA (g Planta ⁻¹)			CONTENIDO N TOTAL (mg planta ⁻¹)		
	Tratamiento			Tratamiento		
	I ^{3/}	U	+N	I	U	+N
<u>Phaseolus vulgaris</u>	8 b ^{2/}	9 b	11 a	190 b	188 b	343 a
<u>P. lunatus</u>	10 b	9 b	12 a	244 b	227 b	394 a
<u>Glycine max</u> noduladora	15 a	12 b	17 a	478 a	284 b	540 a
<u>G. max</u> no noduladora	7 b	15 c	21 a	550 b	306 c	691 a

*Suelo del sitio 1 (lote N^o 6), Estación Experimental "La Montaña", CATIE

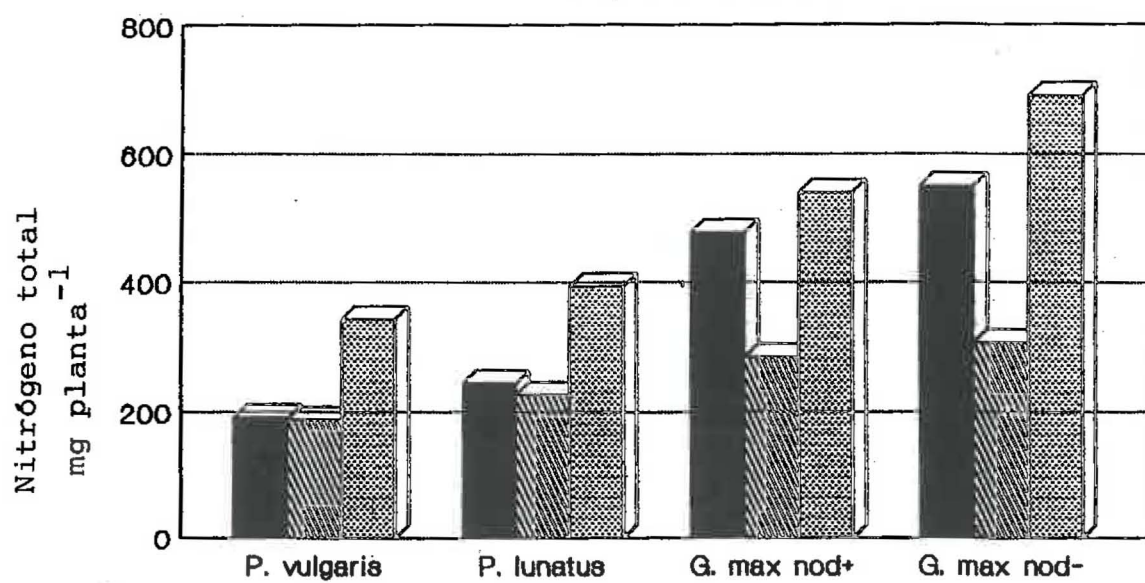
1/ Promedio de cuatro repeticiones

2/ Letras iguales entre columnas no difieren significativamente P (0.05%) por la prueba Duncan

3/ I = Inoculado; U = No inoculado; N = Nitrógeno adicionado



L E G U M I N O S A



L E G U M I N O S A

■ Inoculado ▨ No inoculado ▩ Nitrogeno adicionado

Figura 4.2. Respuesta a la inoculación de diversas leguminosas crecidas en invernadero en macetas con suelo del sitio 1 (lote N°6). Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica.

El comportamiento de *Phaseolus lunatus* fue similar, ya que en producción de materia seca se obtuvo 12 g planta⁻¹ para los tratamientos +N a diferencia de 10 y 9 g planta⁻¹ de los tratamientos I y U respectivamente. En el caso de nitrógeno total en biomasa aérea se obtuvo 394 mg planta⁻¹ en contraste con 244 y 227 mg planta⁻¹, en el mismo orden. No se obtuvo diferencias significativas entre los tratamientos I y U para ninguna de las dos variables en estudio.

En el caso de *Glycine max* los datos obtenidos en producción de materia seca fueron 17 g planta⁻¹ para los tratamientos +N contra 15 y 12 g planta⁻¹ para los tratamientos I y U correspondientemente. Así mismo, se obtuvo 540 mg planta de nitrógeno total a diferencia de 478 y 284 mg planta⁻¹ en el mismo orden ya descrito. Se observó diferencias significativas entre los tratamientos I y U para las dos variables en estudio.

La isolínea no noduladora de *G. max* mostró una tendencia similar a los *Phaseolus*, ya que en producción de materia seca registrada en g planta⁻¹, presentó 21 para los tratamientos +N a diferencia de 17 y 15 de los tratamientos I y U respectivamente. Para el contenido de nitrógeno total expresado en mg planta⁻¹ se registró 691 contra 550 y 306 en el orden ya expresado. Los análisis estadísticos mostraron que la media de los tres tratamientos fueron diferentes entre sí para las dos variables en estudio.

4.4.2 Número y peso seco de nódulos

La producción de nódulos del ensayo de invernadero se presenta en el cuadro 4.16. Se nota que para el caso de *P. vulgaris*, los tratamientos I no difirieron grandemente de los tratamientos U, para ninguna de las dos variables en estudio (número y peso seco), ya que se obtuvo 232 nódulos planta⁻¹ contra 218 correspondientemente, y 381 mg planta⁻¹ en peso seco de nódulos a diferencia de 310 para los mismos tratamientos. El análisis estadístico mostró que las medias de ambos tratamientos no mostraron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre sí para ninguna de las dos variables.

Una tendencia similar se observó en *P. lunatus*, ya que se obtuvo 130 nódulos planta⁻¹ de los tratamientos I a diferencia de 113 de los tratamientos U, y 301 mg planta⁻¹ en peso seco de nódulos contra 232 para los mismos tratamientos. No se observó diferencias significativas entre los dos tratamientos para ninguna de las dos variables.

La especie *G. max* mostró un comportamiento diferente al registrarse 93 nódulos planta⁻¹ para los tratamientos I contra 34 de los U, y 760 mg planta⁻¹ de peso seco de nódulos a diferencia de 182 para los mismos tratamientos. Hubo diferencias significativas entre los tratamientos I y U para las dos variables.

Cuadro 4.16. Respuesta a la inoculación (nodulación) de especies de leguminosas bajo condiciones de invernadero*, CATIE, Turrialba, Costa Rica^{1/}

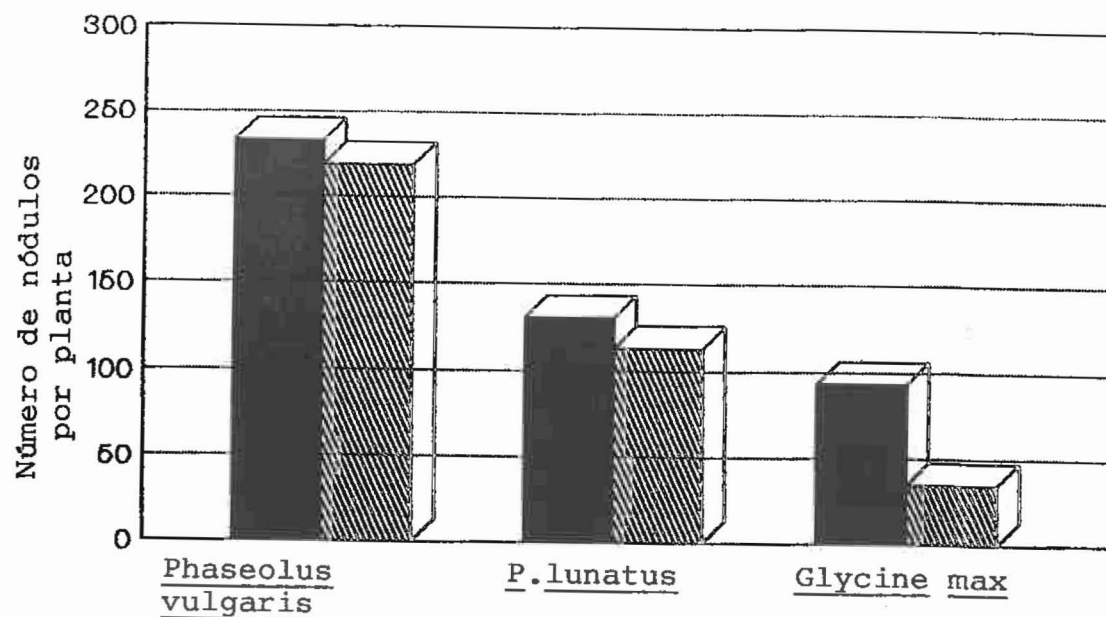
ESPECIE	NODULOS (No. Planta ⁻¹)		PESO SECO NODULOS (mg planta ⁻¹)	
	Tratamiento		Tratamiento	
	I ^{3/}	U	I	U
<u>Phaseolus vulgaris</u>	232 ^{2/a}	219 a	381 a	309 a
<u>P. lunatus</u>	131 a	113 a	301 a	232 a
<u>Glycine max</u>	93 a	35 b	760 a	182 b

* Suelo del sitio 1 (lote N°6) Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica

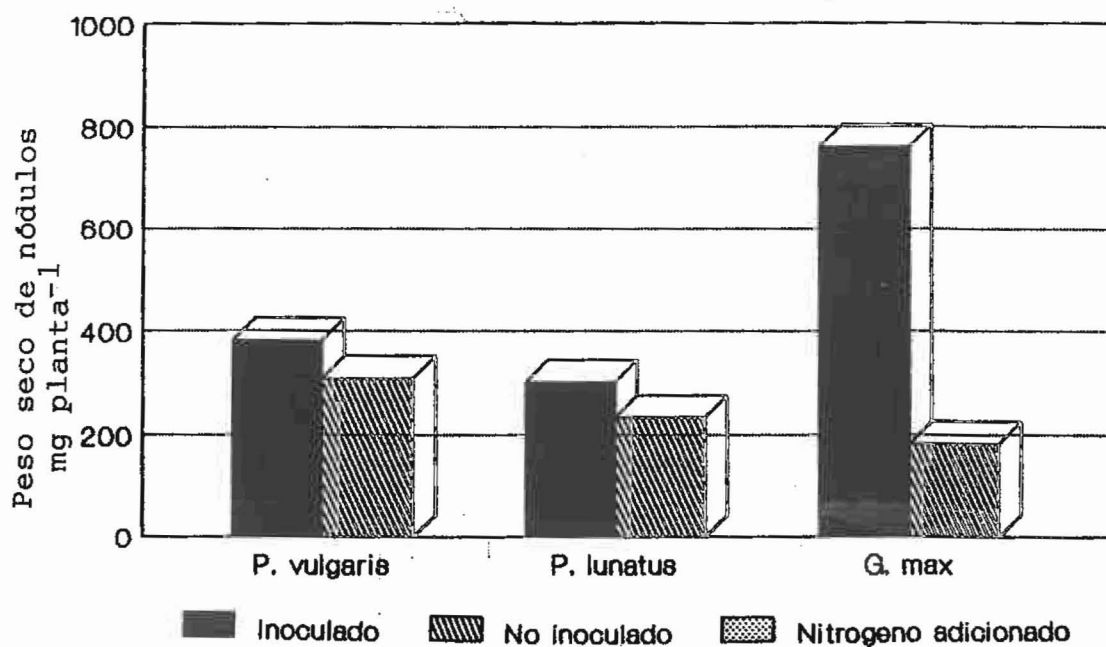
1/ Promedio de 4 repeticiones

2/ Letras iguales entre columnas no difieren significativamente (0.05%) por la prueba de Duncan

3/ I = inoculado; U = No inoculado



L E G U M I N O S A



L E G U M I N O S A

Figura 4.3. Respuesta a la inoculación (nodulación) de leguminosas crecidas en invernadero en macetas con suelo del sitio 1 (lote N°6). Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica.

4.4.3 Efectividad de las cepas nativas

La proporción de nódulos con coloración rojiza en el interior fue de 62,5% (25 rojos contra 15 grisáceos), en los tratamientos no inoculados de *Phaseolus vulgaris*.

Para la especie *P. lunatus* se obtuvo 80% (32 de color rojizo contra 8 grises. Finalmente en *Glycine max* se registró una proporción de 72,5%, ya que se obtuvo 29 nódulos de coloración rojiza contra 11 de color grisáceo.

4.5 Experimento de campo 1

4.5.1 Materia seca y contenido de Nitrógeno total en biomasa aérea.

Los resultados alcanzados en el sitio 1 para producción de materia seca y contenido de N en biomasa aérea, se presentan en el cuadro 4.17. Se observó tendencias muy similares que en el ensayo de invernadero para todas las especies leguminosas empleadas. Así, en *Phaseolus vulgaris* se obtuvo 6 g planta⁻¹ de materia seca en los tratamientos +N a diferencia de 3 y 3 g planta⁻¹ para los tratamientos I y U correspondientemente. En el caso de la otra variable se obtuvo 283 contra 136 y 140 mg planta⁻¹ para los mismos tratamientos respectivamente. No se obtuvo diferencias significativas entre los tratamientos I y U para ninguna de las dos variables en estudio.

Cuadro 4.17. Respuesta a la inoculación de diversas leguminosas, sitio 1 (lote N^o 6), Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica^{1/}

ESPECIE	MATERIA SECA (g Planta ⁻¹)			CONTENIDO N TOTAL (mg planta ⁻¹)		
	Tratamiento			Tratamiento		
	I ^{3/}	U	+N	I	U	+N
<u>Phaseolus vulgaris</u>	3 b ^{2/}	3 b	6 a	136 a	140 b	282 a
<u>P. lunatus</u>	5 b	5 b	8 a	175 b	176 b	336 a
<u>Glycine max</u> noduladora	13 ab	11 b	16 a	578 ab	418 b	772 a
<u>G. max no</u> noduladora	14 a	15 a	20 a	571 b	557 b	892 a

1/ Promedio de cuatro repeticiones

2/ Letras iguales entre columnas no difieren significativamente P (0.05%) por la prueba Duncan

3/ I = Inoculado; U = No inoculado; N = Nitrógeno adicionado

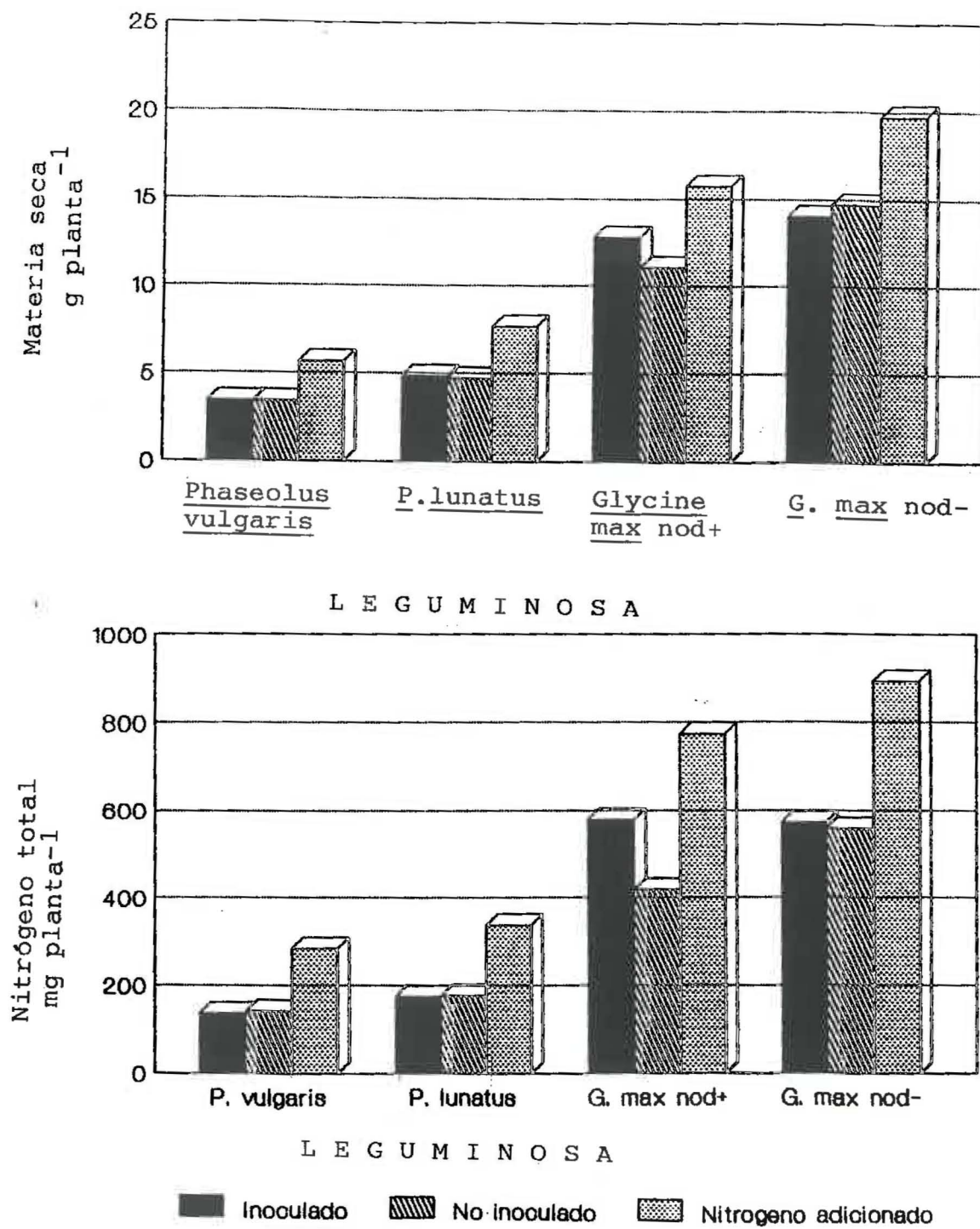


Figura 4.4. Respuesta a la inoculación de leguminosas crecidas bajo condiciones de campo sitio 1 (lote N°6). Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica

En el caso de *P. lunatus* se obtuvo 8 g planta⁻¹ de materia seca para los tratamientos +N contra 5 y 5 de los tratamientos I y U correspondientemente. En el caso de contenido de N se registró 336 mg planta⁻¹ a diferencia de 175 y 176 para los mismos tratamientos. No se observó diferencias significativas entre los tratamientos I y U para ninguna de las dos variables en estudio.

La especie *Glycine max* registró 16 g planta⁻¹ de materia seca para los tratamientos +N a diferencia de 13 y 11 de los tratamientos I y U comparativamente. En ese mismo orden en contenido de nitrógeno total, expresado en mg planta⁻¹, se registró 772 contra 578 y 418 para los tres tratamientos. Se observó diferencias significativas entre los dos tratamientos para las dos variables en estudio, aunque no de manera muy precisa.

La isolínea no noduladora de *G. max* registró 20 g planta⁻¹ de materia seca en los tratamientos +N a diferencia de 14 y 15 de los tratamientos I y U correspondientemente. En el mismo orden para la variable contenido de Nitrógeno total, se tuvo 829 mg planta⁻¹ contra 571 y 557. No hubo diferencias significativas entre los tratamientos I y U para la variable contenido de nitrógeno, y para el caso de producción de materia seca las medias de los tres tratamientos fueron iguales entre sí.

4.5.2 Número y peso seco de nódulos

Esta información se presenta en el cuadro 4.18. Se nota que en la especie *Phaseolus vulgaris* los tratamientos I y U no difirieron grandemente tanto para la variable número, como para peso seco de nódulos, ya que los tratamientos I registraron 20 nódulos planta⁻¹ contra 16 de los tratamientos U. De igual manera se obtuvo 31 y 37 mg planta⁻¹ de peso seco de nódulos, correspondientemente. No se observó diferencias significativas entre los dos tratamientos para ninguna de las dos variables en estudio.

La especie *Phaseolus lunatus* mostró una tendencia similar que *P. vulgaris*, al registrar 12 nódulos planta⁻¹ de los tratamientos I, a diferencia de 17 de los tratamientos U. De igual forma se registró 24 mg planta⁻¹ de peso seco de nódulos contra 24 en el orden ya señalado. No se observó diferencias significativas entre ambos tratamientos para ninguna de las dos variables bajo estudio.

En *Glycine max* se observó diferencias significativas para las dos variables en estudio, ya que se obtuvo 95 nódulos planta⁻¹ para los tratamientos I a diferencia de 27 de los tratamientos U. En el mismo orden para peso seco de nódulos, se registró 60 mg planta⁻¹ contra 25. Hubo diferencias altamente significativas entre los tratamientos I y U para las dos variables en estudio.

Cuadro 4.18. Respuesta a la inoculación (nodulación) de especies de leguminosas bajo condiciones de campo, sitio 1 (lote Nº 6), Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica.^{1/}

ESPECIE	NODULOS (No. Planta ⁻¹)		PESO SECO NODULOS (mg planta ⁻¹)	
	Tratamiento		Tratamiento	
	I ^{3/}	U	I	U
<u>Phaseolus vulgaris</u>	21 ^{2/}	7 a	1 a	37 a
<u>P. lunatus</u>	12 a	8 a	24 a	23 a
<u>Glycine max</u>	95 a	27 b	60 a	25 b

1/ Promedio de 4 repeticiones

2/ Letras iguales entre columnas no difieren significativamente (0.05%) por la prueba de Duncan

3/ I = inoculado; U = No inoculado

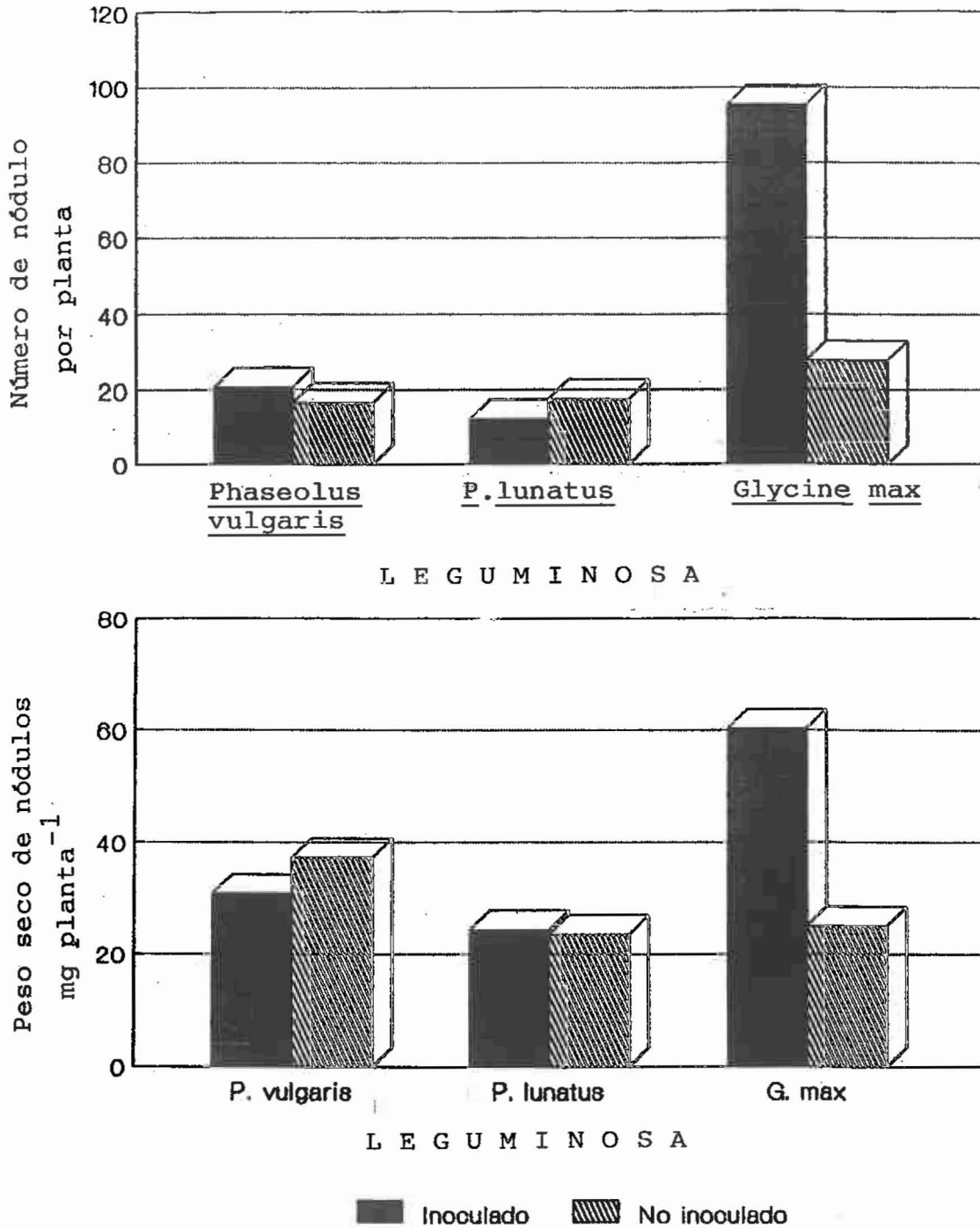


Figura 4.5. Respuesta a la inoculación (nodulación) de leguminosas crecidas bajo condiciones de campo, sitio 1 (lote N°6), Estación Experimental "La Montaña", Turrialba, Costa Rica.

4.5.3 Rendimiento en grano

La información sobre los rendimientos alcanzados para grano, de las diferentes especies leguminosas utilizadas en el experimento de campo 1, se presenta en el cuadro 4.19. Es importante destacar que los datos presentados en este cuadro, corresponden a los resultados de un análisis estadístico ajustado como bloques incompletos, ya que como se mencionó inicialmente, se tuvo un contratiempo en la época de llenado de grano de las leguminosas en algunas parcelas, las cuales al final no fueron cosechadas quedando desbalanceados los datos, ya que no se obtuvo cosecha de una especie leguminosa, quedando su número reducido a tres. De las restantes, algunos de los tratamientos no fueron igualmente cosechados. Tomando en consideración entonces estas restricciones, es como se presenta esta información.

Se nota en el referido cuadro, que los tratamientos con nitrógeno adicionado (+N), fueron siempre superiores a los tratamientos inoculados (I) y no inoculados (U), en todas las especies leguminosas. Así, *Phaseolus vulgaris* registró 1105 kg ha⁻¹ de rendimiento en grano, distinguiéndose de 623 y 663 correspondientemente al orden señalado. No se obtuvo diferencias significativas entre los tratamientos I y U por la prueba de t.

La especie *P. lunatus* obtuvo 1686 kg ha⁻¹ de rendimiento en grano, a diferencia de 1159 y 1075 en el orden correspondiente. No se observó diferencias significativas entre los tratamientos I y U para esta variable.

Cuadro 4.19. Respuesta a la inoculación (rendimiento en grano) de especies de leguminosas bajo condiciones de campo, sitio 1 (lote Nº 6), Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica^{1/}

ESPECIE	RENDIMIENTO EN GRANO (kg ha ⁻¹)			INDICE DE COSECHA		
	Tratamiento			I	U	N
	I ^{3/}	U	N			
<u>Phaseolus vulgaris</u>	623 b ^{2/}	663 b	1105 a	0,59	0,64	0,64
<u>P. lunatus</u>	1159 b	1075 b	1696 a	0,41	0,54	0,65
<u>Glycine max</u>	2529 b	2549 b	3094 b	0,53	0,55	0,65

1/ Análisis estadístico ajustado como bloques incompletos

2/ Letras iguales que preceden a las cifras no son significativamente diferentes por la prueba Duncan

3/ I = Inoculado; U = No inoculado; N = Nitrógeno adicionado

El comportamiento de *Glycine max* fue similar a las otras dos especies, ya que registró 3094 kg ha⁻¹ contra 2527 y 2549 respectivamente, en esta variable. No se observó diferencias significativas entre los tratamientos I y U por la prueba de t para esta variable.

4.6 Experimento de campo 2

4.6.1 Materia seca y contenido de Nitrógeno total en biomasa aérea

La información sobre producción de materia seca y contenido de Nitrógeno total en parte aérea de las leguminosas empleadas, se detalla en el cuadro 4.20. Se aprecia que en general los tratamientos con nitrógeno adicionado (+N), superaron a los inoculados (I) y no inoculados (U), para las dos variables bajo estudio. Así, en *P. vulgaris* los datos para producción de materia seca fueron 12 g planta⁻¹ distinguiéndose de 10 y 10 en el mismo orden. De igual forma se obtuvo 436 mg planta⁻¹ a diferencia de 294 y 295, correspondientemente para la segunda variable. El análisis estadístico efectuado, mostró que la media de los tratamientos inoculados, fue igual tanto para los tratamientos no inoculados, como los de Nitrógeno adicionado para la variable producción de materia seca. En contraste no hubo diferencias significativas entre los tratamientos I y U para la variable contenido de N total.

Cuadro 4.20. Respuesta a la inoculación de diversas leguminosas, sitio 2 (lote Nº 7)
Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica.^{1/}

ESPECIE	MATERIA SECA (g Planta ⁻¹)			CONTENIDO N TOTAL (mg planta ⁻¹)		
	Tratamiento			Tratamiento		
	I ^{3/}	U	+N	I	U	+N
<u>Phaseolus vulgaris</u>	10 ab ^{2/}	10 b	12 a	294 b	295 b	436 a
<u>P. lunatus</u>	6 b	6 b	8 a	209 b	200 b	310 a
<u>Glycine max</u>	4 b	24 b	29 a	731 b	585 b	1057 a
<u>Cicer arietinum</u>	7 b	9 b	11 a	159 ab	115 b	326 a

1/ Promedio de cuatro repeticiones

2/ Letras iguales entre columnas no difieren significativamente P (0.05%) por la prueba Duncan

3/ I = Inoculado; U = No inoculado; N = Nitrógeno adicionado

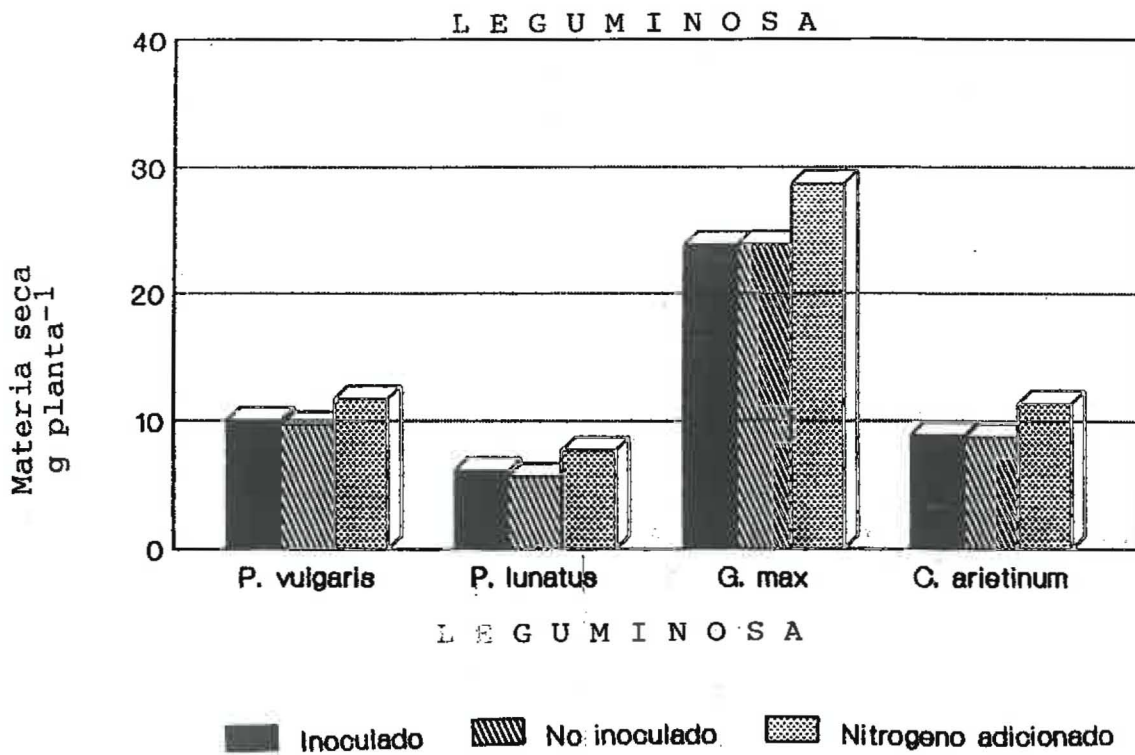
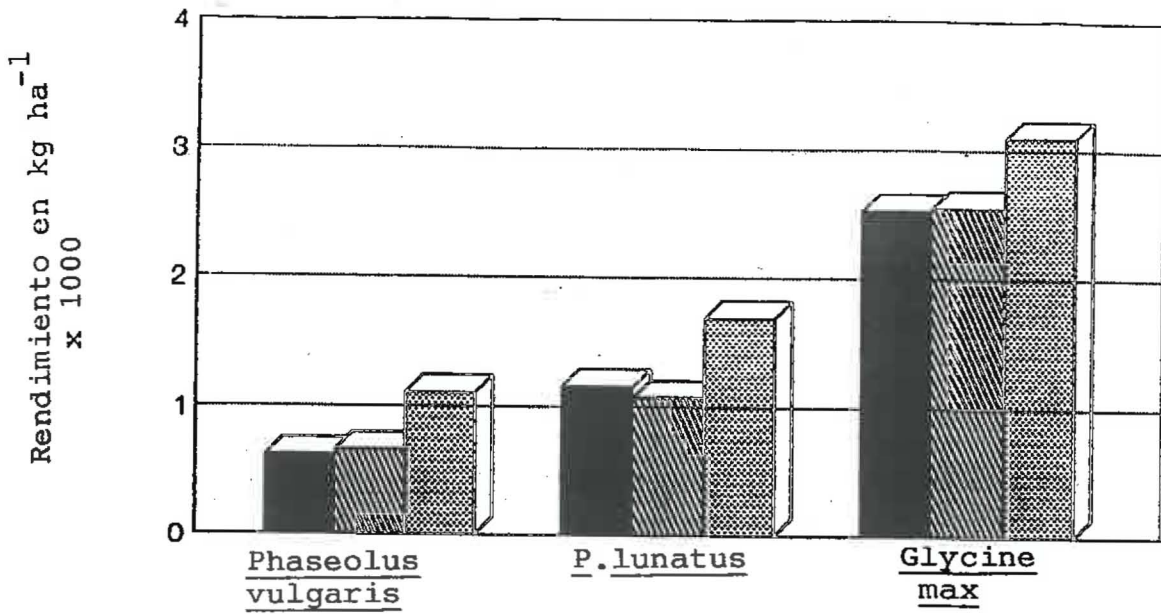


Figura 4.6. Respuesta a la inoculación de leguminosas crecidas bajo condiciones de campo, sitio 1 (arriba) y sitio 2 (abajo). Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica.

El comportamiento de *P. lunatus* fue similar para las dos variables en estudio, ya que se mantuvo la predominancia de los tratamientos +N sobre los I y U. No hubo diferencias significativas entre estos últimos, para ninguna de las dos variables bajo estudio. Los datos para la primer variable fueron 8 g planta⁻¹ contra 6 y 6 en el orden ya descrito; y 310 mg planta⁻¹ distinguiéndose de 209 y 100, respectivamente.

La especie *Glycine max* tuvo comportamiento similar a *P. lunatus*, ya que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos I y U, para ninguna de las dos variables bajo estudio, y los tratamientos +N fueron siempre superiores a ambos. Se obtuvo 29 g planta⁻¹ contra 24 y 24, correspondientemente, para la variable producción de materia seca; así mismo se registró 1057 mg planta⁻¹ discrepando de 731 y 585 en el orden descrito anteriormente.

En el caso de *Cicer arietinum* el comportamiento fue similar a la especie anterior, ya que se obtuvo 11 g planta⁻¹ de materia seca contra 7 y 9, correspondientemente en los tres tratamientos descritos. Además se registró 326 mg planta⁻¹ de Nitrógeno total, a diferencia de 159 y 115 en el mismo orden. No se observó diferencias significativas entre los tratamientos I y U para la variable producción de materia seca. Estos mismos tratamientos no presentaron una clara diferencia entre sí, para el caso de contenido de N total, ya que los tratamientos I mostraron ser iguales tanto para los +N, como los U en esta variable.

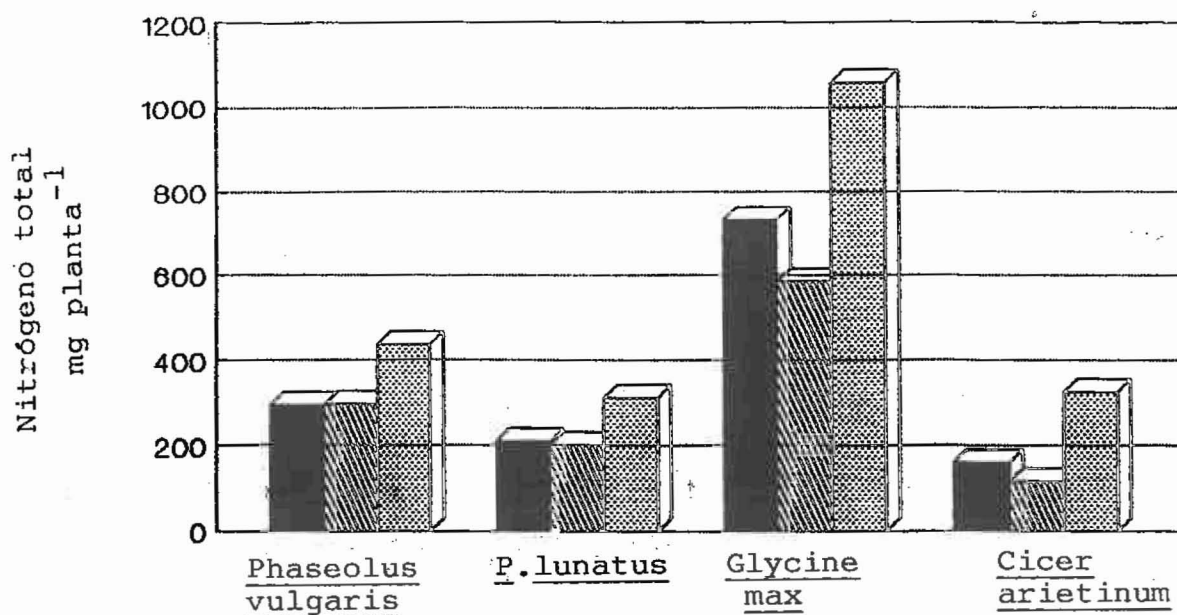
Cuadro 4.21 . Respuesta a la inoculación (nodulación) de especies de leguminosas bajo condiciones de campo, sitio 2 (lote N^o 7) Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica ^{1/}

ESPECIE	NODULOS (No. Planta ⁻¹)		PESO SECO NODULOS (mg planta ⁻¹)	
	Tratamiento		Tratamiento	
	I ^{3/}	U	I	U
<u>Phaseolus vulgaris</u>	34 a ^{2/}	26 a	52 a	43 a
<u>Glycine max</u>	78 a	63 a	145 a	115 a

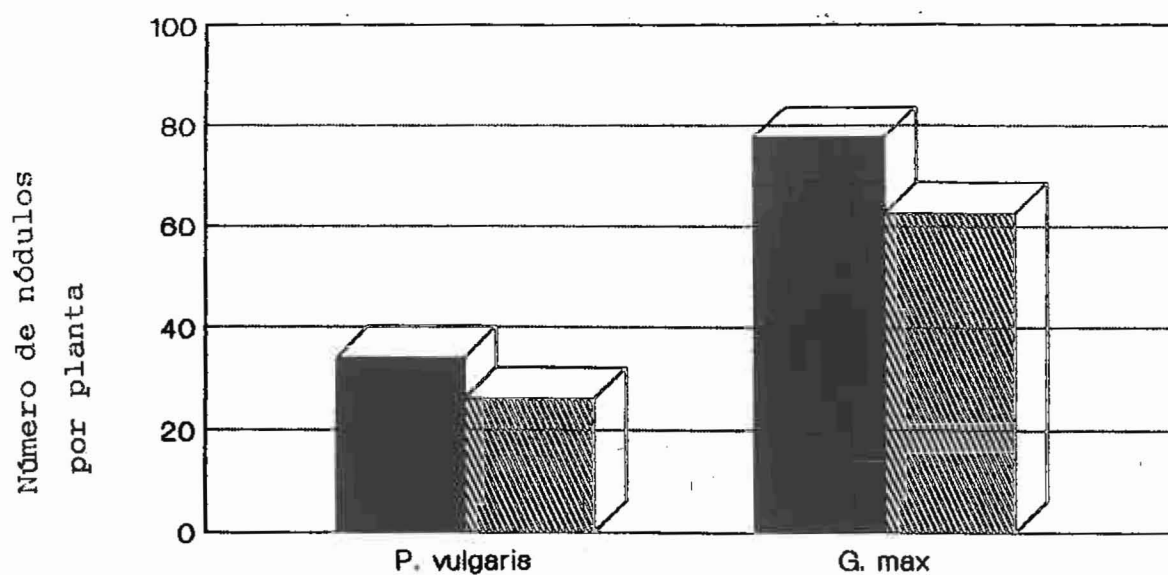
1/ Promedio de 4 repeticiones

2/ Letras iguales entre columnas no difieren significativamente (0.05%) por la prueba de Duncan

3/ I = inoculado; U = No inoculado



L E G U M I N O S A



L E G U M I N O S A

■ Inoculado ▨ No inoculado ▤ Nitrogeno adicionado

Figura 4.7. Respuesta a la inoculación de leguminosas crecidas bajo condiciones de campo sitio 2 (lote N°7), Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica.

4.6.2 Número y peso seco de nódulos

La información referente a estas variables se presenta en el cuadro 4.21. Cabe señalar que solamente se pudo obtener datos para dos especies leguminosas, debido a que en las parcelas de *Cicer arietinum* se presentó un ataque masivo de nemátodos, que imposibilitó coleccionar nódulos de esta especie; Así mismo *Phaseolus lunatus* no noduló en ningún tratamiento, desconociéndose la causa de ello.

Así pues, en *Phaseolus vulgaris* se obtuvo 34 nódulos planta⁻¹ para los tratamientos I, contra 26 de los U. De igual forma se obtuvo 52 mg planta⁻¹ en peso seco de nódulos contrastando con 43 en el orden ya descrito. No se obtuvo diferencias significativas entre ambos tratamientos, para ninguna de las dos variables bajo estudio.

La especie *Glycine max* tuvo un comportamiento similar a las especies anteriores, ya que registró 77 nódulos planta⁻¹ contra 62, en el orden usual. De igual manera se obtuvo 145 mg planta⁻¹ de peso seco nódulos, a diferencia de 115, en el orden usual. No se observó diferencias significativas entre ambos tratamientos, para ninguna de las dos variables en estudio.

4.6.3 Rendimiento en grano

Los resultados alcanzados para rendimiento en grano de las leguminosas empleadas en el experimento de campo 2 se detallan en el cuadro 4.22. Se

Cuadro 4.22. Respuesta a la inoculación (rendimiento en grano) de especies de leguminosas bajo condiciones de campo, sitio 2 (lote N^o 7), Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica^{1/}

ESPECIE	RENDIMIENTO EN GRANO (kg ha ⁻¹)			INDICE DE COSECHA		
	Tratamiento			I	U	N
	I ^{3/}	U	N			
<u>Phaseolus vulgaris</u>	1012 b ^{2/}	962 b	1726 a	0,59	0,57	0,69
<u>Glycine max</u>	1815 b	1438 b	2792 a	0,71	0,43	0,79

1/ Análisis estadístico ajustado como bloques incompletos

2/ Letras iguales que preceden a las cifras no son significativamente diferentes por la prueba Duncan

3/ I = Inoculado; U = No inoculado; N = Nitrógeno adicionado

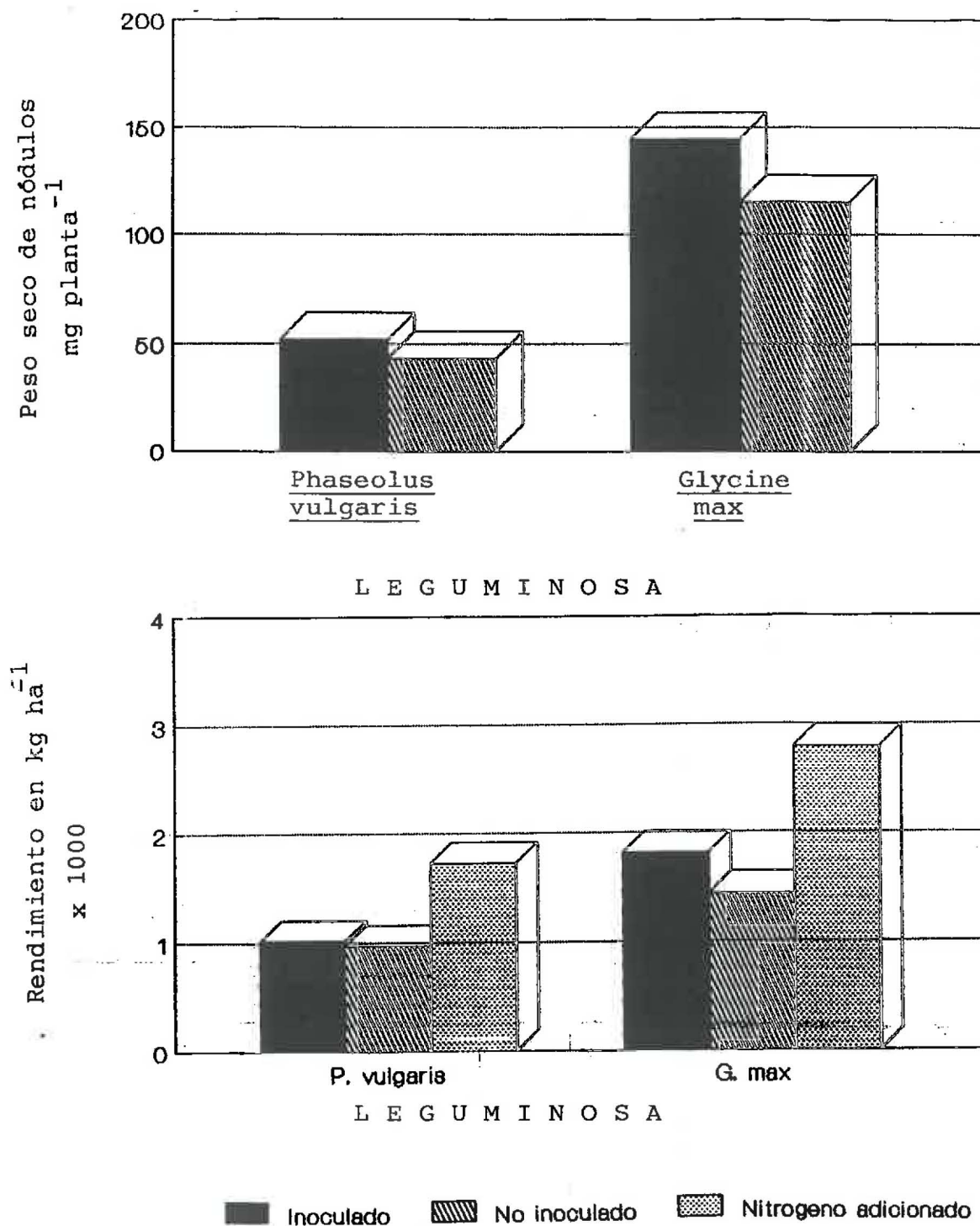


Figura 4.8. Respuesta a la inoculación de leguminosas crecidas bajo condiciones de campo, sitio 2 (lote N°7), Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica.

nota que sólo existe datos para dos especies ya que en *Cicer arietinum* y *Phaseolus lunatus* no fué posible obtener cosecha, debido al ataque de nemátodos en la primer especie, y la ausencia de vainas en la segunda. Así, *P. vulgaris* registró 1726 kg ha⁻¹ distinguiéndose de 1012 y 962 respectivamente. No se observó diferencias significativas entre los tratamientos I y U para esta variable.

Por otro lado *Glycine max* obtuvo 2792 kg ha⁻¹ de rendimiento en grano, contra 1815 y 1438 correspondientemente a los tratamientos +N, I y U. No se observó diferencias significativas entre los tratamientos I y U.

4.7 Experimento de campo 3

4.7.1 Materia seca y contenido de N total en biomasa aérea.

El contenido de N total y la producción de materia seca por cada leguminosa empleada, se presenta en el cuadro 4.23. Se nota que los tratamientos +N fueron superiores en todas las especies a los tratamientos I y U, para las dos variables bajo estudio. En *Phaseolus vulgaris* la información fue 5 g planta⁻¹ de materia seca, discrepando de 4 y 4 en el orden establecido. Para la segunda variable los resultados fueron 206 mg planta⁻¹ contra 134 y 135 de los mismos tratamientos. No se observó diferencias significativas entre los tratamientos I y U, para ninguna de las dos variables bajo estudio.

Cuadro 4.23. Respuesta a la inoculación de diversas leguminosas, sitio 3 (lote N^o 1), Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica ^{1/}

ESPECIE	MATERIA SECA (g Planta ⁻¹)			CONTENIDO N TOTAL (mg planta ⁻¹)		
	Tratamiento			Tratamiento		
	I ^{3/}	U	+N	I	U	+N
<u>Phaseolus vulgaris</u>	4 b ^{2/}	4 b	5 a	134 b	135 b	206 a
<u>P. lunatus</u>	7 b	6 b	8 a	254 b	224 b	349 a
<u>Glycine max</u>	14 b	12 c	18 a	552	366 c	781 a
<u>L. culinaris</u>	3 b	2 c	4 a	95 b	60 c	132 a

1/ Promedio de cuatro repeticiones

2/ Letras iguales entre columnas no difieren significativamente P (0.05%) por la prueba Duncan

3/ I = Inoculado; U = No inoculado; N = Nitrógeno adicionado

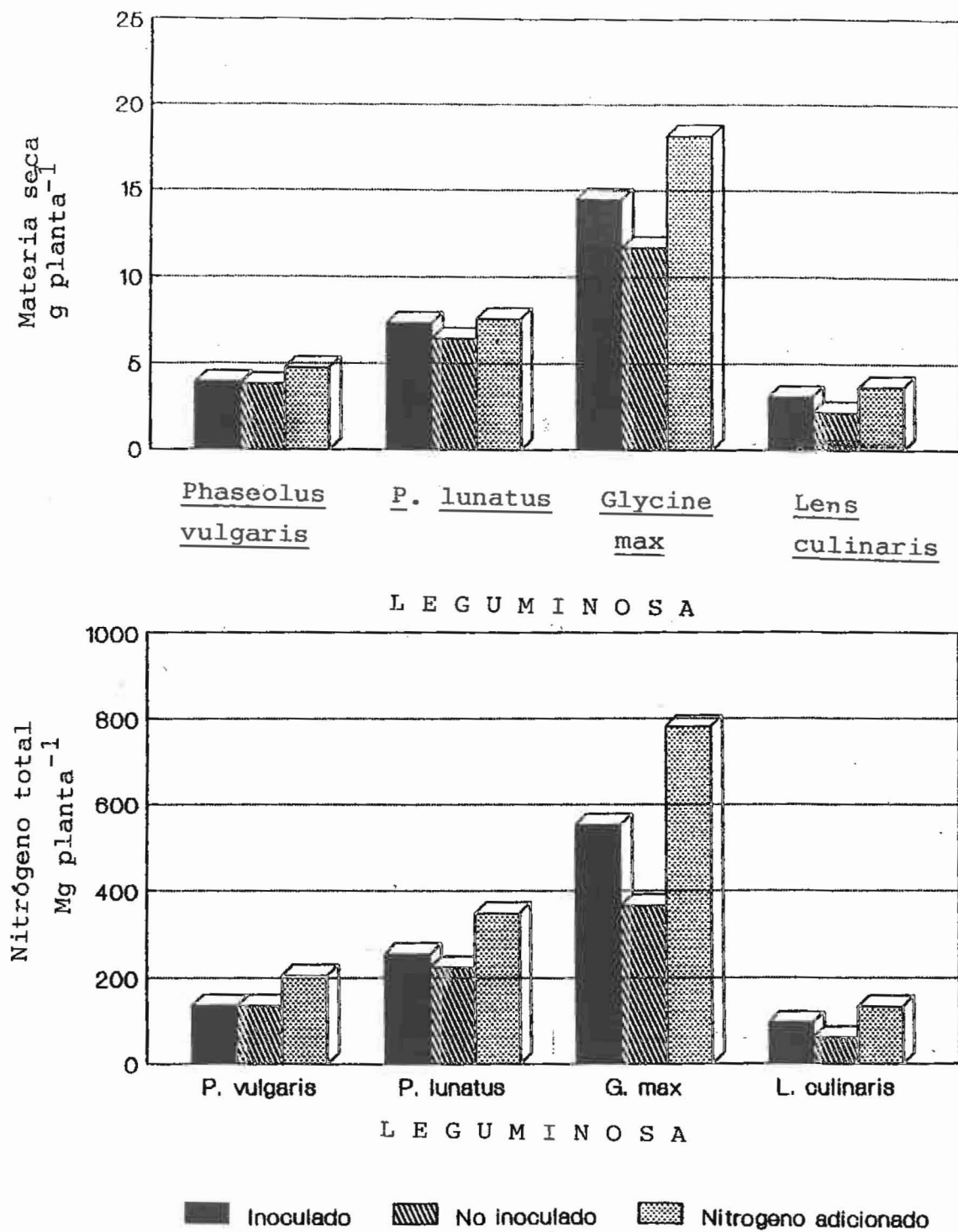


Figura 4.9. Respuesta a la inoculación de leguminosas crecidas bajo condiciones de campo sitio 3 (lote N^o 1) Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica.

La especie *Phaseolus lunatus* mostró igual comportamiento que *P. vulgaris*, ya que registró 8 g planta⁻¹ en producción de materia seca, a diferencia de 7 y 6 correspondientemente al orden ya señalado. En el caso de la segunda variable, se obtuvo 349 mg planta⁻¹ distinguiéndose de 254 y 224 en el orden usual. No se obtuvo diferencias significativas entre los tratamientos I y U, para ninguna de las dos variables bajo estudio.

En *Glycine max* el comportamiento fue distinto, ya que las medias de los tres tratamientos fueron diferentes entre sí, para las dos variables bajo estudio, correspondiendo al +N la mayor magnitud, evidenciando superioridad sobre las demás. Se registró 18 g planta⁻¹ en producción de materia seca, a diferencia de 14 y 12, correspondientemente. Para el caso de la segunda variable se obtuvo 781 mg planta⁻¹ de N total, contra 552 y 366 respectivamente.

Así mismo, *Lens culinaris* registró 4 g planta⁻¹ de materia seca, discrepando de 3 y 2, de acuerdo con los tres tratamientos. De igual manera, se obtuvo 132 mg planta⁻¹ de N total, contra 95 y 60 en el orden ya establecido. La media de los tres tratamientos fue diferente entre sí, para las dos variables en estudio.

4.7.2 Número y peso seco de nódulos

En el cuadro 4.24 se presentan los datos sobre producción de nódulos (número y peso seco) del experimento de campo 3. Se aprecia que no hubo diferencias significativas, para ninguna de las dos variables en el caso

Cuadro 4.24. Respuesta a la inoculación (nodulación) de especies de leguminosas bajo condiciones de campo sitio 3 (lote N^o 1), Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica.^{1/}

ESPECIE	NODULOS (No. Planta ⁻¹)		PESO SECO NODULOS (mg planta ⁻¹)	
	Tratamiento		Tratamiento	
	I ^{3/}	U	I	U
<u>Phaseolus vulgaris</u>	37 a ^{2/}	30 a	40 a	36 a
<u>P. lunatus</u>	27 a	12 b	82 a	42 b
<u>Glycine max</u>	64 a	11 b	72 a	40 b
<u>Lens culinaris</u>	8 a	0 b	8 a	0 b

1/ Promedio de 4 repeticiones

2/ Letras iguales entre columnas no difieren significativamente (0.05%) por la prueba de Duncan

3/ I = inoculado; U = No inoculado

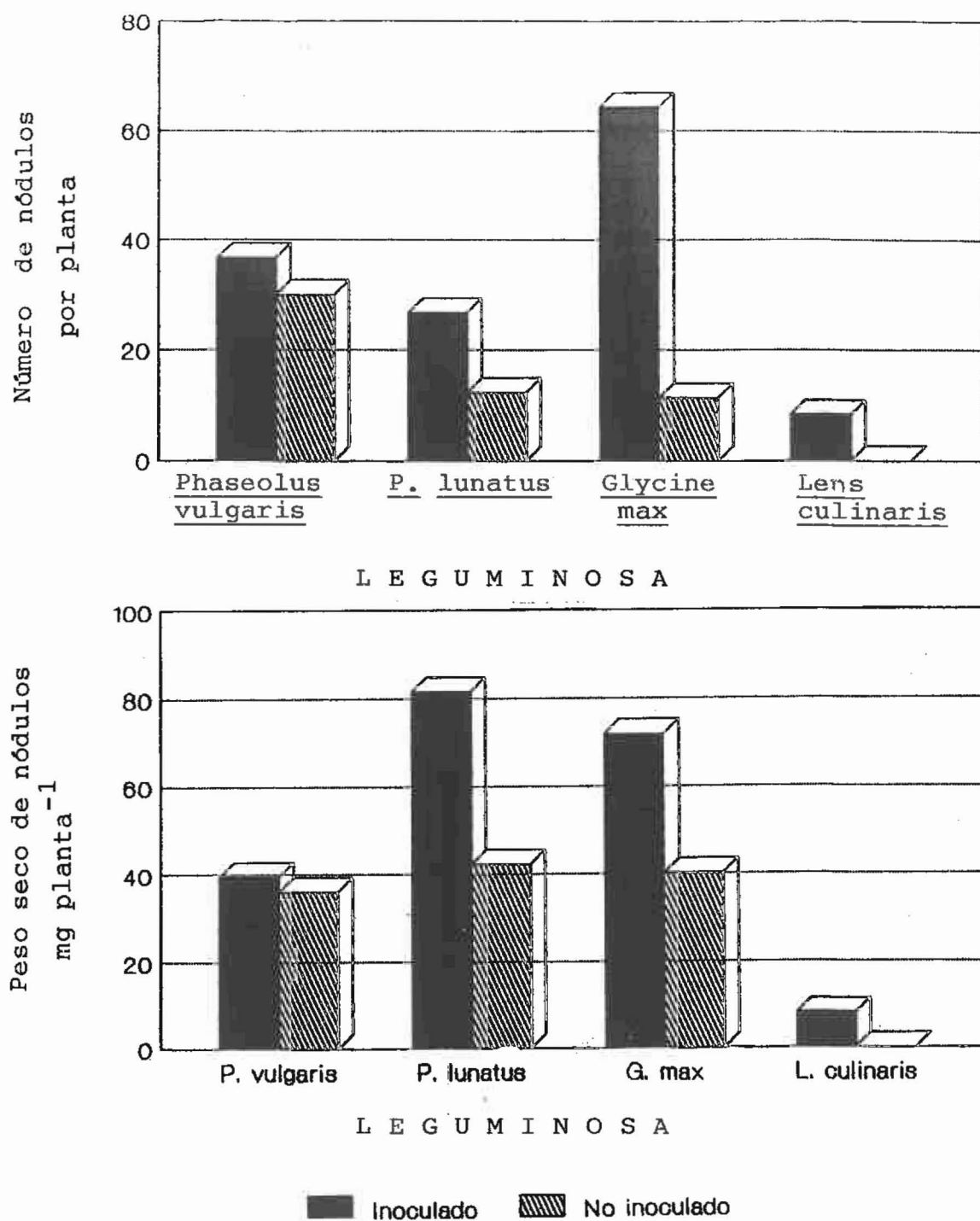


Figura 4.10 Respuesta a la inoculación (nodulación) de leguminosas crecidas bajo condiciones de campo sitio 3 (lote N°1) Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica.

de *Phaseolus vulgaris*, ya que se obtuvo 36 nódulos planta⁻¹ en los tratamientos I, distinguiéndose de los U que registró 30. Así mismo, en la segunda variable se obtuvo 40 mg planta⁻¹ contra 36, correspondientemente.

En la especie *P. lunatus* se observó comportamiento diferente a la especie anterior, ya que registró 27 nódulos planta⁻¹ contra 12, en el orden usual. Así mismo, para la segunda variable se tuvo 82 mg planta⁻¹, a diferencia de 42, respectivamente, obteniéndose con ello diferencias significativas entre los tratamientos I y U.

El comportamiento de *Glycine max* fue similar a *P. lunatus*, ya que hubo diferencias significativas entre las medias de los tratamientos I y U, para la variable número de nódulos. En contraste, no se registró diferencias en la variable peso seco de nódulos, entre estos mismos tratamientos. Así pues, se tuvo 64 nódulos planta⁻¹ distinguiéndose de los U, en los cuales se obtuvo 11. Además se registró 72 mg planta⁻¹ en peso seco de nódulos, contra 40, en el orden usual.

En el caso de *Lens culinaris*, se registró 8 nódulos planta⁻¹ en los tratamientos I, contrastando con los U, los cuales no presentaron nodulación. Iguales cantidades se obtuvo para la segunda variable. Ambos tratamientos mostraron diferencias altamente significativas para las dos variables estudiadas.

4.7.3 Rendimiento en grano

Esta información se presenta en el cuadro 4.25, donde se aprecia que *Phaseolus vulgaris* obtuvo 1383 kg ha⁻¹ contrastando con 691 y 679 respectivamente. No se registró diferencias significativas entre los tratamientos I y U para esta variable.

La especie *Phaseolus lunatus* registró 2933 kg ha⁻¹ a diferencia de 1662 y 1660 en el orden usual. No se observó diferencias significativas entre los tratamientos I y U para esta variable en estudio.

Del mismo modo *Glycine max* tuvo un comportamiento similar a las anteriores especies, ya que registró 3081 kg ha⁻¹ distinguiéndose de 1546 y 1254, correspondientemente. No se obtuvo diferencias significativas entre los tratamientos I y U para esta variable bajo estudio.

En el caso de *Lens culinaris* el comportamiento fue totalmente diferente a todas las demás especies, ya que registró 397 kg ha⁻¹ contra 366 y 250 en el orden ya señalado. Se obtuvo diferencias significativas para los tratamientos I y U para esta variable, bajo la prueba t, e inclusive la media de los tratamientos I no fue significativamente diferente de los tratamientos +N.

Cuadro 4.25. Respuesta a la inoculación (rendimiento en grano) de especies de leguminosas bajo condiciones de campo, sitio 3 (lote N^o 1), Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica^{1/}

ESPECIE	RENDIMIENTO EN GRANO (kg ha ⁻¹)			INDICE DE COSECHA		
	Tratamiento			I	U	N
	I ^{3/}	U	N			
<u>Phaseolus vulgaris</u>	691 b ^{2/}	679 b	1383 a	0,50	0,53	0,74
<u>P. lunatus</u>	1662 b	1660 b	2933 a	0,68	0,76	0,80
<u>Glycine max</u>	1546 b	1254 b	3081 a	0,43	0,61	0,73
<u>Lens culinaris</u>	366 a	250 b	397 a	0,48	0,46	0,47

1/ Análisis estadístico ajustado como bloques incompletos

2/ Letras iguales que preceden a las cifras no son significativamente diferentes por la prueba Duncan

3/ I = Inoculado; U = No inoculado; N = Nitrógeno adicionado

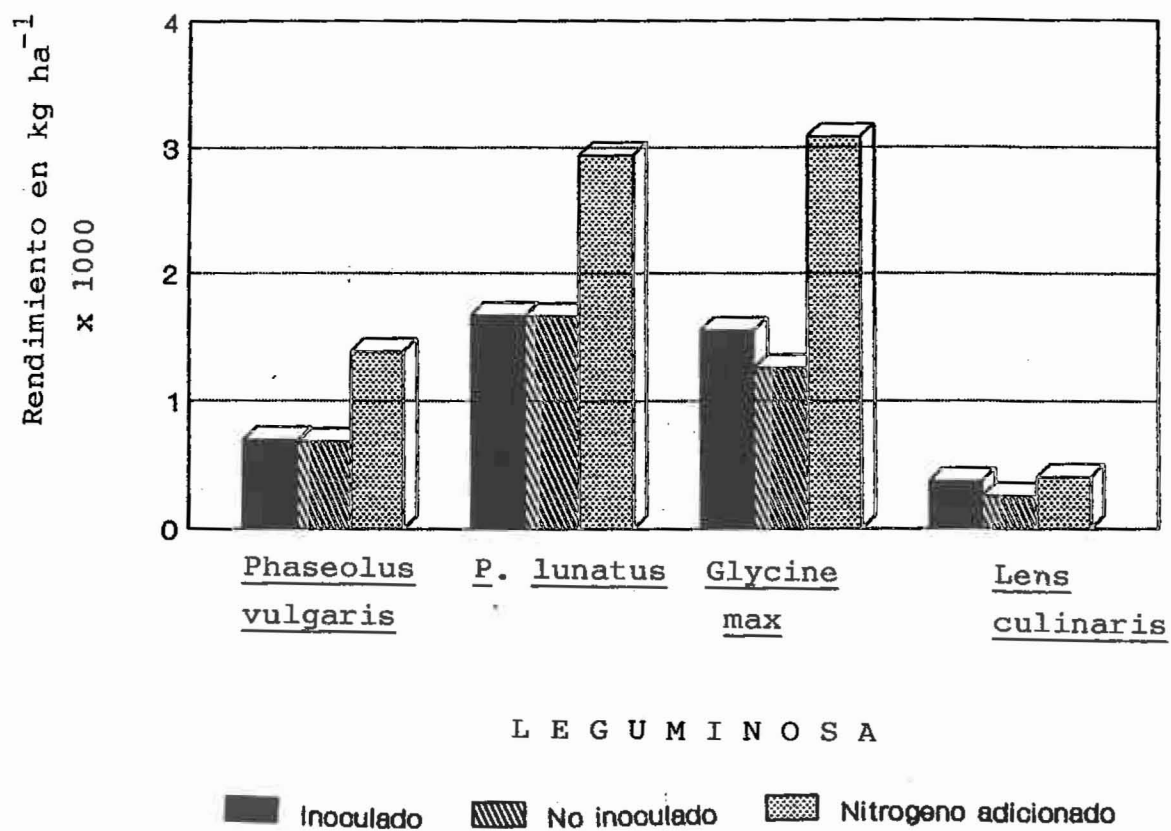


Figura 4.11. Respuesta a la inoculación (rendimiento en grano) de leguminosas crecidas bajo condiciones de campo, sitio 3 (lote N^o 1) Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica.

4.8 Tipificación serológica de los nódulos

Se tuvo dificultades para realizar la identificación de las cepas que colonizaron los nódulos, ya que no pudo contarse a tiempo con la totalidad de los antisueros y al final solamente se pudo disponer de dos de ellos. Estos antisueros correspondieron a las cepas TAL 102 para *Bradyrhizobium japonicum*, microsimbionte de la soya (*Glycine max*) y TAL 634 para *Rhizobium leguminosarum* biovar *vicea* hospedero de lenteja (*Lens culinaris*).

Para la cepa TAL 102 se observó que en las tres repeticiones efectuadas, la totalidad de los nódulos de los tratamientos inoculados, presentaron fluorescencia al observarse en el microscopio de luz ultravioleta. De igual forma los nódulos de los tratamientos no inoculados (cepas nativas) presentaron fluorescencia en un alto porcentaje (50%).

Para la cepa TAL 634 se observó que la totalidad de los nódulos de los tratamientos inoculados presentaron fluorescencia al microscopio. Como ya se indicó anteriormente, no se obtuvo nodulación en los tratamientos no inoculados.

Cuadro 4.26 Modelos de regresión ajustados con los datos de todos los experimentos (1 invernadero y tres de campo), CATIE, Turrialba, Costa Rica.

Nº	MODELO	CONTENIDO DE N			MATERIA SECA PRODUCIDA			RENDIMIENTO EN GRANO		
		F	SIG.	R ²	F	SIG.	R ²	F	SIG.	R ²
1	Y=X	11.7211	**	0.4168	9.9046	**	0.3725	4.8744	NS	0.3563
2	Y=X+XX	6.0683	*	0.4033	4.8210	*	0.3375	2.0909	NS	0.2376
3	Y=X+XX+XXX	3.7824	*	0.3575	3.0245	NS	0.2882	1.2406	NS	0.0935
4	Y=1/X	10.1026	**	0.3777	15.5661	**	0.4927	1.1358	NS	0.0190
5	Y=1/X+X	11.8616	**	0.5915	14.9593	**	0.6505	2.1031	NS	0.2396
6	X/Y=X	0.0		0.0	0.0		0.0	0.0		0.0
7	XX/Y=X+XX	0.0		0.0	0.0		0.0	0.0		0.0
8	1/Y=X	0.0		0.0	0.0		0.0	0.0		0.0
9	LN Y=X	7.7626	*	0.3107	7.2187	*	0.2931	5.1547	NS	0.3725
10	LN Y=LN X	0.0775	NS	-0.0655	0.0913	NS	-0.0645	4.3418	NS	0.3231
11	LN Y=LN X+X	11.9447	**	0.5934	9.9700	**	0.5446	2.2989	NS	0.2707
12	Y=LN X	1.2361	NS	0.0155	1.1893	N/S	0.0125	4.2095	NS	0.3144
13	LN Y = 1/X	5.1967	*	0.2186	5.6896	*	0.2382	1.2348	NS	0.0325
14	LN Y= 1/X+X	5.6601	*	0.3832	5.6544	*	0.3829	2.2422	NS	0.2620

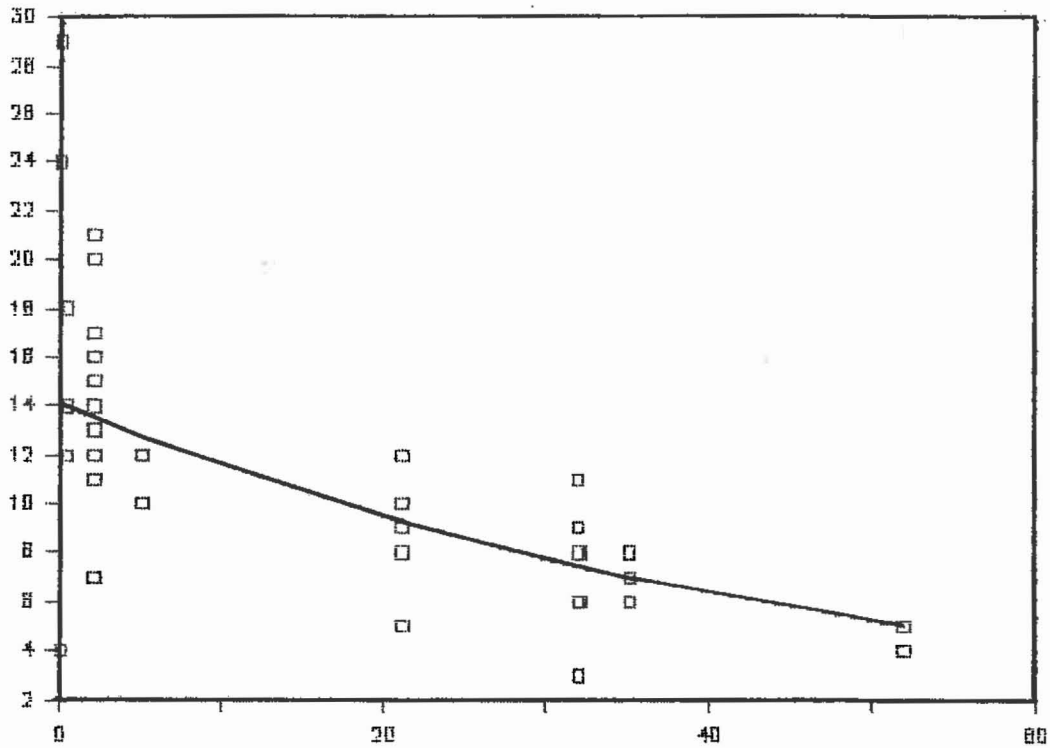


Figura 4.12. Gráfico del modelo de regresión exponencial negativo que muestra el comportamiento de las especies leguminosas en todos los experimentos en relación con la respuesta a la inoculación en competencia con rizobios nativos, CATIE, Turrialba, Costa Rica.

Cuadro 4.27 Modelos de regresión* que describen el incremento en rendimiento de algunas variables en relación con la población nativa de rizobios en la Estación Experimental La Montaña, CATIE, Turrialba, Costa Rica^{1/}

Variable	Invernadero	Campo 1	Campo 2	Campo 3
Materia seca	-12,90+253,80 x (0,89)	-29,36+382,79 x (0,96)	-9,84+197,47 x (0,98)	-10,059+182,42 x (0,95)
Contenido de N total	-484,86+8351,93 x (0,93)	-1284,11+16652,9 (0,98)	-327,56+6281,15 x (0,99)	-381,7+6954,6 x (0,94)
Rendimiento	----	-7377,45+99115 x (0,86)	-1293,06+24145,4 x (1,0)	2865,07-0,028 x (0,81)

1/ Promedio de 4 repeticiones

2/ Valores entre paréntesis corresponden al coeficiente de determinación R²

* Modelo hiperbólico

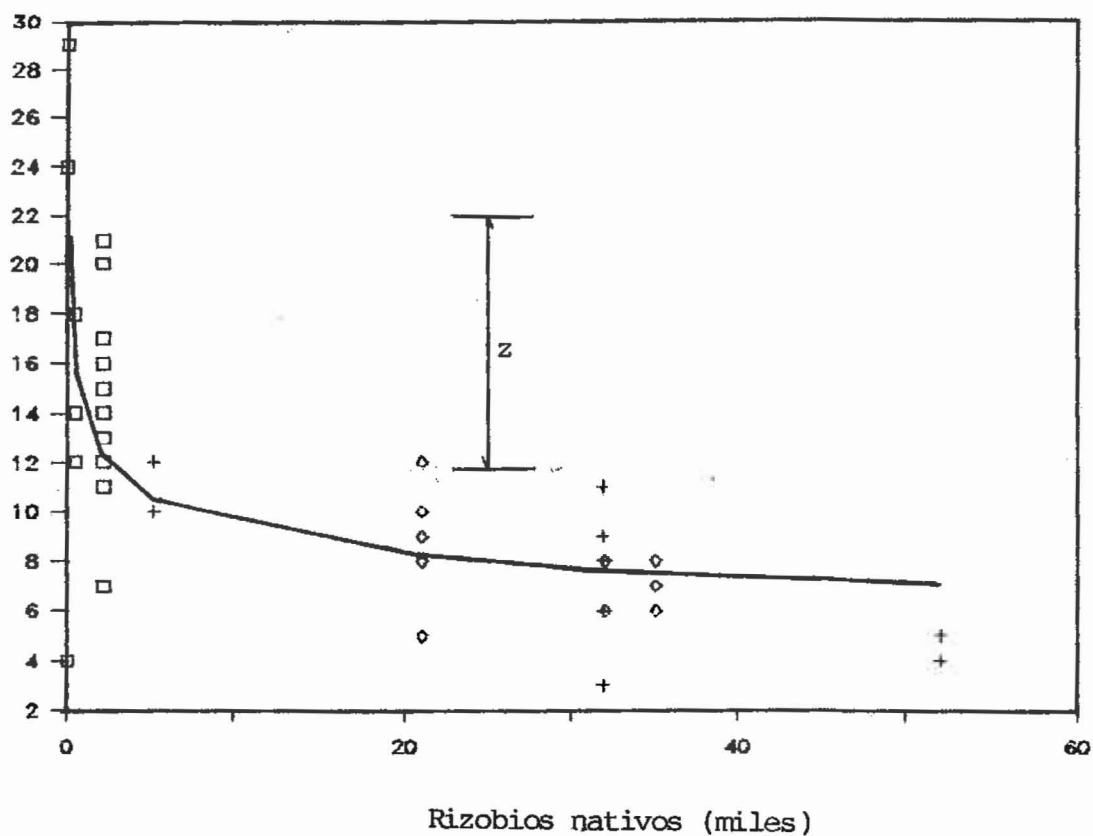


Figura 4.13. Gráfico del modelo de regresión hiperbólico que muestra el comportamiento de especies leguminosas en relación con la respuesta a la inoculación en competencia con rizobios nativos, CATIE, Turrialba, Costa Rica.

5. DISCUSION

5.1 Caracterización de los sitios

5.1.1 Recuento y caracterización de malezas

Los experimentos fueron realizados en terrenos localizados dentro de la Estación Experimental "La Montaña" en el CATIE, Turrialba, Costa Rica. Los suelos aquí han recibido, a través de los años diferentes sistemas de manejo, dependiendo del tipo de ensayo. Así, es posible que en un ciclo de cultivo se haya sembrado hortalizas con labranza convencional y en otro se haya plantado maíz con cero labranza o labranza reducida, por ejemplo.

La anterior situación provoca cambios en las propiedades fisicoquímicas de los suelos y en la composición florística de las malezas (tipo, densidad, estacionalidad). Sólomente este último factor por ejemplo, podría afectar el tipo y composición de exudados radicales a los cuales va a estar expuesta la microflora y microfauna del suelo con habilidad para colonizar la rizosfera.

Los rizobios en el suelo no sólo se comportan como organismos capaces de sobrevivir en competencia saprofítica con otras bacterias, sino también de comportarse como un organismo típicamente rizosférico, tal como lo evidenció recientemente Viteri, S. y Schmidt, E. (1987) y Germida, J. (1988). Esto significa que el *Rhizobium* es capaz de competir por sustratos, los cuales pueden provenir de materiales orgánicos o de los

exudados radicales de plantas ya sean hospederas o no. De esta manera, la proliferación de malezas en suelos, podría jugar un papel decisivo ya sea estimulando o inhibiendo las poblaciones nativas de rizobios, dependiendo de la calidad y/o cantidad de exudados radicales.

Esto justifica la caracterización de las malezas en los sitios donde se realizaron los ensayos, para establecer posibles interacciones entre éstas y la población nativa de *Rhizobium*.

En este estudio se observó que en el sitio 1 (barbecho), las malezas de tipo C_4 ocuparon un 30% relativo y las de vía fotosintética C_3 un 70%. Malezas de la familia *Fabaceae* (*Leguminosae*) ocuparon un 16% en relación con las otras familias de plantas.

En el sitio 2 (recientemente cultivado) la proporción fue de 92% para malezas de tipo C_3 y 8% para las de vía C_4 . Las plantas de la familia *Fabaceae* ocuparon apenas un 1% del total.

Finalmente en el sitio 3 (barbecho) las malezas de vía C_4 predominaron en el terreno con 87% del total a diferencia de las del tipo C_3 las cuales alcanzaron un 13%. Las malezas de la familia *Fabaceae* ocuparon 4% en esta ocasión.

La composición florística de las plantas en el segundo sitio, con predominancia de malezas anuales, se vio posiblemente influenciada por los tipos de labranza convencional utilizados con anterioridad en este

sitio. En efecto, de acuerdo con Fawcet, R. et al, 1978; Terptr, R. 1986 y Baskin, J. et al, 1987 , el crecimiento de malezas anuales se favorece con este tipo de labranza, pues éstas sobreviven bajo condiciones de disturbio constante de suelo, debido a la gran producción de semillas sexuales que permanecen viables durante años y además su viabilidad aumenta con la profundidad del suelo, enterrado que ocurre con cada ciclo de labranza.

Para el primer sitio en barbecho (experimento 1), es probable que el tipo y grado de enmalezamiento se haya visto influenciado por antecedentes de ensayos con la maleza *Melampodium perfoleatum*. Bajo condiciones de experimentación, las semillas de esta maleza se pudieron haber introducido al banco de semillas preexistente en el suelo, manifestándose en altas proporciones al disturbar de nuevo el terreno.

En el caso del segundo sitio en barbecho (experimento 3), hubo predominio de malezas perennes sobre las anuales. De acuerdo a Fawcet, R. et al (1978), los sistemas de cero labranza o ausencia de disturbio del suelo, favorecen una mayor emergencia de especies perennes, pues sus sistemas radicales necesitan menos disturbio del suelo para establecerse plenamente, lo que no ocurriría bajo labranza convencional.

Se ha encontrado que la labranza del suelo es un promotor de la emergencia de plántulas de maleza en el campo, debido al estímulo que produce el disturbio del suelo sobre las semillas, ya que las expone a la superficie donde las mismas rompen la latencia al recibir luz, mejorarse la aireación, y quedar expuestas a fluctuaciones de

temperatura y humedad (Eagley, G.H. 1986). De esta manera las malezas perennes por su tipo de establecimiento y reproducción, se verá disminuída su población bajo sistemas de labranza convencional, a diferencia de las malezas anuales, que se verán favorecidas con este tipo de labranza. Enseguida se discute cómo estas diferencias en composición de malezas, podrían asociarse con cambios en la población nativa de *Rhizobium*.

5.1.2 Poblaciones nativas de rizobios

Debe recordarse aquí que los recuentos de los rizobios nativos, se hicieron antes de realizar cualquier práctica nueva de manejo de los suelos. De esta manera la presencia de las poblaciones nativas de rizobios en los tres sitios, estuvo seguramente influenciado por las prácticas de manejo anteriores a los ensayos y posiblemente a los efectos rizosféricos de las malezas.

Comparando las poblaciones nativas de rizobios entre los tres sitios en estudio, sobresale el hecho que el número de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* en el sitio 2 (cultivado), fue sensiblemente menor a los otros dos sitios, a pesar de haber sido cultivado en el ciclo de siembra anterior *Phaseolus vulgaris*, hospedero natural de este microsimbionte. Se esperaba encontrar una población mayor en este sitio, en relación con los dos en barbecho, pues la estimulación de los rizobios nativos a través de la multiplicación y la contribución de la población de los nódulos, era más factible de ocurrir donde se cultivaba intensivamente

su leguminosa hospedero. Recientemente Germida, J. (1988) informó de una estimulación específica del hospedero en los campos donde se había sembrado recientemente *Medicago sativa* (alfalfa), en los cuales se encontró una población nativa de *Rhizobium leguminosarum* biovar *meliloti* mientras que en otros sitios donde no se había sembrado la alfalfa el *R. leg. bvr. meliloti* estuvo ausente.

En el sitio donde estaba sembrado el frijol común, se acostumbra aplicar fertilizantes nitrogenados para aumentar rendimientos, y así obtener más cantidad de semilla. Dado que la adición de nitrógeno combinado ejerce un efecto inhibitorio sobre el establecimiento de la simbiosis *Rhizobium* - leguminosa, es posible esperar que en el sitio 2 (recientemente cultivado) se haya inhibido en alguna medida el proceso de nodulación entre el microsimbionte y el frijol común. Esto pudo haber afectado la densidad de los rizobios nativos pues la multiplicación de los mismos en los nódulos y su posterior liberación al suelo durante la senescencia del nódulo posiblemente se disminuyó.

Alternativamente, la presencia de las malezas anuales en el sitio 2 después del ciclo de siembra del frijol pudo haber afectado la población nativa a través de excreción de exudados radicales con un posible efecto antagónico a *Rhizobium* o indirectamente a través del estímulo de una microflora antagónica o más competitiva que desplazó a esta bacteria.

Esta última hipótesis es atractiva para explicar también el comportamiento de *Bradyrhizobium japonicum* con el cual ocurrió una

situación similar de menor densidad de rizobios en el sitio cultivado, que en los dos sitios en barbecho.

Por otro lado los sitios en barbecho presentaron una mayor población nativa tal vez por su composición florística. En efecto, Brown, M. (1982) anota que las plantas tropicales que apoyan mejor la fijación de N_2 en la rizosfera son aquellas de vía fotosintética C_4 , ya que forman más fotosintatos y excreciones de las raíces, que las plantas de vía C_3 , al tomar ventaja de temperaturas e intensidades de luz más altas, existentes en este medio ambiente. Tomando en consideración esta información y correlacionándola con el recuento y caracterización de malezas en los tres sitios, se observó (cuadros 4.1 a 4.3 y figura 5.1), que la densidad de plantas de vía C_4 en los dos sitios en barbecho fue mayor que en el sitio cultivado. La estimulación de *Rhizobium* en este caso estaría restringida desde luego a un efecto rizosférico.

Aunado a lo anterior vale la pena destacar el hecho que las plantas de la familia *Fabaceae* (*leguminosae*) fueron más numerosas en los sitios en barbecho uno y tres con un 16% y 4% correspondientemente, a diferencia del experimento dos, donde apenas alcanzaron el 1% del total. Se ha atribuido a estas plantas con sus secreciones radicales un efecto estimulador directamente de las poblaciones nativas de rizobios así como aumento en la nodulación, esto último incrementa indirectamente la población nativa al liberarse las bacterias durante la senescencia del nódulo, tal como ha sido convenientemente demostrado por Bromfield, E. et. al. (1986) y Parker, C. et. al. (1977).

Las anteriores consideraciones aunque no explican la diferencia de poblaciones de rizobios entre sitios sugieren al menos, que la dinámica poblacional de los rizobios nativos, pudo haber sido influenciada por las características de las malezas nativas.

Otro factor que debe ser tomado en cuenta es la época en que se hizo los muestreos para realizar los recuentos de rizobios nativos. Esta no coincidió en los tres casos, habiendo una diferencia de seis meses entre el sitio uno y dos, y de nueve meses entre el uno y tres. Además el muestreo en el segundo sitio (cultivado), se hizo en época de menor precipitación que los otros dos sitios, esta situación podría haber permitido que en los sitios en barbecho, el suelo se mantuviera más cerca de su capacidad de campo al momento del muestreo, a diferencia del sitio cultivado y bajo estas condiciones las poblaciones de *Rhizobium* podrían ser más estables, tal como lo sugiere Peña-Cabriales, J. y Alexander, M. (1983).

Debe anotarse aquí que la técnica del número más probable utilizada para hacer los recuentos de los rizobios del suelo, tiene sus limitaciones en cuanto a su precisión: la misma está basada en la teoría de la probabilidades. El cálculo del número más probable se basa en la presencia o ausencia de nódulos en plantas trampa (diferentes leguminosas) inoculadas con varias diluciones consecutivas de la muestra a evaluar (suelo). Esta técnica supone que los rizobios están distribuidos aleatoriamente en las diferentes diluciones y que al menos uno o más de ellos son capaces de producir un nódulo radical. Desde

luego para que una sólo célula bacterial llegue a infectar la planta para formar nódulos (reacción positiva) debe primero multiplicarse en la rizosfera de la planta hospedero en cuestión, como etapa previa a la infección. Cabe la posibilidad que células que en medios de cultivo (ricos en factores de crecimiento) crecen sin dificultad para formar colonias no lo hagan en las condiciones más restrictivas de la rizosfera. De ser ésto cierto es esperable una discrepancia entre el recuento viable en plato y el número más probable, cosa que ocurrió como se explica más adelante.

La confiabilidad de esta técnica ha sido evaluada recientemente para enumerar rizobios en suelos tropicales (Woomer, P. et.al., 1988) y los resultados alcanzados permiten establecer que la técnica es segura y precisa cuando se utilizan grandes números de muestras para satisfacer los requerimientos estadísticos, así como en ensayos de suficiente continuidad, tal como se informa en los trabajos de Brockwell, J. 1963; Weaver, R. et al 1972; Scott, J. et al 1986 y Woomer, P. et al 1988.

5.1.3 Correlación entre recuento en plato y técnica de infección de plantas

A pesar de las restricciones señaladas para la técnica de infección de plantas, ésta puede ser utilizada adecuadamente empleando intervalos de confianza tomados de tablas calculadas exprofeso. De esta forma se pueden hacer comparaciones con los recuentos en plato. Así, en este experimento la tendencia general observada fue que las poblaciones de

rizobios estimadas por el recuento en plato (controles) fueran siempre mayores, comparadas con la técnica de infección de plantas, lo que sugiere que podría existir mayor cantidad de rizobios en el suelo, de la que se estimó con la técnica de infección de plantas. Aunque no se pudo precisar el origen de tales diferencias, posiblemente las condiciones para la multiplicación *in vivo* sean más restrictivas que *in vitro*. Bajo las condiciones en que se ejecutó la determinación del número más probable de rizobios, los resultados se consideraron confiables y comparables.

5.2 Respuesta a la inoculación en condiciones controladas

Las leguminosas tropicales varían ampliamente en su respuesta a la inoculación, de tal forma que no ha sido posible hasta hoy predecir con buen grado de certidumbre esta respuesta en algún sitio en particular, a pesar de los esfuerzos realizados para ello. Ante esta situación cabría preguntarse ¿por qué esa amplitud de respuesta a la inoculación por parte de algunas leguminosas tropicales?, ¿qué factores bióticos y/o abióticos existentes en este medioambiente influyen mayormente?, ¿se podría de manera práctica controlar estos factores una vez identificados, de tal forma de mejorar sustancialmente la simbiosis Rhizobium- leguminosa?, ¿será posible predecir con buen grado de certidumbre el éxito o fracaso de la inoculación de leguminosas para algún sitio en particular? y de ser posible ésto último ¿que información se necesitaría?.

Recientemente Schmidt, E. (1985) señaló que el comportamiento de los rizobios como bacteria de vida libre es el principal determinante del éxito a la inoculación de las plantas leguminosas, y que se debería esclarecer de qué manera esos rizobios nativos afectan esta respuesta; esto ha sido compartido también por otros investigadores (Singleton, P. y Tavares, J. 1986; Singleton, P. , Roskoski, J. y Woomey, P. 1987. En el presente trabajo también se siguió este enfoque para evaluar la respuesta a la inoculación de diferentes leguminosas seleccionadas en función de la presencia o ausencia de su correspondiente microsimbionte en el suelo. La selección de las leguminosas se hizo en base a los siguientes criterios: a) disponibilidad de semilla, b) presencia o no del microsimbionte específico en el suelo y c) tipo de crecimiento para facilidad de manejo. Esto último limitó la selección de especies forrajeras.

Específicamente para el ensayo de invernadero se seleccionó tres especies para las cuales en el recuento del número más probable se evidenció que existía población nativa de rizobios y la cuarta fue una aislina no noduladora considerando que su crecimiento y desarrollo sería indicador de la capacidad de la leguminosa para extraer el nitrógeno presente en el suelo.

Ahora bien, el éxito a la inoculación de una leguminosa en particular, puede evaluarse en términos de incremento, tanto en materia seca producida, contenido de N total en biomasa aérea, nodulación (número y peso seco) y rendimiento en grano. Tales parámetros han sido convenientemente utilizados por la mayoría de investigadores (Vincent,

J. 1970; Stowers, M. y Elkan, G. 1980; Somasegaran, P. y Hoben, H. 1985; Singleton, P. Roskoski, J. y Woome, P. 1987). Así bajo las condiciones controladas de invernadero se realizó la evaluación de las leguminosas empleadas; el propósito de este ensayo era fundamentalmente comparar y correlacionar los resultados alcanzados con los datos de campo. El suelo que se utilizó para este ensayo fue el del sitio 1, el cual como ya se mencionó se mantenía en barbecho por tres años, aunque con antecedentes previos de ensayos sobre comportamiento de malezas. Dado que la poca cantidad de suelo en los maceteros podría reducir considerablemente los rendimientos en grano de las leguminosas, no se llegó hasta esta etapa sino que se cosechó cuando las diferencias visuales entre plantas eran muy evidentes.

La tendencia general observada fue que los tratamientos con nitrógeno adicionado (+N), resultaran siempre superiores para las variables materia seca y contenido de nitrógeno total en biomasa aérea, en todas las especies leguminosas empleadas, comparadas con los tratamientos inoculado (I) y no inoculado (U). Este fue un comportamiento esperado, ya que se adicionó suficiente nitrógeno tanto para cubrir holgadamente los requerimientos nutricionales de las leguminosas, traduciéndose en mayor producción de materia seca y contenido de N total en biomasa aérea, como para inhibir la nodulación de los rizobios nativos, tal como se observó (cuadro 4.15).

En las especies *Phaseolus vulgaris*, *P. lunatus* y *Glycine max* aislínea no noduladora, no se observó ni visual ni estadísticamente respuesta a la inoculación, para ninguna de las dos variables. En la especie *G. max*

noduladora en cambio, se presentó respuesta a la inoculación, tanto visual como estadísticamente, quedando debidamente documentada.

Otros factores que limitan la simbiosis *Rhizobium*- leguminosa, como la humedad, pH, nutrimentos disponibles, fueron controlados en la medida de lo posible para permitir que se manifestara sin otro tipo de restricciones la competencia por nodulación entre los rizobios inoculados y los nativos. Es por esta razón que las diferencias encontradas entre los tratamientos inoculados y no inoculados sugieren que las poblaciones nativas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* y *R. misceláneo* tipo caupí influyeron negativamente, al menos en su número en la respuesta a la inoculación de *Phaseolus vulgaris* y *P. lunatus* correspondientemente, en el ensayo de invernadero.

Por el contrario en la especie *Glycine max* la densidad poblacional del *Bradyrhizobium japonicum* presente no fue al parecer una barrera para que se estableciera con mejor funcionamiento la simbiosis, permitiendo una respuesta positiva a la inoculación.

Para la nodulación, la tendencia general observada fue similar al caso de las otras variables, ya que en las especies *Phaseolus vulgaris* (frijol común) y *P. lunatus* (frijol lima) no se observó diferencias entre los tratamientos inoculados y no inoculados; en la especie *Glycine max* en cambio hubo diferencias significativas entre estos mismos tratamientos.

Puesto que la hipótesis inicialmente planteada de que la población nativa de rizobios, tanto en su número como efectividad es la que determina el éxito o fracaso a la inoculación, de una leguminosa dada, puede sugerirse aquí que al menos el número de rizobios nativos para el frijol común y el frijol lima, influyó negativamente impidiendo una respuesta, similarmente al caso de las otras variables. Así mismo, para la soya la respuesta mostrada en incremento en nodulación podría haber sido influenciada por la menor densidad de su microsimbionte nativo.

5.2.1 Efectividad de las cepas nativas y ocupación de los nódulos

Se estima que en la mayoría de los sitios, las poblaciones nativas de rizobios son muy inestables y cuando establecen la asociación simbiótica con leguminosas son, en la mayoría de los casos, inefectivas. Un método práctico para evaluar la efectividad de la población nativa de rizobios es el de coleccionar nódulos y partirlos longitudinalmente para observar si tienen coloración rojiza en el interior, lo cual se interpretaría como síntoma evidente de actividad de leghemoglobina, el pigmento acarreador de O_2 en el proceso de fijación del dinitrógeno atmosférico.

Para este estudio se observó que las poblaciones nativas de rizobios variaron en su eficiencia (fijación efectiva de N_2 atmosférico) entre cepas. Así por ejemplo, para *Rhizobium* misceláneo tipo caupí la proporción fue muy alta, lo que podría indicar en primera instancia, que la mayoría de los rizobios nativos que ocuparon los nódulos fue eficiente. Así mismo, *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* y

Bradyrhizobium japonicum, mostraron el mismo comportamiento aunque en menor grado.

Reiterando que los experimentos fueron realizados bajo condiciones de fertilidad mejorada de los suelos, es conveniente anotar en este punto los posibles efectos de este hecho, sobre las cepas nativas de rizobios. Puesto que se mejoraron sustancialmente las condiciones de fertilidad de los suelos, en términos de pH, nivel de nutrimentos como P, Fe, Mo, Zn, humedad disponible, factores que están íntimamente ligados al buen funcionamiento de la asociación simbiótica Rhizobium-leguminosa (Lowendorf, H. 1980) la eficiencia de los rizobios en los nódulos se pudo haber incrementado sustancialmente. Así mismo, el encalado tiende en general a aliviar los problemas de establecimiento de cultivos en suelos ácidos, al elevar el pH del suelo y los niveles de calcio, contrarrestando así problemas de toxicidad causados por Al y Fe. Como resultado de este mejoramiento en las condiciones del suelo, las plantas leguminosas hospederas responden con cambios en la calidad y cantidad de exudados de las raíces, lo que a su vez provoca una proliferación diferencial de las poblaciones nativas de rizobios, con cambios concomitantes en la ocupación del nódulo por algún serogrupo en particular. Esta afirmación está respaldada por los hallazgos en este mismo sentido de Brockwell, J. et al (1982), los cuales trabajaron con cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. Además de esto, el encalado puede provocar directamente esta proliferación diferencial independientemente de la planta hospedero, tal como lo sostienen Dughri, M. et al (1983), Leung, K. y Bootomley, P. (1987) , Almendras, A. y Bootomley, P. (1987). Independientemente de cual de las dos

aseveraciones sea la conclusiva, lo relevante es de que se presenta una proliferación diferencial entre la población nativa de rizobios con el encalado de los suelos.

Los resultados obtenidos para los nódulos de *Glycine max* en el sentido de que la totalidad de los nódulos en los tratamientos inoculados, presentaron fluorescencia al microscopio de luz ultravioleta, podría indicar que la cepa inoculada TAL 102 ocupó predominantemente los nódulos y de esta manera fue más agresiva y competitiva que las cepas nativas. Sin embargo el hecho que un alto porcentaje de los nódulos en los tratamientos no inoculados (cepas nativas) hubiera presentado también fluorescencia, impide postular la aseveración de que que las cepas inoculadas tuvieron más agresividad y competitividad que las nativas, en estos tratamientos. Así mismo hubo respuesta a la inoculación sugiriendo con ello que la cepa TAL 102 fue más eficiente que las nativas en el porcentaje de nódulos no ocupados por la cepa "naturalizada" TAL 102 en los tratamientos.

Una hipótesis atractiva para explicar este suceso puede derivarse de lo siguiente: existe la posibilidad de que uno o más de los antígenos en la periferia de las células de rizobios inoculados, contra los cuales se prepararon los antisueros, pudieran encontrarse también en las cepas nativas, con lo cual se estaría en presencia de una verdadera reacción cruzada, ya que dos cepas diferentes de rizobios poseen uno o más antígenos iguales, en la periferia de sus células. Otra consideración puede establecerse en el sentido que se trate de la misma cepa TAL 102 que pudo haberse establecido en este lugar por medio de experimentos

anteriores de inoculación o por contaminación. Si ésto es en realidad lo que ocurrió, entonces ya no se trataría de población nativa de rizobios, sino de población naturalizada, en la cual jugaría un papel preponderante la cepa identificada como TAL 102.

Quedaría por dilucidar si la predominancia del serogrupo TAL 102 de *Bradyrhizobium japonicum* en los nódulos de plantas no inoculadas, es resultado de una proliferación diferencial de sus miembros sobre otros serogrupos presentes o bien la composición de la población nativa de rizobios ya estaba dominada por este serogrupo antes del encalado.

Dado que no fue posible realizar las tipificaciones para las otras especies de leguminosas, no se puede establecer el grado de competitividad de cada cepa en relación con las cepas nativas.

5.3 Respuesta a la inoculación bajo condiciones de campo

Los ensayos de invernadero son herramientas valiosas para hacer una evaluación primaria de respuesta a la inoculación por plantas leguminosas, sin embargo para evaluaciones completas, debe realizarse también experimentos de campo ya que bajo estas condiciones la asociación simbiótica Rhizobium-leguminosa estará siendo probada en una situación natural más compleja y por consiguiente arrojará resultados más reales. Por ello el sitio 1 (barbecho) se sembró las mismas especies leguminosas que para el ensayo de invernadero y establecer así

comparaciones. Se observó las mismas tendencias que bajo las condiciones controladas, en todas las leguminosas: el frijol común, frijol lima y soya no noduladora no presentaron diferencias entre las plantas no inoculadas y las inoculadas; en cambio la soya noduladora se presentó respuesta temprana visual que no se evidenció estadísticamente. Este comportamiento de la soya es conveniente resaltarlo ya que se presentó en los tres experimentos de campo.

Una hipótesis atractiva para explicar este hecho puede derivarse de los hallazgos de Singleton, P. y Stockinger, K. (1983) y Delves, A. et al (1986), los cuales trabajaron con *Glycine max* para medir la influencia de las diferentes proporciones de nódulos efectivos e inefectivos sobre la fijación del N₂, encontrando que la planta realizó un aporte selectivo de fotosintatos a nódulos efectivos formados por cepas nativas, como un mecanismo compensatorio para la nodulación inefectiva. El hecho que en el presente experimento la población nativa no halla ocupado la totalidad de nódulos en los tratamientos no inoculados y que no se haya obtenido el 100 por ciento de nódulos efectivos en estos mismos tratamientos para el *Bradyrhizobium japonicum*, nos inducen a anotar que la planta hospedero desarrolló este mismo mecanismo compensatorio y de esta manera se compensó el crecimiento y desarrollo de los tratamientos no inoculados en relación con los inoculados.

Para el experimento 2 se hizo cambios en las especies leguminosas: se utilizó *Cicer arietinum* (garbanzo) en sustitución de la soya no noduladora ya que la primer especie mencionada no noduló en ningún tratamiento de las diferentes diluciones de suelo empleadas en el

recuento del número más probable, sospechándose una ausencia del microsimbionte específico; así mismo se cambió el cultivar de *Phaseolus lunatus* (frijol lima) por uno local ya que se agotó la semilla del utilizado en el experimento anterior.

Las tendencias observadas aquí fueron similares a los anteriores ensayos, ya que no se observó ni visual ni estadísticamente diferencias entre plantas inoculadas y no inoculadas para frijol lima y garbanzo en producción de materia seca; en frijol común se presentó respuesta aunque no suficientemente clara ya que estadísticamente los tratamientos inoculados tendieron a ser iguales a los de nitrógeno adicionado, pero también a los no inoculados. Para la variable contenido de N en biomasa aérea el garbanzo presentó esta misma situación. No hubo tampoco diferencias para las variables nodulación y rendimiento en grano.

Debe destacarse algunos hechos observados en este experimento 2. Primeramente el haber utilizado garbanzo (*Cicer arietinum*) la cual es una especie sin antecedentes de siembra en estos sitios; agroecológicamente no es ésta la zona donde se pueda maximizar el rendimiento potencial del cultivo, ya que éste se desarrolla mejor en una zona más seca y de mayor altitud (Sanchez, A. et al 1982); conjuntamente con la especie debe anotarse los posibles efectos de cultivares empleados, hecho que se resalta al observar los rendimientos alcanzados en producción de grano, pues en los tratamientos con nitrógeno adicionado se obtuvo un promedio menor al de otros cultivares empleados (Fuenmayor, E.J.F., 1985), lo que podría sugerir que los cultivares no alcanzaron su rendimiento potencial máximo a pesar de

existir supuestamente condiciones adecuadas para ello como la fertilidad mejorada del suelo, humedad disponible, control de plagas y enfermedades. Ello evidencia que las condiciones climáticas fueron las que limitaron en mayor grado este rendimiento potencial. Informes de varios investigadores demuestran que el desarrollo de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa está bajo el control de factores tanto de parte aérea como radicales y que estos factores interactúan (Delves, A. et al 1986; Singleton, P. et al 1987). La nodulación temprana, que es la que potencialmente aporta la mayor cantidad de N fijado, está sujeta a control por factores de la planta, aunque los sitios precisos son desconocidos (Kosslak, R. y Bohlool, B. 1984; Lawn, R. y Brun, W. 1974; Lawn, R. y Bushby, H. 1982). Estos hallazgos apoyan la sugerencia de que los cultivares a través de su rendimiento potencial restringido limitaron el proceso de fijación simbiótica del nitrógeno.

Otra consideración debe establecerse en el sentido de que no se realizó un experimento paralelo, bajo condiciones de fertilidad natural. Es posible que bajo estas últimas condiciones las cepas nativas pudieran tomar ventaja sobre las inoculadas, las que tendrían que sobrevivir y multiplicarse bajo un medioambiente ácido como lo es los suelos de la Estación Experimental "La Montaña" cuyos niveles de Al y Fe podrían ser tóxicos para los inoculados. Se esperaría bajo estas condiciones que la colonización de los nódulos la ocupara predominantemente las cepas indígenas y así la respuesta a la inoculación entonces, estaría supeditada a la eficiencia de estos mismos rizobios para fijar nitrógeno.

En el experimento de campo 3 se hizo otro cambio: se utilizó *Lens culinaris* (lenteja) en sustitución de garbanzo (*Cicer arietinum*) ya que para la primer especie mencionada no se detectó población nativa; además se utilizó de nueva cuenta el cultivar de *Phaseolus lunatus* (frijol lima) empleado en el primer experimento.

Se observó la misma tendencia que en los anteriores ensayos en relación con los tratamientos de nitrógeno adicionado. La lenteja y la soya mostraron respuesta visual a la inoculación, la cual se evidenció también estadísticamente en todas las variables. Las plantas no inoculadas de lenteja no presentaron nodulación y las inoculadas fueron estadísticamente iguales a las de nitrógeno adicionado, evidenciando con ello una clara respuesta a la inoculación. Esto último tiene relevancia pues al parecer la cantidad de nitrógeno adicionada, no fue aprovechada eficientemente por las plantas bajo este tratamiento, mientras que el nitrógeno obtenido por vía de la fijación simbiótica le redituó más ganancia en términos de desarrollo.

Así, los resultados alcanzados en los cuatro experimentos realizados, permiten sugerir que cuando la población nativa de rizobios para una leguminosa en particular fue alta, no se obtuvo respuesta a la inoculación ni visual ni estadísticamente. En cambio a medida que la población nativa de rizobios del suelo tendió a disminuir, se observó respuestas tempranas a la inoculación (visuales), las cuales no siempre se mantuvieron debido posiblemente a mecanismos compensatorios del hospedero.

5.4 Análisis estadístico de los datos

Los análisis efectuados para todos los experimentos permitió observar que las especies leguminosas fueron diferentes entre sí para todas las variables estudiadas, demostrando con ello su diversidad genética como especie. Las comparaciones realizadas entre las fuentes de nitrógeno (inoculado, no inoculado y N adicionado) dentro de cada especie permitió identificar con precisión las diferencias entre estos tratamientos y con ello el éxito o fracaso de la inoculación para una especie leguminosa en particular. Así esta comparación resultó la más útil de las efectuadas.

5.5 Modelos de regresión

En relación con las regresiones efectuadas para probar el ajuste de los datos a un modelo matemático puede anotarse lo siguiente:

Al probar el ajuste de los datos obtenidos a modelos matemáticos se trató de representar el fenómeno biológico de respuesta a la inoculación por leguminosas en presencia de rizobios nativos, al estar controlados otros factores que también influyen en la simbiosis Rhizobium-leguminosa, como son la fertilidad y humedad disponible entre otros. Dado que no existía antecedentes de este tipo de ajustes, se decidió correr los 14 modelos contenidos en el paquete estadístico Palmer's para identificar si alguno de ellos ajustaba bien la información; en el cuadro 4.26 se puede apreciar que algunos de estos modelos probados

tuvieron significancia para las variables contenido de N en biomasa aérea y materia seca producida, pero ninguno fue significativo para la variable rendimiento en grano; esto último daría pauta para anotar que no eran los modelos más apropiados para representar el fenómeno de interés para esta última variable y en el caso de las dos primeras no fueron los más adecuados; además de que los coeficientes de determinación (R^2) no fueron muy altos pues el mayor de ellos fue de 0,65, la gráfica conjunta de los modelos (figura 4.11) permite observar también que el ajuste al comportamiento no es totalmente adecuado toda vez que es conocido las tendencias de comportamiento de las leguminosas en este tipo de ensayos.

Por otro lado, el modelo hiperbólico $Y = a + b (1 / (\log x + 1))$ donde x es el número de rizobios indígenas por gramo de suelo, propuesto preliminarmente a raíz de otros ensayos de inoculación, donde se encontró alta correlación entre el número de rizobios nativos y la respuesta positiva de alguna leguminosa particular, fue el que mejor ajustó los datos para esas mismas variables, ya que sus coeficientes de determinación R^2 variaron entre 0,81 y 0,99 tal como se aprecia en el cuadro 4.27. Además de esto la graficación del modelo permitió observar (figura 4.13) que el comportamiento de las leguminosas se ajustaba bien a las tendencias expresadas en la gráfica. Observando la misma puede apreciarse que las especies leguminosas se distribuyeron a lo largo de la línea de regresión ajustada, de tal forma que los datos de menor magnitud se ubicaron en concordancia con la mayor densidad de los rizobios nativos. La soya (*Glycine max*) tendió a agruparse en la zona inicial de la curva donde la pendiente es mayor y que coincide con la

menor densidad de los rizobios nativos, no observándose ninguno de sus valores en el otro extremo de la curva; así mismo los datos de los tratamientos con N adicionado se agruparon por encima de los tratamientos no inoculados e inoculados, lo que podría sugerir que en estos últimos tratamientos las poblaciones nativas que colonizaron los nódulos fueron eficientes y fijaron adecuadas cantidades de nitrógeno para las plantas leguminosas; si esto es en realidad lo que ocurrió, entonces podría pensarse en que la eficiencia mostrada por las cepas nativas para la soya, fue similar a las de las cepas inoculadas y así pudiera tratarse del mismo serogrupo, lo que obligaría a considerar como población naturalizada a las nativas y el hecho que los datos de los tratamientos I y U esten intercalados puede reforzar la hipótesis de que en realidad las poblaciones nativas o naturalizadas influyen de manera importante en el éxito a la inoculación por las leguminosas; así mismo debe anotarse que el agrupamiento de los datos de la soya en esta área y la magnitud de sus valores obedece también al mayor potencial genético de esta especie comparada con las otras utilizadas. La diferencia Z presentada en la gráfica representaría ese mismo potencial genético entre las diversas especies.

Otra anotación que puede hacerse es en el sentido de que la curva tiende a estabilizarse y hacerse recta; este comportamiento podría indicar que el potencial genético de la planta es de tal magnitud que a determinado punto rendirá en la medida de este mismo potencial independientemente de la presencia de rizobios nativos.

En resumen la gráfica ayuda a explicar y objetiviza que las especies leguminosas para las cuales la población nativa de rizobios fue mayor no presentan respuesta a la inoculación y agrupan sus valores alrededor de la línea cuando ésta empieza a estabilizarse de manera recta, mientras que las especies leguminosas para las cuales la densidad de rizobios nativos fue menor tendieron a situarse alrededor de la línea donde la pendiente es mayor apreciándose respuestas a la inoculación.

Bajo las condiciones en que se ejecutaron estos análisis (poca cantidad de datos) puede establecerse que el modelo hiperbólico se ajusta bien para explicar las diferencias encontradas en porcentaje de incremento de las distintas variables. Debe sin embargo tenerse cuidado para utilizarlo con mayor cantidad de datos de otros experimentos similares.

6.- CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en la presente investigación se puede llegar a las siguientes conclusiones:

1. La respuesta a la inoculación fue variable entre las distintas especies de leguminosas empleadas, en invernadero y campo.
2. Las respuestas tempranas a la inoculación cuando las hubo, no se mantuvieron debido posiblemente a mecanismos compensatorios de la leguminosa hospedero y/o a factores agronómicos limitantes para la planta.
3. El número y efectividad de las poblaciones nativas de rizobios afectaron negativamente la respuesta a la inoculación por las leguminosas empleadas.
4. Todas las poblaciones de rizobios nativos tuvieron cepas inefectivas.
5. El incremento en nodulación (número y peso seco) fue un prerrequisito para incremento en las variables evaluadas (materia seca, contenido de nitrógeno en biomasa aérea, rendimiento en grano).
6. Las poblaciones de rizobios nativos variaron tanto en número como en especies de sitio a sitio.

7. El número y tipo de rizobios nativos tendió a ser asociado positivamente con las malezas presentes.
8. los resultados del ensayo de invernadero fueron similares con su correspondiente ensayo de campo (sitio 1).
9. Un serogrupo de rizobios (TAL 102) dominó la ocupación de nódulos en las plantas inoculadas de soya. Sin embargo una alto porcentaje de plantas de soya no inoculadas muy probablemente lo ocupó este mismo serogrupo.
10. El rendimiento potencial máximo para la zona, de las leguminosas empleadas, no se alcanzó debido probablemente a limitantes agroecológicas.
11. El fenómeno biológico de respuesta a la inoculación puede representarse convenientemente, por medio de un modelo matemático de regresión tipo hiperbólico, sugerido de ensayos similares anteriores.

7.- RECOMENDACIONES

1. Realizar recuentos por medio de la técnica del número más probable (NMP) de la población nativa de rizobios en diferentes épocas para verificar fluctuaciones de la misma.
2. Caracterizar fenotípicamente las cepas indígenas.
3. En ensayos similares utilizar cepas de Rhizobium y cultivares de leguminosas, en los que se tenga información preliminar sobre su adaptabilidad a las condiciones ecológicas del ensayo.
4. Realizar ensayos con cultivares seleccionados por su mayor capacidad de fijar nitrógeno.
5. Incluir en el protocolo experimental metodología novedosa de inoculación que pueda mejorar el comportamiento de las cepas inoculadas en competencia con las cepas nativas, como por ejemplo inoculante granular.

8.- BIBLIOGRAFIA

- AGUIRRE, V.A. 1971. Estudio de los suelos del área del Centro Tropical de Enseñanza e Investigación. Tesis Mag. Sc. Turrialba, C.R., IICA. 139 p.
- ALEXANDER, M. 1961. Introduction to soil microbiology. Ed. by J. W. ley & Sons Inc. New York. 491 p.
- ALMENDRAS, A. S.; BOTTOMLEY, P. J. 1987. Influence of lime and phosphate on nodulation of soil-grown *Trifolium subterraneum* L. by indigenous *Rhizobium trifolii*. Appl. Environ. Microbiol. (EE.UU.) 53(9): 2090-2097.
- ALSAADAWI, I. S.; RICE, E.L.; KARNS, T.K.B. 1983. Allelopathic effects of *Poligonum aviculare* L. 3. Isolation, characterization, and biological activities of phytotoxins other than phenols. Journal of Chemical Ecology (EE.UU.) 9(6): 761-774.
- ANGLE, J. S.; PUGASHETTI, B.K.; WAGNER, G.H. 1981. Fungal effects on *Rhizobium japonicum* soybean symbiosis. Agrón. J. (EE.UU.) 73 :301-306.
- AWONAIKE, K. 1980. Effects of combined nitrogen on nodulation and growth of *Phaseolus vulgaris* L. Experimental Agriculture (EE.UU.) 16(3): 303-311.
- BASKIN, J.M.; BASKIN, C. 1987. Environmentally induced changes in the dormancy states of burried weeds seeds. In: British crop protection. Conference of weeds 1987. London. p. 71-75.
- BERINGER, J. E.; JOHNSTON, A.W.B. 1977. Recent advances in *Rhizobium* genetics. Soc. Gen. Microbiol. Proc. (EE.UU.) 4: 145-146.
- BHUVANESWARI, T.V.; PUEPPKE, S.G.; BAUER, W.D. 1977. Role of lectins in plant-microorganism interactions. I. Binding of soybean lectin to rhizobia. Plant Physiol. (EE.UU.) 60: 486-491.
- BISHOP, P.E.; DAZZO, F.B.; APPELBAUM, E.R.; MAIER, R.J.; BRILL, W.J. 1977. Intergenetic transfer of genes involved in the *Rhizobium*-legume symbiosis. Science (EE.UU.) 198: 938-940.
- BOHLOOL, B.B.; SCHMIDT, E. 1974. Lectins a possible basis for specificity in the *Rhizobium*-legume root nodule symbiosis. Science (EE.UU.) 185: 169-271.
- BREMNER, J.M. 1965. Total nitrogen. In: Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties. ASA. Madison, Wis. USA. Agronomy series No.9 . p. 1149-1178.
- BROCKWELL, J. 1963. Accuracy of plant-infection technique for counting populations of *Rhizobium trifolii*. Appl. Microbiol. (EE.UU.) 11: 373-383.
- _____. 1981. A strategy for legume nodulation in developing regions of the world. Plant Soil (HOL.) 58:367-382.

- _____ ; GAULT, R.R.; ZORIN, M.; ROBERTS, M.J. 1982. Effects of environmental variables on the competition between inoculant strains and naturalized of *Rhizobium trifolii* and on rhizobia persistence in the soil. Aust. J. Agric. Res. (AUST) 33: 803-815.
- BROWN, M.E. 1982. Nitrogen fixation by free-living bacteria associated with plants. -Fact or fictions? In: Bacteria and plants. Ed. by M.E. Rhodes-Robert & F.A. Skinner. Academic Press. The society for applied bacteriology symposium. Serie No. 10. p. 25-41.
- BURNS, R.C.; HARDY, R.W.F. 1975. Nitrogen-fixation in bacteria and higher plants. Springer-Verlag Berlin. Heidelberg, New York. 315 p.
- CALDWELL, B.E.; WEBER, D.F. 1970. Distribution of *Rhizobium japonicum* serogroups in soybean nodules as affected by planting dates. Agron. J. (EE.UU.) 62: 12-14.
- CANNON, F.C. 1972. A study of the *Rhizobium* genome by genetic and physico-chemical techniques. Ph D. Thesis. Univ. Galway, Ireland. 166 pp.
- CHATEL, D.L.; PARKER, C.A. 1972. Inhibition of rhizobia by toxic soil-water extracts. Soil Biol. Biochem. (G.B.) 4: 289-294.
- CHOWDHURY, M.S. 1977. Effects of soils antagonists on symbiosis. In: Exploiting the legume-*Rhizobium* symbiosis in tropical agriculture. J.M. Vincent, A.S. Whitney and J. Bose, (eds.). University of Hawaii. Honolulu p. 385-411.
- COVENTRY, D.R.; HIRTH, J.R.; REEVES, T.G.; BURNETT, V.F. 1985. Growth and nitrogen fixation by subterranean clover in response to inoculation, molybdenum application and soil amendment with lime. Soil. Biol. Biochem. (G.B.) 17: 791-796.
- DAMIRGHI, S.M.; JOHNSON, A.W. 1986. Effect of soil actinomycetes on strains of *Rhizobium japonicum*. Agron. J. (EE.UU.) 58: 223-224.
- DANSO, S.K.A.; HERA, C.; DOUKA, C. 1987. Nitrogen fixation in soybean as influenced by cultivar and *Rhizobium* strain. Plant Soil (HOL.) 99: 163-174.
- DATE, R.A. 1976. Especificidad en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. VIII Reunión Latinoamericana sobre *Rhizobium*. Edit. por P.H. Graham y J. Halliday. Servicios de información. CIAT, Cali Col. sp.
- DAZZO, F.B.; HUBBELL, D.H. 1975. Cross-reactive antigens and Lectins as determinants of symbiotic specificity in the *Rhizobium* clover association. App. Microbiol. (EE.UU.) 30: 1017-1033.
- _____ ; HOLLINGSWORTH, R.; PHILLIP-HOLLINGSWORTH, S.; ROBELES, M.; OLEN, T.; SALZWEDEL, J.; DJORDJEVIC, M.; ROLFE, B. 1988. Recognition process in the *Rhizobium trifolii*-White clover Symbiosis. In: Nitrogen fixation: Hundred years after. Proceedings of the 7th. international congress on N=Nitrogen fixation. Cologne , FRG. March 13-20. p. 431-435.

- _____ ; YANKE, W.E.; BRILL, W.J. 1978. Trifoliin: A *Rhizobium* recognition protein from white clover. *Biochem. Biophys. Acta (HOL.)* 539: 276-286.
- DECENA, G.E.; ALCALA, C.; GONZALEZ, M. 1976. Efecto de la aplicación de fósforo y azufre sobre la producción, composición química y fijación de nitrógeno de *Desmodium Transversum* y *D. tortuosum*. In: Congreso venezolano de la ciencia del suelo. Resúmenes. Jusepin, Venezuela. p.1-23.
- DELVES, A.C.; MATHEWS, A.; DAY, D.A.; CARTER, A.S.; CARROLL, B.J.; GRESSHOFF, P.M. 1986. Regulation of the soybean-Rhizobium nodule symbiosis by shoot and root factors. *Plant Physiol. (EE.UU.)* 82: 588-590.
- DIAZ-ROMEY, R.; HUNTER, A. 1982. Metodología de muestreo, análisis químico de suelos y tejido vegetal y de investigaciones en invernadero. Serie materiales de enseñanza No. 12. CATIE, Turrialba, C.R. 61 p.
- DOWDLE, S.F.; BOHLOOL, B.B. 1987. Intra and inter-specific competition in *Rhizobium fredii* and *Bradyrhizobium japonicum*. *Can. J. Microbiol. (CAN.)* 33: 990-995.
- DOWNTON, W.J.S. 1975. The occurrence of C₄ photosynthesis among plants. *Photosynthetica (Checoslovaquia)* 9 (1): 96-105
- DUGHRI, M.H.; BOTTOMLEY, P.J. 1983. Effect of acidity on the composition of an indigenous soil population of *Rhizobium trifolii* found in nodules of *Trifolium subterraneum* L. *Appl. Environ. Microbiol. (EE.UU.)* 46 (5): 1207-1213.
- _____. 1984. Soil acidity and the composition of an indigenous population of *Rhizobium trifolii* in nodules of different cultivars of *Trifolium subterraneum* L. *Soil Biol. Biochem. (G.B.)* 16 (4): 405-411.
- DUNICAN, L.K.; CANNON, F.C. 1971. The genetic control of symbiotic properties in Rhizobium: evidence for plasmid control. *Plant Soil Special Vol. (HOL.)* p. 73-79.
- _____ ; TIERNEY, A.B. 1974. Genetic transfer of nitrogen fixation from *Rhizobium trifolii* to *Kebsiella aerogenes*. *Biochem. Biophys. Res. Com. (HOL.)* 57: 62-72.
- EAGLEY, G.H. 1986. Stimulation of weed seed germination in soil. *Weed Sci. (EE.UU.)* 2: 69-84.
- ESCUDEY, A.M.Q. de 1972. A survey of rhizobia in farm soils at Wye College, Kent. *J. Appl. Bacteriol. (EE.UU.)* 35: 109-118.
- FAO. 1985. Inoculantes para leguminosas y su uso. FAO, Roma, Italia. 63 p.
- FAWCETT, R.S.; SLIFE, F.W. 1978. Effect of field applications of nitrate on weed seed germination and dormancy. *Weed Sci. (EE.UU.)* 26: 594-596.

- FERNANDEZ, F.; GEPTS, P.; LOPEZ, M. 1985. Etapas de desarrollo en la planta de frijol. In: Frijol: Investigación y producción. Referencia de los cursos de capacitación sobre frijol dictados por el CIAT, Compilado y editado por M. López, T. Fernández, y A.V. Schoonhoven. Cali, Col. p.61-78.
- FOO, E.L.; VARMA, A.K. 1976. Inhibitory effect of streptomyces antibioticus and other microorganisms on *Rhizobium*. Folia Microbiológica. (Italia) 21: 315-319.
- FOX, R.L.; KAMPRATH, E.J. 1970. Phosphate sorption isotherms for evaluating the phosphate requirements of soils. Soil Sci. Soc. Am. Proc. (EE.UU.) 34: 902-907.
- FRANCO, A.A.; MUNNS, D.N.; 1981. Response of *Phaseolus vulgaris* L. to Molybdenum under acid conditions. Soil Sci. Soc. Am. J. (EE.UU.) 45: 1144-1148.
- FUENMAYOR, E.J.F. 1985. Análisis del crecimiento e influencia de los factores microclimáticos en cultivos solos y asociados de *Zea mays* L., *Glycine max* L. y *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Tesis Mag. Sc. CATIE, Turrialba, C.R. 192 p.
- GERMIDA, J.J. 1988. Growth of indigenous *Rhizobium meliloti* in soils amended with organic nutrients. Appl. Environ. Microbiol. (EE.UU.) 54 (1): 257-263.
- GIBSON, A.H. 1967. Carbon dioxide limitations of plant growth in tube culture with special reference to legume nodulation studies. Aust. J. Biol. Sci. (AUST.) 20: 837-842.
- _____. 1971. Factors in the physical and biological environment affecting nodulation and nitrogen fixation by legumes. In: Biological nitrogen fixation in natural and agricultural habitats. Lie, T.A., Mulder, E.G. (eds). Martinus, Nijhoff. The Hague.
- _____. 1976. Limitation to dinitrogen fixation by legumes. In: Proc. 1st. Int. Symp. Nitrogen fixation. W.E. Newton and C.J. Nyman (eds.). Washington State. Univ. Press, Pullman.
- _____. 1977. The influence of the environmental and managerial practices on the legume-*Rhizobium* symbiosis: In: A treatise on dinitrogen fixation, sect.IV (Agronomy and ecology). Hardy, R.W.F, Gibson, A.H.(eds). Wiley Interscience. New York.
- _____; JORDAN, D.C. 1983. Ecophysiology of Nitrogen-fixation systems. In: Physiological plant ecology III. O.L. Lange, P.S. Nobel, C.B. Osmond, H. Ziegler (eds). Springer-Verlag. Berlín. p. 301-390.
- _____; NUTMAN, P.S. 1960. Studies on the physiology of nodule formation. 7. A reapraisal of the effect of preplanting. Ann. Bot. (G.B.) 24: 420-433.

- GOMEZ, A.A.; ZANDSTRA, H.G. 1976. An analysis of the role of legumes in multiple cropping systems. In: Exploiting the legume- *Rhizobium* symbiosis in tropical agriculture. College of Trop. Agric. Misc. Pub. 145. Dept. of Agronomy and Soil Science University of Hawaii, Honolulu. p.81-96.
- GRAHAM, L; MAIER, R.J. 1987. Variability in Molybdenum uptake activity in *Bradyrhizobium japonicum* strains. J. Bacterial. (EE.UU.) 169 (6): 2555-2560.
- GRAHAM, P.H. 1982. Plant factors affecting symbiotic nitrogen fixation in legumes. In: Biological nitrogen fixation technology for tropical agriculture. Papers presented at a Workshop Held at CIAT. March 9-13, 1981. CIAT, Cali, Col. p. 26-29.
- _____ ; ROSAS, J.C. 1979. Phosphorus fertilization and symbiotic nitrogen fixation in common bean. Agron. J. (EE.UU.) 71 (6): 925-926.
- GUY, P.; GIBSS, A.; HARROWER, K. 1980. The effect of white clover mosaic virus on nodulation of white clover (*Trifolium repens* L. cv. Ladino). Aust. J. Agric. Res. (AUST.) 31: 307-311.
- HALLIDAY, J. 1981. Agrotechnologies based on symbiotic systems that fix Nitrogen. The international Workshop on BFN technology. Cali, Col. p. 1-13.
- HAM, G.E., 1980. Inoculation of legumes with *Rhizobium* in competition with naturalized strains. In: Nitrogen fixation. Vol. II: Symbiotic Associations and cyanobacteria. W. E. Newton and W.H. Orme-Johnson (eds.) University Park Press, Baltimore, EE. UU. p. 131-138.
- HAMBLIN, J.; KENT, S.P. 1973. Possible role of phytohaemagglutination in *Phaseolus vulgaris* L. Nature (EE.UU.) 245: 28-30.
- HAMDI, Y. 1985. La fijación del nitrógeno en la explotación de los suelos. Boletín de suelos de la FAO No. 49. Roma, Italia 188 p.
- HAVELKA, U.D.; HARDY, R.W.F., 1976. Legume N₂ fixation as a problem in carbon nutrition. In: W.E. Newton and C.J. Nyman (eds.) Proc. 1st. int. Symp. Nitrogen fixation. Washington State Univ. Press. Pullman. p.112-123.
- _____ ; BOYLE, M.G.; HARDY, R.W.F. 1982. Biological nitrogen fixation. In: Nitrogen in agricultural soils. ASA. Agronomy Series No. 22. Madison, Wis. EE.UU. p. 365-390.
- HELY, F.W.; BERGERSEN, F.J.; BROCKWELL, J. 1957. Microbial antagonism in the rhizosphere as a factor in the failure of inoculation of subterranean clover. Aust. J. of Agric. Res. (AUST.) 8: 24-44.
- HOLDRIDGE, L. 1982. Ecología basada en zonas de vida. IICA, San Jose, Costa Rica. 216 p.

- HOLLAND, A.A.; PARKER, C.A. 1966. Studies on microbial antagonism in the establishment of clover pasture. II. The effect of saprophytic soil fungi upon *Rhizobium trifolii* and growth of subterranean clover. *Plant Soil (HOL)* 25: 329-340.
- HUBELL, D.H.; MORALES, V.M.; UMALI-GARCIA, M. 1978. Pectolytic enzymes in *Rhizobium*. *Appl. Environ. Microbiol. (EE.UU.)* 35: 210-213.
- JOHNSON, H.W.; MEANS, U.M. 1963. Serological groups of *Rhizobium japonicum* recovered from nodules of soybeans (*Glycine max*) in field soils. *Agron. J. (EE.UU.)* 55: 269-271.
- JOHNSTON, A.W.B.; BERINGER, J.E. 1976. Mixed inoculations with effective and ineffective strains of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Appl. Bact. (EE.UU.)* 40: 375-380.
- _____; DAVIS, E.O.; HAMILTON, W.D.; ECONOMOU, A.S.; BURN, J.E.; HAWKINS, J.W.; LACHTFORD, J.W.; HONG, G.F. 1988. Genetic analyses of early stages in the infection of legumes by *Rhizobium*. In: Nitrogen fixation: hundred years after. Proc. 7th. Int. Symp. nitrogen fixation. Bothe, de Bruij, Newton (eds.). Gustav Fischer, Stuttgart-New York. pp. 437-441.
- KEYA, S.O.; ALEXANDER, M. 1975. Regulation of parasitism by host density: the *Bdellovibrio-Rhizobium* interrelationship. *Soil Biol. Biochem. (G.B.)* 7: 231-237.
- KEYSER, H.H.; MUNNS, D.N.; HOHENBERG, J.J. 1979. Acid tolerance of rhizobia in culture and in symbiosis with cowpea. *Soil Sci. Soc. Am. J. (EE.UU.)* 43: 719-722.
- KLUSON, R.A.; KENWORTHY, W.J.; WEBER, D.F. 1986. Soil temperature effects on competitiveness and growth of *Rhizobium japonicum* and on *Rhizobium* - induced chlorosis of soybeans. *Plant Soil (HOL.)* 95: 201-207.
- LABANDERA, C.A.; VINCENT, J.M. 1975. Competition between an introduced strain and native Uruguayan strain of *Rhizobium trifolii*. *Plant Soil (HOL.)* 42: 327-347.
- LACHMANN, K.; BADILLA, CH.R.; SCHELLSTEDG, W.; PINCHINAT, A.M. 1973. Pruebas de rendimiento y consumo directo de la soya en Costa Rica. In: Reunión Anual Programa Cooperativo Centroamericano para el Mejoramiento de Cultivos Alimenticios. San José (CR) 5-8 Mar. 1973. Resúmenes p.72.
- LARA, M.; ORTEGA, J.L.; OLGUIN, B.C.; SANCHEZ, F. 1988. Nodulation expression and nitrogen metabolism in *Phaseolus vulgaris* root nodules. In: Nitrogen fixation: hundred years after. Proc. 7th. Int. Symp. nitrogen fixation. Bothe, de Bruij, Newton (eds.). Gustav Fischer, Stuttgart-New York. pp. 617-622.
- LEUNG, K.; BOTTOMLEY, P.J. 1987. Influence of phosphate on *Rhizobium trifolii*. *Appl. Environ. Microbiol. (EE.UU.)* 53 (9): 2098-2105.

- LIBBENGA, K.R.; HARKES, P.A.A. 1973. Initial proliferation of cortical cells in the formation of root nodules in *Pisum sativum* L. *Planta (Alemania)* 114: 17-28.
- LINCH, J.M. 1982. Interactions between bacteria and plants in the root environment. In: *Bacteria and plants*. Ed. by Muriel E. Rhodes - Robert F.A. Skinner. Academic Press the society for applied bacteriology symposium. Series No.10. p. 1-20.
- LINDEMANN, W.C.; HAM, G.E. 1979. Soybean plant growth, nodulation, and nitrogen fixation as effected by root temperature. *Soil Sci. Soc. AM. J. (EE.UU.)* 43: 1134-1137.
- LOWENDORF, H.S. 1980. Factors affecting survival of *Rhizobium* in soil. In: *Advances in microbial ecology*. Ed. by M. Alexander. Plenum publishing Corp. New York. p.379-385.
- LYND, J.Q.; HANLON, JR.E.A.; ODELL, JR. G.V. 1984. Nodulation and nitrogen fixation by arrowleaf clover: Effects of phosphorus and potassium. *Soil Biol. Biochem. (G.B.)* 16 (6): 589-594.
- MALIK, N.S.A.; CALVERT, H.E.; BAUER, W.D. 1987. Nitrate induced regulation of nodule formation in soybean. *Plant Physiol. (EE.UU.)* 84: 266-271.
- MALLIK, M.A.B.; TESFAI, K. 1987. Stimulation of *Bradyrhizobium japonicum* by allelochemicals from green plants. *Plant Soil (HOL.)* 103 (2): 227-231.
- MARQUES PINTO, C.; YAO, P.Y.; VINCENT, J.M.1974. Nodulating competitiveness amongst strains of *Rhizobium meliloti* and *R. trifolii*. *Aust. J. Agric. Res. (AUST.)* 25: 317-329.
- MARTINEZ, R.V. 1986 *Ciclo biológico del nitrógeno en el suelo*. Ed. Científico-técnica. La Habana, Cuba. 167 p.
- MARTINEZ-MOLINA, E.; MORALES, V.M.; HUBBELL, D.H. 1979. Hydrolytic enzyme production by *Rhizobium*. *Appl. Environ. Microbiol. (EE.UU.)* 38: 1186-1188.
- MEYNELL, G.G.; MEYNELL, G. 1970. *Theory and practice of experimental bacteriology*. 2 ed. Cambridge, University Press. 333 p.
- MINCHIN, F.R.; PATE, J.S. 1973. The carbon balance of a legume and the functional economy of its root nodules. *J. Exp. Bot. (G.B.)* 24: 259-271.
- MISHUSTIN, G.N.; SHIL NIKOVA, V.K. 1971. *Biological fixation of atmospheric nitrogen*. Transl. A. Crozy. MacMillan, London.
- MOAWAD, H.A.; SCHMIDT, E.L. 1987 Occurrence and nature of mixed infections in nodule of field- grown soybean (*Glycine max*). *Biol. Fertil. Soils. (1987)* 5:112-114.
- MORA, N. de. 1983 Fijación simbiótica de nitrógeno por plantas leguminosas: aspectos biológicos. *Suelos ecuatoriales. (Colombia)* 12(2): 18-27.

- MORALES, M.A.S. 1987. Selección y evaluación de cepas de *Rhizobium* biovar *phaseoli* tolerantes al suministro restringido de fósforo. Tesis Mg. Sci. CATIE, Turrialba. Costa Rica. 115 p.
- MUNEVAR, F. 1988. Sistema piloto de producción de inoculantes del Instituto Colombiano Agropecuario. In: Resúmenes XIV Reunión Latinoamericano de Rhizobiología. 21-25 Nov. 88. Pontificia Universidad Católica de Chile. Facultad de Agronomía, Santiago, Chile. p.95.
- MUNNS, D.N. 1977. Soil acidity and related factors. In: Exploiting the legume-*Rhizobium* symbiosis in tropical agriculture. Vincent, J.R., Whitney, A.S., Bose, J. (eds). Coll. Trop. Agric. Univ. Hawaii. Misc. Publ. 145:211-23
- ; FOX, R.L.; KOLH, B.L. 1977. Influence of line on nitrogen fixation by tropical and temperate legumes. Plant Soil (HOL.) 46: 591-601.
- ; HOHENBERG, J.S.; RIGHETTI, T.L.; LAUTER, D.J. 1981. Soil acidity tolerance of symbiotic and N. fertilized soybeans. Agron. J.(EE.UU.) 73: 407-410.
- ; KEYSER, H.H.; FOGLE, V.W.; HOHENBERG, J.S.; RIGHETTI, T.L.; LAUTER, D.L.; ZAROUG, M.G.; CIARKIN, K.L.; WHITACRE, K.W.; 1979. Tolerance of soil acidity in symbiosis of mungbean with rhizobia. Agron. J. (EE.UU.) 71: 256-260.
- NAVARRO, Y. de. Estudio de la eventual interacción *Rhizobium*-lectina de *Vicia faba*. Tesis de Magister. Depto. de Química. Universidad Nacional de Colombia. 116 p.
- NUTMAN, P.S. 1959. Some observations on root hair infection by nodule bacteria. J. Exp. Bot. (G.B.) 10: 250-263.
- _____. 1965. Symbiotic nitrogen fixation. In: Soil nitrogen. W.V. Bartholomen and F.E. Clarke (eds.). ASA. Agronomy Monographs No. 10, Madison, Wis. p. 363-379.
- ; ROSS, G.J.S. 1970. *Rhizobium* in the soils of the Rothamsted and Woburn farms. Rothamsted Report for 1969. part 2, pp. 148-167.
- 1976. IBP field experiments on nitrogen-fixation by nodulated legumes. In: Nitrogen fixation in plants. Ed. by P.S. Nutman. Cambridge, University Press. pp.211-237.
- OLARTE, L.I.R.; MUÑOZ, B.M. de.; BENAVIDES, G.E. de; GARAVITO, F.N.; LUNA, C.Z.; MEJIA, L.C.; ROZA, E. de. 1979. Métodos analíticos de laboratorio de suelos. IGAC. Bogotá, D.E. 664 p.
- OLIVARES, J.; MONTOYA, E. ; PALOMARES, A. 1977. Some effects derived from the presence of extrachromosomal DNA in *Rhizobium meliloti*. In: Recent developments nitrogen fixation. W.E. Newton, J.R. Postgate, C. Rodríguez-Barruecos (eds). Academic Press. London. pp.375-385.

- . 1988. Comunicación personal.
- ORELLANA, R.G.; FAN, F.F. 1978. Nodule infection by bean yellow mosaic virus in *Phaseolus vulgaris*. Appl. Environ. Microbiol. (EE.UU.) 36: 814-818.
- PALOMARES, A.J. 1975. Estudio sobre la producción de poligalacturonasa en la asociación *Rhizobium*-leguminosa. Tesis doctoral. Universidad de Granada, España. 180 p.
- PARK, D. 1967. The importance of antibiotics and inhibiting substances. In: Soil biology. A. Burgess and F. Raw (eds). Academic Press. New York. p. 85-98.
- PARKER, C.A.; GROVE, P.L. 1970. *Bdellovibrio bacteriovirus* parasitizing *Rhizobium* in Western Australia. J. Appl. Bacteriol. 33: 253-255.
- PATEL, J.J. 1974. Antagonism of actinomycetes against rhizobia. Plant Soil. (HOL.) 41: 395-402.
- PATTL, D.S.; SOSNWANSHI, R.B. 1982. Beneficial effects of combinations of P and Zn for green gram (*Phaseolus aereus* L.). Plant Soil (HOL.) 65 (1): 125-128.
- PEECH, M. 1965. Hydrogen-Ion activity. In: Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties. C.A. Black (eds) ASA. Agronomy 9. Madison, Wis. U.S.A. pp.914-926.
- PETERS, N.K.; FROST, J.W.; LONG, S.R. 1986. A plant flavone luteolin induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. Science (EE.UU.) 233: 977-979.
- PETERS, R.J.; ALEXANDER, M. 1966. Effect of legume exudates on the root nodule bacteria. Soil Sci. (EE.UU.) 102: 380-387.
- PEÑA-CABRIALES, J.J.; ALEXANDER, M. 1983. Growth of *Rhizobium* in soils amended with organic matter. Soil Sci. Soc. Am. J. (EE.UU.) 47: 241-245.
- PIHA, M.I.; MUNNS, D.N. 1987. Sensitivity of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) symbiosis to high soil temperature. Plant Soil (HOL.) 98 (2): 183-194.
- PLANQUE, N.; KIJNE, J.W. 1977. Binding of pea lectins to a glycan type polysaccharide in the cell walls of *Rhizobium leguminosarum*. FES letters. (G.B.) 73: 64-66.
- PUGASHETTI, B.K.; ANGLE, J.S.; WAGNER, G.H. 1982. Soil microorganism antagonistic towards *Rhizobium japonicum*. Soil Biol. Biochem. (G.B.) 14: 45-49.
- QUINTERO, C.F.F. 1974. Efecto de la forma y capacidad del recipiente y sistema de riego sobre el crecimiento y productividad del frijol (*Phaseolus vulgaris*). Tesis Mag. Sc. IICA, Turrialba, C.R. 105 p.

- RAGHAVENDRA, A.S.; DAS, V.S.R. 1978. The occurrence of C₄-photosynthesis: A supplementary list of C₄ plants reported during late 1974-mid 1977. *Photosynthetica*. (Czechoslovakia) 12 (2): 200-208.
- RAMIREZ, C.M. 1979. *Rhizobium* population in spermosphere and rhizosphere as it effects on nodulation of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Thesis by Ph.D. Cornell, University.
- _____. 1983. La posible contribución de la fijación biológica del nitrógeno de los cultivos. In: El reciclaje de materias orgánicas en la agricultura de América Latina. Boletín de suelos de la FAO. No. 51. Roma, Italia. pp. 56-59.
- _____; ALEXANDER, M. 1980. Evidence suggesting protozoan predation on *Rhizobium* associated with germination seeds and in rhizosphere of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) *Appl. Environ. Microbiol.* (EE.UU.) 40: 492-499.
- RAMOS, M.L.G.; MAGALHAES, N.F.M.; BODEY, R.M. 1987. Native and inoculated rhizobia isolated from field grown *Phaseolus vulgaris*: Effects of liming and acid soil on antibiotic resistance. *Soil. Biol. Biochem.* (G.B.) 19 (2): 179-185.
- REDMOND, J.W.; BATTLE, M.; DJORDEVIC, A.; INNES, R.W.; KUEMPEL, P.L.; ROLFE, B.G. 1986. Flavones induce expression of nodulation genes in *Rhizobium*. *Nature* (EE.UU.) 323: 632-634.
- REYES, V.G.; SCHMIDT, E.L. 1979. Populations densities of *Rhizobium japonicum* strains 123 estimated directly in soli and rhizospheres. *Appl. Environ. Microbiol.* (EE.UU.) 37: 854.
- RICE, E.L. 1964. Inhibition of nitrogen-fixation and nitrifying bacteria by seed plants. *Ecology* (EE.UU.) 45: 824-837.
- _____. 1968. Inhibition of nodulation of inoculated legumes by pioneer plant species from abandoned fields. *Bull. Torrey Bot. Club* (EE.UU.) 95: 346-358.
- ROBERT, F.M.; SCHMIDT, E.L. 1983. Population changes and persistence of *Rhizobium phaseoli* in soil and rhizospheres. *Appl. Environ. Microbiol.* (EE.UU.) 45(2): 550-556.
- 1985. A comparasion of lectin-binding activity in two strains of *Rhizobium japonicum*. *FEMS Microbiology Letters* (G.B.) 27: 281-285.
- 1985. Response of three indigenuos serogroups of *Rhizobium japonicum* to the rhizosphere of pre-emergent seedlings of soybean. *Soil Biol. Biochem.* (G.B.) 17 (4): 579-580.
- 1985. Somatic serogroups among 55 strains of *Rhizobium phaseoli*. *Can. J. Microbiol.* (CAN.) 31: 519-523.

- ROBINSON, A.C. 1967. The influence of host on soil and rhizosphere populations of clover and lucerne root-nodule bacteria in the field. *J. Aust. Inst. Agric. Sci. (AUST.)* 33: 207-209.
- ROUGHLEY, R.J.; BLOWES, W.A.; HERRIDGE, D.F. 1976. Nodulation of *Trifolium subterraneum* by introduced rhizobia in competition with naturalized strains. *Soil Biol. Biochem. (G.B.)* 8: 403-407.
- ROVIRA, A.D. 1961. *Rhizobium* numbers in the rhizospheres of red clover and *Paspalum* in relation to soil treatment and numbers of bacteria and fungi. *Aust. J. Agric. Res. (AUST.)* 12:77-83.
- SAIZ DEL RIO, J.F.; BORNEMISZA, E.S. 1961. Análisis químico de suelos; métodos de laboratorio para diagnosis de fertilidad. Turrialba, C.R. IICA, 107 p.
- SANCHEZ, A.J.; ARIAS, L.; COMERMA, J.A. 1982. Delimitación y definición de unidades agroecológicas. FONAIAP CENIAP. Publicación técnica. Serie No. 1-02. Caracas, Venezuela.
- SCHDMIDT, E.L.; ROBERT, F.M. 1985. Recent advances in the ecology of *Rhizobium*. In: Nitrogen fixation research progress. Evans, Bootomley, Newton (eds). The Neederlands. pp. 379-385.
- SCOTT, J.M.; PORTER, F.E. 1986. An analysis of the accuracy of a plant infection technique for counting rhizobia. *Soil Biol. Biochem (G.B.)* 18 (4): 355-362.
- SCOTTI, M.R.M.M.L.; SA, N.M.H.; VARGAS, M.A.T.; DOBEREINER, J. 1982. Streptomycin resistance of *Rhizobium* isolates from Brazilian cerrados. *Anales de Academia Brasileira de Ciencias. (BRA.)*54: 733-738.
- SHARPE, R.R.; BOSWELL, F.C.; HARGROVE, W.L. 1986. Phosphorus fertilization and tillage effect on dinitrogen fixation in soybeans. *Plant Soil (HOL.)* 96 (1): 31-44.
- SHOEMAKER, H.E.; McLEAN, E.D.; PRATT, P.F. 1961. Buffer methods for determining lime requeriments of soils with appreciable amonts of extractable aluminium. *Soil Sci. Am. Proc. (EE.UU.)* 25: 274-277.
- SINGLETON, P.W. ; STOCKINGER, K.R. 1983. Compensation against ineffective nodulation in soybean. *Crop. Sci. (EE.UU.)* 23: 69-72.
- _____ ; TAVARES, J.W. 1986 Inoculation response of legumes in relation to the number and effectiveness of indigenous *Rhizobium* populations. *Appl. Environ. Microbiol. (EE.UU.)* 51 (5): 1013-1018.
- SMITH, J.H.; GIBSON, P.B. 1960. The influence of temperature on growth and nodulation of white clover infected with bean yellow mosaic virus. *Agron. J. (EE.UU.)* 52: 5-7.
- SOIL CONSERVATION SERVICE. 1987. Characterization data for profiles in Guatemala, El Salvador, Honduras, Nicaragua, Costa Rica and Panamá. s.p.

- SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H.J. 1985. Methods in legume-Rhizobium technology. NIFTAL Project and MIRCEN, Univ. of Hawaii. Paia, Maui, HI. 367 p.
- SOUZA, E.A. 1978. Efectos de dose e modos de aplicacao do superfosfato simple na cultura de soja (*Glycine max*) cv. Santa Rosa. In: Seminario Nacional de Pesquisa de Soja. (1,1978, Brasil) Anais Londuina EMBRAPA. V. I p. 211-218.
- SPRENT, J.I. 1971. The effects of water stress on nitrogen-fixing root nodules. I. Effects on the physiology of detached soybean nodules. New Phytol. (G.B.) 70: 9-17.
- STOWERS, M.D.; ELKAN, G.H. 1980. Criteria for selecting infective and efficient strains of Rhizobium for use in tropical agricultural. North Carolina State University. Tech. Bull. No. 26. 73 p.
- SUTTON, W.D. 1974. Some effects of the DNA of Rhizobium bacteroids and bacteria. Biochem. Biophys. Acta, 366: 1-10.
- TERPTRA, R. 1986. Behaviour of weed seed in soil clods. Weed Sci. (EE.UU.) 34: 889-895.
- THORNTON, G.D.; ALENCAR, J. de.; SMITH, F.B. 1949. Some effects of streptomyces albus and penicillium spp. on *Rhizobium meliloti*. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 14:188-191.
- TORO, N.; OLIVARES, J. 1985. Plasmidos de Rhizobium y características simbióticas. Anales de Edafologia y Agrobiologia (ESP) 44(3-4): 549-562.
- TRINICK, M.J.; PARKER, C.A. 1982. Self inhibition of rhizobial strains and the influence of cultural conditions on microbial interactions. Soil Biol. Biochem. (G.B.) 14: 79-86.
- ; PALMER, M.J. 1983. Interactions of the microflora from nodulation problem and non-problem soils towards *Rhizobium* sp. on agar plates. Soil. Biol. Biochem. 15: 295-301.
- TU, J.C.; FORD, R.E.; QUINIONES, S.S. 1970. Effects of soybean mosaic virus and/or bean pod mottle virus infection on soybean nodulation. Phytopathology (EE.UU.) 60:518-523.
- TUZIMURA, K.; WATANABE, I. 1962. The growth of Rhizobium in the rhizosphere of the host plant. Ecological studies of root nodule bacteria. (part 2). Soil Sci. Plant. Nutr. (Japón) 8(2): 19-24.
- VERMA, D.P.S.; DELAUNEY, A.; KUHSE, J.; HIREL, B. SCHAFFER, R.; RAJU, K. 1988. Metabolites and protein factors controlling nodulin gene expression. In: Nitrogen fixation: hundred years after. Proc. 7th. Int. Symp. nitrogen fixation. Bothe, de Bruij, Newton (eds.). Gustav Fischer, Stuttgart-New York. pp. 599-604.

- VITTEI, S.C.; SCHMIDT, E.L. 1987. Ecology of indigenous rhizobia: response of *Bradyrhizobium japonicum* to readily available substrates. Appl. Environ. Microbiol. (EE.UU.) 53 (8): 1872-1875.
- WEAVER, R.W.; FREDERICK, J.R. 1972. A new technique for most-probable-number counts of Rhizobia. Plant Soil (HOL.) 36: 219-222.
- WEAVER, R.W.; FREDERICK, J.R. 1974. Effect of inoculum rate on competitive nodulation of *Glycine max.* L. Merrill. I. Greenhouse studies. Agron. J. (EE.UU.). 66 (): 229-232.
- WEBER, C.R. 1966. Nodulation and non-nodulation soybean isolines: II. Response to applied nitrogen and modified soil conditions. Agron. J. (EE.UU.) 58: 46-49.
- WEBER, D.F.; CALDWELL, B.E.; SLOGER, C; WEAT, H.G. 1971. Some USDA studies on the soybean-Rhizobium symbiosis. Plant Soil Special Vol. (HOL.), pp. 293-304.
- WESTERMANN, D.T.; KOLAR, J.J. 1978. Fixation by bean. Crop Sci. (EE.UU.) 18: 986-990.
- WIJFFELMAN, C.A.; DSPAINK, H.P.; OKKER, R.J.H.; PEES, E.; ZAAT, S.A.J.; van BRUSSEL, A.A.N.; LUGTENBERG, B.J.J. 1988. Regulation of nod gene expression and nodulation. In: Nitrogen fixation: hundred years after. Proc. 7th. Int. Symp. nitrogen fixation. Bothe, de Bruij, Newton (eds.). Gustav Fischer, Stuttgart-New York. pp. 417-422.
- WOLPERT, J.S.; ALBERSHEIM, P. 1976. Host-symbiont interactions. I. The lectins of legumes interact with the O-antigen- containing lipopolysaccharides of their symbiont Rhizobia. Biochem. Biophys. Res. Commun. (HOL.) 70:729-737.
- WOOD, M.; COOPER, J.E. 1988. Acidity, aluminum and multiplication of *Rhizobium trifolii*: Possible mechanisms of aluminum toxicity. Soil Biol. Biochem. (G.B.) 20 (1): 95-99.
- WOOMER, P.L. ; SINGLETON, P.W.; BOHLOOL, B.B. 1988. Reliability of the most-probable-number technique for enumerating rhizobia in tropical soils. Appl. Environ. Microbiol. (EE.UU.) 54 (6): 1494-1497.
- WORRALL, V. ; ROUGHLEY, R.J. 1976. The effect of moisture stress on infection of *Trifolium subterraneum* L. by *Rhizobium trifolii*. J. Exp. Bot. (G.B.) 27: 1233-1241.
- ZAROUG, M.G. MUNNS, D.N. 1979. Nodulation and growth of *Lablab purpureus* (*Dolichos lablab*) in relation to rhizobia strain liming and phosphorus. Plant Soil. (HOL.) 53 (3): 329-339.

APENDICE

Cuadro 1.A Solución nutritiva libre de nitrógeno utilizada en el recuento del número más probable de los rizobios nativos

Solución	Elemento	M	Forma	MW	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	KH_2PO_4	136.09	136.1	1.0
3	Fe	10	$\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	355.03	6.7	0.02
	Mg	250	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246.5	123.3	0.5
	K	250	K_2SO_4	174.06	87.0	0.5
	Mn	1	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	169.02	0.338	0.002
4	B	2	H_3BO_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

Cuadro 2.A. Número de rizobios estimados por el recuento de infección de plantas (WMP) tomado de Vincent, J. 1970.
(Datos para series de cuatro diluciones)

n=4	n=2	s=10			
40	20				
39		2.0×10^5			
38	19	2.0×10^5			
37		1.2			
36	18	8.1×10^4			
35		5.5			
34	17	3.8			
33		2.6	s=8		
32	16	1.8	1.3×10^4		
31		1.3			
30	15	9.1×10^3	1.3×10^4		
29		6.3	7.9×10^3		
28	14	4.5	5.1		
27		3.5	3.5		
26	13	2.2	2.4		
25		1.6	1.7	s=6	
24	12	1.1	1.1	7.9×10^2	
23		8.0×10^2	8.0×10^2		
22	11	5.6	5.6	7.9×10^2	
21		4.0	4.0	5.0	
20	10	2.8	2.8	3.2	
19		2.0	2.0	2.2	
18	9	1.4	1.4	1.5	
17		1.0	1.0	1.0	s=4
16	8	7.1×10^1	7.1×10^1	7.2×10^1	5.0×10^1
15		5.0	5.0	5.1	
14	7	3.5	3.5	3.5	5.0×10^1
13		2.5	2.5	2.5	3.2
12	6	1.8	1.8	1.8	2.0
11		1.3	1.3	1.3	1.4
10	5	8.9×10^0	8.9×10^0	8.9×10^0	9.6×10^0
9		6.3	6.3	6.3	6.6
8	4	4.5	4.5	4.5	4.6
7		3.2	3.2	3.2	3.2
6	3	2.2	2.2	2.2	2.2
5		1.6	1.6	1.6	1.6
4	2	1.1	1.1	1.1	1.1
3		7.2×10^{-1}	7.2×10^{-1}	7.2×10^{-1}	7.2×10^{-1}
2	1	<4.4	<4.4	<4.4	<4.4
1					
0	0	4.4×10^{-1}	4.4×10^{-1}	4.4×10^{-1}	4.4×10^{-1}
Approx range		5×10^5	3×10^4	2×10^3	1×10^2
Factor, 95%					
fiducial limits	n=2	4.0			
(x, ÷)	n=4	2.7			

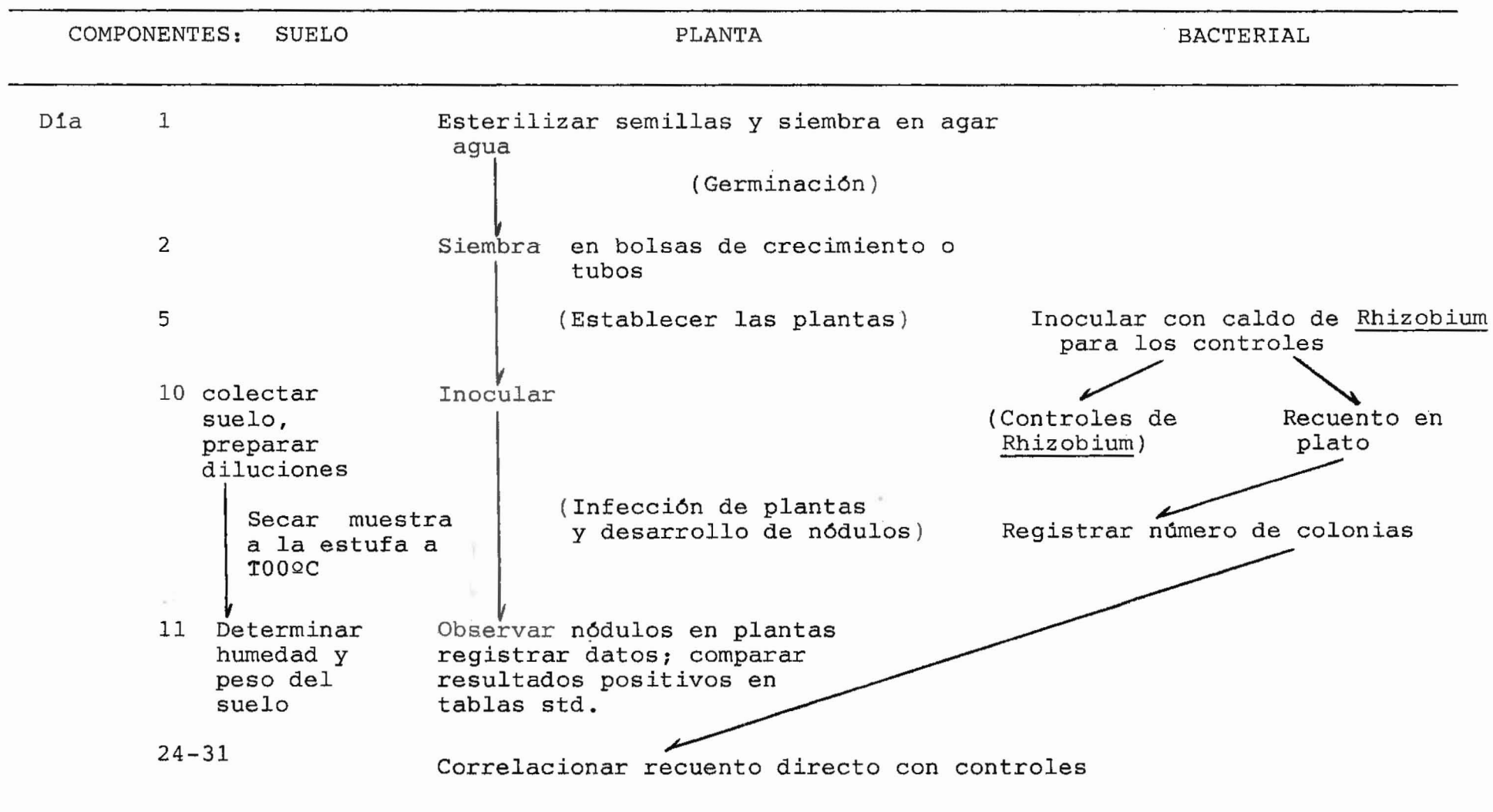
Cuadro 3.A. Descripción del perfil representativo de la serie "Instituto", sitio 3, Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica.

Ap—	0 a 18 cm; café oscuro (7,5 YR 3/2) en húmedo, franco arcillo limoso, estructura granular moderada a fina; duro en seco, firme en húmedo, ligeramente adherente y ligeramente plástico en mojado, poros, vesiculares y tubulares muy finos, muchas raíces finas y muy finas, pocos fragmentos de diorita intemperizada, límite abrupto.
Bw1	18 a 33 cm; café rojizo oscuro (5 YR 3/4) en húmedo; franco arcillo limoso, estructura débil en bloques subangulares finos; dura en seco, firme en húmedo, ligeramente pegajosa y ligeramente plástica en mojado; poros comunes vesiculares y tubulares muy finos, raíces comunes finas y muy finas, pocos guijarros de diorita intemperizada, límite gradual.
Bw2	33 a 58 cm; café rojizo (5 YR 4/4) en húmedo; franco arcillo limoso; estructura débil en bloques subangulares finos; dura en seco, firme en húmedo; ligeramente adherente y ligeramente plástica en mojado; poros comunes tubulares muy finos y pocos poros vasculares muy finos; pocos guijarros de diorita intemperizada y una lengüeta de diorita extendiéndose hacia el horizonte Bw3; límite gradual.
Bw3	58 a 79; café oscuro (7,5 YR 4/4) en húmedo; franco arcillo limoso; estructura débil en bloques subangulares finos y medios; muy pocos carbones negros prominentes sobre las caras de los pedos; duro en seco, firme en húmedo, ligeramente plástico y ligeramente adherente en mojado; pocos poros vesiculares y tubulares muy finos; pocas raíces muy finas; pocos guijarros de diorita intemperizada; límite gradual.
Bw4	79 a 105; café (7,5 YR 4/4) en húmedo; franco arcilloso limoso; pocos moteados finos de rojo distintivo (2.5 YR 4/8 en húmedo); rojo amarillento (5 YR 5/6 en húmedo) y gris rosado (7.5 YR 6/2) en húmedo; estructura débil en bloques subangulares medios y finos, comunes carbones negros prominentes sobre la cara de los pedos; duro en seco, firme en húmedo ligeramente pegajoso y ligeramente plástico en mojado; pocos poros tubulares muy finos; pocas raíces muy finas guijarros de diorita intemperizada.

Cuadro 4.A. Descripción del perfil representativo de la serie "Instituto", fase pedregosa, sitio 3, Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica.

A ₁₁ 0 - 15 cm	Café oscuro (7,5 YR 3/2) en húmedo y de café a café oscuro (7,5 YR 4/4) en seco; franco arcillo limoso; estructura granular, fina y media, moderada; adherente, plástico, friable, en húmedo, ligeramente duro en seco; muchos poros intersticiales y tubulares, muy finos; muy pocas gravas, finas, angulares, de bordes redondeados (5 a 10 cm); pocas raíces finas, límite neto, plano.
A ₁₂ 15-30 cm	Café a café oscuro (7,5 YR 4/4) en húmedo y café (7,5 YR 5/4) en seco; franco arcilloso a arcilloso; estructura de bloques subangulares, fina y media, moderada, adherente, plástico, friable en húmedo, ligeramente duro en seco; muchos poros tubulares, finos y muy finos; pocas raíces, finas; límite neto, plano.
AC 30 - 48 cm	Café (7,5 YR 5/4) en húmedo y café fuerte (7,5 YR 5/6) en seco; franco arcillo arenoso; estructura de bloques subangulares, mediana, débil; ligeramente adherente, ligeramente plástico, muy plástico, muy friable en húmedo, blando en seco; muchos poros tubulares finos y medianos; muy pocas raíces, finas; límite neto, plano.
C ₁ 48 - 78 cm	Café a café oscuro (7,5 YR 4/4) en húmedo y amarillento (1 OYR 7/6) en seco; franco arcillo-arenoso; sin estructura definida; ligeramente adherente, ligeramente plástico, muy friable en húmedo, blando en seco; muchos poros tubulares medianos; presencia de nódulos redondeados, finos y medianos, posiblemente de óxidos de hierro; límite gradual, irregular.
C ₂ 78 - 100 cm	Café amarillento claro (1 OYR 6/4) en húmedo y café muy pálido (1 OYR 7/4) en seco; franco arcillo arenoso; sin estructura definida; ligeramente adherente, ligeramente plástico, muy friable en húmedo, blando en seco; muchos poros tubulares, medianos; pocas gravas finas, de bordes redondeados (0,5 a 3 cm), presencia de nódulos redondeados, posiblemente de óxidos de hierro; límite gradual, plano.
C ₃ 100 - 130 cm	Café amarillento claro (1 OYR 6/4) en húmedo y amarillento (1 OYR 7/6) en seco; franco arenoso; sin estructura definida; ligeramente adherente, ligeramente plástico, muy friable en húmedo, blando en seco; muchos poros tubulares, medianos; abundantes gravas finas, de bordes redondeados (0,5 a 3 cm); presencia de nódulos redondeados, posiblemente de óxidos de hierro.

Figura 1.A Procedimiento utilizado para determinar el número más probable (NMP) de rizobios mediante el recuento en planta.



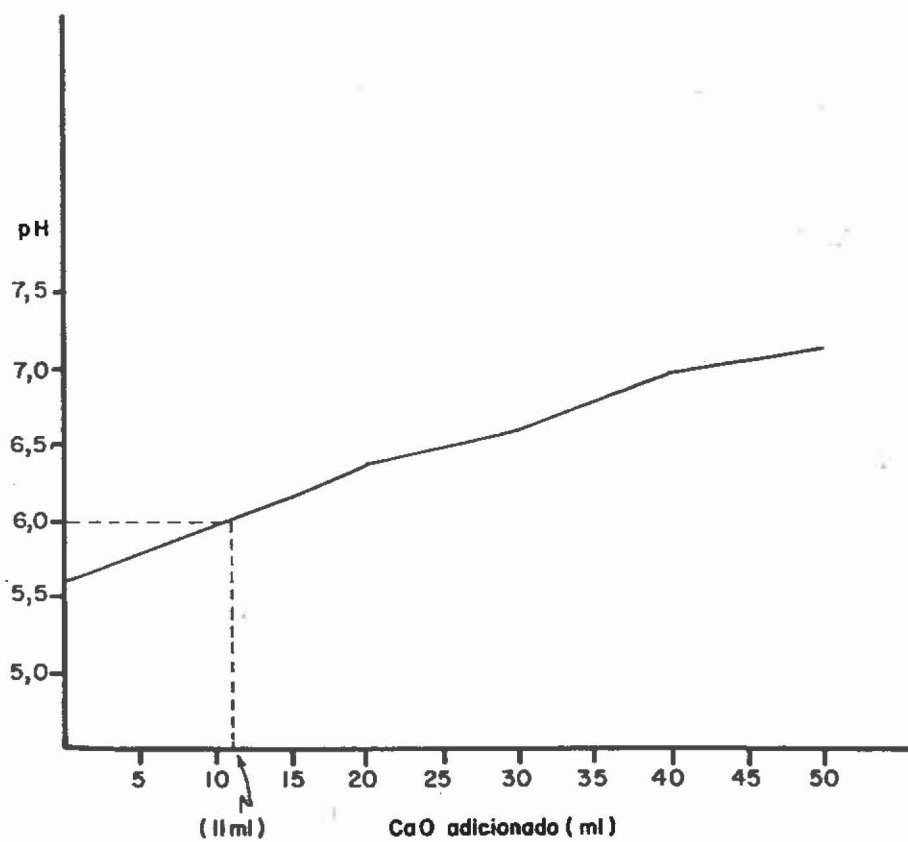


Figura 3.A. Curva de necesidad de cal, suelo Húmitropept típico, Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica.

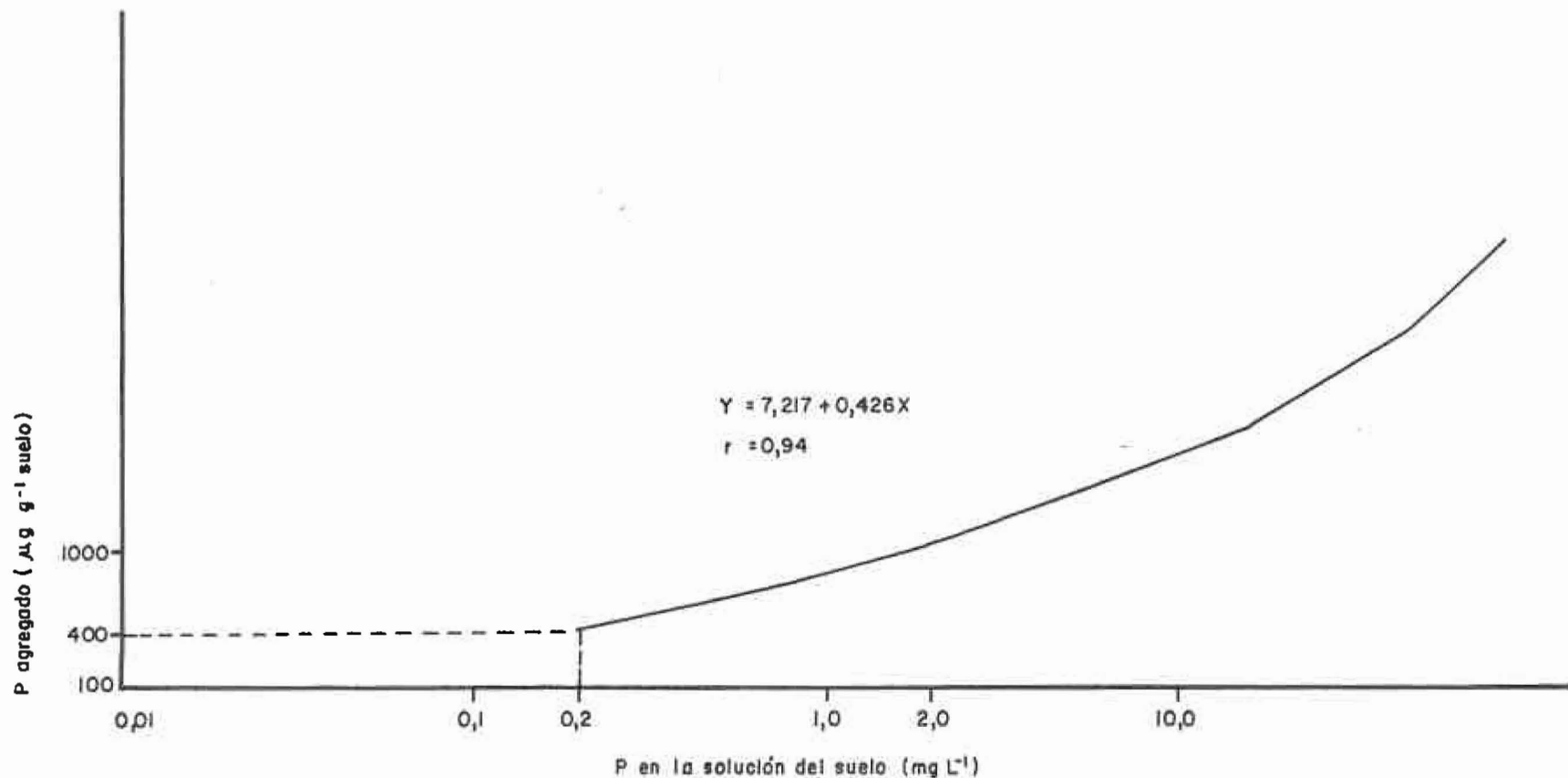


Figura 4.A. Isotherma de sorción de fósforo suelo del sitio 1 (lote N^o6), Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica.

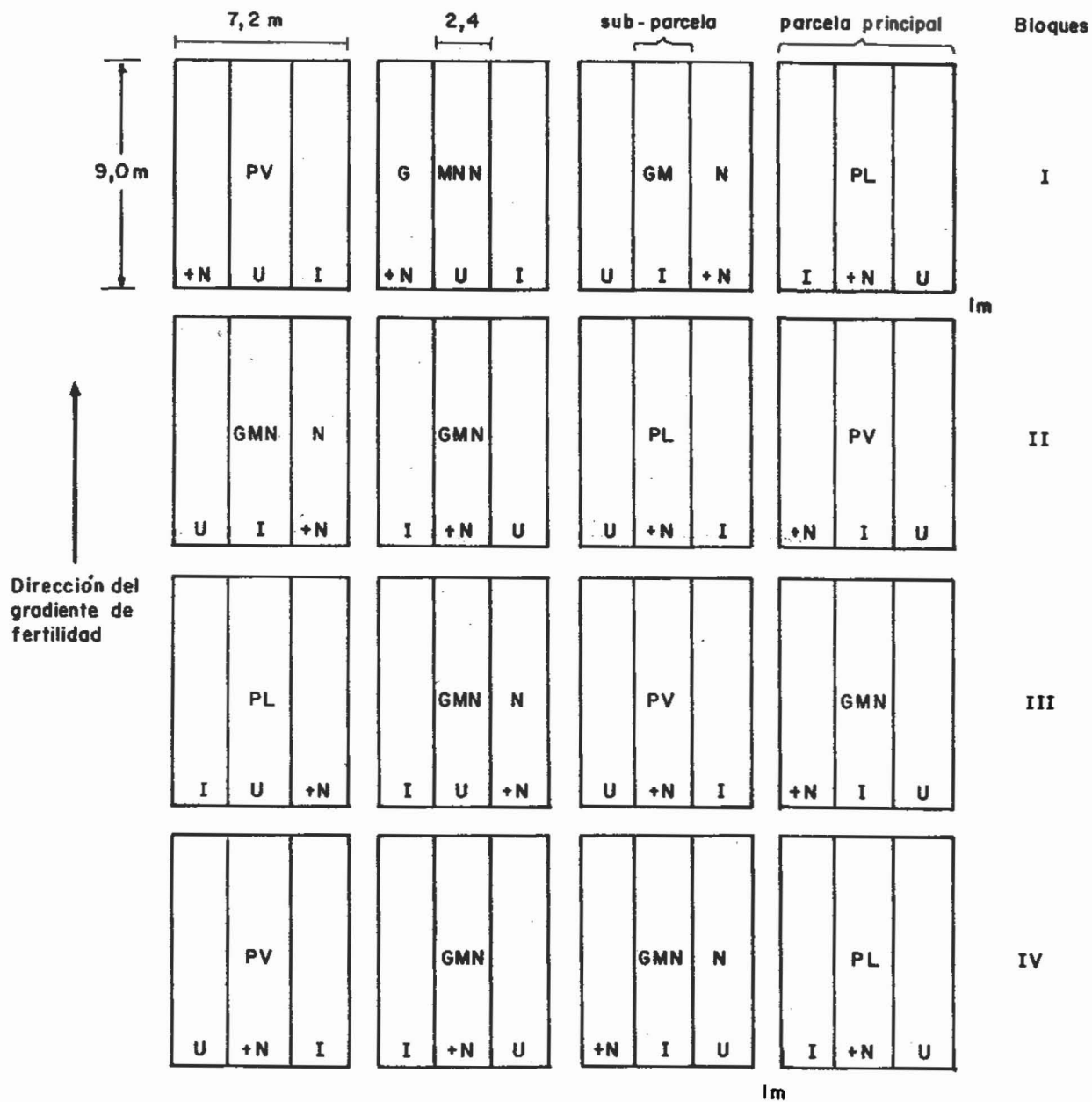
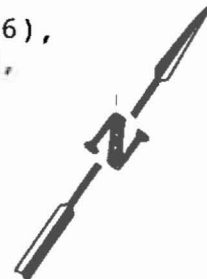


Figura 5.A. Diagrama de campo experimento 1 (lote N°6), Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica.



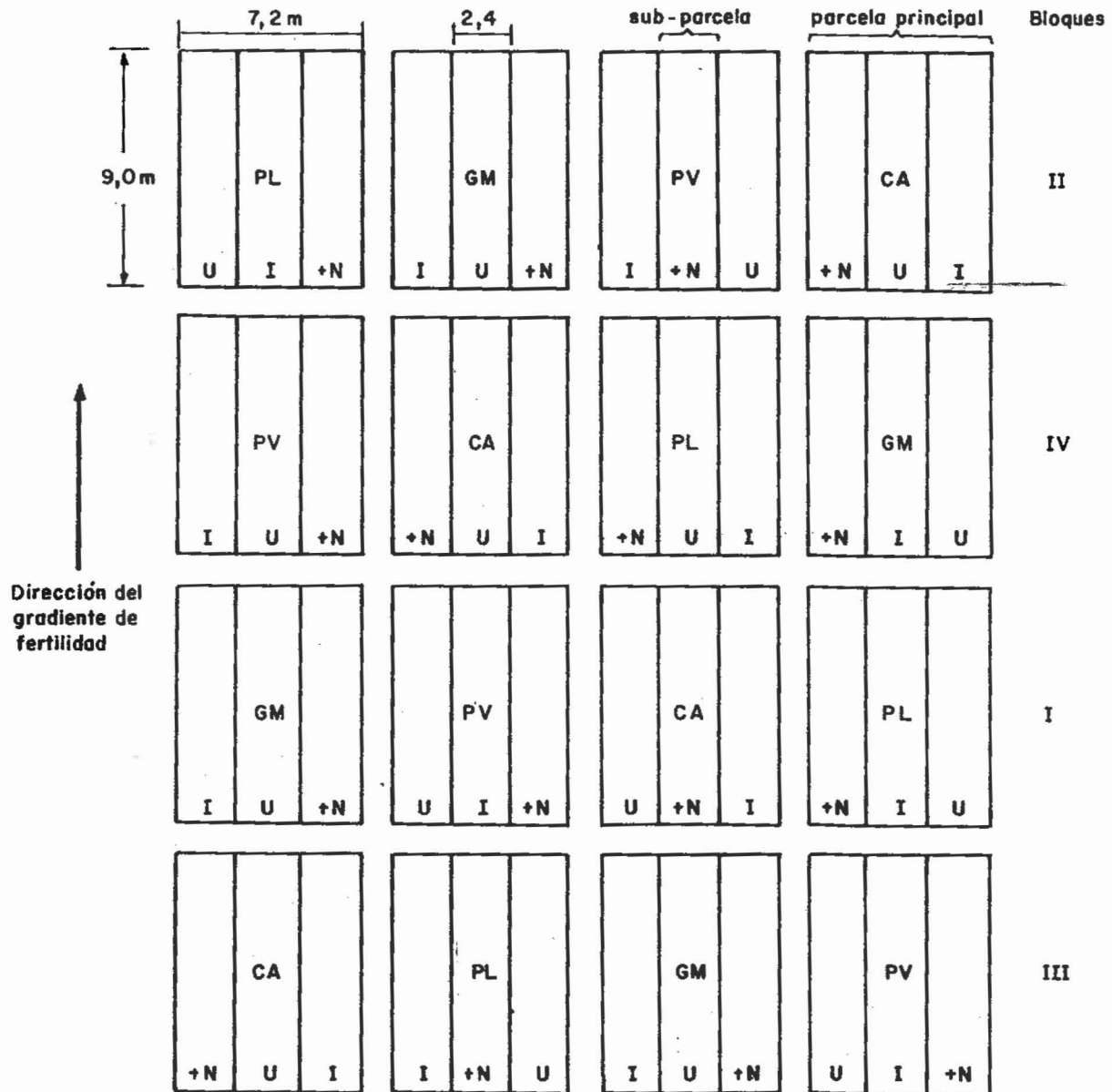


Figura 6.A. Diagrama de campo experimento 2 (lote N^o7),
 Estación Experimental "La Montaña", CATIE,
 Turrialba, Costa Rica.



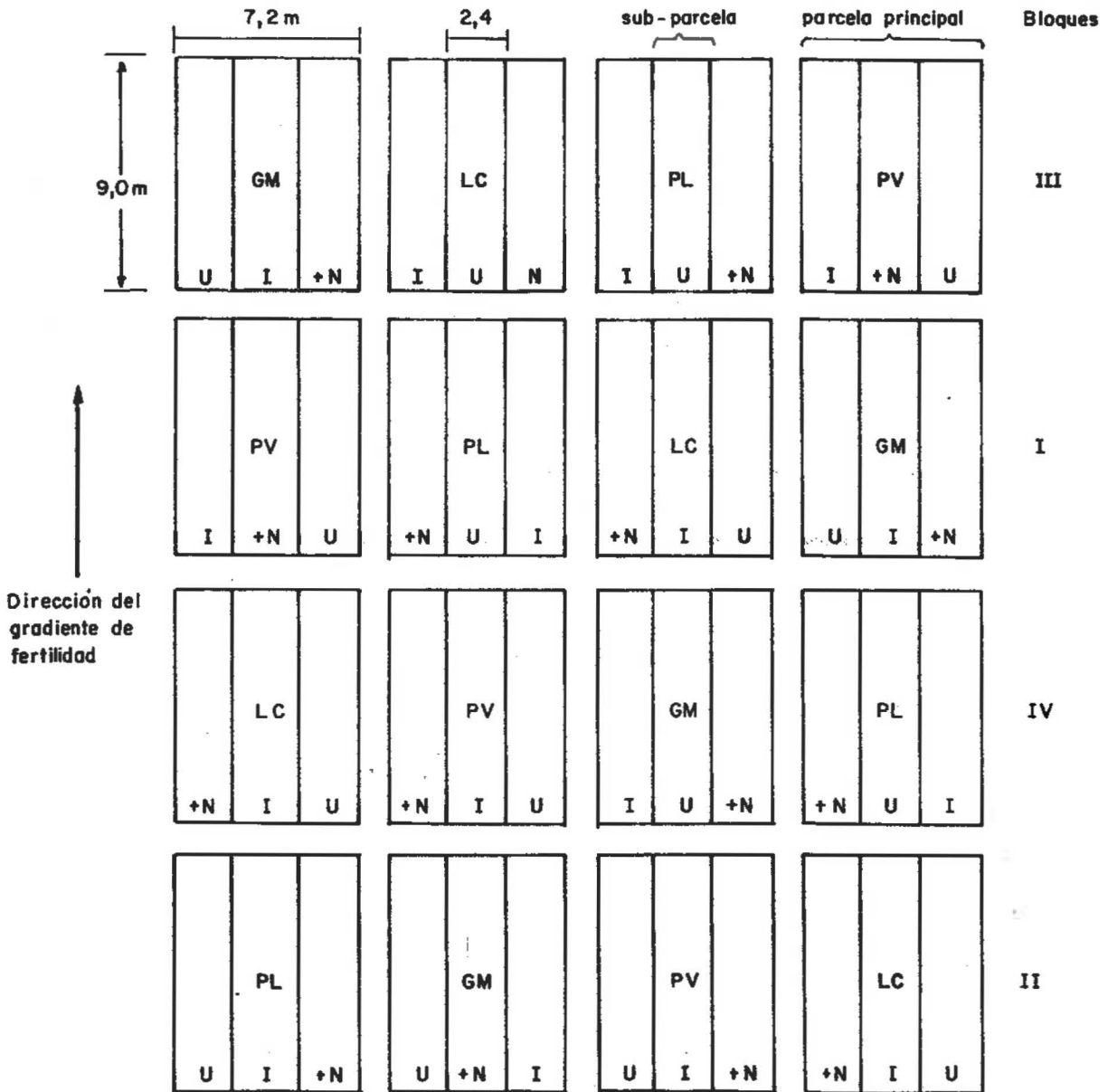


Figura 7.A. Diagrama de campo experimento 3 (lote N°1), Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica.



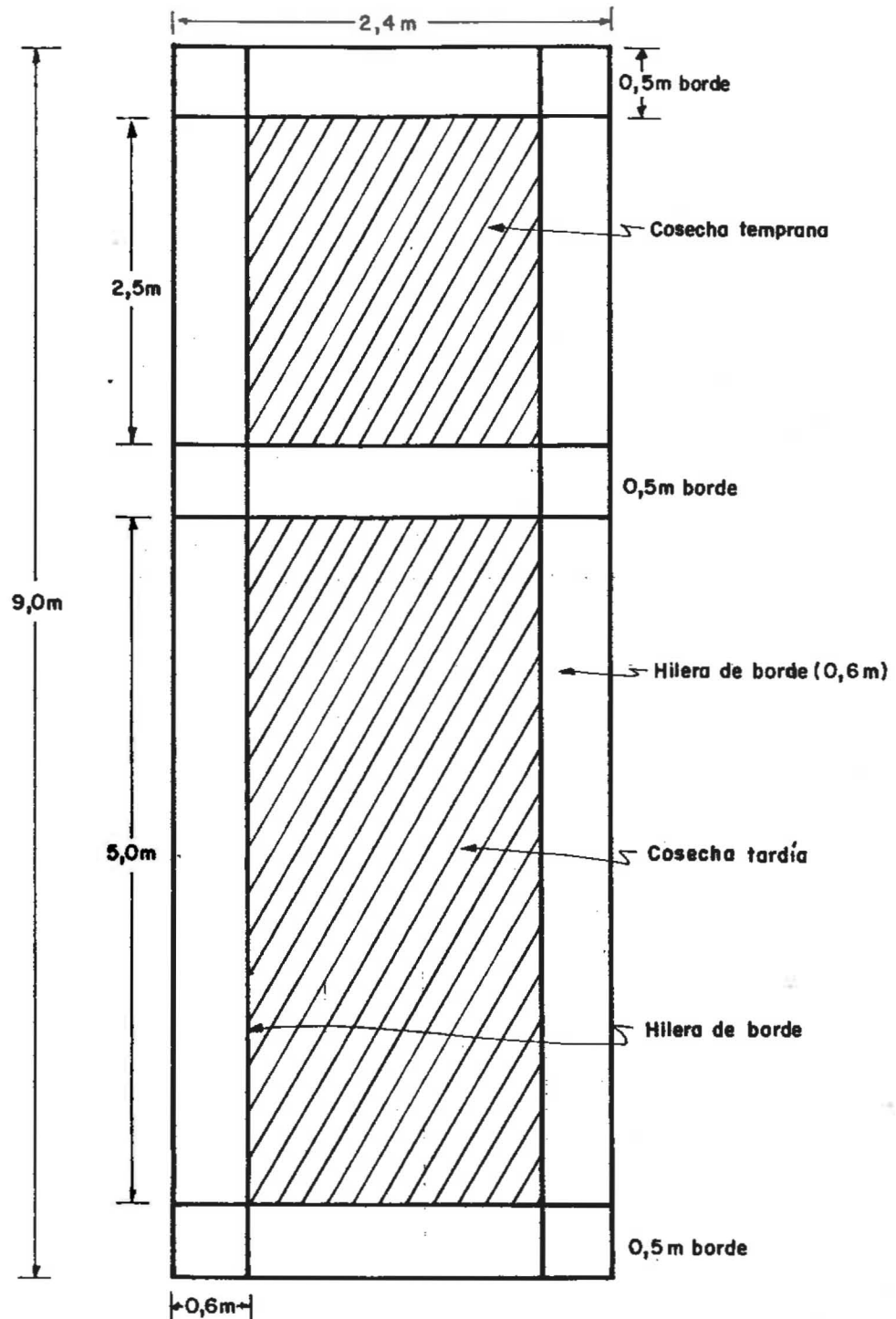


Figura 8.A. Diagrama muestreo de las subparcelas ensayos de campo de respuesta a la inoculación de leguminosas, sitios 1, 2 y 3. Estación Experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica.