

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA

SUBDIRECCIÓN GENERAL ADJUNTA DE ENSEÑANZA

PROGRAMA DE POSGRADO

LA INTERACCIÓN ENTRE CULTIVARES/ZONAS ECOLÓGICAS Y CEPAS DE
BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM Y SUS EFECTOS SOBRE LA PRODUCCIÓN
DEL CULTIVO DE LA SOYA (GLYCINE MAX MERR.) EN COSTA RICA.

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

MAGISTER SCIENTIAE

Por

VENANCIO ESTEBAN IZAGUIRRE SILVA

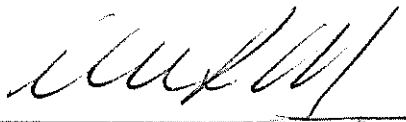
Turrialba, Costa Rica

1990

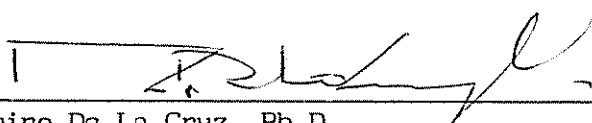
Esta tesis ha sido aceptada, en su presente forma, por la Coordinación del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales Renovables del CATIE, y aprobada por el Comité Asesor del estudiante como requisito parcial para optar el grado de:

MAGISTER SCIENTIAE

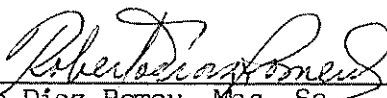
COMITE ASESOR:



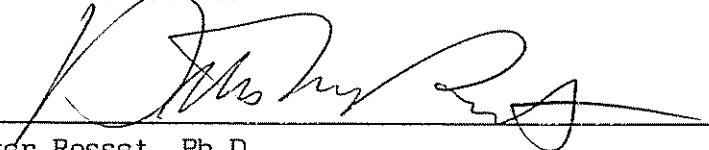
Carlos Ramírez M., Ph.D.
Profesor Consejero



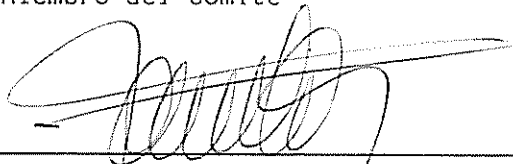
Ramiro De La Cruz, Ph.D.
Miembro del Comité



Roberto Díaz-Romeu, Mag. Sc.
Miembro del Comité



Peter Rosset, Ph.D.
Miembro del Comité



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



Dr. José Luis Parisí
Subdirector General Adjunto de Enseñanza



Venancio E. Izaguirre Silva
Candidato

DEDICATORIA

A mis padres Agustín y Faustina (Q.E.P.D.) a quienes le debo la vida.

A mi esposa Juana Guido con quien he compartido más de la mitad de mi vida, tanto momentos difíciles como alegres.

A mis hijos Ana Luisa, Nelson Enrique, Diana Carolina, Gabriela Karina y Lenin Gerardo por quienes daré la vida.

A los héroes anónimos de Nicaragua que ofrendaron sus vidas y que no dijeron que morían, sino que murieron.

RECONOCIMIENTO

A Dn. Carlos Ramírez M. Ph. D. por su amistad brindada y su orientación y asesoría en este trabajo.

A los miembros del comité de tesis Ph. D. Peter Rosset, Ph. D. Ramiro de la Cruz y al Ing. Roberto Díaz-Romeu Mag. Sc. por su guía y consejos oportunos.

A los obreros de la finca experimental "La Montaña", CATIE y de "Los Diamantes", Guápiles; con quienes auné esfuerzos para cumplir con los objetivos de este trabajo.

A los obreros y campesinos de mi país "solo los obreros y los campesinos llegarán hasta el final, solo su fuerza organizada logrará el triunfo".

A Holanda fuente de beca para mis estudios que sin sus recursos no hubiera culminado esta meta.

BIOGRAFIA

El autor nació en Chinandega, Nicaragua.

Obtuvo el título de Ingeniero Agrónomo, con orientación en fitotécnica en La Escuela de Agricultura y Ganadería "ENAG" hoy Instituto Superior de Ciencias Agropecuarias "ISCA" en 1980.

Se desempeñó como director del Centro Nacional de Capacitación "Santiago Baldovinos" en 1980-1981.

Fué técnico de la dirección de Horticultura del Programa Alimentario Nacional "PAN" en 1982-1983.

Se desempeñó como director de La Empresa Agropecuaria "Comandante Marcos Somarriba" de la Zona Especial III en 1983-1984.

Director Regional de Producción "Zona Especial III" Río San Juan 1984-1987.

El 15 de septiembre ingresó al Programa de Posgrado en Ciencias Agrícolas del CATIE y obtuvo el grado de Magister Scientiae, el 12 de septiembre 1989.

INDICE

Lista de Cuadros	viii
Lista de Figuras	x
Resumen	xii
Abstract	xiv
1. Introducción	1
2. Revisión de Literatura	4
2.1. Interacción Cepa-Cultivar	5
2.2. Relación Suelo/cultivar	8
2.2.1. La Humedad	9
2.2.2. Nitrógeno	10
2.2.3. El pH	11
2.2.4. Molibdeno	13
2.3. Temperatura	15
2.4. Macrosimbionte: La planta	17
2.5. Microsimbionte: La bacteria <u>Rhizobium</u>	18
3. Materiales y Métodos	20
3.1. Ubicación de los ensayos	20
3.1.1. Los Diamantes	20
3.1.2. La Montaña	21
3.2. Descripción de los experimentos	21
3.3. Establecimiento de los experimentos	21
3.4. Dimensiones del experimento	22
3.5. Tratamientos y variables estudiadas	22
3.5.1. Diseño Experimental	23
3.5.2. Las Variables estudiadas	24
3.5.2.1. Nodulación	24

3.5.2.2	Materia seca	24
3.5.2.3	Nitrógeno	24
3.5.2.4	Altura de planta	24
3.5.2.5	Vainas por planta	25
3.5.2.6	Granos por vaina	25
3.5.2.7	Contenido de ureídos	25
3.6	Manejo fitosanitario	25
3.7	Descripción de las variedades	26
3.8	Inoculación	27
3.9	Muestreo de suelo	27
3.10	Riego	28
4.	Resultados	29
4.1	Generalidades	29
4.2	Datos climatológicos	29
4.2.1.	Datos climatológicos de La Montaña	29
4.2.2	Datos climatológicos de Los Diamantes	30
4.3	Datos edafológicos	32
4.3.1	Datos de edafológicos de La Montaña	32
4.4	Composición florística	33
4.5	Pruebas de Duncan	37
5.	Discusión	48
5.1.	Tratamientos y variables evaluadas	49
5.2	Los cultivares	53
6.	Conclusiones	65
7.	Recomendaciones	66
8.	Bibliografía	67

LISTA DE CUADROS

	Página
2.1. Agrupación bacterias-leguminosas; según el tipo de crecimiento y la (s) especie (s) de planta (s) con la(s) que establece simbiosis (Jordan, 1984)	19
3.1. Tratamientos de los experimentos de los experimentos de respuesta a la inoculación en el cultivo de Soya (<u>Glycine max</u>) realizados en La Montaña, CATIE, Turrialba, Costa Rica y Los Diamantes, Guápiles, Limón, Costa Rica	23
4.1. Promedios mensuales de la radiación (Cal/cm ² /día), temperaturas máximas y mínimas (°C) y precipitación (mm). Finca experimental La Montaña, CATIE, Turrialba, Costa Rica.	30
4.2. Promedios mensuales de la radiación (Cal/cm ² /día), temperaturas máximas y mínimas (°C) y precipitación (mm). En la estación experimental Los Diamantes, Guápiles, Costa Rica	31
4.3. Algunas características del suelo de "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica	32
4.4. Algunas características físico-químicas del suelo de la estación experimental "Los Diamantes", Guápiles, Costa Rica	33
4.5. Composición florística de malezas del lote 10 de la finca experimental "La Montaña", Turrialba, Costa Rica, expresada en % (Downton, W.J.S., 1975; Raghavendra, A.S.; Das, V.S.R., 1978)	35
4.6. Composición florística (en %) de malezas del lote Las Guineas, estación experimental "Los Diamantes", Guápiles, Costa Rica (Downton, W.J.S., 1975; Raghavendra, A.S.; Das, V.S.R., 1978)	36
4.7. Pruebas de Duncan para la interacción cepa/cultivar, variable nodulación (escala 0-5) para los cultivares (IAC-8 y Papillón) de soya (<u>Glycine max</u> Merr) y tratamientos (cepa de <u>Bradyrhizobium japonicum</u>) en la finca experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica y "Los Diamantes", Guápiles, Limón, Costa Rica	37
4.8. Pruebas de Duncan para la interacción cepa/cultivar para la variable materia seca (g/parcela), para los cultivares (IAC-8 y Papillón) de soya (<u>Glycine max</u> Merr.) y tratamientos (cepas de <u>Bradyrhizobium japonicum</u>) en la finca experimental "La Montaña", Turrialba, Costa Rica y "Los Diamantes", Guápiles, Limón, Costa Rica	39
4.9. Pruebas de Duncan para la interacción cepa/cultivar para el	

- contenido de nitrógeno (mg/g), para los cultivares (IAC-8 y Papillón) de soya (Glycine max Merr.) y tratamientos (cepas de Bradyrhizobium japonicum) en la finca experimental "La Montaña", Turrialba, Costa Rica y "Los Diamantes, Guápiles, Limón, Costa Rica 40
- 4.10. Pruebas de Duncan para la interacción cepa/cultivar para la variable rendimiento (kg/ha), para los cultivares (IAC-8 y Papillón) de soya (Glycine max Merr.) y tratamientos (cepas de Bradyrhizobium japonicum) en la finca experimental "La Montaña", Turrialba y "Los Diamantes, Guápiles, Limón, ambos en Costa Rica 41
- 4.11. Pruebas de Duncan para la interacción cepa/cultivar, variable altura de planta (cm) para los cultivares (IAC-8 y Papillón) de soya (Glycine max Merr.) y tratamientos (cepa de Bradyrhizobium japonicum) en la finca experimental "La Montaña", Turrialba y "Los Diamantes", Guápiles, Limón, ambos en Costa Rica 43
- 4.12. Pruebas de Duncan para la interacción cepa/cultivar, variable vainas por planta, para los cultivares (IAC-8 y Papillón) de soya (Glycine max Merr.) y tratamientos (cepas de Bradyrhizobium japonicum) en la finca experimental "La Montaña", Turrialba y "Los Diamantes", Guápiles, Limón, ambos en Costa Rica 44
- 4.13. Pruebas de Duncan para la interacción cepa/cultivar, variable granos por vaina, para los cultivares (IAC-8 y Papillón) de soya (Glycine max Merr.) y tratamientos (cepas de Bradyrhizobium japonicum) en la finca experimental "La Montaña", Turrialba y "Los Diamantes, Guápiles, Limón, ambos en Costa Rica 45
- 4.14. Pruebas de Duncan para la interacción cepa/cultivar para el contenido de ureídos ($\mu\text{g/g}$), para los cultivares (IAC-8 y Papillón) de soya (Glycine max Merr.) y tratamientos (cepas de Bradyrhizobium japonicum) en la finca experimental "La Montaña", Turrialba y "Los Diamantes, Guápiles, Limón, ambos en Costa Rica 46

LISTA DE FIGURAS

1. Respuesta de nodulación (escala 0-5) a la interacción cepas de Bradyrhizobium japonicum con cultivares de soya Glycine max Merr. en la finca experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba y en la estación experimental "Los Diamantes", Guápiles, Costa Rica 57
2. Respuesta de contenido de nitrógeno (ppm) a la interacción cepas de Bradyrhizobium japonicum con cultivares de soya Glycine max Merr. en la finca experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba y en la estación experimental "Los Diamantes", Guápiles, Costa Rica 58
3. Respuesta de producción de materia seca a la interacción cepas de Bradyrhizobium japonicum con cultivares de soya Glycine max Merr. en la finca experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba y en la estación experimental "Los Diamantes", Guápiles, Costa Rica 59
4. Respuesta de altura de planta (cm) a la interacción cepas de Bradyrhizobium japonicum con cultivares de soya Glycine max Merr. en la finca experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba y en la estación experimental "Los Diamantes", Guápiles, Costa Rica 60
5. Respuesta de producción de granos (kg/ha) a la interacción cepas de Bradyrhizobium japonicum con cultivares de soya Glycine max Merr. en la finca experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba y en la estación experimental "Los Diamantes", Guápiles, Costa Rica 61
6. Respuesta de producción de vainas por planta a la interacción cepas de Bradyrhizobium japonicum con cultivares de soya Glycine max Merr. en la finca experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba y en la estación experimental "Los Diamantes", Guápiles, Costa Rica 62
7. Respuesta de producción de granos por vaina a la interacción cepas de Bradyrhizobium japonicum con cultivares de soya Glycine max Merr. en la finca experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba y en la estación experimental "Los Diamantes", Guápiles, Costa Rica 63

8. Respuesta de contenido de nitrógeno en forma de ureidos a la interacción cepas de Bradyrhizobium japonicum con cultivares de soya Glycine max Merr. en la finca experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba y en la estación experimental "Los Diamantes", Guápiles, Costa Rica

64

IZAGUIRRE SILVA, V.E. 1989. La interacción entre cultivares/zonas ecológicas y cepas de Bradyrhizobium japonicum y sus efectos sobre la producción del cultivo de la soya (Glycine max Merr.) en Costa Rica. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 60 p.

Palabras claves: Interacción, cepas, Bradyrhizobium japonicum, zonas ecológicas, cultivares de soya, Glycine max.

RESUMEN

Con el objetivo de determinar la interacción entre cepas de *Bradyrhizobium japonicum*, zonas ecológicas y cultivares de soya (*Glycine max* Merr.) se ejecutaron dos experimentos; uno en la finca experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba y otro en el centro experimental "Los Diamantes", Guápiles, ambos en Costa Rica. En los mismos se sembraron dos cultivares de soya (IAC-8 y Papilión) y seis tratamientos, de los cuales, dos no fueron inoculados (testigos); pero sí fertilizados, uno con nivel bajo (20 kg/ha de N.) y el otro con nivel alto (80 kg/ha de N.) y cuatro inoculados con cepas (508, 514, 506 y CR-502) infectivas y efectivas. El diseño experimental empleado fue un bloque completo al azar con arreglo de parcelas divididas en donde la parcela grande fue el cultivar; en el cual se probaron seis tratamientos con cuatro repeticiones.

Para determinar la interacción planteada, en los dos experimentos se evaluaron las variables de nodulación (escala 0-5), contenido de N en la biomasa aérea (mg/g), peso de biomasa aérea (g/parcela), altura de planta (cm), rendimiento de grano (kg/ha), vainas por planta, granos por vaina y contenido de N en forma de ureídos ($\mu\text{m/g}$) en las hojas.

Las respuestas de los sitios, cultivares y tratamientos para los parámetros evaluados fueron variables; no obstante el sitio que dió los mejores resultados para rendimiento de granos, contenido de ureídos y nodulación fue "Los Diamantes" en Guápiles. Por otro lado el cultivar que dió los mejores valores para las variables de nodulación, vainas por planta y rendimiento fue Papillón. Los tratamientos que dieron mejores respuestas para nodulación fueron las cepas 508 y 514 tanto en La Montaña como en Los Diamantes.

Con los experimentos ejecutados, los cultivares establecidos y los tratamientos estudiados y evaluados con las variables contempladas, se determinó que hubo interacción entre cepas, zonas ecológicas y cultivares de soya.

IZAGUIRRE SILVA, V.E. 1989. Interaction between cultivars/ecological zones and strains of Bradyrhizobium japonicum and their effects on yield of soybean (Glycine max Merr.) in Costa Rica. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica. CATIE, 60 p.

Key words: Interaction, strains, Bradyrhizobium japonicum, ecological zone, soybean, Glycine max Merr., cultivars.

ABSTRACT

In order to determine the interaction between strains of *Bradyrhizobium japonicum*, ecological zones and soybean (*Glycine max* Merr) cultivars two field experiments were carried out, one at CATIE's experimental farm "La Montaña", Turrialba and another at Ministry of Agriculture's experimental station "Los Diamantes", in Guápiles, Limón both in Costa Rica. Two soybean cultivars were planted, IAC-8 and Papillon, and six treatments, two were uninoculated controls, with low N (20 kg/ha) and high N (80 kg/ha), four were inoculated with infective and effective strains CR 508, 514, 506 and 502. A complete randomized block design was used arranged in split plots, where the large plot was the cultivar and the subplots the treatments. Four replicates were used.

The following parameters were evaluated: nodulation (scale 0-5), nitrogen content of biomass (%), dry matter per plot (g), plant height (cm), grain yield (kg/ha), pods per plant, grains per pot and leaf ureide ($\mu\text{m/g}$) content.

A variable response for the parameters were obtained for sites, cultivars and treatments. However, higher values for grain yield,

ureide content and nodulation was obtained at "Los Diamantes" site. Cultivar Papillon showed the highest values for nodulation, pods per plant and grain yield. In the other hand the strains that induced the best nodulation were C.R. 508 and 514 in both sites.

Taken into account sites, cultivars and treatments it was concluded that there was interaction between strains, ecological zones and cultivars. These findings have practical implications for inoculant use in soybeans.

1. INTRODUCCION

Los factores más limitantes de la producción agrícola son el agua y el nitrógeno disponibles en los suelos (Obaton, 1983; Quispel, 1974).

Con el aumento de la población humana se incrementan también los requerimientos alimentarios y posiblemente su costo sobre todo los cereales. Para finales de siglo, por ejemplo, se ha estimado que se requiere duplicar la producción de cereales de 1.3 a 2.6×10^9 toneladas y cuadruplicar la de leguminosas de grano de 0,13 a $0,5 \times 10^9$ toneladas para satisfacer las necesidades alimentarias proyectadas para entonces (Havelka y Hardy, 1976).

El nitrógeno forma parte de ácidos nucleicos, proteínas, clorofila y otros compuestos esenciales para la vida de las plantas (FAO, 1985b).

Algunas de las alternativas para lograr incrementos significativos de la producción y satisfacer las necesidades alimentarias, entre otras están (Ramírez, 1983; Obaton, 1983):

a- Aumentar la producción química de fertilizantes nitrogenados de 40 a 160×10^6 toneladas.

b- Mejorar la eficiencia de la utilización del nitrógeno de fertilizantes por los cereales mediante el uso de inhibidores de la nitrificación.

c- El invento de nuevos procesos catalíticos que requieran menos energía para la síntesis de fertilizantes.

d- Aumentar la eficiencia de la fijación biológica de nitrógeno, sobre todo la simbiótica entre *Rhizobium*/leguminosas.

e- Agregando materia orgánica al suelo.

El nitrógeno tiene dos depósitos de relevancia para la biósfera: a- la atmósfera y b- la tierra y los cuerpos de agua (mares, lagos). En el primero casi el 80% de los gases que la constituyen están en forma de N_2 molecular, altamente estable y se hace disponible por medio de la acción de las tormentas, las lluvias, la fijación simbiótica y de la fijación industrial por el método Haber-Bosh (Obaton, 1983). Las formas disponibles del N a las plantas, son el nitrato (NO_3^-) y el amonio (NH_4^+) las cuales son generalmente limitantes para los cultivos. Las formas gaseosas de nitrógeno tales como el óxido nitroso (N_2O), óxido nítrico (NO) y dióxido de nitrógeno (NO_2) y desde luego el N_2 no son disponible para las plantas (Martínez, 1986).

La optimización del manejo del cultivo de la soya, cultivo de gran potencial en el área centroamericana para suplir al menos en parte el déficit de aceite y proteínas para consumo humano y animal, debe incluir forzosamente un buen manejo de la fijación biológica de nitrógeno.

En efecto la soya (*Glycine max* Merr.) es un cultivo con alta capacidad de fijar nitrógeno. De esta manera el cultivo además de llenar sus necesidades de nitrógeno se puede incluir también en rotaciones con otros no fijadores; por ejemplo el sorgo, maíz y arroz con el fin de mejorar su producción y la fertilidad general de los suelos.

Objetivo

El objetivo de este trabajo fue determinar la interacción entre cultivares de soya, zonas ecológicas y cepas de Bradyrhizobium japonicum.

2. REVISION DE LITERATURA

La soya (Glycine max (Merr.)). El cultivo de la soya se ha incrementado en mesoamérica pues el grano se utiliza tanto para la alimentación humana como animal y para la extracción de aceite de alta calidad por su contenido bajo de ácidos grasos no saturados (18-26%).

El grano contiene entre 33 y 45% de proteína (Monge, 1987; Montero y Mata, 1988). Sobre este cultivo se ha investigado en zonas tropicales y templadas en los distintos aspectos de manejo tanto en lo productivo como en la fijación de nitrógeno.

En Centro América se han introducido líneas o cultivares de soya de Brasil, EE. UU., China, Japón y otros países en donde se ha adaptado bien dicho cultivo (Montero, 1985; CARE, 1984).

Con relación a la adaptación de cultivares, la compatibilidad entre cepas de *Bradyrhizobium japonicum* se han realizado varios estudios (Montero, 1985; CARE, 1984).

El cultivo de la soya necesita, para una producción de 2.500 kg/ha de grano cerca de 200 kg/ha de N (FAO, 1977), cuya fuente puede ser el suelo, el fertilizante nitrogenado y la simbiosis con Bradyrhizobium japonicum. Obviamente la contribución de la fijación dependerá de las condiciones de crecimiento, cepa, variedad, fertilidad del suelo y sobre todo el nitrógeno disponible. En terrenos no cultivados previamente con soya la inoculación con el microsimbionte casi invariablemente aumenta

el rendimiento (Chamber Pérez et al, 1981). A veces se prefiere una mezcla de dos o más cepas efectivas en el inoculante pues permite utilizar el mismo en un ensayo más amplio de variedades y sitios (Chamber Pérez et al, 1981). Sin embargo Acuña et al (1987) encontraron competencia entre cepas cuando se incluyeron en mezcla en un inoculante. De esta manera, si existen las posibilidades técnicas, sería preferible utilizar un inoculante unicepa, de probada efectividad en el sitio y con las variedades sembradas.

La eficiencia relativa que se ha logrado con cultivares de soya y cepas de Bradyrhizobium japonicum ha sido entre 0,30 a 0,98, siendo unos de los más altos de leguminosas de grano fijadoras de nitrógeno estudiadas. La eficiencia relativa (ER) es la tasa de liberación de H₂ sobre la tasa de reducción de C₂H₂ como índice de la actividad fijadora de la nitrogenasa, restado de uno (Drevon, 1983).

$$ER = 1 - \frac{H_2 \text{ liberado}}{C_2H_2 \text{ reducido}}$$

2.1. Interacción Cepa-Cultivar

Chamber Pérez (1982) trabajando con tres cepas y sus combinaciones con dos cultivares de soya, determinó que las cepas 110 más 138 más 1809 dieron los mejores resultados en las variables medidas. Estas fueron rendimiento de grano, contenido y producción de aceite y proteína. El mismo expresa que la efectividad e infectividad se puede deber a la ausencia de cepas nativas en el suelo y/o a la competitividad de las inoculadas y su compatibilidad con el cultivar (Vincent, 1965; Trinick y Parker, 1982).

Varela *et al* (1978) trabajando con 9 cepas y tres variedades determinaron que unas cepas fueron más infectivas con unas variedades que otras. Además que al correlacionar el número de nódulos con el peso seco de la parte aérea respondía directamente a la infectividad.

Acuña O. *et al* (1987) en un experimento resultado de mezclar 4 cepas en todas las posibles combinaciones con la variedad júpiter de soya, determinaron que hubo correlación entre peso seco parte aérea, peso seco de nódulos, % de N y la infectividad y efectividad de unas cepas con dicho cultivar. Algunas cepas no provocaron una respuesta a la inoculación cuando se pusieron en mezcla. Además se determinó que la mayor infectividad y efectividad fue con las cepas Semia 5019 y Ciat 90.

Halverson *et al* (1987) en investigación realizada con un cultivar de soya con la cepa Hs111 y su mutante Hs111,s determinaron que la tasa de infección es diferente entre ellas. La inoculación con la cepa y su mutante en el cultivar Essex expresó formas diferentes en los nódulos; resultados similares se obtuvieron con otro cultivar.

Para que ocurra la nodulación debe haber aparentemente reconocimiento entre las bacterias y los exudados radicales. Así las bacterias discriminan la especie de la planta y las raíces y/o pelos radicales.

En el proceso de reconocimiento y fijación intervienen factores químicos (quimiotaxismo) estimulados por la lectina; genéticos del

macrosimbionte; por ejemplo el gen sencello *rj1*, *rj1* y los genes *Rj2*, *Rj3* y *Rj4* de soya son no noduladores y del microsimbionte cuyas características se expresan en la eficiencia tales como la presencia de hidrogenasas asimilatorias (*Hup+*) y su carencia (*Hup-*). De esta manera el H_2 que se produce como producto secundario de la nitrogenasa puede ser reutilizado para obtener su energía por las cepas *Hup+*. Además los factores medioambientales (temperatura, pH, humedad, sequía entrea otros); de los cuales se tratará más adelante juegan un papel muy importante.

La nodulación y la fijación de nitrógeno dependen de las interacciones entre una determinada especie leguminosa (macrosimbionte) y las cepas de una especie de Rhizobium (microsimbionte).

Escuder (1978) trabajando con 3 cultivares de soya, 4 inoculantes, 2 niveles de fertilización nitrogenada (150, 225 kg) y un testigo sin fertilización y sin inoculación, determinó que entre cepas y cultivares hubo mejor rendimiento en cuanto a peso seco de la parte aérea y peso de nódulos. En el nivel más alto de nitrógeno hubo valores similares a la mejor asociación cepa-cultivar; no obstante, al calcularse la relación costo-beneficio, la fertilización tiene una relación negativa, o sea que es antieconómica la aplicación de altas dosis de fertilizantes. Por ejemplo si aplicamos 150 kg de N/ha, de urea 46%, deben aplicarse 326 kg de dicha fórmula. Para obtener óptimos rendimientos el suministro debe hacerse fraccionado en tres épocas y minimizar así las pérdidas; al momento de la siembra, al inicio de floración y al comienzo de llenado de vaina. Esto significa un jornal

por cada época de aplicación. Además de los altos costos directos se pueden mencionar otros inconvenientes del uso de fertilizantes como lo son la contaminación de aguas por lixiviación de nitratos. Por otro lado, para inocular 70 kg de semilla de soya, cantidad necesaria para sembrar una ha por ejemplo, sólo se requiere un kg de inoculante si se inocula la semilla o hasta 5-10 kg/ha si se inocula al surco con inoculante granulado. Un sólo hombre puede inocular dicha cantidad de semillas en un tiempo muy breve. La inoculación se efectúa una sola vez y los simbioses realizarán la fijación según los factores medioambientales y el desarrollo de la planta. Posiblemente se requiera aplicar 20 kg/ha de N como nitrógeno de arranque. A pesar de esto el costo de la inoculación es más barato que aplicar fertilizantes. Con la inoculación no hay peligro inmediato de contaminación de las aguas freáticas o superficiales con NO_3 .

2.2. Relación suelo/cultivar

Teixeria et al (1978) en estudios realizados con 3 cultivares de soya y tres tipos de suelo determinaron que, en cuanto al contenido de proteína y aceite hubo diferencias entre la asociación de unos cultivares con un tipo de suelo. Relaciones similares en otros estudios encontró Tango et al (1974). Por otro lado Rayo (1977) trabajando en tres zonas de Nicaragua, cultivares de soya e inoculantes comerciales obtuvo diferentes respuestas de la planta a la fertilización con fórmulas nitrogenadas y a los inoculantes en la producción de materia seca de la parte aérea y producción de grano. A continuación se detalla el efecto de varios factores del suelo que afectan la simbiosis.

2.2.1. La Humedad

La actividad fijadora de nitrógeno de los nódulos es afectada por deficiencia o por exceso de humedad en el suelo.

Una capa delgada de agua alrededor del nódulo, reduce la actividad fijadora del mismo. Esto se debe a la baja disponibilidad de O_2 al nódulo (Martínez, 1986). La película de agua alrededor del nódulo evita que las concentraciones de sales a su alrededor causan daño por presión osmótica. Períodos alternos de anegación y sequía con temperaturas altas, son más detrimenales que sequías prolongadas (Martínez, 1986). La carencia de humedad tanto en zonas templadas como en tropicales, inciden negativamente en la actividad fijadora de los nódulos.

La desecación de los nódulos esféricos de la soya, a diferencia de los meristemáticos del trébol y Vicia fava, se recuperan menos de los daños causados por concentraciones de sales al disminuir el agua (Martínez, 1986; Sprent, 1971).

La humedad en el suelo a capacidad de campo favorece la multiplicación de las bacterias (Martínez, 1986). Con la sequedad de los nódulos, ocurre el rompimiento de las células corticales que rodean a los mismos y a los bacteroides; los cuales son afectados por la acción del O_2 y bajo suministro de sustrato al tejido fijador de N.

El bajo potencial de agua afecta la infección de los pelos radicales y la nodulación (Worral y Roughley, 1976) por efecto de la respiración de las raíces y microorganismos del suelo, el CO_2 se

encuentra en mayor proporción que el O_2 , influenciado por la difusión de los gases por poros del suelo (Martínez, 1986).

2.2.2. Nitrógeno

El N disponible en el suelo que generalmente es insuficiente para suplir las necesidades de las plantas se encuentra en forma de amonio y nitratos (NH_4^+ ; NO_3^-) y concentraciones excesivas de ambos afectan negativamente la simbiosis entre bacterias y leguminosas en sus diversas fases (CARE, 1984; Martínez, 1986).

Aplicaciones de 20-30 kg/ha de N al momento de la siembra o estado de plántula como N de arranque beneficia a la planta, aumentando el área fotosintética; mientras los nódulos inician su actividad fijadora (Giddens et al 1982; Martínez, 1986). Una vez que la actividad se instaure, la planta está en capacidad de suplir más fotosintatos a los nódulos. Antes de iniciar la actividad simbiótica, la planta debe estar en un estado de "hambre" de N.

Así el N en pequeñas cantidades (10-20 kg/ha) aplicadas al momento de la siembra favorece la actividad simbiótica, cantidades mayores, inhiben el proceso fijador de N (Giddens et al, 1982; Scott y Aldrich, 1975).

Aplicaciones de fertilizantes nitrogenados a cultivos de soya en plena floración y/o de fructificación, pueden ser beneficiosos ya que en estas etapas el cultivo requiere más de los nutrimentos para la formación de cosecha (CARE, 1984; Martínez, 1986). La materia orgánica y

la urea, son menos perjudiciales que las aplicaciones de NO_3^- y NH_4^+ . La materia orgánica se descompone lentamente y así el N va quedando disponible y la urea se convierte en NH_4^+ el cual luego se nitrifica.

Cantidades de 6,5 ppm de nitrato aplicadas al suelo favorecen la nodulación y la fijación de N (Gibson y Jordan, 1983). Por otro lado aplicaciones de 50, 75 o 100 kg/ha de nitrógeno, inhiben completamente la nodulación (Giddens et al, 1982).

Algunos de los posibles mecanismos que ocurren con la aplicación de fórmulas nitrogenadas sobre la simbiosis *Rhizobium*-leguminosas, pueden ser: a- rompimiento irreversible de la organización de los tejidos fijadores; b- retardo o inhibición de la iniciación de la infección de los pelos radicales; c- disminución de nuevos nódulos inhibiendo la adherencia de los rhizobios a la raíz; d- prevención de la inducción del encorvamiento del pelo radical por las bacterias; e- bloqueo en la iniciación del pelo infectivo y f- desarrollo limitado de la biomasa nodular (Millak y Tesfai, 1987).

2.2.3. El pH

La soya se adapta bien en suelos con pH de 5,8 a 7,0, recomendándose para la producción rangos de 6,0 a 6,5; valores mayores puede causar deficiencias de manganeso (Scott y Aldrich, 1975) Vincent (1965) encontró que *B. japonicum* toleró pH hasta de 3,5. La producción en cultivos con suelos de pH bajo no es tan significativo por deficiencias en Mo, además de la toxicidad de Mn y Al.

Se considera que las leguminosas de climas tropicales son más eficientes en la fijación de nitrógeno que las de zonas templadas. Quizás se deba a que en los trópicos hay mayor diversidad de especies y las mismas que se han adaptado mejor a las condiciones climatológicas. La distribución de las leguminosas es así (FAO, 1985; Alexander, 1980): El 90% de las mimosáceas, están en el trópico y el otro 10% en zonas templadas; las cesalpináceas 96% y 4% y las papilionáceas 37% y 63% en el mismo orden. También se afirma que la mayor parte de los Rhizobium Hup+ están en los trópicos (Martínez, 1986; Montero y Mata, 1988). En condiciones de pH bajo (suelos ácidos) puede ocurrir que no haya fijación de nitrógeno o si ocurre esta sea baja, debido; a) las condiciones negativas sobre la sobrevivencia de las bacterias en el suelo, b) infección de las raíces e inicio de la formación del nódulo; c) eficiencia de la simbiosis, d) nutrición de las plantas hospederas.

En cuanto al encalado de suelos ácidos, puede haber respuestas diferentes a la nodulación y la fijación de N. Esto se ilustra con los resultados obtenidos por Brockwell et al (1982) que fueron positivos, y por otro lado Dughri y Bottomley (1983) fueron negativos. El pH puede tener efecto indirecto como en la multiplicación y actividad de otros microorganismos en el suelo y/o bloquear la disponibilidad de los nutrientes (Montero y Mata, 1988).

En términos generales la aplicación de cal en suelos ácidos la multiplicación de los rhizobios se ve favorecida, esté o no la planta hospedera (Conventry et al, 1985; Rovira, 1961). En suelos con pH bajo puede haber Al en proporciones que causen toxicidad sobre los rhizobios

y se puede deber a: a) Un efecto directo del Al monomérico, b) un efecto indirecto del Al polimérico al provocar reducción en la concentración del P y c) un efecto directo del Al polimérico sobre los rizobios (Wood y Cooper, 1988).

En suelos con pH mayores de 6,5, pueden manifestarse deficiencia de Mn, Fe y P por la fijación de estos elementos. Por el contrario en suelos con pH de 5,5 se reduce la disponibilidad de Cu, Bo, Ca, Mg y P. Además el Al y Mn aumentan su disponibilidad y pueden inducir toxicidad en la planta (Montero y Mata, 1988). La soya crece bien en suelos con pH de 5,8 a 7,0; siendo el óptimo 6,0 a 6,5.

Vincent (1965) determinó que Rhizobium melilotii y R. trifoli, son más susceptibles a pH bajo que B. japonicum, ya que cepas de ésta, toleran pH de 3,5. Desde luego; los efectos del pH en suelo no son directos; sino por el bloqueo o la no disponibilidad de algunos elementos como Ca, P y Mo.

En investigaciones realizadas se ha determinado que en pH bajo, no ocurre la fijación simbiótica del N o es muy escasa.

2.2.4. Molibdeno

Los microorganismos que fijan nitrógeno requieren de la presencia de la enzima nitrogenasa, la cual está formada por dos proteínas, la nitrogenasa que contiene dos átomos de Mo y la reductasa de la nitrogenasa que carece de Mo; ambas tienen Fe (Postgate, 1982). Además de la nitrogenasa, también se requiere de un agente reductor y una

fuente energética como el ATP para fijar el nitrógeno. Los bacteroides requieren de O_2 ; pero altas concentraciones son inhibitorias; así la leghemoglobina regula el suministro de dicho elemento (Alexander, 1980).

Suelos conteniendo menos de 0,7 ppm de Mo se considera deficientes. Por lo general la adsorción de iones de Mo ocurre en los óxidos de Fe y Al; por ello es que la deficiencia de Mo ocurre en los suelos ácidos. El contenido de Mo en las plantas está alrededor de 0,02 a 10 ppm y en los nódulos de 5 a 15 ppm. Dado que el Mo tiene la función en la reducción de nitratos, la deficiencia de dicho elemento se asemeja en muchos cultivos a la de N. Deficiencia de Mo en los suelos, restringe la nodulación de las leguminosas y la eficiencia en la fijación de dinitrógeno. El Mo participa en diversos procesos en las plantas (CARE, 1984):

- a- Reductasa del N en la transformación de nitritos a nitratos mediante flavoproteínas, bajo el cambio de valencia Mo_4 a Mo_5 .
- b- Reductasa para la fijación de N molecular en las leguminosas.
- c- Mediante acción enzimática (fosfatasa) interviene en el metabolismo fosforado: fosforilización e incorporación del P.
- d- Interviene en la síntesis del ácido ascórbico.

Martínez, R. (1986) indica que cuando no hay Mo se forman nódulos, pero son menos eficientes y son similares a los nódulos inefectivos. La dificultad para asimilar Mo parece ser una de las principales limitaciones en la fijación de dinitrógeno por el frijol, se ha demostrado que cuando se aplica a dicho suelo Mo y Ca, el frijol es capaz de obtener todo el N necesario para producir 3000 kg/ha de grano.

2.3. Temperatura

La temperatura es uno de los factores medioambientales que influye en los distintos procesos de la fijación de N. Esto es, en la asociación, formación y función de los nódulos. Giddens *et al* (1982) afirman que los rizobios no sobreviven en suelos con temperaturas arriba o próximas a 40° C y que en suelos secos con temperaturas de 20° C la población declina en más de 10% de la población inicial en una semana. Por otro lado Chowdhury *et al* (1968) comunicaron que temperaturas entre 35 y 40°C son letales para R. trifoli y R. lupini en suelos estériles. Munevar y Wollun (1962) probaron con cultivares de soya seleccionados para suelos con altas temperaturas con cepas de B. japonicum, cuyos resultados demuestran que la alternativa para superar este estrés, puede ser por la nodulación y funcionamiento adecuados entre cepas y cultivares adaptados a dichas condiciones. En general se afirma que temperaturas de 20°C son óptimas para las zonas templadas y de 27 a 30°C, lo son para las zonas tropicales (Martínez, 1986). A temperaturas menores de 7°C y mayores de 36°C ocurre poca o ninguna nodulación. El mismo autor afirma que en dos sitios uno a 1000 y otro a 1800 msnm, la eficiencia en la fijación de N, fue mayor en el de más altitud.

Gibson y Jordan (1983) comentaron que se ha dado énfasis al efecto de la temperatura del suelo en el volumen de la rizósfera; dejando de lado la temperatura de la filósfera. Esta tiene influencia sobre la actividad simbiótica pues afecta el suministro de fotosintatos por la planta a los bacteroides. Cabe mencionar que la actividad fijadora de N por los nódulos, está influenciada por el proceso de fotosíntesis y el

movimiento de azúcares producida por la planta. Temperaturas edáficas de 22 a 27° C son más favorables para el crecimiento radical y que la relación parte aérea/raíz, es más influenciada por la luz que por la temperatura.

Scott y Aldrich (1975) expresaron que en suelos en donde se siembra soya a temperaturas entre 18-21° C, la plántula aflora a los 5 o 7 días después de siembra; siempre que no haya otro factor limitante al respecto.

Olivares (1988) plantea que altas temperaturas pueden incidir entre los simbioses, reduciendo de esa manera la actividad simbiótica.

Schwitzer et al (1980) trabajando con nódulos de soya, variaron los períodos de exposición a la luz y oscuridad alternativamente con la temperatura en diferentes combinaciones y encontraron que el factor más influyente en la actividad del nódulo fue la temperatura cuando se disminuía de 27° C hasta 18° C. A temperatura constante de 27° C y la variación en el período de exposición de luz y oscuridad, la actividad del nódulo, no decreció. Por otro lado Klauson et al (1986) trabajando con B. japonicum a diferentes temperaturas, determinaron que la competitividad entre las mismas disminuía con el incremento de la temperatura. En unos rangos, unos serotipos eran más competitivos que otros en iguales condiciones.

Según la FAO (1985a) para distintas cepas o grupos de rhizobios, las exigencias de temperaturas son diferentes; así para R. meliloti, los

límites son de 36,5 a 42° C y puede sobrevivir 21 días en turba a 40° C. Por otro lado Chowdhury et al (1968) comunicaron que temperaturas mayores de 35 o 40° C son mortales para R. trifoli y R. lupini cultivadas en suelos estériles.

2.4. Macrosimbionte: La planta

La familia leguminosa a la cual pertenecen las plantas de mayor interés en la fijación simbiótica del N., se dividen en tres subfamilias a saber: Papilionoidae a la cual pertenecen los géneros Glycine (soya), Arachis (maní), Phaseolus (frijol), Medicago (alfalfa), Cajanus (gandul) (Cubero y Moreno, 1983; FAO, 1985; Alexander, 1980). Las subfamilias Ceasalpinoidae y Mimosoidae son de menor importancia en cuanto a plantas productoras de alimentos.

Según Graham (1982) se pueden considerar tres factores del hospedero que afecta la fijación simbiótica del N₂: La iniciación, desarrollo y funcionamiento del nódulo. Obviamente estos procesos no son marcadamente separables sino que están entrelazados entre sí. Entre otros están: Quimiotaxis de los rizobios; multiplicación de los mismos en la rizosfera; acercamiento y unión a los pelos radicales, penetración o preinfección de los rizobios al pelo radical; infección de las células de la corteza. Las dos últimas etapas son la inducción de crecimiento meristemático local en la corteza radical y el funcionamiento de los mismos.

En el proceso de infección se asume que intervienen tres genes; uno en el reconocimiento de especies, otro en la invasión de los pelos

radicales y filamento de infección, además del que interviene en el desarrollo de células corticales por poliploidía. En el desarrollo del nódulo intervienen otros tres genes, los cuales afectan directamente la división bacteriana y diferenciación de las células de las plantas; otro que interviene en la estructura del nódulo y por último el gen que interviene en la maduración del bacteroide. Evidentemente en el funcionamiento del nódulo intervienen otros genes cuyos productos nodulinas no han sido identificados, menos su función, a excepción de la leghemoglobina, la sintetasa de la glutamina y la uricasa (Verma et al, 1988).

2.5. Microsimbionte: La bacteria Rhizobium

Las bacterias de los géneros Rhizobium y Bradyrhizobium pertenecen a las familias de las Rhizobiaceas. Son Gram negativas, de forma bacilar, no esporulan, móviles por la presencia de flagelos peritricos, aeróbicas y tienen aproximadamente 1-2 x 0,5-1 micrómetros de diámetro y longitud respectivamente. Las especies de bacterias se agrupan por las plantas con las cuales establecen simbiosis; diferenciándose los géneros por el tipo de crecimiento y la capacidad de soportar la acidéz del medio en el que crecen; así los de crecimiento lento y ácido resistente son Bradyrhizobium y los de crecimiento rápido y que crecen mejor en medio alcalino, son Rhizobium (Cubero y Moreno, 1983; Martínez, 1986; Alexander, 1980).

La especificidad de las bacterias para formar nódulos y fijar nitrógeno, está vinculado con los siguientes procesos: Invaginación del pelo radical y formación de un filamento o hilo de infección; formación y persistencia de

un meristemo nodular; multiplicación de las bacterias dentro de la membrana envolvente y transformación en bacteroides; establecimiento de un metabolismo eficiente integral entre el macro y microsimbionte (Martínez, 1986; Alexander, 1980; Jordán, 1984).

Cuadro 2.1. Agrupación bacterias-leguminosas; según el tipo de crecimiento y la (s) especie (s) de planta (s) con la (s) que establece simbiosis (Jordán, 1984).

Bacteria	Géneros hospedantes
1. DE CRECIMIENTO RAPIDO	
<u>Rhizobium meliloti</u>	<u>Medicago</u> , <u>Melilotus</u> , <u>Trigonella</u>
<u>Rhizobium leguminosarum</u>	
biovar. <u>trifolii</u>	<u>Trifolium</u>
biovar. <u>phaseoli</u>	<u>Phaseolus vulgaris</u> ,
biovar. <u>vicea</u>	<u>Pisum</u> , <u>Lathyrus</u> ,
	<u>Lens</u> , <u>Vicia</u>
<u>Rhizobium loti</u>	<u>Lupinus</u> , <u>Lotus</u> ,
	<u>Ornithopus</u> , <u>Leucaena</u>
2. DE CRECIMIENTO LENTO	
<u>Bradyrhizobium japonicum</u>	<u>Glycine max</u>
<u>Bradyrhizobium</u> spp.:	
<u>Bradyrhizobium</u> sp (<u>Vigna</u>)	<u>Vigna</u> , leguminosas forrajeras tropicales y muchos otros
<u>Bradyrhizobium</u> sp (<u>Lupinus</u>)	<u>Lotus pendiculatus</u> <u>Lupinus</u> sp.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Ubicación de los ensayos

Se establecieron dos ensayos, uno en la estación experimental "Los Diamantes" del Ministerio de Agricultura y Ganadería, en Guápiles y el otro en la finca experimental "La Montaña" del CATIE, Turrialba; ambos en Costa Rica. En los dos ensayos se sembraron los cultivares de soya IAC-8 y Papillón, se utilizaron las mismas cuatro cepas de B. japonicum, niveles de N de 20 y 80 kg/ha, una distancia de siembra de 20 cm, se tomaron los siguientes parámetros: nodulación, % de N, materia seca, altura de planta, vainas por planta, granos por vaina, rendimiento de granos en kg/ha y contenido de ureidos en las hojas. Más información se ofrece posteriormente.

3.1.1. Los Diamantes

La estación experimental "Los Diamantes" del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), está localizada en Guápiles, Limón, Costa Rica, a 10° 13' de latitud N. y 83° 47' de longitud O. y a 250 msnm. Los terrenos de dicha estación están ubicados en la zona de vida clasificada como bosque muy húmedo (Holdridge, 1982). La temperatura media anual es de 24,6° C, con máximas de 30,5° C y mínimas de 19,5° C. La precipitación promedio anual es de 4.390 mm y una humedad relativa promedio de 87%. En la región, el mes con menos precipitación es marzo (60 mm) y el de mayor es octubre (545 mm). Las características físico-químicas de los suelos están en cuadro 4.2.

3.1.2. La Montaña

La finca experimental "La Montaña" del CATIE, en Turrialba, Costa Rica, está ubicada a 09° 52' de latitud N y 83° 38' longitud O, con una elevación de 590 msnm, una precipitación de 2563 mm y una temperatura media anual de 22° C. Los lotes experimentales están en la zona de vida bosque tropical húmedo (Holdridge, 1982). Las características físico-químicas de los suelos están en el cuadro 4.1. Según Aguirre (1971) la clasificación de estos suelos, son:

Serie : Instituto, fase normal.
 Orden : Inceptisol
 Suborden : Tropept
 Gran grupo : Humitropept
 Subgrupo : Typic humitropept
 Familia : Humitropept, fine, halloystic, isohiperthermic.

3.2. Descripción de los experimentos

Los experimentos se establecieron uno en la estación experimental "Los Diamantes", Guápiles, Limón y el otro en la finca experimental de CATIE "La Montaña" en donde se sembraron los cultivares de soya IAC-8 y Papillón con dos niveles de fertilización nitrogenada y cuatro cepas de B. japonicum.

3.3. Establecimiento de los experimentos

La preparación del terreno consistió en un pase de arado, dos de gradas y el surqueado a 60 cm. Al momento de la siembra se aplicó una dosis de 20 Kg de N por Ha. de la fórmula 12-24-12 (N-P-K) al fondo del

surco de todo el experimento como N de arranque y en el tratamiento con 80 Kg de N por Ha., además se le adicionó 20 kg de N en forma de urea. Durante el ciclo del cultivo, se adicionó más N hasta completar los 80 kg/ha. El fertilizante se tapó para evitar el contacto directo con la semilla. El experimento de La Montaña, se estableció el ocho de enero y el de Los Diamantes el veinte del mismo mes y del año 1989.

3.4. Dimensiones del experimento

La parcela experimental fue de 5,0 m de largo por 3,6 m de ancho (seis surcos). La parcela útil fue de 3,0 m de largo y 1,8 m de ancho (tres surcos). Los surcos laterales y un m por cabeceras fueron los efectos de borde; el 4to surco de la parcela no se cosechó, sino que se utilizó para el muestreo para determinar nodulación, materia seca y % de N en las etapas fenológicas R4 (4 nudos) y V6 (inicio de llenado de vaina) según Fehr y Caviness (1977).

El área total del experimento fue de 2100 mt² (70 mt de largo por 30 mt de ancho).

3.5. Tratamientos y variables estudiadas

Los tratamientos en los experimentos fueron:

Cultivares de soya (Glycine max. Merr.), IAC-8 y Papillón.

Cepas de *B. japonicum*, CR 502, 504, 508 y 514. y los niveles de nitrógeno, 20 y 80 kg/ha de N (cuadro 3.1.). Las cepas se obtuvieron del Centro de investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica, San Pedro, Costa Rica.

Cuadro 3.1. Tratamientos de los experimentos de respuesta a la inoculación en el cultivo de soya (Glycine max realizados en La Montaña, CATIE, Turrialba y Los Diamantes, Guápiles, Limón, Costa Rica.

Tratamientos	Cepas de <u>Bradyrhizobium japonicum</u>		Descripción	
	identificación	Colección del CIA. (C.R.)	Sinonimia del país de origen	
1	IAC-8+	508	Semia 587	Brasil
2	IAC-8+	514	Semia 5019	Brasil
3	IAC-8+	504	Ciat 90	Colombia
4	IAC-8+	CR 502	aislamiento local	
5	IAC-8+	20 Kg de N/Ha		
6	IAC-8+	80 Kg de N/Ha		
7	Papillón+	508	Semia 587	Brasil
8	Papillón+	514	Semia 5019	Brasil
9	Papillón+	504	Ciat 90	Colombia
10	Papillón+	CR 502	aislamiento local	
11	Papillón+	20 Kg de N/Ha		
12	Papillón+	80 Kg de N/Ha		

3.5.1. Diseño experimental

El diseño fue un bloque completamente al azar con arreglo de parcelas divididas, en donde la parcela grande fue el cultivar y la pequeña fueron los tratamientos con las cepas y los niveles de nitrógeno

El modelo estadístico.

$$Y_{ijk} = U + b_i + a_j + (b_i * a_j) + E_{ijk}.1$$

donde

Y_{ijk} = valor de la variable independiente

U = es la media general

$i=1....r$ bloques

$j=1....a$ tratamientos (variedades)

k=1....b tratamientos de las subparcelas (inoculantes y niveles de fertilización)

yij= interacción entre zonas y cultivares.

3.5.2. Las variables estudiadas fueron las siguientes:

3.5.2.1. Nodulación. Para determinar la nodulación, se arrancaron diez plantas del surco destinado para el submuestreo. Se aplicó una escala de cero a cinco. Cero a la que no presentó nódulos y cinco a la mejor nodulada tanto en el cuello de la planta como en las raíces principales y secundarias de dicha planta; la cual se tomó como patrón.

3.5.2.2. Materia seca. La materia seca se determinó de las mismas plantas arrancadas para determinar nodulación. La parte aérea se sometió a secado en horno a 70°C por 72 horas, se enfriaron y se pesaron.

3.5.2.3. Nitrógeno. El % de N se determinó por método micro-Kjeldhal (Muller, 1961) de la parte aérea, previamente molida y tamizada.

3.5.2.4. Altura de planta. La altura de planta se determinó con cinta métrica en la etapa fenológica de V6 (Fehr y Caviness, 1971), los puntos de referencia fueron el cuello de la planta y el extremo distal (base de la hoja) del peciolo más alto. La media calculada, se obtuvo de cinco alturas de igual número de plantas de la parcela útil.

3.5.2.5. Vainas por planta. Se contaron las vainas que contenían tres plantas diferentes de la parcela útil y se calculó la media aritmética de las mismas.

3.5.2.6. Granos por vaina. Se contaron las vainas de una planta, separadamente las que contenían 1, 2 y 3 granos y posteriormente se calculó la media de entre éstas.

3.5.2.7. Contenido de ureídos. El contenido de ureído se determinó con el método de Vogel y Van der Drift (1970) de hojas extraídas de plantas de la parcela experimental en la etapa fenológica de V6 (Fehr y Caviness, 1971).

La densidad de siembra. Antes de sembrar se pesaron 100 semillas, para determinar los kilos de semilla para obtener una población de 333000 plantas por ha. y tomando en cuenta el % de germinación. No obstante la variedad papillón tuvo una baja germinación y como fué resemebrada en el periodo de sequía, la atacó el gusano cuerudo Agrotis subterranea ó Feltia subterranea (King y Saunders, 1984). Por tal motivo para determinar la densidad actual de plantas por parcela y por variedad hubo que efectuar un muestreo al azar in situ.

3.6. Manejo fitosanitario

Control de plagas insectiles y de malezas.

El manejo de las plagas fue similar en los dos experimentos; procediéndose de la siguiente manera:

Antes de establecer los ensayos, se aplicó el hierbicida preemergente Alaclor (Lasso) 1,5 kg de i.a. por ha. Posteriormente se aplicó dos veces Fluazifop-metil (fusilade) a razón de 1,25 lts. del producto comercial por ha para controlar gramíneas.

Las plagas insectiles que más se presentaron fueron las vaquitas o tortuguillas de los géneros Diabrotica y Ceratoma (King y Saunders, 1984) que perforan las hojas de la planta. Para su control se aplicó Tamarón 600 a razón de 1,25 lt por ha. esta misma aplicación en efectuó en dos oportunidades tanto en La Montaña como en Los Diamantes. Cabe destacar que la soya soporta una defoliación de hasta un 35 % antes de la floración y 17 % en otros periodos sin que haya efecto negativo en la producción (Montero y Mata, 1988; Care, 1984). Cuando se presentó el período de sequía, hubo ataque de gusanos tierreros o cortadores Agrotis subterranea; pero no hubo necesidad de efectuar aplicaciones porque las larvas se controlaron manualmente.

3.7. Descripción de las variedades

IAC-8. Esta variedad es originaria de Brasil, de flor púrpura, pubescencia marrón, semilla amarilla, hilo negro, resistente al acame, resistente a la dehiscencia, de crecimiento determinado. La semilla contiene un 38% de proteína y un 24,3% de aceite, y un peso de 17,3 gr por 100 semillas al 14% de humedad (Montero, 1988).

Papillón. Esta variedad es de crecimiento determindo, resistente al acame, un 17,73 gr. por 100 semillas, un rendimiento de 2645 kg/ha. Las plantas producen entre 25 y 30 vainas (Montero y Mata, 1988).

3.8. Inoculación

El inoculante se obtuvo de cepas liofilizadas que luego se cultivaron en agar inclinado con medio agar-levadura-manitol (Vincent, 1975) durante ocho días a 30° C. Posteriormente se preparó una suspensión de bacterias en caldo levadura-manitol luego para ser inoculada en la turba previamente esterilizada por calor húmedo y neutralizada con carbonato de calcio. El caldo se inoculó en una proporción de 50 ml por 100 gr de turba esterilizada, esta turba inoculada se dejó madurar por 72 horas a temperatura ambiente para permitir una mayor reproducción de las bacterias e inocular así la semilla con una mayor población de dicho microorganismo. Cuando se inoculó la semilla se mantuvieron las recomendaciones de FAO, o sea que por 100 g de semilla se aplicó 10 g de inoculante y 3 ml de goma arábiga como adherente (FAO, 1985a).

3.9. Muestreo de Suelo

Para obtener las muestras de suelo en La Montaña se extrajeron 5 submuestras de diferentes lugares formando una equis en el terreno, a las profundidades de 0-10, 10-20, y de 20-30 cm. Las muestras se mezclaron y se tomó una compuesta para el análisis químico y físico del suelo para cada profundidad y además, para poner a germinar las semillas de malezas que se encontraban en el perfil del suelo. El suelo para la germinación de las semillas se puso en un macetero en el invernadero y se realizaron identificaciones a medida que las plántulas lo permitían por sus características botánicas. La composición florística de los lotes se reflejan en los cuadros 4.3. y 4.4.

3.10. Riego

En La Montaña el riego fue por aspersión y se aplicó al cultivo tres veces para evitar que las plantas sufrieran estrés hídrico. En Guápiles por otra parte el riego se aplicó con manguera y regaderas. En ambos sitios aparentemente hubo períodos en los que el suelo no se mantuvo a capacidad de campo; no obstante, el cultivo en ambos sitios se desarrolló vigorosamente sin mostrar ningún síntoma de estrés hídrico.

Cultivos anteriores a los ensayos: En La Montaña el lote #10 estaba en barbecho desde hacía 6 meses; lo que permitió un desarrollo de las malezas y en Guápiles, un mes antes se había cosechado arroz de tal manera que al momento de la siembra, había pocas malezas. Sin embargo se realizó el inventario de malezas en ambos sitios con el objetivo de tener una idea del historial del manejo de los lotes.

4. RESULTADOS

4.1. Generalidades

Los resultados obtenidos durante la realización de los experimentos se presentan en cuadros y figuras. Los datos climatológicos se presentan en los cuadros 4.1. y 4.2., las características físico-químicas de los lotes de terreno experimentales en los cuadros 4.3. y 4.4. y la composición florística de malezas de los lotes en los cuadros 4.5. y 4.6. Con relación a análisis estadísticos, se presentan los cuadros resúmenes de pruebas de DUNCAN, en los cuadros 4.7., 4.8., 4.9. y 4.10. y las figuras 4.1.,...4.8.

4.2. Datos climatológicos

En el capítulo de Materiales y Métodos se indican algunas características agroecológicas de las zonas donde se establecieron los experimentos, finca "La Montaña", Turrialba y "Los Diamantes", Guápiles, Costa Rica. Aquí se anotan además algunos parámetros climatológicas medidos durante la ejecución de los experimentos.

4.2.1. Datos Climatológicos de La Montaña

En el cuadro 4.1. se indica que en el mes de enero, hubo una precipitación de 91 mm lo cual es deficitario para la germinación de las plántulas, aunque hubo una radiación de 310 Cal/cm²/día y una temperatura máxima de 26°, la evapotranspiración pudo haber sido alta por estar el suelo descubierto por efecto de la preparación para la siembra. No obstante la deficiencia de agua por precipitación, fue complementada con riego por aspersión. Algo similar ocurrió en el mes de

marzo y abril. De tal manera que en La Montaña no se presentó aparentemente en el cultivo estrés hídrico porque hubo riego complementario, aunque no se descarta la posibilidad de que por períodos cortos este se haya presentado.

Cuadro 4.1 Promedios mensuales de radiación ($\text{Cal}/\text{cm}^2/\text{día}$), temperatura máxima y mínima ($^{\circ}\text{C}$) y precipitación (mm). Finca experimental "La Montaña", Turrialba, Costa Rica.

Mes	Radiación solar		Precipitación (mm)	Temperaturas	
	$\text{Cal}/\text{cm}^2/\text{día}$			Máxima $^{\circ}\text{C}$	Mínima $^{\circ}\text{C}$.
Diciembre 88	347,3		159,0	25,8	16,6
Enero 89	310,0		91,0	26,2	16,1
Febrero 89	362,0		110,0	25,7	14,6
Marzo 89	377,2		58,0	26,7	15,6
Abril 89	439,1		92,0	27,6	17,8

4.2.2. Datos Climatológicos de Los Diamantes

En el cuadro 4.2. se observa que el mes con menor precipitación fue marzo con 140 mm, hubo una radiación de $394,8 \text{ Cal}/\text{cm}^2/\text{día}$ y una temperatura máxima de 27°C . En este mes ocurre una posición cenital y la misma incide en la evapotranspiración y debido a que el cultivo no había cubierto la superficie con la sombra de sus hojas, hubo necesidad

de regar manualmente porque no había instalaciones de riego. En este periodo se presentó un ataque de cortadores en el cultivar Papillón que era de menor edad porque fue resembrado en sustitución de la Siatsa. Por haber sido un riego deficiente por la capacidad de cobertura, hubo estrés hídrico cuando la IAC-8 estaba iniciando la floración y la Papillón se encontraba en estado de plántula (V4=4 nudos).

Cuadro 4.2. Promedios mensuales de radiación (Cal/cm²/día), temperatura máxima y mínima (°C) y precipitación (mm). Estación experimental "Los Diamantes", Guápiles, Costa Rica.

Mes	Radiación solar		Precipitación		Temperaturas	
	Cal/cm ² /día		ción (mm)		Máxima °C	Mínima °C.
Diciembre 88	289,8		476,0		26,4	19,6
Enero 89	338,7		189,0		27,4	19,2
Febrero 89	348,8		266,0		27,0	18,0
Marzo 89	394,5		140,0		27,1	18,1
Abril 89	362,5		362,4		28,2	19,7

4.3. Datos Edafológicos

4.3.1. Datos edafológicos del lote 10 de La Montaña

En el capítulo de Materiales y Métodos se indican algunas características agroecológicas de las zonas en que se establecieron los experimentos (La Montaña y Los Diamantes); no obstante a ello, aquí se anotan otras que se registraron antes y durante la ejecución de los ensayos pues pudieron haber afectado el establecimiento de los mismos.

El experimento de La Montaña se estableció el 8 de enero y el de Los Diamantes el 20 del mismo mes.

Cuadro 4.3. Algunas características del suelo de La Montaña, CATIE, Turrialba, Costa Rica.

parámetros	profundidades (cm)		
	0-10	10-20	20-30
pH (KCl)	5,1	5,1	5,3
Materia orgánica gkg-1	52,0	50,0	43,0
P mgkg-1	20,0	20,8	13,7
K Cmol(+)-1	0,2	0,2	0,2
N total gkg-1	0,33	0,33	0,33
N nitrato mgkg-1	0,4	0,4	0,4
textura	franco	arenosos	

Se realizaron análisis físico-químico de los suelos de los lotes en donde se establecieron los experimentos para determinar las

condiciones de fertilidad y otras que pudieran afectar de alguna manera la consecución de los objetivos planteados en los mismos Díaz-Romeu y Hunter, 1978).

Cuadro 4.4 Algunas características físico-químicas del suelo de la estación experimental "Los Diamantes", Guápiles, Limón, Costa Rica.

Parámetros	Profundidades (cm)		
	0-10	10-20	20-30
pH (KCl)	4,4	4,4	4,4
Materia orgánica gkg-1	45,0	42,0	42,0
P mgkg-1	16,4	18,7	17,0
K Cmol(+)-1	0,4	0,4	0,6
N gkg-1	0,33	0,33	0,33
Nitrato mgkg-1	0,3	0,4	0,4
textura	franco	arenoso	

4.4 Composición florística

Se determinó la composición florística del perfil de suelo en los lotes de los experimentos porque los mismos son disturbados por los distintos ensayos que se realizan en los mismos y el banco de semillas se enriquece con la incorporación de semillas por las prácticas de labranza, que puede ser cero, mínima o convencional.

Se ha determinado que las plantas del tipo fotosintético C4, suministran más fotosintatos a los microorganismos rizosféricos como los Rhizobios entre otros, por la cantidad y calidad de los mismos y podrían afectar seguramente la inoculación (Martínez, 1986).

En los cuadros 4.5. y 4.6. aparece el inventario de las malezas por los nombres científicos, familias y tipo de fotosíntesis de los dos sitios.

En el Cuadro 4.5 notamos que en los primeros 10 cm de profundidad el contenido de semillas de malezas del grupo C4 fue de 97,4% y 2,6% de C3; mientras que de 10-20 cm fue de 93,4% para C4 y 6,6% de C3 y para la profundidad de 20-30 cm las del grupo C4 80% y para C3 20%. De tal manera que las predominantes en las tres profundidades fueron las del grupo C4.

Cuadro 4.5. Composición florística de Malezas del lote 10 de la finca experimental, "La Montaña", Turrialba, Costa Rica, expresada en % (Downton, W.J.S., 1975; Raghavendra, A.S.; DAS, V.S.R. 1978).

Géneros y especies	profundidad (cm)			tipos foto-	
	0-10	10-20	20-30	Familia	sintéticos.
<u>Digitaria sanguinalis</u>	59,7	8,1	24	Poaceae	C4
<u>Eleusine indica</u>	22,8	18,9	12	Poaceae	C4
<u>Cyperus</u> sp.	12,7	47,2	28	Cyperaceae	C4
<u>Portulaca oleracea</u>	1,3	2,7		Portulacaceae	C4
<u>Phyllanthus niruri</u>		13,5	12	Euphorbiaceae	C4
<u>Mollugo verticillata</u>		1,3	4	Aizoeaceae	C4
<u>Alternanthera</u> sp.		1,3		Amarantaceae	C4
<u>Browalia americana</u>	1,3		4	Solanaceae	C3
<u>Pilea hyalina</u>	1,3	1,3	4	Urticaceae	C3
<u>Oxalis</u> sp.			4	Oxalidaceae	C3
<u>Gnaphalium</u> sp.		1,3		Asteraceae	C3
<u>Ganlinsoga</u> sp.		4	8	Asteraceae	C3
	100%	100%	100%		
cantidad total/plántulas	149	74	25		

Cuadro 4.6. Composición florística (%) de las Malezas del lote Las Guineas, estación experimental "Los Diamantes", Guápiles, Costa Rica (Dowton, W.J.S., 1975; Raghavendra, A.S.; DAS, V.S.R., 1978).

Géneros y especies	Profundidad (cm).			Familia	tipos foto-sintéticos.
	0-10	10-20	20-30		
<u>Cyperus</u> sp.	64,8	42,3		Cyperaceae	C4
<u>Eleusine indica</u>	8,9	3,6	16,6	Poaceae	C4
<u>Phyllanthus niruri</u>	1,7	3,8		Euphorbiaceae	C4
<u>Mollugo verticillata</u>	2,3	7,6	16,6	Aizoaceae	C4
<u>Alternantera</u>	2,3			Amaranthaceae	C4
<u>Digitaria</u> sp.	5,9		16,6	Poaceae	C4
<u>Gnaphalium</u> sp.	1,1	3,8		Asteraceae	C4
<u>Lindernia crustacea</u>	1,7	11,5		Scrophulariaceae	C4
<u>Mecardomonía</u> sp.	1,1			Scrophulariaceae	C4
<u>Leptochloa</u> sp.	3,8			Poaceae	C4
<u>Erechtites hieraciifolia</u>		7,6		Asteraceae	C3
<u>Richardia scabra</u>	3,5	3,8		Rubiaceae	C3
<u>Portulaca oleracea</u>	1,1		33,3	Portularaceae	C3
<u>Drymaria cordata</u>	1,1	3,8		Caryophyllaceae	C3
<u>Galinsoga</u> sp.	1,7	7,6		Asteraceae	C3
<u>Borreria</u> sp.	,5			Rubiaceae	C3
<u>Mitracarbo</u> s sp.	1,1			Rubiaceae	C3
<u>Pilea hyalina</u>			16,6	Urticaceae	C3
cantidad total/plántulas	100% 168;	100% 26	100% 6.		

En el cuadro 4.6. se expresa que el mayor contenido de semillas de malezas fueron las del grupo C4 y consecuentemente las de menor fueron las del grupo C3. Para la profundidad de 0-10 cm el contenido de semillas del grupo C4 fue 91% y las C3 9%; mientras que en la profundidad de 10-20 cm el % de C4 fue de 84,8 y las C3 de 15,2%; por otro lado para la profundidad de 20-30 fue de 50% para cada grupo.

Cuadro 4.7. Pruebas de Duncan para la interacción cepa/cultivar, variable nodulación (escala 0-5), para los cultivares (IAC-8 y Papillón) de soya (*Glycine max* Merr.) y tratamientos (cepas de *Bradyrhizobium japonicum*) en la finca experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba, Costa Rica y "Los Diamantes", Guápiles, Limón, Costa Rica.

Tratamientos (cepas/N)	Sitio			
	La Montaña Cultivares		Los Diamantes Cultivares	
	IAC-8	Papillón	IAC-8	Papillón
508	A 2,20	A 2,37	A 3,85	A 4,02
514	A 2,50	A 2,25.	A 3,25	B 3,25
504	B 0,70	A 1,62	A 3,00	AB 3,77
502	B 0,05	B 0,02	A 2,30	C 2,42
20kg	B 0,00	B 0,02	B 0,77	D 1,70
80kg	B 0,00..	B 0,02	B 0,35	D 1.77

4.5. Pruebas de Duncan

Los tratamientos con las cepas 508 y 514 para la variable de nodulación tuvieron igual comportamiento con la variedad IAC-8 en la montaña; mientras que los tratamientos con las cepas 504 y 502, con 20 y

80 Kg/Ha de N estadísticamente formaron el segundo grupo de respuesta en la interacción cepa/cultivar. Mientras que los tratamientos inoculados para el mismo cultivar y variable en los Diamantes fueron estadísticamente iguales y los tratamientos con N. formaron el segundo grupo de respuestas. Por otro lado los tratamientos inoculados con las cepas 508, 514 Y 504 para la variable nodulación, el cultivar Papillón en La Montaña, tuvieron igual comportamiento formando el primer grupo de respuesta; mientras que el inoculado con la cepa 502 y los testigos, formaron el segundo grupo de respuesta.

La respuesta de nodulación a la interacción cepa/cultivar en Los Diamantes con el cultivar Papillón, fue variada entre los tratamientos inoculados en donde las cepas 508 y 504 formaron el primer grupo, y la cepa 502 sola, el tercer grupo. Los tratamientos testigos (no inoculados) formaron el cuarto grupo. Como era de esperar para la respuesta a la nodulación, los tratamientos no inoculados; mostraron los valores más bajos.

Cuadro 4.8. Pruebas de Duncan para la interacción cepa/cultivar para la variable materia seca (g/parcela), para los cultivares (IAC-8 y Papillón) de soya (*Glycine max* Merr.) y tratamientos (cepas de *Bradyrhizobium japonicum*) en la finca experimental "La Montaña", Turrialba, Costa Rica y "Los Diamantes", Guápiles, Limón, Costa Rica.

Tratamientos (cepas/N)	Sitio			
	La Montaña Cultivares		Los Diamantes Cultivares	
	IAC-8	Papillón	IAC-8	Papillón
508	A 18,24	A 15,96	A 10,75	A 19,84
514	A 20,45	A 20,13	A 10,83	A 15,48
504	A 16,97	A 12,44	AB 9,83	A 14,95
502	A 17,45	A 12,92	B 8,59	A 18,28
20 kg	A 17,81	A 15,32	A 10,82	A 19,60
80 kg	A 17,89	A 17,13	AB 9,17	A 19,70

En cuanto a la respuesta a la interacción entre tratamientos cultivares y sitios para la variable de producción de materia seca aérea para el cultivar y IAC-8 en el experimento de la Montaña, todos los tratamientos tuvieron igual comportamiento. De igual manera ocurrió con el cultivar Papillón en el mismo sitio. Por otro lado para el cultivar IAC-8 en Los Diamantes los tratamientos inoculados con las cepas 508, 514 y 504 con el testigo de 80 kg/ha de N, formaron el primer grupo de respuestas, mientras que las cepas 504 y 502 y el testigo 20 kg/ha de N.; por su lado formaron el segundo grupo. En el mismo sitio para el cultivar Papillón, todos los tratamientos tuvieron estadísticamente igual comportamiento.

Las respuestas de los tratamientos y los cultivares en La Montaña para la variable de contenido de nitrógeno en la parte aérea estadísticamente fueron iguales. Esto es que todos los tratamientos se comportaron igual para cada cultivar.

Cuadro 4.9. Pruebas de Duncan para la interacción cepa/cultivar para el contenido de nitrógeno (mg/g), para los cultivares (IAC-8 y Papillón) de soya (*Glycine max* Merr.) y tratamientos (cepas de *Bradyrhizobium japonicum*) en la finca experimental "La Montaña", Turrialba, y "Los Diamantes", Guápiles, Limón, ambos en Costa Rica.

Tratamientos (cepas/N)	Sitio			
	La Montaña Cultivares		Los Diamantes Cultivares	
	IAC-8	Papillón	IAC-8	Papillón
	mg Ng ⁻¹			
508	A 5,20	A 4,19	B 2,93	A 4,17
514	A 5,37	A 4,09	AB 3,12	A 3,74
504	A 4,99	A 4,16	AB 3,25	A 4,29
502	A 5,12	A 4,15	AB 3,39	A 3,95
20kg	A 5,38	A 4,33	AB 3,35	A 3,85
80kg	A 5,16	A 4,14	A 3,70	A 3,57

Cuadro 4.10. Pruebas de Duncan para la interacción cepa/cultivar para la variable rendimiento (kg/ha^{-1}), para los cultivares (IAC-8 y Papillón) de soya (*Glycine max* Merr.) y tratamientos (cepas de *Bradyrhizobium japonicum*) en la finca experimental "La Montaña", Turrialba, y "Los Diamantes", Guápiles, Limón, ambos en Costa Rica.

Tratamientos (cepas/N)	Sitio			
	La Montaña Cultivares		Los Diamantes Cultivares	
	IAC-8	Papillón	IAC-8	Papillón
	kg ha^{-1}			
508	A 1565,0	B 897,5	A 2348,8	A 2300,0
514	A 1423,8	AB 1106,3	A 2195,0	A 2257,5
504	A 1362,5	AB 1035,0	A 1930,5	A 1950,0
502	B 1052,2	AB 960,0	A 2547,5	A 2133,8
20kg	A 1553,8	A 1281,5	A 2325,0	A 1366,8
80kg	B 986,3	AB 1108,8	A 2343,8	A 2112,5

Los tratamientos inoculados con las cepas 508, 514 y 504 con el testigo con 20 kg/ha de N. estadísticamente fueron iguales. Mientras que el tratamiento con la cepa 502 y el testigo con 80 kg/ha de N., formaron el segundo grupo. Esto para el cultivar IAC-8 en La Montaña. Mientras el mismo cultivar en Los Diamantes con los mismos tratamientos, hubo respuestas iguales entre ellos.

La interacción entre los tratamientos y el cultivar Papillón en La Montaña, presentaron las siguientes respuestas: Los tratamientos

inoculados con las cepas 514, 504 y 502 con los testigos, formaron el primer grupo de respuestas; mientras que los tratamientos inoculados y el testigo co 80 kg/ha de N. por su parte formaron el segundo grupo. En los Diamantes la respuesta de interacción entre los tratamientos y el cultivar IAC-8, fueron estadísticamente iguales para la misma variable, Por su parte el cultivo Papillón y los mismos tratamientos en Los Diamantes fueron estadísticamente iguales.

En La Montaña la interacción y los tratamientos del cultivar IAC-8 para la variable de altura de planta; no hubo diferencia estadística entre los mismos. Por su lado el cultivar Papillón en el mismo sitio, no presentó diferencia entre tratamientos.

En la interacción cepa/cultivar para la variable vainas por planta, en la Montaña no hubo diferencias estadísticas entre tratamientos. Comportamiento igual hubo entre los tratamientos para el cultivar Papillón en el mismo sitio. Por otro lado Los Diamantes para la misma variable y el mismo cultivar no hubo diferencia entre tratamientos en los Diamantes para el cultivar Papillón.

Cuadro 4.11. Pruebas de Duncan para la interacción cepa/cultivar, variable altura de planta (cm) para los cultivares (IAC-8 y Papillón) de soya (Glycine max Merr.) y tratamientos (cepas de Bradyrhizobium japonicum) en la finca experimental "La Montaña", Turrialba, y "Los Diamantes", Guápiles, Limón, ambos en Costa Rica.

Tratamientos (cepas/N)	Sitio			
	La Montaña Cultivares		Los Diamantes Cultivares	
	IAC-8	Papillón	IAC-8	Papillón
	cm			
508	A 77,3	A 54,9	A 85,4	A 70,6
514	A 77,4	A 57,3	A 80,1	A 67,8
504	A 84,5	A 57,2	A 84,5	A 67,3
502	A 81,0	A 56,0	A 81,0	A 66,0
20 kg	A 88,2	A 58,7	A 88,2	A 70,8
80 kg	A 86,9	A 57,2	A 86,9	A 71,6

Cuadro 4.12. Pruebas de Duncan para la interacción cepa/cultivar, variable vainas por planta, para los cultivares (IAC-8 y Papillón) de soya (Glycine max Merr.) y tratamientos (cepas de Bradyrhizobium japonicum) en la finca experimental "La Montaña", Turrialba, y "Los Diamantes", Guápiles, Limón, ambos en Costa Rica.

Tratamientos (cepas/N)	Sitio			
	La Montaña Cultivares		Los Diamantes Cultivares	
	IAC-8	Papillón	IAC-8	Papillón
508	A 46	A 52	A 53	A 94
514	A 43	A 63	A 46	A 86
504	A 28	A 60	A 58	A 93
502	A 38	A 60	A 52	A 96
20 kg	A 33	A 67	A 36	A 99
80 kg	A 26	A 62	A 36	A 75

Cuadro 4.13. Pruebas de Duncan para la interacción cepa/cultivar, variable granos por vaina, para los cultivares (IAC-8 y Papillón) de soya (Glycine max Merr.) y tratamientos (cepas de Bradyrhizobium japonicum) en la finca experimental "La Montaña", Turrialba, y "Los Diamantes", Guápiles, Limón, ambos en Costa Rica.

Tratamientos (cepas/N)	Sitio			
	La Montaña Cultivares		Los Diamantes Cultivares	
	IAC-8	Papillón	IAC-8	Papillón
508	A 2,0	B 2,1	A 1,9	A 2,2
514	A 2,0	AB 2,2	A 2,0	A 2,2
504	A 2,0	AB 2,2	A 1,3	A 2,0
502	A 2,1	A 2,5	A 2,0	A 2,2
20kg	A 2,2	AB 2,2	A 1,8	A 1,8
80kg	A 2,0	AB 2,3	A 2,0	A 1,9

No hubo diferencias con significancia estadística entre los tratamientos igual comportamiento hubo con el cultivar IAC-8 para la variable de granos por vaina en la Montaña. No fue así para el cultivar Papillón, los tratamientos inoculados con las cepas 514, 504 y 502 y los testigos sin inocular formaron el primer grupo de respuesta en La Montaña. En cuanto a la respuesta a la variable de granos por vaina la interacción cepa-cultivar en los Diamantes; los tratamientos, no difirieron estadísticamente entre sí. Por otro lado para la misma variable y en el mismo sitio, la interacción entre el cultivar Papillón y los tratamientos, no difirieron.

Cuadro 4.14. Pruebas de Duncan para la interacción cepa/cultivar para contenido de ureídos ($\mu\text{g/g}$), para los cultivares (IAC-8 y Papillón) de soya (*Glycine max* Merr.) y tratamientos (cepas de *Bradyrhizobium japonicum*) en la finca experimental "La Montaña", Turrialba, Costa Rica y "Los Diamantes", Guápiles, Limón, Costa Rica.

Tratamientos (cepas/N)	Sitio				
	La Montaña Cultivares		Los Diamantes Cultivares		
	IAC-8	Papillón	IAC-8	Papillón	
508	A 108	A 433	AB 654	A 664	
514	A 115	B 231	B 460	A 744	
504	A 92	AB 324	A 1093	A 685	
502	A 96	AB 330	AB 751	A 750	
20kg	A 112	AB 346	B 494	A 692	
80kg	A 96	B 249	AB 561	A 654	

La respuesta del cultivar IAC-8 y la interacción con los tratamientos, a la variable de contenido de ureídos en La Montaña, estadísticamente fueron iguales, mientras que el cultivar Papillón en el mismo sitio e iguales tratamientos, el comportamiento fue como sigue: los tratamientos inoculados con las cepas 508, 504, 502 y el tratamiento fertilizado con 80 kg de N, fueron dieron los mejores resultados.

Las variedades en Los Diamantes tuvieron igual comportamiento para las variables de rendimiento, granos por vaina y contenido de ureídos; no así para la variable de vainas por planta en donde la mejor fue la Papillón. Los tratamientos en este mismo sitio en cuanto a las variables

de rendimiento y vainas por planta, fueron iguales; no siendo igual para las variables de granos por vaina y contenido de ureídos. Los tratamientos con las cepas 508, 514, 506, 502 y el tratamiento con 80 kg/ha de nitrógeno forman el primer grupo de respuesta para la variable de granos por vaina y el segundo lo constituyen las mismas cuatro cepas y el tratamiento con 20 kg/ha de N; de tal manera que no hubo una diferencia altamente significativa entre los tratamientos. Por otro lado las cepas 506, y 502 formaron el primer grupo de respuesta; mientras que las cepas 508, 514, 502 y los tratamientos sin inoculación forman el segundo grupo. Estos datos se ilustran con las figuras 4.5., 4.6., 4.7. y 4.8. para las variables de rendimiento, vainas por planta, granos por vaina y contenido de ureídos respectivamente testigo con 20 kg/ha de N, formaron el primer grupo de respuesta y los tratamientos con las cepas 514, 502 y los testigos (no inoculados) formaron el segundo grupo. Mientras que en los Diamantes, la respuesta para el contenido de ureídos para el cultivar IAC-8 y la interacción con los tratamientos fue como sigue: los tratamientos inoculados con las cepas 508, 512 y los testigos formaron el segundo grupo.

5. DISCUSION

La expresión más elaborada y eficiente de la fijación biológica de nitrógeno se da en los bacteriodes de los géneros Rhizobium y Bradyrhizobium localizados en los nódulos radiculares de muchas leguminosas. De ahí que en áreas cultivadas del mundo, sea esta simbiosis la que más contribuye con el N proveniente de la fijación.

En cultivos como la soya donde la fijación tiene tanta incidencia sobre la producción existe un enorme interés práctico en conocer aquellos factores microbiológicos y agronómicos que inciden sobre el proceso y así corregir o modificar las prácticas de manejo que optimicen su funcionamiento. De esta manera se evita que el N disponible al cultivo sea un factor limitante en la producción.

Factores ligados al hospedero influyen en la iniciación de la nodulación, el desarrollo y el funcionamiento de los nódulos (Graham, 1982; Verma et al, 1988). Por otro lado factores de la bacteria también influyen en la expresión de los cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos que en el hospedero se inducen como resultado de la infección bacteriana. Factores ambientales afectan también todas las etapas de la simbiosis, como la temperatura del suelo y aire, humedad, oxígeno y dióxido de carbono en el suelo (Gibson, 1977; Gibson y Jordan, 1983) y factores ligados a la fertilidad de los suelos (Munevar y Franco, 1982).

El presente trabajo se realizó con el objetivo de establecer las interacciones cepas, cultivares y sitio en dos zonas ecológicas de Costa Rica con el fin de contar, por un lado información de la producción de soya bajo las condiciones del trópico húmedo así como del germoplasma microbiano disponible para los mismos.

5.1. Tratamientos y variables evaluadas

Para establecer la relación cepa, cultivar, sitio, se establecieron los siguientes tratamientos en los dos sitios experimentales de La Montaña y Los Diamantes cuatro cepas de B. japonicum, las cuales fueron: Semia 587 (508), Semia 5019 (514), Ciat 90 (504) y la CR 502, testigos no inoculados y los dos cultivares de soya.

Las variables estudiadas fueron nodulación, contenido de N, materia seca, altura de planta, vainas por planta, granos por vaina y contenido de ureídos.

Efecto de tratamientos: a) Cepas de Bradyrhizobium japonicum.

La respuesta a la inoculación con las cepas empleadas en los cultivares utilizados fueron diferentes en los sitios experimentales de La Montaña y Los Diamantes. La mejor asociación para la variable de nodulación fueron las cepas Semia 587 y Semia 5019 con el cultivar IAC-8 en La Montaña y las cepas Semia 587, Semia 5019 y CIAT 90 para el cultivar Papillón en el mismo sitio. Por otro lado en Los Diamantes no hubo diferencia entre las cuatro cepas en el cultivar IAC-8 pues los datos fueron estadísticamente iguales. En el cultivar Papillón en el mismo sitio al contrario la mejor nodulación se encontró con las cepas

Semia 567 y Ciat 90, en segundo lugar las cepas Semia 5019 y Ciat 90 y la cepa CR 502 en último lugar. Es decir si hubo una respuesta diferencial en cuanto a nodulación se refiere con este cultivar en Los Diamantes.

Este tipo de respuesta a la asociación entre inoculantes y cultivares, también fueron reportadas por Chamber Pérez (1982) al trabajar con tres cepas de inoculantes y dos cultivares de soya. El determinó que las mezcla entre las cepas de Bradyrhizobium japonicum USDA 110, 138 y 109 dieron los mejores resultados para las variables de rendimiento de grano, contenido y producción de aceite y proteína.

Por otro lado Varela et al (1982) trabajando con nueve cepas y tres cultivares de soya deermnaron que unas cepas se asociaron mejor para dar una correlación positiva entre el número de nódulos con el peso seco de la parte aérea. Acuña O. et al (1987) reportaron que al utilizar cuatro cepas de B. japonicum en sus distintas combinaciones en inoculantes en el cultivar de soya Júpiter, hubo respuesta diferencial en cuanto a el peso seco de nódulos, % de N y la infectividad y efectividad entre las cepas utilizadas. Estos autores también encontraron que ciertas combinaciones no fueron adecuadas pues cepas que dieron una excelente respuesta a la inoculación cuando se aplicaron solas, fallaron cuando se aplicaron con otras cepas mediocres. Este ensayo subraya las interacciones que se pueden suscitar entre cepas, la cual desde luego podría ocurrir entre cepas inoculadas a la semilla y las cepas existente en el suelo sean estas nativas o naturalizadas. Esto fue un problema que pudo haber sido un factor en los sitios y haber afectado el comportamiento de las cepas en los mismos pues en ambos

existía una población nativa como lo evidencia la nodulación e los testigos no inoculados. En estas circunstancias la competencia entre las cepas nativas y las inoculadas podría ser un factor limitante en la falta de respuesta a la inoculación (Halliday, 1985). En consecuencia no es conveniente emplear mezclas de cepas en los inoculantes sin tener conocimiento previo de cada una de ellas, o sus mezclas en un sitio y variedad en particular. En Los Diamantes si se toma solamente la variable "nodulación" no sería conveniente inocular con la cepa de B. japonicum Semia 5019 ni sola ni en combinación pues eventualmente la misma podría colonizar y dar problemas de competencia con cepas más efectivas que se quisieran inocular en el mismo sitio en el futuro.

En lugares en donde el cultivo de la soya se ha sembrado año a año por mucho tiempo la mayoría de las veces las cepas inoculadas son incapaces de provocar una respuesta a la inoculación pues sólo un porcentaje bajo de los nódulos son producidos por las cepas inoculadas (Weber et al, 1971; Ham, et al; 1971). Esta situación se complicaría aún más de existir más afinidad por la nodulación entre cierta variedad de soya y las cepas nativas que la (s) cepas inoculadas (Weber et al, 1971). Halverson et al (1985) trabajando con un cultivar de soya y la cepa de B. japonicum Hs11 y su mutante Hs 111,s determinaron que la tasa de infección fue diferente entre ellas.

Por su lado Drevon (1983) indicó que la eficiencia relativa en el proceso de fijación depende de la compatibilidad entre los simbioses y que en el caso de la soya, la misma puede ser de 0,30 a 0,90; siendo el máximo valor para dicho proceso de uno. De existir nodulación similares

como fue el caso con el cultivar PAC-8, las posibles diferencias entre cepas si se consideran otros factores, se deben a diferencias entre la eficiencia de la simbiosis en las diferentes combinaciones cepa/cultivar, la cual puede depender de genes del hospedero que son activados tarde en el proceso de formación de nódulos (Verma, et al 1988) cuyos productos (proteínas con actividad enzimática) tengan que ver con el funcionamiento de la simbiosis, por ejemplo enzimas que faciliten el transporte de los fotosintatos a los bacteroides o el transporte de NH_4^+ (como amino ácidos o ureídos) del nódulo a las partes aéreas en crecimiento. Diferentes cepas en soya afectan el patrón proteico de las membranas peribacteriales en las células afectadas si no también la composición de los ácidos grasos en las mismas (Werner et al, 1988).

El análisis estadístico por sitio para la respuesta a la variable de materia seca, (g/parcela) contenido de nitrógeno (mg/g) altura de planta (cm) y vainas por planta, sin embargo no mostró diferencias para los cultivares en La Montaña. Por otro lado en Los Diamantes; para las variables de rendimiento (kg/ha), altura de planta (cm), vainas por planta y granos por vaina, entre los tratamientos y los mismos cultivares, tampoco hubo diferencias estadísticas.

Las respuestas estadísticamente diferentes mostradas por los tratamientos para las variables de nodulación, contenido de nitrógeno (mg/g) y contenido de nitrógeno en forma de ureídos ($\mu\text{g/g}$) en Los Diamantes para los cultivares en estudio, muestra que existe interacción cepa-cultivar. Así mismo en La Montaña los tratamientos mostraron

diferencias entre ellos con los cultivares IAC-8 y Papillón para las variables de nodulación (escala 0-5) y rendimiento (kg/ha), esto confirma que entre unas cepas y cultivar, hay mejor asociación entre unos simbiontes que con otros.

En el proceso de formación de nódulos intervienen factores físicos que pueden evitar o favorecer el reconocimiento entre simbiontes, por ejemplo si hay suficiente nitrógeno disponible en el suelo; se puede inhibir la excreción de lectina de la planta y también la población nativa de Rhizobium (Martínez, 1986; Giddens 1982; Scott et al, 1975). Otro carácter genético de la bacteria es la presencia de hidrogenasa (Hup^+) o ausencia que determina su eficiencia en el proceso de fijación del N_2 (Hup^-) (Martínez, 1986). Sin embargo se carece de la información correspondiente sobre qué genotipo presentan las cepas utilizadas en el presente estudio en lo referente a esta característica.

5.2. Los Cultivares

Los cultivares, IAC-8 y Papillón mostraron diferencias estadísticas para las variables de contenido de nitrógeno (mg/g) y altura de planta (cm) en La Montaña, con el cultivar IAC-8, mostró los mejores resultados. No obstante Papillón fue mejor resultados para las variables de vainas por planta y contenido de nitrógeno en forma de ureídos ($\mu\text{g/g}$) en el mismo sitio.

En Los Diamantes, Papillón mostró los mejores resultados para la variables de vainas por planta. La variación de las respuestas por

cultivar a las variables evaluadas se puede deber a factores fisiológicos y genéticos del macrosimbionte.

5.3. Los Sitios

Al efectuarse el análisis de varianza como parcelas subdivididas en donde los sitios, cultivares y tratamientos fueron fuentes de variación, se determinó que el que mostró los mejores resultados estadísticamente, para las variables de nodulación, rendimiento y contenido de nitrógeno en forma de ureídos fue " Los Diamantes", Guápiles.

Teixeria et al (1978) trabajando con tres cultivares de soya y tres tipos de suelo determinó que el contenido de proteína y aceite en el grano difirió entre la asociación de cultivares y tipos de suelo.

Así los factores físicos tales como poca profundidad del suelo y baja capacidad para retención de agua pueden afectar el crecimiento de las leguminosas. El suelo de "La Montaña" tiene una menor capacidad de retención de agua respecto al suelo de "Los Diamantes". Esto unido a la mayor precipitación en este último sitio puede expresar o al menos indicar un mejor balance hídrico en el mismo, lo que tal vez benefició el crecimiento del cultivo.

En lo que se refiere a factores de fertilidad del suelo no hubo diferencias aparentes en el contenido de nutrimentos como para justificar las diferencias en rendimiento entre sitios.

También Tango et al (1974) y Rayo (1977) trabajando con diferentes cultivares y zonas ecológicas encontraron respuestas similares. Por esta razón es necesario zonificar los cultivos según su adaptación a las condiciones medioambientales. Dentro de los factores que pudieron incidir sobre las respuestas obtenidas en los sitios, entre otras están la humedad (Martínez, 1982; Schint, 1978; Masefield, 1958) y la temperatura (Giddens et al 1982; Chowdhury et al 1968; Munevar y Wollum, 1962; Scott y Aldrich, 1975).

Las propiedades físicas y químicas del suelo afectan directamente la población microbiana rizosférica ya que unas propiedades favorecen la multiplicación de individuos de unas especies que pueden ser depredadoras para otras. Así temperaturas de 27⁰ a 30⁰ en la zonas tropicales son favorables para el Rhizobium y 20⁰ para zonas templadas. Temperaturas mayores de 30⁰ y menores de 7⁰ son mortales para la mayoría de las especies y cepas de Rhizobium (Martínez, R. 1986; Chowdhury et al, 1968; Giddens et al, 1982).

La radiación solar influye en el proceso de fijación por la producción de fotosintatos que son suministrados como fuente energética al microsimbionte; ya que a más 30° C y a menos de 0° C el proceso fotosintético se hace nulo o muy mínimo (Holdridge, 1982). La radiación fue bastante similar en el período del experimento en ambos sitios.

Gibson y Jordan (1983) informan que tiene importancia la temperatura de la filósfera en en el proceso de fijación por la influencia de la misma en la fotosíntesis. La precipitación por otro

lado fue más uniforme en Los Diamantes que en La Montaña; aunque en este sitio se aplicó riego en el mes de enero de poca precipitación.

En pH de La Montaña fue de 5,5 y en Los Diamantes de 4,4. las bacterias Bradyrhizobium son ácido resistentes y quizá la condición de pH en Los Diamantes le haya favorecido; además de una mejor uniformidad en la humedad provista por la precipitación (Scott y Aldrich, 1975; Martínez, 1986; Montero y Mata, 1988; Montero, 1988).

El cultivo anterior al establecimiento del experimento en Los Diamantes fue arroz que al momento de la preparación del lote, ya tenía un mes de cosechado, o sea que el lote estaba libre de cultivo y malezas. Esto posiblemente afectó la composición microbiana del suelo, en donde microorganismos competidores y/o "enemigos" de las rhizobias, pudieron ser disminuidos y las cepas inoculada se establecieron mejor. Caso contrario ocurrió en el lote 10 de La Montaña que permaneció en barbecho por 6 meses y hasta pocos días antes de la siembra, fue preparado el terreno.

La composición florística de malezas en Los Diamantes presentó mayor número y diversidad de especies que en La Montaña, lo que pudo favorecer también una mayor diversidad de especies de microorganismos y/o haber disminuido el número de individuos por volumen de suelo por haber estado un período sin vegetación.

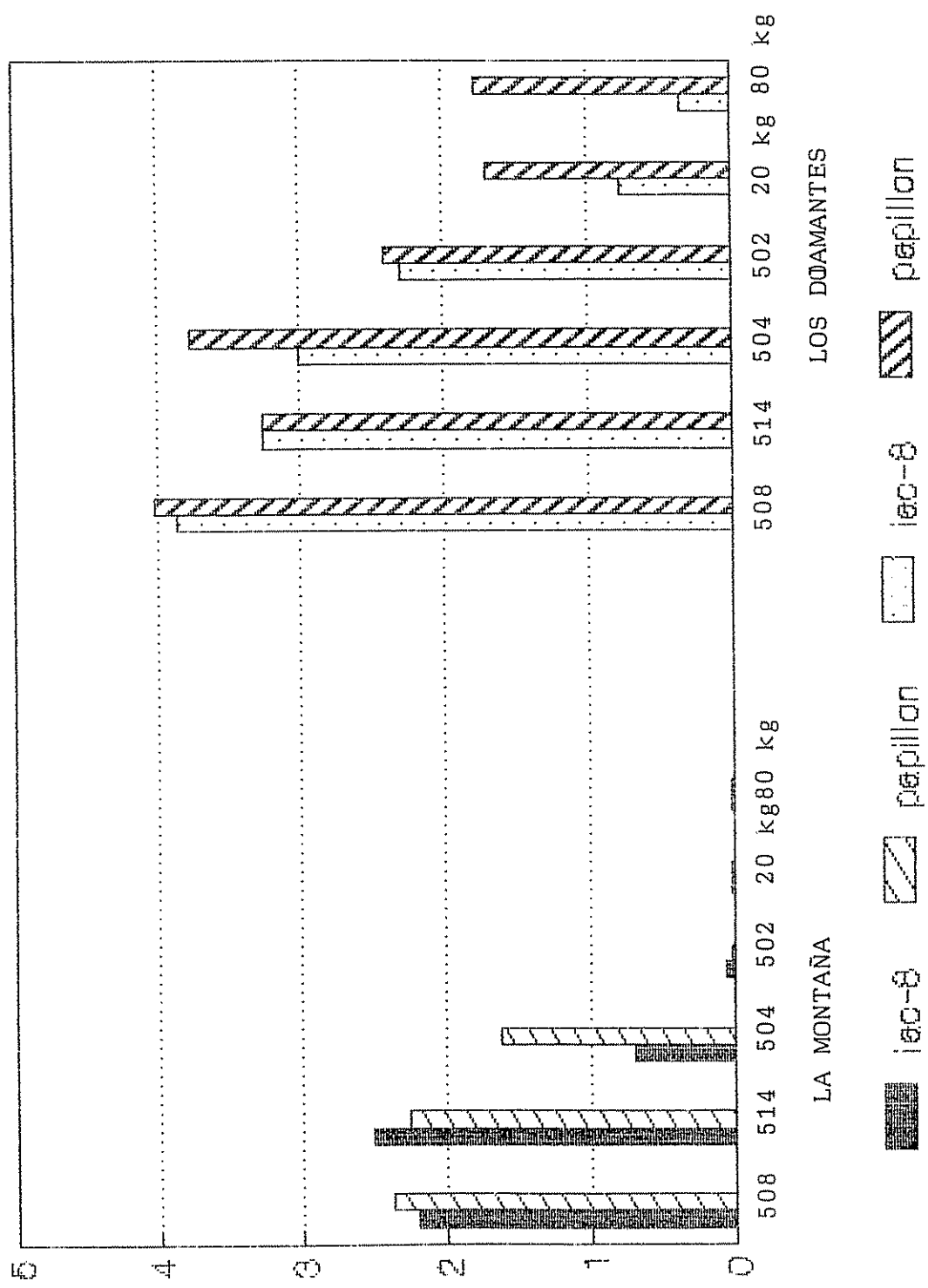


Figura 1. Respuesta de nodulación (escala 0-5) a la interacción cepas de *Bradyrhizobium japonicum* con cultivares de soja *Glycine max* Merr en la finca experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba y en la Estación Experimental "Los Diamantes", Guápiles, Costa Rica.

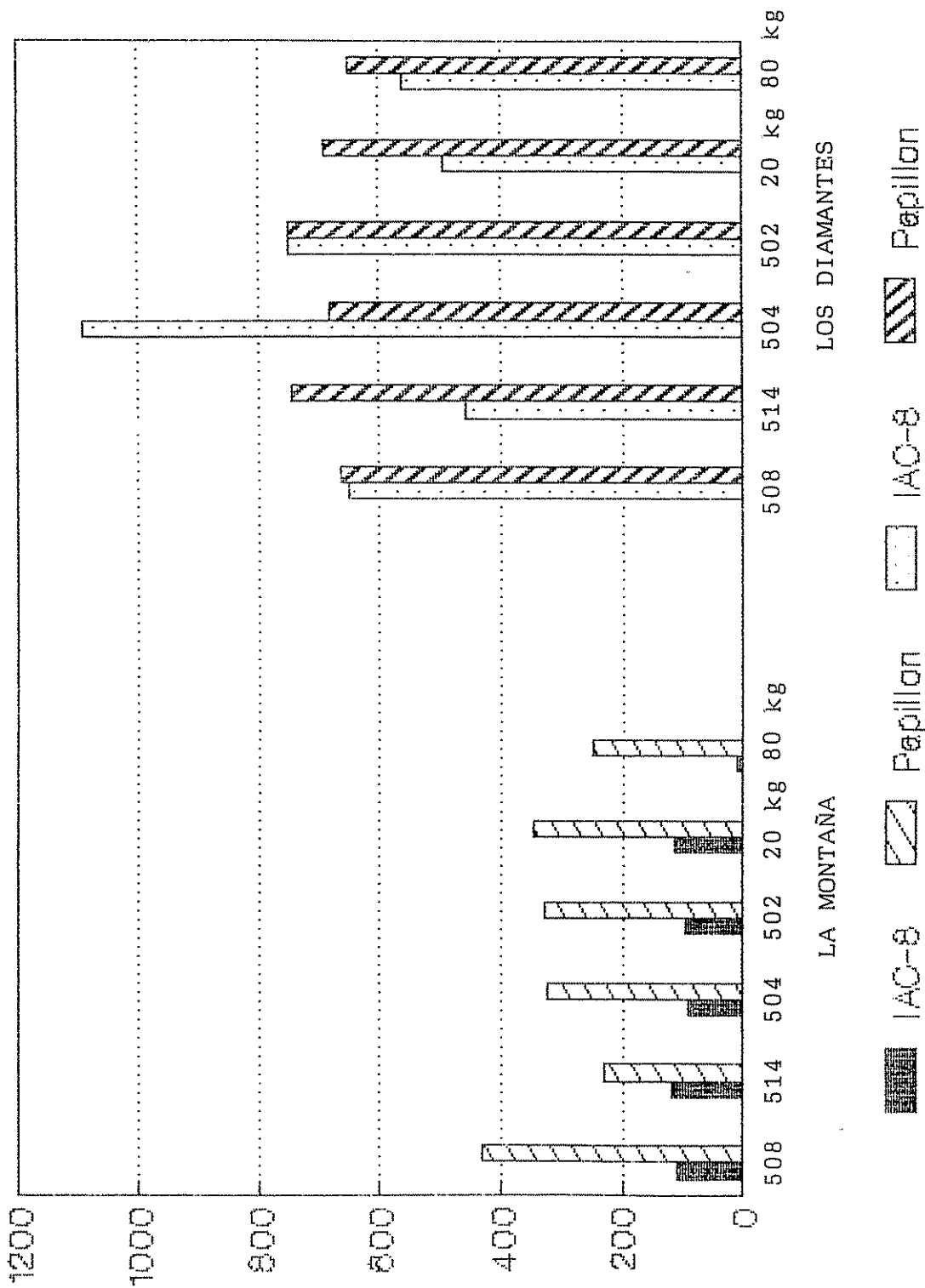


Figura 2. Respuesta de contenido de nitrógeno (ppm) a la interacción de cepas de *Bradyrhizobium japonicum* con cultivares de soja *Glycine max* Merr. en la finca experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba y en la estación experimental "Los Diamantes", Guápiles, Costa Rica.

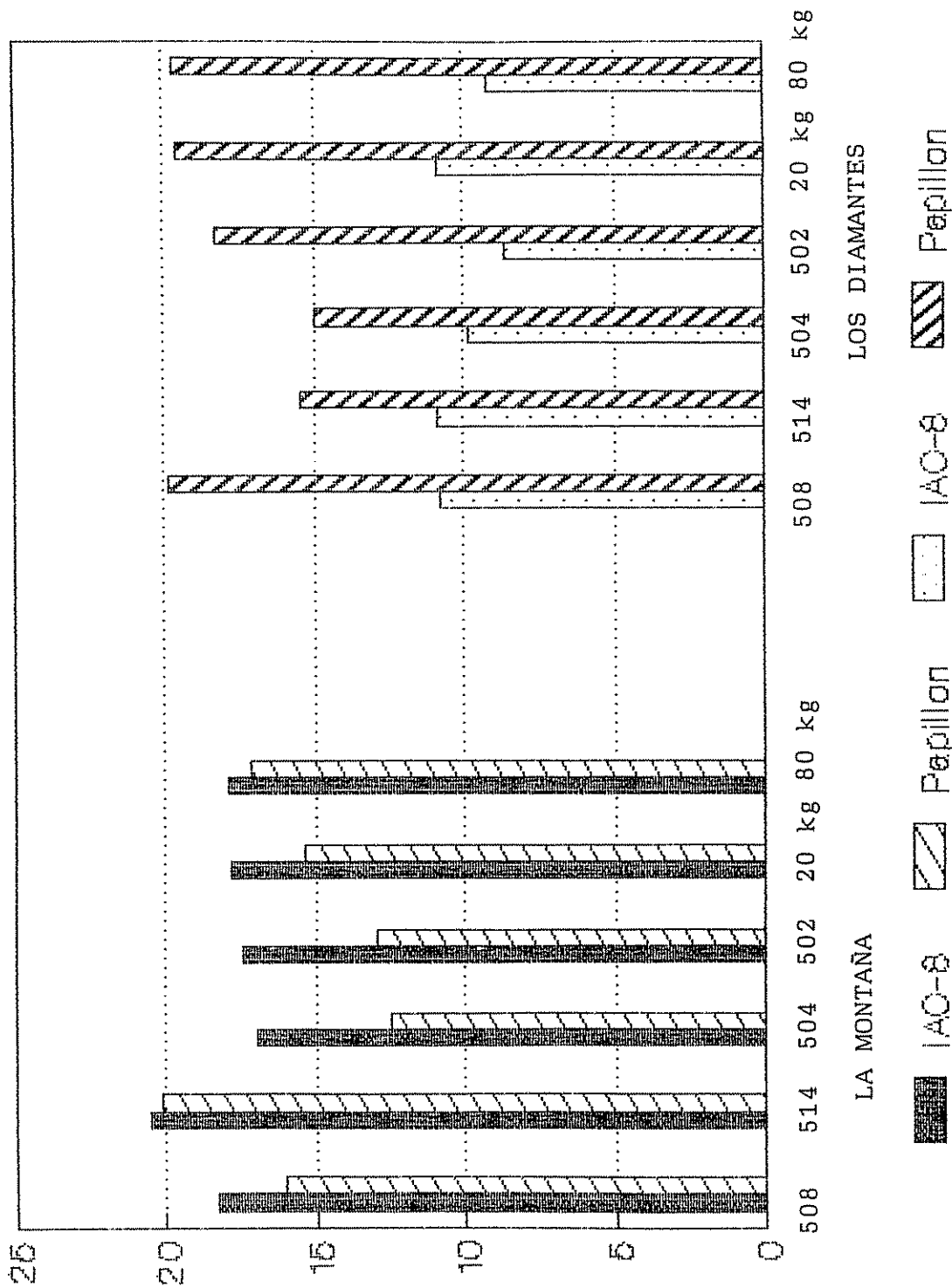


Figura 3. Respuesta de producción de materia seca a la interacción de Bradyrhizobium japonicum con cultivares de soya Glycine max Merr. en la finca experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba y en la estación experimental "Los Diamantes", Guápiles, Costa Rica.

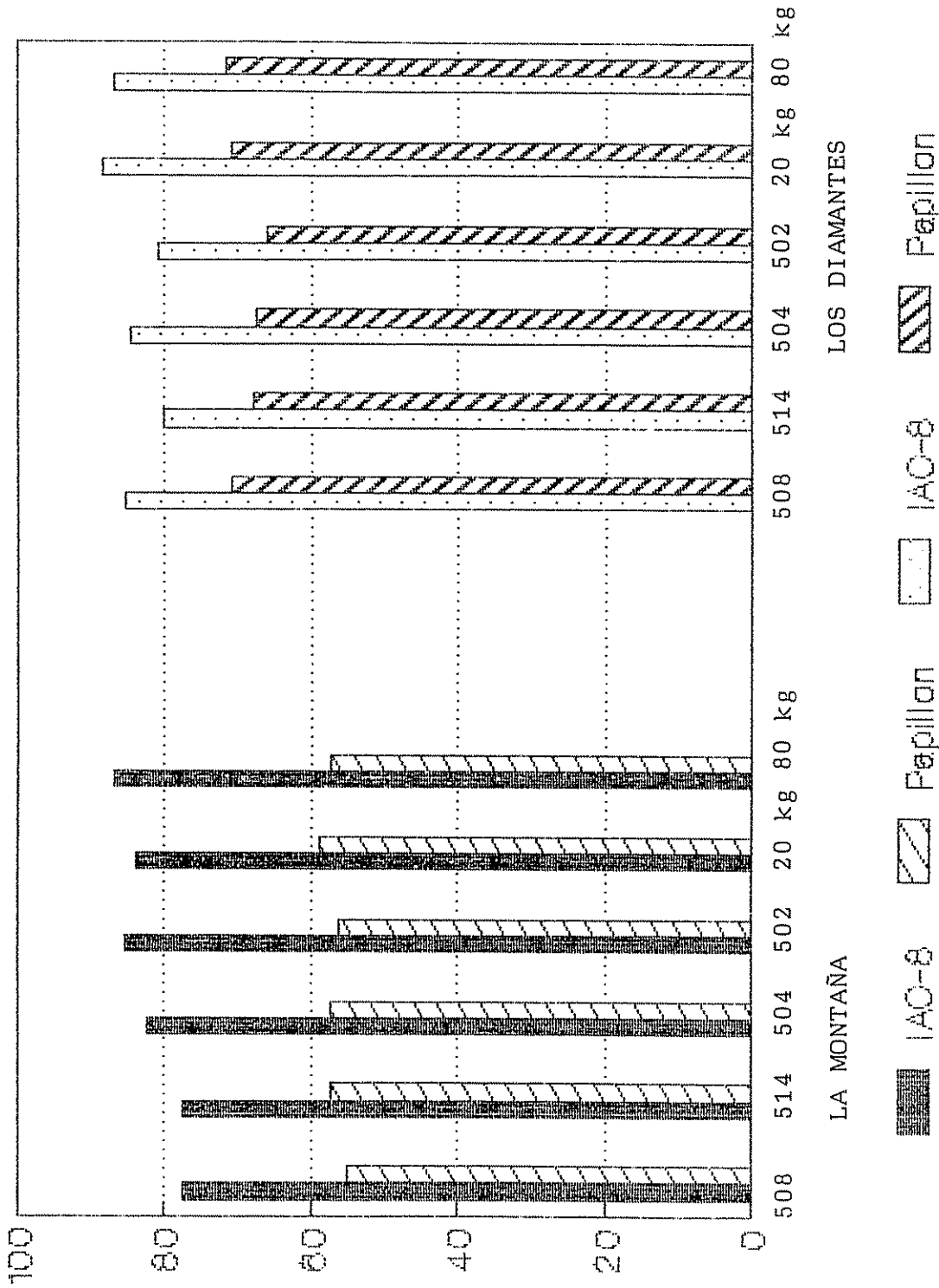
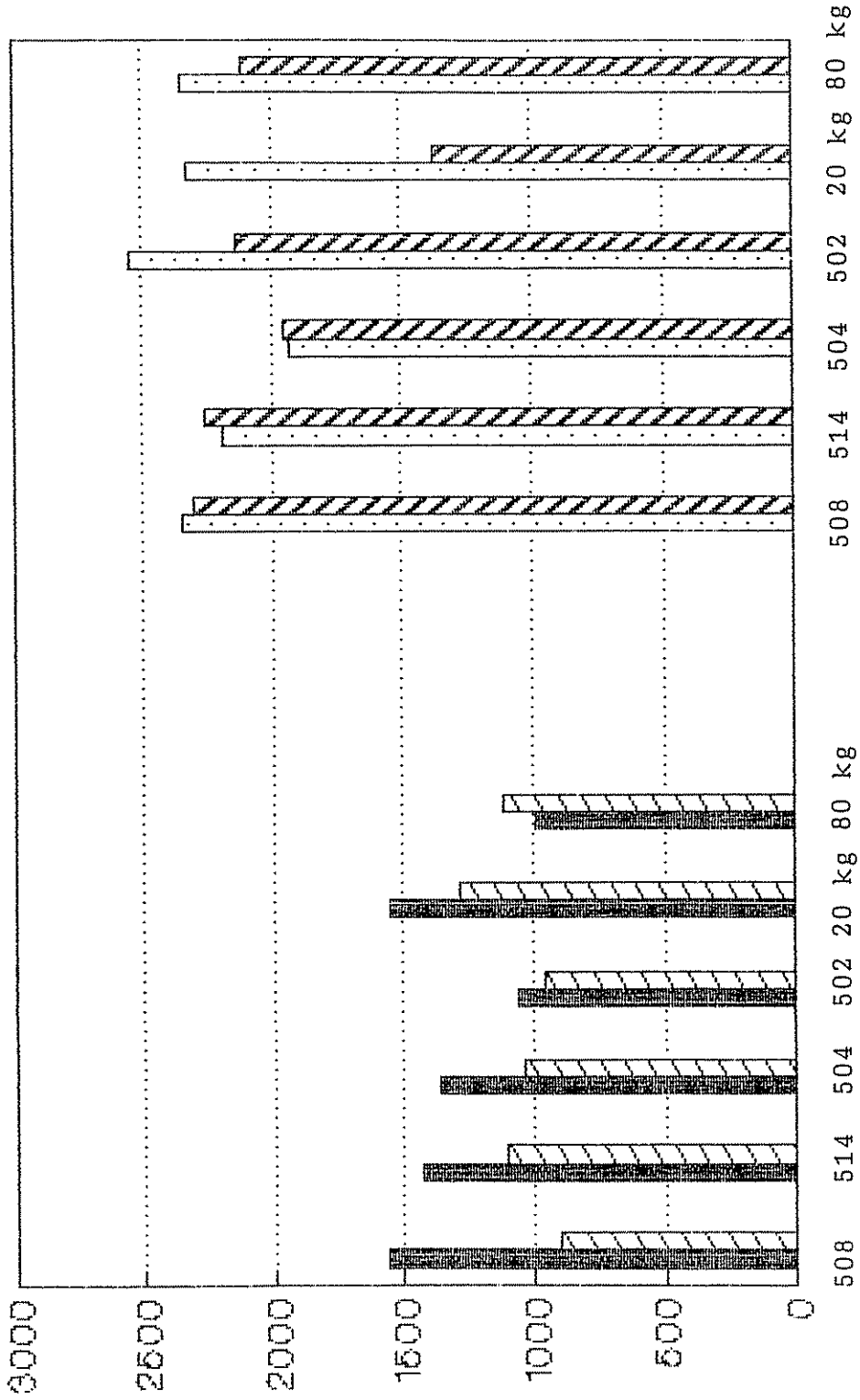


Figura 4. Respuesta de altura de planta (cm) a la interacción cepas de *Bradyrhizobium japonicum* con cultivares de soya *Glycine max* Merr. en la finca experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba y en la estación experimental "Los Diamantes", Guápiles, Costa Rica.



LOS DIAMANTES

LA MONTAÑA

Figura 5. Respuesta de producción de granos (kg/ha) a la interacción cepas de *Bradyrhizobium japonicum* con cultivares de soya *Glycine max* Merr. en la finca experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba y en la estación experimental "Los Diamantes", Guápiles, Costa Rica.

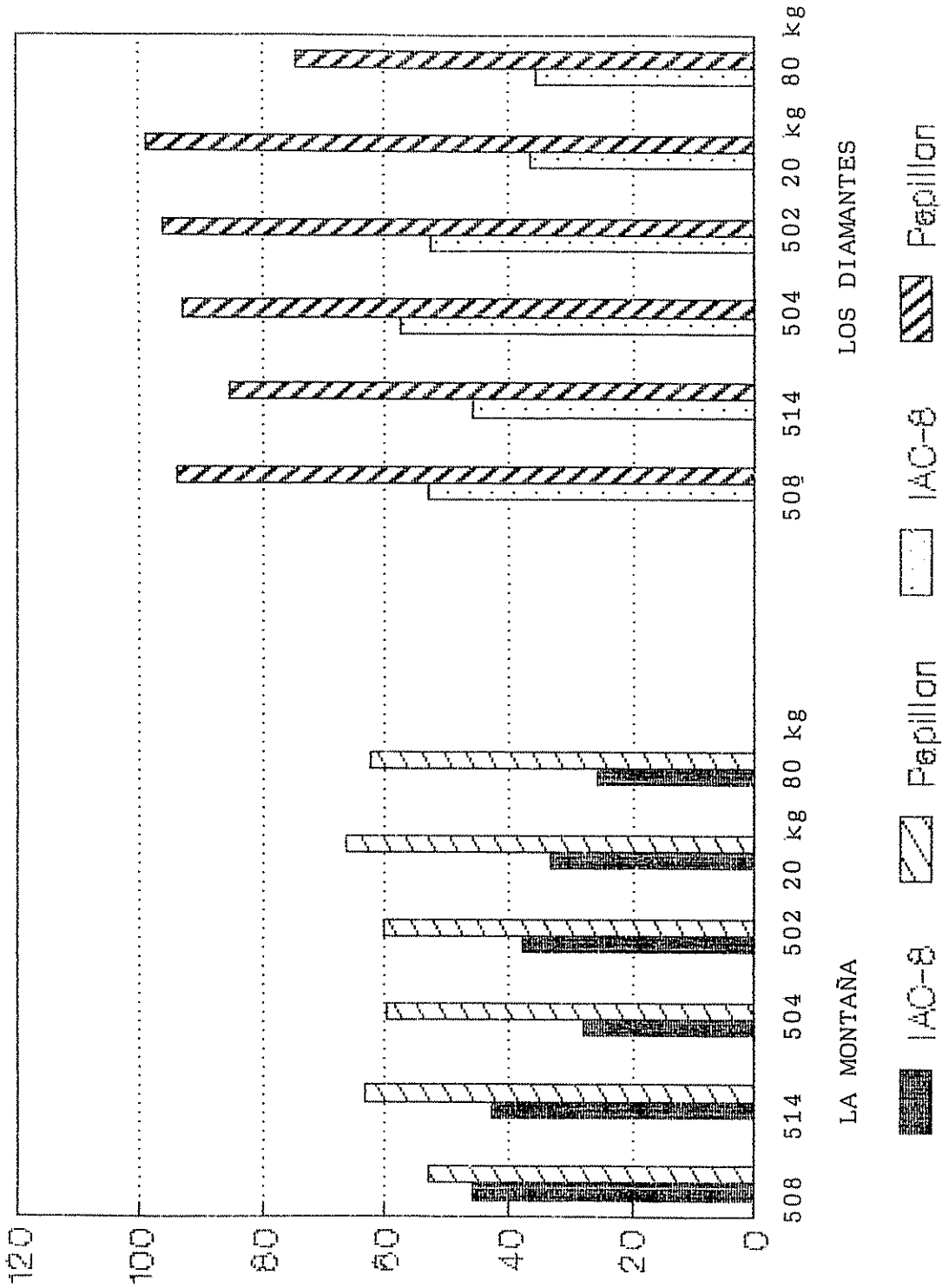


Figura 6. Respuesta de producción de vainas por planta a la interacción cepas de *Bradyrhizobium japonicum* con cultivares de soya *Glycine max* Merr. en la finca experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba y en la estación experimental "Los Diamantes", Guápiles, Costa Rica.

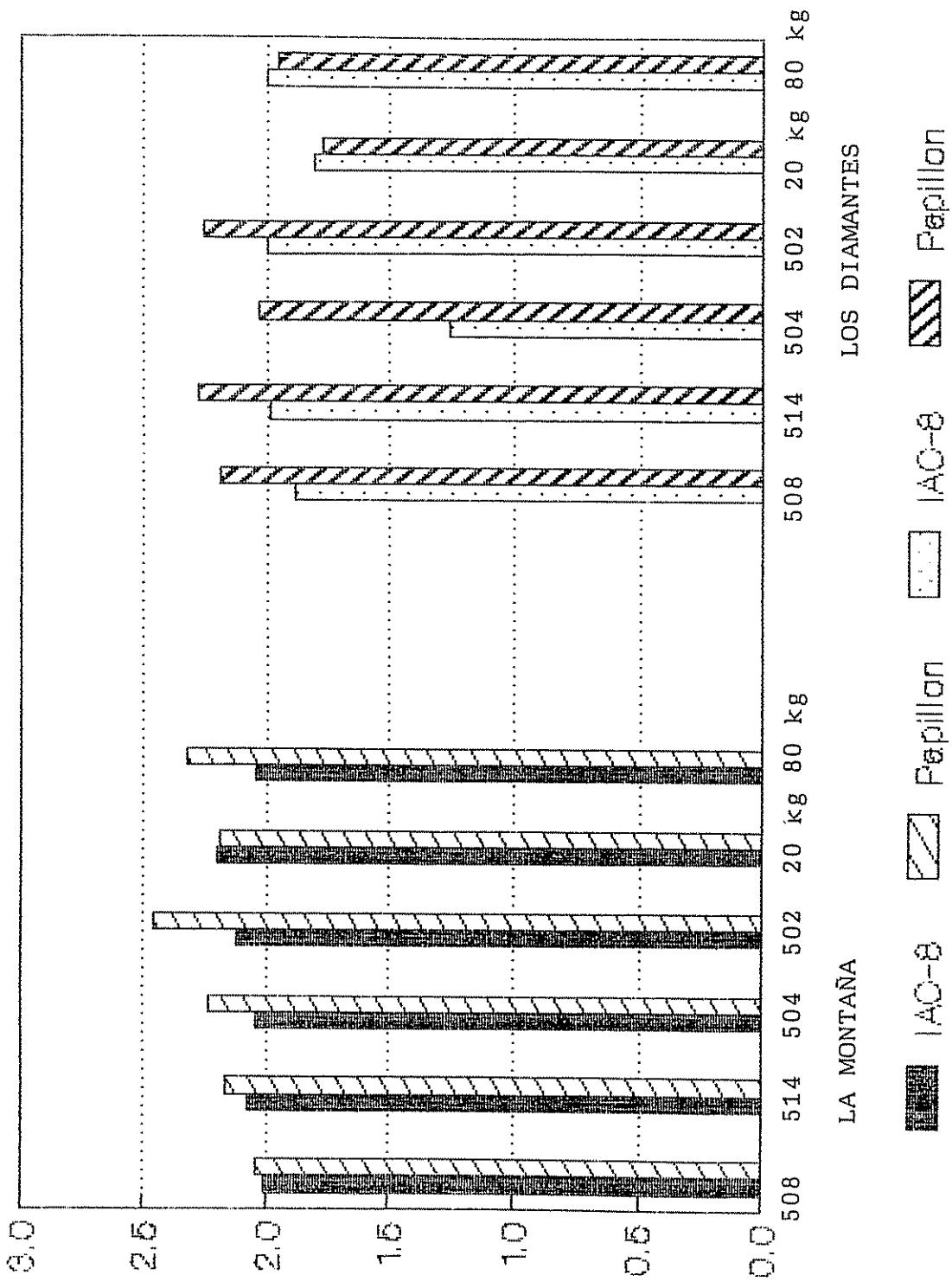


Figura 7. Respuesta de producción de granos por vaina a la interacción cepas de *Bradyrhizobium japonicum* con cultivares de soya *Glycine max* Merr. en la finca experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba y en la estación experimental "Los Diamantes", Guápiles, Costa Rica.

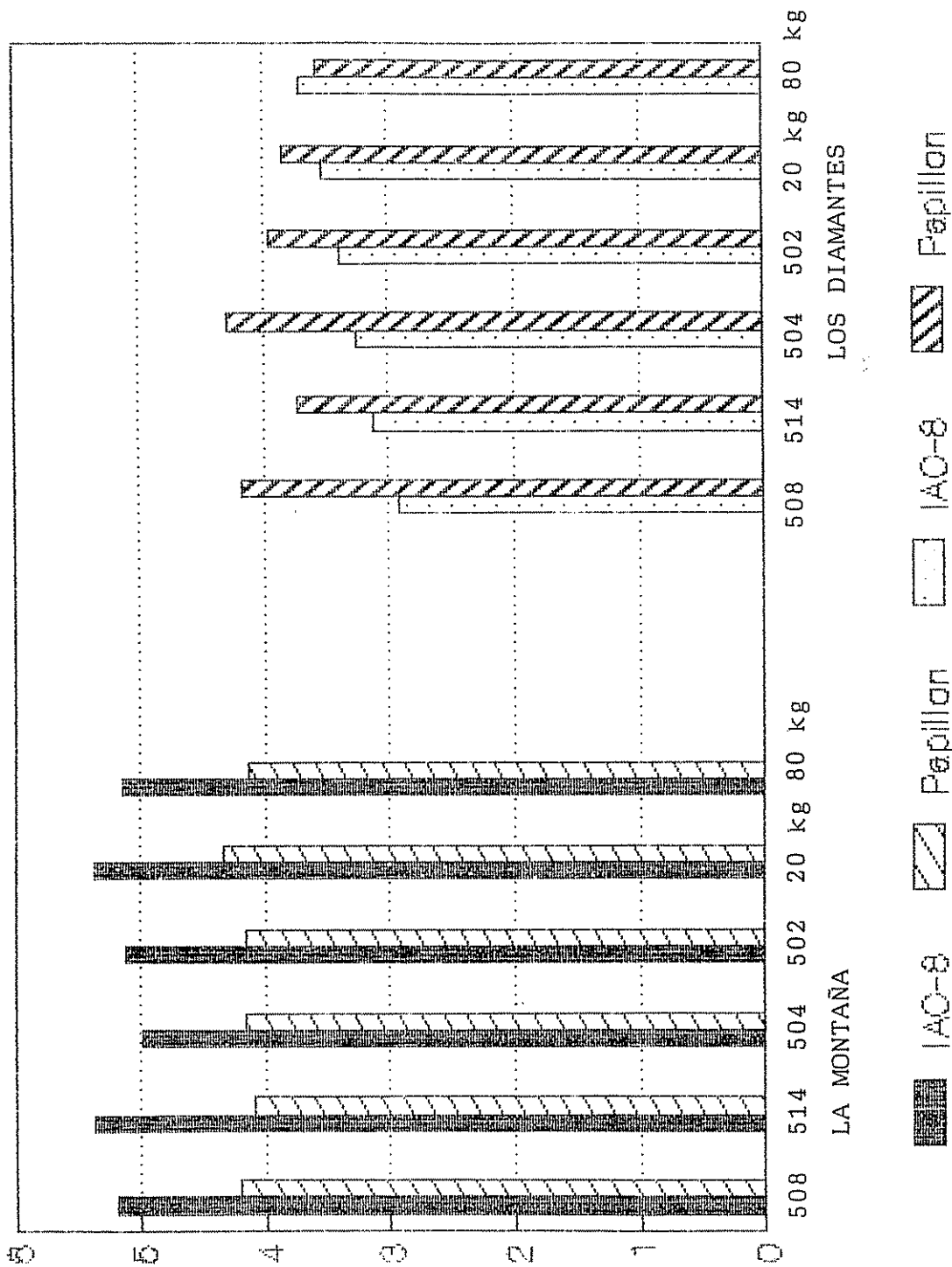


Figura 8. Respuesta de contenido de nitrógeno en forma de ureidos a la interacción cepas de *Bradyrhizobium japonicum* con cultivares de soya *Glycine max* Merr. en la finca experimental "La Montaña", CATIE, Turrialba y en la estación experimental "Los Diamantes", Guápiles, Costa Rica.

6. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos y en las condiciones en las que se desarrollaron los experimentos; se puede concluir que:

1. Hubo interrelación entre cepas y cultivares, en y entre zonas ecológicas y cultivares para las variables de nodulación, contenido de N, rendimiento y contenido de ureídos.

2. La inoculación de cultivares de soya con cepas compatibles dio rendimiento iguales al tratamiento fertilizado con 80 Kg de N/Ha.

3. Es más económico inocular con cepas compatibles y eficientes que efectuar aplicaciones de fertilización para lograr óptimos rendimientos en la producción de granos de soya.

4. El sitio que presentó mejor respuesta para nodulación, contenido de ureídos y rendimiento fue "Los Diamantes" en comparación a "La Montaña".

7. RECOMENDACIONES

1. Es necesario realizar ensayos de inoculación con el cultivo de soya con cepas compatibles y eficientes para justificar ecológicamente las asociaciones antes de iniciar el cultivo a gran escala.

2. En el cultivo de soya la inoculación con cepas eficientes es una práctica barata y efectiva para obtener producciones altas sin utilizar dosis elevadas de fertilizantes nitrogenados.

8. BIBLIOGRAFIA

- ACUÑA, O.; RAMIREZ, C.; MATA, E. 1987. La Respuesta de la soya (*Glycine max* Merr.) a la inoculación con diversas cepas de *Rhizobium japonicum* en Liberia, Guanacaste, Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 11(1):33-37.
- AGUIRRE V.A. 1971. Estudio de los suelos del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Tesis Mag. Sc. Turrialba, C.R., IICA, 139 p.
- ALEXANDER, M. 1980. Introducción a la microbiología de suelo. 2 ed. México, D. F., Libros y editoriales. 493 p.
- BROCKWELL, J.; GAULT, R.R.; ZORIN, M.; ROBERTS, M.J. 1982. Effects of environmental variables on the competition between inoculant strain and naturalized of *Rhizobium trifolii* and on rhizobia persistence in the soil. *Australian Journal of agricultural research* 33:805-815.
- CARE (Costa Rica). 1984. Primer curso de producción de soya. San José, Costa Rica. p. irr. (mimeografiado)
- CHAMBER PEREZ et al, 1981. Selección de razas de *Rhizobium japonicum* para la producción de inculantes para soya. *Anales de I.N.I.A.* (Inia agrícola) 16:57-69.
- CHAMBER PEREZ, M.A. 1982. Utilización de inoculantes simples y multicepas en la Soja (*Glycine max* (L) Merr.) de segunda cosecha. INIA, Andalucía (Esp) p 13-31.
- CHOWDHURY, M.S. 1968. 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 Hawai. Honolulu. pp. 385-411.
- CONVENTRY, D. R.; HIRT, J.R.; REEVES, T. G.; BURNETT, V.F. 1985. Growth and nitrogen fixation by subterranean clover in response to inoculation, Molybdenum application and soil amedment with Lime. *Soil Biology and Biochemistry* 17:791-796.
- CUBERO, J.; MORENO, M. 1983. Leguminosas de grano. Madrid, Ediciones Mundi-Prensa, 359 p.

- DIAZ-ROMEU, R.; HUNTER, A. 1978. Metodología de muestreo, análisis químico de suelo y tejido vegetal y de investigaciones en invernadero. CATIE. Serie materiales de enseñanza No 12. 61 p.
- DOWTON, W.J.S. 1975. The occurrence of C4 photosynthesis among plants. *Photosynthetica* (Checoslovaquia) 9(1): 96-105.
- DREVON, J.J. 1983. Evaluación de la actividad nitrogenásica de los nódulos de las leguminosas mediante la actividad reductora de acetileno. Manual técnico de la fijación del nitrógeno Leguminosa-*Rhizobium*. Roma, FAO. p. irr.
- DUGHRI, M. H.; BOTTOMLEY, P.J. 1983. Soil acidity and the composition of an indigenous population of *Rhizobium trifolii* found in nodules of different cultivars of *Trifolium subterraneum* L. *Soil Biology and Biochemistry* (G.B.) 16 (4):405-411.
- ESCUDEY, A.M. 1978. Estudios o comportamiento de diferentes inoculantes comerciais em tres cultivares de soja. In seminario Nacional de Pesquisa de Soja. (1, 1978, Brasil) ANAIS. Brasil, EMBRAPA. v. 1, p 257-268.
- FAO. 1977. Soybean production in the tropics. Hartwing E.E. ed. FAO, Roma 92 p.
- _____. 1985a. Inoculantes para leguminosas y su uso. Roma. 61 p.
- _____. 1985b. La fijación del nitrógeno en la explotación de los suelos. FAO. Boletín de Suelos N° 49.
- FEHR, W.; CAVINESS, C.E. 1971. Stages of soybean development. Ames Iowa, Iowa State University. 11 p (Special report n° 80).
- GIBSON, A.H. 1977. Factors in the physical and biological environment affecting nodulation and nitrogen fixation by legumes. In *Plant and soil special volume*. Ed. por: T.A. Lie y Mulder, E.G. (ed.) 139-152.
- _____, A; JORDAN, D.C. 1983. Ecophysiology of nitrogen-fixation system. In *Physiological plant ecology*. Ed. O.L. Lange; P.S. Nobel, C.B. Osmond, H. Ziegler. Berlín, Springer-Verlag. p. 301-390.

- GIDDENS, J.E.; DUNINGAN, E. P.; WEAVER, R.W. 1982. Legume inoculation in Southeastern USA. Georgia, Agricultural Experiment Station. Special publication December 1982, series Bulletin n° 283. 38 p.
- GRAHAM, P.H. 1982. Plant factors affecting symbiotic nitrogen fixation in legumes. In Biological nitrogen fixation technology for tropical agriculture. Ed. por P.H. Graham y S.C. Harris. Cali, CIAT. p. 27-37.
- HALVERSON, L.J.; STACY, G. 1985. Host recognition in the Rhizobium-Soybean Symbiosis. Plant Physiology (USA) 77:621-625.
- HALLIDAY, J. 1985. Biological nitrogen fixation in Tropical Agriculture In Nitrogen fixation research progress. Evans, H.; Bottomley, P.; and Nijhloff, Dordrecht pp 675-681.
- HAM, G.E.; CALDWELL, J.B. and JOHNSON, H.W. 1971. Evaluation of Rhizobium japonicum inoculantes in soils containing naturalized populations of rhizobia. Agronomy Journal (63)301-303.
- HAVELKA, U.D. and 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.
- HOLDRIDGE, L. 1982. Ecología basada en zonas de vida. San José, Costa Rica. IICA, 216 p.
- JORDAN, D.C. 1984. Family III. Rhizobiaceae. In Bergeys Manual of systematic bacteriology Vol. I. Ed. N.R. Krieg and J.G. Holt. Baltimore, Williams and Wilkins.
- KING, A.B.S.; SAUNDERS, J.L. 1984. Las Plagas invertrabradas de los cultivos anuales alimenticios en Centro América. ODA, Londres (Ing), 182 p.
- KLAUSON, R.A.; KENWORTHY, W.M. 1986. Soil temperature effects on competitivenses and growth of Rhizobium japonicum an on Rhizobium-induced chlorosis of soybeans. Plant and Soil (Hol.) 95:201-207.
- MARTINEZ, V.R. 1986. El ciclo biológico del nitrógeno el Suelo. La Habana, Editorial Científico-Técnico 167p.

- MILLAK, M.A.B.; TESFAI, K. 1987. Simulation of *Bradyrhizobium japonicum* by allelochemicals from green plants. *Plant Soil (Hol.)*, 103(2): 227-231.
- MONGE, V. 1987. Cultivos básicos. San José, C. R. Universidad Estatal a Distancia. 298 p.
- MONTERO, R. 1985. Programa de leguminosas (soya-maní-gandul-rabiza). Liberia Universidad de Costa Rica, Centro Regional Universitario de Guanacaste, Escuela de Fitotecnia. 82 p.
- _____; MATA, E. 1988. La soya. Guía para cultivo y consumo en Costa Rica. San José, Costa Rica, Editorial Universidad de Costa Rica. 112 p.
- MULLER, L. 1961. Un aparato micro kjeldahl simple para análisis rutinarios rápidos de materia vegetal. *Turrialba (C.R.)*, 2(1):17-25.
- MUNEVAR, D.N. y FRANCO, A.A. 1982. Soil constraints to legume nodulation In *BNF Technology for Tropical Agriculture*. Ed. P.H. Graham and S.C. Havis. CIAT, Cali p. 133-152.
- MUNEVAR, F.; WOLLUM, A.G. 1962. Response of soybean plant to high root temperatue as affected by plant cultivar and Rhizobium strain. *Agronomy Journal (EE.UU)*. 74:173-182.
- OBATON, M. 1983. Informe general sobre la simbiosis fijadora de nitrógeno *Rhizobium*/leguminosa. In *Manual técnico de la fijación simbiótica de nitrógeno, Leguminosa/Rhizobium*. Roma, FAO. p. irr.
- OLIVARES, J.; MONTOYA, E.; PALOMARES, A. 1977. Some effects derive from the presence of extracromosomal DNA in Rhizobium meliloti. In: *Recent developments in nitrogen fixation*. W.E. Newton J.R. Postgate, C. Rodríguez-Barruecos (eds). London. pp. 375-385. Academic Press.
- POSTGATE, J.R. 1982. *The fundaments of nitrogen fixation* Cambridge University Press. Cambridge. 252 p.
- QUISPEL, A. (Ed.) 1974. *The Biology of Nitrogen Fixation*. Amsterdam, North Holland Publishing Company. 769 p.

- RAGHAVENDRA, A.S.; DAS, V.S.R. 1978. The occurrence of C₄-photosynthesis: A supplementary list of C₄ plant reported during late 1974-mid 1977. *Photosynthetica*. (Chocoeslovaquia) 12(2): 200-208.
- RAMIREZ, C. 1983. La posible contribución de la fijación biológica del Nitrógeno a los cultivos. In: El reciclaje de materias orgánicas en la agricultura de América Latina. Ed. por P.L. Aarens. Roma, FAO, Boletín de Suelos No. 51. p. 56-60.
- RAYO, H. 1977. Efecto de la inoculación con Rhizobium japonicum y de la fertilización nitrogenada con soya Glycine max (L) Merr. en tres localidades de Nicaragua. Tesis Ing. Agr. Nicaragua, Instituto Nicaraguense de Tecnología Agropecuaria. 54 p.
- ROVIRA, A.D. 1961. Rhizobium numbers in the Rhizosphere of red clover and Paspalum in relation to soil treatment and number of bacteria and fungi. *Australian Journal Agricultural Research* (Australia). 12:77-83.
- SCHWITZER, L.E.; HARPER, J.E. 1980. Effect of Light, dark, and temperature on root nodule activity (Acetylene Reduction) of Soybeans. *Plant Physiology*, (USA), 61:51-56.
- SCOTT, M. y ALDRICH, S. 1975. Producción moderna de Soya. Buenos Aires, Argentina, Editorial Hemisferio Sur. 192 p.
- SPRENT, J.I. 1971. The effects of water stress on nitrogen-fixation root nodules. Effects on the physiology of detached soybean nodules. *New Phytologist* (G.B.) 70:9-17.
- TANGO, J.S.; MASCARANHAS, I.B.; FIGUEREIDO, SIROSE, I. 1974. Influencia de anos agrícolas sobre os teores de matéria graxa e proteína no grão de soja e de ácidos graxos no óleo. *Colectanea de ITAL* 5:345-355.
- TEIXEIRA, J.P.; MASCARENHAS, H.A.; BATAGLIA, O.C. 1978. Efeitos de cultivares, tipos de solo e práticas culturais sobre a campos: Cao (Glycine max (L) Merr.) I Seminario Nacional de Pesquisa de Soja, EMBRAPA, BRASIL. p. 11-16.
- TRINICK, M.J.; PARKER, C.A. 1982. Self inhibition of rhizobial strains and the influence of cultural conditions *Soil Biology and Biochemistry*. (G.B.) 14:79-86.

- VARELA, G.R.; MUNEVAR, M., F. 1978. Comportamiento de cepas de Rhizobium japonicum asociadas con variedades de soya (Glycine max (L) Merr.) seleccionadas para el departamento de Tolima. ICA, Bogotá (Col), 13(2):249-255.
- VINCENT, J.M. Envirometal factors in the fixation of nitrogen by the legumes. In Bartholomew, W.V. y Clark, F.I. Soil nitrogen. Madison, American Society of Agronomy, 1965. pp. 404-408.
- VINCENT, J.M. 1975. Manual práctico de rhizobiología. Hemisferio sur, Buenos Aires (Arg), 200 p.
- VERMA, D.P.S. et al. 1988. Metabolites and protein factors controlling nodulin gene expressid. In Nitrogen fixation: Hundred years after. Ed. por M.A. Bothe, F.J. Bruijn, and W.E. Newton. Gustav Fisher. Stuttgart, p 599-604
- VOGELS, G.D.; Van der DRIFT. 1970. Differential Analysis glyoxylate derivatives. Analytical Biochemistry, 33:143-157.
- WEBER, D.F., CALDWELL, B.E., SLOGER, C. and VEST, H.G. 1971. Some USDA studies on the soybean-Rhizobium symbiosis. In Plant and Soil Special volume. Lie, T.A. and Mulder, E.G. (ed) p 139-152.
- WERNER, D. et al. 1988. Nodule protein and comportaments. In Bofhe, M. De Bruijn F. J. and Newton, W. E. (eds). Nitrogen fixation: Hundred years after. Gustav Fisher Stuttgart. pp 599-604.
- WOOD, M.; COOPER, J.E. 1988. Acidity, aluminum and multiplication of Rhizobium trifolii: Possible mechanisms of aluminum toxyty. Soil Biology and Biochemistry. (G.B.) 20(1): 95-99.
- WORRAL, V.; ROUGHLEY, R.J. 1976. The effect of moisture stress on infection of Trifolium subterraneum L. by Rhizobium trifolii. Journal of Experimental Botany. (G.B.) 27: 1233-1241.