

## **Efecto de la inoculación con cepas nativas e introducidas de *Rhizobium* sobre la fijación de nitrógeno en leucaena (*Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit).**

Inoculation effect of native and introduced *Rhizobium* stumps on the nitrogen fixation in the leucaena (*Leucaena leucocephala* (Lam) of Wit).

J. J. Rincón <sup>1</sup>, T. Clavero <sup>2</sup>, R. Razz <sup>2</sup>, S. Pietrosemoli <sup>2</sup>,  
F. Mendez-Castro <sup>3</sup>, N. Noguera <sup>4</sup>

### **Resumen**

Con el objetivo de evaluar el efecto de la inoculación de cepas de *Rhizobium* nativas e introducidas sobre la fijación de nitrógeno en *Leucaena leucocephala*, se procedió a aislar dos cepas nativas de dos plantaciones de *Leucaena leucocephala* (Lam) Wit. ubicadas en el Municipio San Francisco del Estado Zulia, con coordenadas 10°33' latitud Norte, 71°39' longitud Oeste. Se evaluaron 5 tratamientos de inoculación, un control sin inoculación, dos cepas nativas aislada del mismo suelos empleado en el ensayo y las cepas introducidas C.CUB.; CC1 y CC2. El diseño utilizado fue un completamente al azar, con 12 repeticiones por tratamiento, se realizaron 3 muestreos cada 30 días, cosechando 4 plantas por tratamiento. Se midió el nitrógeno en la materia seca aérea (NitA), nitrógeno en la materia seca radicular (NitR), nitrógeno en la materia seca total (NitT), y el número de nódulos promedio por tratamiento (NNOD). En cuanto al NNOD no se encontraron diferencias para los muestreos (M1) y (M2) pero sí para el muestreo 3 (M3) ( $P < 0,001$ ) con valores respectivos de 8,14, 10,37 y 5,35 NNOD/pta. Los tratamientos CNT1 y CCUB. presentaron el mayor número de nódulos con 10, 30 y 12, 10 NNOD/pta, respectivamente ( $P < 0,05$ ), las cepas nativas fueron capaces de producir nodulación, mostrando diferencias en sus habilidades al nodular la *Leucaena leucocephala*. Las plantas inoculadas presentaron valores NitA

Recibido el 14-9-2000 ● Aceptado el 14-12-2000

1. Departamento de Producción Animal – Agonomía- Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado”, Barquisimeto - Lara E-Mail: jjringo@hotmail.com

2. Centro de Transferencia de Tecnología en Pastos y Forrajes. La Universidad del Zulia. Maracaibo – Zulia.

3. Departamento de Agrobiológicos – Agonomía- Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado”, Barquisimeto – Lara.

4. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias (FONAIAP) – Región Zuliana, Maracaibo – Zulia.

de 1,90, 2,08 y 3,96 mg N/pta. para los muestreos M1, M2 y M3, respectivamente ( $P < 0,01$ ), siendo M2 estadísticamente superior a M1 y M2. Para el NitR se encontró que se incrementó en la medida que la planta crecía siendo sus valores de 0,55, 1,32 y 2,51 mg N/pta. respectivamente para M1, M2 y M3 ( $P < 0,01$ ). Destaca CNT2 la cual presentó el mejor promedio de NitR para M1 y M2 ( $P < 0,01$ ).

**Palabras clave:** *Leucaena*, *Rhizobium*, inoculación, cepas nativas, fijación de nitrógeno

## Abstract

The study was with the objective to study the effect of the inoculation of stumps of introduced *Rhizobium* and isolated native stumps of two plantations of *Leucaena leucocephala* (Lam) Wit. The experiment was located in the country San Francisco of Zulia state located at 10°33 ' North, 71°39 ' NW, 5 inoculation treatments were mounted with the introduced stumps C.CUB.; CC1 and CC2, and with the native isolated CNT1 and CNT2 plus a control without inoculation. A complete random design was used with 12 replications by treatments; they were evaluated through 90 days harvesting 4 plants every 30 days, for a total of 3 samplings. The production of nitrogen in the MSA (NitA), nitrogen in the MSR (NitR), total nitrogen (NitT) and the number of nodules average for treatment (NNOD), were evaluated. There not differences for the samplings 1 (M1) and 2 (M2) but for the sampling 3 (M3) ( $P < 0.01$ ). The inoculated plants showed increment in NitA starting from M2 ( $P < 0.05$ ). For the NitR their stands out CNT2 which presented the best average for M1 and M2 ( $P < 0.01$ ).

**Key words:** *Leucaena*, *Rhizobium*, inoculation, native stumps, nitrogen fixation

## Introducción

Se denomina fijación de nitrógeno al proceso por el cual diversos organismos procariotes, bien en forma libre, o formando asociaciones simbióticas, reducen el nitrógeno molecular ( $N_2$ ) a Amonio (15). Bajo condiciones limitadas de nitrógeno en el suelo, las bacterias pertenecientes a los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium* (colectivamente denominadas rizobios), son capaces de establecer conjuntamente con el hospedero: las leguminosas, estructuras especializadas denominadas nódulos, en

los que se lleva a cabo el proceso de fijación del nitrógeno elemental.

La *Leucaena* es un género de árboles tropicales que pueden establecer una relación simbiótica con rizobios (13, 14); las investigaciones en la etapa de vivero, especialmente los mecanismos de la nodulación, se hacen necesarias para conocer los factores que limitan su crecimiento inicial y lograr con ello un uso más extensivo de dicha especie. Se ha observado en estudios de nodulación en *L. leucocephala* que solo nodula con cepas

aisladas de ella misma (20). Esta planta presenta alta especificidad en sus requerimientos de rizobios, ya que no todas las cepas que la nodulan pueden producir una eficiente fijación del nitrógeno atmosférico (31,38), y esto es un factor limitante para su establecimiento. Una posible explicación a ésta situación ha sido atribuida en parte a la especificidad del *Rhizobium* y a la presencia de compuestos fenólicos en extractos de raíces de *Leucaena*. Se plantea la especificidad del *Rhizobium loti* para la *Leucaena* (20), también se señala a *Rhizobium tropici* (42).

Se ha encontrado que la *L. leucocephala* presenta una pobre nodulación natural mostrando diferencias significativas en el contenido de nitrógeno entre los tratamientos con nitrógeno y sin nitrógeno, concluyendo que las cepas de *Rhizobium* existentes de forma natural en el suelo no presentan una acción efectiva en el proceso simbiótico leguminosa- rizobio (39). Iguales resultados se obtuvieron (40), cuando estudiaron la nodulación con cepas nativas en leguminosas tropicales, entre ellas la leucaena, la cual no noduló o presentó pobre nodulación, dicho resultado se lo atribuyeron a una posible especificidad de *Rhizobium loti* y al retardo inicial en el desarrollo y crecimiento de la leucaena, lo cual según ellos pudo afectar la formación de nódulos. También se ha reportado (29), una diferencia entre los ecotipos de *Leucaena* CIAT 7984 y CIAT 1723 en cuanto al número y tamaño de los nódulos. Se observa que el grado de asociación está dado en función de la

cepa o raza de *Rhizobium* y el genotipo de la leguminosa y que existe un efecto tanto del genotipo de la leguminosa como de las condiciones de fertilidad del suelo para maximizar la eficiencia de las cepas de rizobios en la fijación del nitrógeno atmosférico (10).

Las cepas nativas de *Rhizobium* pueden ser aisladas usando la planta huésped como un agente de selección, ya que bajo condiciones adecuadas para el crecimiento de la planta, los rizobios nativos formarán nódulos en las raíces de la planta (19, 37). No parece ser posible predecir la efectividad de un sistema simbiótico leguminosa - *Rhizobium* con base a la taxonomía del hospedero, o al hábitat de la cepa que ha sido aislada, si se tiene la necesidad de seleccionar cepas en ciertas combinaciones de leguminosa - suelo, es preciso obtener un rango de cepas "probablemente" efectivas y luego llevar a cabo una prueba de selección.

El proceso de fijación de nitrógeno entre las leguminosas y los rizobios no da como resultado una fijación indiscriminada del mismo, sin embargo parte de este puede resultar en exceso siendo excretado o transferido al exterior de las raíces de la leguminosa (5), en tal sentido se ha demostrado que las leguminosas tropicales y subtropicales en una buena simbiosis con rizobios son capaces de fijar de 40 - 210 kg N/Ha/año (13,39) y una plantación de *L. leucocephala* en excelentes condiciones hasta 500 kg N/ha/año (24) el cual puede ser aprovechado por otras plantas que crecen alrededor de éstas. El objetivo del presente trabajo es conocer el efecto de la inoculación de cepas nativas e

introducidas sobre el contenido de nitrógeno en plantas de *leucaena* en los primeros 90 días de crecimiento

durante la etapa de vivero utilizando un suelo con bajo contenido de fósforo y nitrógeno.

## Materiales y métodos

El ensayo se realizó bajo condiciones controladas, en un cobertizo con techo de vidrio que permitía pasar la luz y evitaba el agua de lluvia. El suelo empleado en ésta investigación se obtuvo en el municipio San Francisco, del Estado Zulia, climatológicamente ubicado en una zona con precipitación media anual de 450 mm y una temperatura promedio de 28 °C, la evaporación media anual llega a valores de 2100 mm., bajo condición de bosque muy seco tropical (12, 28).

El suelo está caracterizado por presentar en la parte superior, areniscas friables de color pardo amarillento y de textura media gruesa, con algunas capas de limolitas pardo grisáceas y arcillas de color pardo que pueden ser duras y ferruginosas. Se clasifican taxonómicamente estos suelos como Typic Haplargid, familia francosa fina (21), presenta un horizonte argílico. Del análisis de suelo se obtuvo que las características físicas y químicas son las siguientes: 81,25 % de arena; 14,85 % de limo; 3,90 % de arcilla; clase textural AF, 13 % saturación de humedad; 2,50 – 1,80 C.I.C. (Meq/100g); 6,7 pH (1:2); 0,16 salinidad (ds/m); 0,7 % materia orgánica; 20 ppm fósforo; 91 ppm potasio; 1039 ppm calcio; 70 ppm magnesio. El suelo, en su perfil se presenta como un suelo de baja fertilidad natural al compararlo con los

valores estimados para suelos de textura gruesa. Los valores medios de fósforo y calcio se pueden deber a efectos de fertilizaciones, ya que en reportes de análisis anteriores (28) presentan valores muy bajos.

### **Cepas de *Rhizobium* utilizadas en el ensayo.**

**Cepas Nativas.** Se aislaron de dos muestras de suelos tomadas en dos parcelas establecidas de *leucaena*, de las cuales una se maneja en condiciones de secano y la otra está bajo riego durante el periodo seco. En ambas parcelas se hizo un muestreo al azar de suelo cercano a las raíces de 5 plantas con la finalidad de asegurar la presencia de *Rhizobium*, mediante la técnica para muestro de raíces propuesta por Shuurman y Goedewaagen (33). De la primera se aisló la cepa (CNT1) y de la segunda la cepa (CNT2). Las cepas nativas de *Rhizobium* fueron aisladas usando la planta huésped como un agente de selección. Para la selección de los nódulos y su posterior proceso de esterilización, se siguió la técnica de Weaver y Gaham (43); los nódulos obtenidos en esta primera etapa se seleccionaron por sus tamaños grandes, de buen aspecto y color rosado, buscando la mayor diferencia posible entre los nódulos.

**Cepa Cubana.** Identificada como (C.CUB), donada por la Estación Experimental "Indio Hatuey" de Cuba

y probada con éxito en la nodulación de la leucaena en suelos ácidos. Esta cepa se utilizó como testigo representativo de aquellas cepas de *Rhizobium* que han sido introducidas al país como promisorias para ser utilizadas en la inoculación de leucaena. Esta muestra inicial se sembró mediante rallado de la superficie de 10 cápsulas de Petri que contenían medio de cultivo Agar Rojo Congo. Las cápsulas fueron incubadas a 30 °C, por un período de 7 días. De éstas 10 cápsulas de Petri se seleccionaron, para seguir la purificación, aquellas 3 que presentaron las características más homogéneas descritas para las colonias de *Rhizobium* (43).

**Cepa ULA.** Se obtuvieron dos cepas provenientes de dos inoculos. La cepa fue adquirida como específica para la leucaena (*Rhizobium loti*), preparado por el Laboratorio de Botánica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de los Andes. Se tomó 1 g de cada inoculo comercial y se diluyeron por separado en 10 ml de agua esterilizada y así sucesivamente hasta realizar una dilución de  $10^{-4}$ , esto fue necesario debido a que en un primer intento de aislamiento se observó contaminación de diversos hongos y bacterias, lo cual dificultaba el aislamiento de las cepas de *Rhizobium* por contaminación del inoculo. De la cuarta dilución realizada se tomó una muestra con el asa de platino y se llevó a la siembra en cápsulas de Petri mediante rallado de la superficie de la cápsula, incubando por un período de 7 días a 30 °C, seleccionando las posibles colonias y siguiendo un

proceso de aislamiento y purificación (22)

**Tratamientos evaluados y diseño experimental.** El diseño experimental consistió en un completamente al azar con un total de 6 tratamientos con 12 repeticiones cada uno, siendo los tratamientos: 1) cepa comercial aislada por la ULA = (CC1); 2) cepa comercial aislada por la ULA = (CC2); 3) cepa nativa aislada de la parcela 1 (sin riego) = (CNT1); 4) cepa nativa, aislada de la parcela 2 (bajo riego) = (CNT2); 5) cepa (C CUB.); 6) siembra de semillas esterilizadas sin inoculación como Testigo. Se realizaron 3 muestreos, a los 30, 60 y 90 días después de la siembra, en cada muestreo se cosecharon 4 repeticiones por tratamiento.

#### **VARIABLES MEDIDAS.**

**Número de nódulos promedio por planta.** Se procedió a contar manualmente el número total de nódulos (NNOD), por tratamiento y se expresó en número de nódulos promedios por planta.

**Contenido de nitrógeno.** El contenido de nitrógeno, se midió utilizando el método micro-Kjeldhal y se expresó en mg N/g de materia seca por planta para la materia seca aérea (MSA), materia radicular (MSR) y materia seca total (MST). Se determinó el Índice de Eficiencia de la Inoculación (IEI), según la metodología de Sylvester *et al* (35).

**Análisis Estadístico.** Se realizaron a través del procedimiento de Proc GLM del Sistema de Análisis Estadístico computarizado (32), para las pruebas de análisis de la varianza, y para las pruebas de medias se realizó

el procedimiento LSMEANS y Correlación con el procedimiento

PROC CORR del mismo paquete estadístico.

## Resultados y discusión

### Número de Nódulos (NNOD).

En el cuadro 1 se muestran los resultados obtenidos en cuanto al número de nódulos para los distintos tratamientos en los tres muestreos realizados.

Este indicador fue afectado significativamente por los diferentes tratamientos de inoculación ( $P < 0,01$ ). En el primer muestreo no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de inoculación, pero si entre estos y el control. El tratamiento más favorable fue CNT2 con un promedio de  $13,66 \pm 4,93$  nódulos/planta. Para el segundo muestreo, el promedio más favorable lo obtuvo el tratamiento C.CUB. con promedio de  $18,25 \pm 8,14$  nódulos/planta, y no presentó diferencias

significativas con los tratamientos CNT1, CNT2 y CC1, los que superaron al tratamiento CC2, cuyo promedio fue superior al control. Para el tercer muestreo, el mejor promedio fue del tratamiento C.CUB. con  $8,00 \pm 2,00$  nódulos/planta, seguido por los tratamientos CNT2 y CC2, los cuales no presentaron diferencias significativas entre si, siendo sus promedios superiores al alcanzado por los tratamientos CNT1 y CC1, los cuales superaron al tratamiento control.

Al analizar el número de nódulos promedio por planta y muestreo, se encontraron diferencias altamente significativas ( $P < 0,001$ ). El primer y segundo no presentaron diferencias significativas entre sí ( $8,14$  y  $10,37$

**Cuadro 1. Números de nódulos promedio (NNOD/pta.).**

Tratamientos	Muestreo 01	Muestreo 02	Muestreo 03	Promedio por tratamiento
Control	$0,00 \pm 0,00^b$	$0,00 \pm 0,00^c$	$0,00 \pm 0,00^c$	$0,00^c$
CNT1	$6,75 \pm 2,87^a$	$12,75 \pm 0,96^a$	$3,67 \pm 0,58^b$	$10,30^a$
CNT2	$13,66 \pm 4,93^a$	$16,25 \pm 10,53^a$	$5,67 \pm 1,53^{ab}$	$9,91^b$
CC1	$10,25 \pm 8,18^a$	$10,50 \pm 2,08^a$	$5,25 \pm 0,50^b$	$8,67^b$
CC2	$9,50 \pm 4,93^a$	$4,50 \pm 2,89^b$	$6,00 \pm 2,00^{ab}$	$5,73^b$
C.CUB	$8,00 \pm 4,36^a$	$18,25 \pm 8,14^a$	$8,00 \pm 2,00^a$	$12,10^a$
Promedio por muestreo	$8,14^a$	$10,37^a$	$5,35^b$	

Medias con igual letra en la misma columna no presentan diferencias significativas ( $P < 0,01$ )

nod/pta. respectivamente), pero fueron mayores al promedio alcanzado en el tercer muestreo (5,33 nod/pta.). En el primer muestreo se pudo observar que todas las plantas presentaban sus cotiledones, lo cual pudo afectar la respuesta de la planta en la nodulación con las distintas cepas de *Rhizobium* inoculadas. Durante el tercer muestreo se presentó un ataque de un insecto defoliador (Acrididae§) en la parte aérea de las plantas, con el nicho en las raíces, el cual solo pudo ser detectado al momento del muestreo de las mismas, esto pudo causar una disminución del número de nódulos. Los resultados obtenidos en los tres muestreos muestran diferencias ( $P < 0,05$ ) entre los tratamientos, los tratamientos C.CUB y CNT1 no presentaron diferencias significativas al alcanzar 12,10 y 10,30 nod/pta, respectivamente, sus promedios superaron a los tratamientos CNT2, CC2 y CC1 con promedios de 9,91; 8,56 y 5,73 nod/pta, respectivamente, superiores al control que no presentó nódulos durante los 90 días de ensayo. El número de nódulos alcanzados por los distintos tratamientos en los muestreos realizados demuestra la infectividad de las cepas inoculadas en las plantas de leucaena. Las cepas CNT1 y CNT2 demostraron tener diferencias en la habilidad para nodular la leucaena a pesar de haber sido aisladas de suelos próximos, esto demuestra lo planteado por algunos investigadores (1,22,35), que señalaron que en la mayoría de los suelos se

pueden encontrar poblaciones de rizobios indígenas, los cuales serán diferentes en su habilidad para infectar la leucaena de acuerdo a las condiciones químicas y físicas de suelo, así como debido al proceso lento de la selección natural a que están sometidas bajo condiciones de estrés y a las excreciones de sustancias realizadas por las raíces como flavonoides y glicoproteínas que atraen o seleccionan las diferentes cepas de *Rhizobium* que habitan la rizosfera de éstas plantas. La selección de cepas, realizada con base en las condiciones de manejo, permitió obtener dos cepas diferentes en su habilidad para infectar la especie hospedera, ratificando lo señalado anteriormente. La cepa CNT1 presentó promedios de nódulos similares con la cepa C.CUB., la cual se recomendó como infectiva para la nodulación de la leucaena, la CNT2, a pesar de no haber alcanzado el promedio de la cepa C.CUB., superó a las cepas CC1 y CC2, lo cual evidencia que es posible el aislamiento de cepas nativas de aquellos suelos donde se piensa establecer leucaena y reinocularla sobre ésta para garantizar una infectividad en el tiempo, sin necesidad de alterar las condiciones químicas del suelo para la inoculación de cepas aisladas de otros sitios.

Los promedios de nódulos por planta observados cuyos valores medios no superaron los 18,25 en las condiciones del ensayo, fueron bajos en todos los tratamientos. Esto pudiera ser atribuido a varios factores, entre ellos

§ *Acrididae*: insecto ortóptera saltamontes de antenas cortas, fitófago voraz, de hábitos nocturnos, coloca huevos en galerías en el suelo y eclosionan cuando la humedad y la temperatura son favorables.

al pobre desarrollo mostrado por la leucaena durante los 90 días de ensayo, donde se alcanzó presentaron una altura máxima de 23,88 cm (cuadro 2); esto concuerda con lo señalado por Veasey *et al* (40), quienes expresaron que la baja nodulación natural observada en leucaena en la etapa de establecimiento, pudiera ser consecuencia del retardo inicial en el desarrollo, ya que el proceso simbiótico está estrechamente relacionado con la magnitud total de crecimiento alcanzado por la planta huésped, lo cual puede ser consecuencia de la producción de fotosíntatos (5).

Existen varios factores que pueden afectar el proceso de fijación del nitrógeno atmosférico, señalando entre estos a los edáficos (11, 17, 30, 36, 41). Las condiciones químicas del suelo utilizado también pudo limitar las respuestas de las plantas a la inoculación, ya que el mismo presentó bajo contenido de materia orgánica,

alto de calcio y fósforo ligeramente debajo de los requerimientos, lo cual pudo limitar o dificultar la multiplicación de los *Rhizobium* en el suelo y por ende causar una disminución progresiva de las unidades formadoras de colonias de dicha bacteria. Esta afirmación coincide con lo señalado por otros autores (34), los que relacionaron los nutrientes minerales con la fijación de nitrógeno atmosférico en la fase de crecimiento de la planta hospedera, el crecimiento y sobrevivencia del *Rhizobium*, y la fijación, crecimiento y funcionamiento del nódulo.

En el caso específico del análisis de los niveles de calcio, se encontró que los niveles del mismo superan la capacidad de intercambio catiónico del suelo, la cual es de 2,50 meq/100 g, esto indica que los niveles de saturación con este mineral son extremadamente altos. Esto concuerda con lo señalado por otros

**Cuadro 2. Nitrógeno en la materia seca aérea (mg N/g).**

Tratamientos	Muestreo 01	Muestreo 02	Muestreo 03	Promedio por tratamiento
Control	1,33 ± 1,17 <sup>a</sup>	1,25 ± 0,46 <sup>c</sup>	1,51 ± 1,10 <sup>b</sup>	1,36 <sup>c</sup>
CNT1	1,88 ± 0,60 <sup>a</sup>	1,51 ± 0,71 <sup>bc</sup>	2,08 ± 1,14 <sup>b</sup>	1,82 <sup>b</sup>
CNT2	2,05 ± 0,33 <sup>a</sup>	3,88 ± 0,90 <sup>a</sup>	3,99 ± 3,17 <sup>ab</sup>	3,31 <sup>a</sup>
CC1	1,35 ± 0,71 <sup>a</sup>	1,97 ± 0,73 <sup>abc</sup>	6,29 ± 2,46 <sup>a</sup>	3,20 <sup>a</sup>
CC2	2,27 ± 0,90 <sup>a</sup>	1,67 ± 1,25 <sup>bc</sup>	3,44 ± 2,59 <sup>ab</sup>	2,46 <sup>b</sup>
C.CUB	2,52 ± 0,83 <sup>a</sup>	2,52 ± 0,62 <sup>ab</sup>	4,85 ± 1,40 <sup>ab</sup>	3,30 <sup>a</sup>
Promedio por muestreo	1,90 <sup>b</sup>	2,08 <sup>b</sup>	3,96 <sup>a</sup>	

Medias con igual letra en la misma columna no presentan diferencias significativas (P<0,01)



investigadores, quienes observaron, que cuando este se aplica en cantidades superiores a 0,5 ton/ha se afecta el crecimiento inicial de la planta de leucaena, lográndose plantas de poca altura y de escasa nodulación (3,16,23,26).

### **Contenido de nitrógeno.**

**Nitrógeno Aéreo (NitA).** Al analizar el efecto de la inoculación de las cepas sobre el contenido de nitrógeno (N) en la parte aérea como promedio para los tres muestreos (cuadro 2), se observó que hubo diferencias significativas ( $P < 0,01$ ) entre los tratamientos. C.CUB., CNT2 y CC1 no presentaron diferencias significativas entre sí con valores de 3,30; 3,31 y 3,20 mg N/g. de MSA, respectivamente para cada uno, pero superaron a los tratamientos CC2 y CNT1 y estos al control cuyo promedio alcanzado fue de 1,36 mg N / g MSA, lo que indica que las cepas CNT2, C.CUB. y CC1 fueron más eficientes en la fijación de nitrógeno aéreo bajo las condiciones del ensayo.

Al comparar los promedios de nitrógeno en la parte aérea para los tres muestreos realizados se encontró que hubo diferencias significativas ( $P < 0,001$ ). Los muestreos 1 y 2 presentaron valores medios de contenido de nitrógeno de 1,90 y 2,08 mg N/g MSA respectivamente siendo estadísticamente iguales, resultando inferiores al promedio alcanzado en el muestreo 3, cuyo valor medio de nitrógeno fue de 3,96 mg N/ g MSA.

No hubo diferencias entre los distintos tratamientos de inoculación y entre estos con el control para el muestreo 1. Para el muestreo 2 se encontraron diferencias significativas

entre los distintos tratamientos ( $P < 0,01$ ) y entre estos y el control, se observa que el tratamiento CNT2 presentó el mejor promedio con  $3,88 \pm 0,90$  mg N/g. MSA, seguido por el tratamiento C.CUB. y este por el tratamiento CC1, CC2 y CNT1 y por último el control.

Se encontraron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre los tratamientos para el muestreo 3. El tratamiento CC1 presentó el mejor promedio ( $6,29 \pm 2,46$  mg N/ g MSA), el cual superó a los tratamientos CNT2, C.CUB. y CC2 que no presentaron diferencias significativas entre sí y solo superaron a los tratamientos CNT1 y al control.

Durante el segundo y el tercer muestreo se evidencian distintas capacidades de las cepas utilizadas en la fijación de nitrógeno, superando al testigo, lo que supone que si hubo fijación de nitrógeno, además, se observa que el NitA presenta correlación altamente significativa ( $P < 0,001$ ) con el contenido de MSA con un valor de  $r = 0,94$ , y una correlación positiva altamente significativa ( $P < 0,001$ ) con MSR y MST con valores de  $r = 0,72$  y  $r = 0,85$ , respectivamente.

El contenido de nitrógeno en la parte aérea demuestra la efectividad de las cepas utilizadas como inoculante al compararlas con el control. Los resultados observados difieren de lo reportado, al señalar que la *L. leucocephala* solo nodula con *Rhizobium* específico (1,20,39,42), y concuerda con lo manifestado por (7,10,18,27,35,38), ya que las cepas aisladas del mismo suelo presentaron diferencia en la nodulación, la cepa CNT2 presentó promedios similares a

las cepas CC2 y C.CUB. demostrando con ello que es posible aislar cepas nativas del suelo en el que se piensa introducir la leucaena. Por otra parte queda demostrado al respecto, que no todas las cepas aisladas serán eficientes en la fijación de nitrógeno, por lo tanto se deben someter a procesos de evaluación en macetas y en campo para seleccionar las más sobresalientes. También se demostró que las cepas introducidas no siempre son capaces de producir los mismos efectos logrados en aquellas regiones de donde son aisladas, ya que la cepa C.CUB no superó en las condiciones del ensayo a la cepa nativa CNT2.

#### **Nitrógeno radicular (NitR).**

Al analizar los promedios de los tratamientos en cuanto al nitrógeno acumulados en la raíz para los tres muestreos (cuadro 3), se aprecia que hubo diferencias significativas ( $P < 0,001$ ) entre los tratamientos.

Los tratamientos con mejores respuesta fueron CNT2 y C.CUB. al alcanzar valores medios de 2,35 y 2,12 mg N/g de materia seca radicular, estos promedios fueron superiores a los alcanzados por los tratamientos CC2, CC1, CNT1 y el control, que no presentaron diferencias significativas entre sí.

Al estudiar la fijación de nitrógeno en la raíz en los diferentes muestreos se observó que hubo diferencias altamente significativas ( $P < 0,001$ ) entre los tres muestreos realizados, se observó un incremento en el contenido de nitrógeno promedio en la raíz en la medida que aumentaron los días de evaluación.

El mayor promedio lo presentó el tercer muestreo con 2,51 mg N/g de

MSR, seguido por el segundo con un valor promedio de 1,32 mg N/g de MSR y este por el primer muestreo con 0,55 mg N/g de MRS. Estos valores presentaron correlación positiva con la MSA con  $r = 0,83$  ( $P < 0,0001$ ); con MSR  $r = 0,95$  ( $P < 0,0001$ ), pero no presentó correlación con el número de nódulos.

Este incremento lineal en el contenido de nitrógeno se explica como consecuencia de una mayor disponibilidad de carbohidratos para el desarrollo de la planta y mayor disponibilidad para el crecimiento radicular de acuerdo a Bartholomeu (5), quien señala que el desarrollo de la parte aérea afecta la fijación de nitrógeno, ya que la formación, desarrollo y funcionamiento de los nódulos depende de los fotosintatos para su funcionamiento, según lo concluido por Aparicio – Tejo *et al* (2). Al analizar los resultados se aprecia que la cepa nativa CNT2 presenta valores más altos de nitrógeno radicular en los muestreos 1 y 2, así mismo la cepa CNT1 para el segundo muestreo no muestra diferencias significativa con la cepa cubana y las cepas comerciales de la ULA. En cuanto a las cepas de la ULA (CC1 y CC2) parecen no presentar mucha eficiencia en la fijación de nitrógeno en la leucaena, pues sus valores de nitrógeno no alcanzaron los de las cepas nativas y la Cubana durante los muestreos 1 y 2.

**Nitrógeno Total por Planta (NitT).** Para el contenido del nitrógeno total (NitT) (cuadro 4), se encontraron diferencias altamente significativas ( $P < 0,001$ ) entre los muestreos. El tercer muestreo (6,22 mg

**Cuadro 3. Nitrógeno en la materia seca radicular (mg N/g).**

Tratamientos	Muestreo 01	Muestreo 02	Muestreo 03	Promedio por tratamiento
Control	0,48 ± 0,44 <sup>ab</sup>	0,76 ± 0,19 <sup>b</sup>	1,74 ± 0,48 <sup>a</sup>	0,90 ± 0,59 <sup>b</sup>
CNT1	0,52 ± 0,41 <sup>ab</sup>	1,01 ± 0,72 <sup>ab</sup>	0,98 ± 0,30 <sup>a</sup>	0,91 ± 0,57 <sup>b</sup>
CNT2	1,05 ± 0,10 <sup>a</sup>	2,03 ± 0,22 <sup>a</sup>	3,98 ± 2,99 <sup>a</sup>	2,35 ± 0,18 <sup>a</sup>
CC1	0,25 ± 0,12 <sup>b</sup>	0,98 ± 0,37 <sup>ab</sup>	2,82 ± 0,81 <sup>a</sup>	1,35 ± 0,12 <sup>b</sup>
CC2	0,62 ± 0,44 <sup>ab</sup>	1,26 ± 0,86 <sup>ab</sup>	1,79 ± 1,76 <sup>a</sup>	1,22 ± 0,12 <sup>b</sup>
C.CUB	1,10 ± 0,28 <sup>a</sup>	1,85 ± 0,48 <sup>ab</sup>	3,40 ± 1,03 <sup>a</sup>	2,12 ± 0,11 <sup>a</sup>
Promedio por muestreo	0,55 <sup>c</sup>	1,32 <sup>b</sup>	2,51 <sup>a</sup>	

Medias con igual letra en la misma columna no presentan diferencias significativas (P<0,01)

N/g MST) superó al segundo y al primero los cuales no presentaron diferencias significativas entre sí (3,44 y 2,70 mg N/g MST, respectivamente).

Al estudiar el efecto de la inoculación en el tiempo, las cepas que

aportaron mejores promedios con diferencias altamente significativas (P<0,01) en contenido de NitT fueron C.CUB. y CNT2 con valores promedios de 5,31 y 5,45 mg N/g MST respectivamente, seguidas por las

**Cuadro 4. Nitrógeno en la materia seca total (mg N/g.).**

Tratamientos	Muestreo 01	Muestreo 02	Muestreo 03	Promedio por tratamiento
Control	1,80 ± 1,61 <sup>a</sup>	2,01 ± 0,64 <sup>b</sup>	3,25 ± 1,59 <sup>a</sup>	2,22 <sup>c</sup>
CNT1	2,39 ± 0,26 <sup>a</sup>	2,52 ± 1,46 <sup>b</sup>	3,05 ± 0,96 <sup>a</sup>	2,64 <sup>c</sup>
CNT2	3,10 ± 0,25 <sup>a</sup>	5,91 ± 0,70 <sup>a</sup>	7,97 ± 6,09 <sup>a</sup>	5,45 <sup>a</sup>
CC1	1,60 ± 0,78 <sup>a</sup>	2,95 ± 0,99 <sup>ab</sup>	9,10 ± 3,02 <sup>a</sup>	4,55 <sup>b</sup>
CC2	2,89 ± 0,97 <sup>a</sup>	2,93 ± 2,09 <sup>b</sup>	5,23 ± 4,21 <sup>a</sup>	3,54 <sup>b</sup>
C.CUB	3,62 ± 1,10 <sup>a</sup>	4,38 ± 0,90 <sup>ab</sup>	8,25 ± 2,36 <sup>a</sup>	5,31 <sup>a</sup>
Promedio por muestreo	2,70 <sup>b</sup>	3,44 <sup>b</sup>	6,22 <sup>a</sup>	

Medias con igual letra en la misma columna no presentan diferencias significativas (P<0,01)

cepas CC1 y CC2 con promedios de 4,55 y 3,54 mg N/g MST, las cuales superaron los promedios alcanzados por la cepa CNT1 y el control 2,64 y 2,22 mg N/g MST respectivamente siendo estadísticamente similares. Al evaluar el índice de eficiencia de la inoculación (IEI) (35) para el contenido total de nitrógeno se encontró que los valores de IEI para cada tratamiento fueron; 58.19% y 59.27% para los tratamientos C.CUB. y CNT2, respectivamente y de 51.21%, 37.29% y 15,90% para los tratamientos CC1, CC2 y CNT1, lo cual demuestra que las inoculaciones presentaron efecto positivo en la fijación de nitrógeno con respecto a las plantas sin inocular (control).

Para el primer muestreo no se encontraron diferencias entre los tratamientos y el control. Durante el segundo muestreo el tratamiento CNT2 presentó el mejor promedio ( $P < 0,01$ ), seguido por los tratamientos C.CUB. y CC1, que superaron a los tratamientos CC2, CNT1 y el control que no presentaron diferencias significativas entre sí. Estos resultados evidencian que la inoculación efectuada fuese positiva.

Para el tercer muestreo no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, esto posiblemente como consecuencia de las defoliaciones causadas por el acridido, sin embargo, se puede considerar que los promedios alcanzados por los tratamientos CC1, C.CUB., CNT2 son más favorables que el alcanzado por el control, demostrando un efecto positivo de la inoculación de éstas cepas. El efecto de la defoliación, pudo causar una reducción en el número de nódulos por varias causas; la primera que el

estrés inducido por la defoliación causó necrosamiento de los nódulos según lo indicado en otros trabajos de investigación relacionados con el tema (1,2), la segunda posiblemente por una desviación de los fotosíntatos producidos en la fotosíntesis a la formación de nuevas hojas (3), por lo tanto, las diferencias observadas en el contenido de nitrógeno en la parte aérea pudiera ser explicado como una traslocación de nitrógeno desde la parte radicular hasta la parte aérea, ya que existe una correlación de  $r = 0,83$ ; ( $P < 0,0001$ ) entre el nitrógeno radicular y el peso de la parte aérea, así mismo el nitrógeno de la parte aérea presenta una correlación de  $r = 0,72$ ; ( $P < 0,0001$ ) entre el nitrógeno de la parte aérea y el peso seco de las raíces. También existe una relación lineal positiva entre el nitrógeno de la parte aérea y contenido de nitrógeno total y la producción de MST al estudiar la correlación entre ambas variables la cual fue de  $r = 0,93$ ; ( $P < 0,0001$ ). Estos resultados coinciden con quienes manifiestan que existe una alta relación entre el contenido de nitrógeno en la planta y la producción de materia seca (4, 8).

No se observaron diferencias en el contenido de nitrógeno total en el primer y tercer muestreo, lo cual se puede explicar debido al poco desarrollo inicial (acumulación de materia seca total) observado en la leucaena (cuadro 5) y la relación que existe entre la materia seca y el contenido de nitrógeno (40). Este lento desarrollo puede estar afectado por las condiciones de fertilidad del suelo (34), debido a una disminución de los aportes de fotosíntatos, los cuales afectan en

**Cuadro 5. Materia seca por muestreo (g/pta.).**

Tratamientos	Muestreo 01	Muestreo 02	Muestreo 03
MSA (materia seca aérea)	0,37 <sup>c</sup>	0,53 <sup>b</sup>	0,93 <sup>a</sup>
MSR (materia seca radicular)	0,18 <sup>c</sup>	0,62 <sup>b</sup>	1,03 <sup>a</sup>
MST (materia seca total)	0,58 <sup>c</sup>	1,15 <sup>b</sup>	1,96 <sup>a</sup>

Medias con igual letra en la misma fila no presentan diferencias significativas ( $P < 0,01$ )

forma directa el crecimiento inicial en plantas de *leucaena* (2,5), también puede ser consecuencia de la sobrevivencia del *Rhizobium*, crecimiento de los nódulos y fijación de nitrógeno (44), ya que la actividad nodular depende la actividad fotosintética, esto quedó demostrado al observar que la defoliación causada por el acridido en el tercer muestreo afectó el contenido de nitrógeno total al ocurrir una disminución de la materia seca aérea.

Con respecto al nitrógeno total en la planta, las diferencias observadas entre tratamientos pueden ser atribuidas a la selección misma de la planta y las características intrínsecas de las cepas utilizadas, en concordancia con lo manifestado por otros investigadores (6,25,40). También hay que considerar la presencia en el suelo de nitrógeno

inorgánico, el cual aún en concentraciones muy pequeñas puede inhibir la fijación sin perjudicar la nodulación (5,11,35,40); las leguminosas frecuentemente fijan solo una pequeña parte del nitrógeno contenido en sus tejidos cuando crecen y algunas cepas pudieran tener mayor tolerancia al contenido de nitrógeno mineral en el suelo. Fue demostrado en trabajos de fijación de nitrógeno en *L. leucocephala*, que la fijación dependía de la cepa utilizada y que el nitrógeno fijado por la simbiosis fue de 34 – 39 % del total encontrado en la planta (27), lo cual coincide con lo reseñado por Crespo y Curbelo (9), sobre la necesidad de aplicar cantidades pequeñas de nitrógeno en el establecimiento de leguminosas de manera de favorecer el crecimiento inicial y con ello una simbiosis eficiente en el tiempo.

## Conclusiones

Al estudiar el efecto de la inoculación de cepas nativas e introducidas de *Rhizobium* en la *L. leucocephala*, se llegó a las siguientes conclusiones:

Bajo las condiciones del ensayo la leucaena pudo formar nódulos, tanto con las cepas nativas de *Rhizobium* así

como con las introducidas, siendo sus respuestas superiores al control. Las cepas introducidas CC1 y CC2 presentaron menor habilidad que las cepas nativas para formar nódulos y presentaron menores NitT al compararlas con la cepa nativa CNT2 que fue aislada y reinoculada en el

mismo suelo utilizado en el ensayo. El aislamiento de cepas nativas de *Rhizobium* en aquellos suelos donde se piensa establecer *L. leucocephala*, puede favorecer una mejor producción forrajera de ésta planta, ya que se observó un efecto positivo al inocular rizobios aislados en el mismo suelo en comparación con otras cepas introducidas. No todas las cepas nativas aisladas causan el mismo efecto sobre el incremento de producción de materia seca y fijación de nitrógeno en la leucaena, lo que parece comprobar que las condiciones ambientales y el genotipo de hospedero son determinantes, posiblemente bajo diferentes condiciones de siembra, otras cepas nativas tendrán mejor efecto que las introducidas por tener

mejor adaptación a las condiciones ecológicas del suelo. La presencia de los cotiledones a los 30 días después de la germinación, puede limitar la acción de los rizobios en la formación de nódulos, posiblemente debido a que la planta obtiene de los cotiledones parte del nitrógeno para su crecimiento afectando la nodulación. El crecimiento de la planta afecta la formación de nódulos, la cual depende de la presencia de la parte aérea para su funcionamiento, debido a que de la fotosíntesis se obtienen los carbohidratos necesarios para su funcionamiento, y al ser el crecimiento de la parte aérea afectado, se verá el número de nódulos reducido proporcionalmente.

## Literatura citada

1. Aparicio-Tejos, P. M. y C. Arrese-Igor. 1993. Fijación de nitrógeno. p. 193-213. En: (Ed) Azcon-Bieto y Talon, M. Fisiología y Bioquímica Vegetal. Interamericana. Mc Gaw-Hill. Cap.(9)
2. Aparicio-Tejo, P. M., A. J. Gordon, E. M. González; M. Royuela, F.R. Minchin y C. Arrese-Igor. 1999. Metabolismo de carbono y nitrógeno en nódulos de leguminosas en condiciones de sequía. Departamento de Ciencias del Medio Natural. Universidad Pública de Navarra. 31006 - Pamplona. España. 5 p
3. Arun-Prasad, N. Totey, K. Kapoor, P. Khatin, J. Chouham y A. Bhowmick. 1990. Effect of salt on the soil reaction and growth and dry matter yield of *Leucaena leucocephala* and *Aca-cia auriculiformis* in pot culture. Indian -Forestes. Vol. 116 (3): 227 - 232.
4. Aspiola, J.; A. Avila y R. Pérez. 1977. Influencia de la fertilización nitrogenada en el rendimiento y composición mineral de la guinea. Agrotécnica Cuba. 9: 53 - 58.
5. Bartholomeu. W. V. 1972. El nitrógeno del suelo: Proceso de Abastecimiento y requerimiento de los cultivos. (Ed) En: ternational Soil Fertility Evaluation e Improvement. Program. Boletín Técnico N° 6. Carolina del Norte. 97 p.
6. Brockwell, J. 1982. Host plants for Symbiotic Experiments. Cap 8. En: (ed) J. Vincent. Nitrogen Fixation in legumes. (Ed) Academy Press. 285 p.
7. Campos, R. 1995. Selección in vitro de *Rhizobium* Tolerante a acidez y aluminio. Agron. Colombiana, XII (2): 142 - 148.

8. Coto, G., R. Ferrer, R. Cruz, Y. Hernández y M. Pérez. 1990. Efecto de la época y la fertilización nitrogenada en la calidad y solubilidad de la proteína del pasto bermuda. *Rev. Cubana Cienc. Agric.* 24: 115 – 119.
9. Crespo G. y F. Curbelo. 1992. Determinación de los nutrientes limitantes para el establecimiento de leguminosas en dos suelos ganaderos. *Rev. Cub. Cienc. Agric.* 26: 217 – 222.
10. Cuesta, A. y M. López. 1985. Estado microstacional del suelo de la Microestación de Pastos de la Isla de la Juventud. *Boletín Técnico de Pasto No. 1.* ICCA, La Habana, Cuba. 51 p.
11. Dommergues, Y. R. y N. Ahmad. 1995. Nitrogen fixation by tree in relation to soil nitrogen economy. *Fertilizer Research.* 42 (1-3): 215 – 230.
12. Ewel, J.; A. Madriz y J. Tosi. 1976. Zonas de vida de Venezuela: Memoria explicativa sobre el mapa Ecológico. (Ed) M.A.C. – Caracas, Venezuela. 265 p.
13. Faría - Mármol, J. 1991. Leguminosas forrajeras. Limitaciones y perspectivas. Experiencias en la región Zuliana. En: *Curso sobre Producción e Investigación en Pastos Tropicales.* Universidad del Zulia. Maracaibo – Venezuela. 95 – 105.
14. Faría-Mármol, J. 1996. Evaluación de accesiones de *Leucaena leucocephala* a pastoreo en el bosque seco tropical II. valor nutritivo. *Rev. Fac. Agon. (LUZ).* 18: 179- 190.
15. Fontes, A. y J. M. Maldonado. 1994. Fotosíntesis. Cap II. En: Herrera, E. (Ed). *Bioquímica: Aspectos estructurales y vías metabólicas.* Vol. I. 2<sup>da</sup> Edición. (Ed) Interamericana – Mc Gaw-Hill. 922 p.
16. Hansen, E. y D. Munns. 1988. Effects of  $\text{CaSO}_4$  and  $\text{NaCl}$  on growth and nitrogen fixation of *Leucaena leucocephala*. *Plant and soil.* Vol. (107). (1): 95 – 99.
17. Hernández, B. y D. Focht. 1986. Factores Limitantes de la Fijación de Nitrógeno en el Guandú (*Cajanus cajan*) en suelos Ácidos. En: (ed) Rosa, J y C. Pilz. *Primer Seminario Centroamericano sobre Fijación Biológica de nitrógeno.* *Rev. Ceiba* Vol. 27 (1): 61 – 80.
18. Herrera, M y J. Olivares. 1983. Host interspecificity and hydrogenase activity in some *Rhizobium*- legume trees symbioses. *Nit. Fix. Tree Res.* 1: 20 – 21.
19. Hubbell, D. 1986. Producción y Uso de inoculantes. En: (ed) Rosa, J y Pilz C. *Primer Seminario Centroamericano sobre Fijación Biológica de nitrógeno.* *Rev. Ceiba* Vol. 27 (1): 17 – 21.
20. López, M. 1987. Simbiosis Rizobio – *Leucaena*: Inoculación. En: (ed) M. T. Ruiz. y G. Febles. *Leucaena (Leucaena leucocephala): una opción para la alimentación bovina en el trópico y subtropico.* (Ed) EDICA-Cuba. 200 p.
21. Materano, G., W. Peters, N. Noguera. y G. Romero. 1973. Estudio de Suelos “Jardín Botánico de Maracaibo”. Universidad del Zulia: Facultad de Agronomía. Maracaibo.
22. Mendéz-Castro, F. 1997. Manual de Laboratorio de Microbiología. Departamento de Agrobiológicos. Decanato de Agronomía. U.C.L.A. Edo. Lara. 75p.
23. Morales, M.; P. Gaham y R. Cavallo. 1973. Influencia del método de inoculación y el encalamiento del suelo de Carimagua (Llanos Orientales, Colombia) en la nodulación de leguminosas. *Turrialba* 23 (1): 52 – 55.
24. National Academy of Sciences (NAS). 1977. *Leucaena: Promising forage and tree crops for the tropics.* Washington. D.C. 332 p.
25. Nicholas, D. B. y K. Haydock. 1971. Variation in growth and nodulation of *Glycine wightii*. *Aust. J. Agric. Res.*, 22, 233 – 240.

26. Norris, D. O. 1958<sup>b</sup>. A red strain of *Rhizobium* from *Lotononis bainesii* (Baker). Aust. J. Agric. 31: 255-259.
27. Palm, O. y K. Sandell. 1989. Sustentable agriculture and nitrogen supply in Sri Lanka: farmers and Scientists perspective. Ambio V(18) (8): 442 – 448.
28. Peters, W., N. Noguera, G. Materano y G. Romero. 1983. Estudio de suelos de la Granja Experimental “Ana María Campos” de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia. Facultad de Agronomía. Maracaibo. 14 p.
29. Razz, R., T. Clavero, J. J. Pérez, L. González y J. Guiurdaneta. 1995. Efecto de la fertilización con N y P sobre la nodulación de 2 ecotipos de *Leucaena leucocephala*. Rev. Fac. Agron (LUZ) 12-1:187-192.
30. Rosas, J. y F. Bliss. 1986. Principios y prácticas para la Conducción de Ensayos sobre Fijación de Nitrógeno en Condiciones de Campo. En: (ed) Rosas, J y Pilz C. Primer Seminario Centroamericano sobre Fijación Biológica de nitrógeno. Rev. Ceiba. 27(1): 23 39.
31. Roskoski, J. 1986. Ensayos de Selección de Cepas y Respuesta a la Inoculación. Primer Seminario Centroamericano sobre Fijación Biológica de Nitrógeno. Ed: Rosas J. y Pilz, G. Rev. Ceiba. 27 (1): 147 – 158.
32. Statistical Analysis System (S.A.S) Institute Inc. 1992. S.A.S.: Sistema Automático de Estadística. Cary. NC 27512 – 8000. U.S.A.. versión: 92
33. Schuurman, J. J. y M. A. Goedewaagen. 1971. Methods for the examination of root systems and roots. Center for Agricultural Publishing and Documentation. Wageningen. 83 p.
34. Sistachs, E, M. López, F. Funes, M. Ruiz y M. Monsote. 1981. Agrotecnia y utilización de leguminosas. Rev. Cubana Ciencias Agrícolas. 15: 195 – 207.
35. Sylvester, R., J. Kipe-Nolt y F. Munevar. 1986. Estrategias para la integración de la Rizobiología en programas de selección de Leguminosas en América Latina. En: (ed) Rosas, J y Pilz C. Seminario Centroamericano sobre Fijación Biológica de nitrógeno. Rev. Ceiba 27 (1): 41 – 59.
36. Tang, M., J. Menéndez, A. Castañeda y D. Téllez. 1990<sup>b</sup>. Estudio de la nodulación natural de leguminosas tropicales. I: Sancti Spiritus. Pastos y Forrajes, 13: 21 - 27.
37. Tang, M., J. Menéndez y M. Gazó. 1991. Estudio de la inoculación con *Rhizobium* en dos cultivares de *Centrosema pubescens*. Pastos y Forrajes. 14: 13 - 19.
38. Tang, M. 1994. Efectos de la inoculación *Rhizobium* en el rendimiento de materia seca, contenido de nitrógeno y nodulación en *Leucaena leucocephala* cv CNIA-250. Pastos y Forrajes, 17 :143 - 147.
39. Tang, M., O. Rodríguez y V. Avila. 1994. Efecto de las cepas nativas de Rizobios sobre varias leguminosas tropicales. Pastos y Forrajes. 17: 45 – 50.
40. Veasey, E., O. Ghisi, M. Valarini, I. Otsuk, M. Cardelli, M. Sanchez y D. Beisman. 1997. Early growth and native nodulation of leguminous shrub and tree species in Brasil. Tropical Grasslands. 31: 40 – 48.
41. Vincent, J. 1982. The legume – Rhizobium Symbiosis. (ed) J. Vincent. Nitrogen Fixation in legumes. (Ed) Academy Press. 285 p.
42. Waisel, Y, A. Eshel y U. Kafkafé. 1996. Species of Rhizobia and Their Characteristics. En: Plant Roots. The Hidden Half by: Marcel Dekker. Inc. 205 p.
43. Weaver, R. W. y P. Gaham. 1994. Legume Nodule Symbionts. In: Methods of Soil Analysis. Part 2: Microbiological and Biochemical Properties. Number 5 in the Science Society of America Book Series. Published by: Soil Science Society of America, Inc. 605 p.
44. Wesley, D. 1987. Investigation of the Role of Phosphorus in Symbiotic Dinitrogen Fixation. Plant Physol. 84, 835 – 840.