

EVALUACION DE LA FIJACION DE NITROGENO POR CEPAS DE *Rhizobium* QUE NODULAN FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.)

María Inés Ballesteros*, Amanda Lozano de Yunda.

*Departamento de Química, Facultad de Ciencias Universidad Nacional de Colombia, Apartado Aéreo 14490, Santafé de Bogotá, D.C.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*, *Rhizobium*, Nitrogen fixation

RESUMEN

La capacidad de fijar nitrógeno de ocho cepas de *Rhizobium* fue evaluada mediante dos ensayos de invernadero, en solución nutritiva, con cinco variedades de fríjol: ICA CITARA, ICA PIJAO, DIACOL CATIO, ANDINO y PVA 916. Se determinó en floración el peso seco de la parte aérea, peso seco de nódulos y nitrógeno total en la planta por el método de microkjeldahl. Las cepas de mejor comportamiento en cuanto a nitrógeno fijado fueron en su orden: CIAT 144, CIAT 899, y CIAT 2; aunque en general la respuesta de las cepas fue diferente con la variedad de fríjol se logró un porcentaje promedio de nitrógeno fijado del orden del 28% comparado con los controles que recibieron nitrógeno combinado (Ensayo 2). Las cepas CIAT 7115 y CIAT 632 presentaron la menor efectividad con las variedades ensayadas. Se encontró correlación altamente significativa entre el rendimiento en peso seco y el nitrógeno fijado para todas las variedades de fríjol.

ABSTRACT

Capacity to fix nitrogen on eight *Rhizobium* strains, by means of two greenhouse assays in nutrient solution with five bean varieties: ICA CITARA, ICA PIJAO, DIACOL CATIO, ANDINO and PVA 916, was evaluated. Dry weights for both the aerial parts and the nodules were obtained at flowering period. The total nitrogen of the aerial part was determined by microkjeldahl method. The better strains in nitrogen fixation behavior turned out to be in decreasing order: CIAT 144, CIAT 899 and CIAT 2; nevertheless the strains response was different among varieties. In general, an average percentage of 28% was achieved for nitrogen fixation as compared to controls with combined nitrogen added. (Second assay). Strains CIAT 7115 and CIAT

632 showed the least effectivity with the tested varieties of bean. It was found a significative high correlation between dry weight yield and fixed nitrogen for all bean varieties.

INTRODUCCION

Las leguminosas en asociación con bacterias del género *Rhizobium* pueden utilizar el nitrógeno atmosférico para la síntesis de aminoácidos y por consiguiente de sus proteínas. Estos beneficios son altamente importantes en países de América tropical, en donde la deficiencia de nitrógeno es uno de los mayores factores limitantes en la producción de cultivos y los fertilizantes nitrogenados fuera de ser costosos pueden causar contaminación de suelos y aguas (1) (2).

La cantidad de nitrógeno fijado por el frijol es muy variada; depende de la variedad, de la eficiencia fijadora de la bacteria *Rhizobium* y de las condiciones físicas, químicas y biológicas del suelo ó del medio de cultivo (3). *Phaseolus vulgaris* tiene una amplia diversidad genética y existen grandes diferencias entre los genotipos en la cantidad de nodulación y el nitrógeno fijado. Igualmente, la habilidad para formar grandes y abundantes nódulos, está también controlada por las bacterias fijadoras de nitrógeno (4) (5).

En frijol, se reportan intervalos de nitrógeno fijado desde 20 hasta 115 Kg. de nitrógeno por hectárea de cosecha, con un porcentaje de nitrógeno tomado de la atmósfera desde 37-68% (1), 56-78% (6), 16-71% (7) y en cepas muy efectivas hasta el 86% (8). Plantas que crecen en condiciones de invernadero y en medios de arena libres de nitrógeno pueden fijar entre 200 y 400 mg de nitrógeno por planta (9).

La selección de cepas nativas o foráneas eficientes en la fijación de nitrógeno es una etapa previa esencial en los programas de investigación sobre fijación de nitrógeno, puesto que es frecuente encontrar interacción cepa/variedad de la planta. Por lo tanto, este trabajo se realizó con el fin de encontrar algunas combinaciones hospedero/bacteria promisorias, en cuanto a su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico para posteriormente evaluarlas en otros trabajos en relación con factores reguladores de la fijación, tales como, presencia de aluminio, pH ácido, influencia de nutrientes como calcio y fósforo y competencia con cepas nativas del suelo.

PARTE EXPERIMENTAL

El trabajo comprendió dos ensayos : en el primero se utilizaron dos variedades de frijol y siete cepas de *Rhizobium* y en el segundo, otras tres variedades de frijol y ocho cepas incluyendo las del ensayo I.

Ensayo 1.

Se utilizaron dos variedades de frijol propias de clima medio, ICA CITARA (arbusitivo) e ICA PIJAO (indeterminado arbusitivo) y siete cepas de *Rhizobium* que nodulan frijol, suministradas por el CIAT denominadas CIAT 144, CIAT 7115, CIAT 151, CIAT 2, CIAT 144*, CIAT 632 y CIAT 899.

El ensayo se realizó en invernadero (Dpto. de Química, Universidad Nacional-Bogotá) con temperatura promedio de 20°C y humedad relativa del 75%. Como unidades experimentales se emplearon jarras de Leonard, usando como medio de soporte de la planta arena cuarcítica y como solución nutritiva la utilizada por Franco y Munns (10): KH_2PO_4 50 uM, K_2SO_4 1000 uM, CaCl_2 1000 uM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1000 uM, H_3BO_3 2 uM, MnSO_4 0,04 uM, ZnSO_4 0,16 uM, CuSO_4 0,04 uM, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 0,01 uM, Fe-EDTA 10 uM. En el tratamiento control se usó como fuente de nitrógeno solución de KNO_3 , con una concentración en la solución final de 70 p.p.m. (11). El pH antes de esterilización fue de 6,5.

Los inóculos se prepararon en medio Manitol-Extracto de levadura líquido a 28°C y con agitación de 110 revoluciones/minuto hasta lograr la fase estacionaria de crecimiento. Las semillas se desinfectaron según (11) y se pusieron a germinar en cajas de Petri con agar en agua al 0,5% P/V a 28°C, todo en condiciones estériles. La siembra se hizo en cabina estéril depositando dos semillas pregerminadas a un centímetro de profundidad en cada jarra. Después de una semana, se dejó solamente una plántula; en este momento se hizo la inoculación con 2 mL de caldo de cultivo, que tenían densidad óptica a 630 nm entre 0,959 y 1,699. Las plantas se dejaron crecer durante 49 días para la variedad ICA CITARA y 56 días para la ICA PIJAO, ya que no había alcanzado la época de floración y formación de vainas. Durante el tiempo de cultivo, se cambió la solución cada 25 días duplicando las concentraciones de fósforo y potasio debido a que las plantas presentaron síntomas de deficiencia de estos elementos. A los controles también se les agregó solución de KNO_3 con una concentración de 70 p.p.m. en la solución final.

En el momento de la recolección se cortó la parte aérea de la planta. Se hicieron observaciones del aspecto de los nódulos; se separaron de la raíz, se lavaron y se secaron a 70°C al igual que la parte aérea de la planta para determinar el rendimiento en peso seco. Se analizó el contenido de nitrógeno por el método microkjeldahl (12).

El diseño estadístico fue completamente al azar, con tres repeticiones y nueve tratamientos (siete cepas, testigo y control). La comparación de promedios se hizo por Duncan (13).

Ensayo 2

En general el ensayo fue similar al anterior, con algunas variaciones. Se utilizaron las variedades de frijol DIACOL CATIO (de clima medio arbustivo), ANDINO (de clima frío, determinado arbustivo) y PVA 916 (de clima medio arbustivo). Las cepas de *Rhizobium* fueron las mismas del Ensayo 1, excepto la CIAT 144*, incluyéndose además la SEMIA 4064 y SEMIA 4077 procedentes del Centro de Recursos Microbiológicos MIRCEN de Porto Alegre, Brasil. En este caso se utilizó la solución nutritiva de Norris y Date (11) cuya composición en uM es: KCl 1000, K_2HPO_4 1000, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1000, $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ 2000, $CuSO_4$ 0,156, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,38, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 4,55, H_3BO_3 11,57, $(NH_4)_6Mo_{24}O_{24} \cdot 4H_2O$ 0,004, Fe-citrato 7,5 y se ajustó el pH a 7,0. En el tratamiento control se empleó como fuente de nitrógeno NH_4NO_3 con una concentración de 140 ppm de N en la solución nutritiva (11). Las soluciones nutritivas se cambiaron cada dos semanas y la duración del experimento fue de 45 días, época en que las plantas alcanzaron la floración y comenzó de formación de vainas.

El diseño del experimento fue completamente al azar, con arreglo factorial (variedad x fuentes de nitrógeno: Inoculación, testigo y control) y tres repeticiones. Las variables de respuesta fueron el rendimiento en peso seco de la parte aérea de la planta, el peso seco de nódulos y el contenido de nitrógeno de la planta. También se hizo un análisis de varianza separadamente para cada variedad. La comparación de promedios se hizo por Duncan (13).

RESULTADOS Y DISCUSION

En general al comparar los dos ensayos, se observó que en el ensayo 1 hubo un desarrollo de plantas menor que en el ensayo 2, puesto que en todos los tratamientos incluyendo el tratamiento control, se presentó clorosis foliar (deficiencia de nitrógeno) además síntomas de deficiencia de otros elementos que podrían atribuirse a fósforo y potasio, situación que fue en parte corregida por la adición de estos elementos en la solución nutritiva. De otro lado, el tratamiento control (con nitrógeno) presentó una apariencia en follaje similar al de los tratamientos inoculados, por lo tanto se reforzó este elemento en el control del ensayo 2.

En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos en el ensayo 1 para peso seco de nódulos, rendimiento en peso seco, absorción y concentración de nitrógeno en la parte aérea de la planta. De acuerdo con el análisis estadístico, en la variedad ICA Citará las cepas que fijaron significativamente mayor cantidad de nitrógeno/planta fueron la CIAT 899 y CIAT 2, con un

valor alrededor de 25,5 mg N/planta, cantidad que no fue significativamente diferente a la del tratamiento control. Este comportamiento fue similar para el rendimiento en peso seco. En la variedad ICA Pijao, la CIAT 899 presentó la más alta fijación de nitrógeno 26,7 mg/planta y el mejor rendimiento en parte aérea de la planta 1,57 g/planta, resultados que fueron estadísticamente superiores a los del tratamiento control; le siguieron en importancia la CIAT 144 y la CIAT 2.

Los inóculos de la cepa CIAT 144 provenían de diferente método de conservación, así es que la CIAT 144* fue obtenida directamente de un medio liofilizado y la CIAT 144 de un cultivo mantenido en tubo con agar inclinado. Con el primero la nodulación resultó muy escasa, lo que produjo bajos rendimientos y muy poca fijación de nitrógeno, por lo tanto se descartó para el segundo ensayo. Respecto a la liofilización, los microbiólogos la consideran como uno de los principales métodos de conservación de cultivos de bacterias. Se menciona en literatura (14) que un alto porcentaje de cultivos de *Rhizobium* fueron viables después de mantenerlos liofilizados por varios años y fueron capaces de nodular efectivamente los hospederos. Pero también existen muchos factores que en este método afectan la supervivencia de los microorganismos, causando daño en alguna función o estructura vital. Entre los factores se citan : el tipo de microorganismo, la edad fisiológica, la concentración de células, la clase de medio de suspensión, la rata de congelación y temperatura de secado, entre otros.

Los resultados del ensayo 2 aparecen en la tabla 2. Se observa que en las tres variedades de frijol, los valores de rendimiento en peso seco de la parte aérea de la planta, contenido y concentración de nitrógeno en la planta en los tratamientos control, fueron muy superiores estadísticamente a los tratamientos inoculados; así es que en rendimiento fue aproximadamente 2,5 veces mayor y en porcentaje de nitrógeno 3,5 veces superior que el mejor tratamiento inoculado resultante en cada variedad. Considerando como 100% de nitrógeno en la planta, el del tratamiento control, los mejores valores de nitrógeno fijado correspondieron a un porcentaje promedio de 28%; Duque y colaboradores (7) encontraron que esta proporción depende de la variedad de frijol, con valores entre 16 y 71%. Se encontró que el comportamiento de las cepas de *Rhizobium* frente a cada variedad es diferente.

Para rendimiento en peso seco resultaron significativamente mejores las asociaciones Diacol Catio-SEMIA 4064, Andino-CIAT 144 y PVA-916-CIAT 2 y en cantidad de nitrógeno fijado Diacol Catio-CIAT 899, Andino-CIAT 144 y Andino-SEMIA 4064 y PVA 916-CIAT 2, mostrando mejor comportamiento con todas las variables evaluadas, la CIAT 144 y la CIAT 2. Esta diferencia en interacción hospedero/cepa ha sido detectada en varios trabajos (3) (4) (5) (7).

Tabla 1. Resultados de las variables de respuesta en el ensayo 1 a/

CEPAS	ICA CITARA				ICA PIJAO			
	Peso de Nódulos g/planta	Peso parte aérea g/planta	Nitrógeno Absorbido mg/planta	% N Parte aérea	Peso de Nódulos g/planta	Peso parte aérea g/planta	Nitrógeno Absorbido mg/planta	% N parte aérea
CIAT 7115	0.100	0.80 ab	13.4 ab	1.67	0.069	0.36 c	4.3 de	1.20
CIAT 144*	0.015	0.49 b	7.2 b	1.53	0.054	0.39 c	5.2 de	1.33
CIAT 151	0.120	0.51 b	8.3 b	1.63	0.150	0.88 abc	9.1 cd	1.03
CIAT 144	0.127	0.78 ab	13.8 ab	1.77	0.236	1.47 ab	20.1 b	1.37
CIAT 632	0.097	0.53 b	7.3 b	1.37	0.116	0.77 bc	8.7 cd	1.13
CIAT 899	0.147	1.31 a	26.2 a	2.00	0.214	1.57 a	26.7 a	1.70
CIAT 2	0.230	1.41 a	25.0 a	1.77	0.164	1.23 ab	10.7 c	0.87
Control		1.49 a	24.3 a	1.63		1.21 ab	10.9 c	0.90
Testigo		0.55 b	7.7 b	1.40		0.32 c	3.4 e	1.06
Promedio	0.119	0.87	14.8	1.64	0.143	0.91	11.0	1.18

a/: valores promedio de tres determinaciones

CIAT 144*: similar a CIAT 144 pero mantenida en cultivo biofilizado

Valores con la misma letra dentro de una variable no son significativamente diferentes

Tabla 3. Coeficientes de correlación lineal entre las variables rendimiento en peso seco de la parte aérea de la planta, peso seco de nódulos y nitrógeno de la planta para las variedades de frijol de los ensayos 1 y 2.

VARIABLES a/	VARIEDADES DE FRIJOL				
	ICA CITARA	ICA PIJAO	ANDINO	DIACOL CATIO	PVA 916
Nitrógeno vs. Rendimiento	0.9839**	0.8997**	0.9946**	0.9844**	0.9925**
Peso nódulos vs. Rendimiento	0.6227*	0.9712**	0.6046*	0.6244*	0.0163 ns
Peso nodulos vs. Nitrógeno	0.7824*	0.6866**	0.6589*	0.6253*	0.1062 ns

a/: Valores promedio de tres determinaciones

* : Significativo al 5%

** : Significativo al 1%

Se resalta el hecho, que a pesar de observar desarrollos de plantas diferentes en los dos ensayos, el rendimiento promedio en peso seco de la parte aérea de la planta de todos los tratamientos inoculados en el ensayo 1; 0,89 g/planta fue muy similar al del ensayo 2; 0,91 g/planta. Sin embargo, la fijación promedio de nitrógeno en el ensayo 2 resultó ser aproximadamente el doble, 28,3 mg/planta en relación con la del primer ensayo, 13,3 mg/planta. Esto nos sugiere que la composición y concentración de la solución nutritiva puede influir en la efectividad de las cepas, puesto que es afectada la fijación de nitrógeno por el suministro de otros nutrientes esenciales para la planta, como fósforo y potasio que estaban deficientes en el ensayo 1. Es posible también, que las variedades del ensayo 2 presenten una mayor eficiencia en la actividad fijadora. Los pesos promedio de nódulos en los dos ensayos (0,131 g/planta y 0,1549 g/planta) fueron superiores a los reportados en otros trabajos similares (7) (15).

En cuanto a concentración de nitrógeno en la parte aérea de la planta, en el primer ensayo (tabla 1) las plantas de los tratamientos inoculados alcanzaron concentraciones un poco mayores, entre 1,03 y 2,00%, que en los tratamientos control, 0,90 y 1,63%. Por el contrario, en el segundo ensayo las plantas de los tratamientos inoculados presentaron concentraciones inferiores, entre 2,11 y 3,80% en relación con las de los tratamientos control, 3,73 y 4,20%. Aquí solamente las cepas CIAT 899 y CIAT 2 muestran una capacidad de fijar nitrógeno en concentraciones que están dentro del intervalo de los tratamientos control. Estos valores se pueden considerar normales de acuerdo con el nivel crítico del 3% (15). Se considera deficiente para fríjol una concentración de nitrógeno inferior a 1,54% (15), por tanto en el ensayo 2 no se presentaron deficiencias en ningún tratamiento inoculado. En ambos ensayos se midió la asociación entre las variables de respuesta mediante los coeficientes de correlación lineal r , resultados que aparecen en la tabla 3. Se encontró que en todas las variedades de fríjol ensayadas existe una correlación altamente significativa entre el rendimiento en peso seco y el nitrógeno fijado por la parte aérea de la planta, con valores entre 0,8997** y 0,9946**, lo que quiere decir que el rendimiento en peso seco es un buen parámetro para medir la efectividad de las cepas. Resultados similares ($r = 0,96^{**}$) se encontraron también en fríjol, en experimentos en invernadero en Rwanda (Africa Central) realizados con el fin de seleccionar cepas nativas de *Rhizobium* (8). Las otras correlaciones, rendimiento en peso seco vs. peso seco de nódulos y peso seco de nódulos vs. contenido de nitrógeno solamente fueron altamente significativas para la variedad ICA Pijao, siendo en los demás casos significativa y no significativa. Esto demuestra que el proceso de infectividad no siempre conlleva una buena efectividad, tal es el caso de la cepa CIAT 151 que presentó un peso de nódulos similar algunas veces a la CIAT 2 y otras a la CIAT 144, pero la cantidad de nitrógeno fijado fue mucho más baja, alcanzando valores cercanos al del tratamiento testigo.

Tabla 2. Resultados de las variables de respuesta en el ensayo 2. a/

CEPAS	DIACOLCATIO				ANDINO				PVA 916			
	Peso de nódulos g/planta	Peso parte aérea g/planta	Cont. Nitrog. mg/plant	% N parte aérea	Peso de Nódulos g/planta	Peso parte aérea g/planta	Cont. Nitrog. mg/plant	% N parte aérea	Peso Nódulos g/planta	Peso parte aérea g/planta	Cont. Nitrog. mg/plant	% N parte aérea
CIAT 899	0.174	1.33 bc	45.8 b	3.40	0.179	1.06 cd	40.3 bd	3.80	0.491	0.75 d	23.4 def	3.05
CIAT 2	0.168	1.23 bcd	33.2 bde	3.83	0.138	0.84 cde	24.6 de	2.93	0.210	1.34 b	35.5 b	2.64
CIAT 632	0.048	0.43 f	18.3 de	2.68	0.121	0.59 de	15.0 f	2.51	0.065	0.63 d	13.1 f	2.11
CIAT 7115	0.004	0.58 ef	12.21 f	2.29	0.024	0.40 ef	9.1 f	2.25	0.091	0.94 bc	26.7 bde	2.73
CIAT 151	0.165	0.96 cde	22.3 de	2.31	0.200	0.80 cde	20.3 ef	2.53	0.174	1.06 bc	27.9 bde	2.67
SEMIA 4064	0.231	1.51 b	35.7 bd	2.46	0.130	1.10 bc	41.9 b	3.71	0.105	0.95 bc	28.7 bd	3.02
SEMIA 4077	0.170	1.22 bcd	34.6 bd	2.85	0.175	1.02 bc	34.1 bde	3.34	0.077	0.71 d	21.8 def	2.77
CIAT 144	0.199	1.46 bc	39.7 bc	2.71	0.230	1.33 b	41.6 bc	3.25	0.122	1.08 bc	32.2 bc	3.23
Control		3.95 a	147.5 a	3.73		3.11 a	129.2 a	4.20		3.72 a	160.4 a	4.30
Testigo		0.76 def	15.1 ef	2.00		0.48 de	4.9 g	1.02		1.80 d	12.9 f	1.51
Promedio	0.145	1.34	38.4	2.83	0.150	1.07	36.1	2.95	0.167	1.20	38.4	2.81

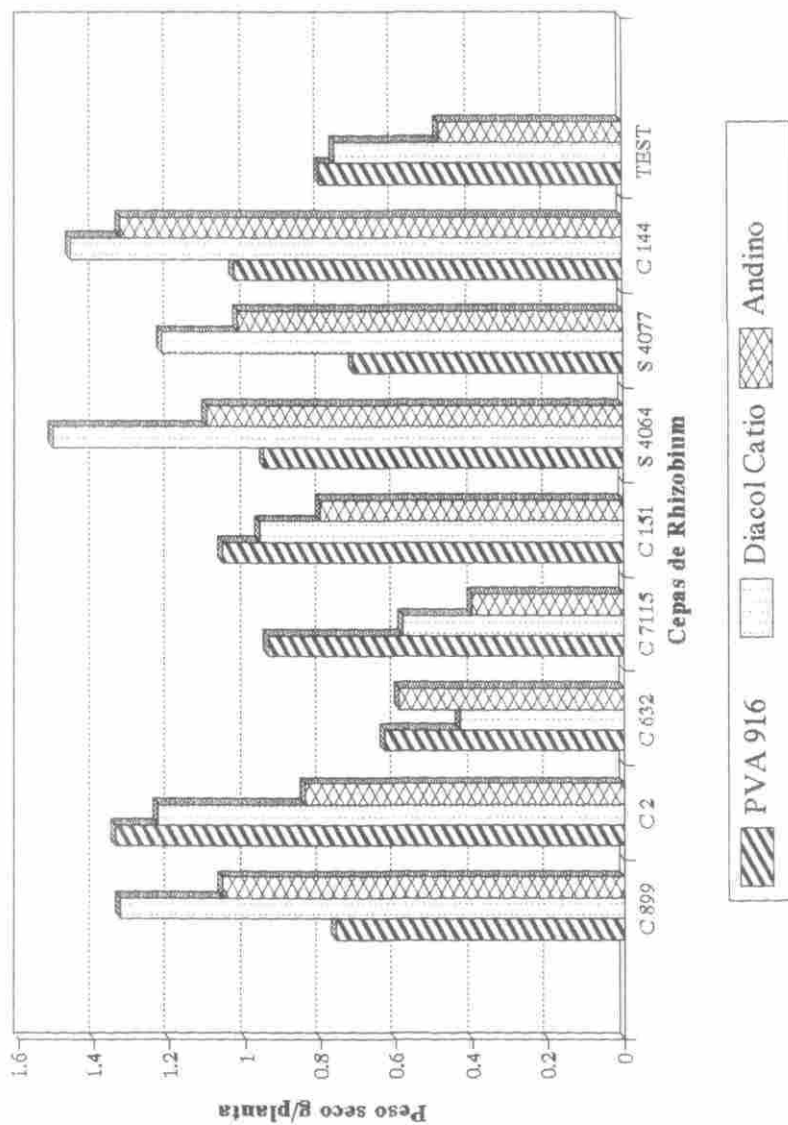
a/ Valores promedio de tres determinaciones

Datos con la misma letra dentro de una variable no son significativa alfa = 0.05

Se hizo un análisis de varianza incluyendo las tres variedades de frijol del ensayo 2. Se encontró que entre las variedades, existe diferencia altamente significativa para la variable rendimiento, pero no para absorción de nitrógeno en parte aérea de la planta. También existe diferencia altamente significativa entre las fuentes de nitrógeno (testigo, control y tratamientos inoculados) para las dos variables mencionadas anteriormente. La figura 1 permite comparar los resultados de rendimiento de la planta, en cada una de las variedades inoculadas con una misma cepa. Aquí se excluyeron los resultados del tratamiento control, ya que por sus valores tan altos quedaban fuera de la escala. Como se observa en la figura 1, solo las cepas CIAT 632 y CIAT 151 afectan el rendimiento independientemente de la variedad de frijol. La SEMIA 4064 y SEMIA 4077 presentan una respuesta similar en dos variedades. En las demás cepas la respuesta es diferente para cada variedad, luego existe la interacción de cepa/variedad. Esta situación presenta desventaja, ya que el comportamiento observado no se puede extrapolar a otras variedades de frijol, sino que sería necesario evaluar las múltiples combinaciones cepa/hospedero.

Al analizar el efecto de la inoculación sobre las tres variedades consideradas en conjunto, para rendimiento y contenido de nitrógeno en la planta (tabla 2), se observa que con cualquiera de las variedades, la cepa CIAT 144 es la que mayor cantidad de nitrógeno fija y por tanto la que produce el mayor rendimiento en la planta. Otras cepas que también son importantes, son la CIAT 899 en fijación de nitrógeno y la SEMIA 4064 en rendimiento. La cepa CIAT 899 ha sido considerada modelo en varios experimentos realizados para evaluar diferentes variedades de frijol en Estados Unidos (4) (16) y Brasil (17)(18). Podrían ser promisorias para futuros ensayos la CIAT 2 y la SEMIA 4077. No se recomendaría inocular las variedades de frijol ensayadas con la CIAT 7115 y la CIAT 632, puesto que mostraron un comportamiento cercano o similar al del tratamiento testigo. La cepa CIAT 151, aunque presentó unos resultados intermedios, que estadísticamente no son diferentes a los de las consideradas como mejores, tampoco se recomendaría; ya que como se dijo anteriormente su capacidad noduladora no siempre trasciende en la mayor cantidad de nitrógeno fijado, por lo menos en las variedades probadas en este trabajo. Aunque las cepas de las colecciones internacionales se recomiendan como buenas fijadoras en un gran número de variedades, siempre es necesario probarlas con las variedades locales, ya que el sistema frijol/*Rhizobium* presenta alguna especificidad cepa/hospedero, en este caso, aparentemente hay más afinidad con la cepa de *Rhizobium tropici* CIAT 899 que por las cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* CIAT 151 y CIAT 632. (19)

Fig 1. Efecto de la Inoculación sobre el Rendimiento de Frijol (Ensayo 2)



BIBLIOGRAFIA

1. Graham, P. H.; Temple S.R. *Plant and Soil*, **1984**, 82, 315-327.
2. Bohlool, B. B.; Indha, J. K.; Garrity, D. P.; George, T. *Plant and Soil*, **1992**, 141, 1-11.
3. Trigos, R.; Fassbender, H.W. *Turrialba*, **1973**, 23, 172-179.
4. Pereira, P. A. A.; Burris, R.H.; Bliss, F.A. *Plant and Soil*, **1989**, 120, 171-179.
5. Giller, K. E. *Soil use and Management*, **1990**, 6, 82-84.
6. Piha, M. I.; Munns D. N. *Plant and Soil*, **1987**, 98, 169-182.
7. Duque, F.; Neves, M. C. P.; Franco, A. A.; Victoria, R. L.; Boddey, R. *Plant and Soil*, **1985**, 88, 335-343.
8. Lalonde, R.; Bigwaneza, P. C.; Antoun, H. *Plant and Soil*, **1990**, 121, 41-46.
9. Ramos, M. L. G.; Boddey, R. M. *Soil Biol. Biochem.*, **1987**, 19, 171-177.
10. Franco, A. A.; Munns, D. N. *Plant and Soil*, **1982**, 66, 149-160.
11. Centro Internacional de Agricultura Tropical. *Simbiosis Leguminosa-Rizobio. Manual de métodos de evaluación selección y manejo agronómico*. CIAT, Cali, Colombia **1988**.
12. Black, C. A. *Methods of Soil Analysis*. American Society of Agronomy Ins. Madison, Wisconsin. USA. **1965**, 1262-1268
13. Steel, R. G. D.; Torrie, J.H. *Bioestadística. Principios y Procedimientos*. McGraw Hill Book Co. Bogotá. **1985**, 134-138, 181-184, 328-334.
14. Meckly, R. J. *Advances in Applied Microbiology*. **1978**, 24, 1-53.
15. Van Schoonhoven, A.; Voysest, O. *Common Beans: Research for crop improvement*. RedWood Pres Ltd. Wilshire. **1991**, 779-781.
16. Wolff, A. B.; Singleton P. W.; Sidirelli M.; Bohlool, B. B. *Soil Biol. Biochem.*, **1993**, 25, 715-721.

17. Hungria, M.; Franco, A.A.; Sprent, J. *Plant and Soil*, **1993**, 149, 103-109.
18. Pereira, P.A.A.; Bliss, F.A. *Plant and Soil*, **1987**, 104, 79-84.
19. Martínez, E.; Segovia, L.; Martins, F.; Franco, A.A.; Graham, P.H.; Pardo, M.A. *Int. J. Syst. Bact.* **1991**, 41, 417-426.