

FALTA DE RESPUESTA A LA INOCULACION DE POROTO ALUBIA CON CEPAS DE *Rhizobium phaseoli* EN EL NOROESTE ARGENTINO

J. L. Boiardi (1), E. A. Arrarás (1), L. A. Mazza (2) y A. P. Balatti (2)

Recibido: 30/12/82

Aceptado: 5/9/83

RESUMEN

El poroto tipo alubia es uno de los cultivos de secano más importantes del Noroeste Argentino. En este cultivo no es usual la práctica de la inoculación. Debido a este hecho es que se realizó el siguiente estudio para evaluar el comportamiento de 4 cepas de *Rhizobium phaseoli* frente a esta leguminosa. Además se evaluó la competencia por los sitios de infección nodular entre las cepas introducidas y las autóctonas.

Las experiencias se realizaron en 2 etapas: a) en cámara de clima controlado y b) a campo (Cerrillos, Salta).

El ensayo a) mostró que las Cepas F 45, F 48 y 492 establecen una eficiente simbiosis. La cepa 4012, si bien fue infectiva, fue ineficiente en la fijación de nitrógeno. Las cepas F 48 y F 45 formaron los mayores porcentajes de nódulos y este valor varió con la presencia de nitrato de potasio en las jarras. En el ensayo a campo no se obtuvo respuesta a la inoculación y la nodulación obtenida fue muy baja. Las cepas introducidas formaron más del 80 por ciento de los nódulos frente a las cepas autóctonas, siendo la F 45 la más competitiva por los sitios de infección.

LACK OF RESPONSE TO INOCULATION OF ALUBIA TYPE BEANS WITH *Rhizobium phaseoli* STRAINS IN THE ARGENTINE NORTH WEST AREA

SUMMARY

Dry bean (alubia type) is one of the most important cultivation in the unwater lands of the Argentinian Northwest.

Inoculation is not frequently used. For this reason it was decided to evaluate the behavior of four *Rhizobium phaseoli* strains with that leguminous. Competence between the natives and foreign strains for the nodule infection sites were studied.

Experiments were performed under two conditions: 1) in a controlled climate chamber and 2) a field study (Cerrillos, Salta).

The experiment performed in controlled climate chamber shows that F 45, F 48 and 492 strains have a good symbiotic efficiency. 4012 strain while infective is not effective in nitrogen fixation. F 48 and F 45 produced the higher percentage of nodules, which was dependent of the presence of mineral nitrogen.

Under field conditions inoculation was ineffective, nodulation was very low respect to that in controlled climate chamber.

In spite of the low nodulation, foreign strains produced more than 80 % of the nodules respect to native ones, being F 45 the most competitive for the infection sites.

-
- (1) Centro de Investigación y Desarrollo de Fermentaciones Industriales.
 - (2) Area Tecnología Bioquímica y Farmacéutica, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Calle 47 y 115, (1900) La Plata, Buenos Aires, Argentina.

INTRODUCCION

Según informes de la FAO (1982) el área sembrada de poroto seco en el Noroeste Argentino es superior a las 200.000 hectáreas y de acuerdo a informes recientes de técnicos del INTA (Informe de Comisión presentado por los Ings. Agrs. Diéguez, R. N. y Pacheco Basurco, J. C., en lo atinente a la labor desarrollada en la EERA Salta, 29 de abril de 1981) esta leguminosa no es inoculada con *Rhizobium phaseoli*. Es por este motivo que se iniciaron experimentos a fin de estudiar el comportamiento de cepas introducidas (recomendadas por las instituciones de donde provienen) y también de la población nativa de este microorganismo.

Es conocido el poco éxito que ha tenido a nivel mundial la inoculación de *Phaseolus vulgaris* según trabajos de recopilación realizados por Graham (1978) y Graham y Halliday (1977), aunque de acuerdo a lo informado por Graham y Rosas (1977), es posible alcanzar tasas de fijación de Nitrógeno, en esta simbiosis, superiores a las logradas para otras leguminosas. Por otra parte, Graham y Hubbel (1975) destacan la necesidad de realizar más investigación para aclarar aspectos relacionados con la nodulación y fijación de Nitrógeno de este cultivo tropical.

Los experimentos descriptos en este trabajo tienen carácter preliminar y servirán como base para un estudio más detallado de los factores que afectan dicha simbiosis.

MATERIALES Y METODOS

1. Cepas

Se utilizaron las cepas de *Rhizobium phaseoli* F 45 y F 48 del INTA Castelar; y 4012 y 492 del MIRCEN (Microbiological Resources Center) Porto Alegre, Brasil.

2. Semillas

El huésped empleado fue poroto (*Phaseolus vulgaris*) tipo blanco, variedad alubia, selección Cooperadora, provista por el INTA

Cerrillos (Salta), por ser el cultivar más difundido en el Noroeste Argentino, FAO (1982).

3. Esterilización de las semillas

Las mismas fueron esterilizadas en superficie mediante el tratamiento con $HgCl_2$ al 0,1 por ciento y alcohol de 96° según lo recomendado por Vincent (1970).

4. Obtención de las suspensiones bacterianas

Los caldos de *Rhizobium phaseoli* fueron obtenidos según la metodología empleada por Boiardi et al. (1983).

5. Obtención de los antisueros específicos

Fueron obtenidos por inoculación de conejos albinos machos de 2,5 kg de peso y de acuerdo a la metodología propuesta por Schmidt et al. (1968).

6. Diseño de la experiencia en cámara

Se empleó un diseño enteramente al azar con 5 repeticiones de los siguientes tratamientos:

- a) Jarras inoculadas con la cepa F 45.
- b) Jarras inoculadas con la cepa F 48.
- c) Jarras inoculadas con la cepa 492.
- d) Jarras inoculadas con la cepa 4012.
- e) Jarras inoculadas con la mezcla de cepas.
- f) Jarras inoculadas con la mezcla de cepas + 50 ppm de Nitrato de Potasio.
- g) Testigo sin inocular.

7. Diseño de la experiencia a campo

La misma fue realizada en el INTA Cerrillos (Salta) con un diseño en bloques casualizados con 4 repeticiones de los siguientes tratamientos:

- a) Parcelas inoculadas con inoculante convencional de la cepa F 45 + 60 kg/ha de $P_2 O_5$ (F 45-P).

- b) Parcelas inoculadas con inoculante convencional de la cepa F 48 + 60 kg/ha de P_2O_5 (F 48-P).
- c) Parcelas inoculadas con inoculante convencional de la cepa 492 + 60 kg/ha de P_2O_5 (492-P).
- d) Parcelas inoculadas con inoculante convencional de mezcla de cepas + 60 kg/ha de P_2O_5 (M-P).
- e) Parcelas inoculadas con inoculante convencional de la mezcla de cepas + 60 kg/ha de P_2O_5 + 60 kg/ha de Nitrógeno como Sulfato de Amonio (M-P-N).
- f) Parcelas inoculadas con inoculantes granulados de la mezcla de cepas + 60 kg/ha de P_2O_5 (MG-P).
- g) Parcelas inoculadas con inoculante convencional de la mezcla de cepas sin fertilizar (M).
- h) Testigo sin inocular + 60 kg/ha de P_2O_5 (T-P).

Estas parcelas fueron ubicadas de forma tal de bloquear la pendiente local del 1 por ciento.

8. Unidades experimentales, siembra y recolección de las plantas en cámara

Se utilizaron jarras tipo Leonard modificadas (Vincent, 1970) cubiertas externamente con papel de aluminio y llenas de una mezcla de arena (95 por ciento) y carbón vegetal (5 por ciento). Estas unidades fueron esterilizadas durante 1 hora a 121°C. En cada jarra se colocaron 2 semillas desinfectadas y pregerminadas. Las condiciones empleadas en la cámara fueron: T° diurna 28°C; T° nocturna 14°C; fotoperíodo 13,5 hs y humedad superior al 60 por ciento (Coincidentes con valores medios del área de cultivo). Las plantas fueron recogidas para su evaluación a los 45 días de la siembra (en prefloración) y los resultados se expresan por jarra.

Las macetas fueron regadas con 1 litro de solución nutritiva de Norris (1968) dos veces durante el experimento (al inicio y a los 20 días). Los restantes riegos fueron realizados con agua destilada cada vez que fue

necesario variando la frecuencia de los mismos con el desarrollo vegetal. En el caso del tratamiento adicionado con Nitrógeno las jarras fueron regadas al inicio del ensayo (únicamente) con una solución de Nitrato de Potasio de forma tal de obtener una concentración de 50 ppm de Nitrógeno en las macetas.

9. Unidades experimentales, siembra y recolección de las plantas a campo

Se utilizaron parcelas de 6 surcos de 3 m de largo, distanciados 70 cm, con una separación entre ellas de 1,40 m y 2 m entre bloques.

Los análisis de suelo arrojaron los siguientes valores promedio: pH 6,67 (en pasta saturada), Nitrógeno 0,180 g por ciento, Fósforo disponible 8,7 ppm (según Bray Kurtz N° 1) y textura franco arcillosa.

La siembra fue realizada a fines de febrero. La misma se hizo a mano de manera de obtener, luego de raleo, 14 plantas/m (200.000 plantas/ha). Durante el transcurso del cultivo se realizaron las prácticas culturales recomendadas para esta especie.

Debido a que la concentración de Fósforo media del terreno es considerada de moderada limitación para el cultivo de poroto y dada la gran importancia de este mineral en el establecimiento de una adecuada simbiosis, es que se fertilizó con Fósforo. Las parcelas inoculadas y fertilizadas con Nitrógeno fueron introducidas como testigos de máxima. La fertilización se realizó en la emergencia, a mano sobre el surco.

A los 45 días de la siembra (prefloración) sobre 16 plantas del segundo y quinto surco se determinó: número de nódulos/planta, caracterización serológica de los mismos, peso seco y Nitrógeno total en parte aérea. Posteriormente se evaluó rendimiento en granos, por ciento Nitrógeno en granos y cantidad de plantas.

10. Inoculación en cámara

La inoculación de las raíces fue efectuada en el momento de la siembra por agrega-

do de 1 ml de una suspensión bacteriana obtenida como se indica en el punto 4, con una concentración de 1×10^9 cél/ml. En el caso del tratamiento inoculado con mezcla de cepas la suspensión utilizada contenía la misma concentración de cada una de las cepas.

11. Inoculación a campo

El inoculante convencional empleado, fue obtenido usando como vehículo turba proveniente de Tierra del Fuego y elaborado según Balatti y Mazza (1970).

El inoculante fue agregado a la semilla en dosis masiva empleando el método húmedo con una solución de goma arábiga al 40 por ciento P/V.

El inoculante granulado se obtuvo de igual forma que el convencional, pero en este caso el vehículo utilizado fue turba cuyo diámetro de partícula mínimo es de 400 micrones.

La inoculación con el inoculante granulado se realizó por aplicación directa del mismo sobre el surco de siembra con una dosis aproximada de 5 g por metro.

12. Determinación serológica de las cepas formadoras de nódulos

Esta determinación fue realizada sobre una suspensión obtenida por maceración de cada nódulo en 3 ml de solución salina (0,85 por ciento); 0,5 ml de esta suspensión (previa decantación de los restos del nódulo) se enfrentaron con 0,5 ml de cada uno de los antisueros de las cepas empleadas. Los tubos conteniendo las soluciones de antígenos y anticuerpos se incubaron semisumergidas durante 3 ó 4 horas a 52°C, tiempo al cabo del cual se leyeron los resultados. En todos los casos se incluyeron testigos de autoaglutinación.

El número de nódulos empleados para su identificación fue de 400 en el ensayo en cámara y de 250 en la experiencia a campo.

13. Determinaciones generales

a) peso seco de parte aérea y de nódulos:

el mismo fue realizado luego del secado en estufa a 65°C hasta peso constante.

- b) peso fresco: fue realizado por pesada directa, inmediata a la cosecha, de cada una de las plantas.
- c) Nitrógeno: el porcentaje de Nitrógeno fue evaluado por el método de Microkjeldahl (AOAC, 1970).
- d) Rendimiento: este parámetro fue evaluado utilizando como parcela útil los 2 surcos centrales dejando 25 cm de bordura en ambos extremos, corrigiendo los resultados a 14 por ciento de humedad.

14. Análisis de los resultados

Estos fueron sometidos al análisis de la varianza y se determinaron las diferencias significativas entre medias por el test de Tukey (Pimentel Gómez, 1978).

RESULTADOS

Los resultados de los experimentos se indican en los Cuadros 1, 2, 3 y 4.

DISCUSION

El Cuadro 1 muestra a las cepas F 48 y F 45 como las más eficientes en la fijación de Nitrógeno de acuerdo a los valores significativamente superiores de peso seco de parte aérea obtenidos. La cepa 492 presenta un valor de este parámetro que indica una aceptable tasa de fijación aunque inferior a las 2 cepas antes mencionadas. La cepa 4012, si bien es muy infectiva como lo indica el valor de peso seco de nódulos, es totalmente ineficiente en la fijación de Nitrógeno, ya que el valor de peso seco de parte aérea obtenido con la misma no difiere del testigo sin inocular.

Los tratamientos inoculados con la mezcla de cepas dan valores de peso seco de parte aérea inferiores a los obtenidos con las cepas F 48 y F 45. Este comportamiento podría ser atribuido a que los nódulos de estas plantas, fueron formados, además de por las cepas eficientes, por las restantes (492 y

A — Experiencia en cámara climatizada

CUADRO 1: Parámetros evaluados sobre el huésped.

1. Tratamiento	Peso seco de parte aérea (g/jarra)	2. Tratamiento	Peso seco de nódulos (mg/jarra)
F 45	5,8095	M + NO ₃ K	692,7
F 48	5,2806	Mezcla	542,2
M + NO ₃ K	4,4671	F 48	430,3
492	4,4597	F 45	412,0
Mezcla	4,2348	4012	410,7
4012	2,4721	492	344,9
Testigo	2,3210	Testigo	0,0

Cada valor corresponde a la media de las 5 repeticiones y aquellas unidas por el mismo trazo no difieren significativamente (Tukey P: 0,05).

CUADRO 2: Competencia por sitios de infección nodular.

Cepas	Tratamientos	
	Mezcla %	Mezcla + NO ₃ K %
F 48	80	52
F 45	12	27
492	5	13
4012	3	8

4012) como lo indica el Cuadro 2 y estas estirpes son menos eficientes en la fijación de Nitrógeno.

Respecto a la nodulación, las cepas eficientes dan un adecuado valor de peso seco de nódulos, pero idéntico comportamiento presentan las estirpes restantes (492 y 4012). Estos resultados confirman los obtenidos por otros autores (Thompson *et al.*, 1974; Vidor *et al.*, 1978) que informaron la no existencia de una relación directa entre masa o número de nódulos y eficiencia de los mismos.

El valor excepcionalmente alto de nodulación obtenido en el tratamiento inoculado con la mezcla de cepas adicionado con Nitrógeno contraría una vasta bibliografía al respecto (revisada por Dart, 1977; Pate, 1977, entre otros), que indica la inhibición de la

nodulación por el Nitrógeno combinado. Sin embargo coinciden con lo informado por Guss y Döbereiner (1972) para *Phaseolus vulgaris* que muestran que para dosis de Nitrógeno de hasta 46 ppm se presenta un incremento en la nodulación. Además otros autores (Oghoghorie y Pate, 1971; Pahwa y Rao, 1974; Heichel y Vance, (1979) encontraron este estímulo de la nodulación a tenores bajos de Nitrógeno para otras leguminosas. Este comportamiento se obtiene si el agregado de Nitrógeno se realiza simultáneo a la siembra y según Guss y Döbereiner (1972) esto es debido a que este mineral previene la etapa de deficiencia crítica que tiene lugar una vez agotada la reserva de la semilla.

La mezcla de cepas sin la adición de Nitrógeno produjo mayor nodulación, fenómeno también observado por Heichel y Vance (1979).

La cepa F 48 fue la que mayor porcentaje de nódulos formó aunque este valor varió con el ambiente donde se desarrolló la planta (porcentajes de nódulos en los tratamientos con y sin Nitrógeno), por lo tanto el valor de competitividad así obtenido sólo sirve como dato preliminar para el diseño de la experiencia a campo.

En el ensayo a campo (Cuadro 3), la inoculación en ningún caso aumentó el peso de las plantas, su contenido en Nitrógeno, el

B - Experiencia a campo

CUADRO 3: Parámetros evaluados sobre el huésped.

	1	2	3	4	5
F 45-P	20,5	M-P+N 11,67	M-P+N 467	F 45-P 680	F 45-P 27,78
M-P	18,4	MG-P 10,40	MG-P 360	MG-P 630	M-P+N 27,31
492-P	18,3	M-P 9,55	M-P 320	F 48-P 608	F 48-P 26,48
MG-P	17,7	492-P 9,20	F 48-P 314	M-P+N 589	MG-P 26,33
F 48-P	15,1	F 48-P 8,94	F 45-P 309	492-P 562	492-P 22,88
T-P	10,7	F 45-P 8,59	492-P 266	T-P 520	M-P 22,85
M-O	9,3	T-P 7,36	T-P 241	M-P 513	T-P 21,91
M-P+N	5,6	M-O 6,33	M-O 233	M-O 378	M-O 17,41

Las medias unidas por el mismo trazo no discrepan entre sí en forma significativa (Tukey, P: 0,05).

CUADRO 4: Competencia por sitios de infección nodular (%).

Cepas	6				Media %
	M-P %	M-P+N %	M-O %	MG-P %	
F 45	45	64	54	48	54
F 48	5	9	13	16	12
492	18	9	17	23	20
Sin identificar	13	18	16	13	14

1. Número de nódulos por planta (media de 15 plantas) C.V. 25%. 2. Peso seco de parte aérea en g/planta (media de 15 plantas) C.V. 16%. 3. mg de N en parte aérea (media de 15 plantas y 3 Kjeldahl) C.V. 15%. 4. Rendimiento en grano en g/parcela (corregido por humedad) C.V. 25%. 5. N en grano en g/parcela (media de 3 Kjeldahl) C.V. 30%. 6. Porcentaje de nódulos formados por cada cepa.

rendimiento en granos o Nitrógeno y las diferencias surgidas se deben exclusivamente a la fertilización. El número de nódulos obtenidos es bajo y está influenciado negativamente por la fertilización nitrogenada, incluso en los formados por cepas nativas. Las concentraciones de Nitrógeno alcanzadas en los ensayos fertilizados con Sulfato de Amonio superan el tope hasta el cual se produce un estímulo de la nodulación (Gibson, 1977).

La presencia de Fósforo aumenta el número de nódulos, pero sólo con valores significativos para la cepa F 45. Este comportamiento ha sido citado en numerosos trabajos de acuerdo a la revisión de Mooy *et al.*, (1973).

Hay población natural de *Rhizobium*, pero los nódulos fueron formados en todos los casos en más de un 80 por ciento por las cepas introducidas. Este porcentaje tan alto probablemente se deba a la inoculación masiva que se realiza en este tipo de ensayos, ya que, de acuerdo a lo reportado por algunos autores las cepas introducidas (en las dosis habituales) sólo forman un pequeño porcentaje de nódulos frente a las cepas autóctonas (Johnson *et al.*, 1965; Weaver y Frederik, 1974).

En cuanto a la competitividad entre cepas, la F 45 es la que mayor porcentaje de nódulos formó y este resultado discrepa con el obtenido en cámara climatizada (igual comportamiento fue observado entre las cepas S-100 y 5019 de *Rhizobium japonicum*). Este comportamiento es atribuible a las diferencias ambientales de los dos ensayos y en este caso también a la presencia de las cepas autóctonas, como lo indican Das y Badhuri (1974).

No existen diferencias en cuanto al com-

portamiento de los inoculantes usados (granulado y convencional).

CONCLUSIONES

Los resultados de estas experiencias demuestran la necesidad de hallar cepas, ya sea introducidas o aisladas de esa región, que establezcan una adecuada simbiosis y además estudiar los factores que afecten a la misma.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la colaboración prestada en el ensayo a campo al personal del INTA Cerrillos, y en especial al Ing. Agr. Sosa Quiroga, R.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Balatti, A. P.; L. A. Mazza, 1970. Producción de inoculantes para leguminosas. *ION*, 30: 270-275.
- 2) Boiardi, J. L.; A. P. Balatti y L. A. Mazza, 1983. Cultivos de *Rhizobium phaseoli* en sistema sumergido. Revista de la Facultad de Agronomía, 4 (3): 19-27.
- 3) Dart, P., 1977. Infection and Development of Leguminous Nodules, in: A Treatise on Dinitrogen Fixation, Sect. 3, Chap. VII. Ed.: John Wiley & Sons, New York, 675 p.
- 4) Das, S. N. and P. N. Badhuri, 1974. Host-Rhizobium interaction between *Phaseolus vulgaris* L. and *Rhizobium phaseoli*. *Proc. Ind. Natl. Sci. Acad. Pt. B. Biol. Sci.* 40: 554-561.
- 5) de Mooy, C. Y. and J. Pesek, 1966. Nodulation responses of soybeans to added phosphorous, potassium and calcium salts. *Agronomy Journal* 58: 275-280.
- 6) Gibson, A. H., 1977. The influence of the environment and Managerial Practices on the legume-Rhizobium symbiosis, in: A Treatise on Dinitrogen Fixation, Sect. 4, Chap. XI. Ed. John Wiley & Sons, New York, 527 p.
- 7) Graham, P. H. and D. H. Hubbel, 1975. Legume-Rhizobium relationships in Tropical Agriculture, in Doll, E. C. and Mott, G. O. Eds. Symposium of Tropical Farages in Livestock Production Systems. Las Vegas, Nevada 1973. Proceedings American Society of Agronomy (ASA) Madison, Wisconsin. Special Publication No 24.
- 8) Graham, P. H. and J. Halliday, 1977. Inoculation and Nitrogen Fixation in the genus *Phaseolus*. In Workshop on Exploring the Legume-Rhizobium symbiosis in Tropical Agriculture. Maui, Hawaii 1977. Proceedings, Ed. J. M. Vincent. Dept. of Agronomy and Soil Science, Honolulu University of Hawaii. Misc. publication No 145.
- 9) Graham, P. H. and J. C. Rosas, 1977. Growth and development of indeterminate bush and climbing cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. inoculated with *Rhizobium phaseoli*. *Journal of Agricultural Science*, 88: 503-508.
- 10) Graham, P. H., 1978. Variación entre cultivares de *Phaseolus vulgaris* en la fijación simbiótica de Nitrógeno y estrategia para el desarrollo de variedades mejoradas con amplia fijación. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) Cali, Colombia, serie SE-17-78, 22 p.
- 11) Guss, A. y J. Döbereiner, 1972. Efeito da adubação nitrogenada e da temperatura do solo no fixação da nitragênio em feijão. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira Serie Agronomia*, 7: 97-92.
- 12) Heichel, G. H. and C. P. Vance, 1979. Nitrate-N and Rhizobium Strains role in Alfalfa Seedling Nodulation and growth. *Crop Science*, 19: 512-518.
- 13) Johnson, H. W. U. M. Means and C. R. Weber, 1965. Competition for nodule sites between strains of *Rhizobium japonicum* applied as inoculum and strains in the soil. *Agronomy Journal*, 57: 179-185.
- 14) Norris, D. O., 1964. Techniques used in Works with Rhizobium. In: Some Concepts and Methods in Subtropical Pasture Research. Coom. Bureau of Pastures and Field Crops, Hurley, Berkshire, England. Bull. No 47, p. 186-198.
- 15) Official Methods of Analysis of the Association Official Analytical Chemists. Eleven Edition 16, 1970. Ed.: Horowitz H. Pub. AOAC, Washington.
- 16) Oghoghorie, C. G. and J. S. Pate, 1971. The nitrate stress syndrome of the nodulated field pea (*Pisum arvense* L), in: Lie, T.A. & Mulder, E. G. Eds. Biological Nitrogen Fixation in Natural and Agricultural Habitats. Plant and soil special Volume, 185-202.
- 17) Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 1982. Ed: Oficina Regional para América Latina, Santiago de Chile. Situación actual de las leguminosas alimenticias en Argentina, Paraguay y Uruguay.
- 18) Pahwa, M. R. and S. Rao, 1974. A comparative study of the effects of certain nitrogen sources on nodulation in lucerne (*Medicago sativa* L). *Sci. Cult.*, 40: 254-258.
- 19) Pate J. S., 1977. Functional Biology of Dini-

- trogen Fixation by Legumes. In: A Treatise on Dinitrogen Fixation, Sect. III, Cap. IX. Ed. John Wiley & Sons, New York, 675 p.
- 20) Pimentel Gómez, F., 1978. Curso de Estadística Experimental. Editorial Hemisferio Sur S.A.
- 21) Schmidt, E. A.; R. O. Bankole and B. B. Bohlool, 1968. Fluorescent Antibody Approach to Study of Rhizobia in Soil. *Journal of Bacteriology*, 95: 1987-1992.
- 22) Thompson, J. A.; R. J. Roughley and D. F. Herridge, 1974. Criteria and methods for comparing the effectiveness of Rhizobium strains for pasture legumes under field conditions. *Plant and Soil*, 40: 511-524.
- 23) Vidor, C.; E. Brose y J. Soares Pereira, 1978. Competicao por sitio de infeccao nodular entre estirpes de Rhizobium japonicum em cultivares de soja. Presentado en la IX Relar, México 1978.
- 24) Vincent, J. M., 1970. A manual for the Practical Study of the Root Nodule Bacteria. International Biological Programme. London. Blackwell Scientific Publications. Oxford and Edinburg. 164 pp.
- 25) Weaver, R. W. and L. R. Frederik, 1974. Effect of inoculum rate on competitive nodulation of Glycine max (L) Merril. II Field Studies. *Agronomy Journal*, 66: 233-236.
-