

Efectividad de cepas rizobianas nativas de sabana en *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv. C4A-3

Effectiveness of savannah native rhizobial strains in *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv. C4A-3

Juliana Mayz¹, América Lárez², Nilda Alcorcés³

Resumen

Se estima que la población mundial se incrementará y demandará mayor cantidad de alimentos y uso de fertilizantes nitrogenados. En Venezuela, el frijol es altamente consumido y se cultiva en las sabanas orientales, cuyas características edáficas pueden afectar negativamente la población rizobiana. Estos planteamientos refuerzan la importancia de la evaluación de la flora rizobiana nativa, y enfatizan la necesidad de aumentar la explotación de la fijación biológica de nitrógeno. En este contexto, se evaluaron 6 cepas rizobianas en el cultivar C4A-3, aisladas, de frijol cv. Tejero Criollo y previamente catalogadas como efectivas (JV91, JV94 y JV101) e inefectivas (JV99, JV103, y JV104) en el cultivar TC9-6. El experimento se llevó a cabo en umbráculo por 45 días, donde además se incluyeron dos tratamientos control no inoculados. La suspensión de las cepas individualmente cultivadas se usó para inoculación. De acuerdo con la tipología de la nodulación (número de nódulos, peso total y por nódulo, tamaño y color), los valores de los parámetros de crecimiento (peso seco, altura y número de hojas del vástago) y los estimados de la concentración de nitrógeno y nitrógeno total, las cepas JV91, JV99 y JV101, fueron las más efectivas en la fijación de nitrógeno. El nitrógeno total y la concentración de nitrógeno tuvieron una correlación significativa con peso seco, altura y número de hojas del vástago. Los resultados muestran la existencia de cepas efectivas en los suelos de sabana para este cultivar, y enfatizan la importancia de evaluar las cepas indígenas, antes de proceder a la inoculación con foráneas.

Palabras clave: *Rhizobium*, frijol, fijación de nitrógeno, Venezuela.

1 Bióloga, M.Sc. Ph.D., Universidad de Oriente, Núcleo de Monagas, Campus "Juanico", Laboratorio de Rizobiología, Maturín, Estado Monagas, Venezuela. julianamayz@cantv.net.

2 Ingeniero Agrónomo, M. Sc., Universidad de Oriente, Núcleo de Monagas, Campus "Juanico", Herbario UOJ, Maturín, Estado Monagas, Venezuela.

3 Bióloga, M. Sc., Universidad de Oriente, Núcleo de Monagas, Campus "Los Guaritos", Escuela de Ingeniería Agronómica, Departamento de Agronomía, Maturín, Estado Monagas, Venezuela.

Abstract

It has been estimated that the world-wide population will increase and demand higher amounts of food and nitrogen fertiliser use. There is large-scale cowpea consumption and cultivation on the eastern savannahs of Venezuela where soil characteristics may negatively affect the rhizobial population. Such approaches reinforce the importance of evaluating native rhizobial flora and emphasise the need for increasing biological nitrogen fixation exploitation. Six rhizobial strains isolated from cowpea cv. Tejero Criollo non-inoculated and previously catalogued as being effective (JV91, JV94 and JV101) and ineffective (JV99, JV103, and JV104) in cultivar TC9-6 were thus evaluated in the C4A-3 cultivar. The experiment was carried out in greenhouse conditions for 45 days where two non-inoculated control treatments were also included. A suspension of individually-cultivated strains was used for inoculation. The JV91, JV99 and JV101 strains were the most effective in terms of nitrogen fixation according to nodulation typology (nodule number, total dry weight per nodule and colour), growth parameter values (dry shoot weight, height and number of leaves) and nitrogen concentration and total nitrogen estimates. Total nitrogen and concentration correlated significantly with shoots' dry weight and height and the number of leaves. The results showed there were effective strains in savannah soils for this cultivar and emphasised the importance of evaluating indigenous strains before proceeding to inoculate with foreign strains.

Key words: *Rhizobium*, cowpea, nitrogen fixation, Venezuela.

Recibido: marzo 24 de 2010

Aprobado: noviembre 3 de 2010

Introducción

En las naciones pobres, con sustanciales problemas de hambre, un incremento en el uso de los fertilizantes nitrogenados elevaría considerablemente la disponibilidad de alimentos (Sánchez, 2002); sin embargo, la escasez de estos, principalmente por sus elevados costos, ha disminuido su uso, en contraposición con el incremento en la población y por ende de la demanda de alimentos, del hambre y la malnutrición.

La Academia Nacional de Ciencias de Estados Unidos (NAS, 1994) señaló que para el año 2050 se esperaba una población mundial de más de 5 billones. Además, indicó que el uso del nitrógeno fijado para la producción de los cultivos se duplicaría, y que si éste fuera suplido por fuentes industriales, el uso de los fertilizantes nitrogenados se incrementaría a alrededor de 160 millones de toneladas por año, lo cual requeriría cerca de 270 millones de toneladas de carbón o su equivalente. Esto requiere aumentar la explotación de la fijación biológica de nitrógeno (FBN) a fin de reducir la necesidad del fertilizante nitrogenado producido industrialmente, o reemplazar su uso. Galloway

y Cowling (2002) consideran que aproximadamente 120 TgN/año entran a los ecosistemas terrestres a través de los organismos procarióticos fijadores de nitrógeno, lo cual está en torno a un 55% del insumo total de nitrógeno, lo que acentúa la importancia de la FBN como un medio efectivo para la producción agrícola, amparado por el soporte internacional al desarrollo sostenible con uso de recursos renovables.

El frijol (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) es sembrado en dos tercios de los países en desarrollo, usualmente como un cultivo compañero de maíz u otros granos, siendo consumido por millones de personas a nivel mundial (Higuera *et al.*, 2001). Debido a su alto contenido de proteína (20-25%), se le denomina como la "carne del pobre" (Fall *et al.*, 2003). En Venezuela es producido en las sabanas orientales por pequeños productores, donde la mayoría de los suelos, de orden Ultisol, muestran deficiencias de calcio, fósforo y nitrógeno, pH ácido y toxicidad de aluminio y/o manganeso. Aunque ha sido comprobado que estas características edáficas afectan negativamente la población microbiana, incluyendo los rizobias, se han encontrado cepas efectivas para algunas especies, cultivares

o líneas de leguminosas, lo cual indica que las condiciones edáficas y climáticas determinan la población rizobiana nativa responsable de la fijación de nitrógeno en condiciones naturales, y refuerza la importancia de la evaluación de la flora indígena para ciertos cultivos.

A fin de identificar cepas rizobianas nativas con mayor capacidad de fijación de nitrógeno en el cultivar de frijol C4A-3, se evaluaron 6 cepas aisladas de plantas de frijol del cultivar Tejero Criollo no inoculadas y cultivadas en suelos de sabana del Estado Monagas.

Materiales y métodos

El experimento se llevó a cabo en el umbráculo del Postgrado en Agricultura Tropical de la Universidad de Oriente, Estado Monagas, Venezuela, donde se evaluaron 6 cepas rizobianas (JV91, JV94, JV101, JV99, JV103 y JV104) en el cultivar de frijol C4A-3 proveniente del programa de mejoramiento genético de la Escuela de Agronomía de la Universidad de Oriente (Valladares, 1990).

Las cepas fueron obtenidas de nódulos (2-3 mm de diámetro) desarrollados en la raíz principal de plantas del cultivar Tejero Criollo sembrado en suelo no inoculado de sabana del Estado Monagas, Venezuela, siguiendo el procedimiento de Somasegaran y Hoben (1994).

Los extractos acuosos de los nódulos se sembraron en placas con agar de extracto de levadura y manitol (YMA) con rojo congo (10 mL⁻¹ de una solución acuosa 1:400), las cuales fueron incubadas a temperatura ambiente por 10 días, con observación periódica a fin de detectar la aparición de las colonias. La autenticación de las colonias catalogadas como presuntos rizobia (colonias con poca o ninguna absorción de rojo congo) se llevó a cabo en el cultivar de origen sembrado en bolsas de germinación (diSPo growth pouches, Scientific Products, Div. of American Hospital Supply Corp.) con 75 ml de solución de Sandman (CIAT, 1988) inoculadas con 1 ml de suspensión individual de las cepas. Dos bolsas por cepa se colocaron

a temperatura ambiente bajo iluminación con luz blanca fluorescente (16 lámparas de 40 W cada una). A intervalo interdiario la solución nutritiva fue reemplazada al volumen inicial y las plantas fueron inspeccionadas diariamente hasta los 30 días para chequear la aparición de los nódulos.

Los aislados autenticados como rizobia (formadores de nódulos) fueron caracterizados de acuerdo con su tasa de crecimiento (tiempo en días de aparición de las colonias en placas con YMA), producción de ácido o alcali (YMA con azul de bromotimol: 8×10^{-3} gL⁻¹) y utilización de citrato (agar citrato de Simmons suplementado con 0,4 gL⁻¹ de extracto de levadura). Las cepas JV91 y JV94 resultaron de crecimiento lento (tiempo de aparición de colonias mayor de 5 días), productoras de álcali y no utilizadoras de citrato; mientras que las cepas JV99, JV101, JV103 y JV104 fueron de crecimiento rápido (tiempo de aparición de las colonias menor o igual a 5 días), productoras de ácido y no utilizadoras de citrato (Mayz *et al.*, 2003). Estas cepas han sido evaluadas en el cultivar de frijol TC9-6, donde se comportaron como efectivas (JV91, JV94, JV101) e inefectivas (JV99, JV103, y JV104) (Mayz *et al.*, 2003).

En el presente ensayo se incluyeron dos tratamientos control no inoculados: uno fertilizado con KNO₃ (0,75 gL⁻¹ de solución nutritiva):(N1) y otro sin fertilización nitrogenada:(N2). Se usó el diseño de bloques al azar con cuatro repeticiones por tratamiento.

Para la inoculación, las cepas fueron cultivadas en caldo de extracto de levadura y manitol (Somasegaran y Hoben, 1994) en un agitador orbital (60 rpm), por 5 días las de crecimiento rápido y 10 días las de crecimiento lento. Las plantas fueron inoculadas tres veces (al momento de la siembra, y tres y seis días más tarde) con 2 mL de inóculo (células activas mL⁻¹: 1,03-1,15 x 10⁹, OD₆₇₀). Las semillas seleccionadas por uniformidad de tamaño fueron superficialmente esterilizadas con 0,2% de Hg-Cl₂, luego lavadas varias veces con agua destilada estéril, y finalmente germinadas en cápsulas

de Petri estériles con papel húmedo a temperatura ambiente. Dos plántulas con radículas de 1,0-1,5 de largo fueron transferidas a materos plásticos con 4 kg de arena "sandblast" estéril. Una planta por pote fue dejada a los 8 días después de la siembra, la cual fue regada diariamente con solución nutritiva de Sandman (CIAT, 1988) y cosechada a los 45 días después de la siembra. Se evaluaron: el crecimiento de las plantas a través del peso seco, altura (desde el nudo cotiledonal) y número de hojas del vástago, y la nodulación por medio del número total de nódulos, del número de nódulos categorizados por color (rojos y blancos: inspección con lupa manual de cortes transversales a mano) y tamaño (≤ 1 , $>1-2$, $>2-4$, $>4-6$, >6 mm de diámetro, considerándose los nódulos como esferas) y del peso seco total y por nódulo. Los pesos secos se registraron después del secado en estufa a 65 °C por 72 h. La determinación del nitrógeno total de la parte aérea se realizó en un autoanalizador después de la digestión ácida de la materia seca por el procedimiento de Kjeldahl (AOAC, 2007).

Los datos fueron examinados por análisis de varianza convencional, de acuerdo con el diseño empleado y la correlación, y las diferencias entre los tratamientos se detectaron mediante la mínima diferencia significativa ($p \leq 0,05$), determinadas usando el programa estadístico Statistix 8.0 (Analytical Software, 2003).

Resultados y discusión

El crecimiento del frijol fue afectado por los tratamientos aplicados, señalado por los valores significativos encontrados en el análisis de varianza para el peso seco de la parte aérea, número de hojas y altura del vástago.

Las cepas JV91, JV99 y JV101 promovieron los mayores pesos secos, similares entre sí y al control no inoculado y abonado con nitrógeno. En contraste, las cepas JV94, JV103 y JV104 indujeron los menores valores de materia seca con diferencias significativas con respecto a las cepas JV91, JV99 y JV101, y al

tratamiento fertilizado (en promedio un 34% menos), no así en relación con el tratamiento no inoculado ni enmendado (N2), con el cual no mostraron diferencias (Tabla 1).

En cuanto al número de hojas y a la altura del vástago, la tendencia fue parecida a la presentada por la materia seca; es decir, los mayores valores para el número de hojas / planta fueron mostrados por las plantas inoculadas con las cepas JV91, JV99 y JV101, y el control no inoculado y fertilizado; similarmente, las mayores alturas del vástago se presentaron en las plantas cultivadas con los mismos tratamientos (respectivamente, JV99, JV91 y JV101, y no inoculadas y abonadas con nitrógeno: N1) (tabla 1). Las correlaciones entre el peso seco y la altura ($r=0,96$), y entre el peso seco y el número de hojas ($r=0,94$) del vástago fueron estadísticamente significativas ($p \leq 0,05\%$).

La nodulación de frijol fue influenciada por las cepas inoculadas, indicada por los valores significativos encontrados en el análisis de varianza para el número y peso seco total de nódulos, y para el peso seco por nódulo.

Las plantas inoculadas con las cepas JV91, JV94, JV99 y JV101, exhibieron el máximo número de nódulos, sin diferencias significativas entre sí; pero estadísticamente diferentes a los valores obtenidos con las cepas JV103 y JV104 (con un promedio de 29,00 nódulos/planta), las cuales mostraron los menores números y similares entre sí (figura 1).

Los nódulos inducidos por las cepas JV91, JV99 y JV101, presentaron mayor tamaño, si se consideran su peso seco total y por nódulo y el diámetro, quedando excluida la cepa JV94, la cual, a pesar de inducir un número de nódulos similar a JV91, JV99 y JV101, difirió drásticamente de éstas, por estimular nódulos de mucho menor tamaño (figura 1, tabla 2). Esta cepa, sin embargo, se comportó de manera contraria en el cultivar JV9-6 (Mayz *et al.*, 2003), donde indujo un elevado peso seco total y por nódulo, y en concordancia con estos parámetros y con el peso seco de la parte aérea y

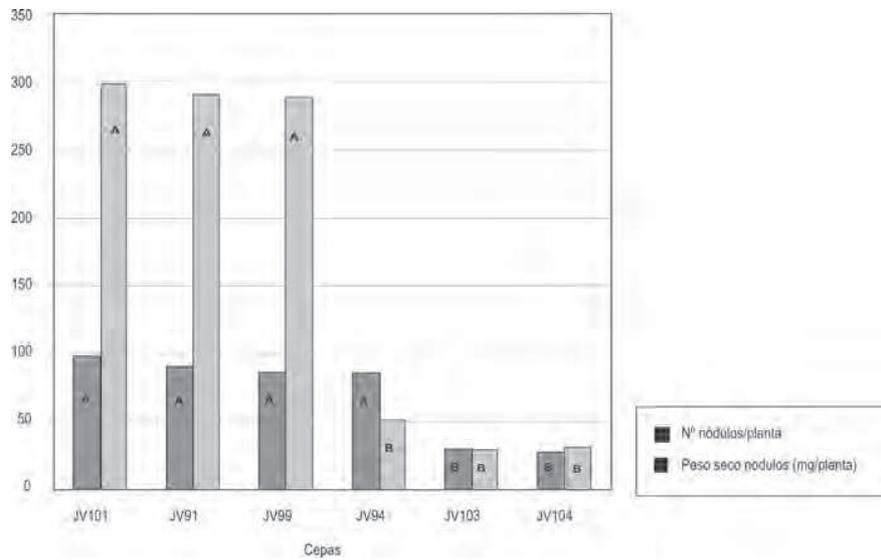


Figura 1. Variaciones en el número y peso seco de los nódulos de frijol, como resultado de la inoculación con cepas rizobianas (JV91-JV104). Letras

Tabla 1. Variaciones del número de hojas, de la altura del vástago de frijol y del peso seco de la parte aérea, en relación con la inoculación con cepas rizobianas y los tratamientos no inoculados con (N1) y sin fertilización (N2)

Tratamiento	Peso seco parte aérea (g/planta)	Tratamiento	Número de hojas/planta	Tratamiento	Altura del vástago (cm)
JV91	3,97±0,06 A	JV91	13,25±0,85 A	JV99	27,45±0,80 A
JV99	3,84±0,11 A	JV101	13,00±0,41 A	JV91	26,78±1,39 A
N1	3,84±0,12 A	N1	12,75±0,75 A	JV101	26,75±0,62 A
JV101	3,83±0,10 A	JV99	12,25±0,85 A	N1	25,20±1,11 A
N2	1,20±0,07 B	JV104	6,50±0,65 B	N2	13,60±0,96 B
JV94	1,18±0,05 B	JV94	6,00±0,41 B	JV104	12,48±0,33 B
JV103	1,15±0,10 B	JV103	5,75±0,63 B	JV94	12,48±0,74 B
JV104	1,15±0,08 B	N2	5,50±0,65 B	JV103	12,33±0,32 B

Letras distintas indican promedios estadísticamente diferentes (Prueba de la mínima diferencia significativa, $p \leq 0,05$).

Tabla 2. Cambios en el peso seco, color y tamaño de los nódulos de frijol inducidos por la inoculación de cepas rizobianas, a los 45 días de crecimiento

Cepa	Peso seco/nódulo (mg)		Color	Tamaño (mm)
JV99	3,34±0,11	A	Rojos	>4-6
JV91	3,20±0,08	A	Rojos	>4-6
JV101	3,02±0,26	A	Rojos	>4-6
JV104	1,11±0,47	B	Blancos	>1-2
JV103	1,00±0,60	B	Blancos	>1-2
JV94	0,60±0,10	B	Blancos	<1, >1-2

Letras distintas indican promedios estadísticamente diferentes (Prueba de la mínima diferencia significativa, $p \leq 0,05$).

su contenido de nitrógeno total, fue clasificada como efectiva. Similarmente, se resalta la conducta de la cepa JV99, la cual, con base en los parámetros anteriormente mencionados, fue catalogada como inefectiva en el cultivar JV9-6 (Mayz *et al.*, 2003).

La concentración de nitrógeno y el contenido de nitrógeno total de la parte aérea fueron afectados por los tratamientos aplicados, indicado por los valores significativos encontrados en el análisis de varianza para ambas mediciones. Estas evaluaciones siguieron un patrón similar al peso seco del vástago, con los mayores valores presentados por las plantas inoculadas con las cepas JV91, JV99 y JV101, similares entre sí, y al control no inoculado y fertilizado: N1 (tabla 3). Las correlaciones de la concentración de nitrógeno con el peso seco ($r=0,98$), la altura de la planta ($r=0,96$) y el número de hojas ($r=0,93$) fueron estadísticamente significativas ($p \leq 0,05\%$); asimismo, lo fueron las correlaciones entre el nitrógeno total y estos parámetros, $r=0,99$, $0,96$ y $0,93$ respectivamente.

De acuerdo con las mediciones de nodulación —número total de nódulos, del número de nódulos categorizados por color (rojos y blancos) y tamaño (≤ 1 , $>1-2$, $>2-4$, $>4-6$, >6 mm de diámetro), considerándose los nódulos como esferas— y del peso seco total y por

nódulo de componentes del crecimiento (peso seco, altura y número de hojas del vástago), nitrógeno total y concentración de nitrógeno, las cepas evaluadas pueden catalogarse como inefectivas (JV94, JV103 y JV104) o efectivas (JV91, JV99 y JV101) en la fijación de nitrógeno en el cultivar de frijol CA4-3. Si estas cepas efectivas son competitivas en condiciones naturales, lo cual no es posible definir en este ensayo, ellas representarían importantes microsimbiontes alternativos para este cultivar si es sembrado en un suelo de sabana donde no existan cepas efectivas. Se ha señalado que la competitividad entre cepas es un factor clave para el éxito de la inoculación; así, son varios los trabajos que enfatizan esta característica: Palaniappan *et al.* (1997), usando soya cultivada en dos tipos de suelo y las cepas nativas SSF4, SSF5, SSF6, SSF7 y SSF8, encontraron que la cepa SSF8 fue la más efectiva y competitiva, superior a la cepa comercial USDA 110; Malek *et al.* (1998) hallaron que la cepa nativa para *Astragalus sinicus*, *Rhizobium bukuii* bv. renga B3, ocupó la mayoría de los nódulos formados y fue más efectiva que la cepa ACM-18 aislada de *A. cicer*; Fenin y Danso (2002), en suelos de Ghana, encontraron cepas nativas efectivas con una alta capacidad de fijar nitrógeno, el crecimiento de las plantas noduladas fue equivalente al de los testigos fertilizados con 70 kgN/ha; Xa-

Tabla 3. Variaciones en la concentración de nitrógeno y en el contenido de nitrógeno total de la parte aérea de frijol, inducidas por los tratamientos aplicados, a los 45 días de crecimiento

Tratamiento	Concentración de nitrógeno (%)		Tratamiento	Nitrógeno total (mg/planta)	
JV91	4,40±0,25	A	JV91	174,77±11,50	A
JV101	4,29±0,16	A	JV101	164,06±5,52	A
N1	4,22±0,15	A	N1	161,97±8,24	A
JV99	4,15±0,10	A	JV99	159,62±7,09	A
JV104	1,95±0,03	B	N2	23,41±1,40	B
N2	1,93±0,05	B	JV104	23,41±1,81	B
JV103	1,89±0,07	B	JV94	22,00±0,98	B
JV94	1,87±0,05	B	JV103	21,74±2,25	B

Letras distintas indican promedios estadísticamente diferentes (Prueba de la mínima diferencia significativa, $p \leq 0,05$).

vier *et al.* (2006) observaron en frijol cultivado en Brasil y nodulado espontáneamente o por inoculación, una mayor eficiencia de las cepas indígenas que el inóculo comercial o las cepas foráneas.

A pesar de las condiciones del suelo de sabana (textura areno francosa, pH ácido, baja capacidad de intercambio catiónico y bajos contenidos de materia orgánica, calcio, fósforo, magnesio y potasio) que podrían incidir en la sobrevivencia y multiplicación de los rizobias, en el presente trabajo se demostró la existencia de cepas efectivas (JV91, JV99 y JV101) en estos suelos para el frijol cultivar CA4-3, y la evidente variabilidad entre las cepas nativas, al tiempo que enfatiza la importancia de evaluar las cepas indígenas, las cuales estarían genética y fisiológicamente adaptadas a estas condiciones edafo-climáticas, antes de proceder a inocular con otras de origen diferente. Bajo este argumento, las cepas JV91, JV99 y JV101 serían fuentes potenciales de inóculo altamente efectivo para frijol. Sobre este aspecto, Sprent (1994) puntualizó que la presión de la selección natural sobre los rizobias conduciría a la evolución

de cepas adaptadas a las condiciones ecológicas, lo cual le conferiría mejor sobrevivencia y por lo tanto mayor competitividad; así, en este contexto Krasova-Wade *et al.* (2006), demostraron que cuando cepas indígenas efectivas son reintroducidas en el ambiente de origen, ellas se comportan en concordancia.

Las diferencias en la efectividad de las cepas JV91, JV94, JV99, JV101, JV103 y JV104 podría explicarse a la luz de las proposiciones de Simsek *et al.* (2007), Fauvart y Michiels (2008), Timko *et al.* (2008), Arango y Gage (2009), Deakin y Broughton (2009) y Kambara *et al.* (2009), las cuales están basadas en un proceso de señalización y repuestas entre el hospedero y los rizobias que conllevan una simbiosis efectiva o inefectiva: la asociación mutualística es iniciada cuando los flavonoides de la planta incitan la expresión de los genes rizobiales de la nodulación (genes *nod*), que a su turno, inducen la síntesis de las señales de la nodulación (señales Nod) que activan el programa de desarrollo que conduce a la formación de los nódulos en la planta hospedera y a la secreción de proteínas en el ambiente extracelular (proteínas

Nops), a las cuales se les atribuye la determinación del rango de hospederos por infectar, conjuntamente con la naturaleza química y el nivel de estas señales. Una señalización inefectiva puede afectar negativamente el desarrollo de un número apropiado de nódulos para el mantenimiento de un suministro adecuado de nitrógeno para el sustento del crecimiento, e impedir el desarrollo de nódulos normales y efectivamente funcionales a través de su efecto sobre alguno o todos de los siguientes aspectos: el crecimiento de los hilos de infección, la formación del primordio nodular, el establecimiento de una infección atípica, la falta de biosíntesis de leghemoglobina, la producción de un desbalance hormonal o la carencia de una organización tisular normal. Es claro que con las cepas JV94, JV103 y JV104 no se produjo la formación de leghemoglobina, lo cual fue indicado por la presencia de solamente nódulos blancos en las plantas inoculadas con estas, lo que podría ser el resultado de una señalización inefectiva y sus correspondientes consecuencias. Así, las diferencias en la efectividad de las cepas evaluadas en el cultivar de frijol C4A-3 soportadas por las asunciones anteriores, podrían explicar la conducta de las mismas; es decir, se podrían haber producido señales Nod efectivas en unos casos e inefectivas en otros.

La diversidad en la conducta de cepas no sólo se ha observado en distintos cultivares de frijol sino también en líneas o cultivares de otras especies, por ejemplo, en soya (Appunu *et al.*, 2008), caraota (Altamirano *et al.*, 2007), maní (Pimratch *et al.*, 2008), garbanzo (Solaiman *et al.*, 2007) y quinchoncho (Marsh *et al.*, 2006).

Conclusiones

De acuerdo con la tipología de la nodulación (número de nódulos, peso total y por nódulo, tamaño y color), los valores de los parámetros de crecimiento (peso seco, altura y número de hojas del vástago), y los estimados de la concentración de nitrógeno y nitrógeno

total, las cepas JV91, JV99 y JV101 fueron las más efectivas en la fijación de nitrógeno en el cultivar de frijol C4A-3, mientras que las cepas JV94, JV103 y JV104 resultaron inefectivas, comprobándose así la existencia de cepas nativas efectivas para este cultivar en los suelos de sabana.

Referencias bibliográficas

- Altamirano J., López, M., Acosta, J., Farías, R., Peña, J. 2007. Influence of soluble sugars on seed quality in nodulated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): The case of Trehalose. *Crop Sci*, 47: 1193-1205.
- Analytical Software. 2003. Statistix 8.0 for Windows. Tallahassee, United States.
- Appunu, C., Sen, D., Singh, M. K., Dhar, B. 2008. Variation in symbiotic performance of *Bradyrhizobium japonicum* strains and soybean cultivars under field conditions. *J Cent Eur Agric*, 9 (1):185-190.
- AOAC. 2007. *Official methods of analysis* (18th ed., 2nd revision). Arlington, VA, USA: Association of Official Analytical Chemists, 700 p.
- Arango, C., Gage, D. 2009. HPrK Regulates succinate-mediated catabolite repression in the Gram-Negative symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 191 (1): 298-309.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 1988. *Aislamiento, caracterización y evaluación de Rizobios para leguminosas forrajeras. Guía metodológica*. Cali, Colombia: CIAT.
- Deakin, W. J., Broughton, W. J. 2009. Symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial protein secretion systems. *Nat Rev Microbiol*, 7 (4): 312-320.
- Fall, L., Diouf, D., Fall, M. A., Abaye, F., Gueye, M. 2003. Genetic diversity in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) varieties determined by ARA and RADP techniques. *Afr J Biotechnol*, 2 (2): 48-50.
- Fauvert, M., Michiels, J. 2008. Rhizobial secreted proteins as determinants of host specificity in the *Rhizobium-legume* symbiosis. *FEMS Microbiol Lett*, 285 (1): 1-9.
- Fening, J. O., Danso, S. K. A. 2002. Variation in symbiotic effectiveness of cowpea bradyrhizobia indigenous to Ghanaian soils. *Appl Soil Ecol*, 21 (1): 1-89.
- Ferguson, B. J., Mathesius, U. 2003. Signalling interactions during nodule development. *J Plant Growth Regul*, 22 (1): 47-72.

- Galloway, J. N., Cowling, E. B. 2002. Reactive nitrogen and the world: 200 years of change. *Ambio*, 31 (2): 64-71.
- Higuera, A., Gallaber, R. N., McDonald, G. E. 2001. Response of cowpea (*Vigna unguiculata*) to tillage and herbicide management. In Proc. 24th Annual Southern Conservation Tillage Conference for Sustainable Agriculture (Stieger, J. H. ed.). Oklahoma State Univ. 9-11 July. Oklahoma, USA.
- Kambara, K., Ardisson, S., Kobayashi, H., Saad, M. M., Schumpp, O., Broughton, W. J., Deakin W. J. 2009. Rhizobia utilize pathogen-like effector proteins during symbiosis. *Mol Microbiol*, 71 (1): 92-106.
- Krasova-Wade, T., Diouf, O., Ndoye, I., Sall, C. E., Braconier, S., Neyra, M. 2006. Water-condition effects on rhizobia competition for cowpea nodule occupancy. *Afr J Biotechnol*, 5 (16): 1457-1463.
- Malek, W., Inaba, M., Ono, H., Kaneko, Y., Murooka, Y. 1998. Competition for *Astragalus sinicus* root nodule infection between its native microsymbiont *Rhizobium huakuii* bv. *rengae* B3 and *Rhizobium* sp. ACMP 18 strain, specific for *Astragalus cicer*. *Appl Microbiol Biotech*, 50: 261-265.
- Marsh, L. E., Baptiste, R., Marsh, D. B., Trinklein, D., Kremer, R. J. 2006. Temperature effects on *Bradyrhizobium* spp. growth and symbiotic effectiveness with pigeonpea and cowpea. *J Plant Nutr*, 29 (3): 331-346.
- Mayz, J., Campos, F., Valladares, N. 2003. Evaluation of rhizobial (*Rhizobium* sp.) isolates for their effects on cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] growth and yield. *Trop Agric*, 80 (1): 36-40.
- National Academic of Science (NAS). 1994. *Biological Nitrogen Fixation: Research Challenges - A Review of Research Grants Funded by the U.S. Agency for International Development*. Washington D.C.: Nat Acad Press. 59 p.
- Palaniappan, S. P., Sreedhar, P. S., Loganathan, P., Thomas, J. 1997. Competitiveness of native *Bradyrhizobium japonicum* strains in two different soil types. *Biol Fert Soils*, 25: 279-284.
- Pimratch, S., Jogloy, S., Vorasoot, N., Toomsan, B., Kesmla, T., Patanothai, A., Holbrook, C. 2008. Effect of drought stress on traits related to N₂ fixation in eleven peanut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes differing in degrees of resistance to drought. *Asian J Plant Sci*, 7 (4): 334-342.
- Sánchez, P. A. 2002. Soil fertility and hunger in Africa. *Science*, 295: 219-220.
- Sprent, J. I. 1994. Evolution and diversity in the legume-*Rhizobium* symbiosis: chaos theory? *Plant Soil*, 161: 1-10.
- Simsek, S., Ojanen-Reuhs, T., Stephens, S., Reuhs, B. 2007. Strain-ecotype specificity in *Sinorhizobium meliloti*-*Medicago truncatula* symbiosis is correlated to Succinoglycan Oligosaccharide structure. *J Bacteriol*, 189 (21): 7733-7740.
- Somasegaran, P. Hoben, H. J. 1994. *Handbook for Rhizobia. Methods in Legume Rhizobium Technology*. Berlin: Springer-Verlag. 456 p.
- Timko, M. P., Rushton, P. J., Laudeman, T. W., Bokowiec, M. T., Chipumuro, E., Cheung, F., Town, Ch. D., Chen, X. 2008. Sequencing and analysis of the genetic space of cowpea. *BMC Genomics*, 9: 103.
- Valladares, N. 1990. Nuevas líneas experimentales de frijol (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) para la ecología de sabana, desarrolladas por selección individual de la población original "Tejero Criollo". Premio Agropecuario Banco Consolidado. Caracas, Venezuela. 115 p.
- Xavier, G. R., Martins, L. M., Ribeiro, J. R., Rumjanek, N. G. 2006. Especificidade simbiótica entre rizobios e accesos de feijão-caupi de diferentes nacionalidades. *Caatinga Mossoró*, 19 (1): 25-33.