Revisión Bibliográfica

FORMACION DE NODULOS DE *Rhizobium*: FACTORES QUE PUEDEN CONFERIR VENTAJA COMPETITIVA¹

Lidieth Uribe*

ABSTRACT

***Rhizobium* nodule formation: factors that may confer competitive advantage.** Adaptations that may confer advantage in nodule formation are discussed, emphasizing strain tolerance to low levels of P. The capacity of *Rhizobium* to grow in low phosphate conditions is analyzed, as well as the importance that this characteristic may have in regard to strain survival and establishment of symbiosis. The use of different strategies for obtaining competitive strains is also reviewed, including conventional techniques for strain selection under *in vitro* and field conditions, as well as the use of genetic engineering techniques.

INTRODUCCION

En estudios ecológicos sobre la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, el término competencia generalmente ha sido utilizado para referirse a la competencia por sitios de formación de nódulos en la leguminosa hospedera, y no a la fase ex-planta donde las cepas de *Rhizobium* también compiten por recursos como espacio y nutrientes (Alexander, 1985; Woome *et al.*, 1988).

Brockwell *et al.* (1982); Jansen van Rensburg y Strijdom (1982) han sugerido que no existe una relación directa entre la capacidad de persistir en el suelo y la competitividad en la formación de nódulos. De modo que las presiones selectivas para sobrevivir en el ambiente y para formar un número mayor de nódulos, parecen ser diferentes. El estudio exhaustivo de la población nativa de *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* aislada de la rizosfera de frijol por Segovia *et al.* (1991) apoya esta propuesta, al encontrar una frecuencia relativa de 1 cepa infectiva (capaz de formar nódulos) contra 40 cepas no formadoras de nódulos.

La caracterización de poblaciones de *Rhizobium* con el uso de técnicas de serología, resistencia intrínseca a antibióticos, susceptibilidad a fagos y patrón de proteínas, isoenzimas y plásmidos, indica gran heterogeneidad genética entre cepas (Beynon y Josey, 1980; Kingsley y Bohlool, 1983; Robert y Schmidt, 1985; Bromfield *et al.*, 1986; Young *et al.*, 1987; Harrison *et al.*, 1989; Pinero *et al.*, 1988). Sin embargo, no se ha encontrado relación entre las características utilizadas en la identificación de cepas, la efectividad simbiótica (Vincent, 1988, Harrison *et al.*, 1989) y la capacidad de persistir en el ambiente.

En esta revisión se discutirán algunas características que pueden conferir ventaja en la formación de nódulos y estrategias utilizadas para la obtención de cepas competitivas.

ADAPTACIONES QUE PUEDEN CONFERIR VENTAJA EN LA FORMACION DE NODULOS

Capacidad de crecer en bajos niveles de fosfato en medio de cultivo

El P es el principal factor nutricional que limita la fijación biológica de N (Freire, 1984). Si bien es un constituyente esencial de todos los organismos vivos y el nutrimento más abundante en

1/ Recibido para publicación el 1 de abril de 1993.
* Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

la materia orgánica del suelo después del N, generalmente su disponibilidad para plantas y microbios se encuentra reducida, ya que solo una pequeña fracción está en la forma soluble absorbible por las plantas (H_2PO_4^- , HPO_4^{2-}) (Cunningham y Munns, 1985; Stevenson, 1986). El P restante se encuentra formando compuestos orgánicos solubles, compuestos inorgánicos insolubles (con Ca, Fe, Al y silicato), y formas orgánicas no disponibles (biomasa microbiana, residuos de plantas y animales no descompuestos y materia orgánica del suelo) (Stevenson, 1986).

Las plantas dependientes de la fijación biológica de N requieren de más fosfato (Pi) que las que utilizan exclusivamente N mineral. Se ha observado que bajo diferentes condiciones de disponibilidad de Pi, éste se encuentra en mayor concentración en los nódulos que en la raíz o en el vástago de la planta (Graham y Rosas, 1979; Pereira y Bliss, 1987). Smart *et al.* (1984a; 1984b) observaron al respecto, una alta concentración de polifosfato en bacteroides de *Bradyrhizobium* sp. La aplicación de fertilizante fosfórico mejora la nodulación y la efectividad de la fijación (Graham y Rosas, 1979; Graham, 1981; Freire, 1984; Singleton *et al.*, 1985; Rosas y Bliss, 1986a; 1986b; Morales, 1987; Pereira y Bliss, 1987).

En Costa Rica la mayoría de los suelos contienen niveles bajos de P disponible. El análisis de 13765 muestras de suelo indicó que el 75% de los suelos presentaron valores menores de 10 ppm (320 μM) de P (Bertsch, 1986). En las soluciones de suelo, este elemento se encuentra generalmente en concentraciones de 1 a 10 μM y puede rápidamente llegar a alcanzar en la rizosfera valores de 0,1 a 1 μM por sustracción de las raíces de la planta (Cassman *et al.*, 1981a). Estudios en los que se utilizó P marcado radioactivamente indicaron una reducción del 50% de la concentración inicial de P dentro de una zona que se extendió a 1,5 mm a partir de la superficie de la raíz (Cole y Sanford, 1988).

Los niveles bajos de P pueden afectar la simbiosis, al disminuir el suplemento de fotosintatos al nódulo (Singleton *et al.*, 1985), reducir la tasa de crecimiento bacteriano (Cassman *et al.*, 1981b) y la población total de aislamientos de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (Keyser y Munns, 1979).

Tolerancia a condiciones de baja concentración de fosfato en medio de cultivo

Se han observado diferencias entre cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* en la capacidad de

crecimiento en condiciones de baja concentración de fosfato en el medio de cultivo (Keyser y Munns, 1979; Cassman *et al.*, 1981a; 1981b; Beck y Munns, 1984; Morales, 1987).

Keyser y Munns (1979) evaluaron la tolerancia de 65 cepas de *Bradyrhizobium* a concentraciones bajas (5-10 μM) de Pi en medio líquido y encontraron que el crecimiento de algunas de las cepas disminuyó con niveles bajos de fosfato. Resultados similares fueron obtenidos con cepas de *B. japonicum* (Cassman *et al.*, 1981b) y *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* (Morales, 1987). Estudios del comportamiento de 40 cepas pertenecientes a 6 especies de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* en medio con baja concentración (5 μM , 0,5 μM y 0,06 μM) de Pi (Beck y Munns, 1984), indicaron que la tolerancia a estos niveles se encuentra ampliamente distribuida. La variación observada puede deberse a pérdida de la capacidad de crecimiento en ambientes con bajos niveles de fosfato, ya que las cepas se cultivan en medios con concentraciones 1000 a 10000 veces mayores que las encontradas en el suelo (Cassman *et al.*, 1981b), y a variabilidad genotípica entre las cepas.

Beck y Munns (1984) sugieren 3 mecanismos que permiten a las cepas crecer en condiciones de baja disponibilidad de fosfato.

Capacidad para almacenar fosfato en medio de cultivo

Se ha observado, en varias especies de rizobios, diferencias entre cepas en la capacidad de almacenar fosfato internamente (Cassman *et al.*, 1981a; Beck y Munns, 1984). Estudios realizados por Cassman *et al.* (1981a) indican que la concentración total de Pi en cepas de *B. japonicum* varió de 1,6% a 2,4% del peso seco, lo que permitió el crecimiento de 4 o 5 generaciones después de la transferencia a un medio de cultivo libre de este elemento. Beck y Munns (1984) encontraron que la cantidad de Pi almacenado por cepas de diferentes especies varió entre 1% y 2% del peso seco de las bacterias, cuando éstas se cultivaron en un medio que contenía 2 mM de Pi, y entre 0,25% a 1,7% cuando crecieron a niveles de 5 μM . Los autores señalan que el número de generaciones obtenido después de la transferencia a un medio con niveles de 0,06 μM de Pi, dependió de la cantidad almacenada, de la eficiencia en la utilización del mismo y del tamaño del inóculo, y que las cepas de crecimiento lento almacenaron una mayor cantidad de P que las de crecimiento rápido.

Se ha identificado en las células gránulos electrodensos que se cree que contienen polifosfatos (Cassman *et al.*, 1981a; Smart, 1984a). Cassman *et al.* (1981) determinaron su presencia cuando el nivel de Pi dentro de la célula fue mayor de 1,5%, observando además que el volumen de los gránulos dependió del porcentaje de Pi almacenado. Los autores sugieren que los gránulos constituyen un mecanismo complementario de almacenamiento, el cual se moviliza rápidamente en condiciones de deficiencia.

- Utilización de fosfato interno

Smart *et al.* (1984a) sugieren que la utilización del Pi almacenado para el crecimiento celular sólo ocurre cuando las bacterias se transfieren a un medio libre de este nutriente, ya que en presencia del mismo las células restauran la concentración interna antes de reasumir el crecimiento celular.

- Capacidad de absorber bajas concentraciones de fosfato

En algunas especies de las familias Enterobacteriaceae y Pseudomonodaceae, se ha observado la presencia de un sistema de transporte de Pi dependiente de energía, en el que la tasa de absorción aumenta al disminuir la concentración de fosfato en el medio de cultivo (Poole y Hancock, 1986). En *Escherichia coli* la respuesta a la disminución de Pi está bien caracterizada a nivel bioquímico, genético y molecular. Esta bacteria tiene 2 sistemas de transporte, el sistema de transporte de fosfato inorgánico (Pit), que consiste en un sistema de baja afinidad, expresado constitutivamente, y el sistema de transporte de fosfato inorgánico de alta afinidad (Pst), que incrementa su actividad cuando las condiciones son limitantes (Matin *et al.*, 1989).

A diferencia de *E. coli*, *Rhizobium* parece tener sólo un sistema de transporte de P, cuya síntesis es reprimida en condiciones de abundancia y que alcanza su actividad máxima cuando el Pi es limitante. Como en todas las especies estudiadas, es unidireccional, requiere energía, y es sensible a cambios en temperatura, pH y concentración celular. La Km de este sistema es mucho mayor que la observada en *E. coli* (Smart *et al.*, 1984b). En diferentes cepas de *Rhizobium*, la disminución de fosfato en el medio de cultivo aumentó la tasa de

transporte 10 a 180 veces más que la obtenida en condiciones de alta disponibilidad (Smart *et al.*, 1984b) y permitió el crecimiento a concentraciones menores de 1 μ M en el medio de cultivo (Smart *et al.*, 1984a). En las cepas de crecimiento rápido indujo la síntesis de muchas proteínas periplásmicas, entre ellas la fosfatasa alcalina (Smart *et al.*, 1984c), lo que correlaciona con el alto nivel de actividad de esta enzima observado en condiciones limitantes (Smart *et al.*, 1984b).

Independientemente de estos mecanismos, Cunningham y Munns (1985) indican que algunas cepas podrían, en un suelo ácido, influenciar el nivel de fosfato disponible en su microambiente por la excreción de polisacáridos extracelulares.

Ventaja ecológica de la tolerancia a bajos niveles de fosfato

La rizosfera es un sitio especialmente activo, en donde, como se discutió anteriormente, pueden ocurrir cambios importantes en la disponibilidad de Pi. Al parecer las cepas de *Rhizobium* han desarrollado mecanismos que no sólo les permite utilizar eficientemente pequeñas cantidades de este elemento, sino aprovechar la exposición a concentraciones altas del mismo (a partir de los nódulos en descomposición) para su almacenamiento y utilización posterior en la colonización de la rizosfera (Cassman *et al.*, 1981a; Beck y Munns, 1984).

La alta capacidad de absorción de fosfato y el mantenimiento de un nivel interno pudieron haberse seleccionado como una estrategia para sobrevivir en un ambiente cambiante como la rizosfera. Esta idea se ve apoyada por el alto valor de Km que posee el sistema de transporte de Pi presente en las cepas de *Rhizobium*, en comparación con *E. coli* y por la observación de Cassman *et al.*, (1981a) de que el crecimiento bacteriano cesa cuando la cantidad de Pi celular disminuye al 0,3% del peso seco. Smart *et al.* (1984a), han especulado que el mantenimiento de este nivel interno les permite a las células permanecer viables por algún tiempo en la eventual disminución del suplemento de fosfato. Ya que el P almacenado alcanza solamente para pocas generaciones (Cassman *et al.*, 1981a; Smart *et al.*, 1984a), la capacidad de absorción de Pi a bajos niveles es importante en la persistencia de las cepas en el suelo.

Adhesión a las partículas de suelo

El papel de la porosidad del suelo en la sobrevivencia de cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* ha sido estudiado en detalle por Postma *et al.* (1990) y Postma *et al.* (1991), quienes observaron la competencia por espacio entre *Rhizobium* y una mezcla de bacterias inoculadas en un suelo estéril. Dicha competencia resultó en un porcentaje menor de *Rhizobium* unido a las partículas de suelo; en este caso muchos de los poros fueron ocupados por las bacterias introducidas. La importancia ecológica de la asociación a partículas se refleja en la disminución de la sobrevivencia de *Rhizobium* en presencia de los depredadores y competidores. En general, los porcentajes de *Rhizobium* y de otros microorganismos asociados a partículas fueron mayores en tratamientos donde los depredadores estaban presentes que en los tratamientos sin depredadores. En un estudio posterior, Postma *et al.* (1991) encontraron que la población final de las cepas evaluadas siguió el mismo patrón que el número de células asociado a partículas; la cepa que presentó el porcentaje más bajo de asociación fue una de las que presentó menor sobrevivencia. Encontraron además diferencias en la adhesión a partículas entre mutantes con alteraciones en la superficie celular y el tipo silvestre. Estas diferencias podrían conferir ventaja en la adhesión a partículas y eventualmente en la formación de nódulos.

Movilidad en el suelo

Ames y Bergman (1981) estudiaron el efecto de la movilidad de las cepas sobre la capacidad competitiva y encontraron que una cepa silvestre formó más nódulos que las cepas mutantes no móviles. La importancia práctica de esta característica se refleja en los estudios de Weaver y Frederick (1974a; 1974b), quienes determinaron que la cepa inoculada formó una mayor proporción de nódulos en la corona que en las raíces laterales. McDermott y Graham (1989) encontraron una disminución en la población de bacterias al aumentar la distancia del sitio de inoculación. Mientras que 33-39% de los nódulos de la corona fueron formados por la cepa inoculada, hubo muy pocos en las raíces laterales. Al parecer las cepas estudiadas fueron incapaces de sostener altas poblaciones a través del sistema radical en desarrollo. Esto podría estar relacionado al hallazgo de que los inoculantes aplicados a la semilla presentaron menor ocupación de nódulos que los aplicados al suelo (Oliveira y Graham, 1990).

Debe considerarse, como sugieren Ames y Bergman (1981), que los cultivos mantenidos en laboratorio pueden perder movilidad, lo que daría ventaja competitiva a las cepas nativas.

Efectividad en la fijación de N

Un tema controversial es si la capacidad de fijar N (efectividad), está relacionada a la competitividad en la formación de nódulos. Se ha señalado con base en estudios de competencia entre cepas efectivas e inefectivas (Robinson, 1969; Labandera y Vincent, 1975), que el hospedero distingue a favor de las cepas efectivas. Sin embargo en estudios utilizando mutantes inefectivos se observó que la competitividad en la formación de nódulos fue independiente de la efectividad, la cual fue retenida durante la mutación (Amarger 1981; Bromfield *et al.*, 1985); Hahn y Studer, 1986). Amarger (1981a) señala al respecto que, aunque la efectividad y la competitividad no son características dependientes, posiblemente fueron en algunos casos asociadas por selección natural. Sólo con el estudio de cepas isogénicas se puede determinar el papel de la efectividad en la capacidad competitiva de las cepas, aunado al entendimiento del ligamen entre los diferentes circuitos de regulación en *Rhizobium*.

Algunos autores indican que existe un mecanismo de compensación mediante el cual el hospedero puede, en situaciones en las que el número de nódulos efectivos es bajo, aumentar la masa nodular efectiva a través de la canalización preferencial de fotosintatos a los nódulos efectivos (Singleton y Stockinger, 1983; Singleton y Tavares, 1986).

Producción de bacteriocinas

La cepa de *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* (T24) produce la trifolitoxina, una bacteriocina que inhibe el crecimiento del 95% de cepas de *R. leguminosarum* bv *trifolii*, *viciae* y *phaseoli* probadas y algunas cepas de *R. fredii* (Triplett y Barta, 1987). Estos autores determinaron con el uso de mutantes de la cepa T24, que la expresión de competitividad requiere tanto de la producción de trifolitoxina como de la capacidad de nodulación. Triplett (1988); Triplett *et al.* (1989) aislaron, mapearon y subclonaron los genes de producción y resistencia a la trifolitoxina (txf) y examinaron su capacidad para restaurar el fenotip. Encontraron además que estos genes no son responsables de la inefectividad en la fijación de N observada en la cepa T24.

ESTRATEGIAS PARA LA OBTENCION DE CEPAS COMPETITIVAS EN LA FORMACION DE NODULOS

Alta concentración del inóculo

Una estrategia utilizada para incrementar el número de nódulos derivados del inoculante es aumentar la concentración de células presentes en el mismo. Sin embargo, a veces no es posible ni práctico elaborar inoculantes con la cantidad necesaria de bacterias para superar la población nativa (Alexander, 1985).

Weaver y Frederick (1974a) advirtieron que en suelos que contienen *Bradyrhizobium* en cantidades de 10^3 o más bacterias/g de suelo, es poco probable obtener una nodulación adecuada con las tasas normales de inoculación. Sparrow y Ham (1983) encontraron que no hubo respuesta a la inoculación de *R. phaseoli* en suelos con menos de 10^4 cepas nativas. Thies *et al.* (1991) observaron que el éxito de la inoculación de 7 leguminosas en suelos de Hawái estuvo inversamente relacionado al número de cepas nativas presentes en el suelo. La presencia de 50 células/g de suelo eliminó la respuesta a la inoculación, mientras que cuando estuvieron presentes menos de 10 células/g de *Rhizobium*, la producción económica debida a la inoculación aumentó el 85% de las veces y solo el 6% cuando fue mayor de 10 células/g de suelo. Si este razonamiento se aplica a Costa Rica, en el 78% de los 94 sitios muestreados de siembra de frijol, no habría respuesta a la inoculación debido al tamaño de la población nativa que fue en promedio $3,7 \times 10^3$ (Soto-Muñoz, 1992). Debe considerarse sin embargo, que la capacidad competitiva por sitios de formación de nódulos varía de una cepa a otra y está determinada por la interacción del genoma de la planta, de la cepa introducida, de la población nativa y de los factores ambientales. Al respecto, Meade *et al.* (1985) observaron que al inocular una cepa en dos sitios que contenían una población de bacterias similar en número, en el sitio I el inóculo se estableció en el 73% de los nódulos y en el sitio II únicamente formó el 33% de los mismos. Bajo condiciones controladas la cepa dominante del sitio II fue igualmente competitiva que el inoculante. Así los factores ambientales pueden decidir cuáles cepas predominan en los nódulos.

Tolerancia *in vitro*

Se ha observado gran variación en el ámbito de susceptibilidad de las cepas a factores ambienta-

les como pH, Al, Mn, temperatura, humedad, disponibilidad de nutrientes, así como a la presencia de microorganismos antagonistas y a la compatibilidad de las cepas con su leguminosa hospedera (Graham *et al.*, 1982; Doughri y Bottomley, 1983; Gibson y Jordan, 1983; May y Bohlool, 1983; Josephson y Pepper, 1984; Dowling y Broughton, 1986). Sin embargo se desconoce en la mayoría de los casos el papel de estas características en la capacidad de una cepa introducida para persistir, multiplicarse y formar nódulos. Wolff *et al.* (1991) observaron que variaciones en la tolerancia de las cepas en pruebas *in vitro* a acidez, alta temperatura, Al, toxicidad de Mn y limitación de Fe no se relacionaron a la competitividad de las cepas en el campo. En estudios de invernadero se observó que la tolerancia de las cepas a niveles bajos de Pi en medio de cultivo correspondió con la capacidad de nodular *Glycine max*, *Vigna radiata* y *Phaseolus vulgaris* en suelos deficientes de P (Beck y Munns, 1984). Resultados similares fueron observados con la variedad de frijol Negro Huasteco (Morales, 1987). En experimentos a nivel de campo en los que se utilizó lenteja, se encontró que la cepa inoculada fue más efectiva en condiciones de baja fertilización con P que las cepas nativas (Dhingra *et al.*, 1988). Con relación a esto, Taylor *et al.* (1990) observaron que cepas de *Bradyrhizobium* seleccionadas para tolerancia a bajo Pi y alto Al no fueron muy efectivas con las variedades tolerantes utilizadas. Estos resultados pueden deberse a falta de compatibilidad entre las cepas de *Rhizobium* y las variedades usadas y a la presencia factores ambientales que afecten el establecimiento de las cepas o su capacidad simbiótica. Los estudios de Richardson *et al.* (1988) sobre el efecto de la acidez, el Ca y el Al sobre la inducción de los genes nod en cepas de *R. leguminosarum* bv *trifolii* concuerdan con lo anterior. Los genes nod codifican proteínas esenciales para la invasión de la planta y establecimiento de la simbiosis; el gen Nod D reconoce los compuestos flavonoides exudados por el hospedero apropiado y activa la transcripción de los operones nod (Cunningham *et al.*, 1991). Los autores observaron que la expresión del gen nod D no fue afectada por el ámbito de pH utilizado, ni por la adición de $22,5 \mu\text{M}$ de Al o $1250 \mu\text{M}$ de Ca. Sin embargo, la inducción de la expresión de nod A se redujo cuando el pH fue menor que 5,7 y en presencia de Al, y la adición de Ca mitigó ligeramente este efecto. Debe destacarse que la cepa de mayor tolerancia a Al en

medio de cultivo fue la más sensible a la inhibición de la expresión de los genes nod.

Selección a nivel de campo

Una alternativa para los suelos que contienen poblaciones de *Rhizobium* es utilizar inoculantes a base de cepas nativas adaptadas al ambiente (Meade *et al.*, 1985). En el programa de Frijol de Centroamérica y Cuba, se realizan aislamientos de cepas nativas que se evalúan en diferentes ambientes a nivel de campo. Las mejores cepas se prueban en toda la región, y en algunas de ellas se ha observado respuesta a la inoculación bajo condiciones limitantes de N con las cepas CR 477, Kim 5 y CIAT 166 (PROFRIJOL/CIAT, 1991).

Restricción de la nodulación

Otra estrategia para prevenir la nodulación por cepas nativas es el uso de variedades que restringen la nodulación como las variedades PIs de soya y los cultivares de *Pisum sativum* portadores del gen sym-2.

Cregan y Keyser (1986), Keyser y Cregan (1987), Cregan *et al.* (1989) seleccionaron a partir de 1278 genotipos de soya, 13 genotipos que restringen la nodulación con la cepa USDA 123, y los denominaron genotipos PI. Las cepas del serogrupo 123 son muy competitivas y poco efectivas, y se encuentran comunmente en los suelos. Los genotipos PI no forman nódulos con la mayoría de estas cepas mientras que sí lo hacen con la cepa efectiva USDA 110. Sin embargo, la restricción no se aplica a todo el serogrupo y algunos aislamientos fueron muy competitivos contra USDA 110.

Así, por ejemplo, la variedad de arveja Afganistan es un cultivar primitivo que generalmente no forma nódulos con cepas europeas de *R. leguminosarum* bv *viciae* como PF2, y nodula con cepas del medio Oriente como la cepa TOM aislada de Turquía (Dowling *et al.*, 1988). Este comportamiento se debe a un gen recesivo (Sym-2) en la planta hospedera (Holl y LaRue, 1976, citado por Dowling *et al.*, 1988) y a un gen extra de "rango" de hospedero, el gen nod X, presente en el plásmido Sym de la bacteria (Davis *et al.*, 1988). Las mutaciones en nod X suprimen la capacidad de nodular la variedad Afganistán pero no la nodulación de arvejas comerciales.

Manipulación genética de las cepas

Desde otra perspectiva el estudio de las bases de la competitividad permitiría el aislamiento

de genes que puedan luego introducirse a cepas efectivas en la fijación de N (Martínez-Romero y Rosenblueth, 1990), o bien, seleccionar cepas competitivas en el campo y manipularlas en laboratorio por adición de los genes que aumenten su efectividad.

Genes que confieren efectividad simbiótica

Chen *et al.* (1991) aumentaron la capacidad simbiótica de la cepa ANU1173 de *R. leguminosarum* bv *trifolii* capaz de nodular a pH 4,4, al reemplazar el plásmido pSym por un plásmido que confirió mayor capacidad de fijar N. A su vez, la transferencia de un plásmido simbiótico a aislamientos incapaces de formar nódulos de *R. leguminosarum* bv *phaseoli* resultó en cepas inefectivas (Segovia *et al.*, 1991).

Genes que confieren competitividad

Un ejemplo es la transferencia de los genes (tx) involucrados en la competitividad de la nodulación. Triplett (1990) insertó en forma estable los genes (tx) en el genoma de la cepa efectiva *R. leguminosarum* bv *trifolii* TA1 y construyó una cepa capaz de producir trifolitoxina que resultó muy competitiva cuando se inoculó con una cepa sensible. Esos experimentos constituyen la primera transferencia estable de genes involucrados en la competitividad en la formación de nódulos a una cepa efectiva. Dichos genes pueden ser transferidos y expresados en muchas especies de *Rhizobium* y ser útiles como solución al problema de competencia en una amplia variedad de leguminosas. Además, su inserción estable al cromosoma evitaría la transferencia por conjugación a la población nativa (Triplett, 1990).

Otro ejemplo es el aislamiento de cepas prevalentes en la localidad, seguida por la introducción del gen nod X que nodule un cultivar deseable portador de sym-2. Fobert *et al.* (1991) construyó un mutante, Tn5nodX y lo evaluó en invernadero con el cultivar Trapper nn al que se ha incorporado los genes sym-2. Sin embargo el uso de cepas seleccionadas o construidas que porten nod X no asegura la nodulación selectiva y eficiente por la cepa inoculada (Fobert *et al.*, 1991). Se ha observado que la nodulación de cepas de las variedades Afganistan e Iran por la cepa Tom era suprimida por la presencia de una cepa no formadora de nódulos, y que el grado de supresión varió con la cepa utilizada (Winarno y Lie, 1979; Ohlen-dorf y Martensson, 1990). Dowling y Broughton

(1988) identificaron, aislaron y clonaron los genes involucrados en el bloqueo competitivo de la inoculación; estos genes se encuentran en el plásmido Sym de la cepa PF2.

Respuesta a los compuestos flavonoides

Se ha demostrado que la expresión de los genes nod de *Rhizobium* es afectada por la secreción de compuestos fenólicos estimulatorios e inhibitorios de la planta (Long, 1989). Djordjevic *et al.* (1987) sugirieron que parte de las diferencias observadas en la capacidad competitiva de las cepas de *R. trifolii* se debe a variación en la sensibilidad, ámbito y velocidad de respuesta a la secreción de los mismos. Los resultados obtenidos por Cunningham *et al.* (1991) apoyan esta idea, ya que observaron gran heterogeneidad en la respuesta de las cepas a la presencia de compuestos flavonoides. Esta característica puede tener implicaciones importantes en las relaciones cepa-cultivar. Cunningham *et al.* (1991) evaluaron la adición de un compuesto flavonoide para aumentar la capacidad competitiva del inoculante. Sin embargo, encontraron que la variabilidad observada en la respuesta de las cepas y el costo de la aplicación de estas sustancias a nivel de campo, hacen esta práctica inadecuada.

CONCLUSIONES

El método tradicional de selección de cepas consiste en escoger bajo condiciones controladas los genotipos que presenten mayor capacidad para fijar N. La evidencia presentada indica la necesidad de considerar la competitividad, además de la efectividad en la fijación de N, cuando se seleccionan cepas para la producción de inoculantes.

Las cepas de *Rhizobium* compiten por los sitios de formación de nódulos en la leguminosa hospedera. Se ha hablado de factores tanto ambientales como biológicos que afectan la proporción de nódulos formados por la cepa introducida. Existen sin embargo, pocos estudios dirigidos a dilucidar a nivel fisiológico y molecular las interacciones hospedero microsimbionte. Debe determinarse no sólo cual cepa es más competitiva bajo determinadas condiciones, sino también cuáles son los mecanismos básicos que confieren competitividad, a fin de poder hacer extrapolaciones a otros ambientes.

La tolerancia de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* a los niveles bajos de fosfato parece ser una

característica a considerar para mejorar la respuesta a la inoculación, ya que, como se discutió antes, la capacidad de las cepas para absorber Pi a bajas concentraciones y su habilidad para el almacenamiento del mismo, pueden conferir ventaja en la colonización y persistencia en la rizosfera (Cassman *et al.*, 1981a; Beck y Munns, 1984), especialmente si se observa el hallazgo de Soto-Muñoz (1992), quien encontró cepas nativas capaces de nodular frijol en 94 sitios de siembra en Costa Rica, a pesar de que el 52% de los suelos estudiados presentaban niveles menores de 10 pmi (320 µM) de P. Estas cepas adaptadas al ambiente podrían ser más competitivas en la formación de nódulos que las cepas utilizadas como inoculante.

Se hace necesaria entonces, la búsqueda de combinaciones cepa-cultivar capaces de establecerse bajo estas condiciones.

RESUMEN

Se discuten algunas adaptaciones que pueden conferir ventaja en la formación de nódulos, con énfasis en la tolerancia de las cepas a bajos niveles de P. Se analiza la capacidad de *Rhizobium* para crecer en condiciones de baja concentración de fosfato y la importancia que puede tener esta característica en la sobrevivencia de las cepas y establecimiento de la simbiosis.

Se revisa además el uso de diferentes estrategias para la obtención de cepas competitivas, que incluye técnicas convencionales de selección de cepas en condiciones *in vitro* y a nivel de campo, así como el uso de técnicas de ingeniería genética.

LITERATURA CITADA

- ALEXANDER, M. 1985. Ecological constraints on nitrogen fixation in agricultural ecosystems. Ed M. Alexander. *Advances in Microbial Ecology*. vol 5.
- AMARGER, N. 1981a. Competition for nodule formation between effective and ineffective strains of *Rhizobium meliloti* Soil. Biol. Biochem. 13:475-480.
- AMARGER, N. 1981b. Selection of *Rhizobium* strains on their competitive ability for nodulation. Soil. Biol. Biochem. 13:481-485.
- AMES, P.; BERGMAN, K. 1981. Competitive advantage provided by bacterial motility in the formation of nodules by *Rhizobium meliloti*. J. of Bacteriol. 148:728-729.
- BECK, D.P.; MUNNS, D.N. 1984. Phosphate nutrition of *Rhizobium* spp. Appl. Environ. Microbiol. 47:278-282.

- BERG, JR., R.K., LOYNACHAN, T.E., ZABLOTOWICZ, R.M.; LIEBERMAN, M.T. 1988. Nodule occupancy by introduced *Bradyrhizobium japonicum* in Iowa soils. *Agron. J.* 280:876-881.
- BERTSCH, F. 1986. Manual para interpretar la fertilidad de los suelos de Costa Rica. Programa de Comunicación Agrícola. Universidad de Costa Rica. Costa Rica. 76p.
- BEYNON, J.L.; JOSEY, D.P. 1980. Demonstration of heterogeneity in a natural population of *Rhizobium phaseoli* using variation in intrinsic antibiotic resistance. *J. Gen. Microbiol.* 118:437-442.
- BROCKWELL, J.; GAULT, R.R.; ZORIN, M.; ROBERTS, M.J. 1982. Effects of environmental variables on the competition between inoculum strains and naturalized populations of *Rhizobium trifolii* for nodulation of *Trifolium subterraneum* L. and on Rhizobia persistence in the soil. *Aust. J. Agric. Res.* 33:803-815.
- BROMFIELD, E.S.P. LEWIS, D.M.; BARRAN, L.R. 1985. Cryptic plasmid and rifampin resistance in *Rhizobium meliloti* influencing nodulation competitiveness. *J. of Bacteriol.* 164:410-413.
- BROMFIELD, E.S.P.; SINHA, I.B.; WOLYNETZ, M.S. 1986. Influence of location, host cultivar, and inoculation on the composition of naturalized populations of *Rhizobium meliloti* in Medicago sativa nodules. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:1077-1084.
- CASSMAN, K.G.; MUNNS, D.N.; BECK, D.P. 1981a. Phosphorus nutrition of *Rhizobium japonicum*: strain differences in phosphate storage and utilization. *Soil Sci. Am. J.* 45:517-520.
- CASSMAN, K.G.; MUNNS, D.N.; BECK, D.P. 1981b. Growth of *Rhizobium* strains at low concentrations of phosphate. *Soil Sci. Am. J.* 45:520-523.
- CHEN, H.; RICHARDSON, A.E.; GARTNER, E.; DJORDJEVIC, M.A.; ROUGHLEY, R. J.; ROLFE, B.G. 1991. Construction of an acid-tolerant *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* strain with enhanced capacity for nitrogen fixation. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:2005-2011.
- CIAT/PROFRIJOL, 1991. Proyectos regionales de investigación. Informes anuales Abril 1990-Marzo 1991. Documento de Trabajo N 91/2. Programa cooperativo regional de frijol para Centro América, México y el Caribe. Panamá. 369p.
- COLE, C.V.; SANDFORD, R.L., Jr. 1988. Biological aspects of the phosphorus cycle. In H. Tiessen (ed) Phosphorus cycles in terrestrial and aquatic ecosystems. Proceedings of a workshop arranged by SCOP, UNEP and the Department of Agrobiolology and Forestry of the Polish Academy of Sciences. Czuniejewo, Poland. p. 10-16.
- CUNNINGHAM, S.D.; MUNNS, D.N. 1985. Effect of Rhizobial extracellular polysaccharide on solution phosphate levels of acid soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 49:609-612.
- CUNNINGHAM, S.; KOLLMAYER, W.D.; STACEY, G. 1991. Chemical control of interstrain competition for soybean nodulation by *Bradyrhizobium japonicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1886-1892.
- CREGAN, P.B.; KEYSER, H.H. 1986. Host restriction of nodulation by *Bradyrhizobium japonicum* strain USDA 123 in soybean. *Crop Science* 26:911-916.
- CREGAN, P.B., KEYSER, H.H.; SADOWSKY, M.J. 1989. Soybean genotype restricting nodulation of a previously unrestricted serocluster 123 *Bradyrhizobia*. *Crop Science* 29:307-313.
- DAVIS, E.O., EVANS, I.J.; JOHNSTON, A.W.B. 1988. Identification of nod X, a gene that allows *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* strain TOM to nodulate Afghanistan peas. *Mol. Gen. Genet.* 212:531-535.
- DEBOUCK, D.G.; HIDALGO, R. 1985. Morfología de la planta de frijol común. In Frijol: Investigación y Producción. Ed por M. López, F. Fernández y A. Schoonhoven. Cali, Colombia, CIAT-PNUD. p. 7-42.
- DHINGRA, K.K.; SEKHON, H.S.; SANDHU, P.S.; BHANDARI, S.C. 1988. Phosphorus-*Rhizobium* interaction studies on biological nitrogen fixation and yield of lentil. *J. Agric. Sci. Camb.* 110:141-144.
- DJORDJEVIC, M.A.; REDMOND, J. W.; BATLEY, M.; ROLFE, B.G. 1987. Clovers secrete specific phenolic compounds which either stimulate or repress nod gene expression in *Rhizobium trifolii*. *The EMBO J.* 6:1173-1179.
- DOUGHRI, M.K.; BOTTOMLEY, P.J. 1983. Effect of acidity on the composition of an indigenous soil population of *Rhizobium trifolii* found in nodules of *Trifolium subterraneum* L. *Appl. Environ. Microbiol.* 46:1207-1213.
- DOWLING, D.N.; SAMREY, U.; BROUGHTON, W.J. 1988. Cloning gene(s) for competitive nodulation blocking on Afghanistan peas from *Rhizobium leguminosarum*. In D.P. Beck; L.A. Materon (editores). Nitrogen Fixation by legumes in mediterranean agriculture. ICARDA Netherlands. p 101-107.
- FOBERT, P.R., ROY, N.; NASH, J.H.E.; IYER, V.N. 1991. Procedure for obtaining efficient root nodulation of a pea cultivar by a desired *Rhizobium* strain and preempting nodulation by other strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1590-1594.
- FREIRE, J.R.J. 1984. Important limiting factors in soil for the *Rhizobium* legume symbiosis. In M. Alexander (Ed). Biological Nitrogen Fixation: ecology, technology, and physiology. Plenum Publishing Corp., New York. p. 51-74.
- GIBSON, A.H.; JORDAN, D.C. 1983. Ecophysiology of nitrogen fixing system. In: O. Lange, et al. (Ed). Encyclopedia of plant physiology. New series vol 12C. Springer-Verlag. p 301-390.

- GRAHAM, P.H.; ROSAS, J.C. 1979. Phosphorus and symbiotic nitrogen fixation in common bean. *Agron. J.* 71:925-926.
- GRAHAM, P.H. 1981. Some problems of nodulation and symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L.: A Review. *Field Crops Research* 4:93-112.
- GRAHAM, P.H.; VITTERI, S.E.; MACKIE, F.; VARGAS, A.T.; PALACIOS, A. 1982. Variation in acid soil tolerance among strains of *Rhizobium phaseoli*. *Field Crops Research* 5:121-128.
- HAHN, M.; STUDER, D. 1986. Competitiveness of a *Bradyrhizobium japonicum* mutant against the wild-type strain. *FEMS Microbiology Letters* 33:143-148.
- HARRISON, S.P., YOUNG, J.P.W.; JONES, D.G. 1987. *Rhizobium* population genetics: Effect of clover variety and inoculum dilution on the genetic diversity sampled from natural populations. *Plant and Soil* 103:147-150.
- HARRISON, S.P., YOUNG, J.P.W.; JONES, D.G. 1989. *Rhizobium* population genetics: Host preference and strain competition effects on the range of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* genotypes isolated from natural populations. *Soil. Biol. Biochem.* 21:981-986.
- JANSEN VAN RENSBURG, H; STRIJDOM, B.W. 1982. Competitive abilities of *Rhizobium meliloti* strains considered to have potential as inoculants. *Appl. Environ. Microbiol.* 44:98-106.
- JOSEPHSON, K.L.; PEPPER, I.L. 1984. Competitiveness and effectiveness of strains of *Rhizobium phaseoli* isolated from the Sonoran Desert. *Soil. Biol. Biochem.* 16:651-655.
- KEYSER, H.H.; MUNNS, D.N. 1979. Tolerance of Rhizobia to acidity, aluminum and phosphate. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 43:519-523.
- KEYSER, H.H.; CREGAN, P.B. 1987. Nodulation and competition for nodulation of selected soybean genotypes among *Bradyrhizobium japonicum* serogroup 123 isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:2631-2635.
- KINGSLEY, M.T.; BOHLOOL, B.B. 1983. Characterization of *Rhizobium* sp (*Cicer Arietinum* L.) by immunofluorescence, immunodiffusion and intrinsic antibiotic resistance. *Can. J. Microbiol.* 29:518-526.
- LABANDERA, C.A.; VINCENT, J.M. 1975. Competition between an introduced strain and native Uruguayan strains of *Rhizobium trifolii*. *Plant and Soil* 42: 327-347.
- LALANDE, R.; BIGWANEZA, P.C.; ANTOUN, H. 1990. Symbiotic effectiveness of strains of *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* isolated from soils of Rwanda. *Plant and Soil* 121: 41-46.
- LONG, S.R. 1989. *Rhizobium*-legume nodulation: Life together in the underground. *Cell* 56:203-214.
- MARTINEZ-ROMERO, E.; ROSENBLUETH, M. 1990. Increased bean (*Phaseolus vulgaris* L.) nodulation competitiveness of genetically modified *Rhizobium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:2384-2388.
- MATIN, A, AUGER, E.A., BLUM, P.H. ; SCHULZ, J.E. 1989. Genetic basis of starvation survival in non differentiating bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 43:293-316.
- MAY, S.N.; BOHLOOL, B.B. 1983. Competition among *Rhizobium leguminosarum* strains for nodulation of lentils (*Lens esculenta*). *Appl. Environ. Microbiol.* 45:960-965.
- MCDERMOTT, T.R.; GRAHAM, P.H. 1989. *Bradyrhizobium japonicum* inoculant mobility, nodule occupancy and acetylene reduction in the soybean root system. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:2493-2498.
- MEADE, J.; HIGGINS, P.; O GARA, F. 1985. Studies on the inoculation and competitiveness of a *Rhizobium leguminosarum* strain in soils containing indigenous Rhizobia. *Appl. Environ. Microbiol.* 49:899-903.
- MORALES, M. 1987. Selección y evaluación de cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* tolerantes al suministro restringido de fósforo. Tesis MSc. Catie. Turrialba, C.R. 97 p.
- OHLENDORF, H.; MARTENSSON, A. 1990. Studies on the nodulation of strain-specific resistant pea lines using single, mixed and delayed inoculation by *Rhizobium leguminosarum*. *Plant and Soil* 121:235-242.
- OLIVEIRA, L.A.; GRAHAM, P.H. 1990. Evaluation of strain competitiveness in *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* using a nod+fix-natural mutant. *Arch. Microbiol* 153:305-310.
- OLIVEIRA, L.A.; GRAHAM, P.H. 1990. Speed of nodulation and competitive ability among strains of *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli*. *Arch. Microbiol* 108:1-6.
- PAULINI, A.E.; PESSANHA, G.G.; GROSZMANN, A. 1969. Competição de variedades de Feijão preto (*Phaseolus vulgaris* L.) na época "da seca" na Baixada Fluminense. *Agronomia* 27(3-4):61-70.
- PEREIRA, P.A.A.; BLISS, F.A. 1987. Nitrogen fixation and plant growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) at different levels of phosphorus availability. *Plant and Soil* 104:79-84.
- PINERO, D.; MARTINEZ, E.; SELANDER, R.K. 1988. Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. *Applied and Environ. Microbiol.* 54: 2825-2832.
- POOLE, K.; HANCOCK R.E. 1986. Phosphate-starvation-induced outer membrane proteins of members of the Families Enterobacteriaceae y Pseudomonadaceae: Demonstration of immunological cross-reactivity with an antiserum specific for porin protein P of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 165:987-993.

- POSTMA, J., HOK-A-HIN, C.H.; VAN VEEN, J.A. 1990. Role of microniches in protecting introduced *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* against competition and predation in soil. Appl. Environ. Microbiol. 56:495-502.
- POSTMA, J., HOK-A-HIN, C.H.; SCHOTMAN, J.M.T.; WIJFFELMAN, C.A.; VAN VEEN, J.A. 1991. Population dynamics of *Rhizobium leguminosarum* Tn5 mutants with altered cell surface properties introduced into sterile and nonsterile soils. Appl. Environ. Microbiol. 57:649-654.
- RENNIE, R.J.; KEMP, G.A. 1983a. N fixation in field beans quantified by N isotope dilution. 1. Effect of strains of *Rhizobium phaseoli*. Agron. J. 75:640-644.
- RENNIE, R.J.; KEMP, G.A. 1983b. N fixation in field beans quantified by N isotope dilution. 2. Effect of cultivars of beans. Agron. J. 75:645-649.
- RICHARDSON, A.E., SIMPSON, R.J., DJORDJEVIC, M.A.; ROLFE B.G. 1988. Expression of nodulation genes in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* is affected by low pH and by Ca and Al ions. Appl. Environ. Microbiol. 54:2541-2548.
- ROBERT, F.M.; SCHMIDT, E.L. 1985. Somatic serogroups among 5 strains of *Rhizobium phaseoli*. Can. J. Microbiol. 31:519-523.
- ROBINSON, A.C. 1969. Competition between effective and ineffective strains of *Rhizobium trifolii* in the nodulation of *Trifolium subterraneum*. Aust. J. Agric Res 20:827-841.
- ROSAS, J.C.; BLISS, F.A. 1986a. Mejoramiento de la capacidad de fijación de N en frijol común. Ceiba 27:95-104.
- ROSAS, J.C.; BLISS, F.A. 1986b. Utilización del potencial de fijación de N del frijol común en Centro América. Ceiba 27:105-115.
- SEGOVIA, L.; PIÑERO, D.; PALACIOS, R.; MARTINEZ-ROMERO, E. 1991. Genetic structure of a soil population of non symbiotic *Rhizobium leguminosarum*. Appl. Environ. Microbiol. 57:426-433.
- SINGLETON, P.W.; STOCKINGER K.R. 1983. Compensation against ineffective nodulation in soybean. Crop Science 23:69-73.
- SINGLETON, P.W.; MAGID, H.M.A.; TAVARES, J.W. 1985. Effect of phosphorous on the effectiveness of strains of *Rhizobium japonicum*. Soil. Sci. Soc. Am. J. 49:613-616.
- SINGLETON, P.W.; TAVARES, J.W. 1986. Inoculation response of legumes in relation to the number and effectiveness of indigenous *Rhizobium* populations. Appl. Environ. Microbiol. 51:1013-1018.
- SMART, J.B.; ROBSON, A.D.; DILWORTH, M.J. 1984a. A continuous culture study of the phosphorus nutrition of *Rhizobium trifolii* WU95, *Rhizobium* NGR234 and *Bradyrhizobium* CB756. Arch. Microbiol. 140:276-280.
- SMART, J.B.; DILWORTH, M.J.; ROBSON, A.D. 1984b. Effect of phosphorus supply on phosphate uptake and alkaline phosphatase activity in Rhizobia. Arch. Microbiol. 140: 281-286.
- SMART, J.B., DILWORTH, M.J.; ROBSON, A.D. 1984c. Effect of phosphorus supply on periplasmic protein profiles in Rhizobia. Arch. Microbiol. 140:287-290.
- SOTO-MUÑOZ M.G. 1992. Geographic distribution and environmental interactions that affect the abundance of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* in Costa Rica. M.Sc. Thesis. Department of Environmental Sciences, University of Virginia. 207 p.
- STEVENSON, F.J. 1986. Cycles of soil. J. Wiley and Sons. New York. p. 231-284.
- SPARROW, S.D.; HAM, G.E., 1983. Nodulation, N₂ fixation, and seed yield of navy beans as influenced by inoculant rate and inoculant carrier. Agron. J. 75:21-24.
- TAYLOR, R.W.; SISTANI, K.R.; PATEL, S. 1990. Soybean-*Rhizobium* combination for tolerance to low P-high aluminum. J. Agron. & Crop Sci. 165:54-60.
- THIES, J.E., SINGLETON, P.W.; BOHLOOL, B.B. 1991. Influence of the size of indigenous Rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced Rhizobia on Field-grown legumes. Appl. Environ. Microbiol. 57:19-28.
- TRIPLETT, E.W.; BARTA, T.M. 1987. Trifolitoxin production and nodulation are necessary for the expression of superior nodulation competitiveness by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strain T24 on clover. Plant Physiol. 85:335-342.
- TRIPLETT, E.W. 1988. Isolation of genes involved in nodulation competitiveness from *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* T24. Proc. Nalt. Acad. Sci. USA 85:3810-3814.
- TRIPLETT, E.W.; SCHINK, M.J.; NOELDNER, K.L. 1989. Mapping and subcloning of the trifolitoxin production and resistance genes from *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* T24. Molecular Plant-Microbe Interactions 2:202-208.
- TRIPLETT, E.W. 1990. Construction of a symbiotically effective strain of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* with increased nodulation competitiveness. Appl. Environ. Microbiol. 56:98-103.
- VINCENT, J.M. 1988. Ecological aspects of the root-nodule bacteria: Competition and survival. In D.P. Beck and L.A. Materon (Ed) Nitrogen Fixation by legume in mediterranean agriculture ICARDA Netherlands. p. 161-171.

- WEAVER, R.W.; FREDERICK, L.R. 1974. Effect of inoculum rate on competitive nodulation of *Glycine max* L. Merrill. I. Greenhouse Studies. Agron. J. 66:229-232.
- WEAVER, R.W.; FREDERICK, L.R. 1974. Effect of inoculum rate on competitive nodulation of *Glycine max* L. Merrill. II. Field Studies. Agron. J. 66:233-236.
- WESTERMANN, D.T.; KLEINKOPF, G.E.; PORTER, L.K.; LEGGETT, G.E. 1981. Nitrogen sources for bean seed production. Agron. J. 73:661-664.
- WINARNO, R. ; LIE, T.A. 1979. Competition between *Rhizobium* strains in nodule formation: interaction between nodulating and non-nodulating strains. Plant and Soil 51:135-142.
- WOLFF, A.B.; STREIT, W., KIPE-NOLT, J.A.; VARGAS, H.; WERNER, D. 1991. Competitiveness of *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* strains in relation to environmental stress and plant defense mechanisms. Biol. Fertil. Soils. 12:170-176.
- WOOMER, P., SINGLETON, P.W.; BOHLOOL, B.B. 1988. Ecological indicators of native rhizobia in tropical soils. Appl. Environ. Microbiol. 54 (5): 1112-1116.
- YOUNG, J.P.W.; DEMETRIOU, L.; APTE, R.G. 1987. *Rhizobium* population genetics: Enzyme polymorphism in *Rhizobium leguminosarum* from plants and soil in a pea crop. Appl. Environ. Microbiol. 53:397-402.
- ZAROUG, N.G.; MUNNS, D.N. 1979. Nodulation and growth of *Lablab purpureus* (Dolichos lablab) in relation to *Rhizobium* strain, liming and phosphorus. Plant and Soil 53:329-339.