

# MANEJO Y TECNOLOGIA DE LA FIJACION BIOLOGICA DE NITROGENO EN LEGUMINOSAS DE IMPORTANCIA AGRICOLA

**Oscar Acuña**

Laboratorio de Microbiología de Suelos. Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica

## 1. INTRODUCCION

Existe una reserva limitada del nitrógeno en el suelo debido a las pocas fuentes existentes y a la utilización por las plantas, lo que hace necesario la aplicación de fertilizantes naturales y sintéticos, pero estos solo cubren una fracción del total necesario para la agricultura. Las plantas de la familia de las leguminosas pueden satisfacer sus necesidades de nitrógeno mediante la adición de fertilizantes y a través de la Fijación Biológica de Nitrógeno, que involucra la reducción del nitrógeno atmosférico a amonio. Esta fijación ocurre mediante una simbiosis, en donde participan dos miembros: la leguminosa y la bacteria del género *Rhizobium* y el efecto más importante de la asociación es la adquisición del nitrógeno de la atmósfera.

## 2. ECOLOGIA DEL *Rhizobium*:

El *Rhizobium*, se encuentra en el suelo no solamente en la rizosfera o zona de raíces de las leguminosas sino alrededor de otras plantas y principalmente agregados a los coloides del suelos. Generalmente el *Rhizobium* vive saprofiticamente en el suelo, utilizando fuentes de energía y sustancias nitrogenadas del medio.

En el suelo la bacteria además de sobrevivir necesita multiplicarse, competir con la microflora nativa, colonizar la rizosfera, poseer habilidad de formar nódulos y principalmente ser eficiente en la fijación de nitrógeno. Teniendo en cuenta los procesos dinámicos que ocurren en el suelo a cada instante es posible imaginarse los numerosos factores que influyen en la población nativa de *Rhizobium* y la población inoculada en esta bacteria en el medio.

La habilidad de los organismos para fijar nitrógeno en el campo se ve fuertemente influenciado por las condiciones ambientales prevalentes. Estos factores pueden ser físicos (temperatura y humedad), efectos tóxicos (ácidos, aluminio), nutricionales (diferencias de elementos) o ecológicos (antagonismo).

## 2. FACTORES QUE AFECTAN LA FIJACION

Una buena nodulación y una eficiente fijación de N<sub>2</sub> antes que todo dependen de la carga genética de la planta y del *Rhizobium*, de una adecuada combinación entre la variedad de la planta y la cepa de la bacteria, además de otros factores como una buena capacidad de sobrevivencia del *Rhizobium* en el suelo, habilidad competitiva del *Rhizobium* en relación a cepas nativas, si éstas existen en el suelo, y alta capacidad invasora del *Rhizobium*, alto número de bacterias en la rizosfera, etc.

Sin embargo, aunque las condiciones expuestas fueran satisfactorias, una buena inoculación puede resultar en un fracaso debido a la interferencia de factores ambientales en la formación de los nódulos.

### 2.1 Factores edafoclimáticos

La comprensión de los factores climáticos y de suelo que afectan la simbiosis es indispensable para hacer posible la introducción y establecimiento de los inoculantes.

En los países de Centro América algunas leguminosas se cultivan en suelos de baja fertilidad, con problemas de acidez, toxicidad de algunos elementos, salinidad, etc; con fuertes pendientes y muy degradados, esto demuestra que para un mayor éxito en los estudios de inoculación se debe trabajar con cepas y variedades tolerantes a tales condiciones (Alvarado et.al., 1993).

Estudios realizados en laboratorio e invernadero han permitido obtener cepas altamente efectivas (Ortiz et.al., 1990), pero cuando son introducidas en el campo no mantienen sus características, muchas investigaciones han demostrado que este efecto se debe a factores ambientales a los que se les ha prestado muy poca atención.

La presencia de nitrógeno mineral en el suelo inhibe el desarrollo de nódulos y también la fijación de N, siempre y cuando este se encuentre en dosis elevadas (mayores de 50 kg/ha). Esto ha sido correlacionado directamente con la relación C:N en el tejido de la planta, donde relaciones altas favorecen y relaciones bajas inhiben la nodulación. Sundstrom *et al.*, (1982) evaluaron el efecto de la compactación y la fertilización nitrogenada sobre la nodulación y encontraron una disminución de la nodulación a densidades aparentes bajas y a dosis de nitrógeno superiores a los 25 kg de nitrógeno por hectárea.

A pesar de esto, a veces es favorable aplicar una pequeña cantidad de fertilizante nitrogenado (30 kg/ha) a la hora de la siembra, para suplir la necesidad de la planta por este elemento durante los estados iniciales de la infección y crecimiento nodular, cuando el proceso de fijación no se ha establecido (Vargas *et al.*, 1990).

Existen otros nutrientes que juegan un papel muy importante en la fijación de nitrógeno entre estos podemos destacar el: P, K, Ca, B, Mg, S, Mo, Cu, Zn, Co, donde tiene especial atención el fósforo, de allí que se estén seleccionando cepas que puedan desarrollarse a bajos niveles de este elemento.

Algunos estudios sobre el efecto del sombrero y pH en la nodulación en frijol demostraron una disminución severa en el desarrollo de los nódulos en la sombra al igual que a pH inferiores a 5,5 o superiores a 6,8 (Vencatasamy *et al.*, 1981). Acuña *et al.*, (1989) encontraron que en suelos de baja fertilidad y alta acidez se obtuvo un efecto beneficioso sobre la nodulación cuando se fertilizó con fósforo y calcio. Se ha observado además que plantas dependientes de la fijación biológica de nitrógeno requieren de más fósforo que las que utilizan nitrógeno mineral. La aplicación de fertilizante fosfórico mejora la nodulación y la efectividad de la fijación (Singleton *et al.*, 1985; Rosas y Bliss, 1986; Morales, 1987; Vargas y Ramírez, 1989).

Espinoza, *et al.* (1985) estudiaron el efecto de la sequía sobre la sobrevivencia de *Rhizobium* en frijol y encontraron que el número de nódulos formados por las cepas inoculadas fue estadísticamente inferior al valor obtenido en los tratamientos bajo riego.

Hungtinton (1984) encontró en estudios sobre la influencia de la labranza en la respuesta a la inoculación con *Rhizobium*, que la misma no se vio afectada con el tipo de labranza evaluada. Galomo *et al.*, (1980) estudiaron la respuesta a la inoculación y a la fertilización de cuatro variedades de frijol sembradas en un sistema mecanizado y en otro tradicional y obtuvo los mayores rendimientos en el sistema tradicional sin

la aplicación de fertilizante y con la aplicación de inoculante. Uribe *et al.*, (1990) en estudios realizados bajo condiciones de mínima labranza observaron que la respuesta a la inoculación varió en tres localidades con características ambientales diferentes.

## 2.2 Factores biológicos

**Cepas nativas:** Muchos de los estudios realizados con la inoculación de cepas en varios cultivos no mostraron los resultados esperados debido a la presencia de cepas nativas, que en algunos casos son más competitivas y menos efectivas que las introducidas. esta situación obliga a la búsqueda de cepas altamente competitivas y a la vez efectivas en la FBN.

**Presencia de otros organismos:** Daños causados a las plantas por fitopatógenos e insectos llegan a afectar indirectamente la fijación de nitrógeno al verse reducida su capacidad fotosintética. También algunas larvas de insectos se alimentan directamente del contenido de los nódulos. Por otro lado, la presencia de protozoarios en el suelo, quienes son los principales depredadores de las bacterias, tienden a afectar drásticamente las poblaciones (Acuña y Ramírez, 1992). Estas condiciones reducen significativamente la capacidad de fijar nitrógeno.

**Efecto de plaguicidas:** La literatura menciona que algunos plaguicidas, especialmente fungicidas aplicados a la semilla o al suelo, afectan negativamente las poblaciones de *Rhizobium*. Algunos trabajos realizados en el país demostraron que fungicidas como el Captan y Carboxin redujeron las poblaciones de bacterias inoculadas a la semilla (Acuña y Ramírez, 1986).

## 3. SELECCION DE CEPAS

Durante muchos años se ha realizado investigación sobre la selección de cepas de *Rhizobium* en gran cantidad de leguminosas de importancia agrícola. Su importancia radica en la necesidad de contar con bacterias altamente efectivas en el proceso de fijación y capaces de establecerse en diversos ambientes, sin embargo, los resultados obtenidos hasta ahora han sido muy variables.

Mediante algunas técnicas se puede aislar y reproducir la bacteria que está dentro del nódulo. Esto permite realizar estudios de la capacidad de fijación y de la ecología de *Rhizobium*. Dos de los aspectos más importantes en los estudios de fijación son la infectividad o capacidad de una cepa de nodular, un hospedero dado y la efectividad o capacidad relativa de la asociación planta- bacteria, una vez establecida, para asimilar el nitrógeno molecular. Estos estudios permiten obtener cepas de *Rhizobium* muy eficiente que pueden ser usadas en la fabricación de inoculantes.

Para el cultivo del frijol, desde el año 1989 se han realizado estudios de selección de cepas. Se cuenta con una colección de aproximadamente 150 cepas, las cuales han sido sometidas a pruebas de selección a nivel de campo en diferentes lugares del país. Actualmente se cuenta con varias cepas muy promisorias para ser utilizadas en siembras comerciales de frijol en algunas regiones.

Estudios realizados sobre la selección de cepas para soya lograron determinar las mejores cepas para ser utilizadas en la fabricación de inoculantes para dicho cultivo (Acuña et.al., 1987).

#### 4. BENEFICIOS DE LA FIJACION BIOLOGICA DEL NITROGENO

Los beneficios que se obtienen de la fijación biológica del nitrógeno estarán entonces ligados a una buena nodulación y a la eficiencia de ésta en el proceso de fijación.

Se sabe que las leguminosas son (siempre que sean eficientemente noduladas) nutricionalmente 2 a 3 veces más ricas en proteína que los cereales, además de poseer algunas de ellas grandes cantidades de aceite, los cuales se utilizan como oleaginosas (soya, maní). Por otro lado, siendo el consumo de alimentos superior a la producción; así como la gran deficiencia proteínica en los países subdesarrollados; la obtención de alimentos por éste medio es de suma importancia.

Ciertas leguminosas como por ejemplo la soya (*Glycine max*) es capaz de suplir sus necesidades de nitrógeno en un 100% a través de esta asociación simbiótica, por lo que el uso de fertilizantes nitrogenados pasa a un segundo plano; obviándose así la utilización de estos.

En el cultivo de frijol, durante los últimos 7 años, se ha realizado investigación con la finalidad de obtener un inoculante de alta efectividad. Algunos resultados demostraron que es posible lograr incrementos en los rendimientos que oscilan entre un 20 y 60% cuando se inocula con cepas altamente efectivas en el proceso de fijación de N (Uribe et.al., 1990; Acuña y Uribe, 1996).

En Ensayos realizados en Costa Rica en el cultivo del maní (*Arachis hypogea* var. Argentina) para evaluar el efecto de inoculación, se obtuvo resultados estadísticamente significativos siendo los resultados de producción los siguientes: tratamiento sin nitrógeno y sin inocular con fertilidad de campo 2.800 kg/ha y 6.600 kg/ha el tratamiento inoculado más la fertilidad nativa (Vargas y Ramírez, 1989).

La utilización de leguminosas forrajeras es una posible solución de bajo costo para el incremento en la producción de leche y carne; ya que actualmente la ausencia general de leguminosas nativas de alto rendimiento, la baja

productividad y escaso valor nutritivo de las gramíneas (nativas) imponen severas limitaciones a la producción animal (León et.al., 1986).

También se debe considerar la contribución de las leguminosas de cobertura en la mejoría de ciertas características físicas, químicas y biológicas de los horizontes superficiales del suelo.

Las leguminosas arbóreas contribuyen con producción de biomasa y fuente energética como carbón, madera, etc.

Investigaciones realizadas durante los últimos años demostraron que con el uso de inoculantes en frijol se logró obtener un incremento considerable en la producción y con la aplicación de menor cantidad de fertilizante nitrogenado, lo que asegura una reducción en los costos de producción.

El Laboratorio de Microbiología de Suelos del Centro de Investigaciones Agronómicas (UCR), cuenta con la tecnología de producción de inoculantes, bajo el nombre comercial de PROBIOL, que pueden ser utilizados en aquellas zonas donde se ha obtenido una favorable respuesta. A continuación se mencionan algunos aspectos relacionados con la producción de inoculantes.

#### 5. PRODUCCION DE INOCULANTES

La explotación agrícola de cepas de *Rhizobium* seleccionadas que son altamente efectivas en la fijación de nitrógeno depende de la disponibilidad de una tecnología de inoculación en la cual la cepa se cultiva en forma masiva, se incorpora en un material que sirve como soporte en el que sobrevivirá durante su distribución y estación en el mercado, lo que permitirá introducirlas al suelo en cantidades adecuadas para que nodulen a las leguminosas sembradas.

##### 5.1 Los inoculantes para leguminosas

Los inoculantes son productos biológicos fabricados a base de un material acarreador o soporte (en la mayoría de los casos se emplea suelo de turba) y de un caldo de bacterias crecidas en un medio de cultivo. La función de los inoculantes es la de proveer a las plantas de la familia de las leguminosas un alto porcentaje del nitrógeno que la planta requiere para su desarrollo y producción, esto debido a la capacidad de las bacterias de hacer disponible el nitrógeno atmosférico.

Su uso ha permitido obtener incrementos en producción entre un 30 y 60% en algunas leguminosas y un aporte de nitrógeno al cultivo que va de 50 a más de 200 Kg/Ha, reduciendo así grandemente la fertilización nitrogenada.

## 5.2 Fabricación de los inoculantes:

Uno de los primeros pasos para la producción de inoculantes es obtener cepas de *Rhizobium* que sean altamente efectivas cuando se adicionan a la leguminosa específica. Aquellas bacterias que mostraron alta eficiencia durante las etapas anteriores se puede multiplicar masivamente en medios de cultivo líquido mediante procesos de fermentación. Comprobada su eficiencia se pone la bacteria a crecer masivamente en fermentadores bajo condiciones controladas de esterilidad. Para comprobar su pureza se realiza un control del caldo.

Una vez que se tiene máximo crecimiento de la bacteria ( $10^{10}$  cel/ml de caldo) ésta se adiciona a un material acarreador o soporte que debe presentar varias características: alto contenido de materia orgánica, textura muy fina, alta capacidad de retención de humedad y bajo pH. dentro de estos materiales el más empleado es el suelo de turba, el cual se origina en sitios que permanecen la mayor parte del año bajo inundación (León et.al., 1986). Este material debe molerse, neutralizarse y esterilizarse, luego de mezclarse realiza el envasado en bolsas plásticas que permitan intercambio gaseoso.

Posteriormente el inoculante se almacena por 1-2 semanas a temperatura ambiente y luego se realiza el control de calidad del mismo. La población mínima que debe contener el inoculante es de  $5 \times 10^8$  bacterias por gramo de inoculante. Cuando se tiene esta población se almacena a temperaturas entre 7 y 10°C hasta su uso, el cual debe ser hasta un máximo de seis meses después de la fabricación.

## 5.3 Técnicas de inoculación

La inoculación consiste en la aplicación masiva de bacterias al suelo para asegurar una mayor producción de nódulos radiculares y fijación de nitrógeno. Esta puede realizarse de diferentes formas: inoculación al suelo, a las semillas o al material vegetativo.

## 5.4 Inoculación de las semillas

El inoculante se puede adicionar a la semilla y su cantidad dependerá del tamaño de la misma. Para esta práctica se recubre la semilla con el inoculante con ayuda de una solución adherente.

- 1- Preparar la solución adherente, entre éstas las más usadas son azúcar comercial al 15% disuelto en agua (3 cucharadas de azúcar por litro de agua), goma arábica (30%), almidón de yuca (20%) o metil celulosa (5%).

- 2- Colocar la semilla sobre una lona o dentro de un balde y adicionar 10 ml de la solución adherente por kg de semilla
- 3- Mezclar la semilla hasta que quede uniformemente humedecida.
- 4- Adicionar el inoculante sobre la semilla. Aplicar 50 g por Kg de semillas pequeñas (alfalfa, kudzu, etc.) y 10 g por Kg de semillas grandes (frijol, soya, etc.). Mezclar bien hasta que se observe un buen recubrimiento de la semilla, posteriormente se pone a secar a la sombra (20 minutos) y luego se siembra.

## 5.5 Inoculación de material vegetativo

Para la siembra de material vegetativo la cantidad de inoculante a usar estará de acuerdo con la distancia de siembra. Por ejemplo, para sembrar una hectárea en *Arachis pintoi* se utilizan aproximadamente 150 plantas o estolones en 100 m lineales; la inoculación se realiza de la siguiente forma:

- 1- Se mezcla 1 kg de inoculante con 600 ml de solución adherente y se agrega suficiente agua hasta completar 20 lts en un estafión o balde.
- 2- La inoculación del material vegetativo puede hacerse colocando éste dentro de la solución líquida para que quede bien recubierto o asperjando sobre el mismo la solución con una bomba de fumigar.

Con esta cantidad se puede asperjar el material vegetativo necesario para sembrar una hectárea. Esto se realiza inmediatamente antes de la siembra.

## 5.6 Inoculación al suelo

Esta se realiza aplicando el inoculante directamente en el fondo de surco de siembra o sobre la semilla y posteriormente se tapa. La dosis a emplear en este caso es de 4 kg/ha.

El tipo de inoculante a usar depende de la leguminosa que se va a sembrar ya que hay una especificidad de ésta con la bacteria. Actualmente se cuenta con inoculantes efectivos para las siguientes leguminosas:

de grano : soya, frijol, lenteja, maní.  
de cobertura y forrajeras: Desmodium, Arachis, Pueraria, Flemingia, Centrosema, alfalfa, Stilosantes, canavalia.  
arbóreas: poró, madero negro, cenízaro, guanacaste.

Además se están realizando investigaciones para obtener inoculantes efectivos en otras leguminosas de interés agrícola.

## 6. RAZONES PARA LA AUSENCIA DE RESPUESTA A LA INOCULACION

1. Suelo contiene bacterias fijadoras poco eficientes.
2. Inoculante no viable o ineficiente
3. Condiciones ambientales no favorables
4. Muerte de bacterias por contacto directo con fertilizantes o sustancias químicas tóxicas.
5. Existencia de otros factores nutricionales limitantes en el suelo para el huésped y/o la bacteria.
6. Antagonismo microbiano

## 7. TECNICAS EXPERIMENTALES ADAPTADAS EN LA TECNOLOGIA Y MANEJO DE *Rhizobium*: INVERNADERO Y CAMPO

Las prioridades de investigación en la simbiosis *Rhizobium* - leguminosa en una región donde la investigación está en el inicio es bastante subjetiva; pero se puede encausar hacia los siguientes puntos:

### a-Evaluación de la necesidad de inoculación

La selección de cepas para la eficiencia en la fijación del N<sub>2</sub> puede ser inútil si las especies de leguminosas forman nódulos eficientes con las cepas nativas.

Esta situación es encontrada a menudo entre leguminosas tropicales como una consecuencia de su alta promiscuidad, o sea, forman nódulos eficientes con rizobios adaptados a otras especies de leguminosas.

### b- Eficiencia de los inoculantes disponibles

Estos deben responder a las condiciones ambientales donde van a ser utilizados

### c- Colección y selección de cepas

Es necesario contar con las facilidades para el almacenamiento de cepas efectivas que puedan ser utilizadas para trabajos de selección.

## d- Competencia y sobrevivencia de cepas

En los ensayos de campo hay que tomar en cuenta la capacidad de las cepas en competir con otras adaptadas al suelo y además su sobrevivencia bajo condiciones adversas.

### e- Factores limitantes

Algunos factores físicos, químicos y biológicos que afectan la capacidad de fijación de nitrógeno.

## f- Producción de inoculantes y técnicas de inoculación

Una vez que se cuente con inoculantes de alta calidad es necesario realizar estudios para determinar la forma más efectiva de su aplicación en los cultivos.

### g- Efecto de plaguicidas

La literatura señala que varios agroquímicos pueden afectar la sobrevivencia de las bacterias, de allí que se debe conocer el efecto de algunos productos utilizados en los cultivos.

## 8. LITERATURA CITADA

- ACUÑA, O.; RAMIREZ, C. 1986. Efecto de fungicidas sobre la multiplicación y sobrevivencia de *Rhizobium japonicum* en soya *Glycine max*. Ceiba 27(1): 129-137.
- ACUÑA, O.; RAMIREZ, C.; MONTERO, R.; MATA, E. 1987. Respuesta de la soya a la inoculación con diversas cepas de *Rhizobium japonicum* en Liberia, Guanacaste. Agronomía Costarricense 11(1): 33-37.
- ACUÑA, O.; CORDERO, A. 1989. Efecto de diferentes dosis de Molibdeno, Fósforo y Calcio sobre la nodulación y crecimiento del frijol en un ultisol de Puriscal. Agronomía Costarricense 13(2): 193-196.
- ACUÑA, O.; RAMIREZ, C. 1992. Efecto de los protozoarios del suelo sobre la nodulación en frijol. Turrialba 42(3): 411-414.
- ACUÑA, O.; URIBE, L. 1996. Inoculación del frijol común con tres cepas seleccionadas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. Agronomía Mesoamericana 7(1): 35-40.
- ALVARADO, A.; ACUÑA, O.; URIBE, L. 1992. Tecnología de bajos insumos para la fertilización del frijol tapado. A workshop on SLASH MULSH Practices. Organizado por CORNEL-CATIE Octubre 1992. p. 189-199.
- ESPINOZA, V.; FERRERA-CERRATO, R.; LARQUE-SAAVEDRA, A. 1985. Efecto de la sequía en la sobrevivencia y competitividad de mutantes de *Rhizobium phaseoli* resistentes a antibióticos. Resúmenes Tercera Reunión sobre Fijación Biológica de Nitrógeno. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. México. D.F. p.17.

- GALOMO, R.; RAMOS, S.; LEPIZ, I. 1980. Respuesta de la inoculación y fertilización de 4 variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris*) en la región de la Chontalpa, Tab. Agricultura Tropical (México) 2(1):19-27.
- HUNTINGTON, T. 1984. The influence of tillage, inoculation and the regulation of symbiotic nitrogen fixation on the production of field beans and the mineralization of nitrogen from winter annual cover crops. Ph.D. Thesis University of Kentucky, Lexington 173p.
- LEON, E.; ACUÑA, O.; RAMIREZ, C. 1986. Respuesta de la leguminosa forrajera *Centrosema pubescens* a la inoculación con *Rhizobium*. Ceiba 27 (1)
- LEON, E.; ACUÑA, O.; RAMIREZ, C. 1986. Evaluación de la reproducción y sobrevivencia de bacterias del género *Rhizobium* en suelos de turba de la zona de Medio Queso, Los Chiles. Costa Rica, Agronomía Costarricense 10(1-2): 33-41.
- LEON, E.; ACUÑA, O.; RAMIREZ, C. 1986. Reproducción y sobrevivencia de *Rhizobium japonicum* en inoculantes a base de turba de Costa Rica. Ceiba 27(1): 139-145.
- MORALES, M. 1987. Selección y evaluación de cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* tolerantes al suministro restringido de fósforo. Tesis M.Sc. Catie. Turrialba, C.R. 97p.
- ORTIZ, R.; ACUÑA, O.; RAMIREZ, C. 1990. Determinación de las necesidades nutricionales de la soya inoculada con *Rhizobium japonicum* en un Humitropept de Guanacaste, en invernadero. Agronomía Costarricense 14(1): 115-120.
- ROSAS, J.; BLISS, F. 1986. Mejoramiento de la capacidad de fijación de nitrógeno en frijol común. Ceiba 27:95-104.
- SINGLETON, P.; MAGID, H.; TAVARES, J. 1985. Effect of phosphorous on the effectiveness of strains of *Rhizobium japonicum*. Soil. Sci. Soc. Am. J. 49:613-616.
- SUNDSTROM, F.; MORSE, R.; NEAL, J. 1982. Nodulation and nitrogen fixation of *Phaseolus vulgaris* L. grown in minesoil as affected by soil compactation and Plant Analysis 13 (3):231-242.
- URIBE, L.; ACUÑA, O.; HERNANDEZ, G. 1990. Respuesta de *Phaseolus vulgaris* var. Negro Huasteco a la inoculación con tres cepas de *Rhizobium* bajo condiciones de mínima labranza en tres localidades de Costa Rica. Agronomía Costarricense 14(2): 201-206.
- VARGAS, R.; ACUÑA, O. 1990. Respuesta de dos variedades de *Phaseolus Vulgaris* a la inoculación y a la fertilización con N y Mo en un inceptisol de Upala, Alajuela. Agronomía Costarricense 14(1): 93-98.
- VARGAS, R.; RAMIREZ, C. 1989. Respuesta de la soya y el maní a *Rhizobium* y a la fertilización con N, P, y Mo en un Typic Pellustert de cañas, Guanacaste. Agronomía Costarricense 13 (2): 175-182.
- VENCATASAMY, D.; PEERALLY, M.; 1981. Effects of certain environmental factors on nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L. Revue Agricole et Sclerie de Ile Maurice 60(2):61-70.