

# FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO POR LEGUMINOSAS ARBÓREAS PARA SOMBRA DE CAFÉ EN PUERTO RICO

Por

Manuel Santana Jiménez

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado

MAESTRO EN CIENCIAS

EN

**AGRONOMÍA**

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO  
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ

2007

Aprobado por:

\_\_\_\_\_  
Wigmar González, M.S.  
Miembro, Comité Graduado

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Ramón Torres, Ph.D.  
Miembro, Comité Graduado

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Eduardo C. Schröder, Ph.D.  
Presidente, Comité Graduado

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Matías Cafaro, Ph.D.  
Representante de Estudios Graduados

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Miguel A. Muñoz Muñoz, Ph.D.  
Director de Departamento

\_\_\_\_\_  
Fecha

## ABSTRACT

Sustainable production of shaded coffee brings multiple benefits, including the conservation and increase of soil fertility. The objective of this study was to evaluate the capacity of biological N<sub>2</sub> fixation of 30 different legume trees in two representative soils that include Humatas and Los Guineos series, from Puerto Rico coffee production region. The experiments were carried out in the greenhouse. Data was recorded at 90 and 180 days after planting for plant height and dry weight, nodule number and nodule dry weight and total nitrogenase activity by acetylene reduction assay (ARA). *Rhizobium* strains were isolated from nodulated trees, acetylene reduction assay for orthodox seeds species, and total nitrogen with Kjeldahl method for recalcitrant seeds species were conducted. The results indicated that total nitrogenase activity was higher in *F. macrophylla*, *C. farchildiana*, *A. procera*, *E. berteriana* and *E. variegata*. Based on the results of the ARA species, *I. vera*, *I. fagifolia*, *I. spectabilis* and *I. quaternata*, showed an important N<sub>2</sub> fixation potential after 300 days seeding, in spite of not being included in the experimental design of orthodox seeds. From the 28 nodulated species, the ones that produced the highest amount of nodules were: *C. farchildiana*, *F. macrophylla*, *I. vera*, *I. spectabilis*, *I. quaternata* and *A. procera*. Species *O. krugii* and *A. peregrina* only nodulated in Los Guineos soil, and *C. surinamensis* and *P. pedunculata* did not nodulate at all. For future studies, tree species should be evaluated under the same experimental design, with different levels of liming and phosphorus fertilization, to improve the soil pH and plant growth.

## RESUMEN

La producción sostenible de café a sombra trae múltiples beneficios incluyendo la conservación y el incremento de la fertilidad del suelo. El objetivo de este estudio fue el de evaluar la capacidad de fijación biológica de nitrógeno de 30 especies de leguminosas arbóreas, en dos suelos representativos (Humatas y Los Guineos) de la región cafetalera de Puerto Rico. Los experimentos se realizaron bajo condiciones de invernadero. Se tomaron datos en dos muestreos 90 y 180 días después de la siembra, para las variables altura de la planta, peso seco de la planta, número de nódulos, peso seco de nódulos y la estimación de la fijación de nitrógeno por el método de Reducción de Acetileno (ARA), para especies con semillas ortodoxas y nitrógeno total por el método de Kjeldahl para especies con semillas recalcitrantes. Cepas de *Rhizobium* fueron aisladas en los muestreos. La estimación de la fijación de N<sub>2</sub> indicó que *F. macrophylla*, *C. farchildiana*, *A. procera*, *E. berteriana* y *E. variegata* son especies con mayor actividad total de la enzima nitrogenasa. Basado en los resultados del ARA después de 300 días de sembradas, las especies *I. vera*, *I. fagifolia*, *I. spectabilis* e *I. quaternata*, a pesar de no estar incluidas en el diseño experimental de semillas ortodoxas, muestran un importante potencial fijador (N<sub>2</sub>). Se encontró que las especies más noduladas fueron: *C. farchildiana*, *F. macrophylla*, *I. vera*, *I. spectabilis*, *I. quaternata* y *A. procera*. Las especies *O. krugii* y *A. peregrina* solo nodularon en el suelo Los Guineos. *C. surinamensis* y *P. pedunculata* no nodularon en ningún de los suelos. Para futuros estudios se recomienda evaluar las especies en un mismo diseño experimental con diferentes grados de encalado y niveles de fertilización de fósforo para mejorar el pH del suelo y el crecimiento de los árboles.

© *Manuel Santana Jiménez* 2007

# DEDICATORIA

*A mi familia y amigos*

## **AGRADECIMIENTOS**

- Al Dr. Eduardo Schröder, por haberme dado la oportunidad y confianza para formar parte del grupo de investigación del laboratorio BNF y poder realizar estudios de postgrado. Además agradezco su amistad y apoyo en todo momento.
- Al Dr. Ramón Torres por formar parte del comité, aportación y colaboración.
- A M. S. Wigmar González por su colaboración y ayuda en el desarrollo de esta investigación.
- A Miguel Arango por su amistad, consejos estadísticos y apoyo durante la maestría.
- A Lionel Cruz por su colaboración en la fase de campo y amistad.
- A Ekram por su gran ayuda en el trabajo de laboratorio.
- A Gloria Aguilar y Evelyn Roselló por solucionar una parte de mis problemas.
- A mis amigos Alonso, Mauricio, Yobana, Beatriz, Alex, Jersón, Mirna, Paola, Yvette, Diana, Feliciano, Ixia, Glenny, Milena, Ricardo, Bismark y Melissa por su apoyo y momentos vividos.

## Tabla de contenido

<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>iii</b>
<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>iv</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>vi</b>
<b>Tabla de contenido</b> .....	<b>vii</b>
<b>Lista de cuadros</b> .....	<b>x</b>
<b>Lista de Apéndices</b> .....	<b>xii</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>3</b>
<b>3. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	<b>4</b>
3.1 El Café en Puerto Rico.....	4
3.2 El nitrógeno.....	5
3.3 <i>Rhizobium</i> spp.....	7
3.4 Las leguminosas.....	12
3.5 Técnicas para evaluar la fijación biológica de nitrógeno.....	15
3.6 Agroforestería .....	17
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>21</b>
4.1 Área de trabajo.....	22
4.2 Suelos.....	22
4.3 Árboles.....	23
4.4 Semillas.....	23
4.5 Aislamiento de rhizobios .....	24
4.6 Nodulación.....	26
4.7 Medición de la fijación biológica de nitrógeno .....	26
4.8 Muestreo .....	27
4.9 Diseño experimental .....	28
4.10 Análisis estadístico de datos .....	28

<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>30</b>
5.1 Suelos .....	30
5.2 Número más probable de <i>Rhizobium</i> en suelo (NMP).....	30
5.3 Experimento en invernadero de especies con semillas recalcitrantes.....	30
5.3.1 Altura de las plantas.....	30
5.3.2 Peso seco de plantas.....	32
5.3.3 Nodulación.....	33
5.3.4 Peso seco de nódulos .....	35
5.3.5 Porcentaje de nitrógeno total en árboles con semillas recalcitrantes.....	36
5.3.6 Cepas aisladas .....	38
5.4 Experimento en invernadero de especies con semillas ortodoxas .....	39
5.4.1 Altura de las planta .....	39
5.4.2 Peso seco de plantas.....	43
5.4.3 Nodulación.....	45
5.4.4 Peso seco de nódulos .....	49
5.4.5 Fijación de nitrógeno (Actividad de la nitrogenasa).....	51
<b>6. DISCUSIÓN .....</b>	<b>55</b>
6.1 Suelos.....	55
6.2 Recuento de <i>Rhizobium</i> en suelo (NMP).....	56
6.3 Experimento en invernadero de especies con semillas recalcitrantes.....	56
6.3.1 Altura de las plantas.....	56
6.3.2 Peso seco de plantas.....	57
6.3.3 Nodulación.....	58
6.3.4 Porcentaje de nitrógeno total en árboles con semillas recalcitrantes.....	59
6.3.5 Fijación de nitrógeno (Actividad de la nitrogenasa).....	59
6.4 Experimento en invernadero de especies con semillas ortodoxas .....	60
6.4.1 Altura de las plantas.....	60
6.4.2 Peso seco de plantas.....	60
6.4.3 Nodulación.....	61
6.4.4 Peso de nódulos.....	62
6.4.5 Fijación de nitrógeno (Actividad de la nitrogenasa).....	63
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>65</b>



<b>8. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>66</b>
<b>9. REFERENCIAS.....</b>	<b>67</b>
<b>10. APÉNDICES .....</b>	<b>79</b>

## Lista de cuadros

Cuadro 1. Lista de especies leguminosas arbóreas con potencial para sombra de café ( <i>Mimosoideas</i> ).....	24
Cuadro 2. Lista de especies arbóreas leguminosa con potencial para sombra de café ( <i>Papilionoideas</i> ).....	25
Cuadro 3. Análisis químico de los suelos utilizados en los experimentos de invernadero.....	31
Cuadro 4. Altura de plantas con semilla recalcitrante (cm).....	32
Cuadro 5. Efecto de suelo en la altura de plantas con semilla recalcitrante (cm).....	32
Cuadro 6. Peso seco de plantas con semilla recalcitrante (gramos) .....	33
Cuadro 7. Efecto de suelo en el peso seco de plantas con semilla recalcitrante (gramos) .....	33
Cuadro 8. Número de nódulos/ planta (semilla recalcitrante) .....	34
Cuadro 9. Efecto de suelo en el número de nódulos de plantas con semilla recalcitrante.....	34
Cuadro 10. Influencia de nemátodos en el No. nódulos de <i>P. carbonarium</i> en el suelo Los Guineos .....	35
Cuadro 11. Peso seco de nódulos en plantas de semilla recalcitrante (Materia Seca en miligramos).....	36
Cuadro 12. Efecto de suelo en el peso seco de nódulos en plantas con semilla recalcitrante (miligramos).....	37
Cuadro 13. Porcentaje de Nitrógeno en plantas con semilla recalcitrante.....	37
Cuadro 14. Efecto de suelo en el porcentaje de N de plantas con semilla recalcitrante.....	38
Cuadro 15. Cepas aisladas de árboles con semillas recalcitrantes y <i>P. carbonarium</i> .....	39
Cuadro 16. Altura de plantas con semillas ortodoxas (cm) .....	40
Cuadro 17. Altura de plantas con semillas ortodoxas (cm) .....	41
Cuadro 18. Efecto de suelo en la altura de plantas con semillas ortodoxas (cm.).....	41
Cuadro 19. Efecto de suelo en la altura de plantas con semillas ortodoxas (cm) .....	42
Cuadro 20. Peso seco de plantas con semillas ortodoxas (gramos).....	43
Cuadro 21. Efecto de suelo en el peso seco de plantas con semillas ortodoxas (gramos).....	44
Cuadro 22. Efecto de suelo en el peso seco de plantas con semillas ortodoxas(gramos).....	45
Cuadro 23. Número de nódulos en plantas con semillas ortodoxas. ....	46
Cuadro 24. Efecto de suelo en el número de nódulos de plantas con semillas ortodoxas .....	48

Cuadro 25. Efecto de suelo en el número de nódulos de plantas con semillas ortodoxas.....	49
Cuadro 26. Peso seco de nódulos en plantas con semillas ortodoxas (mg).....	50
Cuadro 27. Efecto de suelo en el peso seco de nódulos en plantas con semillas ortodoxas (gramos).....	51
Cuadro 28. Efecto de suelo en el peso seco de nódulos en plantas con semillas ortodoxas (gramos).....	52
Cuadro 29. Actividad total de la nitrogenasa en especies con semillas ortodoxas.....	53
Cuadro 30. Actividad específica de la nitrogenasa en especies con semillas ortodoxas.....	54

## Lista de Apéndices

Apéndice 1. Tabla de nombres científicos y comunes familia <i>Mimosoideae</i> .....	79
Apéndice 2. Tabla de nombres científicos y comunes familia <i>Papilionoideae</i> .....	80
Apéndice 3. Análisis de varianza para la variable: altura de plantas en especies con semillas ortodoxas.....	81
Apéndice 4. Separación de medias para efecto principal de especie (altura de plantas).....	82
Apéndice 5. Análisis de varianza para la variable: peso seco de plantas con especies con semillas ortodoxas.....	83
Apéndice 6. Separación de medias para efecto principal de especie (peso seco de plantas).....	84
Apéndice 7. Análisis de varianza para la variable: número de nódulos para especies con semillas ortodoxas.....	85
Apéndice 8. Separación de medias para efecto principal de especie (número de nódulos).....	86
Apéndice 9. Análisis de varianza para la variable: peso seco de nódulos para especies con semillas ortodoxas.....	87
Apéndice 10. Separación de medias para efecto principal de especie (peso seco de nódulos). ....	88
Apéndice 11. Análisis de varianza para la variable: actividad total de la nitrogenasa para especies con semillas ortodoxas.....	89
Apéndice 12. Separación de medias para efecto principal de especie (actividad total de la nitrogenasa).....	90

# FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO POR LEGUMINOSAS ARBÓREAS PARA SOMBRA DE CAFÉ EN PUERTO RICO

## 1. INTRODUCCIÓN

Desde su introducción en Puerto Rico en el año 1736 (Mondoñedo, 1957), el cultivo del café se convirtió en una parte importante de la cultura agrícola de la isla, especialmente de la cordillera central (Pérez, 1957). Los cafés comerciales se originan de árboles nativos de África, *Coffea liberica*, *Coffea canephora*, y *Coffea arabica* que naturalmente crecen bajo el dosel de los bosques. El café puertorriqueño se destaca por la predominancia de la variedad arábica de intenso sabor, cuerpo denso y achocolatado, que lo distingue como uno de los mejores cafés del mundo y con gran potencial para su exportación.

El café ha estado vinculado estrechamente al proceso histórico del desarrollo económico y social del pueblo puertorriqueño. La producción de café en la isla ha ido en descenso en los últimos 50 años. En 1955 se tenían 160 mil cuerdas cultivadas y hoy solo se cuenta con 58 mil cuerdas. Muchos factores han sido la causa incluyendo: fenómenos atmosféricos, el alto costo de mano de la obra, ingreso de café ilegal y el aumento de precio de los insumos agrícolas.

El café tradicionalmente se ha sembrado bajo sombra y fue durante la segunda mitad del siglo veinte que se empezó incentivar a los agricultores a crecer el cafeto a sol para aumentar la producción y reducir la incidencia de enfermedades en 1970, se aceptó y se expandió esta nueva práctica (Perfecto et al., 1996). Con el cultivo del café a pleno sol se aumentó la utilización de pesticidas, el uso de fertilizantes nitrogenados, al igual que la densidad de plantas, lo que produjo un aumento de costos de producción y efectos negativos en el medio ambiente afectando la conservación del suelo, la biodiversidad y la calidad del fruto.

Debido a la escasa investigación científica y la falta de datos en el tema (Monroig- Ingles, 2001) es indispensable realizar investigación en Puerto Rico encaminada a la utilización de prácticas de manejo más adecuadas para recomendar acertadamente a los caficultores sobre el uso más

conveniente de la sombra. Basado en estudios previos realizados en otros países productores del grano, se ha confirmado que la asociación de leguminosas arbóreas con cultivos de café mejora y mantiene la fertilidad del suelo. Es así que encontramos en los sistemas agroforestales una alternativa para la agricultura sostenible que permite reducir costos de producción y conservar a largo plazo el suelo y su fertilidad. Además en los sistemas agroforestales la biodiversidad cumple con servicios que van más allá de la producción de alimento como es el reciclado de nutrientes, regulación del microclima y de procesos hidrológicos, supresión de organismos indeseables, activación de la biología del suelo, adición de materia orgánica y la fijación de nitrógeno (Altieri, 1999).

La plantación típica de café (policultivo) es posiblemente la que más beneficios trae al agricultor y a la vida silvestre (Miranda-Castro & Padrón, 2005). Nuestro objetivo es buscar diferentes especies de leguminosas arbóreas eficientes en la fijación biológica de nitrógeno y de adaptación en la zona cafetalera de Puerto Rico, sabiendo que son pocas las especies de árboles que dominan el agroecosistema café bajo sombra en Puerto Rico (Arango, 2007), para poder llegar a tener cultivos de café en un sistema sustentable que favorezca la conservación del suelo, el aumento de microorganismos benéficos del suelo y la ecología y economía del agroecosistema.

## 2. OBJETIVOS

- Seleccionar las especies de leguminosas arbóreas más prometedoras para sombra en el cultivo de café.
- Evaluar la fijación de nitrógeno a 30 especies de leguminosa arbóreas de las familias *Mimosoideae* y *Papilionoideae*, en dos series diferentes de suelo de la zona cafetalera de Puerto Rico bajo condiciones de invernadero.

### 3. REVISIÓN DE LITERATURA

#### 3.1 El Café en Puerto Rico

El café es el cultivo tradicional más importante en la cordillera central de Puerto Rico, además ocupa el quinto puesto en aporte al ingreso bruto agrícola, 7.2% del valor total de las ventas de productos agrícolas en 2002 (Álamo, 2002). Antes ocupaba el tercer renglón en importancia económica, por debajo de las industrias de plantas ornamentales y plátanos que registran un mayor ingreso. El café se introdujo desde Martinica y República Dominicana en 1736, igualmente se cree fue en la región de Coamo donde primero se cultivó. Para el año de 1776 el café constituía la principal cosecha del país ayudando a fomentar la industria en Puerto Rico (Rivera-Bermúdez, 1975). El cultivo fue muy bien acogido y por entonces había una gran demanda por parte de Europa y Norte América lo que ayudó a su rápida difusión al punto de tener en 1896, 193 mil cuerdas de producción cafetalera; esta cifra ha venido disminuyendo y actualmente se tienen 58 mil cuerdas sembradas (Álamo, 2002).

Para la década de 1960 y principios de los setenta, se introdujeron técnicas más agresivas y enfocadas a aumentar la producción, resultando en un severo cambio en el paisaje de la montaña, haciendo menos sustentable el cultivo en términos agrícolas y socioeconómicos. En colaboración con entidades del gobierno se pasó de cultivar café bajo sombra, a cultivar café al sol o al raso, incrementando el uso de fertilizantes y plaguicidas. Con el tiempo ha sido evidente las desventajas del cultivo a sol incluyendo altos costos ambientales y culturales (Miranda-Castro, 2005). El deterioro del sector en los últimos años se puede apreciar observando la reducción del área sembrada y la producción que en 1955/56 con 160 mil cuerdas y una producción de 309,000 quintales pasó en 2004/05 a 58 mil cuerdas y una producción de 175,000 quintales según datos del anuario estadístico del Departamento de Agricultura (Álamo, 2004).

En sólo 50 años disminuyó la tercera parte del área sembrada de café, esto debido a factores como:

- La escasez en la mano de obra, falta de obreros para recoger las cosechas.



- Los fenómenos atmosféricos, huracanes y sequías que han afectado significativamente la industria.
- Entrada de café ilegal, contrabando de café de otros países productores.
- Los altos costos de los insumos agrícolas, fertilizantes y plaguicidas.
- El fomento del desarrollo industrial.
- La regulación del precio del café, llevada a cabo por DACO (Departamento de Asuntos del Consumidor). El precio se ha mantenido fijo desde 1991 hasta 2005 (Álamo, 2004).

Hoy día el café da empleo a 10,500 habitantes en los 21 municipios de la zona cafetalera, y según el censo agrícola del 2002 hay 57,549 cuerdas sembradas (Álamo, 2004), el café a sombra es visto desde otra perspectiva, son áreas de “bosque secundario” que pueden contribuir a la preservación de cuencas hidrográficas la fauna y la flora.

### **3.2 El nitrógeno**

El nitrógeno ocupa una posición única entre los elementos esenciales para el crecimiento de las plantas ya que se requieren grandes cantidades en la producción de cosechas. La reserva principal de este elemento es la atmósfera, en donde se encuentra en forma de  $N_2$ , pero esta molécula no puede ser utilizada por la mayoría de los seres vivos (exceptuando algunas bacterias). Esas bacterias y algas cianofíticas que pueden usar el nitrógeno ( $N_2$ ) del aire juegan un papel muy importante en el ciclo de este elemento al fijar el nitrógeno, convierten el  $N_2$  en otras formas químicas (nitratos y amonio) asimilables por la planta (Paul y Clark, 1996).

#### **Rol biológico**

De los nutrientes minerales, el nitrógeno es cuantitativamente el más importante para el crecimiento de las plantas. La toma de nitrógeno del suelo en forma de amonio ( $NH_4^+$ ) y nitrato ( $NO_3^-$ ) es regulada por la química y disponibilidad en el suelo. El nitrógeno es componente esencial de los aminoácidos y los ácidos nucleicos, vitales para la vida. Las leguminosas en simbiosis con las bacterias de la familia *Rhizobiaceae* son capaces de absorber el nitrógeno directamente del aire, siendo éste transformado en amoníaco y luego en amonio por bacterias que viven en simbiosis con la planta en sus raíces. El amonio es posteriormente utilizado por la

planta para formar el grupo amino de los aminoácidos de las proteínas que finalmente se incorporan a la cadena trófica (Paul y Clark, 1996).

El nitrógeno tiene funciones fisiológicas en las plantas, como es la osmoregulación y el balance de catión –anión (Steingrover et al., 1986). En general el  $\text{NO}_3^-$  se reduce a  $\text{NH}_4^+$  y después este es asimilado en la glutamina y así subsecuentemente el nitrógeno puede llegar a activar el metabolismo de crecimiento de una planta. La nutrición de nitrógeno influye en el crecimiento de la hoja, afectando el tamaño y/o cantidad de carbohidratos, que a su vez está relacionada con la tasa de fotosíntesis de la planta.

### **Nitrógeno y café**

El nitrógeno es el nutriente más limitante en el cultivo de café (Carvajal, 1984), siendo la disponibilidad del nitrógeno un factor que afecta el 40% del volumen de la cosecha de un cafetal. El consumo de nitrógeno por parte de la planta de café es alto, y dependiendo de la producción la plantación necesita entre 250 y 350 kg de N/ha/año. Una producción alta, necesita un mayor aporte de nitrógeno, pues la fruta extrae una alta cantidad de este elemento alrededor de 40,5 g N/planta (Carvajal, 1959). En los cafetales jóvenes el nitrógeno debe ser aplicado en cantidad suficiente para un desarrollo rápido y vigoroso. Cuando la planta de café tiene una buena fuente de nitrógeno, permite la renovación adecuada de la madera, por medio de la emisión de brotes vigorosos, la formación de abundante follaje que asegura un crecimiento normal de los frutos y una buena floración (Rojas y Pérez, 2001).

Frecuentemente el nitrógeno es agregado a través de fertilización o adición de materia orgánica en descomposición, sujeta a una serie de transformaciones biológicas llevadas a cabo por insectos y microorganismos. En los suelos tropicales el contenido de nitrógeno varía entre 0.05 y 4.7%. En general, es común el rango comprendido entre 0.2 y 0.7% para la denominada capa arable. Las plantas de café extraen el nitrógeno que necesitan esencialmente del suelo, bajo dos formas minerales: nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y amonio ( $\text{NH}_4^+$ ). Estudios sugieren que solo el 30% del nitrógeno adicionado por fertilización es asimilado por las plantas de café (Sommer, 1978), presentando pérdidas en el agro-ecosistema y afectando la calidad de aguas subterráneas y ríos.

El nitrógeno reacciona en el suelo, es así que el nitrato de amonio, el cloruro de amonio y el sulfato de amonio reaccionan acidificando el suelo, aunque el sulfato de amonio provoca mayor grado de acidificación. Los suelos de la zona cafetalera de Puerto Rico son considerados de baja a mediana fertilidad, siendo la acidez de los suelos un componente asociado a la baja fertilidad y productividad, puesto que propicia una serie de toxicidades y deficiencias incluyendo el nitrógeno que es un elemento crítico en la producción de café (Muñiz y Monroig, 1992).

Se requieren cantidades importantes de nitrógeno en el cultivo de café, durante toda su fase de producción, pero en particular para el desarrollo del grano, lo cual está muy relacionado con la calidad del fruto cosechado. Las leguminosas usadas como sombra aportan cantidades importantes de nitrógeno en cada arreglo, además de materia orgánica que mejora las condiciones del suelo, reduce la erosión, regula la temperatura y luminosidad dentro del cafetal y mejora la calidad del grano. Los sistemas de agricultura sostenible que incluyen el uso de árboles leguminosa que aumentan y conservan el nitrógeno en el suelo han sido reportados en Venezuela (Escalante, 1997; Aranguren et al., 1982), Costa Rica (Babbar y Zak, 1994; Linblad y Russo, 1986), México (Greenberg et al., 1997; Roskoski, 1980), Cuba (Rodríguez et al., 1991), Guatemala (Muñoz, 1997), Honduras (CIDICCO, 1995), y Sri Lanka (Ranasinghe, 1995; Kathirgamathaiyah et al., 1993).

### **3.3 *Rhizobium* spp.**

Las *Rhizobiaceae* son una familia de bacterias (División *Proteobacteria*) en forma de bacilos, con pared celular de bajo porcentaje de peptidoglucano, característica que las incluye en el grupo de las bacterias Gram negativas, carecen de esporas, son aerobias y su tamaño oscila entre 0.5 a 0.9 x 1.2 a 3µm (Somasegaran y Hoben, 1994). La mayoría de las cepas producen abundantes polisacáridos mucilaginosos extracelulares que van desde una goma acuosa a altamente densa, cuya composición varía con la cepa. Los Rhizobios sufren un cambio morfológico dentro de las células del nódulo para formar los bacteroides. Estas células son agrandadas, vacuoladas y en algunos casos claramente ramificadas, carecen de flagelos y quizá no son capaces de reproducirse. Los bacteroides están encerrados en membranas de origen de la planta huésped, a

veces aislados y a veces en grupo, dependiendo de la especie. Al final de la vida activa del nódulo los bacteroides se desintegran.

### **Quimiotaxis e infección**

La rizósfera es el medio donde las bacterias se multiplican y es en esta zona donde las raíces de las plantas liberan exudados como aminoácidos, azúcares y polisacáridos (Rovira, 1991). Las bacterias detectan estas sustancias presentando quimiotaxis positiva o negativa. Algunos exudados de las raíces de las leguminosas son conocidos como flavonoides, estas sustancias activan los genes encargados de la producción de factores de nodulación (Nod) en *Rhizobium*. Dentro de estas sustancias encontramos lipooligosacáridos (LOS) que generan una variedad de eventos en la planta como, encurvamiento del pelo radicular, división celular y secreción de inductores de genes *nod* adicionales e iniciación del hilo de infección (Smit et al., 1986).

### **La nodulación**

Los conocimientos de afinidad entre rhizobios y árboles tropicales son limitados. Se tienen reportes basados en estudios que indican nodulación de leguminosas arbóreas por cepas de crecimiento lento y rápido (Danso et al., 1992). Muchos de estos árboles han sido introducidos en diferentes partes del trópico sin ningún conocimiento de la eficiencia de las cepas indígenas de rhizobios con estas nuevas leguminosas. Resultados encontrados por Bala y Giller (2005), muestran gran variabilidad en la especificidad de la simbiosis rhizobios-leguminosa, ya que el rango de hospedero es más grande en algunas leguminosas y en otras es más reducido. Estos autores encontraron que en algunos casos la fijación de nitrógeno fue más efectiva en leguminosas infectadas con rhizobios nativos del suelo que con cepas estándar de *Rhizobium tropici* inoculadas. En otros casos encontraron mejor respuestas en nodulación y fijación de nitrógeno en leguminosas infectadas por cepas estándar inoculadas. La habilidad de los rhizobios para nodular y fijar nitrógeno en un amplio rango de huéspedes ofrece muchas posibilidades incluyendo la introducción de leguminosas a nuevos nichos (Bala y Giller, 2005).

La nodulación en las leguminosas ocurre de forma frecuente. Sin embargo, algunas especies no pueden ser infectadas por *Rhizobium* y no fijan nitrógeno. Las observaciones muestran que el

90% de las *Papilionoideae* y de las *Mimosoideae* tienen nódulos, pero solo el 30% de las *Cesalpinoideae* los poseen (Drevon, 1995).

Sólo se ha examinado un bajo porcentaje de especies, los resultados hasta 1980 han sido publicados por Allen y Allen (1981). Se estima que la familia *Mimosoideae* tiene 3 mil especies de las cuales se han examinado 388 y se ha comprobado nodulación en 351 especies. En 2001, Sprent publica datos de nodulación actualizados hasta ese año, junto con la nueva clasificación taxonómica y cambios de nombre de algunas especies. La mayoría de las especies de la familia *Leguminosae* forman asociación con las bacterias de la familia *Rhizobiaceae*: *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* y *Azorhizobium*. Esta asociación frecuente en las subfamilias *Papilionoideae* y *Mimosoideae* se da en las raíces de las plantas y presentan tumores (nódulos) de distinta forma y tamaño donde se lleva a cabo la fijación de  $N_2$  (Olivares, 2006).

### **La nitrogenasa**

La enzima nitrogenasa es un complejo de dos proteínas, una contiene Fe y la otra Fe y Mo. Esta enzima es responsable de convertir o reducir el nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) en  $NH_4^+$ , es sintetizada en el citosol por los bacteroides. Las leguminosas utilizan el  $NH_4^+$ , para convertir precursores metabólicos en aminoácidos que son convertidos en proteínas (Somasegaran y Hoben, 1994).

### **Rhizobios tropicales**

Se han descrito fenotipos y la diversidad filogenética de varios grupos de rhizobios de crecimiento rápido asociados a especies arbóreas como *Acacia senegal* y *Prosopis chilensis* en Sudan, Kenia y Brasil (Nick et al., 1999). Allí se encontró similitud genética entre las cepas aisladas de los dos continentes y se encontraron cepas pertenecientes a los géneros *Sinorhizobium* y *Azorhizobium* (Haukka et al., 1998). Según Woomey y colaboradores, (1988) existe una relación muy cercana entre las leguminosas y la proliferación de poblaciones rhizobiales de suelos tropicales en simbiosis y vida libre (dependiendo de la materia orgánica y la concentración de nitrógeno en suelo); esto se demostró en estudios hechos en la isla de Maui,

donde se aislaron cepas nativas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* asociadas a *Leucaena leucocephala*, *Sesbania rostrata* y *Acacia mangium*. Igualmente se aislaron otras especies de *Rhizobium* de leguminosas arbustivas (Woomer et al., 1988). Las cepas nativas de suelos tropicales, son a menudo usadas para estudios de diversidad, nodulación cruzada, efectos de salinidad sobre el crecimiento de *Rhizobium* (Lippi et al., 2000), competencia entre cepas nativas e inoculadas (Moawad y Bohlool, 1984), filogenia y aislamiento de cepas potenciales para uso en cultivos que están en suelos ácidos, comúnmente encontrados en los trópicos.

### **Rango de huésped**

La definición taxonómica de *Rhizobium* también incluye la descripción del rango de huésped. Algunos *Rhizobium* tienen un rango más amplio de plantas huéspedes que otros. Se ha reportado que *Bradyrhizobium japonicum* y *Sinorhizobium fredii* son capaces de nodular un gran número de leguminosas, mientras que *S. meliloti* ha sido aislado principalmente de las plantas de los géneros *Medicago*, *Melilotus* y *Trigonella*.

En el género *Bradyrhizobium*, *B. japonicum* tiene un amplio rango de plantas huéspedes, incluyendo muchas leguminosas tropicales y algunas de zonas templadas. En 2004 se aislaron 17 cepas de *Rhizobium* de *Pterocarpus officinalis* en Martinica y Guadalupe. Los resultados mostraron 5 ribotipos muy cercanos al género *Bradyrhizobium*. Estos fueron evaluados en *Acacia seyal*, planta normalmente nodulada por diferentes cepas de *Bradyrhizobium* (Ba et al., 2004). Esto contrasta con *Sesbania sesban*, especie no selectiva que requiere cepas específicas de *Rhizobium* (Mzoma, 1989). Acosta-Duran y Martínez Romero (2002) reportaron nodulación de *R. tropici*, *Sinorhizobium* spp. y *R. etli* en *Gliricidia sepium*, demostrando que *Gliricidia* es un hospedero de amplio rango. En Puerto Rico, 15 aislamientos fueron agrupados en dos grupos *Rhizobium gallicum* y *Rhizobium tropici*. Estas cepas fueron aisladas de *Sesbania*, *Calliandra*, *Poitea*, *Piptadenia*, *Neptunia* y *Mimosa* y confirman el rango amplio de hospederos de *Rhizobium tropici* (Zurdo-Piñero et al., 2004).

En 1998, Haukka y colaboradores, aislaron cepas que agruparon en 5 grupos. La mayoría presentaron crecimiento lento, característica típica del género *Bradyrhizobium* sp. Estas cepas se

aislaron de *Centrolobium* sp, *Dalbergia nigra*, *Swartzia langsdorffii*, *Tipuana tipu*, *Acacia mangium*, *Platypodium elegans*, *Anadenanthera peregrina*, *Albizia lebbeck* y *Enterolobium contortisiliquum*. Las cepas de crecimiento medio, blancas y con producción de mucosa características del género *Azorhizobium* sp fueron aisladas de *Sesbania virgata*. Las cepas de crecimiento rápido y acidificantes características del género *Rhizobium* sp., *Sinorhizobium* sp., o *Mesorhizobium* sp fueron aisladas de *Anadenanthera peregrina*, *Albizia lebbeck* e *Platycyamus regnellii*. Este estudio encontró que cepas de crecimiento lento (*Bradyrhizobium*) y cepas de crecimiento rápido (*Rhizobium*, *Sinorhizobium* y *Mesorhizobium*) nodulan el mismo hospedero.

### **Diversidad genética**

Muchas de las especies de *Rhizobium* son de gran importancia ecológica y agrícola. En la región sur del Sahara en África, muchos árboles madereros son parte del sistema agroforestal, además de ser una alternativa barata de fertilización en esta zona (Giller, 2001). Es así que el estudio de la diversidad genética y filogenia cobra importancia para cualquier agro-ecosistema donde estén presentes las leguminosas arbóreas y herbáceas.

Investigaciones en Etiopía con PCR-RFLP (enzimas de restricción), reflejan gran diversidad genética en el suelo. Wolde-meskel y colaboradores (2005), aislaron 223 cepas: 195 nuevas y 28 conocidas de 18 especies de leguminosas. El análisis filogenético sugiere que las cepas nativas de Etiopía son del género *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium*. Este estudio donde se usaron leguminosas como: *Acacia abyssinica*, *Acacia senegal*, *Acacia seyal*, *Acacia tortilis*, *Albizia gummifera*, *Erythrina brucei*, *Sesbania sesban*, y algunas especies introducidas como: *Acacia saligna*, *Calliandra calothyrsus*, *Gliricidia sepium*, *Leucaena diversifolia* y *Leucaena leucocephala*, mostró que la caracterización de simbiontes de leguminosas crecidas en áreas biogeográficas no estudiadas previamente revela abundantes datos de biodiversidad. En el futuro, el análisis de la biodiversidad y la filogenia permitirá elucidar la evolución de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa (Wolde-meskel et al., 2005).

### 3.4 Las leguminosas

Las leguminosas son una enorme familia, con distribución en todo el mundo, tiene entre 16 mil y 19 mil especies en casi 750 géneros. La familia está dividida en tres subfamilias, *Mimosoideae*, *Caesalpinoideae* y *Papilionoideae*, basándose fundamentalmente en diferencias florales. Las hojas de las especies pertenecientes a esta familia son generalmente alternadas y compuestas (bipinadas, pinadas, palmeadas o rara vez simples). La inflorescencia varía entre racimos, racimos simples, panículas, espigas o cabezas. La estructura de la flor varía fundamentalmente con la subfamilia: corola 5 pétalos; estambres de tres a muchos, generalmente diez, libres o unidos; pistilo único, simple y libre. El fruto es generalmente una vaina (legumbre), dehiscente o indehiscente, con o sin suturas aladas. La raíz puede ser principal y generalmente ramificada, incluso acuática o semi-aérea y casi siempre presenta micorrizas (Sprent, 2001).

#### Leguminosas tropicales

Generalmente las leguminosas tropicales son usadas como granos, abonos verdes y forraje (árboles, arbustos y herbáceas) y entre éstos están el frijol, canavalia, gandúl, y *Gliricidia*. Sin embargo, lo que hasta ahora más se destaca de estas plantas es su contribución al mejoramiento del suelo ya que los árboles en cultivos asociados cuando cierran el dosel contribuyen a reducir la erosión y el lavado del suelo (Haines, 1934), y en el caso de la *Leucaena*, ésta constituye un sotobosque excelente, pues cubre el suelo rápida y completamente y permanece verde durante los meses de sequía por lo que impide el crecimiento de malezas. *Leucaena* puede aumentar en un 50% la productividad ya que mejora la porosidad del suelo, el contenido de humus y los niveles de nutrimentos (Becking, 1951). Además, se conoce que las leguminosas pueden aportar hasta 235 Kg. /ha de nitrógeno en cinco meses, que es un aporte de nitrógeno importante y que mantiene la fertilidad del suelo (Watson, 1973 y Wadsworth, 2000). Análisis de suelos bajo *Acacia albida* en Senegal indican un notable aumento en proteína con respecto al suelo desnudo de hojarasca donde no hay acumulación orgánica de C, N, Ca, Mg, P y K, igual pasa con suelos bajo del dosel de *Prosopis* (Danso et al., 1992).



## Factores que afectan la simbiosis

### Factores físicos

Temperatura. El efecto de la temperatura en la simbiosis es claro y de modo indirecto. Aparece de un modo no específico a través de los procesos metabólicos de la planta como respiración, fotosíntesis, transporte y transpiración. Las leguminosas con el ciclo de Calvin normal su temperatura óptima es de 15 a 20° C. La respiración se incrementa con las altas temperaturas, esto hace que haya una menor disponibilidad de carbono para la simbiosis. El aumento de temperatura afecta la velocidad del metabolismo general de la planta influyendo también en el crecimiento bacteriano y la sobrevivencia de los rizobios en el suelo. A menos de 7° C la nodulación se hace muy poco probable (Pérez y Torralba, 1997). En el caso contrario las altas temperaturas, se reducen el número de raíces laterales y pelos radicales, haciendo que la probabilidad de nodulación sea menor. El efecto de la degradación de los nódulos se puede apreciar tanto a bajas como a altas temperaturas. La temperatura puede reducir la fijación de nitrógeno de la bacteria. Por ejemplo, la actividad de la nitrogenasa en nódulos de soya, incrementa a temperaturas de 20 °C a 30°C y disminuye después de los 30°C (Hardy et al., 1973).

Luz. Afecta a la simbiosis a través de la fotosíntesis, controlando la cantidad de carbohidratos para el desarrollo y funcionamiento del nódulo. Es necesaria una cierta cantidad de luz para obtener una máxima nodulación y óptima fijación de N<sub>2</sub>. A pesar que la luz es un factor limitante en el crecimiento de las leguminosas, hay especies tolerantes a la sombra producida por otras especies arbóreas de mayor tamaño (Sprent, 2001). En el caso de las leguminosas arbóreas, la luz es un factor limitante desde el punto de vista de su importancia en la tasa fotosintética de la planta, ya que de la fotosíntesis provienen nutrientes para abastecer al nódulo.

Humedad. Se conocen pantanos en Brasil donde la fijación de nitrógeno llega a ser muy importante (Sprent, 2001). Aunque la nodulación y fijación de nitrógeno puede verse afectada por falta de humedad como por exceso de humedad, se atribuye la falta de oxígeno por exceso de agua como limitación para el crecimiento de *Rhizobium*, que es una bacteria micro-aeróbica. La corteza del nódulo de los rizobios crea una barrera a la difusión de O<sub>2</sub>, evitando la inactivación de la nitrogenasa que es sensible al oxígeno.

En ecosistemas tropicales y subtropicales con tierras cultivadas en secano, las leguminosas de grano como maní, frijol, garbanzo, arveja, lenteja, gandul y otras, son una fuente importante de nitrógeno fijado. En estos lugares las condiciones ambientales desfavorables como la sequía limitan la tasa de fijación de nitrógeno (Drevon, 1995). En general la máxima actividad fijadora ocurre cuando el suelo está en condiciones de capacidad de campo.

### **Factores químicos**

pH. La acción del pH puede verse desde dos puntos de vista: efecto sobre la bacteria y efecto sobre la formación de nódulos. La bacteria se ve afectada en su crecimiento porque *Rhizobium* crece normalmente en el rango de 6.5 y 7.2, según la especie aunque, algunas especies presentan tolerancia a la acidez como *Bradyrhizobium lupini* que pueden sobrevivir a pH 4 incluso a 3.5 de pH. Asimismo la acidez del suelo puede limitar el crecimiento de las comunidades de bacterias en la rizósfera y llegar a afectar la infección de la planta (Ledgard y Giller, 1995). La formación de nódulos se ve afectada porque hay etapas en el proceso de nodulación que son sensibles a la acidez donde ciertas enzimas bajan su actividad debido al pH no óptimo según estudios de Andrew y Johnson (1976).

### **Elementos minerales**

La deficiencia o exceso de ciertos elementos minerales afectan directa o indirectamente la nodulación. Por ejemplo, el molibdeno es un constituyente de la nitrogenasa, así que una deficiencia de Mo en el medio causa un efecto directo y negativo en la fijación del nitrógeno. Sin embargo el Fe (que también es un elemento constituyente de la nitrogenasa) no tiene un efecto directo sobre la fijación del nitrógeno cuando este escasea en el medio. También son importantes otros elementos como calcio, fósforo, azufre, cobre o zinc ya que originan cambios en el pH que afectan directamente la fijación. Los fertilizantes químicos utilizados tratan de influenciar un mayor crecimiento de la planta y una mayor fijación del nitrógeno (Gibson, 1971).

### 3.5 Técnicas para evaluar la fijación biológica de nitrógeno

#### **Kjeldahl**

Desde hace más de 100 años se está utilizando el método Kjeldahl para la determinación del nitrógeno en una amplia gama de muestras. El método Kjeldahl sirve para determinar el contenido en nitrógeno en muestras orgánicas e inorgánicas. Se basa en la digestión de la muestra en ácido sulfúrico concentrado a ebullición, con la adición de un catalizador, la muestra se digiere hasta disolución y oxidación total. El nitrógeno contenido en la muestra se convierte en sulfato de amonio.

Añadiendo un exceso de solución de hidróxido de sodio, el ion amonio es liberado en forma de amoníaco, destilado y recogido sobre una solución de ácido bórico o sobre una solución valorada de ácido sulfúrico. El amoníaco recogido es determinado con una solución valorada de ácido o se valora por retroceso con solución de sodio hidróxido de concentración conocida, si se recogió sobre ácido sulfúrico. Los resultados se pueden expresar en % N, % NH<sub>3</sub> o proteína (%N x factor) (Bergersen, 1980).

#### **Método de ureídos**

Debido a que existen importantes diferencias en las formas principales de nitrógeno transportadas en el xylema de leguminosas noduladas y no noduladas, es posible utilizar la abundancia de ureídos y la savia del xylema como medida indirecta de la proporción de nitrógeno de la planta derivado de la fijación de nitrógeno. Muchas leguminosas tropicales transportan los productos de la fijación de N<sub>2</sub> desde los nódulos a otras partes de la planta en forma de ureídos, alantoina y ácido alantoico. Los ureídos son compuestos que proceden de la sustitución de átomos de hidrógeno del grupo -NH= de la urea, por radicales ácidos (Giller y Wilson, 1991).

#### **Isótopos estables de nitrógeno**

Los métodos con <sup>15</sup>N se han utilizado para estudiar la bioquímica de la fijación de N<sub>2</sub>, para estudiar los factores que afectan la fijación de N<sub>2</sub>, evaluar la capacidad de microorganismos para fijar N<sub>2</sub>, medir el desplazamiento de nitrógeno simbióticamente fijado, en estudios del balance de nitrógeno y la calibración de la técnica de reducción de acetileno. Los estudios con el <sup>15</sup>N pueden

hacerse de dos formas: estudiar la abundancia natural del isótopo en las distintas partes del sistema, o enriquecer el sistema con  $^{15}\text{N}$  y utilizarlo como trazador.

La abundancia de  $^{15}\text{N}$  en cualquier medio es medida mediante el análisis de una planta de referencia (no fijadora de  $\text{N}_2$ ), la cual es totalmente dependiente del nitrógeno del suelo para su crecimiento. La abundancia natural de  $^{15}\text{N}$  de una muestra se expresa en forma de  $\delta^{15}\text{N}$ , que indica la desviación de la relación  $^{15}\text{N} / ^{14}\text{N}$  de la muestra con respecto a la del  $\text{N}_2$  atmosférico expresada en tanto por mil. Los métodos basados en la abundancia natural presentan dificultades debido a diferencias pequeñas por tanto, requieren una alta precisión analítica y además son difíciles de interpretar. La aplicación más extendida de la abundancia natural es la estimación de la fijación de  $\text{N}_2$ , sobre todo en los ecosistemas naturales, porque es una técnica que no implica una excesiva manipulación del ecosistema. En los ecosistemas agrícolas están más extendidas las técnicas basadas en el enriquecimiento con  $^{15}\text{N}$ . Los métodos de dilución añaden fertilizante marcado al suelo para aumentar el porcentaje de  $^{15}\text{N}$  del mismo, mientras que en el de la abundancia natural no se enriquece el suelo con  $^{15}\text{N}$ . La fijación de  $\text{N}_2$  puede ser determinada por los cambios en el enriquecimiento de  $^{15}\text{N}$  en una planta fijadora debido a la asimilación de  $\text{N}_2$  atmosférico de bajo enriquecimiento (Bergensen, 1980, Valles de la Mora et al., 2003).

### **Reducción de acetileno (ARA)**

Esta técnica se ha utilizado por más de 30 años para medir la fijación biológica del nitrógeno en las raíces de las plantas que tienen asociación con bacterias del género *Rhizobium*. Este método fue propuesto por Hardy y Knight (1966) y envuelve el uso de la nitrogenasa ( $\text{N}_2$ asa) como catalizadora de la reducción de acetileno ( $\text{C}_2\text{H}_2$ ) a etileno ( $\text{C}_2\text{H}_4$ ), gracias a su capacidad de reducir compuestos de triple enlace. La determinación de ARA permitió hacer medidas de la actividad enzimática más fidedignas, eliminando la observación imprecisa del crecimiento bacteriano en medios de cultivo libres de nitrógeno (Olivares, 2004).

El método se basa en el uso de acetileno como sustrato de la enzima nitrogenasa. Hay otros sustratos que han sido utilizados para la identificación cuantitativa de la actividad fijadora de  $\text{N}_2$ , pero ninguno de ellos es tan versátil. Dentro de las ventajas de la técnica encontramos una alta sensibilidad, la metodología es sencilla de llevar a cabo comparado con los demás protocolos; como por ejemplo el Kjeldahl que es una técnica basada en el análisis de nitrógeno total.

Además en el ARA la muestra se analiza directamente en el cromatógrafo de gases sin necesidad de tratamientos químicos y con fácil manipulación manual. La pequeña fracción de  $C_2H_2$  reducida en corto tiempo de incubación permite el uso de acetileno ( $C_2H_2$ ) como patrón de ajuste de la técnica para verificar posibles fallos en el desarrollo de la misma.

La estabilidad del etileno ( $C_2H_4$ ) es muy buena durante su almacenamiento y da la posibilidad de analizar las muestras en diferentes intervalos de tiempo. Algunas de las desventajas de la reducción de acetileno, es la naturaleza explosiva del  $C_2H_2$  y la necesidad de cuantificar el producto como el sustrato. Existen varias precauciones a tener en cuenta en el uso del método de reducción de acetileno y son las condiciones de temperatura, oxígeno, luz y textura del suelo en todos los tiestos, para poder obtener medidas válidas de fijación biológica de nitrógeno (Hardy et al., 1968). Aunque el  $C_2H_4$  puede ser medido colorimétricamente o por espectrometría de masas, el más común y más sensible método de detección empleado, es el de cromatografía de gases equipado con un detector de llama de ( $H_2$ ) ionizada. (Tuner y Gibson, 1980).

### **3.6 Agroforestería**

Tradicionalmente los esfuerzos para conservar la biodiversidad están dirigidos a parques y reservas naturales, ignorando las posibilidades en los hábitats agrícolas (United Nations, 2004). Los monocultivos fueron promovidos en la década de 1960 incluyeron el plantar grandes extensiones de tierra con un solo cultivo con el fin de aumentar la eficiencia y la producción, añadiendo a la vez grandes cantidades de fertilizantes, pesticidas y herbicidas (Green, 2005). Estas técnicas aumentaron la producción a corto plazo y tuvieron efectos negativos sobre la biodiversidad y a los hábitats naturales. Además de la contaminación por el uso excesivo de pesticidas, se suma la reducción de precios resultado de la sobreproducción de muchos monocultivos (Gresser y Tickell, 2002). Los sistemas agroforestales, a diferencia de los monocultivos intensivos, pueden proveer hábitats de alta calidad, para diferentes poblaciones de animales y plantas, por tal motivo son importantes para la conservación de la biodiversidad.

Los sistemas agroforestales se definen como aquellos sistemas agrícolas donde los árboles son cultivados junto con cultivos anuales y/o con animales, resultando en mejores relaciones complementarias entre los diferentes individuos (Nair, 1982). Los cultivos crecidos bajo un dosel

de bosque natural (agrobosques) a menudo caen en el extremo menos intenso del rango de la agricultura (Swift et al., 1996). Los sistemas agroforestales, tales como el cacao, el café o el hule o caucho, en los cuales el cultivo es crecido bajo un diverso dosel de árboles, protegen a la biodiversidad y ayudan a cambiar la imagen de la agricultura como el enemigo. Entre los tipos de agroforestería de los trópicos, el café de sombra y el cacao han recibido la mayor atención y estudio. El café y el cacao fueron cultivados tradicionalmente bajo sombra (generalmente bajo dosel diverso), pero la producción más reciente se ha caracterizado por el aumento en la intensidad de su manejo, incluyendo la reducción de la densidad, la diversidad y eliminación de la sombra de árboles y aumento del uso de agroquímicos (Moguel y Toledo, 1999).

El uso de leguminosas arbóreas como parte del sistema de manejo del cultivo de café y otros como el cacao, puede llegar a ser una fuente importante de nitrógeno, al igual que otros elementos o por lo menos ayuda a no depender en un 100% de fertilización química (Wood y Lass, 1985; Wrigley, 1988 ). En el suelo, el nitrógeno adicionado a través de fertilización o por descomposición de materia orgánica está sujeto a la mediación biológica para obtener como resultado final  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$ , dos formas solubles del nitrógeno y que pueden ser tomadas por las plantas.

Las poblaciones de árboles leguminosas de sombra como *Erythrina poeppigiana* pueden llegar a contribuir hasta con  $60 \text{ Kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ . Fassbender (1987) comparó el balance de nutrientes de leguminosas y no leguminosas en cultivos de café asociados a árboles de sombra (Beer et al., 1998). Los árboles de sombra, dependiendo de la especie, pueden contribuir con diferentes tasas de producción de biomasa, que durante la descomposición de raíces finas y hojas están ayudando al ciclo de nutrientes como N, P, K, Ca, y Mg. Investigaciones realizadas por Fassbender en 1993 y 1988 mostraron mayor transferencia de estos nutrientes por parte *E. poeppigiana* (leguminosa) con respecto a *Cordia alliodora* (no leguminosa). Babbar y Zak (1994 y 1995) demostraron mayores tasas de N mineralizado en plantaciones de café bajo sombra de *E. poeppigiana* en Costa Rica ( $148 \text{ Kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ ) versus plantaciones sin sombra ( $111 \text{ Kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ ). Ambos fueron altamente fertilizados  $300 \text{ Kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$  con nitrógeno mineral. Del estudio se concluyó que el ciclado del N fue más eficiente en la plantación de sombra gracias a la

alta disponibilidad de N mineralizado y menor cantidad de N perdido por lixiviación (Beer et al., 1998).

La mayoría de la aportación de N<sub>2</sub> fijado o extraído del suelo por árboles leguminosa de sombra a plantas o árboles que no fijan y que se encuentran en asociación con cultivos, es generalmente hecha a través de residuos de poda y hojarasca que está sobre el suelo y que entra en descomposición, mineralizando los elementos químicos presentes en su estructura (Danso et al., 1992). La pérdida y lavado de suelos en plantaciones de café bajo sombra es baja, aunque resultados similares se pueden obtener con "mulch" y coberturas sin necesidad de usar árboles de sombra (Beer, 1998). Sin embargo, la sombra de la copa de los árboles provee una mejor protección durante épocas de lluvia ya que la copa amortigua el daño producido por el continuo goteo de lluvias suaves y constantes; tanto al cultivo como al suelo. La lluvia continua en sistemas de cultivo a cielo abierto puede lavar la hojarasca, en el caso de cultivos que usan "mulch". En cafetales donde árboles de sombra como *Erythrina* spp, se podan fuertemente o completamente, hay un alto aporte de materia orgánica alrededor del tronco de los árboles. Los efectos son positivos pues se mantiene la fertilidad y estructura del suelo. En Nicaragua por ejemplo, se evidenció el aumento de la tasa de erosión del suelo después de eliminar muchos árboles de los cafetales, disminuyendo la capacidad del suelo para retener agua y resultando en escorrentía superficial perdiendo nutrientes y resultando una acumulación de sedimentos en cuerpos de agua (Muschler, 2000).

### **Sombra y biodiversidad en cafetales**

El uso de árboles de sombra en cafetales es el tipo de agroforestería que además promueve la biodiversidad, ya que muchas aves criadas en Norte América migran en invierno a las plantaciones de café de centro y sur América durante parte del invierno (Greenberg et al., 1995).

Remover la sombra de cultivos de café incrementa las fluctuaciones diarias de temperatura y disminuye la humedad afectando y alterando el microclima dentro del cultivo. Las plantaciones bajo sombra contribuyen a la sobrevivencia de insectos benéficos como hormigas que gracias a la amortiguación de la temperatura, pueden vivir y degradar la hojarasca, leños y troncos caídos (Phillpott et al., 2006). La sombra proporciona un hábitat propicio para ayudar al ciclo de

nutrientes ayudando a la descomposición de la materia orgánica regresando los elementos químicos al suelo (Roberts et al., 2000).

La relación entre las plantaciones de café a sombra y la riqueza de artrópodos presentes en ellas es muy importante, pues muchos insectos funcionan como eslabones críticos entre especies de aves que se alimentan de hormigas y artrópodos de la hojarasca, proporcionando un recurso alimenticio fácilmente explotado, que de otra manera no estaría disponible para muchas aves. Por el contrario los cultivos de café a sol presentan efectos negativos sobre comunidades de insectos y biodiversidad asociada, siendo los cultivos a sol poco biodiversos y poco positivos para el medio ambiente y la agricultura sostenible (Roberts et al., 2000, Pomara et al., 2003, Rappole et al., 2003).

Nir (1988) argumenta que muchas orquídeas poco comunes sobreviven a la deforestación en Puerto Rico en fincas de café bajo sombra, siendo este un aporte a la diversidad vegetal de especies epífitas. Otros beneficios del cultivo bajo sombra son la formación de refugio para murciélagos, mamíferos y reptiles en áreas donde hay deforestación y/o fragmentación de bosques. El uso de árboles para sombra de café además provee protección al suelo, ayuda a la retención de agua y captura carbono (Moguel y Toledo, 1999, Peeters et al., 2003).

En Puerto Rico las especies nativas *Inga vera*, *Andira inermis* y otras especies introducidas y naturalizadas pertenecientes al género *Citrus* sp., son las más dominantes en la zona cafetalera (Arango, 2007). Las leguminosas como la *I. vera*, *A. inermis* y el *P. carbonarium* mediante el aporte de N mejoran la fertilidad de suelo y la nutrición del cultivo y los cultivos frutales asociados, los que permiten tener un ingreso económico alternativo al agricultor. La diversidad encontrada por Arango (2007) en los cafetales bajo sombra en Puerto Rico cualifica para un policultivo comercial, puesto que índices de riqueza, o el número de especies frecuentes y equidad son menores a los registrados en un policultivo tradicional.



## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se dividió en dos partes:

- Evaluación de 5 especies con semillas recalcitrantes (semillas que mueren si su contenido de humedad se reduce por debajo de un valor crítico) y una especie con semilla ortodoxa (testigo), bajo condiciones de invernadero. Las variables medidas fueron: altura de la planta, peso seco de la planta, cantidad y peso seco de los nódulos y determinación de nitrógeno total por el método de Kjeldahl. Los tratamientos se distribuyeron en 3 invernaderos (Bloques) debido a la falta y disponibilidad de espacio. Como testigo se usó *Pithecellobium carbonarium*.
- En la segunda etapa del experimento se evaluaron 25 especies con semillas ortodoxas (semillas que con contenido de humedad de 8% o menos pueden ser almacenadas por largos períodos) bajo condiciones de invernadero. Se midieron las variables; altura de la planta, peso seco de la planta, cantidad y peso seco de los nódulos y la actividad de la enzima nitrogenasa presente en los nódulos. La fijación de nitrógeno fue cuantificada con el método de reducción de acetileno (ARA). Todos los tratamientos y repeticiones fueron distribuidos en un mismo invernadero.

Para la primera etapa del estudio se utilizaron tres invernaderos diferentes, los cuales se usaron como bloques en el diseño experimental. El uso de bloques nos permite reducir el error experimental derivado de las diferentes calibraciones de riego de los invernaderos, así mismo se reduce el posible error debido a que el diseño del tercer invernadero es diferente a de los dos primeros invernaderos. Para la segunda parte del experimento se empleó un solo invernadero y se usó un diseño completamente al azar. En las dos etapas de la investigación se realizaron dos muestreos (un muestreo a los 90 días y el segundo a los 180 días después de la siembra). Adicionalmente se tomaron datos de especies 300 días después de sembradas que por falta de disponibilidad del equipo de cromatografía no se tomaron en los muestreos programados o porque las semillas no estaban disponibles en el momento de la siembra.

## **4.1 Área de trabajo**

El experimento se ubicó en los invernaderos disponibles de la Finca Laboratorio Alzamora de la Universidad de Puerto Rico Recinto de Mayagüez (N 18° 13'091`` W 067° 08'558``), con temperatura máxima de 35 °C y 11 °C como temperatura mínima. Las muestras fueron procesadas en el laboratorio de Fijación Biológica de Nitrógeno del Departamento de Agronomía y Suelos.

## **4.2 Suelos**

### **Selección**

Se seleccionaron dos series de suelo representativas de la zona cafetalera: La serie Humatas y la serie Los Guineos. Para tal efecto se usaron dos capas de información: una cobertura contenía la información con el mapa de suelos de Puerto Rico (USDA-NRCS, 2001), y otra la cobertura de los municipios que comprenden la zona cafetalera (TIGER/Line Data File publicados por el U.S.Bureau of the Census for the United States ESRI, 2000) sobrepuestas en ArcMap v.9.1. Estas coberturas se sobrepusieron para conocer el área de cada serie de suelo en el área de estudio (Cruz y Schröder, 2006). El suelo Humatas se trajo a Mayagüez de la Subestación de Adjuntas (N 18° 10'568`` W 066° 47'532``) y el suelo Los Guineos de Maricao (N 18° 09'503`` W 066° 53'583``).

### **Presencia de rizobios nativos**

Con la finalidad de conocer el número de rizobios viables en los suelos utilizados para el estudio, se hizo un conteo de rizobios en los suelos mediante el método del Número Más Probable (NMP) para muestras de suelo (Somasegaran y Hoben 1994). Esta técnica se empleó para conocer el número viable de cepas capaces de infectar una planta leguminosa, las muestras de suelo para este conteo se tomaron el mismo día del conteo.

### **Análisis Químico**

Las muestras de suelo de cada serie se sacaron durante la recolección de los suelos, las cuales se secaron al aire y tamizaron a 2.0mm para análisis de pH, calcio, magnesio, y manganeso, capacidad de intercambio catiónico, materia orgánica, nitrato, amonio, nitritos, y carbono y

nitrógeno total. Las muestras se enviaron al Laboratorio de Suelo, Planta y Agua del Colegio de Agricultura y Ciencias Ambientales de la Universidad de Georgia.

### 4.3 Árboles

Se seleccionaron las especies relacionadas en el cuadro 1 y 2 utilizando criterios basados en previos reportes de nodulación y en algunos casos especies usadas como sombra en otros países y cultivos. Para seleccionar las especies también se tuvo en cuenta: presencia de árboles adultos en Puerto Rico como fuente de semillas (especies nativas, introducidas o naturalizadas), tamaño del árbol, adaptación al hábitat (distribución natural, clima, suelo), velocidad de crecimiento y rendimiento, usos y manejo (sombra, producción de madera y frutos), reacción a la competencia y agentes dañinos (plagas).

Las especies que se utilizaron para la primera parte del estudio son: *Cojoba arborea* (L.) B., *Inga spectabilis* (V.) W., *Inga fagifolia* (L.) H., *Inga quaternata* W., *Inga vera* W. porque son plantas cuyas semillas no se pueden almacenar ya que no retienen viabilidad al secarlas. Junto con las anteriores especies se sembró *Pithecellobium carbonarium*, como testigo. Las demás especies serán evaluadas en una segunda parte del experimento. Hay un total de 40 especies potenciales para sombra de café, de las cuales hubo disponibilidad de semillas de 30 especies en total.

### 4.4 Semillas

De 40 especies potenciales para sombra, se obtuvo semilla de 30 especies. Las semillas se recolectaron de árboles adultos, previamente geo-referenciados por el herbario del Departamento de Biología del Recinto Universitario de Mayagüez (UPRM), registros de USDA (NRCS), Estación Experimental TARS y del laboratorio BNF. La ubicación de las coordenadas de los árboles se procesaron en ArcMap v.9.1 y se colocaron sobre el mapa de carreteras y municipios de Puerto Rico para ubicarlos.

Los criterios de calidad de semillas que se tuvieron en cuenta fueron: tamaño, color, calidad de la cubierta (presencia de daños por insectos o microorganismos como hongos y bacterias) y presencia de malformaciones. Las especies con semillas recalcitrantes se sembraron directamente

en los tiestos (3 galones), con los dos suelos (serie Humatas y serie Los Guineos). Las especies con semillas ortodoxas (tolerantes a la desecación) se pre-germinaron en platos de petri con papel humedecido con agua destilada. Las semillas germinadas se trasplantaron a los tiestos con las dos series de suelo.

**Cuadro 1. Lista de especies leguminosas arbóreas con potencial para sombra de café. (Mimosoideae)**

<b>Mimosoideae:</b>	<b>N/I</b>	<b>Origen</b>	<b>Nodulación</b>	<b>Ref.</b>
<i>Acacia angustissima</i> . ( M.) K.	I	Belice	+	Faria 1995
<i>Acacia auriculiformis</i> (A.) C.	I	Indonesia	+	Sprent 2001
<i>Albizia lebbek</i> (L.) B.	I	Asia	+	Sprent 2001
<i>Albizia procera</i> (R.) B.	I	Asia	+	Sprent 2001
<i>Adenanthera pavonina</i> L.	I	India	+	Lim and Ng 1977
<i>Anadenanthera peregrina</i> (L.) S.	N	América	+	Döbereiner 1969
<i>Calliandra houstoniana</i> (M.) S.	I	África	+	Faria y Lima 1998
<i>Calliandra surinamensis</i> B.	I	Surinam, Brasil	+	Moreira et al. 1992
<i>Cajoba arborea</i> (L.) B.	N	América Antillas	+	Britton, Bècquer, Sprent
<i>Enterolobium cyclocarpum</i> (J.)G.	N	Méjico	+	Allen Allen 1936-1939
<i>Inga spectabilis</i>	I	America central		Powell, M. H. 1995
<i>Inga fagifolia</i> (L.) H.	N	América central	+	Faria et al. 1987
<i>Inga fastuosa</i> (J.) W.	I	Colombia	+	Sprent 2001
<i>Inga Ingoides</i> (R.) W.	N	U.S	+	Sprent 2001
<i>Inga quaternata</i> W.	I	América Central	+	Moreira et al. 1992
<i>Inga vera</i> W.	N	América Central, Antillas	+	Sprent 2001
<i>Leucaena diversifolia</i> S.	I	África, Méjico	+	NFT, 1992
<i>Leucaena leucocephala</i> (L.) W.	N	América Central	+	Wilson 1939
<i>Lysiloma latisiliqua</i> (L.) B.	N	América	+	ILDIS
<i>Parkia pedunculata</i> R.	I	África	+	Allen Allen 1936.
<i>Pithecellobium carbonarium</i> . N.	I	Colombia	+	J. Leon1956
<i>Samanea saman</i> J.	I	América Central	+	Sprent 2002
<i>Zapoteca portoricensis</i> J.	N	América	?	

(N): Especie nativa, (I): Especie introducida, según Species Codes for the Trees of Puerto Rico and the U.S. Virgin Islands (1997).

(+): Nodulación comprobada. (?): Nodulación desconocida

#### 4.5 Aislamiento de rhizobios

Para el aislamiento de cepas de *Rhizobium* se usaron uno o dos nódulos por planta de los cuales se extrajo el contenido nodular (macerado), de los nódulos previamente esterilizados con etanol al 95% (v/v) por 30 segundos y hipoclorito de sodio al 3.25% (v/v) por 2 minutos luego

enjuagados 5 veces con agua destilada estéril. El contenido nodular en suspensión con agua estéril se sembró en platos de petri con extracto de levadura y manitol YEM suplementado con rojo congo 0.0025% (Vincent, 1970). Las cepas aisladas se purificaron después de repiques sucesivos y se almacenaron en tubos inclinados "slants" con medio (YEM) a 4°C. Algunas de las cepas se inocularon en *Macroptilium atropurpureum* para confirmar su capacidad de infección y nodulación. El procedimiento anterior se hizo en condiciones asépticas de laboratorio.

**Cuadro 2. Lista de especies leguminosas arbóreas con potencial para sombra de café. (Papilionoideae)**

<b>Papilionoideae:</b>	<b>I/N</b>	<b>Origen</b>	<b>Nodulación</b>	<b>Ref.</b>
<i>Andira inermis</i> W.	I	Méjico	+	Allen Allen 1936
<i>Clitoria fairchildiana</i> (R.) H.	I	América	+	Moreira et al. 1992
<i>Dalbergia sissoo</i> R.	I	India	+	Faria et al. 1994
<i>Erythrina berteroana</i> U.	N	América Central	+	Sprent 2001
<i>Erythrina eggersii</i> (K.) M.	N	América	+	Sprent 2001
<i>Erythrina peoppigiana</i> W.	N	América	+	Allen Allen
<i>Erythrina variegata</i> L.	N	Asia	+	Sprent 2001
<i>Flemingia macrophylla</i> (W.) M.	I	Africa	+	Sprent 2001
<i>Gliricidia sepium</i> J.	I	América Central	+	Holland 1924
<i>Lonchocarpus domingensis</i> T.	N	América	+	Allen Allen 1936
<i>Lonchocarpus glaucifolius</i> T.	N	América	+	ILDIS
<i>Ormosia krugii</i> U.	N	América Central	+	Schroder 1985
<i>Pongamia pinnata</i>	I	Asia	+	Sprent 2001
<i>Pterocarpus indicus</i> W.	I	Trópico sub-asiático	+	Sprent 2001
<i>Pterocarpus macrocarpus</i> K.	I	Asia	+	Sprent 2001
<i>Pterocarpus officinalis</i> J.	N	América	+	Sprent 2001
<i>Sesbania grandiflora</i> L.	I	Asia	+	Pers.

**(N): Especie nativa, (I): Especie introducida, según Species Codes for the Trees of Puerto Rico and the U.S. Virgin Islands (1997).**

**(+): Nodulación comprobada. (?): Nodulación desconocida**

El éxito del aislamiento depende de la salud del nódulo y del nivel de células infectadas dentro del mismo. Para el aislamiento se seleccionó un nódulo efectivo tomando en cuenta la coloración en el interior del mismo, ya que el color rojo o rosa significa alta actividad microbiana. Los aislamientos o colonias aisladas se crecieron en medio líquido YEM y luego se procedió a realizar tinción de Gram y pruebas de alcalinidad y acidez en medio azul de bromotimol (Bromotimol Blue, BTB).

Los criterios utilizados para la selección de colonias con características de rizobios fueron: las colonias con bordes suaves, de color blanco o claro, brillantes y de aspecto mucoso, que no absorbieron el rojo congo y Gram-negativas son muy probablemente *Rhizobium*. Luego del aislamiento se procedió a comprobar la capacidad de nodular para lo cual se inocularon plantulas de *Macroptilium atropurpureum* (especie que nódula con muchos tipos de rizobios), esto nos permitió verificar la autenticidad de los aislamientos de rizobios.

#### **4.6 Nodulación**

Se usaron tiestos de plástico negro con capacidad de 12 litros. En los tiestos se sembró de 2 a 5 semillas sin inocular. Cada tiesto se llenó con 7 kilos de suelo (Humatas ó Los Guineos). Los tiestos con las semillas se colocaron en los invernaderos bajo riego automático sin fertilización. Después de 60 días se empezó a aplicar cada dos semanas solución nutritiva Jensen (sin nitrógeno) a las plantas para evitar inhibición de la nodulación por falta de macro o micro elementos. No se realizó ningún tipo de tratamiento preventivo contra hongos o nemátodos con fungicidas o nematicidas al suelo, esto para no alterar la naturaleza de las comunidades de *Rhizobium* presentes en los suelos. El raleo se hizo después del primer mes después de la emergencia de la plántula y cuando estas se notaban vigorosas y sanas. Se dejó sólo una planta por tiesto.

#### **4.7 Medición de la fijación biológica de nitrógeno**

##### **Método de Kjeldahl**

El contenido de nitrógeno total se determinó por medio del procedimiento Kjeldahl y se expresó en porcentaje del peso seco. Kjeldahl refleja la cantidad total de nitrógeno en una muestra analizada. Este método suma el nitrógeno orgánico en sus diversas formas (proteínas y ácidos nucleicos en diversos estados de degradación, urea, aminos, etc.) y el ión amonio  $\text{NH}_4^+$  (Bergersen, 1980).

### **Técnica de reducción de acetileno (ARA)**

La actividad de la nitrogenasa en los nódulos se determinó mediante el método de reducción de acetileno a etileno. Inmediatamente después de la cosecha, la raíz de cada planta, lavada y escurrida, se colocó en envases plásticos blancos de 1 litro con tapones serológicos en la tapa. El acetileno de alta pureza en cantidad equivalente al 10 % de volumen, fue inyectado al envase herméticamente sellado. Las raíces fueron incubadas a temperatura ambiente por una hora. Después de la incubación se tomaron dos muestras de cada envase con jeringas de 1 ml, las cuales se analizaron en un cromatógrafo de gases Agilent 6850 con detector de ionización de llama (Hardy et al., 1968). La entrada de inyección se ajustó a 200°C. Se utilizó como patrón 1 ml de etileno al 1% (v/v) en nitrógeno, el cual equivale a  $3.46 \times 10^{-7}$  moles de etileno. Los parámetros usados en este sistema fueron:

**Detector:** H<sub>2</sub> Flame-Ionization Detector (FDI), 200°C flujo H<sub>2</sub> 30 ml min<sup>-1</sup>

**Columna:** Columna empacada de Acero, 1mx 2mm I.D., Porapak R (malla de 100-200).

**Temperatura:** 50°C.

**Gas transportador:** N<sub>2</sub>, flujo 25.8 ml min<sup>-1</sup>

### **4.8 Muestreo**

Para evaluar los caracteres vegetativos (altura de la planta) y de producción (peso seco de la planta) y de nodulación (número y peso seco de nódulos), se realizaron cosechas a los 90 días y a los 180 días después de la siembra. En cada muestreo se midió el largo de las raíces y la parte aérea (vástago), luego se secaron las plantas en horno a 72° C durante 72 horas. También se contó el número de nódulos/planta y se midió el peso seco de nódulos/planta después de secar los nódulos a 80°C por 24 h. Para evaluar el porcentaje de nitrógeno total de las especies con semillas recalcitrantes, las plantas (hojas, tallo y raíces) fueron molidas para determinar nitrógeno total por el método de kjeldahl. Para determinar la actividad de la nitrogenasa en los nódulos de los árboles con semillas ortodoxas se usó el método ARA (Hardy et al., 1968).

## 4.9 Diseño experimental

### Diseño experimental para especies de semillas recalcitrantes

El diseño experimental que se empleó para evaluar los diferentes parámetros de fijación, nodulación y características agronómicas en los árboles con semillas recalcitrantes fue un Diseño en Bloques Completos al Azar (DBCA). El diseño incluye 24 unidades experimentales en tres bloques (una repetición por bloque). Cada tratamiento incluye una especie (6), una serie de suelo (1 y 2) y tiempo de cosecha (90 y 180 días).

### Diseño experimental para especies de semillas ortodoxas

El diseño experimental usado para evaluar los diferentes parámetros de fijación, nodulación y características agronómicas en los árboles con semillas ortodoxas fue un Diseño Completamente al Azar (DCA) con 3 repeticiones. El diseño incluye 300 unidades experimentales cada una consta de una especie (25) una serie de suelo (1 y 2) y un tiempo de cosecha (90 y 180 días).

## 4.10 Análisis estadístico de datos

### Análisis estadístico para especies con semillas recalcitrantes

Los datos experimentales de las especies de semillas recalcitrantes fueron evaluados a través de un análisis de varianza (ANOVA), en el programa InfoStat versión 2006. Se usó el método de Tukey para separación de medias. El modelo estadístico utilizado en este estudio fue el siguiente:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \delta_l + (\alpha * \beta)_{ik} + (\alpha * \gamma)_{il} + (\alpha * \gamma * \delta)_{ikl} + \epsilon_{ijkl}$$

$Y_{ijkl}$  = Variables dependientes.

$\mu$  = Media general

$\alpha_i$  = Efecto de especie (1, 2, 3...6)

$\beta_j$  = Efecto de Bloque (1, 2)

$\gamma_k$  = Efecto de suelo (1 y 2)



$\delta_l$  = Efecto de muestreo (90 y 180 días)

$\alpha_i \times \gamma_k$  = Interacción efecto de especie x efecto del suelo

$\alpha_i \times \gamma_k$  = Interacción efecto de especie x efecto de muestreo

$\alpha_i \times \gamma_k \times \delta_l$  = Triple interacción efecto de especie x efecto de suelo x efecto de muestreo

$\epsilon_{ijkl}$  = Error experimental.

### **Análisis estadístico para especies con semillas ortodoxas**

Los datos experimentales de las especies de semillas recalcitrantes fueron evaluados a través de un análisis de varianza (ANOVA), en el programa InfoStat versión 2006. Se usó el método de Tukey para separación de medias. El modelo estadístico utilizado en este estudio fue el siguiente:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \gamma_j + \delta_k + (\alpha * \beta)_{ij} + (\alpha * \gamma)_{ik} + (\alpha * \gamma * \delta)_{ijk} + \epsilon_{ijk}$$

$Y_{ijk}$  = Variables dependientes.

$\mu$  = Media general

$\alpha_i$  = Efecto de especie (1, 2, 3...6)

$\gamma_j$  = Efecto de suelo (1 y 2)

$\delta_k$  = Efecto de muestreo (90 y 180 días)

$\alpha_i * \gamma_j$  = Interacción efecto de especie x efecto del suelo

$\alpha_i * \delta_k$  = Interacción efecto de especie x efecto de muestreo

$\alpha_i * \gamma_j * \delta_k$  = Triple interacción efecto de especie x efecto de suelo x efecto de muestreo

$\epsilon_{ijk}$  = Error experimental.

Los datos de las variables altura de la planta y peso seco de la planta se transformaron a raíz cuadrada y los de las variables número de nódulos y peso seco de nódulos se transformaron a raíz cuadrada de (x+1). Para trabajar los datos de la variable actividad total de la nitrogenasa se usó estadística no paramétrica transformando a rangos. Las transformaciones se hicieron para cumplir con los supuestos del análisis de varianza de normalidad y homogeneidad de varianzas.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Suelos

Los ordenes de suelo predominantes en la zona cafetalera de Puerto Rico son: Ultisoles (41.6%), Inseptisoles (31.8 %) y Oxisoles (11.8 %). Las series que predominan son: Humatas con 36,017 hectáreas (Ultisol), Consumo con 20,400 ha (Ultisol), y Los Guineos con 16,545 ha (Oxisol), (Cruz y Schröder, 2006). Se escogió la serie Humatas por ser el más predominante y Los Guineos porque a pesar de ser el tercero en predominancia es de un orden diferente al de los dos primeros.

El suelo Humatas es arcilloso fino, altamente ácido, con permeabilidad moderada, fertilidad media y susceptibles a la erosión. El suelo Los Guineos es un suelo arcilloso altamente ácido, moderadamente permeable y con una fertilidad natural baja (Muñiz y Monroig, 1992, NSSC Soil Survey Laboratory, 2007). En el análisis químico de los suelos se encontró diferencias numéricas en: Capacidad de intercambio catiónico, contenido de arcillas, aluminio intercambiable, calcio y en el porcentaje de materia orgánica, magnesio, manganeso, sodio y potasio (Cuadro 3).

### 5. 2 Número más probable de *Rhizobium* en suelo (NMP)

El resultado del número más probable de Rizobios en suelo para la serie Humatas fue:  $1.16 \times 10^3$  células por 100 gramos<sup>-1</sup> de suelo seco. El resultado para la serie Los Guineos fue:  $6.2 \times 10^2$  células por 100 gramos<sup>-1</sup> de suelo seco. Estos suelos se usaron para los experimentos en invernadero.

### 5.3 Experimento en invernadero de especies con semillas recalcitrantes

#### 5.3.1 Altura de las plantas

Siguiendo la metodología los datos se transformaron a Log 10 para cumplir con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas y el resultado del análisis de varianza mostró

diferencias significativas entre las especies, no se encontró efecto de bloque ni efecto de suelos. No se encontraron diferencias entre las medias de las especies *I. spectabilis*, *I. fagifolia*,

**Cuadro 3. Análisis químico de los suelos utilizados en experimentos de invernadero series de suelo**

	Humatas	Los Guineos
pH (CaCl <sub>2</sub> )	3.80	4.00
pH en agua	4.40	4.60
M. O. (%)	3.10	4.70
C (%)	0.855	0.879
N (%)	0.095	0.099
P (kg/ha)	7.952	8.648
K (Kg/ha)	140.000	68.480
Mg (Kg/ha)	73.531	43.397
NH <sub>4</sub> -N (Kg/ha)	40.369	32.235
NO <sub>3</sub> -N(Kg/ha)	35.75	21.23
NO <sub>2</sub> -N (Kg/ha)	<1	<1
Al (Kg/ha)	1276.0	770.2
Mo (Kg/ha)	<0.04	<0.04
Mn (Kg/ha)	82.54	50.22
Fe (Kg/ha)	48.88	46.20
Zn (Kg/ha)	2.511	2.772
Na (Kg/ha)	90.73	119.33
Ca (Kg/ha)	331.73	222.46
CIC (meq/100g)	6.266	9.652

pH y concentración de sales (<http://pubs.caes.uga.edu/caespubs/pubs/PDF/C875.pdf>)

Materia Orgánica determinada por "loss on ignition" método de 3 horas/360°C

resultados reportados en porcentaje por peso

*I. quaternata*, *I. vera*. Sin embargo se encontraron diferencias significativas entre las *Inga*, *P. carbonarium* y *C. arborea* (Cuadro 4). Ninguna de las interacciones fue significativa y evidentemente como se esperaba hubo diferencias significativas entre el muestreo a los 90 y 180 días después de la siembra. En suelo Humatas *I. spectabilis* fue significativamente mayor la altura que las demás especies. En el suelo Los Guineos *I. spectabilis* tuvo un crecimiento significativamente mayor al de *P. carbonarium* y al de *C. arborea*.

Cuadro 4. Altura de plantas con semillas recalcitrantes (cm)

Especie	Humatas		Los Guineos		Media
	90 d.	180 d.	90 d.	180 d.	
<i>P. carbonarium</i> *	18.83	36.00	20.67	23.17	24.67b
<i>C. arborea</i>	12.00	20.33	9.33	22.33	16.00b
<i>I. spectabilis</i>	50.23	58.00	52.33	57.00	54.39a
<i>I. fagifolia</i>	36.00	56.50	41.87	55.67	47.51a
<i>I. quaternata</i>	36.07	42.67	32.50	41.83	38.27a
<i>I. vera</i>	26.80	45.33	30.17	52.33	38.66a

Tratamientos con letras iguales no hay diferencias significativas (Tukey,  $p \leq 0.05$ )

\* árbol testigo con semilla ortodoxa. Datos retransformados de Log10.

### 5.3.1.1 Efecto de suelo

No hay interacción suelo x especie, pero si se encontró diferencias significativas dentro de cada suelos. *Inga spectabilis*, *Inga fagifolia* e *I. vera*, tuvieron mejor crecimiento en el suelo Los Guineos. En el caso del suelo Humatas *Inga spectabilis* e *Inga fagifolia* presentaron un comportamiento similar al del suelo Los Guineos (Cuadro 5).

Cuadro 5. Efecto de suelo en la altura de plantas con semillas recalcitrantes (cm)

Especie	Humatas	Los Guineos
<i>P. carbonarium</i> *	57.08 abcd	43.73 bcd
<i>C. arborea</i>	32.82 d	38.00 cd
<i>I. spectabilis</i>	96.05 a	101.75 a
<i>I. fagifolia</i>	100.58 a	92.72 a
<i>I. quaternata</i>	76.83 abc	74.52 abc
<i>I. vera</i>	77.07 abc	81.08 abc
Total	36.56	36.60

Tratamientos con letras iguales no hay diferencias significativas (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

\* árbol testigo de semilla ortodoxa. Datos retransformados de Log10.

### 5.3.2 Peso seco de plantas

Los resultados muestran que la producción de materia seca de *Inga spectabilis* fue superior que las demás especies ( $p \leq 0.05$ ). No se encontró diferencias entre las especies *I. fagifolia*, *I. quaternata* e *I. vera*. La especie que peor comportamiento presento en esta variable fue *Cajobá arborea*. Para el análisis de varianza los datos se transformaron a Log10. (Cuadro 6).

Cuadro 6. Peso seco de plantas con semilla recalitrante (gramos)

Especie	Humatas		Los Guineos		Media
	90 d.	180 d.	90 d.	180 d.	
<i>P. carbonarium</i> *	0.23	3.78	0.39	0.86	1.32c
<i>C. arborea</i>	0.27	1.69	0.27	2.55	1.20c
<i>I. spectabilis</i>	4.20	28.83	6.14	25.37	16.14a
<i>I. fagifolia</i>	2.27	12.80	2.37	14.51	7.99b
<i>I. quaternata</i>	1.46	9.21	1.93	11.13	5.93b
<i>I. vera</i>	0.64	10.30	1.20	15.43	6.89b

Tratamientos con letras iguales no hay diferencias significativas (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

\* árbol testigo con semilla ortodoxa. Datos retransformados de Log10.

### 5.3.2.1 Efecto de suelo

La respuesta de las especies *I. spectabilis*, *I. fagifolia*, *I. quaternata* e *I. vera*, al efecto de suelo fue igual en las dos series de suelo. Pero la producción de materia seca en *P. carbonarium* fue mayor en Humatas, caso contrario en *C. arborea* con mayor producción en el suelo Los Guineos (Cuadro 7).

Cuadro 7. Efecto de suelo en el peso seco de plantas con semilla recalitrantes (gramos)

Especie	Humatas	Los Guineos
<i>P. carbonarium</i> *	2.01 de	0.63 e
<i>C. arborea</i>	0.98 e	1.41 de
<i>I. spectabilis</i>	16.52 ab	15.46 a
<i>I. fagifolia</i>	7.53 abc	8.44 abc
<i>I. quaternata</i>	5.34 c	6.53 abc
<i>I. vera</i>	5.47 cd	8.32 bc
Total	6.31	6.85

Tratamientos con letras iguales no hay diferencias significativas (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

\* árbol testigo con semilla ortodoxa. Datos retransformados de Log10

### 5.3.3 Nodulación

Los resultados de contar los nódulos en la raíz de los árboles infectados muestran que las especies con la media más alta fueron *Inga vera* (46.4) e *Inga spectabilis* (40.8). Las especies *Pithecellobium carbonarium* (15.5) y *Cojoba arborea* (7.2) contrastan con medias inferiores de número de nódulos por planta. Se observaron diferencias significativas entre las especies, para el análisis de varianza los datos se transformaron a raíz cuadrada (Cuadro 8).

Cuadro 8. Número de nódulos/ planta (semilla recalcitrante)

Especie	Humatas		Los Guineos		Media
	90 d.	180 d.	90 d.	180 d.	
<i>P. carbonarium</i> *	11.67	43.00	4.00	3.33	15.50 c
<i>C. arborea</i>	3.00	11.33	5.00	9.33	7.17 c
<i>I. spectabilis</i>	34.67	47.00	31.67	49.67	40.75 ab
<i>I. fagifolia</i>	13.67	19.00	10.33	34.67	19.42 bc
<i>I. quaternata</i>	4.67	27.67	2.67	62.00	24.25 abc
<i>I. vera</i>	14.00	111.00	22.67	38.00	46.42 a

Datos retransformados de raíz cuadrada. \* árbol testigo con semilla ortodoxa

Tratamientos con letras iguales no hay diferencia significativa. (Tukey,  $P \leq 0.05$ )

### 5.3.3.1 Efecto de suelos en el número de nódulos

En el cuadro 9 se observa que no hay un efecto positivo del suelo Humatas en el número de nódulos de *I. fagifolia* e *I. quaternata*. En el suelo Los Guineos se observó un efecto positivo en *I. quaternata* e *I. vera* cuya media fue más alta que en Humatas. No se observó efecto de suelo en *I. spectabilis* ni en *C. arborea*. El efecto en los suelos depende de la presencia de cepas o ausencia de cepas apropiadas para las diferentes especies.

Cuadro 9. Efecto de suelo en el número de nódulos de plantas con semilla recalcitrante en dos suelos

Especie	Humatas	Los Guineos
<i>P. carbonarium</i> *	27.33 abc	3.67 c
<i>C. arborea</i>	7.17 c	7.17 bc
<i>I. spectabilis</i>	40.83 ab	40.67 a
<i>I. fagifolia</i>	16.33 abc	22.50 abc
<i>I. quaternata</i>	16.17 abc	32.33 abc
<i>I. vera</i>	62.50 a	30.33 abc
Total	28.39	22.78

Tratamientos con letras iguales no hay diferencias significativas (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

\* árbol testigo de semilla ortodoxa. Datos retransformados de raíz cuadrada.

La presencia de nemátodos en las raíces de *Pithecellobium carbonarium* sembradas en el suelo Los Guineos, influyó en la baja nodulación. Se observó con el paso del tiempo la influencia negativa de los nemátodos en la media del número de nódulos, ya que disminuyó en la segunda cosecha 90 días después de la primera. La infección de los nemátodos en raíces de *Pithecellobium carbonarium* en el suelo Los Guineos se presentó en las repeticiones sembradas

en el experimento con semillas recalitrantes (testigo) y en las repeticiones sembradas en el experimento con semillas ortodoxas.

**Cuadro 10. Influencia de nemátodos en el No. nódulos de *P. carbonarium* en el suelo Los Guineos**

Especie	Semillas Recalitrantes				Semillas Ortodoxas			
	Humatas		Los Guineos		Humatas		Los Guineos	
	90 d.	180 d.	90 d.	180 d.	90 d.	180 d.	90 d.	180 d.
<i>P. carbonarium</i>	11.7	43	4	3.33	6.3	54.8	4.02	7

Medias número de nódulos/planta. Las semillas recalitrantes fueron sembradas en Septiembre y las semillas ortodoxas en enero.

En el cuadro 10 se puede ver que hay poca nodulación en el suelo Los Guineos para la especie *Pithecellobium carbonarium*, debido a la presencia de nemátodos en el suelo. Después de 180 días la media bajó a 3.33, con respecto al muestreo a los 90 días de sembradas las plantas, mientras que en la serie Humatas a los 90 días se evidenció una media de 11.7 y al cabo de 180 días la nodulación subió a 43 nódulos por planta, un comportamiento que se esperaba se repitiera en Los Guineos. El comportamiento de *Pithecellobium carbonarium* fue muy similar en las dos épocas de siembra (septiembre y enero) y no se encontró ningún efecto en la época de siembra.

### 5.3.4 Peso seco de nódulos

En la interacción Suelo x Especie x Muestreo, se encontraron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ). La especie *Inga spectabilis* presentó la media más alta de peso seco de nódulos después de 180 días de siembra en ambos suelos (Cuadro 11).

No hay diferencia en el peso seco de los nódulos de *I. spectabilis* en Humatas y Los Guineos, *Inga fagifolia* en Humatas y Los Guineos, *I. quaternata* en Los Guineos e *I. vera* en Humatas, después de 180 días de sembradas. La velocidad de desarrollo y crecimiento de los nódulos de *I. spectabilis* es tan buena, que después de 90 días de siembra en Humatas, superó la biomasa de los nódulos de *I. quaternata* en Humatas (180 DDS), *C. arborea* en Los Guineos (180 DDS) y *P. carbonarium* en Los Guineos (180 DDS).

En la interacción Especie x Mes se encontró diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ). Resalta la media de *I. spectabilis* después de 90 días de siembra, ya que supera a *C. arborea* y *P. carbonarium* después de 180 días de la siembra. Se encontraron diferencias significativas entre las especies, siendo *I. spectabilis* la que más biomasa presentó en los nódulos. *I. fagifolia* e *I. vera* le siguieron en orden de mayor a menor sin diferencias significativas entre ellas. A continuación se resumen los resultados (Cuadro 11).

Cuadro 11. Peso seco de nódulos en plantas de semilla recalcitrante  
(Materia Seca en mg.)

Especies	Humatas		Los Guineos		Media
	90 d.	180 d.	90 d.	180 d.	
<i>P. carbonarium</i> *	2.0	223.0	10.0	7.0	60.5 de
<i>C. arborea</i>	4.4	10.3	4.3	21.3	10.1 e
<i>I. spectabilis</i>	172.7	732.7	44.4	695.3	411.3 a
<i>I. fagifolia</i>	12.7	527.3	45.0	421.7	251.7 b
<i>I. quaternata</i>	11.7	84.7	10.4	364.3	117.8 cd
<i>I. vera</i>	12.3	329.7	107.3	201.0	162.6 bc

Tratamientos con letras iguales no hay diferencias significativas (Tukey,  $P \leq 0.05$ )

\* árbol testigo con semilla ortodoxa. Datos retransformados de raíz cuadrada.

#### 5.3.4.1 Efecto de suelo en el peso seco de nódulos

En *Inga quaternata* se observó un efecto del suelo, ya que registró más peso seco en los nódulos en el suelo Los Guineos después de 180 días de la siembra (187.35 mg), que en el suelo Humatas 180 días después de sembrada (48.17 mg). Por otro lado el efecto de suelo en *Inga vera*, *I. spectabilis*, *I. fagifolia* y *P. carbonarium* fue al contrario. Estas especies presentaron un peso promedio mayor de nódulos en Humatas (176.95 mg) que en la serie Los Guineos (161.00 mg) ver cuadro 12.

#### 5.3.5 Porcentaje de nitrógeno total en árboles con semillas recalcitrantes

Los resultados de porcentaje de nitrógeno total se resumen en el cuadro 13. En la interacción Suelo x Especie x Muestreo se observó que *I. vera* en el suelo Humatas (180 DDS), presentó la media más alta de nitrógeno y en orden descendente le siguió *I. quaternata* en el suelo Los Guineos (180 DDS). El porcentaje de nitrógeno en *I. vera* es alto incluso a los de 90 días después de la siembra en el suelo Humatas, superando a *C. arborea*, *I. fagifolia* e *I. quaternata* en el suelo Humatas. En el suelo Los Guineos *P. carbonarium* mostró mayor porcentaje que *I. fagifolia* con diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ). *P. carbonarium* y *C. arborea* presentaron porcentajes de nitrógeno similares a los de las especies del género *Inga*, incluso se observó que *P. carbonarium* (2.12 %) tubo un porcentaje alto junto con *I. vera* (2.12 %) que es una especie que presentó bastante más nodulación que *P. carbonarium*.



Cuadro 12. Efecto de suelo en el peso seco de nódulos en plantas con semillas recalcitrantes (miligramos)

Especies	Humatas	Los Guineos
<i>P. carbonarium</i> *	112.52 cde	8.52 e
<i>C. arborea</i>	7.35 e	12.83 e
<i>I. spectabilis</i>	452.67 a	369.85 abc
<i>I. fagifolia</i>	270.00 bc	233.33 bc
<i>I. quaternata</i>	48.17 de	187.35 bcd
<i>I. vera</i>	171.00 bcd	154.17 bcd
Total	176.95	161.00

Tratamientos con letras iguales no hay diferencias significativas (Tukey,  $P \leq 0.05$ ). \* árbol testigo con semilla ortodoxa. Datos retransformados de raíz cuadrada.

### 5.3.5.1 Efecto de suelo en el porcentaje de nitrógeno total

Se encontró efecto del tipo de suelo en el porcentaje de nitrógeno de las especies evaluadas, se resumen los datos en el cuadro 14. La especie que más porcentaje de nitrógeno presentó fue *I. vera* en el suelo Humatas, le siguió *P. carbonarium* también en el suelo Humatas y en tercer lugar *P. carbonarium* en el suelo Los Guineos (Cuadro 14).

Cuadro 13. Porcentaje de Nitrógeno en plantas con semilla recalcitrante

Especie	Humatas		Los Guineos		Media
	90 d.	180 d.	90 d.	180 d.	
<i>P. carbonarium</i> *	2.16	2.14	2.10	2.06	2.12a
<i>C. arborea</i>	1.98	1.81	2.09	1.99	1.97a
<i>I. spectabilis</i>	2.06	1.99	1.95	2.15	2.04a
<i>I. fagifolia</i>	1.89	1.36	1.86	1.49	1.65b
<i>I. quaternata</i>	2.00	1.60	1.69	2.32	1.91ab
<i>I. vera</i>	2.32	2.64	1.95	1.59	2.12a

Tratamientos con letras iguales no hay diferencias significativas (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

\*árbol testigo de semilla ortodoxa.

El promedio general para el suelo Humatas fue de 2.00 % y para la serie Los Guineos fue 1.94 %. Esto refleja el efecto positivo en el suelo Humatas que influyó en *I. vera* y *P. carbonarium* que presentaron mayor porcentaje de nitrógeno en este suelo.

Los resultados de efecto de especies fueron: mayor porcentaje de nitrógeno en *Pithecellobium carbonarium* (2.12 %) e *Inga vera* (2.12 %) y le sigue *Inga spectabilis* (2.04 %) en tercer lugar. El porcentaje de *Cojoba arborea* (1.97 %), *Inga quaternata* (1.91 %) e *Inga fagifolia* (1.65 %) fue similar, no se encontró diferencias significativas entre especies ( $p \leq 0.05$ ) (Cuadro 13).

**Cuadro 14. Efecto de suelo en el porcentaje de N de plantas con semilla recalitrante**

<b>Especies</b>	<b>Humatas</b>	<b>Los Guineos</b>
<i>P. carbonarium</i> *	2.15 ab	2.08 abc
<i>C. arborea</i>	1.90 bc	2.04 abc
<i>I. spectabilis</i>	2.02 abc	2.05 abc
<i>I. fagifolia</i>	1.62 c	1.68 bc
<i>I. quaternata</i>	1.80 bc	2.01 abc
<i>I. vera</i>	2.48 a	1.77 bc
Total	2.00	1.94

Tratamientos con Letras iguales no hay diferencias significativas (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

\* árbol testigo de semilla ortodoxa

### 5.3.6 Cepas aisladas

De un total de 48 aislamientos 22 resultaron ser bacterias Gram negativas, ocho de las 23 cepas han inducido nódulos en *Macropitilium atropurpureum*. Las colonias aisladas que presentaron absorción del colorante de rojo congo fueron descartadas. A continuación se describen las características de las colonias aisladas que se ajusta a rhizobios: colonia redonda, convexa, brillante, de diámetro entre 1 y 4 milímetros de diámetro, incolora semitraslúcida de consistencia pegajosa y gelatinosa; forma de bacilos cortos Gram negativa (microscopio). Las cepas que infectaron los árboles producen un color rosado o rojo en el interior de los nódulos, lo que evidenció la presencia de leghemoglobina y una activa fijación de nitrógeno. Dos cepas resultaron no ser Gram negativas siendo estas *I. fagifolia* H1 con código INFAH1 y *P. carbonarium* G3 con código PICAG3 y esto concuerda con las cepas que no indujeron formación de nódulos en *Macropitilium atropurpureum*, por lo tanto se descartaron como rhizobios. En el cuadro 15 se muestra los resultados de los aislamientos incluyendo la prueba de producción de acidez o alcalinidad. El género *Rhizobium* incluye a todas las cepas de crecimiento rápido (3-5 días para observar las primeras colonias) y productoras de metabolitos ácidos. Mientras que las cepas del género *Bradyrhizobium* son de crecimiento lento (5-7 días) y producen metabolitos alcalinos para separar cepas de crecimiento rápido y lento.

Cuadro 15. Cepas aisladas de árboles con semillas recalcitrantes y *P. carbonarium*

No.	ESPECIE	CLAVE	Nodulación	Gram +/-	BTB
1	<i>I. spectabilis</i> G1	INESG1	0%	-	AL
2	<i>I. spectabilis</i> G2	INESG2	80%	-	AC
3	<i>I. spectabilis</i> G3	INESG3	0%	-	AL
4	<i>I. spectabilis</i> H1	INESH1	10%	-	AC
5	<i>I. spectabilis</i> H2	INESH2	0%	-	AC
6	<i>I. spectabilis</i> H3	INESH3	20%	-	AC
7	<i>I. quaternata</i> G1	INQUG1	60%	-	AC
8	<i>I. quaternata</i> G2	INQUG2	80%	-	AL
9	<i>I. vera</i> G1	INVEG1	10%	-	AL
10	<i>I. vera</i> H1	INVEH1	0%	-	AC
11	<i>I. vera</i> H2	INVEH2	0%	-	AC
12	<i>I. vera</i> H3	INVEH3	0%	-	AC
13	<i>P. carbonarium</i> G1	PICAG1	30%	-	AL
14	<i>P. carbonarium</i> G2	PICAG2	0%	-	AC
15	<i>P. carbonarium</i> G3	PICAG3	0%	+	AC
16	<i>P. carbonarium</i> G4	PICAG4	0%	-	AC
17	<i>P. carbonarium</i> G5	PICAG5	0%	-	AC
18	<i>P. carbonarium</i> G6	PICAG6	0%	-	AC
19	<i>C. arborea</i> H1	COAR3	90%	-	AC
20	<i>C. arborea</i> H2	COAR4	90%	-	AC
21	<i>I. fagifolia</i> H1	INFAH1		+	AC
22	<i>I. fagifolia</i> H2	INFAH2	40%	-	AC
23	<i>I. fagifolia</i> H3	INFAH3		-	AC
24	<i>I. fagifolia</i> G1	INFAH4		-	AC

\* Cepas en prueba con *Macropodium atropurpureum* (siratro). azul de bromotimol (BTB).

AC: Cepas de crecimiento rapido y producción de ácido

AL: Cepas de crecimiento lento y producción de álcali

Clave: dos primeras letras de las iniciales de género y especie, tipo de suelo del aislamiento

(H:Humatas/ G:Los Guineos) y número de cepa

## 5.4 Experimento en invernadero de especies con semillas ortodoxas

### 5.4.1 Altura de las planta

Se encontró interacción entre Suelo x Especie x Muestreo (Cuadro 16 y 17). En el suelo Humatas las especies de árboles que más crecieron después de 180 días fueron: *A. procera* (94.1 cm), *C. houstoniana* (99.5 cm.) y *E. cyclocarpum* (133.6 cm.), dentro de las *Mimosoideas*. Entre las

*Papilionoideae* están: *C. farchildiana* (99.5 cm.) y *E. variegata* (131.3 cm.) siendo esta la especie la más alta de todas las especies con semillas ortodoxas. En el suelo Los Guineos 180 días después de la siembra se encontró que *E. cyclocarpum* (105.1 cm.) y *L. leucocephala* (90.4 cm.) dentro de las *Mimosoideas* fueron las más altas. Las *Papilionoideas* en el suelo Los Guineos con mayor crecimiento fueron: *C. farchildiana* (127.9 cm.) y *E. variegata* (131.3 cm.) igual que en el suelo Humatas (ver apéndice 4 para separación de medias).

Cuadro 16. Altura de plantas con semillas ortodoxas (cm)

Especie	Humatas			Los Guineos			Media
	90 d.	180 d.	300 d.	90 d.	180 d.	300 d.	
<b>Mimosoideae</b>							
<i>A. angustissima</i>	32.2	76.3		37.6	49.4		48.9
<i>A. auriculiformis</i>	22.1	51.8		ND	ND		36.9
<i>A. lebeck</i>	41.2	43.4		21.6	65.0		42.8
<i>A. procera</i>	29.1	94.1		29.2	85.1		59.4
<i>A. pavonina</i>	17.7	34.9		17.0	24.6		23.5
<i>A. peregrina</i>	49.1	55.9		23.3	43.1		42.9
<i>C. houstoniana</i>	40.3	99.5		42.7	50.0		39.5
<i>C. surinamensis</i>	17.8	27.0		23.3	75.8		36.0
<i>E. cyclocarpum</i>	46.9	133.6		76.5	105.1		90.5
<i>I. fagifolia</i> *			49.00			62.67	47.5
<i>I. quaternata</i> *			52.00			47.00	38.3
<i>I. spectabilis</i> *			61.17			83.67	54.4
<i>I. vera</i> *			59.00			41.00	38.7
<i>L. diversifolia</i>	15.6	49.9		40.4	63.7		42.4
<i>L. leucocephala</i>	17.3	61.2		36.8	90.4		51.4
<i>P. pedunculata</i>	20.0	51.5		19.6	27.8		29.7
<i>P. carbonarium</i>	12.4	28.5		14.1	32.0		21.8
<i>S. saman</i>	19.5	41.7		36.4	79.0		44.1

\* Plantas cosechadas 300 DDS. ND: no hay datos.

Cuadro 17. Altura de plantas con semillas ortodoxas (cm)

Especie	Humatas			Los Guineos			Media
	90 d.	180 d.	300 d.	90 d.	180 d.	300 d.	
<b>Papilionoideae:</b>							
<i>A. inermis</i> *	ND	ND	39.7	ND	ND	40.7	40.2
<i>C. fairchildiana</i>	40.3	99.5		41.0	127.9		77.2
<i>F. macrophylla</i>	23.4	74.2		29.4	81.4		52.1
<i>E. berteroana</i>	22.2	43.0		26.3	83.8		43.9
<i>E. variegata</i>	43.2	131.3		40.4	131.3		86.6
<i>G. sepium</i>	16.6	80.8		14.7	31.3		35.9
<i>L. dominguensis</i>	22.3	62.2		17.0	45.7		36.8
<i>O. krugii</i>	17.0	9.3		15.0	26.3		16.9
<i>P. indicus</i>	20.3	39.2		21.0	30.6		27.8
<i>P. officinalis</i> **	ND	ND	60.2	ND	ND	75.1	67.7
<i>S. grandiflora</i>	19.9	34.9		18.1	51.1		31.0

\* Plantas cosechadas 300 DDS. \*\* Germinó en campo. ND: no hay datos.

#### 5.4.1.1 Efecto de suelo en la altura de la planta

Los resultados muestran interacción doble Suelo x Especie. La media para el suelo Humatas en la variable altura de la planta fue: 42.80 cm y para la serie Los Guineos fue de: 46.17 cm.

Cuadro 18. Efecto de suelo en la altura de plantas con semillas ortodoxas (cm)

Especie	Humatas	Los Guineos	Media
<b>Papilionoideae:</b>			
<i>A. inermis</i> *	39.7	40.7	40.2
<i>C. farchildiana</i>	69.92	84.46	77.2
<i>F. macrophylla</i>	48.8	55.4	52.1
<i>E. berteroana</i>	32.6	55.1	43.9
<i>E. variegata</i>	87.3	85.9	86.6
<i>G. sepium</i>	48.7	23.0	35.9
<i>L. dominguensis</i>	42.2	31.4	36.8
<i>O. krugii</i>	13.2	20.6	16.9
<i>P. indicus</i>	29.8	25.8	27.8
<i>P. officinalis</i> **	60.2	75.1	67.7
<i>S. grandiflora</i>	27.4	34.6	31.0
<b>Media</b>	<b>45.43</b>	<b>48.36</b>	

\* plantas cosechadas 300 DDS. \*\* Germinó en campo

Las especies de la familia *Papilionoideae* *E. variegata* y *C. farchildiana* presentaron mayor altura, sin diferencias significativas en las medias de los suelos ( $p \leq 0.05$ ). Se observó diferencias

numéricas, que muestran mayor crecimiento de *E. variegata* en el suelo Humatas y *C. farchildiana* en el suelo Los Guineos (Cuadro18).

**Cuadro 19 . Efecto de suelo en la altura de plantas con semillas ortodoxas (cm)**

<b>Especie</b>	<b>Humatas</b>	<b>Los Guineos</b>	
<b>Mimosoideae</b>			<b>Media</b>
<i>A. angustissima</i>	54.22	43.51	48.9
<i>A. auriculiformis</i>	36.91	ND	36.9
<i>A. lebeck</i>	42.30	43.33	42.8
<i>A. procera</i>	61.59	57.12	59.4
<i>A. pavonina</i>	26.28	20.81	23.6
<i>A. peregrina</i>	52.51	33.21	42.9
<i>C. houstoniana</i>	32.71	46.34	39.5
<i>C. surinamensis</i>	22.37	49.59	36.0
<i>E. cyclocarpum</i>	90.23	90.84	90.5
<i>I. fagifolia</i> *	46.25	48.77	47.5
<i>I. quaternata</i> *	39.37	37.17	38.3
<i>I. spectabilis</i> *	54.12	54.67	54.4
<i>I. vera</i> *	36.07	41.25	38.7
<i>L. diversifolia</i>	32.77	52.07	42.4
<i>L. leucocephala</i>	39.26	63.60	51.4
<i>P. pedunculata</i>	35.75	23.72	29.7
<i>P. carbonarium</i>	20.46	23.05	21.8
<i>S. saman</i>	30.57	57.69	44.1
<b>Media</b>	<b>41.88</b>	<b>46.27</b>	

\* Plantas cosechadas 300 DDS.

ND: no hay datos.

Entre las especies de la familia *Mimosoideae* la planta con mayor altura fue *E. cyclocarpum* y no se encontraron diferencias significativas entre los suelos ( $p \leq 0.05$ ). *A. procera*, fue la segunda más alta entre las *Mimosoideae* y tampoco se observaron diferencias significativas entre las medias de los suelos. Numéricamente *A. procera* creció mejor en el suelo Humatas que en Los Guineos (Cuadro19).

Cuadro 20. Peso seco de plantas con semillas ortodoxas (gramos)

Especie	Humatas			Los Guineos			Media
	90 d.	180 d.	300 d.	90 d.	180 d.	300 d.	
<b>Mimosoideae</b>							
<i>A. angustissima</i>	1.01	7.11		1.98	2.38		3.12
<i>A. auriculiformis</i>	1.29	4.44		ND	ND		2.86
<i>A. lebbeck</i>	2.03	3.41		4.59	16.01		6.51
<i>A. procera</i>	2.04	25.50		2.53	13.67		10.93
<i>A. pavonina</i>	2.01	4.62		1.57	3.33		2.88
<i>A. peregrina</i>	2.95	6.93		1.85	2.87		3.65
<i>C. houstoniana</i>	1.80	6.99		5.22	6.90		5.23
<i>C. surinamensis</i>	0.89	1.69		1.43	10.48		3.62
<i>E. cyclocarpum</i>	6.80	26.71		10.24	20.29		16.01
<i>I. fagifolia*</i>	ND	ND	23.27	ND	ND	41.43	32.35
<i>I. quaternata*</i>	ND	ND	41.47	ND	ND	37.23	39.35
<i>I. spectabilis*</i>	ND	ND	45.63	ND	ND	61.07	53.35
<i>I. vera*</i>	ND	ND	19.33	ND	ND	19.67	19.50
<i>L. diversifolia</i>	0.66	2.49		1.51	2.64		1.82
<i>L. leucocephala</i>	1.30	6.29		2.80	11.19		5.40
<i>P. pedunculata</i>	2.62	6.76		1.03	4.08		3.62
<i>P. carbonarium</i>	0.23	3.17		0.28	1.03		1.18
<i>S. saman</i>	1.07	3.26		3.31	10.20		4.46
<b>Papilionoideae:</b>							
<i>A. inermis*</i>	ND	ND	17.10	ND	ND	14.13	15.62
<i>C. farchildiana</i>	8.01	20.94		4.62	26.00		14.89
<i>F. macrophylla</i>	0.63	8.62		3.78	30.86		10.97
<i>E. berteriana</i>	1.48	6.85		4.65	18.80		7.95
<i>E. variegata</i>	6.49	34.31		6.28	41.23		22.08
<i>G. sepium</i>	3.02	18.13		1.60	3.86		6.65
<i>L. dominguensis</i>	1.62	9.22		1.01	4.30		4.04
<i>O. krugii</i>	1.19	1.40		0.46	1.95		1.25
<i>P. indicus</i>	0.83	5.63		0.89	2.94		2.57
<i>P. officinalis**</i>	ND	ND	14.20	ND	ND	20.33	17.27
<i>S. grandiflora</i>	1.46	2.50		1.32	3.45		2.18

\* Plantas cosechadas 300 DDS. \*\* Germinó en campo

ND: no hay datos.

#### 5.4.2 Peso seco de plantas

El cuadro 20 muestra los resultados del peso seco de las plantas con semillas ortodoxas. En esta variable no se encontró triple interacción. Se destacaron por su alta producción de biomasa las especies *E. variegata*, *E. cyclocarpum*, *C. farchildiana* y *A. procera*; estas plantas no presentan

diferencias significativas entre si pero si con las demás especies en el efecto principal de especie ( $p \leq 0.05$ ). Ver apéndice 6 para separación de medias.

#### 5.4.2.1 Efecto de suelo en el peso seco de plantas

Los resultados muestran diferencias significativas en la interacción Especie x Suelo ( $p \leq 0.05$ ). El promedio general del suelo Los Guineos fue 6.85 y la media general para el suelo Humatas fue 5.83. Las diferencias numéricas muestran que la especie *E. variegata* en el suelo Los Guineos (23.76) presentó mayor peso seco y segunda fue *E. variegata* en Humatas (20.40). En el suelo Humatas resaltaron las especies *C. farchildiana* y *A. procera*, además de *E. variegata* antes nombrada. En el suelo Los Guineos, *E. cyclocarpum* y *F. macrophylla* se caracterizaron por tener alta producción de biomasa. El cuadro 21 se muestra el efecto de suelo para la variable peso seco de plantas en la familia *Papilionoideae* y en el cuadro 21 las especies de la familia *Mimosoideae*.

Cuadro 21. Efecto de suelo en el peso seco de plantas con semillas ortodoxas (gramos)

Especie	Humatas	Los Guineos
<b>Papilionoideae:</b>		
<i>A. inermis</i> *	17.10	14.13
<i>C. farchildiana</i>	14.48	15.31
<i>F. macrophylla</i>	4.62	17.32
<i>E. berteroana</i>	4.17	11.72
<i>E. variegata</i>	20.40	23.76
<i>G. sepium</i>	10.58	2.73
<i>L. dominguensis</i>	5.42	2.66
<i>O. krugii</i>	1.29	1.20
<i>P. indicus</i>	3.23	1.92
<i>P. officinalis</i> **	14.20	20.33
<i>S. grandiflora</i>	1.98	2.38
Media	8.86	10.31

\* Plantas cosechadas 300 DDS. \*\* Germinó en campo

Entre 11 especies de la familia *Papilionoideae*, 6 presentaron mejor producción de biomasa en el suelo Los Guineos. De 17 especies de la familia *Mimosoideae*, 9 presentaron mejor producción de materia seca en el suelo Los Guineos (Cuadro 21 y 22).



Cuadro 22. Efecto de suelo en el peso seco de plantas con semillas ortodoxas  
(gramos)

Especie	Humatas	Los Guineos
<b>Mimosoideae</b>		
<i>A. angustissima</i>	4.06	2.18
<i>A. auriculiformis</i>	2.86	ND
<i>A. lebbeck</i>	2.72	10.30
<i>A. procera</i>	13.77	8.10
<i>A. pavonina</i>	3.32	2.45
<i>A. peregrina</i>	4.94	2.36
<i>C. houstoniana</i>	4.40	6.06
<i>C. surinamensis</i>	1.29	5.95
<i>E. cyclocarpum</i>	16.75	15.27
<i>I. fagifolia</i> *	23.27	41.43
<i>I. quaternata</i> *	41.47	37.23
<i>I. spectabilis</i> *	45.63	61.07
<i>I. vera</i> *	19.33	19.67
<i>L. diversifolia</i>	1.57	2.07
<i>L. leucocephala</i>	3.80	7.00
<i>P. pedunculata</i>	4.69	2.56
<i>P. carbonarium</i>	1.70	0.66
<i>S. saman</i>	2.17	6.76
Media	10.98	12.84

\* Plantas cosechadas 300 DDS. ND: no hay datos.

### 5.4.3 Nodulación

El cuadro 23 muestra el número de nódulos por planta en los dos suelos y en dos tiempos de muestreo (triple interacción). Se encontraron 23 especies noduladas, en la mayoría de las especies la infección se dió en los dos suelos (Humatas y Los Guineos). En las especies *A. peregrina*, *C. surinamensis* y *O. krugii*, solo se observó nodulación en el suelo Los Guineos y en al menos una repetición. La especie *Acacia auriculiformis* fue la única especie donde solo se observó nodulación en el suelo Humatas, esto se debió a la falta de semillas para probar en el suelo Los Guineos esta especie. Los nódulos de *Acacia auriculiformis* se apreciaron en el muestreo de 180 días después de sembrada. *Clitoria farchildiana*, con una media de 234.69 después de 180 días de sembrada, fue la especie con mayor número de nódulos en el suelo Humatas; además presento nódulos muy característicos con forma esférica, pequeños, de color verde con manchas de color blanco en relieve. El nódulo más grande en *Clitoria farchildiana*

midió 4 mm de diámetro. Se encontró que la mayoría de los nódulos estaban distribuidos en la parte superior de la raíz principal y en las raíces laterales principales.

Cuadro 23. Número de nódulos en plantas con semillas ortodoxas

Especie	Humatas			Los Guineos			Total
	90 d.	180 d.	300 d.	90 d.	180 d.	300 d.	
<b>Mimosoideae</b>							
<i>A. angustissima</i>	0.67	77.90		4.00	5.96		22.13
<i>A. auriculiformis</i>	0.00	22.47		ND	ND		11.24
<i>A. lebbeck</i>	9.35	6.97		1.33	17.68		8.83
<i>A. procera</i>	7.67	37.16		1.67	51.88		24.60
<i>A. pavonina</i>	0.00	0.00		0.00	0.00		0.00
<i>A. peregrina</i>	0.00	0.00		0.00	1.33		0.33
<i>C. houstoniana</i>	0.00	7.36		1.01	0.00		2.09
<i>C. surinamensis</i>	0.00	0.00		0.00	47.08		11.77
<i>E. cyclocarpum</i>	6.97	17.07		12.70	16.33		13.27
<i>I. fagifolia</i> *	ND	ND	25.67	ND	ND	44.33	19.42
<i>I. quaternata</i> *	ND	ND	42.67	ND	ND	79.00	24.25
<i>I. spectabilis</i> *	ND	ND	62.33	ND	ND	25.67	40.75
<i>I. vera</i> *	ND	ND	110.00	ND	ND	135.00	46.42
<i>L. diversifolia</i>	0.00	7.64		2.01	3.33		3.24
<i>L. leucocephala</i>	0.00	11.09		5.01	32.13		12.06
<i>P. pedunculata</i>	0.00	0.00		0.00	0.00		0.00
<i>P. carbonariu</i>	6.31	36.54		2.68	7.00		13.13
<i>S. saman</i>	3.65	7.64		5.66	17.71		8.67
<b>Papilionoideae:</b>							
<i>A. inermis</i> *	ND	ND	10.00	ND	ND	9.67	9.83
<i>C. fairchildiana</i>	78.28	234.69		1.99	199.27		128.56
<i>F. macrophylla</i>	3.65	66.11		5.28	306.01		95.27
<i>E. berteroana</i>	1.33	5.34		3.65	9.67		5.00
<i>E. variegata</i>	9.30	59.25		6.99	8.57		21.03
<i>G. sepium</i>	10.36	95.61		1.00	7.29		28.56
<i>L. dominguensis</i>	15.73	40.36		2.01	8.97		16.77
<i>O. krugii</i>	0.00	0.00		5.01	32.13		0.42
<i>P. indicus</i>	9.27	16.60		1.33	8.62		8.96
<i>P. officinalis</i> **	ND	ND	64.00	ND	ND	83.00	73.50
<i>S. grandiflora</i>	25.35	17.10		11.30	20.17		18.48

\* Plantas cosechadas 300 DDS.\*\* Germinó en campo. ND: no hay datos.

*F. macrophylla* presentó una media de nódulos de 306.01 después de 180 días de sembrada en el suelo Los Guineos. La forma de estos nódulos es redonda y esférica de color beige, con un diámetro máximo de 3 mm, generalmente estaban distribuidos en las raíces laterales jóvenes. Las especies de la subfamilia *Papilionoideae* (36.37) presentaron una mejor nodulación que las

especies de la familia *Mimosoideae* (17.85) (Cuadro 23). Ver apéndice 8 para separación de medias en efecto principal de especie.

*A. angustissima*, *A. procera*, *E. variegata*, *G. sepium*, *L. dominguensis* y *S. grandiflora* presentan diversidad de formas en sus nódulos, además el total de nódulos o la sumatoria de las repeticiones fue mayor a 200 nódulos. *A. angustissima* presentó nódulos alargados en forma de coral de color beige, la mayoría distribuidos en las raíces laterales. En *A. procera*, la forma de los nódulos es similar a los de *A. angustissima* irregulares y en forma de coral; la diferencia fue mayor tamaño, cerca de 10 mm de diámetro. Los nódulos de *E. variegata* presentaron forma semiglobosa y poco irregular, no se presentaron agrupados y su tamaño máximo fue de 8 mm de ancho. Los nódulos jóvenes de *G. sepium* (2mm ancho) presentaron formas globosas y a la madurez presentaron formas elongadas y lobuladas de hasta 8 mm en la parte más ancha. Por último, la especie *S. grandiflora* presentó nódulos con forma globosa de color blanco distribuidos en las raíces laterales y con un tamaño máximo de 4 mm de ancho.

*A. peregrina*, *C. houstoniana*, *E. berteroana*, *L. diversifolia* y *O. krugii*, pertenecen al grupo de especies que presentaron como sumatoria de las repeticiones un número de nódulos menor a 100. La forma de los nódulos *A. peregrina* fue globosa, color marrón rojizo y de tamaño pequeño (> 1.5 mm). *C. houstoniana* y *L. diversifolia* presentaron nódulos de color blanco y en forma de coral. El tamaño máximo fue de 7 mm de ancho para los de *C. houstoniana*. Los nódulos de *E. berteroana* y *L. diversifolia* variaron su tamaño según el tipo de suelo, ambas especies presentaron mayor tamaño de nódulos en el suelo Humatas. Los nódulos de *O. krugii* presentaron forma globosa ovoide y color beige.

#### **5.4.3.1 Efecto de suelos en la nodulación**

Se presentó interacción doble (Suelo x Especie) para la variable número de nódulos. La especie *Clitoria farchildiana* fue la especie mejor nodulada, con diferencias numéricas entre el suelo Humatas con una media de 156.49 y Los Guineos de 100.63. Las especies menos noduladas en los dos suelos fueron: *L. diversifolia* (3.24), *C. houstoniana* (2.09) y *O. krugii* (0.41) que no se incluyeron en el análisis estadístico. En *G. sepium*, *P. carbonarium*, *A. angustissima*, *E.*

*variegata*, *L. dominguensis* y *S. grandiflora* se observó mayor nodulación en el suelo Humatas que en Los Guineos con diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ). En *P. indicus*, *C. farchildiana*, no se encontró diferencias significativas pero si numéricamente nodularon más en Humatas que en Los Guineos (Cuadro 24 y 25).

Cuadro 24. Efecto de suelo en el número de nódulos de plantas con semillas ortodoxas

Especie	Humatas	Los Guineos
<b>Mimosoideae</b>		
<i>A. angustissima</i>	39.28	4.98
<i>A. auriculiformis</i>	11.24	ND
<i>A. lebeck</i>	8.16	9.51
<i>A. procera</i>	22.41	26.78
<i>A. pavonina</i>	0.00	0.00
<i>A. peregrina</i>	0.00	0.66
<i>C. houstoniana</i>	3.68	0.50
<i>C. surinamensis</i>	0.00	23.54
<i>E. cyclocarpum</i>	12.02	14.52
<i>I. fagifolia</i> *	25.67	44.33
<i>I. quaternata</i> *	42.67	79.00
<i>I. spectabilis</i> *	62.33	25.67
<i>I. vera</i> *	110.00	135.00
<i>L. diversifolia</i>	3.82	2.67
<i>L. leucocephala</i>	5.71	18.57
<i>P. pedunculata</i>	0.00	0.00
<i>P. carbonarium</i>	21.43	4.84
<i>S. saman</i>	5.65	11.68
Media	20.78	22.34

\* Plantas cosechadas 300 DDS.

ND: no hay datos.

En algunas especies se observó mayor nodulación en el suelo Los Guineos que en Humatas. Estas fueron, *F. macrophylla*, *L. leucocephala*, *S. saman*, *E. cyclocarpum*, *E. berteroana*. Las especies *C. surinamensis* y *A. peregrina* solo nodularon en el suelo Los Guineos y solo en una repetición de *A. peregrina*, se observó nodulación después de 180 días de sembrada (Cuadro 23 y 24).

Cuadro 25. Efecto de suelo en el número de nódulos de plantas con semillas  
ortodoxas

Especie	Humatas	Los Guineos
<b>Papilionoideae:</b>		
<i>A. inermis</i> *	10.00	9.67
<i>C. farchildiana</i>	156.49	100.63
<i>F. macrophylla</i>	34.88	155.65
<i>E. berteroana</i>	3.33	6.66
<i>E. variegata</i>	34.27	7.78
<i>G. sepium</i>	52.98	4.15
<i>L. dominguensis</i>	28.05	5.49
<i>O. krugii</i>	0.00	0.84
<i>P. indicus</i>	12.94	4.97
<i>P. officinalis</i> **	64.00	83.00
<i>S. grandiflora</i>	21.22	15.73
Media	38.01	35.87

\* Plantas cosechadas 300 DDS. \*\* Germinó en campo

ND: no hay datos.

#### 5.4.4 Peso seco de nódulos

Se encontraron diferencias significativas entre especies (efecto principal). Las especies con mayor producción de materia seca en los nódulos fueron de mayor a menor: *S. saman* (549.28), *E. variegata* (423.85), *A. procera* (379.87), *C. farchildiana* (336.83), *E. cyclocarpum* (274.04) y *A. lebbeck* (266.32) (Cuadro 26). Las especies que menos materia seca presentaron en los nódulos fueron en orden descendente: *L. dominguensis* (53.26), *P. carbonarium* (51.25) y *A. angustissima* (41.23). Se presentó mayor producción de materia seca en los nódulos del suelo Los Guineos con una media de 225.06 mg que es mayor a la media en el suelo Humatas de 191.189 mg, pero esta diferencia no es significativa ( $p \leq 0.05$ ). El *S. saman* en Los Guineos fue la especie con más producción de materia seca en los nódulos con diferencias significativas dentro del suelo Los Guineos y con respecto a la producción de *S. saman* en Humatas también fue mayor. A nivel de efecto principal de especie no se encontraron diferencias entre: *C. farchildiana*, *E. variegata*, *E. cyclocarpum*, *A. procera*, *A. lebbeck*, *E. berteroana*, *G. sepium*, *L. leucocephala*, *S. grandiflora*, *F. macrophylla* y *P. indicus* (Apéndice 10).

Cuadro 26. Peso seco de nodulos en plantas con semillas ortodoxas (mg)

Especie	Humatas			Los Guineos			Media
	Mimosoideae	90 d.	180 d.	300 d.	90 d.	180 d.	
<i>A. angustissima</i>		6.07	126.74		9.32	22.77	41.23
<i>A. auriculiformis</i>		0.00	88.52		ND	ND	44.26
<i>A. lebeck</i>		44.08	345.53		200.4	475.28	266.32
<i>A. procera</i>		81.19	1089.1		58.86	290.36	379.87
<i>A. pavonina</i>		0.00	0.00		0.00	0.00	0.00
<i>A. peregrina</i>		0.00	0.00		0.00	0.33	0.08
<i>C. houstoniana</i>		0.00	182.05		3.33	0.00	46.35
<i>C. surinamensis</i>		0.00	0.00		0.00	187.45	46.86
<i>E. cyclocarpum</i>		167.1	538.35		163.8	226.87	274.04
<i>I. fagifolia</i> *		ND	ND	785.3	ND	ND	1644
<i>I. quaternata</i> *		ND	ND	934.0	ND	ND	447.0
<i>I. spectabilis</i> *		ND	ND	963.7	ND	ND	1069
<i>I. vera</i> *		ND	ND	236.3	ND	ND	546.3
<i>L. diversifolia</i>		0.00	36.55		3.65	2.36	10.64
<i>L. leucocephala</i>		0.00	113.80		65.64	181.70	90.28
<i>P. pedunculata</i>		0.00	0.00		0.00	0.00	0.00
<i>P. carbonarium</i>		4.99	182.97		2.34	14.70	51.25
<i>S. saman</i>		91.81	254.87		247.3	1603.1	549.28
<b>Papilionoideae:</b>							
<i>A. inermis</i> *		ND	ND	437.7	ND	ND	732.0
<i>C. fairchildiana</i>		203.8	425.85		13.74	703.93	336.83
<i>F. macrophylla</i>		2.01	88.17		1.67	469.79	140.41
<i>E. berteriana</i>		37.40	167.61		99.04	295.40	149.86
<i>E. variegata</i>		197.8	909.66		94.89	493.04	423.85
<i>G. sepium</i>		72.82	280.09		30.72	100.67	121.07
<i>L. dominguensis</i>		47.92	112.22		8.97	43.94	53.26
<i>O. krugii</i>		0.00	0.00		0.00	0.33	0.08
<i>P. indicus</i>		36.01	123.03		12.64	96.85	67.13
<i>P. officinalis</i> **		ND	ND	295.7	ND	ND	451.3
<i>S. grandiflora</i>		159.6	68.06		79.63	49.53	89.22

\* Plantas cosechadas 300 DDS.\*\* Germinó en campo. ND: no hay datos

#### 5.4.4.1 Efecto de suelos en el peso seco de nódulos

Los resultados de peso seco de nódulos muestran que hay interacción Especie x Suelo ( $p \leq 0.05$ ). La especie *S. saman* presentó una media de 925.22 miligramos en el suelo Los Guineos. Se observó mayor producción de biomasa en el suelo Los Guineos que en Humatas. Las siguientes

especies presentaron mayor peso seco en los nódulos en el suelo Humatas *A. procera*, *E. variegata*, *E. cyclocarpum*. En el suelo Los Guineos las especies con mayor producción de materia seca en los nódulos fueron, *S. saman*, *C. fairchildian*, *F. macrophylla*, *E. berteroana*, *L. leucocephala* y *A. lebbeck*. (Cuadro 27 y 28).

**Cuadro 27. Efecto de suelo en el peso seco de nódulos en plantas con semillas ortodoxas (miligramos)**

<b>Especie</b>	<b>Humatas</b>	<b>Los Guineos</b>
<b>Papilionoideae:</b>		
<i>A. inermis</i> *	437.67	732.00
<i>C. farchildiana</i>	314.81	358.84
<i>F. macrophylla</i>	45.09	235.73
<i>E. berteroana</i>	102.50	200.22
<i>E. variegata</i>	553.73	293.96
<i>G. sepium</i>	176.45	65.69
<i>L. dominguensis</i>	80.07	26.46
<i>O. krugii</i>	0.00	1.67
<i>P. indicus</i>	79.52	54.74
<i>P. officinalis</i> **	295.67	451.33
<i>S. grandiflora</i>	113.85	64.58
<b>Media</b>	<b>199.94</b>	<b>225.92</b>

\* Plantas cosechadas 300 DDS. \*\* Germinó en campo

ND: no hay datos.

#### **5.4.5 Fijación de nitrógeno (Actividad de la nitrogenasa)**

El cuadro 29 presenta los resultados de la actividad total de la nitrogenasa. Se encontraron diferencias significativas en las medias de etileno producido (micromoles de  $C_2H_4$ /planta/hora) de las especies *C. farchildiana*, *F. macrophylla*, *S. saman*, *A. procera*, *E. berteroana*, *A. lebbeck*, *E. cyclocarpum*, *S. grandiflora*, *E. variegata*, *G. sepium*, *L. dominguensis* y *P. indicus* con respecto a las demás especies. La interacción Suelo x Especie no fue significativa. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre los tiempos de muestreo (90 y 180 DDS), ni entre los suelos. Ver apéndice 12 para separación de medias en efecto principal de especie para la variable actividad total de la nitrogenasa.

Cuadro 28. Efecto de suelo en el peso seco de nódulos en plantas con semillas ortodoxas  
(miligramos)

Especie	Humatas	Los Guineos
<b>Mimosoideae</b>		
<i>A. angustissima</i>	66.40	16.05
<i>A. auriculiformis</i>	44.26	ND
<i>A. lebbeck</i>	194.80	337.83
<i>A. procera</i>	585.13	174.61
<i>A. pavonina</i>	0.00	0.00
<i>A. peregrina</i>	0.00	0.17
<i>C. houstoniana</i>	91.02	1.67
<i>C. surinamensis</i>	0.00	93.72
<i>E. cyclocarpum</i>	352.74	195.33
<i>I. fagifolia</i> *	585.33	1644.00
<i>I. quaternata</i> *	934.00	447.00
<i>I. spectabilis</i> *	963.67	1069.00
<i>I. vera</i> *	236.33	546.33
<i>L. diversifolia</i>	18.27	3.01
<i>L. leucocephala</i>	58.57	123.67
<i>P. pedunculata</i>	0.00	0.00
<i>P. carbonarium</i>	93.98	8.52
<i>S. saman</i>	173.34	925.22
Media	244.32	310.34

\* Plantas cosechadas 300 DDS.

ND: no hay datos.

En el cuadro 29 se incluyen especies como: *Andira inermis*, *Inga vera*, *I. fagifolia*, *I. quaternata*, *I. spectabilis* y *Pterocarpus officinalis*. Estas especies fueron analizadas después de 300 días de sembradas y no están incluidas en el diseño experimental. En el caso de *Andira inermis* las semillas tardaron más de 3 meses en germinar, ya que muchas semillas tuvieron problema con hongos lo que bajó y retrasó la germinación. En el caso de *I. vera*, *I. fagifolia*, *I. quaternata* e *I. spectabilis* se usaron plantas con más de 300 días de sembradas para el ensayo de reducción de acetileno (ARA), ya que en la época de producción de semillas, el cromatógrafo de gases no estaba disponible y hay que recordar que estas semillas no se pueden almacenar. De *Pterocarpus officinalis* no se obtuvieron semillas para incluir esta especie en el diseño experimental, pero se transplantaron plántulas a los tiestos con suelo Humatas y Los Guineos.



Cuadro 29. Actividad total de la nitrogenasa en especies con semillas ortodoxas

Especie	Humatas			Los Guineos			Media
	90 d.	180 d.	300 d.	90 d.	180 d.	300 d.	
<i>A. angustissima</i>	0.18	0.27		0.12	0.71		0.32
<i>A. auriculiformis</i>	ND	0.29		ND	ND		0.29
<i>A. lebeck</i>	1.20	7.07		0.98	1.64		2.72
<i>A. procera</i>	2.83	2.47		3.97	3.27		3.14
<i>A. pavonina</i>	0.30	0.07		0.18	0.34		0.22
<i>A. peregrina</i>	0.47	0.21		0.02	0.16		0.21
<i>C. houstoniana</i>	0.00	0.10		0.75	0.00		0.21
<i>C. surinamensis</i>	0.07	0.09		0.70	0.38		0.31
<i>E. cyclocarpum</i>	1.41	0.22		0.86	0.95		0.86
<i>I. fagifolia*</i>	ND	ND	1.26	ND	ND	7.79	4.53
<i>I. quaternata*</i>	ND	ND	1.13	ND	ND	5.49	3.31
<i>I. spectabilis*</i>	ND	ND	0.48	ND	ND	7.33	3.91
<i>I. vera*</i>	ND	ND	11.61	ND	ND	7.35	9.48
<i>L. diversifolia</i>	0.00	0.14		0.26	1.51		0.48
<i>L. leucocephala</i>	0.25	0.14		0.52	0.38		0.32
<i>P. pedunculata</i>	ND	0.02		0.15	1.65		0.61
<i>P. carbonarium</i>	1.07	0.00		1.07	0.00		0.43
<i>S. saman</i>	0.91	2.05		0.88	2.91		1.69
<b>Papilionoideae:</b>							
<i>A. inermis*</i>	ND	ND	5.97	ND	ND	0.01	4.37
<i>C. farchildiana</i>	1.94	4.91		0.83	5.26		3.23
<i>F. macrophylla</i>	2.48	2.77		0.88	9.74		3.97
<i>E. berteriana</i>	0.47	1.99		2.12	4.28		2.22
<i>E. variegata</i>	2.66	1.67		3.08	5.64		3.26
<i>G. sepium</i>	0.85	1.07		0.95	0.39		0.81
<i>L. domingensis</i>	1.64	0.11		1.06	0.50		0.83
<i>O. krugii</i>	ND	0.42		ND	0.32		0.37
<i>P. indicus</i>	0.81	0.12		0.58	0.97		0.62
<i>P. officinalis**</i>	ND	ND	1.41	ND	ND	1.17	1.29
<i>S. grandiflora</i>	0.63	0.33		1.40	1.30		0.92

ARA Actividad total de la nitrogenasa micromoles de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/planta/hora

\* Plantas cosechadas 300 DDS. \*\* Germinó en campo

ND: no hay datos.

Después de 300 días de transplantadas estas plantas se midieron y se tomaron los datos de peso seco de la planta, número de nódulos, peso seco de nódulos y altura de planta. Las plántulas se trajeron de la zona pantanosa del barrio "El Maní" en el municipio de Mayagüez (N 18° 15' 29.4" W 067° 10' 26.4").

Cuadro 30. Actividad específica de la nitrogenasa en especies con semillas ortodoxas

Especie	Humatas			Los Guineos			Media
	Mimosoideae	90 d.	180 d.	300 d.	90 d.	180 d.	
<i>A. angustissima</i>		9.69	10.33		17.48	53.88	20.02
<i>A. auriculiformis</i>		ND	6.70		ND	ND	1.67
<i>A. lebbeck</i>		19.44	94.35		52.12	5.45	42.84
<i>A. procera</i>		20.01	1.36		30.83	4.09	14.07
<i>A. pavonina</i>		ND	ND		ND	ND	-
<i>A. peregrina</i>		ND	ND		ND	40.22	10.05
<i>C. houstoniana</i>		ND	2.91		35.65	ND	9.64
<i>C. surinamensis</i>		ND	ND		ND	0.67	0.17
<i>E. cyclocarpum</i>		48.83	1.32		62.29	18.80	32.81
<i>I. fagifolia*</i>		ND	ND	1.71	ND	ND	4.58
<i>I. quaternata*</i>		ND	ND	1.21	ND	ND	17.83
<i>I. spectabilis*</i>		ND	ND	0.43	ND	ND	7.07
<i>I. vera*</i>		ND	ND	75.38	ND	ND	10.86
<i>L. diversifolia</i>		ND	ND		ND	ND	-
<i>L. leucocephala</i>		24.74	2.11		6.10	1.47	8.60
<i>P. pedunculata</i>		ND	ND		ND	ND	-
<i>P. carbonarium</i>		185.0	0.00		71.44	0.00	64.10
<i>S. saman</i>		3.24	160.69		3.56	1.59	42.27
<b>Papilionoideae:</b>							
<i>A. inermis*</i>		ND	ND	19.75	ND	ND	0.1
<i>C. fairchildiana</i>		8.85	10.77		47.83	8.97	19.10
<i>F. macrophylla</i>		28.90	12.63		20.43	11.52	18.37
<i>E. berteriana</i>		4.15	12.36		14.68	16.09	11.82
<i>E. variegata</i>		29.36	1.72		47.95	5.71	22.59
<i>G. sepium</i>		14.53	10.93		203.0	0.65	57.28
<i>L. domingensis</i>		50.68	3.06		117.0	3.80	43.62
<i>O. krugii</i>		ND	ND		ND	10.77	10.77
<i>P. indicus</i>		27.72	10.69		269.5	31.41	84.83
<i>P. officinalis**</i>		ND	ND	4.79	ND	ND	2.81
<i>S. grandiflora</i>		2.08	0.20		49.76	52.10	26.03

ARA Actividad total de la nitrogenasa micromoles de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h/g M.S nódulos

\* Especie que no entró en el diseño experimental y con más de 180 días.

\*\* Germinó en campo. ND: no hay datos.

El cuadro 30 muestra la actividad total dividida entre el peso seco en gramos de los nódulos y aquí se destacan las especies *Pterocarpus indicus*, *Pithecellobium carbonarium*, *Gliricidia sepium*, *Samanea saman*, y *Albizia lebbeck* por tener un tejido nodular más eficiente.

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1 Suelos

La serie Ultisoles (Humatas) son suelos en estado avanzado de meteorización con un horizonte iluvial de arcillas que contiene pocas bases. Estos suelos son ácidos y de fertilidad natural baja, pero bien manejados pueden ser altamente productivos. Según Muñiz y Monroig (1992) entre las limitaciones de estos suelos para la producción del café se señala su acidez, baja disponibilidad de fósforo y deficiencias o baja disponibilidad de las bases del suelo como calcio, magnesio y potasio y una baja fertilidad natural.

La serie Oxisoles (Los Guineos) son suelos que se caracterizan por un horizonte óxico, de alta concentración de óxidos de hierro y aluminio. Son ácidos y generalmente rojizos. Son altamente intemperizados y con bajo contenido de nutrientes.

Dadas las características de los suelos usados y su acidez, no se observó problemas con el establecimiento de las especies en estos suelos. Se observó que las especies del género *Inga* presentaron un crecimiento y contenido de nitrógeno homogéneo en los dos suelos. Esto tal vez se debe a que son especies que están bien adaptadas a los suelos ácidos (Sprent, 2001, Pennington, 1997). Por otro lado el encalado ayuda a mejorar la nodulación ya que el calcio y el molibdeno pueden ser absorbidos por la planta (Almendras y Bottomley, 1987). En este estudio se usaron especies que crecen bien en suelos ácidos como las especies del género *Inga*. Contrario a lo que se esperaba no se observó mejor crecimiento en las *Inga* sino en otras especies como *E. cyclocarpum* y *E. variegata*. El efecto de acidez de los suelos no afectó la nodulación ya que la mayoría de las especies nodularon excepto *C. surinamensis* y *P. pedunculata*, porque muy probablemente no hay en los suelos utilizados rhizobios capaces de nodular estas especies. En el caso de *P. pedunculata* hay reportes negativos reportados por Sprent (2001). No se puede definir que un suelo es mejor que otro para el crecimiento de las leguminosas arbóreas, ya que esto depende de la especie y las características que están dadas por su genoma para desarrollarse bajo condiciones determinadas.

## 6. 2 Recuento de *Rhizobium* en suelo (NMP)

El recuento para el suelo Humatas fue mayor al de Los Guineos. Esta diferencia es apreciable a nivel numérico, pero desde el punto de vista biológico el recuento es bajo y puede deberse a que los suelos se dejaron de 7 a 8 semanas cubiertos con plástico para evitar el crecimiento de hierba. El efecto de la solarización pudo influir en el recuento. La pérdida de humedad en el suelo afectó la cantidad de colonias. El número de rhizobios nativos en la serie Humatas está entre 10-100 células/gramo, esto significa que la cantidad de rhizobios es media. Thies y colaboradores (1991) definieron el tamaño de la población basado en el número de rhizobios nativos que afectan una inoculación. En la serie Los Guineos (6.2 células/g de suelo) se encontró un NMP de rhizobios inferior a 10 células/gramo de suelo lo que significa un número bajo de rhizobios nativos en este suelo (Thies et al., 1991). El suelo Los Guineos presentó una media de nódulos de 22.78 que es menor a la que presentó el suelo Humatas (28.39). A pesar del número bajo en Los Guineos todas las especies y repeticiones presentaron nodulación en este suelo, por lo que no hay necesidad de hacer inoculaciones pero si se puede mejorar algunas características del suelo que favorezcan el crecimiento de las colonias nativas de rhizobios.

## 6.3 Experimento en invernadero de especies con semillas recalcitrantes

### 6.3.1 Altura de las plantas

En este estudio la altura en promedio de las *Inga* fue de 63.8 cm al cabo de 90 días en el suelo Humatas y de 69.7 en el suelo Los Guineos. El crecimiento de las *Inga* fue alto comparado con *Inga marginata*, el cual en otros estudios a registrado un crecimiento de 8.82 cm después de 100 días (Uriarte et al., 2004). Este árbol alcanza un tamaño de 20 m de altura que es muy similar a la altura promedio que puede alcanzar *I. vera*, *I. quaternata* *I. spectabilis* e *I. fagifolia* (Penington, 1997).

En este estudio *Inga vera* alcanzó una media de 105.7 cm después de 180 días, este dato es inferior si se compara con el de CATIE (OFI/CATIE 2003) que reporta 150 cm en 150 días. La razón de la falta de desarrollo pudo ser el tamaño de los tiestos, los que quedaron pequeños

después de 90 días ya que se evidenció que hubo restricción física del crecimiento de las raíces debido a la capacidad de los tiestos y esto pudo influir en su crecimiento. Los datos de crecimiento de *Inga fagifolia* en Puerto Rico son de 22 cm en un periodo de 240 días bajo sombra (USDA, 2000), algo que contrastó con el promedio obtenido en este estudio, el cual fue de 96.7 cm de altura después de 180 días bajo invernadero en este estudio. En general el crecimiento de las especies de *Inga* fue uniforme y no se encontraron diferencias estadísticas, el crecimiento fue mayor en las *Inga* que en *C. arborea* y *P. carbonarium* con diferencias significativas. En *C. arborea* se observó que el crecimiento fue poco uniforme entre las repeticiones, entre los dos tipos de suelo y dentro de los suelos. En este experimento con semillas recalcitrantes no se encontró diferencias estadísticas entre los suelos, pero si hay diferencias numéricas, siendo la serie Los Guineos la de mayor promedio de altura. Los suelos no afectan el crecimiento de las especies *Inga*, las diferencias que se encontraron son debido a las características de crecimiento inherentes de cada especie, porque no hay efecto de suelo.

### **6.3.2 Peso seco de plantas**

El crecimiento rápido es una característica de las especies del género *Inga*; la *Inga fagifolia* es una especie que crece 1 metro durante los primeros doce meses y otro metro adicional los siguientes nueve meses (Penington, 1997). Después del establecimiento las especies del género *Inga* están permanentemente en producción de hojas y en este estudio se observó gran número de hojas y ramas en *I. quaternata*, *I. fagifolia*, *I. vera* y un poco menos en *I. spectabilis*. La continua aportación de hojas al "mulch", que reduce el crecimiento de malezas y favorece el ciclo de nutrientes son ventajas del uso de estas especies como sombra de cultivos como café y cacao (Penington, 1997). La retención foliar y la capacidad de rebrote durante la época seca es una de las características sobresalientes de algunas leguminosas (Argel y Lascano, 1998). En este estudio se pudo observar que las especies del género *Inga* rebrotaron y renovaron las hojas con más facilidad después de ser afectadas por plagas como la fumagina (*Capnodium* spp), pulgones y cochinillas. Otras especies como el *P. carbonarium* afectado por nemátodos o *E. cylocarpum* afectado por fumagina no tienen la misma capacidad para sobreponerse con facilidad a enfermedades. Esta característica esta asociada con el desarrollo de hojas y producción de una

gran cantidad de biomasa que le permite resistir o tolerar plagas y enfermedades incluso en condiciones extremas como suelos pobres y ácidos (Penington, 1997).

### 6.3.3 Nodulación

En este estudio se observó nodulación en todas las especies del género *Inga* 90 días después de la siembra, coincidiendo con estudios hechos por Grossman (2005) en *I. oerstediana* y Roskoski (1982) en *I. jinicuil*. En este estudio *I. quaternata* fue la menos nodulada en el muestreo después de 90 días de sembrada en el suelo Los Guineos (2.67), esto puede deberse a que en este suelo hubo menos rizobios ya que el conteo fue menor que el suelo Humatas. *C. arborea* y *P. carbonarium* igualmente presentaron una baja nodulación en el suelo Los Guineos después de 90 días de sembradas contradiciendo los hallazgos de Grossman y colaboradores (2005), quienes afirman que normalmente a un árbol de *Inga* le toma más tiempo la nodulación que a otros árboles leguminosa.

### Peso seco de nódulos

*Inga spectabilis* fue la especie con mejor nodulación y mostró en el peso seco de los mismos mayor biomasa desde los 90 días. El peso seco de los nódulos de *Inga spectabilis* superó en casi 14 veces a las demás especies de *Ingas* y por mucho más a *P. carbonarium* y a *C. arborea*. El peso de nódulos de *C. arborea* (10.1 mg) es similar al de *I. jinicuil* (13.2 mg) después de 10 meses en un suelo sin fertilizar. En este mismo experimento los nódulos de *I. jinicuil* alcanzaron 387.6 mg después de 14 meses y con aportes de 0.92 g de urea al suelo (Van Kessel y Roskoski, 1983). Se encontró que *Inga quaternata* e *Inga vera* tuvieron similar peso de nódulos, desde 4 mg a 12 mg/planta a los 90 días, con respecto a los datos publicados por Moreira en 1997 (7-68 mg/planta). El número de nódulos por planta 16.1 a 62.5 por planta, es mayor a lo reportado en *Inga* por Moreira (1997), de 0.4-2.6 nódulos por planta. Los resultados obtenidos en este estudio en relación al número de nódulos se aproximan más a lo reportado por Patreze y Cordeiro (2005) en *Inga laurina*, 80 nódulos por planta y 195 mg de peso seco.

### 6.3.4 Porcentaje de nitrógeno total en árboles con semillas recalcitrantes

Según estudios de eficiencia en la fijación de nitrógeno de leguminosas arbustivas realizados por Suárez-Vásquez (1975), teniendo en cuenta el porcentaje de nitrógeno de la planta sometida a digestión según el método de Kjeldahl, los datos obtenidos se ajustan a valores normales para plantas de esta familia. Por otro lado se observa que estos valores de contenido de nitrógeno obtenidos en *I. fagifolia* (1.62 % a los 90 días) y en *P. carbonarium* (2.15 % a los 90 días) son bajos si son comparados con la composición de especies arbóreas usadas en el estudio Macías y García (2004), donde *Gliricidia sepium* (3.64%) mostró el mayor contenido de nitrógeno y *Samanea saman* (2.02%) el más bajo. En este estudio también se incluyen especies como: *Albizia falcataria* (2.68%), *Albizia procera* (3.42%), *Erythrina berteroana* (3.06%) y *Guazuma ulmifolia* (3.57%). El contenido de nitrógeno de *P. carbonarium* fue tan alto como el de *I. vera*. El crecimiento de *P. carbonarium* no fue bueno y tampoco presentó producción alta de materia seca, al menos durante los primeros 180 días después de la siembra. Su crecimiento se vió afectado por la presencia de nemátodos y también por la alta retención de humedad en el suelo Los Guineos.

### 6.3.5 Fijación de nitrógeno (Actividad de la nitrogenasa)

Los resultados indican que entre las especies del género *Inga*, la especie *I. vera* fue la que presentó mayor actividad total y específica de la nitrogenasa, incluso superó a otras especies como *Andira inermis*, especies analizadas después de 300 días de la siembra o transplantadas como en el caso de *P. officinalis*. *Inga vera* es una planta perfectamente adaptada a los suelos de la zona cafetalera y es ampliamente usada como sombra de café. Esta adaptabilidad puede ser una razón por la que presenta mayor actividad de la nitrogenasa entre las *Inga* (9.48 micromoles de  $C_2H_4$ /planta/hora) y mayor porcentaje de nitrógeno en su tejido (2.12%).

Las *Inga* son árboles y arbustos cuyas características de crecimiento incluyen tolerancia a suelos ácidos y son especies ampliamente recomendadas en ecosistemas agroforestales (cultivo intercalado) en países tropicales (Carter et al., 1993). La tolerancia de las especies *Inga* a la acidez es una característica valiosa en el agro ecosistema de café de Puerto Rico. Sin embargo en las otras especies no se evidenció la tolerancia a la acidez, ya que solo *Inga vera* e *Inga fagifolia*

presentaron valores mayores a *Eritrina variegata*, *Flemingia macrophylla*, *Andira inermis*, y *Clitoria fairchildiana*.

## 6.4 Experimento en invernadero de especies con semillas ortodoxas

### 6.4.1 Altura de las plantas

El crecimiento de las diferentes especies en los dos suelos fue heterogéneo. *E. cyclocarpum* fue en promedio la especie de mayor crecimiento al cabo de 180 días después de la siembra y presentó un promedio similar en el suelo Humatas y en el suelo Los Guineos. *O. krugii* fue la especie que presentó menor crecimiento de todas las especies usadas. Pero presentó mejor crecimiento en el suelo Los Guineos que en Humatas. Una observación al respecto es que las semillas de *O. krugii* se recolectaron de árboles presentes en zonas aledañas a quebradas, en suelos arcillosos y con alto contenido de humedad. Durante el experimento se observó mayor retención de humedad en Los Guineos y esto pudo favorecer un mejor crecimiento de *O. krugii* en este suelo. Según Crow y colaboradores (1979) *O. krugii* es un árbol que crece más que nada en suelos arcillosos ácidos y aunque la especie crece en todas las posiciones topográficas es más común en pendientes y cimas.

El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre suelos (efecto de suelo). Fueron 16 especies que crecieron mejor en el suelo Los Guineos y 12 las especies que crecieron mejor en el Suelo Humatas, esto puede deberse a que la capacidad e intercambio catiónico es mayor en Los Guineos y por tanto una mayor disponibilidad de los nutrientes.

En general el comportamiento de las especies en la variable altura de planta dependió del tipo de suelo. Las especies con mejor crecimiento después de *E. cyclocarpum* fueron: *E. variegata*, *C. farchildiana* y *A. procera*. Estas manifestaron diferencias en altura de acuerdo al tipo de suelo.

### 6.4.2 Peso seco de plantas

Las especies de árboles que mayor cantidad de materia seca produjeron después de 180 días fue de 22.08 g/planta en *E. variegata*, 16.01 g/planta en *E. cyclocarpum* y 14.89 g/planta en *C. farchildiana*. El nivel de producción de materia seca de las tres especies anteriores al cabo de 90 días no es muy alto, por ejemplo es superado por *Pachecoa venezuelensis* que después de 120



días de sembrada pesó 16.32 g/planta en suelos ácidos pero la cual tuvo inoculación de *Rhizobium* y fertilización completa incluyendo nitrógeno (Marcano et al., 2001). La producción de materia seca está relacionada con la nutrición de la planta y como se discute en el numeral 6.2 los suelos utilizados son ácidos y con baja fertilidad. Es importante encalar el suelo para corregir esta limitante y promover así también el óptimo desarrollo de la nodulación y la fijación biológica de nitrógeno (Umali-Garcia et al., 1988).

### 6.4.3 Nodulación

Las únicas especies de árboles que no nodularon en ninguno de los suelos (Humatas y Los Guineos) fueron *A. pavonina* y *P. pedunculata*. Los resultados negativos obtenidos en este estudio con *A. pavonina* coinciden con los obtenidos por Ng (2005), que estudió la habilidad de ocho especies de árboles leguminosa para formar nódulos en las raíces y fijar nitrógeno en Hong Kong. Otro estudio hecho por Mahmood e Iqbal (1994) en 16 *Mimosoideas* mostró que *A. pavonina* fue la única especie no nodulada. Al parecer *A. pavonina* es una especie que no nódula fácil, ya que solo hay un reporte de nodulación de Lim y Ng del 1977 (Sprent, 2001). Los reportes que hay de *Parkia pedunculata* (Willd.) también son negativos según Norris (1969) y publicado junto con otras especies de este género que tampoco son noduladas (Sprent 2001).

En nuestro estudio el comportamiento entre *E. cyclocarpum* (13.27 nódulos) y *L. dominguensis* (16.77 nódulos) fue similar ya que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, mientras que Prateze y Cordeiro (2005), obtuvieron mejor nodulación en el género *Enterolobium* con la especie *E. contortisiliquum* (130 nódulos) que en *Lonchocarpus muehlbergianus* (24 nódulos) lo que indica que aun siendo árboles del mismo género en estudios diferentes, hay otros factores que afectan la nodulación. La nodulación puede cambiar según la especie, y ser afectada por la presencia en el suelo de cepas de *Rhizobium* compatibles con la especie de árbol que se esta utilizando (Sprent 2001).

Estudios hechos por Prateze y Cordeiro (2005), reportaron una media baja en nodulación de *Lonchocarpus muehlbergianus* (24 nódulos) e *Inga laurina* (4 nódulos) en el mismo tratamiento con fósforo y sin inoculación de *Rhizobium* después de 120 días de sembrados. Las medias

reportadas por Prateze y Cordeiro en *Enterolobium contortisiliquum*, son similares a las observadas en este estudio en *Clitoria farchildiana* (128.56 nódulos después de 180 días de sembrada) sin inoculación y con suplementación de fósforo y otros micro nutrientes. Se puede apreciar que los árboles de *L. dominguensis* sembrados en el suelo Humatas nodularon mejor que los sembrados en Los Guineos, y las medias superaron las de *E. cyclocarpum* (Cuadro 23), esta es una prueba que en este caso el suelo fue un factor que estimuló una mejor nodulación en *L. dominguensis*.

Se pudo observar que en las 25 especies con semillas ortodoxas la nodulación es muy variable y depende en la mayoría de los casos a que en el suelo estén presentes las cepas de *Rhizobium* específicas para cada especie de árbol. En este estudio se observó que en el suelo Humatas ( $1.16 \times 10^3$  células por 100 gramos<sup>-1</sup> de suelo seco) hubo mejor nodulación que en el suelo Los Guineos ( $6.2 \times 10^2$  células por 100 gramos<sup>-1</sup> de suelo seco), por tanto parece ser un suelo favorable para la formación de nódulos en los árboles estudiados. Esto puede deberse a que en el suelo Humatas hubo un número mayor de bacterias de *Rhizobium* que en el suelo Los Guineos, aumentando por tanto la probabilidad de éxito en la infección de las raíces. La habilidad de nodulación de los árboles leguminosa es heterogénea y diferente en cada suelo, este fenómeno está documentado por Wolde-Meskel y colaboradores (2004).

#### **6.4.4 Peso de nódulos**

El promedio del peso seco de los nódulos en *Gliricidia sepium* fue de 121.07 mg, después de 6 meses. Estos resultados son similares a los obtenidos por González y colaboradores (2001), que reportaron la biomasa nodular de 110.04 mg en árboles sin inocular, sin aplicación de nitrógeno, en un suelo Ultisol después de 4 meses. *G. sepium*, no fue la especie que presentó mayor peso seco de nódulos, esta fue superada ampliamente por *S. saman* (549.28 mg) y *E. variegata* (423.85 mg). Anim-Kwapong y Osei-Bonsu (2005) reportan peso seco de nódulos de 13.4 mg/planta en *Flemingia macrophylla* después de 130 días de plantada para sombra de cacao. Este dato es similar al obtenido en nuestro estudio donde *F. macrophylla* presentó 11.70 mg/planta después de 180 días de sembrada, sin embargo *S. saman* (45.77 mg/planta) y *E. variegata* (35 mg/planta) superaron a todas las demás especies dentro del diseño experimental.

En el análisis estadístico no se incluyeron las siguientes especies: *A. auriculiformis*, *A. peregrina*, *A. pavonina*, *C. surinamensis*, *C. houstoniana*, *P. pedunculata* y *O. krugii* para cumplir con los supuestos de normalidad de los datos y homogeneidad de varianzas. La especie *C. houstoniana* no se incluyó en el análisis porque solo noduló en el suelo Humatas después de 180 días de sembrada. Estos nódulos eran grandes en forma de coral y llegaron a medir 6 mm de diámetro (Cuadro 23). El comportamiento de *C. houstoniana* en Los Guineos fue contrario al del suelo Humatas donde presentó nódulos después de 90 días, pero en las repeticiones de 180 días no se encontraron nódulos.

El coeficiente de correlación entre el peso seco de los nódulos y el peso seco del vástago de los árboles sirve como indicador de la efectividad de la simbiosis reflejado en el aumento de materia seca (Somasegaran, 1994). Se encontró correlación positiva en *F. macrophylla* (0.92), *Samanea saman* (0.93), *C. farchildiana* (0.86), *P. carbonarium* (0.84) y *L. leucocephala* (0.82). En estas especies cuando aumentó el peso seco de los nódulos también aumento la materia seca del vástago.

En las especies *F. macrophylla* (0.97), *C. farchildiana* (0.85) y *P. carbonarium* (0.88) además se encontró relación positiva entre el número de nódulos y el peso seco de nódulos.

#### **6.4.5 Fijación de nitrógeno (Actividad de la nitrogenasa)**

Los árboles que mayor actividad total presentaron fueron los de *C. farchildiana* (3.23  $\mu$ moles  $C_2H_4$ /planta/h) y *Flemingia macrophylla* (3.97  $\mu$ moles  $C_2H_4$ /planta/h) y con diferencias significativas sobre las demás especies incluidas en este estudio, esto se debe posiblemente a que fueron las especies con mayor número de nódulos. Estudios de fijación de nitrógeno en árboles, hechos en *Gliricidia sepium* por Melchor-Marroquín y colaboradores (1999), muestran actividad de la nitrogenasa con valores de 28.0  $nmC_2H_2$ /planta/h y hasta 176.2  $nmC_2H_2$ /planta/h, dependiendo del tratamiento de poda del árbol.

Sin embargo la actividad específica de la nitrogenasa no fue la mejor en *C. farchildiana* (19.10  $\mu$ moles  $C_2H_2$ /g) y en *F. macrophylla* (18.37  $\mu$ moles  $C_2H_2$ /g), pero si lo fue en: *E. cyclocarpum* (32.81  $\mu mC_2H_2$ /g.nod.M.S/h), *S. saman* (23.49  $\mu mC_2H_2$ /g.nod.M.S/h), *P. carbonarium* (64.10

$\mu\text{m C}_2\text{H}_2/\text{g.nod.M.S/h}$ ), y *P. indicus* ( $84.83 \mu\text{mC}_2\text{H}_2/\text{g.nod.M.S/h}$ ), que son algunas de las especies con menor número de nódulos, esta relación es documentada por Ayala (2005) para el maní (*Arachis hypogaea*). Los niveles de actividad específica de la enzima fueron altos en general y comparados con otros datos obtenidos en *Arachis hypogaea* ( $4.36$  a  $13.84 \mu\text{m C}_2\text{H}_4/\text{g.nod.M.S/h}$ ), por Ayala (2005). Debe tenerse en cuenta que en el estudio de Ayala las plantas fueron inoculadas con cepas puras en tiestos con arena y solución nutritiva en invernadero, confiriendo esto ventaja sobre los árboles de nuestro experimento que no fueron inoculadas y a los cuales se les suministro solución nutritiva sin nitrógeno a partir de los 3 meses cada mes, para evitar efectos negativos en la fijación (FBN) por deficiencia de nutrientes diferente al nitrógeno. Con respecto a *E. berteroana* ( $11.82 \mu\text{mC}_2\text{H}_4/\text{g.nod.M.S/h}$ ), su actividad estuvo por debajo de la actividad reportada por Lindblad y Russo (1986) de  $15.7 \mu\text{m C}_2\text{H}_4/\text{g.nod.M.S/h}$ . *E. poeppigiana* es usada también como sombra en plantaciones de café de Costa Rica.

Hay que destacar que en el presente estudio algunas de las cepas que nodularon a los diferentes árboles pudieron ser poco eficientes o muy poco eficientes, afectando la fijación biológica de nitrógeno (FBN) y por tanto la actividad de la enzima nitrogenasa. Este efecto es posible de eliminar cuando se inoculan cepas seleccionadas, específicas y eficientes para cada especie. En este estudio no se inocularon los árboles porque el objetivo fue el de conocer la nodulación y fijación natural con las cepas nativas o con la población de rhizobios presentes en los suelos de la zona cafetalera de Puerto Rico.

Los árboles con más alto coeficiente de correlación fueron: *C. fairchildiana* (0.94), *L. leucocephala* (0.91) y *F. macrophyla* (0.97), los que coinciden, menos *L. leucocephala*, con los resultados de actividad total de la nitrogenasa, donde estos presentaron la media más alta. La tasa de fijación de nitrógeno medida como la actividad de la nitrogenasa en un momento dado no implica que sea igual durante el ciclo de vida de una planta. No se encontró relación significativa entre la fijación y el número de nódulos ni tampoco con el peso seco de nódulos; este tipo de resultados negativos han sido reportados anteriormente en soya (Gwata et al, 2004).

## 7. CONCLUSIONES

1. Se recomienda la utilización para siembras de café bajo sombra de las especies *E. variegata*, *C. farchildiana*, *F. macrophylla*, *A. procera*, *E. cyclocarpum* y *G. sepium*, que tienen semillas ortodoxas porque presentaron mejor comportamiento en las variables evaluadas.
2. Se recomienda la utilización para siembras de café bajo sombra de las especies las especies *I. spectabilis* e *I. vera*, que tienen semillas recalcitrantes ya que presentaron mejor comportamiento en las variables evaluadas.
3. Se encontraron diferencias en la capacidad de fijar N en las diferentes especies evaluadas. La respuesta de las especies en los caracteres de nodulación; número de nódulos y peso seco de nódulos dependió del tipo de suelo.
4. No se encontró efecto del suelo en las especies con semillas ortodoxas para la variable actividad de la nitrogenasa.
5. En el suelo Los Guineos se observó infección de nemátodos en la especie *Pithecellobium carbonarium*. La presencia de nemátodos afectó la nodulación y crecimiento de todas las repeticiones.
6. No se encontró ninguna relación entre la actividad específica de la enzima nitrogenasa y los caracteres de nodulación: número de nódulos y peso seco de nódulos. Tampoco se encontró relación entre la actividad total de la enzima nitrogenasa y los caracteres de nodulación: número de nódulos y peso seco de nódulos.

## 8. RECOMENDACIONES

- Se recomienda en futuras investigaciones evaluar en un mismo experimento especies con semillas recalcitrantes y especies con semillas ortodoxas, en un mismo diseño experimental.
- Es de gran importancia crear un banco de semillas o carpoteca en Puerto Rico con la información, calidad y disponibilidad de semillas de especies arbóreas (leguminosas y otras) necesaria para suplir las necesidades de estas para investigación, propagación y venta.
- El uso de *Pithecellobium carbonarium* está bajo estudio por la Estación Experimental Agrícola y personal del departamento de Agronomía y Suelos del RUM. Esta especie es muy buena porque da al cafeto una sombra tenue. Pero se recomienda estudiar otras alternativas además de esta especie para mejorar la biodiversidad del agroecosistema de café.
- En futuros experimentos e investigaciones se recomienda aplicar diferentes niveles de fósforo y cal. Igualmente es importante evaluar la respuesta a la inoculación de cepas de rizobios y de micorrizas por parte de los árboles fijadores.
- Es importante en futuros estudios evaluar la fijación biológica de nitrógeno bajo condiciones de campo y con técnicas de  $^{15}\text{N}$ , en las especies usadas en este estudio y otras que se omitieron. Así mismo es recomendable estudiar los factores que limitan la fijación biológica de nitrógeno en los suelos y condiciones de campo.
- En futuros estudios es recomendable usar tiestos de mayor tamaño y sobre todo en estudios de más de 180 días con árboles de crecimiento rápido como: *I. spectabilis*, *E. variegata*, *E. cyclocarpum* y *C. farchildiana*.

## 9. REFERENCIAS

- Acosta-Duran, C. y E. Martínez-Romero. 2002. Diversity of rhizobia from nodulates of the leguminous trees *Gliricidia sepium*, a natural host of *Rhizobium tropici*. Archives of Microbiology. 178:161-164
- Agricultura, Dpto. de, Ingreso Bruto Agrícola de Puerto Rico 2002, Oficina de Estadísticas Agrícolas. 124 pp
- Álamo, C. I. 2002. Empresas Agrícolas de Puerto Rico: Situación y Perspectivas. Café. 113-122
- Álamo, C. I. 2004. Situación y Perspectivas de la Empresa de Café en Puerto Rico, Empresas Agrícolas: Situación y Perspectivas 2002. Departamento de Economía Agrícola y Sociología Rural. Estación Experimental Agrícola. RUM.
- Álamo, C. I., W. González y M. Monroig. 2004. Descripción de los Componentes de la Empresa de Café en Puerto Rico, Empresas Agrícolas: Situación y Perspectivas 2002, Departamento de Economía Agrícola y Sociología Rural, Estación Experimental Agrícola, RUM, UPR.
- Allen, O. N. y E. K. Allen. 1981. The Leguminosae. The University of Wisconsin Press. Madison. 812 pp.
- Almendras, A. S. y P. J. Bottomley. 1987. Influence of lime and phosphate on nodulation of soil-grown *trifolium subterraneum* L. by indigenous *Rhizobium trifolii*. Applied and Environmental Microbiology. 53: 2090-2097
- Altieri, A. A. 1999. The ecological role biodiversity in agroecosystems. Agriculture, Ecosystems and Environment. 74: 19-31
- Andrew, C. S. y A. D. Johnson. 1976. Effect of calcium, pH and nitrogen on the growth and chemical composition of some tropical and temperate pasture legumes. Australian Journal of Agricultural Research. 27: 625-636
- Anim-Kwapong, G. J. y K. Osei-Bonsu. 2005. Nitrogen fixing potencial of *Flemingia macrophylla* when planted as temporary shade for cacao. Tropical Science. 45: 36-40
- Arango, M. 2007. Zonificación agroecológica del café en Puerto Rico y análisis estructural y de composición de especies arbóreas presentes en el agroecosistema cafetero. Tesis M.S. Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, P.R., 126 pp.
- Aranguren, J., G. Escalante y R. Herrera. 1982. Nitrogen cycle of tropical perennial crops under shade trees. Plant and Soil. 67: 247– 258

Arce, G., L. Valdés, R. J. Valdés, Gallegos Del Tejo y O. A. Calderón. 2003. Rompimiento de latencia en semillas de soto I (*Dasyllirion cedrosanum trel*) mediante escarificación física y ácido sulfúrico. <<http://www.uaaan.mx/DirInv/Rdos2003/Zaridas/sotol02.pdf>>

Argel, P. J. y C. E. Lascano. 1998. *Cratylia argentea* (Desvaux) O. Kuntze: Una nueva leguminosa arbustiva para suelos ácidos en zonas subhúmedas tropicales. *Pasturas Tropicales*. 20: 37-43

Ayala, L. B. 2005. Estudios de algunos aspectos de la fijación simbiótica de nitrógeno por el maní (*Arachis hypoagea*). II. Evaluación bioquímica de la fijación y factores relacionados en la asociación maní-*rhizobium* spp. *Agronomía Tropical*. 27: 427-449

Ba, A. M., R. Samba, S. N. Sylla, C. Le Roux, M. Neyra, A. Rousteau, D. Imbert, y A. Toribio. 2004. Characterization of the diversity of symbiotic microorganisms in *Pterocarpus officinalis* in swamp forests of Guadeloupe and Martinique. *Revue d Ecologie-la terre et la vie*. 59: 163-170

Babbar, L. I. y D. R. Zak. 1994. Nitrogen cycling in coffee agroecosystems: Net N mineralization and nitrification in the presence and absence of shade trees. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 48: 107-113

Babbar, L. I. y D. R. Zak. 1995. Nitrogen loss from coffee Agroecosystems in Costa Rica: leaching and denitrification in the presence and absence of shade trees. *Journal Environmental Quality*. 24: 227-233

Bala, A., y K. Giller. 2005. Symbiotic specificity of tropical tree rhizobia for host legume. *New Phytologist*. 149: 495-507

Barberi, A., A. C. Carneiro, F. Moreira y J. Siqueira. 1998. Nodulação em leguminosas florestais em viveiros no sul de Minas Gerais. *Cerne*. 4: 145-153

Becking, J. H. 1951. Forestry technique in the teak forests of Java. En: *Proceedings, United Nations scientific conference on the conservation and utilization of resources, 1949, Lake Success* 5:106-114. NY: United Nations

Beer, J., R. Muschler, D. Kaas, y E. Somarriba. 1998. Shade management in coffee and cacao plantations. *Agroforestry Systems* 38:139-164

Bergersen, F.J. 1980. Measurement of nitrogen fixation by direct means. En *Methods for evaluating biological nitrogen fixation*, Bergersen F.J. (Eds.), John Wiley and Sons Ltd N.Y. 701 pp.

Brelles-Mariño, G. y E. J. Bedmar. 2001. Detection, purification and characterization of quorum-sensing signal molecules in plant-associated bacteria. *Journal of Biotechnology* 91: 197-209



Carter, M. E., R. Gaméz y S. Gliessman. 1993. Sustainable Agriculture and the Environment in the Humid Tropics. National Research Council, Committee on Sustainable Agriculture. National Academy Press, Washington, D.C, 720 pp.

Carvajal, J. F. 1984. Cafeto-cultivo y fertilización. Eds. Instituto de la potasa, Worblaufen-Berna. 254 pp.

Carvajal, F. J. 1959. Mineral nutrition and crop requirements of the coffee crop. Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG)-Servicio Técnico Interamericano de Cooperación Agrícola (STICA), Technical Bulletin No. 9. San José, Costa Rica, 16 pp.

Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). 2003. Manual de árboles de Centro América. OFI/CATIE. Costa Rica, 1012 pp.

Centro Internacional de Información sobre Cultivos de Cobertura (CIDICCO). 1995. The Use of *Gliricidia sepium* as a Cover/Shade Tree in Coffee Plantations CIDICCO. Honduras.

Congreso Agrícola de Puerto Rico. 1973. Industria Cafetalera. Revista del café. 28: 47-58

Crow, T. R. y D. F. Grigal. 1979. A numerical analysis of arborescent communities in the rain forest of the Luquillo Mountains, Puerto Rico. *Vegetatio*. 40: 135-146

Cruz, L. y E. Schröder. 2006. Characterization of soil in the Puerto Rico coffee agrosystem. Caribbean Food Crops Society, San Juan, Puerto Rico, 66 pp

Danso, S. K. A., G. D. Bowen y N. Sanginga. 1992. Biological nitrogen fixation in trees in agroecosystems. *Plant and Soil* 141: 177-196

De Almeida, C., S. Regina y J. Jacob. 1999. Crecimiento e nodulação de *Inga marginata* em desposta à adição de nitrogênio, fósforo e inoculação com rizóbio. *Floresta e Ambiente* 6: 118-126

Dickinson, R. E., y R. J. Cicerone. 1986. Future global warming from atmospheric trace gases. *Nature*. 319: 109-115

Drevon, J. J. 1995. Manual técnico de la fijación biológica del nitrógeno, Leguminosa/*Rhizobium*. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación, Roma. 1-5 pp.

Escalante, E. 1997. Café y Agroforestería en Venezuela. *Agroforestería en las Américas*. 4: 21–24

Estación Experimental Agrícola. 1999. Conjunto tecnológico para la producción de café. Estación Experimental Agrícola, University of Puerto Rico, Publicación 104, 29 pp.

FAO Documentation. 1985. Manual Técnico de la Fijación Simbiótica del Nitrógeno: Leguminosa/*Rhizobium*. ONU para la Agricultura y la Alimentación. Roma, 53 pp.

Faria, S. M. de, Lima, C. de, Carvalho, A. M., Conçalves V. F. y Sprent, J. I. 1994. Occurrence of nodulation in legume species from Bahia, Minas Gerais and Espirito Santo states of Brazil. In: Sprent, J.I. y McKey, D. (eds.) Advances in Legume Systematics, Part 5, The Nitrogen Factor, Royal Botanical Gardens, Kew, 17-24 pp.

Fassbender, H. W. 1993. Modelos edafológicos de Sistemas Agroforestales. Serie de materiales de enseñanza No. 29. Ed. CATIE-GTZ, Costa Rica, 491 pp.

Fassbender, H. W. 1987. Nutrient cycling in agroforestry systems of coffee (*Coffea arabica*) with shade trees in the central experiment of CATIE. En: Beer, J.A., H.W. Fassbender y J. Heuveldop (Eds). Advances in Agroforestry Research. CATIE, Serie Técnica. 117: 155-165

Flores, M. 2004. Uso de leguminosas tropicales en la alimentación animal. Centro Internacional de Información sobre Cultivos de Cobertura (CIDICCO). Honduras. <[http://www.cidicco.hn/leguminosas\\_en\\_la\\_alimentacion\\_animal.htm](http://www.cidicco.hn/leguminosas_en_la_alimentacion_animal.htm)>

Giller, K. E. 2001. Nitrogen Fixation in Tropical Cropping Systems, 2nd ed. Wallingford, UK: CAB International, UK, 405 pp.

Giller, K. E. y K. F. Wilson. 1991. Nitrogen fixation in tropical cropping systems. CAB International, Wallingford, UK, 313 pp.

Gibson A. H. 1971. Factors in the physical and biological environment affecting nodulation and nitrogen fixation in legumes. Plant and Soil (Special Volume) 139–152

Gibson A. H. 1977. The influence of the environment and managerial practices on the legume–*Rhizobium* symbiosis. En: Hardy R. W. F. y A. H. Gibson (Eds). A treatise on dinitrogen fixation, IV. Agronomy and ecology. 393–450. Wiley Interscience, New York.

González, A., M. González, A. Leal, y V. Michelena. 2001. Evaluación de algunos parámetros relacionados con la fijación de N<sub>2</sub> en *Gliricidia sepium* Jacq. Revista UDO Agrícola. 1: 25-28

Green, R. E., S. J. Cornell, J. P. W. Scharlemann, y A. Balmford. 2005. Farming and the fate of wild nature. Science 307: 550–555

Greenberg, R., J. Salgado-Ortiz, I. Warketin, y P. Bichier. 1995. Managed forest patches and the conservation of migratory birds in Chiapas, Mexico. En M. Wilson, S. Sader, y E. Santana (Eds). The conservation of migratory birds in Mexico. School of Natural Resources, Maine Agricultural and Forest Experiment Station, Miscellaneous Publication, 727 pp.

Greenberg, R., P. Bichier y J. Sterling. 1997. Bird populations in rustic and planted shade coffee plantations of eastern Chiapas, Mexico. Biotropica. 29: 501– 515

Gresser, C. y S. Tickell. 2002. Mugged: Poverty in your cup. Washington, DC: Oxfam International, Oxford, UK.

Grossman, J. M. 2003. Exploring farmer knowledge of soil processes in organic coffee systems of Chiapas, México. *Geoderma*. 111: 267-287

Grossman, J. M., C. Sheaffer, D. Wyse, B. Bucciarelli, C. Vance y P. H. Graham. 2005. An assessment of nodulation and nitrogen fixation in inoculated *Inga oerstediana*, a nitrogen-fixing tree shading organically grown coffee in Chiapas, Mexico. *Soil Biology and Biochemistry*. 38: 769-784

Guitte, R. R., V. P. Rai y R. B. Patil. 1978. Chemotaxis of *Rhizobium* towards root exudates of *Cicer arietinum* L. *Plant and Soil*. 50: 553-566

Gwata, E. T., D. S. Wofford, P. L. Pfahler y K. J. Boote. 2004. Genetics of promiscuous nodulation in soybean: Nodule dry weight and leaf color score. *Journal of Heredity*. 95: 154-157

Haines, W. B. 1934. The uses and control of natural undergrowth on rubber estates. *Planting Manual* 6. Kuala Lumpur, Malaya: Rubber Research Institute, 23 pp.

Hardy, R.W.F. y Jr. E. Knight. 1966. Reduction of N<sub>2</sub>O by biological N<sub>2</sub>-fixing systems. *Biochemistry and Biophysics. Res. Commun.* 23: 409-414.

Hardy, R. W. F., R. D. Holsten, E. K. Jackson y R.C. Burns. 1968. The C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> assay for N<sub>2</sub> fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiology*. 43: 1185-1207

Hardy, R. W. F., R. D. Holsten y R. C. Burns. 1973. Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil Biology and Biochemistry*. 5: 47-81

Haukka, K., K. Lindstrom y P. Young. 1998. Three phylogenetic groups of *nodA* and *nifH* genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* isolates from leguminous trees growing in Africa and Latin America. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 419-426

Kathirgamathaiyah, S., P. J. Wickramasinghe y A. M. D. Abeykoon. 1993. Effect of shading by *Acacia mangium*, *Calliandra calothyrsus*, *Erythrina subumbrans* and *Gliricidia sepium* on canopy development and fruiting of two coffee cultivars. En: Westley, S.B., H. H. Powell (Eds.), pp. 125-128. *Erythrina in the New and Old Worlds*. Nitrogen Fixing Tree Association, Paia, Hawaii, 357 pp.

Lacis, A., J. Hasen, P. Lee, T. Mitchell y S. Lebedeff. 1981. Greenhouse effect of trace gases 1970-1980. *Geophysical Research Letter*. 8: 1035-1038

Leblanc, H. A., R. L. McGraw, P. Nygren y C. Le Roux. 2005. Neotropical legume tree *Inga edulis* for N<sub>2</sub>-fixing symbiosis with fast-growing *Bradyrhizobium* strains. *Plant and Soil*. 275: 123-133

- Ledgard, S. F. y K. E. Giller. 1995. Atmospheric N<sub>2</sub> fixation as an alternative N source. En: Bacon, P.E. (ed.), pp. 443-486. Nitrogen Fertilization in the Environmental. Marcel Dekker, New York, 624 pp.
- Linblad, P. y R. Russo. 1986. C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-reduction by *Erythrina poeppigianna* in a Costa Rican coffee plantation. Agroforestry Systems. 4: 33– 37
- Lippi, D., M. De Paolis, E. Di Mattia, T. Pietrosanti y I. Cacciari. 2000. Effect of salinity on growth and starvation-survival of a tropical *Rhizobium* strain. Biology and Fertility of Soils. 30: 276-283
- Macias, M. y A. García. 2004. Nota sobre la composición química de follaje de árboles de montañas del oeste de Cuba. Revista computarizada de producción porcina. Instituto de investigaciones porcinas. Cuba. 11: 1-5
- Mahmood, A. y P. Iqbal. 1994. Nodulation status of leguminous plant in Sindh. Department of Botany, University of Karachi, Karachi-75270, Pakistan. Pakistan Journal of Botany. 26:1 7-20
- Marcano, L., M. González, A. Leal y V. Michelena. 2001. Fijación biológica de N<sub>2</sub> por *Pachecoa venezuelensis* en dos suelos de sabana del Oriente Venezolano. Revista Universidad de Oriente (UDO) Agrícola. 1: 64-69
- Melchor-Marroquín, J. I., J. J. Vargas-Hernández, J. D. Ferrera-Cerrato, J. D. Etchevers-Barra y A. Velásquez-Martínez. 1999. Actividad de la nitrogenasa en *Gliricidia sepium* en diferentes regimenes de poda. TERRA. 17: 299-308
- Miranda-Castro L. 2005. Café y cultura en Puerto Rico. Comunicación Personal
- Miranda-Castro L. y S. Padrón. 2005. From the mountain to the sea: Restoring shade coffee plantations to protect tropical coastal ecosystem. Comunicación Personal
- Moawad, H. y B. Bohlool. 1984. Competition among *Rhizobium* spp. for nodulation of *Leucaena leucocephala* in two tropical soils. Applied and Environmental Microbiology. 48: 5-9
- Moguel, P. y V. M. Toledo. 1999. Biodiversity conservation in traditional coffee systems of Mexico. Conservation Biology. 13: 11–21
- Moreira, F. M. S. 1997. Nodulação e crescimento de 49 leguminosas arboreas nativas da Amazônia em viveiro. Revista Brasileira de Ciência do Solo. 21: 581-590
- Molina, S. y A. Salvador. 1997. Species Codes for the Trees of Puerto Rico and the U.S. Virgin Islands. Forest Service. General Technical Report SO-122. Asheville, NC.
- Monroig-Inglés, M. F. 2001. Manual para una caficultura sostenible en Puerto Rico. UPR, RUM, Servicio de Extensión Agrícola, SARE, 55 pp.

Monroig Ingles, M. F. 1999. Practicas de manejo en el cafetal. El Servicio de Extensión Agrícola. Colegio de Ciencias Agrícolas, Recinto de Mayagüez, U.P.R.

Mondoñedo, J. R., 1957. Breve historia del café en el mundo. Revista de Agricultura de Puerto Rico. 54: 3-7

Mulawarman, R. J., S. Sasongko, y D. Irianttono. 2003. Tree seed management, International Centre for Research in Agroforestry. Regional Research Programme, Winrock International, 46 pp.

Muñiz, O., M. Monroig. 1992. Suelos de la región cafetalera de Puerto Rico. Características y Manejo. Servicio de Extensión Agrícola. Universidad de Puerto Rico. Recinto de Mayagüez, Colegio de Ciencias Agrícolas.

Muñoz, G. 1997. Importancia de la sombra en el cafetal. Agroforestería en las Américas. 4: 25–27

Muschler, R. 2000. Árboles en cafetales. Colección de enseñanza agroforestal modulo 5. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza CATIE. Costa Rica.

Mzoma, N. 1989. Nursery and field performance of inoculated and uninoculated *Gliricidia sepium* in Malawi. Nitrogen Fixing Tree Research Reports. 7: 101-102

Nair, P. K. R. 1982. Soil Productivity Aspects of Agroforestry. Nairobi, Kenya: ICRAF.

Ng, A. Y. S. 2005. A survey on some native tree legumes for their ability to form root nodules and fix nitrogen in Hong Kong. Porcupine! 32: web: <<http://www.hku.hk/ecology/porcupine/por32/32-flora-legume.htm>>

Nick, G., P. de Lajudie, B. D. Eardly, S. Suomalainen, L. Paulin, X.-P. Zhang, M. Gillis, and K. Lindström. 1999. *Sinorhizobium arboris* sp. nov. and *Sinorhizobium kostiense* sp. nov., isolated from leguminous trees in Sudan and Kenya. International Journal of Systematic Bacteriology 49:1359-1368.

Nir, M. A. 1988. The survivors: orquids on a Puerto Rican coffee finca. American Orquid Society Bulletin. 57: 989-995

Olivares, J. 2006. Fijación Biológica de Nitrógeno. Estación Experimental del Zaidín. Web <<http://www.eez.csic.es/~olivares/ciencia/fijacion/>>

Patreze, C., M. y L. Cordeiro. 2005. Nodulation, arbuscular mycorrhizal colonization and growth of some legumes native from Brazil. Acta Botanica Brasilica. 19: 527-537

Paul, E. A. y F. E. Clark. 1996. Soil microbiology and biochemistry. 2da ed. Academic Press, California, USA, 340 pp.

Peeters, L. Y., K. Soto-Pinto, L. Perales, H. Montoya, y M. Ishiki. 2003. Coffee production, timber, and firewood in traditional and Inga-shaded plantations in Southern México. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 95: 481-493

Pennington, T. D. 1997. The genus *Inga* Botany. The Royal Botanical Gardens, Kew, Ruth Linklater, (Eds.), Forestry Research Programme, Kew, 844 pp.

Pérez, G. M. 1957. *Revista de Agricultura de Puerto Rico*. 54: 1-2.

Pérez, S. y A. Torralba. 1997. La fijación del Nitrógeno por los seres vivos. Seminario Fisiología Vegetal, 21.01. Facultad Biología Oviedo. p 21. <<http://scriptusnaturae.8m.com/Articulos/FijN/simbiosis.html#p1>>

Perfecto, I. y J. Vandermeer. 1994. Understanding biodiversity loss in agroecosystems: reduction of ant diversity resulting from transformation of the coffee ecosystem in Costa Rica. *Entomology* 2: 7-13

Perfecto, I. y R. Snelling. 1995. Biodiversity and the transformation of a tropical agroecosystem: Ants in coffee plantations. *Ecological Applications*. 5: 1084-1097

Perfecto, I., A. R. Rice, R. Greenberg y M. Van der Voort. 1996. Shade Coffee: A disappearing Refuge for Biodiversity. *Bioscience*. 46: 598-608

Petit, L., D. Petit, D. Chrstian y H. Powell. 1999. Bird communities of natural and modified habitats in Panama. *Ecography*. 22: 292-304

Philpott, S. M., I. Perfecto and J. Vandermeer. 2006. Effects of management system and season on arboreal ant diversity and abundance in coffee agroecosystems. *Biodiversity and Conservation* 15: 139-155

Pomara, L., R. Cooper y L. Petit. 2003. Mixed-species flocking and foraging behavior of four neotropical warblers in Panamanian shade coffee fields and forests. *The Auk*. 120: 1000-1012

Ranasinghe, H. 1995. Traditional tree-crop practices in Sri Lanka. *Indigenous Knowledge and Development Monitor*. 3: 7- 9

Rappole, J., I. D. King y R. J. Vega. 2003. Coffee and Conservation. *Conservation Biology*. 17:1

Richardson, J. S., M. F. Hynes y I. J. Oresnik. 2004. A genetic locus necessary for rhamnose uptake and catabolism in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Journal of Bacteriology* 186: 8433-8442

Rivera-Bermúdez, R. 1975. Siete caficultores Coameños fueron los pioneros de la industria cafetalera de Puerto Rico. *Revista del Café*. 31: 27-28

Roberts, D., C. Robert y L. Petit. 2000. Use of premontane moist forest and shade coffee agroecosystems by army ants in western Panama. *Conservation Biology*. 14: 192-199

Rodríguez, V., S. L. Cortés y S. L. Ortiz. 1991. Coffee seedlings growing under *Gliricidia sepium* and *Leucaena leucocephala*: dry and fresh weights of seedlings organs. *Cultivos Tropicales*. 12: 35–41

Rojas, B. M. y Z. Pérez. 2001. Consideraciones sobre el uso del nitrógeno. Boletín técnico, Instituto del café. Costa Rica. Oficina regional Pérez Zeledón, Icafe. Año 1 (4): 2-3.

Román., F. 1957. El Mercado de Café en Puerto Rico. *Revista de agricultura de Puerto Rico*. 54: 152-153

Roskoski, J. 1980. Importancia de la fijación de nitrógeno en la economía del cafetal. En: Jiménez-Ávila, E. y A. Gómez-Pompa, (Eds.). *Estudios Ecológicos en el Ecosistema Cafetalero*, Xalapa, México, 143 pp.

Roskoski, J. 1981. Nodulation and N<sub>2</sub>-fixation by *Inga jinicuil*, a woody legume in coffee plantations. I. Measurements of nodule biomass and field C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> reduction rates. *Plant and Soil*. 59: 201-206

Roskoski, J. P. 1982. Nitrogen fixation in Mexican coffee plantation. *Plant and Soil*. 67: 283-291

Rovira, A. D. 1991. Rhizosphere research-85 years of progress and frustration. En: Keister, D.L. y P. B. Creagan. (Eds.), pp 3-13. *The rhizosphere and plant growth*. Kluwer Academic Publishers, 386 pp.

Schröder, E. C. 1985. Rediscovery of nodulation in *Ormosia* and *Neorudolphia*. *Journal of the Agricultural University of Puerto Rico* 69: 229

Schröder, E. 2002. Notas de clase Fijación Biológica de Nitrógeno. Universidad de Puerto Rico Recinto de Mayagüez. Comunicación Personal

Steingrover, E., P. Catering y J. Siesling. 1986. Daily changes in nitrate uptake, reduction and storage of nitrates in spinach, grown at low light intensity. *Plant Physiology*. 66: 550-556

Smit, G., A. A. VanderBaan, J. M. Kijne y B. J. Lugtenberg. 1986. The attachment mechanisms of *Rhizobium*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 52: 362-363

Somasegaran, P. y H. J. Hoben. 1994. *Handbook for Rhizobia*. Springer-Verlag, New York, 450 pp.

Sommer, K. 1978. Use of radioisotopes in agriculture. Rep. to the Government of Costa Rica. Rep. 1360. Int. Atomic Energy Agency, Vienna, Austria.

Sprent, J. I. 2001. *Nodulation in Legumes*. Royal Botanical Gardens, Kew, 146 pp.

Steiman y Shawn. 2003. Shade vs. Sun Coffee: A Review. <<http://www.grayskies.net/honeybear/shade.htm>>

Steingrover, E. P. Ratering y J. Siesling. 1986. Daily changes in uptake, reduction and storage of nitrate in spinach grown at low light intensity. *Physiologia Plantarum*. 66: 550-556

Suárez-Vásquez, S. 1975. Estudio de adaptación y fijación simbiótica de nitrógeno de algunas leguminosas tropicales. *Revista de Cenicafé*, Colombia, 36 pp.

Swift, M. J. J., P. S. Vandermeer, J. M. Ramakrishnan, C. K. Anderson, Ong, y B. A. Hawkins. 1996. Biodiversity and agroecosystem function. pp. 261–298. En: Mooney, H. A., J. Cushman, E. Medina, O. Sala y E. Schulze (Eds). *Functional Roles of Biodiversity: A Global Perspective*. John Wiley and Sons, New York, 518 pp

Thies, J. E., P. W. Singleton y B. B. Bohlool. 1991. Influence of the Size of Indigenous Rhizobial Populations on Establishment and Symbiotic Performance of Introduced Rhizobia on Field-Grown Legumes. *Applied and Environmental Microbiology*. 57: 19-28

Turner, G. L. y A. H. Gibson. 1980. Measurement of nitrogen fixation by indirect means. En: Bergensen, F. J. (Eds). *Methods of Evaluating Biological Nitrogen Fixation*. John Wiley & Sons, New York, 702 pp.

United Nations Environment Program World Conservation Monitoring Centre. 2004. *World Database on Protected Areas*. CD-ROM. Cambridge, UK. <<http://sea.unep-wcmc.org/wdbpa/download/wdpa2004/index.html> >

Uriarte, M., R. Condit, C. Canham, S. Hubbell. 2004. A spatially explicit model of sapling growth in a tropical forest: does the identity of neighbours matter? *Journal of Ecology* 92: 348-360

Umali-García, M. J., S. Libuit, y R. L. Baggayan. 1988. Effects of *Rhizobium* inoculation on growth and nodulation of *Albizia falcataria* (L.) Fosh. And *Acacia mangium* Willd. in the nursery. *Plant and Soil*. 108: 71-78

U.S.Bureau. 2000. U.S.Bureau of the Census for the United States ESRI, <[http://www.esri.com/data/download/census2000\\_tigerline/index.html](http://www.esri.com/data/download/census2000_tigerline/index.html)>

USDA. 2000. Francis, J. K. y C. A. Lowe. Bioecología de árboles nativos y exóticos de Puerto Rico y las indias occidentales. Servicio Forestal, Instituto Internacional de Dasonomía Tropical, Río Piedras, Puerto Rico. Reporte Técnico general IITF-15. Río Piedras, Puerto Rico: International Institute of Tropical Forestry, 582 pp.

USDA-NRCS. 2001. National Resources Inventory. Retrieved January 2001 from the World Wide Web <<http://www.nhq.nrcs.usda.gov/NRI>>



- USDA-NSSC. 2007. Natural Resources Conservation Service. Soil Survey Laboratory. <<http://ssldata.nrcs.usda.gov/querypage.asp?chksa=1&ac=244&as=3994#sitevar>>
- Van Kessel, C. y J. P. Roskoski. 1983. Nodulation and N<sub>2</sub> fixation by *Inga jinicuil*, a woody legume in coffee plantation. III. Effect of fertilizers and soil shading on nodulation and nitrogen fixation (acetylene reduction) of *I. jinicuil* seedlings. *Plant and Soil* 72:95-105
- Valles de la Mora, B., G. Cadisch, y Aluja-Schunemann. 2003. Comparación de metodologías de isótopos para evaluar fijación de N atmosférico y su destino en suelos y plantas. *Agrociencia*. 37: 117-128
- Vicente-Chandler, J., F. R. Abruña, Bosque-Lugo y S. Silva. 1968. Intensive coffee culture in Puerto Rico. Agricultural Experiment Station, University of Puerto Rico, Boletín 211.
- Vicente-Chandler, J. F., R. Abruña, Bosque-Lugo y S. Silva. 1969. El cultivo intensivo de café en Puerto Rico. Estación Experimental Agrícola, Universidad de Puerto Rico. Boletín 218:5-20.
- Vincent, J. M. 1970. A manual for practical study of the root nodule bacterial. IBP Handbook No. 15, Longman Publishers, 164 pp.
- Wadsworth, F. H. 2000. Producción forestal para América tropical. USDA. Servicio Forestal. Manual de Agricultura 710-S. CATIE. IUFRO-SPDC Texbook Project No. 3: 276-277.
- Wang, T. y J. Martinez-Romero. Taxonomía de *Rhizobium*. <[http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO\\_12/Capitulo12.pdf](http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_12/Capitulo12.pdf)>
- Watson, G. A. 1973. Soil and plant nutrient studies in rubber cultivation. Rep. FAO/IUFRO/F73/24. Rome, Italy: Food and Agriculture organization of the United Nations. 18
- Wolde-meskel, E., T. Berg, K. N. Peters y A. Frostegard. 2004. Nodulation status of native woody legumes and phenotypic characteristics of associated rhizobia in soils of southern Ethiopia. *Biology and fertility of soils*. 40: 55-66
- Wolde-meskel, E., Z. Terefework, A. Frostegard y K. Lindström. 2005. Genetic diversity and phylogeny of rhizobia isolated from agroforestry legume species in southern Ethiopia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55: 1439-1452
- Wood, G. A. R. y R. A. Lass. 1985. Cocoa. 4ta. Ed. Burnt Mill, Harlow, Essex, UK. Longman Group Ltd. London. 620 pp
- Woomer, P., P. Singleton y B. Bohlool. 1988. Ecological indicators of native Rhizobia in tropical soils. *Applied and Environmental Microbiology*. 54: 1112-1116
- Wrigley, G. 1988. Coffee. Longman. New York, USA. 639 pp.

Zurdo-Piñero, J. L., E. Velásquez, M. J. Lorite, G. Brelles-Mariño, C. E. Schröder, E. Bedmar, P. Mateos y E. Martínez-Molina. 2004. Identification of fast-growing rhizobia nodulating tropical legumes from Puerto Rico as *Rhizobium gallicum* and *Rhizobium tropici*. *Systematic and Applied Microbiology*. 27: 469-477

## **10. APÉNDICES**

**Apéndice 1. Tabla de nombres científicos y comunes familia *Mimosoideae***

<b>Nombre científico</b>	<b>Nombre común</b>
<b>Mimosoideae:</b>	
<i>Acacia angustissima</i> . ( M.) K.	Barba de ángel (HO), Barba de ingles (HO), Guaje (GU)
<i>Acacia auriculiformis</i> (A.) C.	Casia
<i>Albizia lebbbeck</i> (L.) B.	Acacia amarilla, lengua de mujer
<i>Albizia procera</i> (R.) B.	Albicia,
<i>Adenantha pavonina</i> L.	Coralitos, Mato colorado, Palo de mato, Peronías chatas.
<i>Anadenanthera peregrina</i> (L.) S.	Cojoba, Cojobilla
<i>Calliandra houstoniana</i> (M.) S.	Cabeza de ángel
<i>Calliandra surinamensis</i> B.	Caliandra de surinam
<i>Cojoba arborea</i> (L.) B.	Acacia silvestre, Cojoba, Cojóbana, Cojóbana negra, Tamarindillo
<i>Enterolobium cyclocarpum</i> (J.)G.	Dormilón, Guanacaste, Oreja de mono
<i>Inga spectabilis</i>	Guaba machete
<i>Inga fagifolia</i> (L.) H.	Guamá,
<i>Inga fastuosa</i> (J.) W.	Guaba peluda, Guaba venezolana
<i>Inga ingoides</i> (R.) W.	Guamo blanco,
<i>Inga quaternata</i> W.	Guamá venezolano
<i>Inga vera</i> W.	Guaba
<i>Leucaena diversifolia</i> S.	Guaje, Guajillo (MEX)
<i>Leucaena leucocephala</i> (L.) W.	Acacia, Acacia palida, Campeche, Hediondilla, Tantan, Zarcilla
<i>Lysiloma latisiliqua</i> (L.) B.	
<i>Parkia pedunculata</i> R.	
<i>Pithecellobium carbonarium</i> . N.	Carbonero
<i>Samanea saman</i> J.	Dormilón, Guango, Samán
<i>Zapoteca portoricensis</i> J.	Cojobillo, Moriviví cimarron, Zarza boba

**Fuente:**

Little, Jr., L. E., Wadsworth, F. H., Marrero, J. 1977. Árboles comunes de Puerto Rico y las Islas Virgenes. Universidad de Puerto Rico, Colegio de Agricultura y artes mecánicas, Servicio de extensión agrícola. Ed. Universitaria, Universidad de Puerto Rico, 731 pp.

Little, Jr., L. E., Woodbury, R.O., Wadsworth, F. H. 1974. Trees of Puerto Rico and the Virgin Islands. Second volume, Agriculture Handbook No. 449. U.S Department of agriculture, Washington, D.C 20250. Forest Service, 1024 pp.

Liogier, H.A., Martrell, L.F. 2000. Flora of Puerto Rico and adjacent islands: a systematic synopsis. Second edition revised. Ed. Universidad de Puerto Rico. San Juan P.R, 481 pp.

**Apéndice 2. Tabla de nombres científicos y comunes familia *Papilionoideae***

<b>Nombre científico</b>	<b>Nombre común</b>
<b>Papilionoideae:</b>	
<i>Andira inermis</i> W.	Moca
<i>Clitoria fairchildiana</i> (R.) H.	Nueva para Puerto Rico
<i>Dalbergia sissoo</i> R.	Sisó
<i>Erythrina berteroana</i> U.	Bucayo enano, Bucayo sin espinas
<i>Erythrina eggersii</i> (K.) M.	Bucayo, búcar, Bucare, Coral, Espuela de gallo, Piñon espinoso
<i>Erythrina peoppigiana</i> W.	Brucayo, Búcar, Bucare, Bucayo, Bucayo gigante, Palo de boya
<i>Erythrina variegata</i> L.	Bucayo haitiano, Pompón haitiano
<i>Flemingia macrophylla</i> (W.) M.	Nueva para Puerto Rico
<i>Gliricidia sepium</i> J.	Madre de cacao, Mata ratón
<i>Lonchocarpus domingensis</i> T.	Genogeno
<i>Lonchocarpus glaucifolius</i> T.	Geno
<i>Ormosia krugii</i> U.	Palo de matos, Palo de peronías, Peronias
<i>Pongamia pinnata</i>	No tiene
<i>Pterocarpus indicus</i> W.	Terocarpo
<i>Pterocarpus macrocarpus</i> K.	No tiene
<i>Pterocarpus officinalis</i> J.	Palo de pollo
<i>Sesbania grandiflora</i> L.	Báculo, Cresta de gallo, Gallito

**Fuente:**

Little, Jr., L. E., Wadsworth, F. H., Marrero, J. 1977. Árboles comunes de Puerto Rico y las Islas Virgenes. Universidad de Puerto Rico, Colegio de Agricultura y artes mecánicas, Servicio de extensión agrícola. Ed. Universitaria, Universidad de Puerto Rico, 731 pp.

Little, Jr., L. E., Woodbury, R.O., Wadsworth, F. H. 1974. Trees of Puerto Rico and the Virgin Islands. Second volume, Agriculture Handbook No. 449. U.S Department of agriculture, Washington, D.C 20250. Forest Service, 1024 pp.

Liogier, H.A., Martrell, L.F. 2000. Flora of Puerto Rico and adjacent islands: a systematic synopsis. Second edition revised. Ed. Universidad de Puerto Rico. San Juan P.R, 481 pp.

**Apéndice 3. Análisis de varianza para la variable: altura de plantas de especies con semillas ortodoxas.**

**Cuadro analisis de la varianza (SC tipo I)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1072.69	87	12.33	10.63	<0.0001
Suelo	5.36	1	5.36	4.62	0.0330
Especie	445.51	21	21.21	18.29	<0.0001
Muestreo	398.72	1	398.72	343.66	<0.0001
Suelo*Especie	81.35	21	3.87	3.34	<0.0001
Suelo*Muestreo	0.01	1	1.00E-02	0.01	0.9122
Especie*Muestreo	88.17	21	4.2	3.62	<0.0001
Suelo*Especie*Muestreo	53.57	21	2.55	2.2	0.0030
Error	204.2	176	1.16		
Total	1276.89	263			

Los datos se transformaron a Raíz Cuadrada.

**Apéndice 4. Separación de medias para efecto principal de especie (altura de plantas).**

<b>Especies</b>	<b>Medias</b>	<b>n</b>	
<i>E. cyclocarpum</i>	9.26	12	a
<i>E. variegata</i>	8.89	12	a b
<i>C. farchildiana</i>	8.46	12	a b c
<i>A. procera</i>	7.39	12	b c d
<i>F. macrophylla</i>	6.89	6	c d e
<i>A. angustissima</i>	6.79	12	d e f
<i>L. leucocephala</i>	6.77	12	d e f
<i>A. peregrina</i>	6.37	12	d e f
<i>S. saman</i>	6.39	12	d e f g
<i>A. lebbeck</i>	6.38	12	d e f g
<i>E. berteriana</i>	6.36	12	d e f g
<i>L. diversifolia</i>	6.26	12	d e f g
<i>C. houstoniana</i>	6.1	12	d e f g h
<i>L. domingensis</i>	5.87	12	d e f g h
<i>C. surinamensis</i>	5.72	12	e f g h
<i>G. sepium</i>	5.59	12	e f g h i
<i>S. grandiflora</i>	5.34	12	e f g h i
<i>P. pedunculata</i>	5.31	12	e f g h i
<i>P. indicus</i>	5.19	12	f g h i
<i>A. pavonina</i>	4.78	12	g h i
<i>P. carbonarium</i>	4.5	12	h i
<i>O. krugii</i>	4.03	12	i

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ )

Datos transformados a Raíz Cuadrada

**Apéndice 5. Análisis de varianza para la variable: peso seco de plantas de especies con semillas ortodoxas.**

**Cuadro analisis de la varianza (SC tipo I)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	400.93	87	4.61	7.04	<0.0001
Suelo	1.98	1	1.68	3.02	0.0840
Especie	186.97	21	8.9	13.6	<0.0001
Muestreo	116.32	1	116.32	177.76	<0.0001
Suelo*Especie	37.76	21	1.80	2.75	0.0002
Suelo*Muestreo	2.30E-03	1	2.300E-03	3.5E-03	0.9527
Especie*Muestreo	43.39	21	2.07	3.16	0.0001
Suelo*Especie*Muestreo	14.51	21	0.69	1.06	0.4006
Error	115.17	176	0.65		
Total	516.11	263			

Los datos se transformaron a Raíz Cuadrada



**Apéndice 6. Separación de medias para efecto principal de especie (peso seco de plantas).**

<b>Especies</b>	<b>Medias</b>	<b>n</b>	
<i>E. variegata</i>	4.23	12	a
<i>E. cyclocarpum</i>	3.77	12	a b
<i>C. farchildiana</i>	3.57	12	a b c
<i>A. procera</i>	2.72	12	b c d
<i>F. macrophylla</i>	2.66	12	b c d
<i>E. berteroana</i>	2.5	12	c d e
<i>A. lebbeck</i>	2.32	12	d e f
<i>G. sepium</i>	2.22	12	d e f g
<i>C. houstoniana</i>	2.12	12	d e f g
<i>L. leucocephala</i>	2.07	12	d e f g h
<i>S. saman</i>	1.91	12	d e f g h
<i>A. peregrina</i>	1.84	12	d e f g h
<i>L. dominguensis</i>	1.83	12	d e f g h
<i>P. pedunculata</i>	1.78	12	d e f g h
<i>A. pavonina</i>	1.64	12	d e f g h
<i>C. surinamensis</i>	1.64	12	d e f g h
<i>A. angustissima</i>	1.58	12	d e f g h
<i>P. indicus</i>	1.44	12	e f g h
<i>S. grandiflora</i>	1.39	12	e f g h
<i>L. diversifolia</i>	1.23	12	f g h
<i>O. krugii</i>	1.09	12	g h
<i>P. carbonarium</i>	0.87	12	h

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ )

Datos transformados a Raíz Cuadrada

**Apéndice 7. Análisis de varianza para la variable: número de nódulos de especies con semillas ortodoxas.**

**Cuadro analisis de la varianza (SC tipo I)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1770.82	59	30.01	5.21	<0.0001
Suelo	26.29	1	26.29	4.56	0.0347
Especie	601.10	14	42.94	7.46	<0.0001
Muestreo	369.67	1	369.67	64.2	<0.0001
Suelo*Especie	246.43	14	17.6	3.06	0.0005
Suelo*Muestreo	1.12	1	1.12	4.3	0.6601
Especie*Muestreo	347.01	14	24.79	2.22	<0.0001
Suelo*Especie*Muestreo	179.2	14	12.8	1.37	0.0104
Error	690.99	120	5.76		
Total	2461.81	179			

Los datos se transformaron a Raíz Cuadrada (x+1)

**Apéndice 8. Separación de medias para efecto principal de especie (número de nódulos).**

<b>Especies</b>	<b>Medias</b>	<b>n</b>	
<i>C. farchildiana</i>	9.69	12	a
<i>F. macrophylla</i>	6.74	12	a b
<i>A. procera</i>	4.20	12	b c
<i>G. sepium</i>	4.00	12	b c
<i>E. variegata</i>	3.92	12	b c
<i>S. grandiflora</i>	3.67	12	b c
<i>E. cyclocarpum</i>	3.55	12	b c
<i>A. angustissima</i>	3.51	12	b c
<i>L. dominguensis</i>	3.38	12	b c
<i>P. carbonarium</i>	3.12	12	c
<i>L. leucocephala</i>	3.02	12	c
<i>A. lebbeck</i>	2.85	12	c
<i>S. saman</i>	2.81	12	c
<i>P. indicus</i>	2.67	12	c
<i>E. berteroana</i>	2.25	12	c

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ )

Datos transformados a Raíz Cuadrada ( $x+1$ )

**Apéndice 9. Análisis de varianza para la variable: peso seco de nódulos de especies con semillas ortodoxas.**

**Cuadro analisis de la varianza (SC tipo I)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2.13	59	0.04	2.65	<0.0001
Suelo	5.30E-05	1	5.3E-05	3.9E-03	0.9503
Especie	0.67	14	0.05	3.51	<0.0001
Muestreo	0.48	1	0.48	34.98	<0.0001
Suelo*Especie	0.4	14	0.03	2.08	0.0173
Suelo*Muestreo	4.90E-04	1	4.9E-04	0.04	0.8503
Especie*Muestreo	0.33	14	0.02	1.72	0.0608
Suelo*Especie*Muestreo	0.26	14	0.02	1.37	0.1803
Error	1.63	120	0.01		
Total	3.76	179			

Los datos se transformaron a Raíz cuadrada (x+1)

**Apéndice 10. Separación de medias para efecto principal de especie (peso seco de nódulos).**

<b>Especies</b>	<b>Medias</b>	<b>n</b>
<i>S. saman</i>	1.22	12 a
<i>E. variegata</i>	1.17	12 a b
<i>A. procera</i>	1.15	12 a b
<i>C. farchildiana</i>	1.15	12 a b
<i>E. cyclocarpum</i>	1.12	12 a b
<i>A. lebbeck</i>	1.12	12 a b
<i>E. berteroana</i>	1.07	12 a b
<i>F. macrophylla</i>	1.06	12 a b
<i>G. sepium</i>	1.06	12 a b
<i>L. leucocephala</i>	1.04	12 b
<i>S. grandiflora</i>	1.04	12 b
<i>P. indicus</i>	1.03	12 b
<i>L. dominguensis</i>	1.03	12 b
<i>P. carbonarium</i>	1.02	12 b
<i>A. angustissima</i>	1.02	12 b

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ )

Datos transformados a Raíz cuadrada ( $x+1$ )

**Apéndice 11. Análisis de varianza para la variable: actividad total de la nitrogenasa para especies con semillas ortodoxas.**

**Cuadro analisis de la varianza (SC tipo I)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	173476	59	2940.27	1.14	0.2649
Suelo	2.71E+03	1	2.7E+03	1.1E+00	0.3061
Especie	73393.38	14	5242.38	2.04	0.02
Muestreo	99.76	1	99.76	0.04	0.8441
Suelo*Especie	15697.59	14	1121.26	0.44	0.9597
Suelo*Muestreo	2.01E+03	1	2.0E+03	0.78	0.3786
Especie*Muestreo	64763.7	14	4625.98	1.8	0.0459
Suelo*Especie*Muestreo	14800.45	14	1057.18	0.41	0.9688
Error	308289	120	2569.08		
Total	481765	179			

Los datos se transformaron a Rangos

**Apéndice 12. Separación de medias para efecto principal de especie (actividad total de la nitrogenasa).**

<b>Especies</b>	<b>Medias</b>	<b>n</b>	
<i>F. macrophylla</i>	116.04	12	a
<i>C. farchildiana</i>	115.17	12	a b
<i>S. saman</i>	108.00	12	a b
<i>A. procera</i>	107.08	12	a b
<i>E. berteroana</i>	105.29	12	b
<i>A. lebbeck</i>	104.42	12	b
<i>E. cyclocarpum</i>	95.92	12	b
<i>S. grandiflora</i>	92.92	12	b
<i>E. variegata</i>	92.92	12	b
<i>G. sepium</i>	90.50	12	b
<i>L. dominguensis</i>	81.67	12	b
<i>P. indicus</i>	79.42	12	b
<i>L. leucocephala</i>	60.25	12	b
<i>A. angustissima</i>	58.08	12	b
<i>P. carbonarium</i>	49.83	12	b

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ )

Datos transformados a Rangos