

EVALUACIÓN DE LEGUMINOSAS ARBÓREAS PARA SOMBRA
DE CAFÉ EN UN ULTISOL ENMENDADO CON CAL Y
NUTRIENTES

Por

Feliciano Antonio Andújar Amarante

Propuesta de tesis sometida como cumplimiento parcial de los requisitos para el grado

MAESTRO EN CIENCIAS
EN
AGRONOMÍA

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO DE MAYAGÜEZ
2009

Aprobado por:

Duane A. Kolterman, PhD
Miembro del Comité Graduado

Fecha

David Sotomayor Ramírez, PhD
Miembro del Comité Graduado

Fecha

Eduardo C. Schröder, PhD
Presidente del Comité Graduado

Fecha

Héctor López, PhD
Representante de Estudios Graduados

Fecha

Miguel Muñoz, PhD
Director del Departamento

Fecha

ABSTRACT

Coffee in Puerto Rico is cultivated mainly on Ultisols. These soils are characterized as having low fertility, acidity, high clay content and highly erodability. To improve the fertility and reduce the erosion of these soils, several practices have been recommended; these include the use of trees as shade for coffee and the application of CaCO_3 to increase soil pH. The purpose of this study was to evaluate the performance of 29 legume tree species in an Ultisol amended or not with CaCO_3 plus a nutrient solution without nitrogen during six months. The pots were arranged in a split plot design with four replications. Amendments or not were the main plots and the 28 species the subplots. Plant height was evaluated monthly. Stem diameter, root length, root dry weight, plant total dry weight, nodule number, nodule dry weight and the Acetylene Reduction Assay (ARA) were evaluated six months after sowing. Results indicate that there was no response to the amendment for the majority of the species. The species that increased their monthly growth in the amended soil were: *Leucaena diversifolia*, *Dalbergia sissoo* and *Erythrina poeppigiana*. The nitrogen fixation capacity, measured by the Acetylene Reduction Assay (ARA), was higher for *E. poeppigiana* ($4.94 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ plant}^{-1} \text{ hour}^{-1}$), *Inga vera* (3.59), *Andira inermis* (3.12), *Samanea saman* (3.03), *Albizia procera* (3.02) and *Enterolobium cyclocarpum* (2.81). Nodules of *Acacia mangium* y *E. poeppigiana* were more efficient with a specific nitrogenase activity of 14.40 and $14.28 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ dry weight}^{-1} \text{ hour}^{-1}$, respectively. Galls caused by nematodes were observed on the roots of 11 plants (73% belonging to *Mimosoideae* subfamily). These results must be validated in field experiments using different CaCO_3 and nutrient levels.

RESUMEN

En Puerto Rico el café se cultiva principalmente en suelos del orden Ultisol. Estos suelos son considerados de baja fertilidad, ácidos y arcillosos, y con declives que lo hacen propensos a la erosión. Entre las medidas para mejorar la fertilidad y disminuir la erosión de los suelos se encuentran el uso de árboles para proveer sombra al cafetal y la aplicación de cal agrícola para mejorar el pH del suelo. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar 29 especies de árboles de leguminosas en un Ultisol enmendado o no con cal agrícola más una solución nutritiva sin nitrógeno durante seis meses. Se utilizó un diseño en parcelas divididas con cuatro repeticiones. La parcela principal consistió en la aplicación o no de la enmienda y la subparcela en las 28 especies. Se evaluó la altura mensual y a los 6 meses de la siembra, el diámetro del tallo, la longitud y peso seco de raíz, el peso seco total de la planta, el número y peso seco de nódulos y la fijación de nitrógeno por el método de reducción de acetileno. Los resultados indican que la mayoría de las especies no respondieron a la enmienda. Las especies que incrementaron significativamente su crecimiento mensual en el suelo con enmienda fueron: *Leucaena diversifolia*, *Dalbergia sissoo* y *Erythrina poeppigiana*. La capacidad de la fijación de nitrógeno, medida como la actividad total de la nitrogenasa ($\text{nmol C}_2\text{H}_4 \text{ planta}^{-1} \text{ hora}^{-1}$) fue superior para *E. poeppigiana* (4.94), *Inga vera* (3.59), *Andira. inermis* (3.12), *Samanea saman* (3.03), *Albizia procera* (3.02) y *Enterolobium cyclocarpum* (2.81). Los nódulos de *Acacia mangium* y *E. poeppigiana* fueron más eficientes que las demás especies ya que tuvieron una actividad específica de la nitrogenasa de 14.40 y 14.28 $\text{nmol C}_2\text{H}_4 \text{ peso seco}^{-1} \text{ hr}^{-1}$, respectivamente. Se observaron agallas de nematodos en 11 plantas de las cuales el 73% eran de la subfamilia *Mimosoideae*. Es recomendable la validación de los resultados en experimentos de campo incluyendo diferentes dosis de cal agrícola y nutrientes.

© *Feliciano Antonio Andújar Amarante, 2009*

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis hijas Laura y Glismer porque con su existencia Dios me ha demostrado cuanto me ama. Ellas fueron pacientes y sobrellevaron mi ausencia. También han sido mi motivación para continuar mejorando mis capacidades intelectuales y humanas.

A mis padres, Feliciano Andújar y Ana Mercedes Amarante por su perseverancia en mi formación y todo el amor que me han prodigado durante mi existencia. Toda mi vida no es suficiente para agradecerles su esfuerzo.

A mi esposa, Egli Toribio, por cuidar nuestras hijas mientras estaba yo ausente. Su fuerza de voluntad y su abnegación la hacen una mujer extraordinaria.

A mi hermano José Octavio Andújar por su apoyo y comprensión en los momentos difíciles. Lo admiro por ser un ser humano ejemplar. Es el mejor amigo que Dios me ha dado.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios, por darme las fuerzas para vencer los obstáculos y aprovechar las oportunidades que me ha presentado.

Al instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IDIAF) y al Centro para el Desarrollo Agropecuario y Forestal (CEDAF) por su apoyo económico para llevar a cabo mis estudios de maestría.

Al Proyecto SARE (Sustainable Agriculture Research and Education) por el financiamiento de mi investigación.

Al Dr. Eduardo C. Schröder por apoyarme en mi interés de ingresar a la Universidad de Puerto Rico. Por ser mi profesor asesor y consejero, y por su apoyo durante mis estudios graduados.

Al Departamento de Agronomía y Suelos en la persona del Dr. Miguel Muñoz por aceptarme como estudiante graduado.

Al Dr. David Sotomayor y al Dr. Duane A. Kolterman por pertenecer a mi comité de tesis. Por sus consejos para mejorar mi desempeño como estudiante graduado y como profesional.

Al Dr. Raúl Macchiavelli por las sugerencias en los análisis estadísticos de mi investigación.

Al agrónomo Wigmar González, MSc., por su ayuda en el traslado del suelo para mi experimento desde la SubEstación Experimental de Adjuntas hasta la Finca Alzamora.

A Educational Concern for Hunger Organization (ECHO) por suministrar parte de las semillas utilizadas en el experimento.

A la Dra. Stefanie Whitmire por su colaboración e instrucción en los cálculos de los análisis de reducción de acetileno.

A Glenny Llinee López Rodríguez y a la familia Gómez Fernández: Milagros, Fino, Vladimir y Jessica. Gracias por tratarme como miembro de su familia.

A Ixia Avilés por su gran amistad filial y apoyo en todo momento. A Melissa Matos, por su colaboración incondicional en la recolección de semillas y el levantamiento de datos durante mi investigación. A Wanda Almodovar, la Dra. Garrido, Donato Seguí, María Méndez, Gloria Aguilar, Lourdes Cataquet, Lionel Cruz, Manuel Santana, Miguel Arango, Enmanuel Feliciano, Jacky Vega, Ronald Dorcinvil, Gerson Ardila, Sonia Carlo, Sol taína Cintrón, Ivón Ventura, Alexander Recamán, César Tejada, Victor Asencio, y a todos aquellos que de una u otra manera contribuyeron con la realización de mi maestría.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ABSTRACT	ii
RESUMEN.....	iii
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vi
ÍNDICE DE CONTENIDO	viii
LISTA DE CUADROS.....	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
3. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
3.1 El cultivo del café.....	5
3.2 El nitrógeno	7
3.3 Fijación biológica de nitrógeno.....	8
3.4 Las leguminosas	10
3.5 <i>Rhizobium</i>	13
3.6 Acidez del suelo	16
3.7 Medición de la fijación biológica de nitrógeno en árboles	17
3.7.1 Método del rendimiento de la materia seca.....	18
3.7.2 Método de la diferencia del nitrógeno total	19
3.7.3 Método de reducción de acetileno (ARA).....	19
3.7.4 Método de la abundancia natural de ¹⁵ N	20
3.7.5 La técnica del isótopo del ¹⁵ N	21
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
4.1 Localización del experimento	22
4.2 Descripción y procedencia del Suelo	22
4.3 Análisis del suelo	23
4.4 Especies de leguminosas arbóreas.....	24
4.5 Pre-germinación de semillas	26
4.6 Determinación de la cantidad de CaCO ₃	26
4.7 Diseño experimental.....	27
4.8 Manejo y duración del experimento.....	28

4.9	Variables estudiadas y recolección de datos	28
4.9.1	Población de <i>Rhizobium</i> en el suelo	28
4.9.2	Altura y diámetro del tallo de las plantas	29
4.9.3	Longitud de las raíces.....	29
4.9.4	Peso seco	29
4.9.5	Número de nódulos	30
4.9.6	Peso seco de los nódulos	30
4.9.7	Actividad de la nitrogenasa	30
4.9.8	Aislamiento y caracterización de las especies de <i>Rhizobium</i>	31
4.10	Análisis estadístico	31
5.	RESULTADOS.....	32
5.1	Análisis del suelo	32
5.2	Población de <i>Rhizobium</i> en el suelo.....	33
5.3	Altura y diámetro del tallo de las plantas	33
5.3.1	Altura mensual	33
5.3.2	Longitud y diámetro del tallo al final del experimento.....	39
5.4	Longitud de las raíces.....	42
5.5	Peso seco de las plantas.....	43
5.6	Número de nódulos	46
5.7	Peso seco de los nódulos	49
5.8	Actividad de la nitrogenasa	51
5.9	Resumen de los análisis de varianza	54
5.10	Caracterización de las bacterias aisladas de los nódulos de las raíces	55
5.10	Enfermedades y plagas.....	57
6.	DISCUSIÓN.....	60
6.1	Análisis del suelo	60
6.2	Población de <i>Rhizobium</i> en el suelo.....	60
6.3	Altura y diámetro del tallo de las plantas	61
6.3.1	Altura mensual	61
6.3.2	Longitud y diámetro del tallo al final del experimento.....	64
6.4	Longitud de las raíces.....	68
6.5	Peso seco de las plantas.....	69
6.6	Número de nódulos	70
6.7	Peso seco de los nódulos	71
6.8	Actividad de la nitrogenasa	72
6.9	Caracterización de las bacterias aisladas de los nódulos de las raíces	73
6.10	Enfermedades y plagas.....	74
7.	CONCLUSIONES.....	76
8.	RECOMENDACIONES.....	78

9. LITERATURA CITADA 82
10. APÉNDICES..... 93

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
Cuadro 1. Especies utilizadas en el experimento fijación de nitrógeno en leguminosas	25
Cuadro 2. Solución nutritiva de Fåhraeus sin nitrógeno (1957).	27
Cuadro 3. Análisis del suelo Humatas utilizado en el experimento	32
Cuadro 4. Resumen de análisis de varianza para las tres especies con significancia en la interacción enmienda x tiempo	34
Cuadro 5. Resumen de análisis de varianza de la altura mensual de las especies.	37
Cuadro 6. Altura por mes y promedio mensual de las especies del experimento	38
Cuadro 7. Resumen del análisis de varianza para la longitud del tallo de las plantas seis meses después de la siembra.	39
Cuadro 8. Número de nódulos por especie con y sin enmienda (datos originales).....	48
Cuadro 9. Resumen de los análisis de varianza para las variables evaluadas en el presente experimento.	54
Cuadro 10. Reacción de cepas aisladas de leguminosas arbóreas en azul de bromotimol e inducción de nodulación en <i>Macroptilium atropupureum</i>	56
Cuadro 11. Número de plantas muertas por especie durante el experimento	58
Cuadro 12. Especies de leguminosas arbóreas con agallas de nematodos en las raíces, seis meses después de la siembra.	59
Cuadro 13. Clasificación del crecimiento de las especies según la longiud del tallo.	66
Cuadro 14. Peso seco y número de nódulos para las especies con y sin enmienda	79

LISTA DE FIGURAS

Figuras	Página
Figura 1. Relación entre el pH del suelo y el tiempo después de encalar	33
Figura 2. Altura mensual de <i>Leucaena diversifolia</i> en suelo con y sin enmienda.	35
Figura 3. Altura mensual de <i>Dalbergia sissoo</i> en suelo con y sin enmienda.....	35
Figura 4. Altura mensual de <i>Erythrina poeppigiana</i> en suelo con y sin enmienda	36
Figura 5. Longitud del tallo de las especies arbóreas al final del experimento.....	40
Figura 6. Diámetro del tallo de las especies arbóreas al final del experimento.	41
Figura 7. Longitud de las raíces de las especies arbóreas del experimento.	43
Figura 8. Peso seco total de las leguminosas arbóreas del experimento.	44
Figura 9. Índice raíz/tallo de las leguminosas arbóreas del experimento.....	45
Figura 10. Nódulos en raíces de plantas de <i>C. fairchildiana</i> e <i>I. vera</i>	47
Figura 11. Peso seco de nódulos por planta de las leguminosas arbóreas del experimento.....	50
Figura 12. Actividad total de la nitrogenasa de las especies arbóreas del experimento.	52
Figura 13. Actividad específica de la nitrogenasa de las especies arbóreas del experimento.....	53
Figura 14. Síntomas de plagas y enfermedades en algunas plantas de leguminosas	57

EVALUACIÓN DE LEGUMINOSAS ARBÓREAS PARA SOMBRA DE CAFÉ EN UN ULTISOL ENMENDADO CON CAL Y NUTRIENTES

1. INTRODUCCIÓN

El café (*Coffea arabica*) es el cultivo que mayor área ocupa en Puerto Rico. El censo del Departamento de Agricultura reportó para el año 2007 un total de 15,144 ha cultivadas de café, con una cosecha de 8,192 toneladas de café uva. De ese total, 4,640 ha (31%) se cultivan bajo sombra, con una cosecha de 1,936 (24% de la producción total) y un rendimiento de 0.42 toneladas ha⁻¹ (calculado por el autor dividiendo la producción entre el área cultivada). El cultivo a pleno sol ocupa un área de 10,504 ha (69%), con una cosecha de 6,256 toneladas (76% de la producción total) (USDA, 2009) y un rendimiento de 0.60 toneladas ha⁻¹. El consumo para el año 2005 fue de 6,480 toneladas (USDA, 2007).

Con relación al valor de mercado de los principales cultivos agrícolas en Puerto Rico en el 2007, el café ocupó el tercer lugar con un valor de USD\$ 41,823, 565.00. En términos porcentuales el café generó el 19%, después del plátano (20%) y los ornamentales (20%) (USDA, 2009). Esto coloca al café como uno de los rubros agrícolas más importantes en Puerto Rico.

Hasta los años 1960, el café en Puerto Rico se cultivaba bajo sombra. Sin embargo en años recientes, con el objetivo de incrementar los rendimientos, se apoyó el cultivo a pleno sol y el uso intensivo de fertilizantes, promovido por el Departamento de Agricultura a raíz de los trabajos de Vicente-Chandler y colaboradores (Vicente-Chandler et al., 1984). El café cultivado a pleno sol tiene una vida útil corta y hace necesaria la resiembra con mayor frecuencia que bajo sombra (O'Connel, 2004). El café a sol requiere mayores cantidades de fertilizantes, plaguicidas y mano de obra, con un efecto en la disminución en la biodiversidad (Rice y Ward, 1996; O'Connel, 2004) y en la calidad de los acuíferos (Babbar y Zak, 1995; Rice y Ward, 1996; Ryan et al., 2001). Además de lo anterior, en el café a pleno sol ocurre

una mayor pérdida de suelo y nutrientes por efecto de la erosión (Ataroff y Monasterio, 1997; Arellano, 2001; Siebert, 2002; DaMatta, 2004).

El cultivo de café en Puerto Rico está localizado en zonas marginales donde predominan suelos ácidos y propensos a la pérdida por erosión hídrica (Hernández, 1930; Muñiz-Torres y Monroig-Inglés, 1994; Cruz y Schröder, 2006; Arango, 2007). Los suelos bajo cultivo de café son considerados, su mayoría, del orden Ultisol (44.7%) y dentro de estos predomina la serie Humatas con un 22.5% (Cruz y Schröder, 2006). En estos suelos es necesario promover sistemas de cultivo bajo sombra de árboles fijadores del nitrógeno atmosférico. La utilización de estos árboles puede hacer una mayor contribución a la agricultura sustentable mediante la restauración, el mantenimiento de la fertilidad de los suelos y el combate de la erosión (Danso et al., 1992). Sin embargo los rendimientos del grano son menores debido a la sombra y a la competencia por agua y nutrientes, y por una más baja tasa fotosintética del de café. Kimemia et al. (2007) encontraron menor rendimiento de café pergamino (0.8 t ha^{-1}) en plantas de café a 5 m del árbol *Albizia shimperiana*, y un mayor rendimiento (2.26 t ha^{-1}) en plantas a 12.5 m de la especie sombreadora. Según Haggar et al. (2007), la producción de café uva de árboles cultivados a pleno sol fue significativamente mayor durante los primeros 2 años en Costa Rica, pero no después; mientras que en Nicaragua la producción acumulada durante 4 años a pleno sol (24.9 t ha^{-1}) y con sombra de *Tabebuia rosea* (21.2 a 24.5 t ha^{-1}) fue significativamente mayor que con sombra de *Inga laurina* (16.3 a 18.0 t ha^{-1}).

En el sistema de café bajo sombra de Puerto Rico se han identificado las especies de árboles de leguminosas *Inga vera* y *Andira inermis* como las de mayor frecuencia en las fincas (Arango, 2007). Además de estas especies, existen otras de las leguminosas fijadoras de nitrógeno que potencialmente podrían ser utilizadas como sombreadores (Santana, 2007). Sin embargo, para maximizar la fijación de nitrógeno por las leguminosas arbóreas, es necesario tomar en cuenta ciertas condiciones que influyen en el proceso. El crecimiento y la fijación de nitrógeno de las leguminosas, generalmente están limitados por nutrición y la acidez del suelo (Giller et al., 1997; Ridley et al., 1990; Danso, et al., 1992; Thomas, 1995). Debido a que estos factores caracterizan los suelos dedicados al cultivo del café en Puerto

Rico (Muñiz-Torres y Monroig-Inglés, 1994), es necesario darles un manejo adecuado para disminuir los efectos negativos en la fijación de nitrógeno en el sistema.

Existen algunas medidas que han sido recomendadas para mejorar las condiciones de los suelos en la zona cafetalera de Puerto Rico. Dentro de éstas se encuentran la aplicación de cal para aumentar el pH y la aplicación de nutrientes (Muñiz-Torres y Monroig-Inglés, 1994). Sin embargo, a nivel local no existe información sobre el efecto de esta enmienda en la fijación de nitrógeno de las especies de leguminosas presentes en el cafetal y de otras con uso potencial. Esta información podría contribuir a mejorar el manejo del sistema para maximizar la fijación de nitrógeno atmosférico y disminuir los costos económicos y ambientales por el uso de fertilizantes nitrogenados.

Es necesario estudiar el efecto de la enmienda de cal y nutrientes en la fijación de nitrógeno de especies de leguminosas arbóreas utilizadas y con potencial de uso en los sistemas de café de Puerto Rico. Los resultados del estudio servirán para ampliar la información disponible sobre el uso adecuado de esta enmienda y para identificar las especies leguminosas con mayor tasa de fijación de nitrógeno que puedan ser recomendadas y adoptadas por los agricultores.

2. OBJETIVOS

1. Evaluar especies de leguminosas arbóreas por su capacidad de fijar nitrógeno para ser utilizadas como sombra en el cultivo de café en Puerto Rico.
2. Identificar y cuantificar cuáles especies de las leguminosas responden mejor a la enmienda de cal y nutrientes.

3. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 El cultivo del café

Desde su introducción en Puerto Rico en el año 1736 y su establecimiento como cultivo en el 1755 (Mondoñedo, 1957), el café es una de las empresas agrícolas de mayor importancia económica y social (Estación Experimental Agrícola, 1999). Para el período 2003-2004 la producción de café generó ingresos brutos por valor de US\$44.8 millones. Además es una fuente de trabajo para unos 25,000 trabajadores (Estación Experimental Agrícola, 2005).

El cultivo de café está localizado en las áreas montañosas de Puerto Rico, donde predominan los suelos del orden Ultisol. La serie Humatas predomina entre otras series y ocupa el 22.5% del área sembrada de café (Cruz y Schröder, 2006). Son suelos muy fuertemente ácidos y altamente erosionables, con declives de 20 a 60% (USDA, 1982). Tradicionalmente el café en Puerto Rico se ha cultivado bajo árboles de sombra. Sin embargo a partir de la década de los años 1960 se incentivó el apoyo del cultivo a pleno sol. Hoy en día se cultivan unas 15,144 ha, de las cuales 4,640 ha (31.0%) se cultivan bajo sombra y 10,504 ha (69.0%) a pleno sol (USDA, 2009).

Uno de los problemas que se podría presentar en el café a sol es la pérdida de suelo por la erosión hídrica. Ataroff y Monasterios (1997) encontraron que las pérdidas de fracciones minerales del suelo menores de 4 mm, fueron cuatro veces mayores en el primer año del establecimiento de café a sol, que en la plantación de 16 a 17 años bajo sombra. También se han encontrado menores niveles de calcio, nitrato y materia orgánica en el horizonte O de café a pleno sol (Siebert, 2002). Por otro lado, Arellano (2001), en una evaluación durante tres años en Venezuela, encontró pérdidas de suelo de 0.34 Mg ha⁻¹ para café bajo sombra de *Inga* sp., 0.42 Mg ha⁻¹ bajo sombra de *Citrus sinensis* y 0.77 Mg ha⁻¹ en café sin sombra (con 15, 5 y 3 años de establecidos, respectivamente). Esta autora concluyó

que la combinación de café e *Inga* sp. fue la más eficiente para contrarrestar la erosión hídrica.

Debido al incremento del uso de plaguicidas y de fertilizantes y los potenciales efectos negativos en el suelo y las fuentes de agua que conlleva el sistema de cultivo a pleno sol, existe el interés para cultivar el café con árboles de sombra, para promover mayor sustentabilidad en términos económicos y ambientales (Perfecto et al., 1996). Abruña et al., (1966) reportaron que “aunque las parcelas a pleno sol produjeron una cantidad mayor de granos propios para exportación, las que se cultivaron bajo sombra mostraron una proporción algo mayor de este tamaño de grano al compararse con la producción total”. Bolaños et al. (2007) encontraron que parece haber una compensación entre una alta productividad en el café a pleno sol o bajo sombra caducifolia; y una baja productividad, pero mayor conversión de café uva a café oro y calidad del café, bajo sombra perennifolia.

Con el propósito de aumentar el área del cultivo de café a sombra y mejorar el medioambiente y la vida silvestre, el Servicio de Pesca y Vida Silvestre (SPVS) ha estado trabajando en Puerto Rico, con un proyecto que provee incentivos y servicios a los productores de café. Con esto se procura que cambien el sistema de cultivo de sol al cultivo bajo sombra de árboles. Desde el inicio de este proyecto en el 2001, se han restaurado más de 400 hectáreas de hábitat bajo sombra. El Departamento de Recursos Naturales de Puerto Rico junto al SPVS y organizaciones no gubernamentales proveen los árboles, los fondos y la asistencia técnica; mientras que otras instituciones aliadas ayudan en la promoción de prácticas de cultivo sostenible (Cooperative Conservation America, 2009).

Los árboles de sombra protegen el cultivo de la excesiva radiación solar, protegen el suelo de la erosión y mejoran la fertilidad del suelo mediante el aporte de materia orgánica y la fijación de nitrógeno por especies leguminosas (Farrel y Altieri, 1995; O'Connor et al., 2005). Además, el uso de especies leguminosas, puede contribuir con la reducción de los

costos por la compra de fertilizantes nitrogenados y mejorar el control biológico y la biodiversidad.

3.2 El nitrógeno

El nitrógeno (N_2) está presente en grandes cantidades (3.86×10^{21} g) como gas inerte en la atmósfera terrestre (Stevenson, 1982) y constituye el elemento mineral fundamental para el crecimiento de las plantas (Triplett et al., 2007). Es un componente de las moléculas de la clorofila, de los aminoácidos, de las enzimas y del ADN; es esencial para la utilización de los carbohidratos, estimula el desarrollo y la actividad de las raíces y es importante para la absorción de otros nutrientes. Con un óptimo suministro de nitrógeno se mejora el desarrollo de brotes y se desarrolla la profundidad y la masa total de las raíces; sin embargo, con cantidades inadecuadas las hojas de las plantas se tornan cloróticas y se reduce su crecimiento (Olson y Kurtz, 1984).

Aunque el nitrógeno es parte de casi el 80% de la atmósfera terrestre, no está fácilmente disponible para ser asimilado por las plantas y otros organismos vivos, ya que se requiere mucha energía para romper químicamente el triple enlace que une los dos átomos de la molécula de N_2 . Sólo después que se haya roto el triple enlace, los átomos se combinan con hidrógeno u oxígeno para formar amoníaco (NH_3) o nitrato (NO_3^-) que son los compuestos utilizados por las plantas (Havelka et al., 1982).

Los microorganismos fijadores de nitrógeno poseen el mecanismo para romper el triple enlace de la molécula de N_2 bajo condiciones ordinarias de temperatura y presión (Stevenson, 1982). Estos microorganismos que pertenecen a diferentes géneros de bacterias con información genética para sintetizar la nitrogenasa, una enzima que utilizando ATP (Adenosin Trifosfato) como fuente de energía, cataliza la conversión de N_2 a NH_3 .

En los sistemas de café en Latinoamérica, el nitrógeno es aportado en su mayoría por la aplicación de fertilizantes. El aporte por la fijación de nitrógeno, la lluvia y los residuos vegetales son en menores proporciones. Bornemisza (1982) reporta que la adición de fertilizantes nitrogenados en los cafetales, puede variar de 100 a 300 kg ha⁻¹ año⁻¹, mientras que la fijación biológica de árboles de leguminosas varía de 1 a 40 kg ha⁻¹ año⁻¹. Según este autor, las pérdidas de este elemento incluyen el que se extrae por la cosecha (15 a 90 kg ha⁻¹ año⁻¹), la leña del café y de los árboles de sombra, pérdidas por lixiviación, erosión y en forma de compuestos gaseosos.

La aplicación sucesiva de fertilizantes nitrogenados reducidos promueve la acidificación del suelo y la contaminación de las aguas superficiales y subterráneas por la lixiviación y la escorrentía (Babbar y Zak, 1995; Ryan et al., 2001; Marchand et al., 2002). Además, para la producción de fertilizantes nitrogenados se requiere de grandes cantidades de energía de recursos no renovables. Según Gellings y Parmenter (2004), para producir una tonelada métrica de Amoníaco Anhídrido, se requieren de 1,090 a 1,250 m³ de gas natural. Estos autores estiman que el gas natural suple entre el 70 y 80% de la energía en la producción de fertilizantes. Las consecuencias de las actividades antes mencionadas, pueden disminuirse mediante la fijación biológica del nitrógeno atmosférico.

3.3 Fijación biológica de nitrógeno

Además del aporte de nitrógeno por las fuentes abióticas (rayos, lluvias), el nitrógeno atmosférico es fijado por la acción de microorganismos de vida libre o asociados con otros organismos. La mayor contribución de la fijación biológica de nitrógeno en la agricultura es a través de bacterias asociadas con plantas, mediante una simbiosis en que las bacterias suplen nitrógeno a las plantas (huésped) y éstas suplen energía a las bacterias. Esta simbiosis puede proveer grandes cantidades de nitrógeno a las plantas y tiene un gran impacto en la agricultura (Board on Science and Technology for International Development, 1994). En este

sistema las plantas se benefician directamente, ya que aproximadamente el 90% del nitrógeno fijado es translocado desde la bacteria al huésped (Hansen, 1994).

El sistema de fijación biológica de nitrógeno mayormente estudiado en la agricultura y la forestería es la simbiosis entre bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* de la familia *Rhizobiaceae* y las plantas de la familia de las leguminosas (Hansen, 1994). Esto se debe a que estas asociaciones tienen un gran impacto en el ciclo del nitrógeno. La simbiosis con leguminosas contribuye con al menos 70 millones de toneladas de nitrógeno por año y aproximadamente la mitad ocurre en los trópicos (Brockwell et al., 1995). Además, para un suministro adecuado de nitrógeno en el cultivo de legumbres y la producción de pastos, las simbiosis entre las leguminosas y *Rhizobium* o *Bradyrhizobium* son una práctica agronómica más barata y usualmente más efectiva que la aplicación de fertilizantes nitrogenados (Zahran, 1999). Para que esta simbiosis se lleve a cabo adecuadamente, la bacteria debe encontrarse en vida libre en el suelo.

La bacteria coloniza la superficie de las raíces de la planta y se adhiere a los pelos radiculares. En el proceso de reconocimiento, la planta segrega flavonoides y otros compuestos que inducen los genes *nod* en la bacteria. Estos genes producen factores Nod que inducen encurvamiento del pelo radicular. La bacteria penetra el pelo radicular y cesa de dividirse para convertirse en un bacteroide fijador de nitrógeno (Hansen, 1994; Sprent, 2001). Los pelos radiculares infectados se transforman en nódulos que pueden ser anuales o perennes que contienen una gran cantidad de rhizobios en la región central infectada (Hansen, 1994).

Los árboles de leguminosas usados como sombra en el cultivo de café contribuyen con el aporte de nitrógeno al sistema, vía la fijación biológica de nitrógeno (Roskoski, 1982; Lindblad y Russo, 1986; Turk y Keyser, 1992). Mogollón et al. (1996) reportaron una mayor cantidad de nitrógeno potencialmente disponible (141 kg ha^{-1}) en café asociado con leguminosas que en café con cítricos. Por otro lado, Danso et al. (1992) concluyeron que

especies de leguminosas arbóreas pueden acumular hasta 500 kg N ha⁻¹ año⁻¹. Roskoski (1982) reportó una fijación de nitrógeno de más de 40 kg ha⁻¹ año⁻¹ en café con sombra de la leguminosa *Inga jinicuil*, equivalente al 53% de la cantidad de fertilizante nitrogenado aplicado anualmente.

Para maximizar la fijación biológica de nitrógeno es necesario considerar los factores que más afectan este proceso. Danso et al. (1992) menciona dentro de estos factores la edad y el genotipo del árbol de leguminosa, el componente microbiano y características del suelo como humedad, temperatura, pH y salinidad. Los requerimientos nutricionales también son factores que afectan la simbiosis (Hansen, 1994) sobre todo el fósforo por su efecto en el desarrollo de las raíces de las plantas, lugar donde ocurre la infección por el *Rhizobium* y la posterior formación del nódulo (Chien et al., 1993; Tang, et al., 2001).

3.4 Las leguminosas

Las leguminosas constituyen una familia de aproximadamente 727 géneros y cerca de 19,325 especies (Lewis et al., 2005). Su rango ecológico va desde los trópicos hasta regiones árticas, con especies que toleran la sequía, altas y bajas temperatura, deficiencia de nutrientes, inundaciones y otros factores ambientales (Hansen, 1994). Su importancia agrícola, especialmente en los países tropicales, ha sido documentada por varios autores (Hansen, 1994; Peoples et al., 1995; Franco y Faria, 1997). La característica más importante que posee la mayoría de las plantas de esta familia es la de fijar nitrógeno de la atmósfera.

La familia de las leguminosas se divide en tres subfamilias: *Mimosoideae*, *Caesalpinioideae* y *Papilionoideae* (Allen y Allen, 1981; Hansen, 1994; Sprent, 2001; Lewis et al., 2005; Sprent, 2007). Las *Papilionoideae* agrupan a la mayor cantidad de especies que nodulan (97%), mientras que las *Mimosoideae* contienen muchas especies que nodulan, excepto algunas del género *Acacia* y *Mimosa* (Hansen, 1994; Sprent, 2001). La nodulación en las especies de las *Caesalpinioideae* es poco común (Sprent, 2007). Esta característica de

las subfamilias no ha cambiado mucho desde el estudio de Allen y Allen (1981). Con excepción de muchas de las *Papilionoideae*, la mayoría de las especies leguminosas son árboles (Allen y Allen, 1981).

Las leguminosas arbóreas han sido utilizadas por muchos años en las regiones tropicales como integrantes importantes de los sistemas agroforestales. Se han realizado numerosos estudios sobre sus aportes como fijadoras de nitrógeno atmosférico y de materia orgánica producto de la hojarasca. Sin embargo, los niveles de nodulación y de fijación varían según el genotipo que se encuentre en el sistema.

De acuerdo con Danso et al. (1992), en experimentos de campo y en tiestos observaron grandes diferencias en la fijación de nitrógeno en dos genotipos de *Leucaena leucocephala*. En trabajos realizados por Sanginga et al. (1990) el porcentaje de nitrógeno fijado varió significativamente entre genotipos de *Leucaena leucocephala* y *Acacia albidia* (65 y 20% respectivamente). Los autores reportaron diferencias en la fijación dentro de cada especie, variando de 37 a 74% dentro de *L. leucocephala* y de 6 a 37% en *A. albidia*. Faria et al. (1987) reportaron nodulación en seis especies de las *Caesalpinioideae*, 23 *Mimosoideae* y 27 *Papilionoideae*. Éstas incluían especies pertenecientes a los géneros *Albizia*, *Acacia*, *Inga*, *Pithecellobium*, *Enterolobium*, *Piptadenia*, *Andira*, *Dalbergia*, *Lonchocarpus* y *Erythrina*.

El uso de leguminosas arbóreas como sombra en el cultivo de café ha sido documentado por varios autores (Roskoski, 1982; Weaver y Birdsey, 1986; Escalante, 1995; Mogollón et al., 1996; Grossman et al., 2005; Arango, 2007; y Méndez et al, 2007). Estos autores reportaron sobre la nodulación, fijación de nitrógeno y la presencia de especies en los sistemas de café bajo sombra.

En un estudio con la leguminosa *Inga oerstediana*, utilizada como sombra en café orgánico en México, Grossman et al. (2005) encontraron que esta especie es de nodulación lenta. Reportaron una nodulación muy baja y limitada, a los 90 y 150 días después de la

siembra respectivamente. También reportaron que el 20% del nitrógeno total en árboles de 1 a 3 años, se derivó de la fijación.

Escalante (1995) llevó a cabo seis estudios en seis localidades (un estudio en cada localidad) de Venezuela. Entrevistó a 20 agricultores con un total de 120 fincas de café bajo sombra. Encontró que los árboles de especies de *Inga* y *Erythrina* estuvieron presentes en el 97.5% de las fincas estudiadas. Por otro lado, en un estudio de la biodiversidad de árboles en cafetales bajo sombra en El Salvador, se identificaron árboles de especies pertenecientes a 46 familias (Méndez et al, 2007). De estas especies, el 27% pertenecían a la familia de las leguminosas.

De las cinco especies de árboles más comunes según el área basal, identificadas por Weaver y Birdsey (1986) en las plantaciones de café abandonadas en Puerto Rico, tres pertenecen a la familia de las leguminosas. Estas especies son: *Inga vera*, *Inga fagifolia* y *Andira inermis*. Dentro de las más importantes reportadas por Arango (2007) están *Inga vera* y *Andira inermis* que, junto con los cítricos, sumaban el 52.5% del índice de importancia y el 64.3% del área basal. Esto indica la importancia de las leguminosas como sombra en los cafetales de Puerto Rico.

Santana (2007) evaluó 30 especies de leguminosas arbóreas que incluyeron las presentes en los cafetales de Puerto Rico y otras con potencial para sombra del cultivo de café. El autor encontró una mayor actividad total de la nitrogenasa en las especies *Flemingia macrophylla*, *Clitoria fairchildiana*, *Albizia procera*, *Erythrina berteriana* y *Erythrina variegata*, mientras que *C. fairchildiana*, *F. macrophylla*, *Inga vera*, *Inga spectabilis*, *Inga quaternata* y *A. procera*, fueron las que tuvieron más nódulos. Estas especies fueron evaluadas en invernaderos en los dos suelos más representativos de la zona cafetalera de Puerto Rico.

3.5 *Rhizobium*

Rhizobium es una bacteria capaz de asociarse a una planta huésped, crear un tipo de tumor en sus raíces y desde allí fijar nitrógeno de la atmósfera. Esta bacteria pertenece a la familia *Rhizobiaceae*, nombre que define a la mayoría de las bacterias parasíticas y no parasíticas que viven en asociación con plantas causándoles cierto tipo de tumor (Sprent, 2001) en el tallo o en las raíces. Las bacterias que pertenecen a la familia *Rhizobiaceae* se caracterizan por ser Gram-negativas, con forma de bastón, no forman esporas y se mueven por flagelos.

Al reconocerse que el espectro de huésped no era el único criterio para clasificar el género *Rhizobium*, éste se reclasificó en dos géneros según su crecimiento: *Rhizobium*, de crecimiento rápido, y *Bradyrhizobium*, de crecimiento lento (Hansen, 1994; Sprent, 2001). Estos géneros agrupaban sólo cuatro especies (Sahgal y Johri, 2006). Sahgal y Johri (2006) mencionan 44 especies de bacterias que nodulan en las leguminosas, agrupadas en 11 géneros de los cuales 9 pertenecen a las α -proteobacterias. Estos géneros son: *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Devosia*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Ochrobactrum*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium*. Sin embargo, actualmente se reportan 76 especies agrupadas en los siguientes 13 géneros: *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer* (antes *Sinorhizobium*), *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Methylobacterium*, *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Devosia*, *Herbaspirillum*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium* y *Shinella* (Weir, 2008).

El *Rhizobium* presente en el suelo coloniza las raíces de las leguminosas y se inicia un proceso de reconocimiento entre la planta y la bacteria que da como resultado la formación de nódulos en las raíces de la planta. Estos nódulos contienen en su interior gran cantidad de bacteroides y son el lugar de la fijación de nitrógeno.

Antes de la infección, la bacteria se adhiere a los pelos radiculares de la planta huésped. La planta secreta flavonoides que inducen a los genes *nod* en la bacteria. Estos genes producen factores Nod, lipoquitina y oligosacáridos que inducen el proceso de formación del nódulo (Sprent, 2001). En la planta se producen procesos que permiten la curvatura del pelo radicular y la bacteria penetra para luego cesar su división y convertirse en bacteroide. Dentro del nódulo ocurre la inducción de genes *nif* y *fix* responsables de la síntesis de la nitrogenasa, enzima necesaria para llevar a cabo el proceso de fijación de nitrógeno.

De acuerdo con Giller (2003), los estudios realizados con especies de *Rhizobium* en árboles de las leguminosas son escasos si se comparan con los realizados en las leguminosas de grano. Algunos autores han estudiado la nodulación con diferentes cepas en especies de leguminosas arbóreas. Turk y Keyser (1992) en experimentos para delinear la especificidad de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* en varias leguminosas arbóreas encontraron que *Gliricidia sepium*, *Calliandra calothyrsus* y *Leucaena leucocephala* nodularon efectivamente con las cepas aisladas de estos tres géneros de planta. Los autores reportaron que la nodulación de *Sesbania grandiflora* y *Robinia pseudo-acacia* sólo ocurre con las cepas aisladas de estas mismas especies. Los autores reportaron que *Acacia mearnsii* noduló con la mayoría de los aislados pero fue baja en la fijación de nitrógeno, mientras que *Acacia mangium* y *Lysiloma latisiliqua* fueron específicas para nodulación y efectividad de fijación.

Odee et al. (2002) estudiaron la diversidad genética natural y el estatus de simbiosis en cepas de *Rhizobium* aisladas de leguminosas arbóreas y herbáceas. Encontraron que las especies de *Acacia* y *F. albidia* mostraron variación en la efectividad de simbiosis de las cepas estudiadas (*Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhizobium leguminosarum* y *Rhizobium tropici* IIB), mientras que *S. sesban* noduló con más efectividad sólo con su cepa homóloga (*Rhizobium tropici* IIB).

Por otro lado, Zurdo-Piñeiro et al. (2004) caracterizaron 15 aislados de los nódulos de varias leguminosas tropicales en Puerto Rico. Estos autores reportaron que *Sesbania* sp. puede ser huésped de *R. gallicum* y de *R. tropici*, y esta última especie puede nodular además plantas de los géneros *Neptunia* y *Mimosa*. Los autores demostraron que *R. gallicum* también nodula a *G. sepium*. Además reportaron que géneros como *Sesbania* y *Calliandra* pueden albergar en sus nódulos a *R. tropici* y a *R. gallicum* simultáneamente.

Diferentes especies de *Rhizobium* reaccionan de distintas formas en respuesta a condiciones adversas del ambiente en el suelo y bajo condiciones controladas como solución de cultivo líquido o en agar. Sin embargo la habilidad de algunas cepas de crecer en cultivo artificial con un pH bajo, no necesariamente tiene relación con buenas características de nodulación en suelos ácidos. Un pH bajo del suelo afecta tanto la adhesión y penetración del *Rhizobium* a la raíz de la planta como el crecimiento de ésta (Hansen, 1994).

La acidez y la toxicidad por aluminio contribuyen con la reducción de la diversidad de las poblaciones de *Rhizobium* en los suelos tropicales. Andrade et al. (1999) reportaron que la mayor diversidad de cepas nativas de *Rhizobium* que nodulaban *Phaseolus vulgaris* se observó en los suelos tratados con la dosis más alta de cal (10% y 6% de saturación de aluminio), mientras que la diversidad más baja se observó en los suelos sin cal (41% de saturación de aluminio).

Bala y Giller (2006) observaron cambios en la dominancia relativa de poblaciones de rizobios a medida que cambiaba el pH. *Rhizobium tropici* predominó en condiciones de acidez, *Mesorhizobium* spp. en pH intermedio y *Sinorhizobium* spp. en condiciones alcalinas. *Rhizobium tropici* fue el más efectivo en todas las especies leguminosas. Sin embargo, las cepas de *Sinorhizobium* spp. fueron tan efectivas como *R. tropici* en la fijación de nitrógeno en *Gliricidia sepium*, *Calliandra calothyrsus* y *Leucaena leucocephala*; mientras las cepas de *Mesorhizobium* fueron tan efectivas como *R. tropici* en *Sesbania sesban*.

3.6 Acidez del suelo

La reacción del suelo (acidez o alcalinidad) es una de las características químicas del suelo más importantes e influye sobre la disponibilidad de nutrientes para las plantas. El exceso de acidez del suelo influye negativamente en el desarrollo de las plantas. Bajo esta condición ocurren efectos como: toxicidad de aluminio y manganeso, deficiencia de calcio, magnesio y molibdeno, y la disminución de la actividad de los microorganismos.

Los suelos son considerados ácidos si tienen un pH por debajo de 7 y se subclasifican según el grado de acidez. Los suelos ácidos se encuentran generalmente en las regiones húmedas. En esos suelos la concentración de iones en solución de H^+ excede los iones de OH^- . Los suelos con exceso de acidez se caracterizan por bajos niveles disponibles de calcio, fósforo, magnesio y molibdeno; además contienen niveles de aluminio y manganeso que son tóxicos para la leguminosa.

La leguminosa y el *Rhizobium*, así como su interacción, son variablemente susceptibles al pH de suelo fuera de los rangos entre 5 y 8 (O'Hara et al., 2002). Sin embargo, en suelos con pH por encima de 6 la nodulación se puede reducir limitando la fijación de nitrógeno en especies de leguminosas sensitivas a la alcalinidad. Por otro lado Munns (1965) reportó un pobre crecimiento de *Medicago sativa* en varios suelos ácidos sin encalar, y en suelos de pH entre 5.5 y 6.0; la respuesta de esta especie al encalado se atribuyó a un mejoramiento en la nodulación. El autor también reportó que *Trifolium subterraneum* fue poco afectado por la acidez o la cal.

En Puerto Rico el café se cultiva en suelos ácidos, de baja fertilidad y altamente erosionables, con declives de 20 a 40%. La mayor parte del cultivo se encuentra en suelos del orden Ultisol de la serie Humatas (arcilloso, mixto, isohipertérmico, Typic Haplohumults) (Muñiz-Torres y Monroig-Inglés, 1994). Se ha estimado que esta serie representa el 50.4% de los Ultisoles en Puerto Rico (Cruz y Schröder, 2006). La adaptación de algunas especies

arbóreas y la fijación biológica de nitrógeno podrían verse limitadas por la acidez de estos suelos.

La aplicación de cal en los suelos ácidos tiene el potencial de disminuir los efectos negativos de estos suelos, mejorando el crecimiento de *Rhizobium* y reduciendo los niveles de manganeso y aluminio. En un experimento con *Leucaena leucocephala* durante once semanas en Ultisoles y Oxisoles, Blair et al. (1988) observaron que en ambos suelos la aplicación de carbonato de calcio (CaCO_3) y carbonato de estroncio (SrCO_3) el pH y redujo el aluminio intercambiable. Los autores encontraron que la respuesta de la *Leucaena* a la enmienda fue variable en ambos suelos.

En Puerto Rico, Abruña et al. (1965) reportaron que el encalado no tuvo efecto significativo en los rendimientos de café cultivado a pleno sol en suelos de las series Alonso arcilloso y Los Guineos arcilloso. Sin embargo, los autores reportan un incremento en el contenido de calcio y una disminución en el contenido de manganeso. También el encalado incrementó el pH y las bases intercambiables, y disminuyó marcadamente el contenido de aluminio intercambiable del suelo.

3.7 Medición de la fijación biológica de nitrógeno en árboles

Para asegurar un manejo y beneficios adecuados de la simbiosis leguminosa-*Rhizobium*, es necesario cuantificar la cantidad de nitrógeno fijado en este proceso. Esto permitirá la manipulación tanto del macro- y micro-simbionte, como de los factores agronómicos para maximizar la fijación de nitrógeno. Por tal razón es necesario utilizar un método de medición que sea adecuado en cualquier programa dirigido a incrementar la fijación de nitrógeno atmosférico (Hardarson y Danso, 1993).

De acuerdo con Danso et al. (1992) la determinación de la fijación de nitrógeno en árboles es mucho más complejo que en leguminosas anuales. Sostienen que la dificultad se presenta cuando se tienen que muestrear árboles completos o establecer controles adecuados durante varios años. Por esta razón muchos investigadores han realizado experimentos con árboles en tiestos y por tiempos relativamente cortos. Este tipo de experimentos tienen sus limitaciones: no se puede determinar durante cuánto tiempo esos árboles estarán fijando nitrógeno, ni cuáles son los efectos de la descomposición de raíces y hojas y la fijación de nitrógeno en la fertilidad del suelo.

Existen diferentes métodos para la cuantificación de la fijación de nitrógeno atmosférico. El más adecuado será aquel que responda a la disponibilidad de los recursos y a los objetivos de un determinado experimento. Los métodos más comúnmente utilizados para estimar la fijación de nitrógeno son: rendimiento de materia seca, la diferencia de nitrógeno total, reducción de acetileno (ARA), el método de la abundancia natural de ^{15}N y la técnica de isótopo de ^{15}N . Estos métodos han sido descritos y discutidos por varios autores (Hardarson, et. al., 1987; Peoples et al., 1989; Hardarson, 1990; Danso et al., 1992; Hardarson y Danso, 1993; Valles-de la Mora et al., 2003).

3.7.1 Método del rendimiento de la materia seca

Debido a que el nitrógeno usualmente es el factor más limitante en el crecimiento de las plantas, el rendimiento en materia seca de las leguminosas debería estar positivamente correlacionado con la cantidad de nitrógeno fijado. Este método es comúnmente usado para seleccionar grandes cantidades de cepas de *Rhizobium* y líneas de plantas leguminosas. Tiene la ventaja de que es económico y simple, y no es destructivo siempre que se recoja material fresco y la planta pueda replantarse para la producción de semillas. Una de las desventajas de este método es que no toma en cuenta el nitrógeno presente en ese suelo al momento de sembrar la leguminosa (Hardarson y Danso, 1993).

3.7.2 Método de la diferencia del nitrógeno total

Con este método se cuantifica el porcentaje de nitrógeno total usando una planta fijadora y una no fijadora o control (Hardarson y Danso, 1993). Se basa en estimar cuanto del nitrógeno total en la planta fijadora fue acumulado del suelo; la diferencia es atribuida al nitrógeno fijado. El total de nitrógeno en la planta no fijadora o control es asumido como el nitrógeno acumulado del suelo en la planta fijadora (Danso et al., 1992). La principal desventaja de este método es que tanto la leguminosa como la planta control deben absorber la misma cantidad de nitrógeno del suelo. Debido a que esto generalmente no sucede, las estimaciones de nitrógeno fijado pueden no ser las correctas (Hardarson y Danso, 1993).

3.7.3 Método de reducción de acetileno (ARA)

Uno de los avances más importantes en la metodología en la investigación del nitrógeno del suelo desde el 1966 ha sido la introducción del método de reducción de acetileno para medir la actividad de la nitrogenasa (Bremner y Hauck, 1982). Se basa en la medición de la actividad de la nitrogenasa, una enzima responsable de reducir el N_2 atmosférico en NH_3 , que también reduce el gas acetileno (C_2H_2) en etileno (C_2H_4) (Schöllhorn y Burris, 1967a y 1967b). Esta enzima es sintetizada por los bacteroides en los nódulos de las plantas y la reducción molecular (de N_2 a NH_3) ocurre en el citoplasma de los bacteroides (Somasegaran y Hoben, 1994).

La actividad de la nitrogenasa se mide mediante un procedimiento de cromatografía de gases propuesto por Hardy y Knight (1967). Se basa en el uso de un detector de ionización de llama para medir la reducción de acetileno a etileno por la enzima en estudios de suelo y de plantas (Hardy et al., 1968, 1973).

El método consiste en colocar la muestra (raíces de la planta) en frascos de incubación herméticamente cerrados a los que se les extrae 5 o 10% de la atmósfera. Se

inyecta una cantidad equivalente de acetileno y se deja incubar por 30-45 min. (Somasegaran y Hoben, 1994) o por 60 min (Santana, 2007). Después de la incubación se extrae una muestra de 1.0 ml de gas y se inyecta en el cromatógrafo de gases (Somasegaran y Hoben, 1994; Santana, 2007). El gas inyectado pasa por una columna de acero inoxidable llena de Porapak N (un polímero poroso) la cual permite la separación de C_2H_2 y C_2H_4 usando N_2 como gas transportador. Debido a los distintos tiempos de retención que tienen diferentes gases en la columna, el cromatógrafo registrará los picos en orden de aparición (Somasegaran y Hoben, 1994). La reducción se cuantifica a través de la lectura de los picos de concentración de ambos gases (Valles-de la Mora et al., 2003).

3.7.4 Método de la abundancia natural de ^{15}N

El método se basa en las diferencias en la abundancia natural de ^{15}N entre el nitrógeno atmosférico (0.3663% átomos ^{15}N) y el nitrógeno del suelo. Debido a que el nitrógeno del suelo es ligeramente más abundante en ^{15}N que el nitrógeno de la atmósfera, se espera que las plantas no fijadoras, cuya fuente primaria de nitrógeno es el derivado del suelo, tengan más ^{15}N que las plantas fijadoras que toman el N_2 de la atmósfera y del suelo. La separación de los isótopos ^{14}N y ^{15}N se puede hacer mediante la espectrometría de emisión o de masas (Valles-de la Mora et al., 2003).

Dentro de las desventajas o limitantes de este método se encuentran la necesidad de un espectrómetro de masas preciso y procedimientos analíticos meticulosos. Además, se necesita medir el factor de discriminación (el valor B) en las leguminosas durante la fijación de N_2 . Otra desventaja es que la técnica es insensible si el $\delta^{15}N$ del suelo es cercano al $\delta^{15}N$ del aire y se sugiere que el $\delta^{15}N$ del suelo sea mayor a 5. Por otro lado, la variabilidad en el campo puede ser considerable en algunos casos (Valles-de la Mora et al., 2003).

3.7.5 La técnica del isótopo del ^{15}N

Implica el cultivo de una planta fijadora y una no fijadora (referencia), en un suelo al que se ha aplicado determinada cantidad de fertilizante enriquecido con ^{15}N (Hardarson y Danso, 1993). La aplicación de ^{15}N en el suelo incrementa la diferencia de ^{15}N entre el nitrógeno del suelo y el N_2 . Esto aumenta la facilidad para detectar el ^{15}N en las plantas y la oportunidad de obtener estimados más precisos de la fijación de nitrógeno (Danso et al., 1992).

La técnica supone que el crecimiento y la absorción de nitrógeno añadido y del suelo, es similar en la planta fijadora y en la no fijadora. Dentro de las limitantes de esta técnica se encuentran la necesidad de alto nivel de entrenamiento del personal para evitar contaminaciones cruzadas. También, la baja disponibilidad de espectrómetros de masas en países en desarrollo, los altos costos de equipo para medir ^{15}N , así como del fertilizante enriquecido, entre otras (Valles-de la Mora et al., 2003).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Localización del experimento

El experimento se realizó en los invernaderos del Laboratorio de Fijación Biológica de Nitrógeno del Departamento de Agronomía y Suelos. Estos invernaderos están localizados en la Finca Alzamora de la Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez. Geográficamente están ubicados en 18°13'09.1" latitud Norte y 067°08'55.8" longitud Oeste, a una altitud de 22 m sobre el nivel del mar. La temperatura promedio es de 28 °C (82 °F).

4.2 Descripción y procedencia del Suelo

En la zona cafetalera de Puerto Rico predominan los siguientes órdenes de suelo según el área que ocupan (Muñiz-Torres y Monroig-Ingles, 1994):

- Ultisol, serie Humatas (arcilloso, mixto, isohipertérmico, Typic Haplohumults), ácidos y de baja fertilidad.
- Oxisol, serie Los Guineos (muy fino, mixto, isotérmico, Inceptic Hapludox), ácidos y de baja fertilidad).
- Inceptisol, serie Caguabo (lómico, mixto, isohipertérmico, Lithic Eutropepts), de poca profundidad y con riesgo de alta erosión y deslizamientos.

Para seleccionar el suelo se tomó como criterio su representatividad en la zona cafetalera de Puerto Rico. Se utilizó un suelo del orden Ultisol, de la serie Humatas. El orden Ultisol, ha sido estimado que está presente en el 41.6% del área cafetalera. Dentro de los Ultisoles, se estima que la serie Humatas ocupa 36,017 ha (50.4% de los Ultisoles) (Cruz y Schröder, 2006).

El suelo se extrajo de los primeros 30 a 40 cm (12 a 16 pulg.) de una zona no cultivada localizada entre los 18°10'45.1" latitud norte y 66°47'55.3" longitud Oeste, en la Subestación Experimental de Adjuntas, Universidad de Puerto Rico. La precipitación anual promedio es de 1893 mm (74.5 pulg.); la temperatura máxima promedio es de 28 °C (82°F) y la mínima es de 10 °C (50°F) (Universidad de Puerto Rico, Subestación Experimental de Adjuntas. [http:// eea.uprm.edu/adjuntas/infgen. shtm](http://eea.uprm.edu/adjuntas/infgen.shtm)).

4.3 Análisis del suelo

Antes del establecimiento del experimento se tomaron submuestras del suelo traído de Adjuntas y se mezclaron para hacer una muestra compuesta. La muestra se secó al aire y se tamizó por una malla de 2.0 mm para su posterior análisis de pH, aluminio intercambiable, nitrógeno total, fósforo, potasio, calcio, magnesio, manganeso, zinc, y materia orgánica. La muestra se analizó en el Laboratorio Central Analítico de la Estación Experimental Agrícola de la Universidad de Puerto Rico.

El pH se determinó en agua (2:1). La materia orgánica se determinó exponiendo la muestra a dicromato de potasio y ácido sulfúrico con sulfato de plata como catalizador, utilizando sulfato ferroso para titular la solución hasta obtenerse un color rojo (Modificación del método Walkley & Black). Para el nitrógeno total, la muestra se digirió en ácido sulfúrico, utilizando selenio como catalizador. El amoníaco en solución se calentó en presencia de salicilato e hipoclorito. Se utilizó tartrato de potasio y sodio, y EDTA.

El aluminio intercambiable se analizó según el método propuesto por Thomas (1982) (Hendershot et al., 1993). Para el fósforo disponible se utilizó solución extractora de Bray II. Para potasio, calcio, magnesio y sodio intercambiables, se utilizó la solución extractora de acetato de amonio y se determinaron por la técnica de absorción atómica. El hierro, manganeso, zinc y cobre de la muestra se extrajeron con solución de DTPA y se

determinaron las concentraciones por la técnica de absorción atómica. El nitrato y el amonio se extrajeron con solución de cloruro de potasio y la concentración se determinó por colorimetría. El boro se determinó por el método de Azometina-H. Para el sulfato se usó cloruro de bario acidificado y se determinó por turbidimetría. La textura se determinó utilizando oxalato de sodio y se utilizó un hidrómetro para determinar la densidad de las partículas suspendidas en la solución de oxalato. Las lecturas del hidrómetro se corrigieron para temperatura.

También se determinó el número de rizobios viables en el suelo mediante el conteo de infección de plantas conocido como Número Más Probable (NMP) (Somasegaran y Hoben, 1994). Para esta prueba se utilizaron plantas de siratro (*Macroptilium atropurpureum*) cultivadas en tubos con medio de cultivo sin nitrógeno (Jensen).

Para no alterar la población nativa de rizobios presente en el suelo, éste no se esterilizó. Se tamizó en un tamiz con abertura de 4.5 cm² y luego se echó en tiestos de polipropileno negro. Cada tiesto contenía 10 kg (22 lb) de suelo.

4.4 Especies de leguminosas arbóreas

Para fines del experimento se prepararon semillas de 28 especies de leguminosas arbóreas. Las semillas fueron obtenidas del banco de semillas del Laboratorio de Fijación de Nitrógeno, de árboles sanos localizados mediante puntos de coordenadas (GPS) en diferentes lugares de Puerto Rico, de ECHO (Educational Concerns for Hunger Organization, <http://www.echotech.org/mambo/>) y de la República Dominicana. Dentro de las especies se incluyeron las que se usan para sombra en las fincas de café (Arango 2007) y otras estudiadas por Santana (2007). Como control se utilizó la especie *Cassia javanica* la cual pertenece a la subfamilia *Caesalpinioideae* y no nodula. En el Cuadro 1 se muestra una lista de las especies que se utilizaron en el presente estudio.

Cuadro 1. Especies utilizadas en el experimento fijación de nitrógeno en leguminosas arbóreas en un Ultisol con cal y nutrientes en Puerto Rico

Sub-familia	Especie (origen)	Nombre común en Puerto Rico
Mimosoideae	<i>Acacia angustissima</i>	Nd
	<i>Acacia auriculiformis</i>	Nd
	<i>Acacia mangium</i> (NA)	Nd
	<i>Adenantha pavonina</i> (NA)	Coralitos
	<i>Albizia lebeck</i> (NA)	Acacia amarilla
	<i>Albizia procera</i> (NA)	Albicia
	<i>Anadenanthera peregrina</i> (NA)	Cojóbana, Cojobilla
	<i>Calliandra calothyrsus</i>	Nd
	<i>Calliandra houstoniana</i>	Nd
	<i>Cojoba arborea</i> (N)	Cojoba, Tamarindillo
	<i>Enterolobium cyclocarpum</i> (NA)	Dormilón, Oreja de mono
	<i>Inga vera</i> (N)	Guaba
	<i>Inga nobilis</i> subsp. <i>quaternata</i> ² (NA)	Guamá venezolano
	<i>Leucaena diversifolia</i> (NA)	Nd
	<i>Leucaena leucocephala</i> K-500 (NA)	Zarcilla
	<i>Pithecellobium carbonarium</i> (NA)	Carbonero
	<i>Pithecellobium dulce</i> (NA)	Guamá americano
<i>Samanea saman</i> (NA)	Dormilón, Samán	
Papilionoideae	<i>Andira inermis</i> (N)	Moca
	<i>Clitoria fairchildiana</i> (NA)	Nd
	<i>Dalbergia sissoo</i> (NA)	Siso
	<i>Erythrina poeppigiana</i> (NA)	Brucayo, Bucayo gigante
	<i>Erythrina berteroana</i> (NA)	Bucayo enano
	<i>Flemingia macrophylla</i>	Nd
	<i>Gliricidia sepium</i> (NA)	Madre de cacao, Mata ratón
	<i>Ormosia krugii</i> (N)	Palo de matos, Peronía
	<i>Pterocarpus indicus</i> (NA)	Terocarpo
	<i>Sesbania grandiflora</i> (NA)	Báculo, Cresta de gallo, gallito
Caesalpinioideae	<i>Cassia javanica</i> (NA)	Acacia rosada

¹ Origen según Molina y Alemañy (1997), N: Nativa NA: Naturalizada. ² Esta especie se sembró tres meses después de las demás especies.

Nd.- no disponible.

Fotos: <http://plants.usda.gov/index.html>; <http://www.ildis.org/>

4.5 Pre-germinación de semillas

Para su pre-germinación, las semillas se colocaron en papel absorbente humedecido con agua esterilizada y en la oscuridad a 28°C. Previamente, las semillas de testa dura se escarificaron en una solución de ácido sulfúrico al 70% durante 6 minutos y después se enjuagaron en agua destilada cuatro veces consecutivas durante un minuto cada vez. Este procedimiento se utilizó para asegurar la cantidad necesaria de semillas pre-germinadas. De cada especie se sembraron 3 a 5 semillas por tiesto. Después que las plantas alcanzaron una altura de 20 cm se dejó solo una en el tiesto, las demás se eliminaron cortándolas por la base del tallo.

4.6 Determinación de la cantidad de CaCO_3

La cal se obtuvo de una planta de procesamiento de cal del Departamento de Agricultura de Puerto Rico en Ciales. La cantidad de cal a aplicar se determinó con el procedimiento sugerido por Abruña y Vicente (1955). Según este procedimiento, se tomaron muestras de 10 g de suelo tamizado a 2 mm. El suelo se diluyó en 100 ml de agua destilada, y se añadieron cantidades variables de una solución 0.05 N de Ca(OH)_2 . La muestra se calentó durante 5 minutos y luego se dejó enfriar en una bandeja con agua a temperatura ambiente. Se midió el pH de la suspensión con un medidor de pH y con estos datos se hizo una curva de calibración relacionando el pH con la cantidad de cal. De esta manera mediante una curva de encalado, se determinó la cantidad de cal necesaria para incrementar el pH a 6.45 (Apéndice 1).

4.7 Diseño experimental

El experimento consistió en un diseño en parcelas divididas en bloques completos aleatorizados con cuatro repeticiones. Los niveles de la parcela principal fueron dos: a) con enmienda (6.3 g de $\text{CaCO}_3 \text{ kg}^{-1}$ de suelo con una única aplicación al inicio del experimento, más 1.0 ml kg^{-1} de suelo de la solución nutritiva de Fåhraeus sin nitrógeno (Cuadro 2) (Somasegaran y Hoben, 1994) aplicado mensualmente a partir del segundo mes después de la siembra; y b) sin enmienda. Los niveles de las sub-parcelas fueron las especies de leguminosas: 29 especies. Dentro de las 29 especies se incluye a *Inga nobilis* subsp. quaternata por ser una planta de importancia. Las semillas de esta especie se sembraron tres meses después de la siembra de las demás especies. Esto fue debido a que al inicio del experimento, no había semillas disponibles y éstas debían sembrarse inmediatamente se extrajeran de los frutos ya que son semillas recalcitrantes.

Cuadro 2. Solución nutritiva de Fåhraeus sin nitrógeno (1957) (Somasegaran y Hoben, 1994).

Elemento nutritivo	Cantidad (g l de agua ⁻¹)	Cantidad aplicada (g kg de suelo ⁻¹)	Cantidad aplicada del elemento (g kg de suelo ⁻¹)
CaCl_2	0.100	1×10^{-3}	$\text{Ca} = 2.7 \times 10^{-4}$
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.120	1.2×10^{-3}	$\text{Mg} = 2.4 \times 10^{-4}$ $\text{S} = 3.2 \times 10^{-4}$
KH_2PO_4	0.100	1×10^{-3}	$\text{K} = 2.8 \times 10^{-4}$ $\text{P} = 2.3 \times 10^{-4}$
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.150	1.5×10^{-3}	$\text{Na} = 4.8 \times 10^{-4}$ $\text{P} = 3.3 \times 10^{-4}$
Citrato férrico	0.005	5×10^{-5}	$\text{Fe} = 1.1 \times 10^{-5}$
Microelementos	1.0 ml	1×10^{-2}	
B	0.5 μg	5×10^{-9}	5×10^{-9}
Mn	0.5 μg	5×10^{-9}	5×10^{-9}
Zn	0.05 μg	5×10^{-10}	5×10^{-10}
Mo	1.0 μg	1×10^{-8}	1×10^{-8}
Fe	100 μg	1×10^{-7}	1×10^{-7}
Co	0.0005 μg	5×10^{-6}	5×10^{-6}

4.8 Manejo y duración del experimento

Los tiestos con el suelo se colocaron en mesas de metal dentro de un invernadero. Se midió la temperatura máxima y mínima del aire en el interior del invernadero. El experimento tuvo una duración de 180 días desde la siembra a la cosecha de las plantas. Las semillas pregerminadas se sembraron entre el 15 enero y el 8 de febrero del 2008. Durante el experimento las plantas se regaron con agua corriente de forma regular para mantener un nivel adecuado de humedad en el suelo. El control de malezas y de insectos como cochinilla, áfidos y saltamontes, se hizo manualmente y no se aplicaron plaguicidas. Transcurridos 180 días después de la siembra, las plantas se extrajeron de los tiestos y se eliminó el suelo con agua corriente evitando dañar las raíces y los nódulos.

4.9 Variables estudiadas y recolección de datos

4.9.1 Población de *Rhizobium* en el suelo

La población de *Rhizobium* se determinó por la técnica del número más probable (Somasegaran y Hoben, 1994). Se tomaron 10 g de suelo sin tamizar y se homogeneizó agitando en 90 ml de agua esterilizada (dilución 10^{-1}). A partir de esta dilución se hizo una dilución seriada desde 4^{-1} a 4^{-8} . De cada dilución se inocularon cuatro plantas de siratro (*Macroptilium atropurpureum*) cada una en un tubo de ensayo con un medio de cultivo sin nitrógeno (Jensen).

Las plantas de siratro se dejaron crecer a temperatura ambiente bajo luz fluorescente y seis semanas después se contó el número de plantas noduladas (+) en cada dilución. Con el número total de plantas noduladas se buscó el número estimado de rizobios en la tabla A14.5 de Somasegaran y Hoben (1994). Este valor se utilizó para calcular el número más probable de rizobios viables en el suelo mediante la fórmula 1 (Somasegaran y Hoben, 1994):

$$\chi = \frac{md}{v} \quad (1)$$

Donde χ = número de rhizobios g^{-1} de suelo seco;

m = valor de la tabla A14.5 de Somasegaran y Hoben (1994)

d = recíproco de la dilución más baja

v = volumen en ml de la dilución del suelo aplicado a cada planta de siratro

Debido a que el suelo se diluyó 1:10 antes de la dilución seriada, el resultado de la fórmula se multiplicó por 10.

4.9.2 Altura y diámetro del tallo de las plantas

Con el propósito de seleccionar la especie de más rápido crecimiento, mensualmente se midió la altura (cm) y el diámetro del tallo (mm). La altura se midió desde el nivel del suelo al brote apical, mientras que el diámetro del tallo se midió a la altura del borde superior del tiesto (aproximadamente 7 cm del nivel del suelo en el tiesto). La primera evaluación se hizo en marzo y la última en julio-agosto (180 días después de la siembra).

4.9.3 Longitud de las raíces

Se midió la longitud en centímetros de la raíz principal de las plantas en cada especie. Esta medición se hizo desde el cuello o corona hasta la punta de la raíz.

4.9.4 Peso seco

Para medir esta variable, el tallo y la raíz por separado se colocaron en un horno a 75°C durante 24 horas para su secado. Esta variable de peso seco se correlacionó con la altura y el diámetro del tallo en cada especie.

4.9.5 Número de nódulos

Se contaron los nódulos en las raíces de cada especie. Las raíces se lavaron con agua corriente para eliminar el suelo y se contó el número de nódulos presentes en cada planta. El conteo se hacía desprendiendo los nódulos de las raíces y colocándolos en bandejas pequeñas de aluminio.

4.9.6 Peso seco de los nódulos

Los nódulos se removieron de las raíces y se colocaron en cajas pequeñas de aluminio; luego se colocaron en un horno a 75°C durante 12 horas. Esta variable se correlacionó con el número de nódulos, la actividad de la nitrogenasa y el peso seco de la planta.

4.9.7 Actividad de la nitrogenasa

Esta variable se midió mediante el método de reducción de acetileno (Acetylene Reduction Assay, ARA). Las raíces se separaron de la parte aérea y se introdujeron en frascos de plástico de 1000 ml. Los frascos se cerraron herméticamente con tapas en cuyo centro tenían tapones de caucho. Con una aguja hipodérmica y a través del tapón de caucho, se extrajo el 10% (100 ml) del volumen de aire dentro de cada frasco. Este volumen se sustituyó por 100 ml de acetileno a una concentración de 99.8%. Los frascos se dejaron incubar a temperatura ambiente (25 °C) durante una hora.

Después de la incubación se extrajeron dos muestras de 1 ml del aire de cada frasco, con agujas hipodérmicas de 1 ml. La muestra se inyectó en un cromatógrafo de gases Agilent® 6850 (detector: ionización de llama; flujo H₂: 30 ml min⁻¹ a 200 °C; columna: empacada de acero 1 m x 2mm I.D., Porapak R, malla 100-200; Temperatura del horno: 50°C; gas transportador: nitrógeno (N₂); flujo: 25.8 ml min⁻¹). Se registraron los picos de etileno y a partir de estos se hizo una curva de calibración y se calculó la reducción de acetileno (C₂H₂) a etileno (C₂H₄) en nmol planta⁻¹ hora⁻¹ (actividad de la nitrogenasa).

4.9.8 Aislamiento y caracterización de las especies de *Rhizobium*

Para esta variable se utilizó el procedimiento sugerido por Somasegaran y Hoben (1994). Los nódulos se esterilizaron primero en una solución de etanol (95%) y después en hipoclorito de sodio (3% v/v). Los nódulos se trituraron y los bacteroides de su interior se aislaron en el medio LMA (Levadura-Manitol-Agar: extracto de levadura: 0.5 g l⁻¹; Manitol : 10.0 g l⁻¹; MgSO₄: 0.20 g l⁻¹; K₂HPO₄: 0.50 g l⁻¹; NaCl: 0.10 g l⁻¹; Agar: 15.0 l⁻¹) suplementado con Rojo Congo (10.0 ml l⁻¹ de LMA). Luego se evaluaron en LMA suplementado con Azul de Bromotimol (5.0 ml l⁻¹ de LMA). Los aislados se incubaron a 28° C durante 7 días en la oscuridad. Después de siete días de incubación se observó el cambio de pH de la colonia en el medio de cultivo.

4.10 Análisis estadístico

Se hicieron pruebas de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas. Cuando se cumplían los supuestos, se realizó un análisis de varianzas (ANAVA) para probar si existían diferencias entre tratamientos a un nivel de significancia del 5%. Para la comparación de las medias de tratamientos se utilizó la prueba de Tukey al 5% de significación. Cuando los supuestos no se cumplían se realizó transformación a raíz cuadrada o a log₁₀ para homogeneizar las varianzas y entonces realizar el ANAVA. Debido a que hubo una alta mortalidad de plantas de *Phithecellobium carbonarium*, esta especie no se tomó en cuenta para el análisis estadístico. Por lo tanto el análisis abarcó 28 especies.

Para la altura mensual se hizo un análisis de varianzas para cada una de las 28 especies por separado, con el fin de dectar la interacción enmienda por tiempo. Las especies que no fueron significativas para la interacción, se agruparon en un análisis de varianzas conjunto. De esta manera se pudo identificar la especie de mayor crecimiento dentro de las que no respondieron a la enmienda.

5. RESULTADOS

5.1 Análisis del suelo

El suelo tenía un pH muy ácido y un bajo porcentaje de materia orgánica. El nitrógeno total también fue muy bajo (Cuadro 3). Esto indica la representatividad del suelo que se usó en el experimento, según lo reportado para los suelos bajo cultivo de café en Puerto Rico.

Cuadro 3. Análisis del suelo Humatas utilizado en el experimento

Variable	Valores
pH	4.08
Materia orgánica (%)	0.92
Nitrógeno total (%)	0.06
Aluminio intercambiable ($\text{cmol}_{(+)}$ kg^{-1})	5.28
Fósforo (mg kg^{-1})	3.52
Calcio ($\text{cmol}_{(+)}$ kg^{-1})	0.85
Magnesio ($\text{cmol}_{(+)}$ kg^{-1})	0.51
Potasio ($\text{cmol}_{(+)}$ kg^{-1})	0.24
Nitratos (mg kg^{-1})	184
Amonio (mg kg^{-1})	22.4
Manganeso (mg kg^{-1})	27
Sulfato (mg kg^{-1})	122
Sodio (mg kg^{-1})	47
Zinc (mg kg^{-1})	1.59
Boro (mg kg^{-1})	0.427
Cobre (mg kg^{-1})	1.38
Arcilla (%)	40.80
Limo (%)	42.20
Arena (%)	17.00

La cal aumentó el pH del suelo en los tratamientos con enmienda. Los valores del pH fueron: 4.08, 6.3 y 7.26 antes, cuatro meses después y ocho meses después de encalar, respectivamente. Esto indica que la cal continuó reaccionando en el suelo observándose una tendencia a la estabilización del pH (Figura 1).

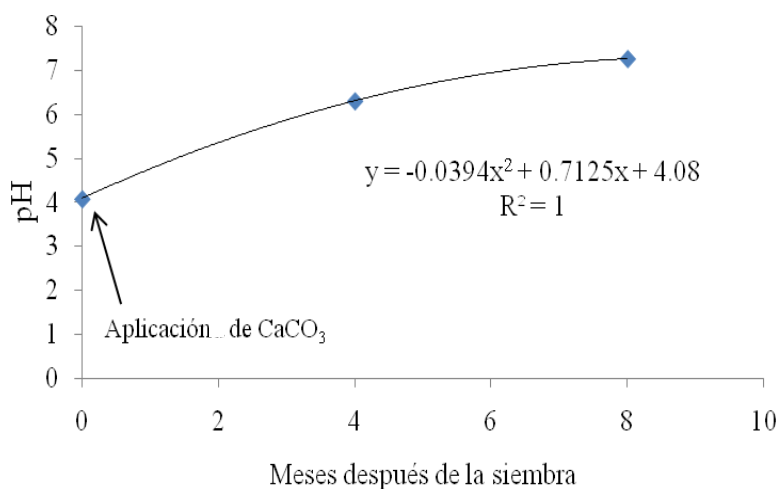


Figura 1. Relación entre el pH del suelo y el tiempo después de encalar

5.2 Población de *Rhizobium* en el suelo

En la prueba del número más probable (NMP), con una dilución seriada del suelo de 4^{-1} a 4^{-8} y con cuatro repeticiones por dilución, se observaron 12 plantas de siratro (*Macropodium atropurpureum*) con nódulos. De acuerdo a la prueba NMP, la población de rizobios nativos en el suelo Humatas usado en el experimento fue de 4.5×10^3 células g^{-1} de suelo seco.

5.3 Altura y diámetro del tallo de las plantas

5.3.1 Altura mensual

La interacción enmienda por tiempo fue significativa en la altura mensual para *L. diversifolia* ($p=0.0135$), *D. sissoo* ($p=0.0061$) y *E. poeppigiana* ($p<0.0001$). Las tres especies tuvieron mayor altura a través del tiempo en el suelo con enmienda, evidenciando un efecto positivo de ésta sobre el crecimiento (Cuadro 4, Figuras 2, 3 y 4).

Cuadro 4. Resumen de análisis de varianza para las tres especies con significancia en la interacción enmienda x tiempo

Especies	gl	CM	CME	P valor	CV (%)
<i>L. diversifolia</i>					25.13
Enmienda	1	6451.60	2495	0.2062 ns	
Tiempo	4	10607.46	200.95	<0001**	
Enmienda × tiempo	4	3167.65		0.0135*	
<i>D. sissoo</i>					31.88
Enmienda	1	6630.63	1425.29	0.1199 ns	
Tiempo	4	5587.23	149.27	<0001**	
Enmienda × tiempo	4	700.75		0.0061**	
<i>E. poeppigiana</i>					6.29
Enmienda	1	1166.40	13.20	0.0841 ns	
Tiempo	4	2169.04	5.29	<0001**	
Enmienda × tiempo	4	168.71		<0001**	

gl.- grados de libertad; CM.- Cuadrado Medio; CME.- Cuadrado Medio del Error
 CV.- Coeficiente de Variación; *.- Significativo al 5%, **.- Significativo al 1%,
 ns.- no significativo.

La altura de *L. diversifolia* fue significativamente mayor en el tratamiento con enmienda solo en el quinto y en el sexto mes después de la siembra (100.50 cm y 125.5 cm, respectivamente). En el segundo, tercero y cuarto mes la altura fue igual con o sin enmienda. También para *D. sissoo*, la altura fue mayor en el tratamiento con enmienda en el quinto y el sexto mes (73.25 cm y 96.25, respectivamente), mientras que en el segundo, tercero y cuarto mes, no hubo efecto de la enmienda. Sin embargo, la altura de *E. poeppigiana* fue mayor en el tratamiento con enmienda en el cuarto, quinto y sexto mes (45 cm, 54 cm y 68.75 cm, respectivamente). En el segundo y en el tercer mes, la altura fue igual con o sin enmienda (Figuras 2, 3 y 4, apéndice 2).

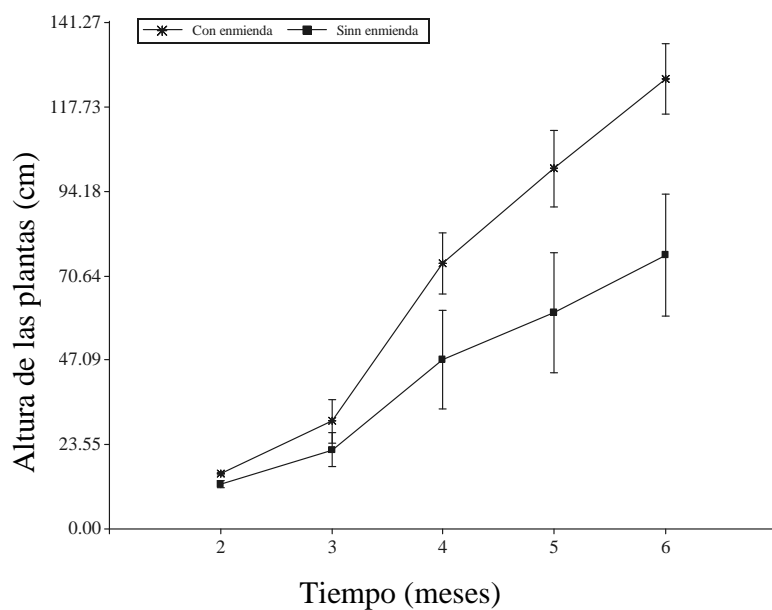


Figura 2. Altura mensual de *Leucaena diversifolia* en suelo con y sin enmienda. (Tukey, $\alpha=0.05$).

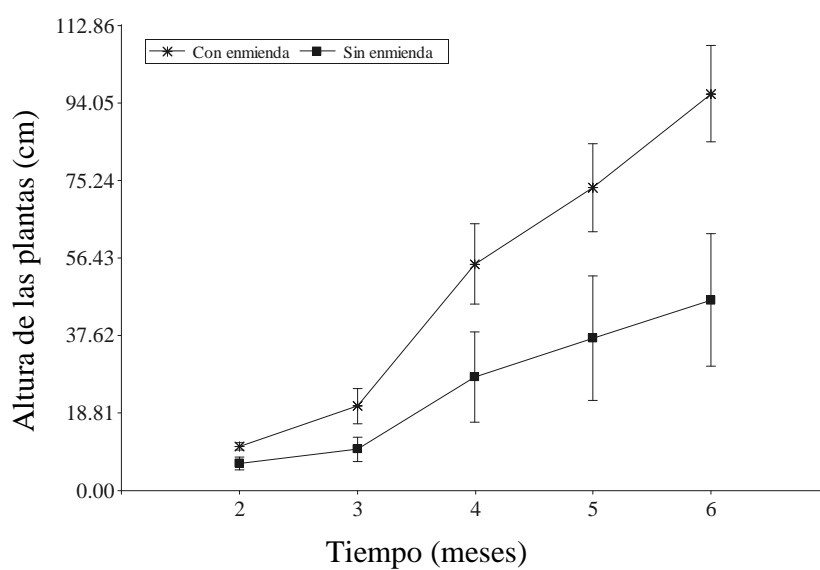


Figura 3. Altura mensual de *Dalbergia sissoo* en suelo con y sin enmienda. (Tukey, $\alpha=0.05$).

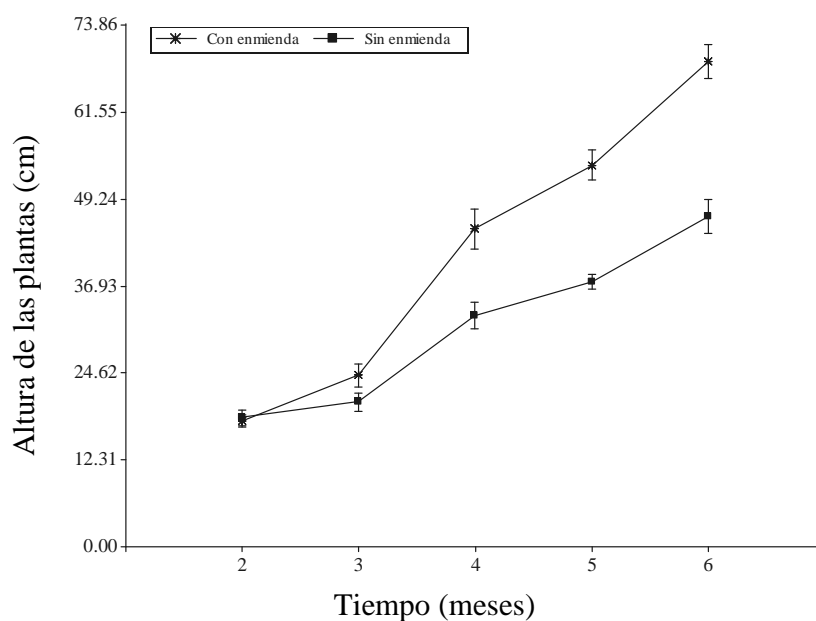


Figura 4. Altura mensual de *Erythrina poeppigiana* en suelo con y sin enmienda (Tukey, $\alpha=0.05$)

Debido a que en la mayoría de las especies no se detectaron diferencias en la interacción enmienda por tiempo, se hizo un análisis de varianza excluyendo las especies que fueron significativas para la interacción (*L. leucocephala*, *D. sissoo* y *E. poeppigiana*). En el modelo se asumió la especie como parcela principal y el tiempo como sub-parcela (análisis de medidas repetidas). El análisis reflejó diferencias estadísticas significativas ($p<0.0001$) en la interacción especie por el tiempo, en el tiempo y entre especies (Cuadro 5, apéndice 3).

Cuadro 5. Resumen de análisis de varianza de la altura mensual de las especies.
Se han excluido las especies *L. diversifolia*, *D. sissoo*, *E. poeppigiana*.

Fuente de variación	gl	CM	P valor
Especie	23	14080.17	<0.0001**
Bloque	3	138.20	0.6766 ns
Especie × bloque	69	1686.80	<0.0001**
Tiempo	4	129066.98	<0.0001**
Especie × tiempo	92	1077.85	<0.0001**
Error	768		
CV (%)	36.87		

gl.- grados de libertad; CM.- Cuadrado Medio; Cuadrado Medio del Error
CV.- Coeficiente de Variación; **.- significativo al 1%, ns.- no significativo.

La interacción significativa fue como se esperaba ya que distintas especies alcanzaron alturas diferentes a través del tiempo. La especie con mayor altura desde el primer mes de evaluación (segundo mes después de la siembra) fue *E. cyclocarpum*. También esta especie tuvo la mayor altura promedio mensual y fue estadísticamente superior a las demás, excepto para *A. peregrina* (Cuadro 6, apéndice 3).

Las especies con una altura promedio mensual mayor de 50 cm, fueron *E. cyclocarpum*, *A. peregrina*, *P. dulce*, *C. fairchildiana*, *F. macrophylla*, *L. leucocephala*, *C. houstoniana* y *S. saman* (Cuadro 6, apéndice 3).

Las especies con menor altura promedio mensual fueron *O. krugii*, y *C. arborea*. Sin embargo, ambas fueron estadísticamente iguales (Cuadro 6). El incremento promedio en altura fue de $27 \pm 18 \text{ cm mes}^{-1}$ para *E. cyclocarpum*, $17 \pm 4 \text{ cm mes}^{-1}$ para *A. peregrina* y $18 \pm 14 \text{ cm mes}^{-1}$ para *L. leucocephala*.

Cuadro 6. Altura por mes y promedio mensual de las especies del experimento (Tukey $\alpha = 0.05$) (no se incluyen *L. diversifolia*, *D. sissoo*, *E. poeppigiana* y *I. nobilis*. Esta última se sembró a los tres meses de iniciar el experimento.

Especie	Tiempo (meses)					Promedio (cm)
	2	3	4	5	6	
	Altura (cm)					
<i>E. cyclocarpum</i>	53.50	65.88	108.50	133.00	150.13	102.20
<i>A. peregrina</i>	21.5	35.00	82.37	97.12	115.63	70.32
<i>P. dulce</i>	26.00	39.75	69.63	82.50	99.37	63.45
<i>C. fairchildiana</i>	28.25	40.38	66.25	81.13	98.00	62.80
<i>F. macrophylla</i>	11.25	19.00	57.88	81.38	112.13	56.33
<i>L. leucocephala</i>	7.13	13.88	58.75	81.13	117.75	55.73
<i>C. houstoniana</i>	11.75	18.63	54.75	78.13	106.25	53.90
<i>S. saman</i>	15.13	21.13	50.75	70.50	93.63	50.23
<i>A. mangium</i>	9.00	18.63	48.13	60.63	94.25	46.13
<i>A. lebeck</i>	17.00	26.88	50.13	60.63	67.88	44.50
<i>A. angustissima</i>	8.75	17.88	40.75	59.75	83.38	42.10
<i>C. calothyrsus</i>	10.50	19.38	45.00	60.88	74.50	42.05
<i>A. procera</i>	13.88	22.63	43.00	56.38	71.75	41.53
<i>C. javanica</i>	16.75	23.50	42.75	53.75	69.38	41.23
<i>E. berteriana</i>	17.13	25.00	43.50	54.00	65.00	40.93
<i>G. sepium</i>	15.38	19.63	39.13	52.13	73.38	39.93
<i>A. inermis</i>	22.38	29.38	40.75	45.13	52.88	38.10
<i>A. pavonina</i>	12.63	17.13	58.50	47.38	59.63	35.05
<i>A. auriculiformis</i>	8.44	13.88	34.75	51.63	63.13	34.36
<i>P. indicus</i>	10.00	16.38	32.13	39.75	56.13	30.88
<i>S. grandiflora</i>	6.38	8.50	28.63	41.63	55.63	28.15
<i>I. vera</i>	8.88	13.63	26.88	34.75	49.25	26.68
<i>C. arborea</i>	9.13	11.25	16.38	17.38	22.63	15.35
<i>O. krugii</i>	8.37	10.00	11.38	15.20	14.50	11.35
	DMS = 32.7					DMS= 34.9

5.3.2 Longitud y diámetro del tallo al final del experimento

Seis meses después de la siembra se extrajeron las plantas de los tiestos y se midió la longitud y el diámetro del tallo. Para la longitud, la interacción enmienda por especie no fue significativa. No hubo un efecto de la enmienda en la altura de las especies al final del experimento. Sin embargo, hubo diferencias entre especies (Cuadro 7, apéndice 4).

Cuadro 7. Resumen del análisis de varianza para la longitud del tallo de las plantas seis meses después de la siembra.

Fuente de variación	gl	CM	P valor
Enmienda	1	6165.87	<0.0651 ns
Bloque	3	1154.02	0.1781 ns
Enmienda × bloque	3	758.96	0.3546 ns
Especie	27	12419.91	<0.0001**
Enmienda × especie	27	800.62	0.2902 ns
Error		695.43	
CV (%)	28.73		

gl.- grados de libertad; CM.- Cuadrado Medio; CME.- Cuadrado Medio del Error
CV.- Coeficiente de Variación, **.- significativo al 1%, ns.- no significativo.

Las especies con mayor longitud fueron *E. cyclocarpum* (184 cm), *L. leucocephala* (181 cm), *C. houstoniana* (147 cm), *F. macrophylla* (139 cm) y *A. peregrina* (134 cm), las cuales fueron estadísticamente iguales. Las especies con menor longitud y estadísticamente iguales fueron (de mayor a menor): *A. pavonina* (65 cm), *A. inermis* (60 cm), *E. poeppigiana* (60 cm), *I. nobilis* (49 cm), *C. arborea* (24 cm) y *O. krugii* (16 cm) (Figura 5).

De las veintiocho especies evaluadas, diez (36%) alcanzaron una longitud del tallo superior a los 100 cm en los seis meses de crecimiento. Estas especies fueron (de mayor a menor): *E. cyclocarpum*, *L. leucocephala*, *C. houstoniana*, *F. macrophylla*, *A. peregrina*, *C. fairchildiana*, *A. angustissima*, *L. diversifolia*, *P. dulce* y *S. saman* (Figura 6). De estas diez,

ocho especies pertenecen a las *Mimosoideae* y dos a las *Papilionoideae*. De las veintiocho especies, quince (53%) tenía una longitud del tallo entre 50 y 100 cm; y tres (11%) estaban por debajo de 50 cm (Figura 5, apéndice 4).

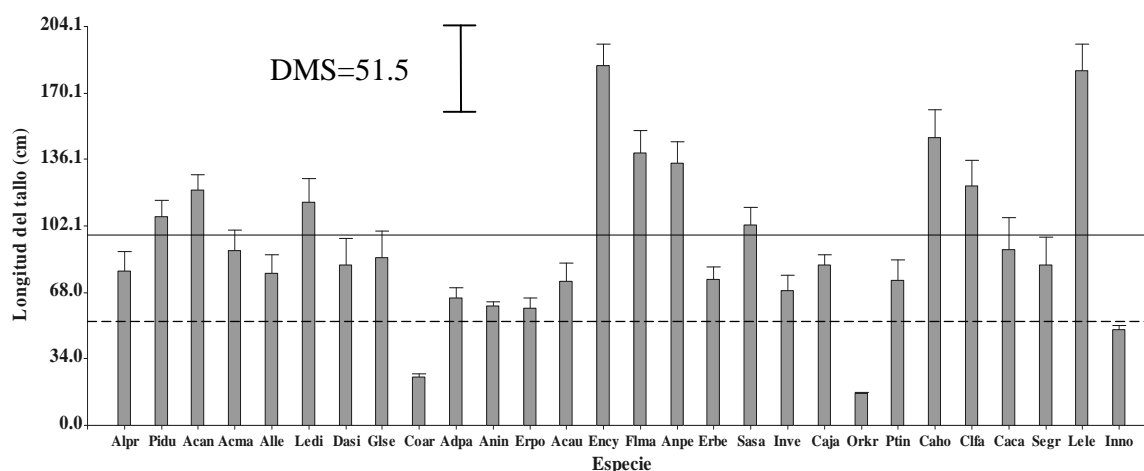


Figura 5. Longitud del tallo de las especies arbóreas al final del experimento (Tukey, $\alpha=0.05$, DMS= 51.5); **Alpr**=*A. procera*, **Pidu**=*P. dulce*, **Acan**=*A. angustissima*, **Acma**=*A. mangium*, **Alle**=*A. lebbeck*, **Ledi**=*L. diversifolia*, **Dasi**=*D. sissoo*, **Glse**=*G. sepium*, **Coar**=*C. arborea*, **Adpa**=*A. peregrina*, **Anin**=*A. inermis*, **Erpo**=*E. poeppigiana*, **Acau**=*A. auriculiformis*, **Ency**=*E. cyclocarpum*, **Flma**=*F. macrophylla*, **Anpe**=*A. peregrina*, **Erbe**=*E. berteriana*, **Sasa**=*S. saman*, **Inve**=*I. vera*, **Caja**=*C. javanica*, **Orkr**=*O. krugii*, **Ptin**=*P. indicus*, **Caho**=*C. houstoniana*, **Clfa**=*C. fairchildiana*, **Caca**=*C. calothyrsus*, **Segr**=*S. grandiflora*, **Lele**=*L. leucocephala*, **Inno**=*I. nobilis*. Las barras representan el error estándar de la media. Línea continua y discontinua, separan las plantas con altura mayor de 100, y entre 50 y 100 cm, respectivamente.

En cuanto al diámetro del tallo, en la interacción enmienda por especie y en las especies hubo diferencias estadísticas significativas ($p<0.01$) (Apéndice 5). Las especies con mayor diámetro del tallo, según la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$, DMS=3.86932) fueron: *E. poeppigiana* (con enmienda, 11 mm), *E. berteriana* (con enmienda, 10 mm; sin enmienda, 9 mm), *C. fairchildiana* (con enmienda, 8 mm; sin enmienda, 9 mm), *L. leucocephala* (con enmienda, 9 mm), *E. cyclocarpum* (con enmienda, 9 mm; sin enmienda, 8 mm) y *G. sepium* (con enmienda, 8 mm). De acuerdo con la prueba de Tukey, estas especies fueron estadísticamente iguales (Figura 6). *E. poeppigiana*, *L. leucocephala* y *G. sepium* fueron las

únicas especies que respondieron significativamente a la enmienda, siendo superiores que en el tratamiento sin enmienda (Apéndice 6).

En la figura 6 se observa que *I. vera* no fue diferente del tratamiento con y sin enmienda (5 mm y 6 mm, respectivamente). Otras especies mostraron el mismo comportamiento que *I. vera*. Dentro de estas se encuentran *A. mangium*, *F. macrophylla*, *G. sepium*, *A. auriculiformis* y *O. krugii*. Las especies con menor diámetro fueron *D. sissoo* (con enmienda, 4 mm; sin enmienda, 3 mm), *O. krugii* (con enmienda, 3; sin enmienda, 4 mm), *C. calothyrsus* (con enmienda, 4 mm; sin enmienda, 4 mm) y *A. angustissima* (con enmienda, 4 mm; sin enmienda, 4 mm) (Figura 6, apéndice 5).

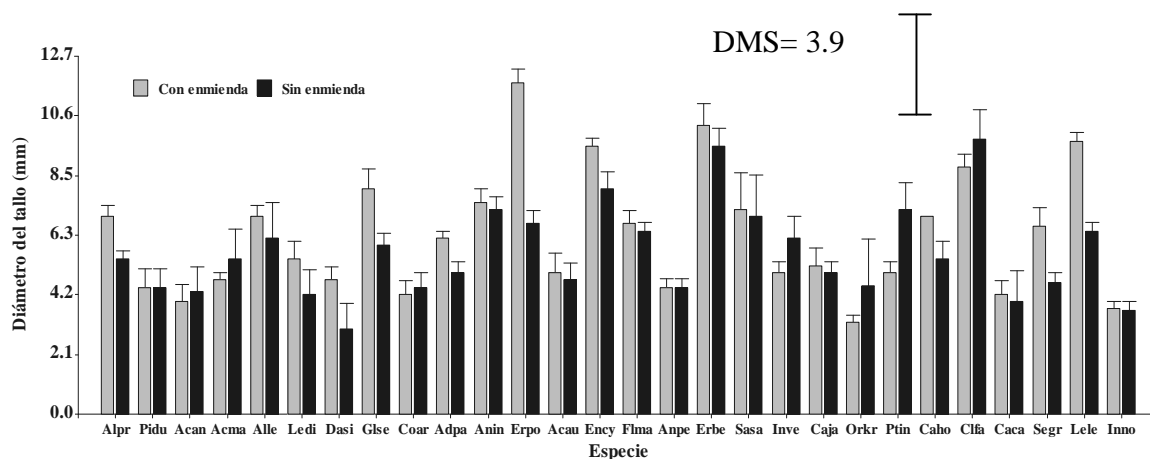


Figura 6. Diámetro del tallo de las especies arbóreas al final del experimento (Tukey, $\alpha=0.05$, DMS=3.86932); **Alpr**=*A. procera*, **Pidu**=*P. dulce*, **Acan**=*A. angustissima*, **Acma**=*A. mangium*, **Alle**=*A. lebeck*, **Ledi**=*L. diversifolia*, **Dasi**=*D. sissoo*, **Glse**=*G. sepium*, **Coar**=*C. arborea*, **Adpa**=*A. peregrina*, **Anin**=*A. inermis*, **Erpo**=*E. poeppigiana*, **Acau**=*A. auriculiformis*, **Ency**=*E. cyclocarpum*, **Flma**=*F. macrophylla*, **Anpe**=*A. peregrina*, **Erbe**=*E. berteroana*, **Sasa**=*S. saman*, **Inve**=*I. vera*, **Caja**=*C. javanica*, **Orkr**=*O. krugii*, **Ptin**=*P. indicus*, **Caho**=*C. houstoniana*, **Clfa**=*C. fairchildiana*, **Caca**=*C. calothyrsus*, **Segr**=*S. grandiflora*, **Lele**=*L. leucocephala*, **Inno**=*I. nobilis*. Las barras representan el error estándar de la media.

5.4 Longitud de las raíces

Para la variable longitud de las raíces hubo diferencias significativas entre las especies ($p < 0.0001$), pero no para la interacción enmienda por especie ($p = 0.1517$) ni entre enmienda ($p = 0.7951$) (Apéndice 6). Se observó una variación de longitud entre un máximo de 82 cm para *I. vera* y un mínimo de 20 cm para *O. krugii* (Figura 7, apéndice 6).

Se detectaron diferencias entre *I. vera* (81.9 cm) y el grupo: *A. lebbeck* (43.5 cm), *C. calothyrsus* (40.3 cm), *G. sepium* (31.9 cm), *D. sissoo* (29.6 cm), *C. arborea* (26.9 cm), *O. krugii*, *S. grandiflora* y *P. dulce*, las cuales fueron estadísticamente iguales a *A. lebbeck*, pero diferentes a las demás especies mencionadas más arriba. Asimismo, *L. leucocephala* (69.1 cm) tuvo una longitud de raíces mayor que las anteriores, excepto para *C. calothyrsus*. La especie *S. saman* (68.6 cm) presentó raíces más largas que las últimas tres especies de las mencionadas más arriba (*D. sissoo*, *C. arborea* y *O. krugii*) siendo estas las de menor longitud de raíces. Todas las demás fueron estadísticamente iguales (Figura 7, apéndice 6). De las veintiocho especies evaluadas, veintiuno (72%) tuvieron una raíz de más de 45 cm de longitud. Las especies *G. sepium*, *D. sissoo*, *C. arborea* y *O. krugii* tuvieron una longitud de raíz igual a *I. nobilis* (38 cm) que sólo tenía tres meses de edad.

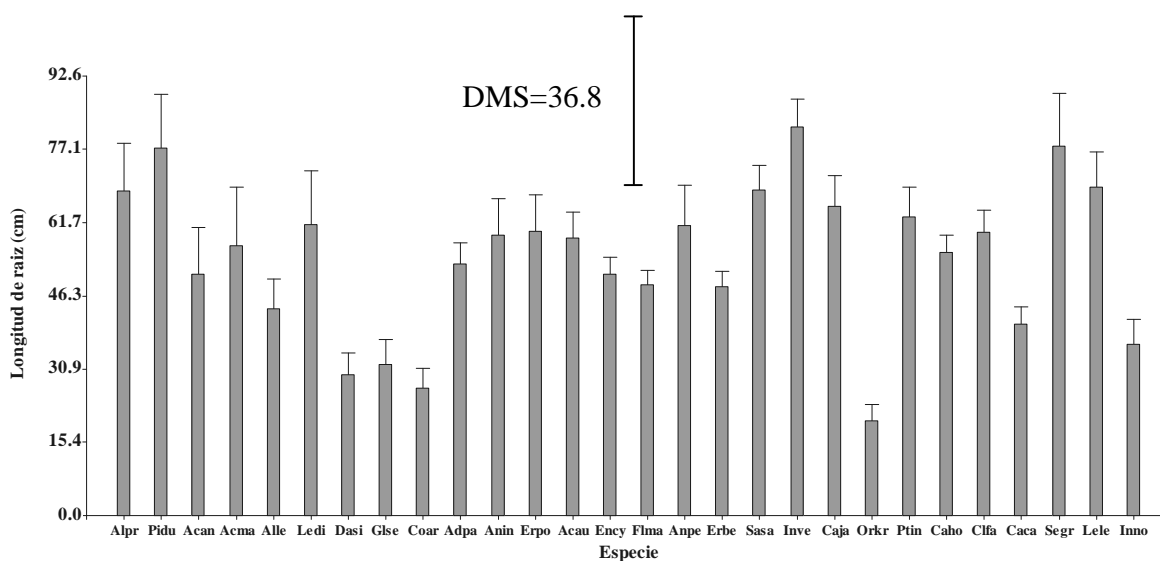


Figura 7. Longitud de las raíces de las especies arbóreas del experimento (Tukey, $\alpha=0.05$, DMS=36.81928); **Alpr**=*A. procera*, **Pidu**=*P. dulce*, **Acan**=*A. angustissima*, **Acma**=*A. mangium*, **Alle**=*A. lebbeck*, **Ledi**=*L. diversifolia*, **Dasi**=*D. sissoo*, **Glse**=*G. sepium*, **Coar**=*C. arborea*, **Adpa**=*A. peregrina*, **Anin**=*A. inermis*, **Erpo**=*E. poeppigiana*, **Acau**=*A. auriculiformis*, **Ency**=*E. cyclocarpum*, **Flma**=*F. macrophylla*, **Anpe**=*A. peregrina*, **Erbe**=*E. berteroana*, **Sasa**=*S. saman*, **Inve**=*I. vera*, **Caja**=*C. javanica*, **Orkr**=*O. krugii*, **Ptin**=*P. indicus*, **Caho**=*C. houstoniana*, **Clfa**=*C. fairchildiana*, **Caca**=*C. calothyrsus*, **Segr**=*S. grandiflora*, **Lele**=*L. leucocephala*, **Inno**=*I. nobilis*. Las barras representan el error estándar de la media.

5.5 Peso seco de las plantas

El análisis de varianza para el peso seco total de las plantas arrojó diferencias estadísticas significativas para la interacción enmienda por especie, entre especies ($p < 0.0001$ respectivamente) y entre enmienda ($p = 0.0188$) (Figura 8, apéndice 7). Se obtuvo un valor máximo de 65.3 g para *L. leucocephala* en el tratamiento con enmienda, y un valor mínimo de 4.10 g para *O. krugii* en el tratamiento con enmienda.

Las especies con mayor peso seco con enmienda que sin enmienda fueron (de mayor a menor): *L. leucocephala* (65.3 g) y *A. procera* (41.8 g). Estas fueron estadísticamente iguales (Figura 8, apéndice 7). La especie *E. poeppigiana* (25.2 g) fue estadísticamente igual a *E. cyclocarpum*, *A. procera* y *F. macrophylla*. *E. cyclocarpum* respondió igual con la enmienda

y sin la enmienda (48.4 y 38.9 g, respectivamente). Las especies *I. vera* (con=12.4 g, sin=19.2 g) *A. inermis* (con=18 g, sin=15.8 g) y *E. poeppigiana* (con=25.2 g, sin=6.3 g) respondieron indistintamente a la enmienda.

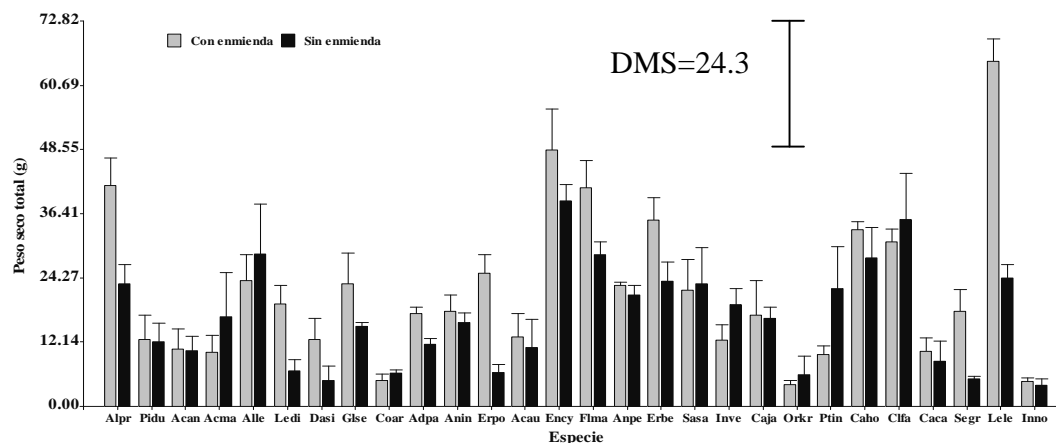


Figura 8. Peso seco total de las leguminosas arbóreas del experimento (Tukey, $\alpha=0.05$, DMS=24.31344); **Alpr**=*A. procera*, **Pidu**=*P. dulce*, **Acan**=*A. angustissima*, **Acma**=*A. mangium*, **Alle**=*A. lebbeck*, **Ledi**=*L. diversifolia*, **Dasi**=*D. sissoo*, **Glse**=*G. sepium*, **Coar**=*C. arborea*, **Adpa**=*A. peregrina*, **Anin**=*A. inermis*, **Erpo**=*E. poeppigiana*, **Acau**=*A. auriculiformis*, **Ency**=*E. cyclocarpum*, **Flma**=*F. macrophylla*, **Anpe**=*A. peregrina*, **Erbe**=*E. berteroana*, **Sasa**=*S. saman*, **Inve**=*I. vera*, **Caja**=*C. javanica*, **Orkr**=*O. krugii*, **Ptin**=*P. indicus*, **Caho**=*C. houstoniana*, **Clfa**=*C. fairchildiana*, **Caca**=*C. calothyrsus*, **Segr**=*S. grandiflora*, **Lele**=*L. leucocephala*, **Inno**=*I. nobilis*. Las barras representan el error estándar de la media.

Hubo una correlación positiva entre la longitud del tallo y el peso seco total de las plantas con un $r = 0.71$. La ecuación de regresión que se generó a partir de los datos fue la siguiente: $y = -0.11 + 0.21x$ ($r^2 = 0.50$) donde y es el peso seco total y x la longitud del tallo.

Una variable que es útil en el crecimiento de las plantas es la relación peso seco de raíz/tallo. Esta relación indica el desarrollo de ambos órganos de la planta. Un valor igual a 1.0 indica que la cantidad de la biomasa en la raíz es igual a la biomasa en el tallo, mientras que un valor de 0.5 indica que la biomasa de la raíz es la mitad de la biomasa del tallo.

Para la relación raíz/tallo, sólo hubo diferencias estadísticas entre las especies ($p < 0.0001$). No se detectaron diferencias para la interacción enmienda por especie ($p = 0.7557$) ni para enmiendas ($p = 0.1036$). Por lo tanto no hubo un efecto de la enmienda en la relación raíz/tallo (Figura 9, apéndice 8).

El índice máximo de raíz/tallo fue de 0.98 para *A. lebbeck* y el mínimo de 0.19, para *O. krugii*. Esto quiere decir que en la primera, la biomasa de las raíces fue igual a la biomasa del tallo, y en la segunda la biomasa fue mayor en el tallo que en la raíz. Además de *A. lebbeck*, las especies con mayores índices fueron: *A. procera* (0.90), *A. peregrina* (0.85), *C. javanica* (0.72), *E. berteroana* (0.67), *D. sissoo* (0.63), *S. saman* y *S. grandiflora* (0.62), *C. fairchildiana* (0.60), *P. indicus* y *F. macrophylla* (0.58), *G. sepium* (0.57) y *E. cyclocarpum* (0.56) y estas fueron estadísticamente iguales (Figura 9, apéndice 8). Dentro de estas 13 especies, siete (54%) pertenecen a las *Papilionoideae*, cinco (38%) a las *Mimosoideae* y una (8%) *C. javanica* a las *Caesalpinioideae*.

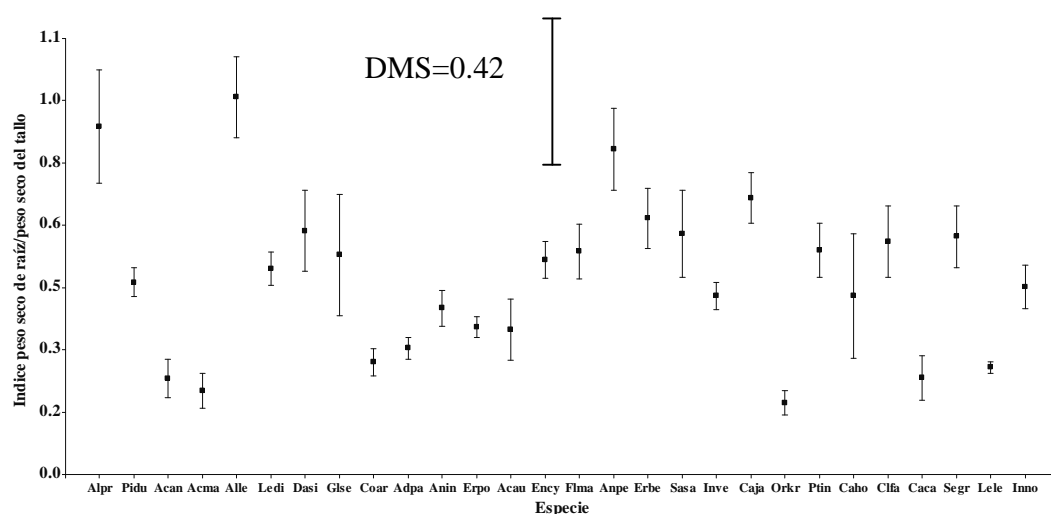


Figura 9. Índice raíz/tallo de las leguminosas arbóreas del experimento (Tukey, $\alpha = 0.05$, $DMS = 0.42334$); **Alpr**=*A. procera*, **Pidu**=*P. dulce*, **Acan**=*A. angustissima*, **Acma**=*A. mangium*, **Alle**=*A. lebbeck*, **Ledi**=*L. diversifolia*, **Dasi**=*D. sissoo*, **Glse**=*G. sepium*, **Coar**=*C. arborea*, **Adpa**=*A. peregrina*, **Anin**=*A. inermis*, **Erpo**=*E. poeppigiana*, **Acau**=*A. auriculiformis*, **Ency**=*E. cyclocarpum*, **Flma**=*F. macrophylla*, **Anpe**=*A. peregrina*, **Erbe**=*E. berteroana*, **Sasa**=*S. saman*, **Inve**=*I. vera*, **Caja**=*C. javanica*, **Orkr**=*O. krugii*, **Ptin**=*P. indicus*, **Caho**=*C. houstoniana*, **Clfa**=*C. fairchildiana*, **Caca**=*C. calothyrsus*, **Segr**=*S. grandiflora*, **Lele**=*L. leucocephala*, **Inno**=*I. nobilis*. Las barras representan el error estándar de la media.

5.6 Número de nódulos

Los datos de número de nódulos por planta se transformaron con la función $\sqrt{x+1}$. El análisis de varianza arrojó diferencias estadísticas significativas para la interacción enmienda por especie ($p=0.002$), para especies ($p<0.0001$), pero no para enmienda ($p=0.3354$) (Apéndice 9). El análisis indica que el efecto de la enmienda depende de la especie. De las 28 especies evaluadas 22 (76%) nodularon con y sin enmienda. Dos especies (7%) nodularon sólo en el suelo con enmienda, mientras que cuatro (14%) no nodularon en ninguno de los tratamientos.

El valor promedio máximo de nódulos por planta fue de 183 para *C. fairchildiana* (Cuadro 8 y figura 10) y el mínimo de 1 para *A. angustissima* (ambas en el tratamiento sin enmienda) (apéndice 9). La especie *I. vera* respondió mejor en el tratamiento sin enmienda (176 nódulos planta⁻¹) que con enmienda (43). Las demás especies se comportaron igual en enmienda y sin enmienda (Cuadro 8, Figura 10 y apéndice 9).



Figura 10. Nódulos en raíces de plantas de *C. fairchildiana* (A y B) e *I. vera* (C).

Dentro de las especies no noduladas se encuentran: *A. pavonina* (con y sin enmienda), *O. krugii* (con y sin), y como se esperaba, *C. javanica* la cual es de las *Caesalpinioideae* y reportada como no noduladora. Las plantas de *I. nobilis* subsp. *quaternata*, tampoco tuvieron nódulos (esta tenía tres meses de edad). *S. grandiflora* y *L. diversifolia* no nodularon en el tratamiento sin enmienda (Cuadro 8, apéndice 9).

Cuadro 8. Número de nódulos por especie con y sin enmienda (datos originales)

Especie	Con enmienda	Sin enmienda	Promedio
<i>C. fairchildiana</i>	134 a ¹	183 a	158
<i>I. vera</i>	43 cdef	176 a	110
<i>F. macrophylla</i>	114 abcdef	164 abc	139
<i>P. indicus</i>	51 bcdef	153 abcd	102
<i>C. houstoniana</i>	116 abcdef	41 cdef	73
<i>E. poeppigiana</i>	95 abcdef	29 def	62
<i>G. sepium</i>	86 abcdef	11 ef	49
<i>A. auriculiformis</i>	40 cdef	71 abcdef	56
<i>E. cyclocarpum</i>	67 abcdef	26 def	47
<i>A. inermis</i>	65 abcdef	34 def	49
<i>A. angustissima</i>	58 abcdef	1 f	29
<i>S. saman</i>	35 def	50 bcdef	43
<i>P. dulce</i>	48 cdef	2 f	25
<i>A. lebbeck</i>	20 ef	47 cdef	34
<i>A. mangium</i>	16 ef	43 cdef	29
<i>D. sissoo</i>	27 def	39 cdef	33
<i>A. procera</i>	38 cdef	35 def	37
<i>C. calothyrsus</i>	38 cdef	11 ef	25
<i>L. leucocephala</i>	22 ef	32 def	27
<i>S. grandiflora</i>	31 def	0 f	16
<i>L. diversifolia</i>	25 ef	0 f	12
<i>A. peregrina</i>	12 ef	20 ef	16
<i>E. berteriana</i>	20 ef	10 ef	15
<i>C. arborea</i>	4 f	13 ef	9
<i>A. pavonina</i>	0 f	0 f	0
<i>O. krugii</i>	0 f	0 f	0
<i>I. nobilis</i> subsp. <i>quaternata</i>	0 f	0 f	0
<i>C. javanica</i>	0 f	0 f	0
	DMS= 127.7	DMS = 87.2	

¹Medias seguidas de la misma letra en una misma columna, no difieren estadísticamente (Tukey ≤ 0.05)

5.7 Peso seco de los nódulos

Para cumplir con el supuesto de normalidad y de homogeneidad de varianzas, los datos se transformaron a la función $\sqrt{x+0.5}$, donde x es el peso de nódulos planta⁻¹. El análisis de varianza arrojó diferencias estadísticas significativas para la interacción enmienda por especie ($p=0.0191$), y entre especies ($p<0.0001$). No hubo diferencias para la enmienda ($p=0.9081$). El peso seco promedio máximo se observó en las plantas de la especie *P. indicus* y el mínimo en *A. angustissima* (1.32 y 0.002 g respectivamente, dato original), ambos en el tratamiento sin enmienda (Apéndice 10).

La especie *P. indicus* respondió mejor al suelo sin enmienda (1.32 g). Todas las demás especies fueron iguales, es decir no respondieron a la enmienda (Apéndice 10). En la figura 11 se muestran los promedios de los datos originales del comportamiento de las especies.

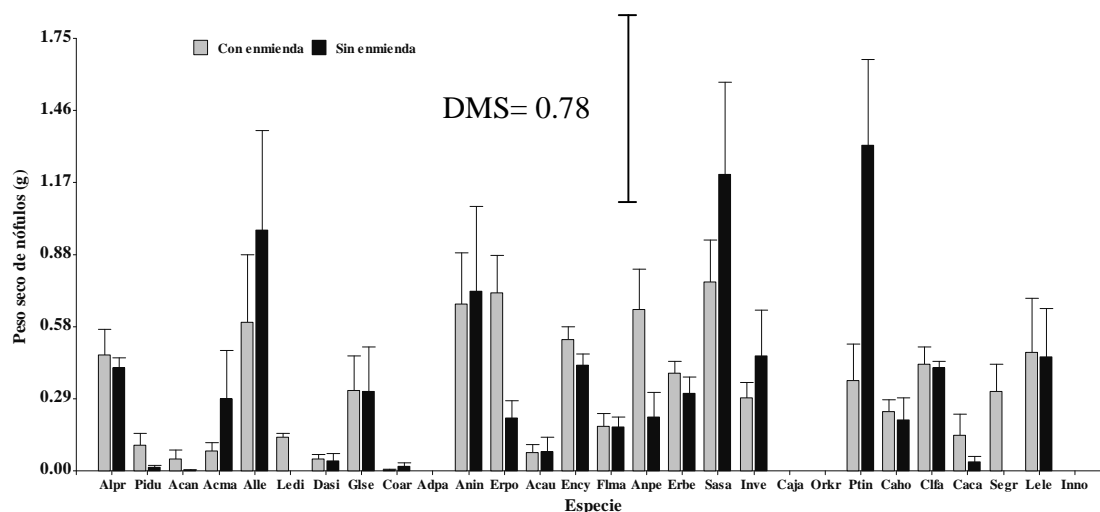


Figura 11. Peso seco de nódulos por planta de las leguminosas arbóreas del experimento (Tukey, $\alpha=0.05$, DMS= 0.78, datos originales); **Alpr**=*A. procera*, **Pidu**=*P. dulce*, **Acan**=*A. angustissima*, **Acma**=*A. mangium*, **Alle**=*A. lebbeck*, **Ledi**=*L. diversifolia*, **Dasi**=*D. sissoo*, **Glse**=*G. sepium*, **Coar**=*C. arborea*, **Adpa**=*A. peregrina*, **Anin**=*A. inermis*, **Erpo**=*E. poeppigiana*, **Acau**=*A. auriculiformis*, **Ency**=*E. cyclocarpum*, **Flma**=*F. macrophylla*, **Anpe**=*A. peregrina*, **Erbe**=*E. berteroana*, **Sasa**=*S. saman*, **Inve**=*I. vera*, **Caja**=*C. javanica*, **Orkr**=*O. krugii*, **Ptin**=*P. indicus*, **Caho**=*C. houstoniana*, **Clfa**=*C. fairchildiana*, **Caca**=*C. calothyrsus*, **Segr**=*S. grandiflora*, **Lele**=*L. leucocephala*, **Inno**=*I. nobilis*. Las barras representan el error estándar de la media.

La correlación entre el peso seco de nódulos y la actividad total de la nitrogenasa fue de $r = 0.67$ indicando una relación positiva entre ambas variables. El análisis de regresión entre el peso seco de nódulos como variable regresora y la actividad total de la nitrogenasa como variable dependiente, reveló un r^2 de 0.52 y de 0.64 (para el tratamiento con enmienda y sin enmienda, respectivamente) siendo ambos significativos ($p < 0.0001$). Esto indica que bajo las condiciones del presente experimento, el 52% y el 64% del cambio de la actividad de la nitrogenasa estuvieron explicados por un cambio en el peso seco de nódulos en el suelo con enmienda y sin enmienda respectivamente. Las ecuaciones de regresión generadas a partir de los datos fueron: $y = -22.15 + 42.34x - 19.30x^2$ (para el suelo con enmienda) y $y = -18.20 + 31.28x - 12.20x^2$ (para el suelo sin enmienda) (apéndice 11).

5.8 Actividad de la nitrogenasa

La figura 12 muestra los resultados de la actividad total de la nitrogenasa. Para cumplir con el supuesto de homogeneidad de varianzas, los datos de la actividad total y la actividad específica de la nitrogenasa (nmol de etileno planta⁻¹ hora⁻¹ y nmol de etileno peso seco de nódulos⁻¹, respectivamente) se transformaron a la función del logaritmo natural. Para ambas variables el análisis de varianza reveló diferencias estadísticas significativas entre las especies ($p < 0.0001$), pero no para la interacción enmienda por especie ni entre enmiendas. Esto indica que bajo las condiciones del experimento no hubo efecto de la enmienda en la actividad de la nitrogenasa (reducción de acetileno (C₂H₂) a etileno (C₂H₄)).

Las especies con mayor actividad total de la nitrogenasa fueron: *E. poeppigiana* (4.94 nanomoles de C₂H₄ planta⁻¹ hora⁻¹), *I. vera* (3.59), *A. inermis* (3.12), *S. saman* (3.03), *A. procera* (3.02), *E. cyclocarpum* (2.81) y también *P. indicus* (2.77), *G. sepium* (2.53), *A. lebbeck* (2.40), *A. mangium* (2.06), *F. macrophylla* (1.81), *C. fairchildiana* (1.79), *L. leucocephala* (1.74) y *E. berteriana* (1.55). Todas estas fueron estadísticamente iguales (Figura 12, apéndice 12). De estas 14 especies, seis (43%) pertenecen a las *Papilionoideae* y ocho (57%) a las *Mimosoideae*. Las plantas de *E. poeppigiana* fueron superiores a las demás especies.

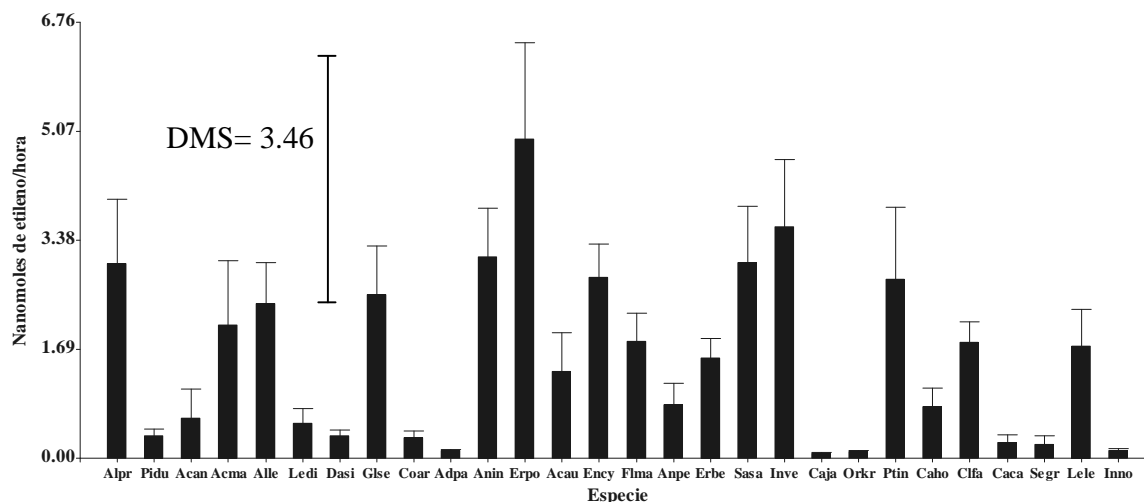


Figura 12. Actividad total de la nitrogenasa de las especies arbóreas del experimento (Tukey, alfa=0.05, DMS=3.45689); **Alpr**=*A. procera*, **Pidu**=*P. dulce*, **Acan**=*A. angustissima*, **Acma**=*A. mangium*, **Alle**=*A. lebeck*, **Ledi**=*L. diversifolia*, **Dasi**=*D. sissoo*, **Glse**=*G. sepium*, **Coar**=*C. arborea*, **Adpa**=*A. peregrina*, **Anin**=*A. inermis*, **Erpo**=*E. poeppigiana*, **Acau**=*A. auriculiformis*, **Ency**=*E. cyclocarpum*, **Flma**=*F. macrophylla*, **Anpe**=*A. peregrina*, **Erbe**=*E. berteroana*, **Sasa**=*S. saman*, **Inve**=*I. vera*, **Caja**=*C. javanica*, **Orkr**=*O. krugii*, **Ptin**=*P. indicus*, **Caho**=*C. houstoniana*, **Clfa**=*C. fairchildiana*, **Caca**=*C. calothyrsus*, **Segr**=*S. grandiflora*, **Lele**=*L. leucocephala*, **Inno**=*I. nobilis* supsp. *quaternata*. Las barras representan el error estándar de la media de los datos originales.

La actividad específica de la nitrogenasa es la actividad total dividida por el peso seco de los nódulos. Para esta variable sólo hubo diferencias estadísticas significativas ($p < 0.01$) entre especies (apéndice 13); *A. mangium* (14.40 nanomoles peso seco de nódulos⁻¹ hr⁻¹) y *E. poeppigiana* (14.28 nanomoles peso seco de nódulos⁻¹ hr⁻¹) fueron superiores a *S. grandiflora* (0.77) y a las demás especies que no nodularon (*A. pavonina*, *O. krugii* y *C. javanica*). Todas las demás especies fueron estadísticamente iguales (Figura 13,apéndice 13).

La actividad específica de la nitrogenasa para *I. vera*, *E. cyclocarpum* y *A. inermis* fue de 10.76, 5.69 y 5.10 nanomoles peso seco de nódulos⁻¹ hr⁻¹, respectivamente. Sin embargo éstas fueron estadísticamente iguales a *A. mangium* y *E. poeppigiana*. Hubo una alta variabilidad en esta variable (cv 111.47%) (apéndice 13).

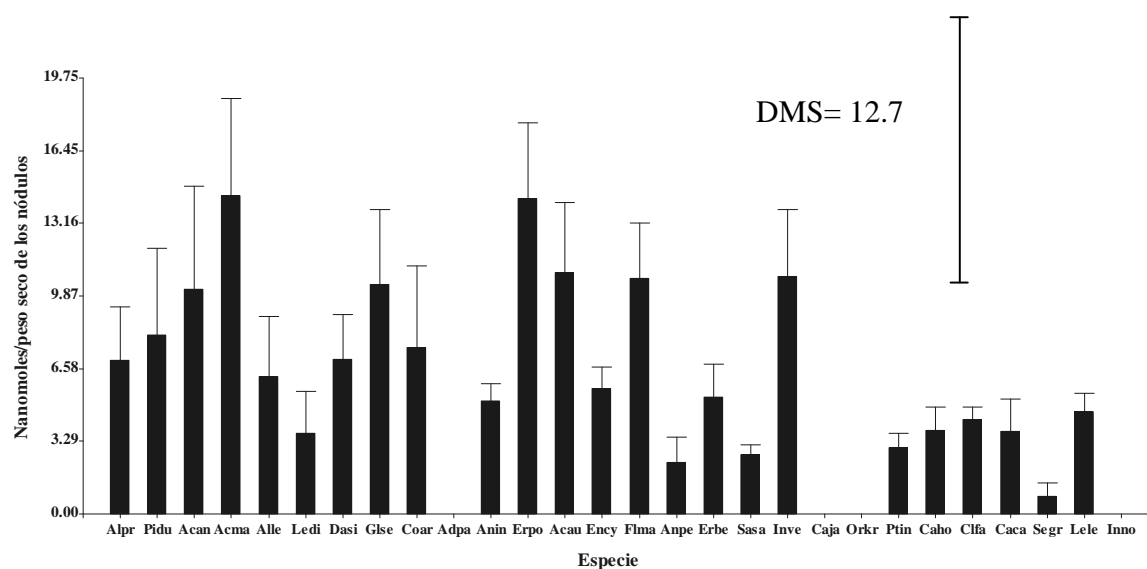


Figura 13. Actividad específica de la nitrogenasa de las especies arbóreas del experimento (Tukey, $\alpha=0.05$, DMS=12.72155); **Alpr**=*A. procera*, **Pidu**=*P. dulce*, **Acan**=*A. angustissima*, **Acma**=*A. mangium*, **Alle**=*A. lebeck*, **Ledi**=*L. diversifolia*, **Dasi**=*D. sissoo*, **Glse**=*G. sepium*, **Coar**=*C. arborea*, **Adpa**=*A. peregrina*, **Anin**=*A. inermis*, **Erpo**=*E. poeppigiana*, **Acau**=*A. auriculiformis*, **Ency**=*E. cyclocarpum*, **Flma**=*F. macrophylla*, **Anpe**=*A. peregrina*, **Erbe**=*E. berteroana*, **Sasa**=*S. saman*, **Inve**=*I. vera*, **Caja**=*C. javanica*, **Orkr**=*O. krugii*, **Ptin**=*P. indicus*, **Caho**=*C. houstoniana*, **Clfa**=*C. fairchildiana*, **Caca**=*C. calothyrsus*, **Segr**=*S. grandiflora*, **Lele**=*L. leucocephala*, **Inno**=*I. nobilis*. Las barras representan el error estándar de la media de los datos originales.

5.9 Resumen de los análisis de varianza

Se observó efecto de la enmienda, sólo para el diámetro del tallo y el peso seco de la planta. Para todas las demás variables no hubo efecto de la enmienda. Sin embargo, hubo efecto de interacción en enmienda \times especie para diámetro del tallo, peso seco de la planta, número de nódulos, y peso seco de nódulos. En todas las variables hubo diferencias significativas entre especies (Cuadro 9).

Cuadro 9. Resumen de los análisis de varianza para las variables evaluadas en el presente experimento.

Variables	Enmienda	Especie	Enmienda \times especie
	Probabilidad		
Longitud de tallo (cm)	0.0651 ns	<0.0001**	0.0292 ns
Diámetro de tallo (mm)	0.0797 ns	<0.0001**	0.0011**
Longitud de raíces (cm)	0.7951 ns	<0.0001**	0.1517 ns
Peso seco de planta (g)	0.0188*	<0.0001**	<0.0001**
Raíz/tallo	0.1036 ns	<0.0001**	0.7557 ns
Núm. de nódulos ($\sqrt{x+1}$)	0.3354 ns	<0.0001**	0.0002**
Peso seco de nódulos ($\sqrt{x+0.5}$)	0.9081 ns	<0.0001**	0.0191*
Act. total de la nitrogenasa (LogN x)	0.9840 ns	<0.0001**	0.5143 ns
Act. Esp. de la nitrogenasa (LogN x)	0.5055 ns	<0.0001**	0.6120 ns

*.- significativo al 5%, **.-significativo al 1%, ns.- no significativo

5.10 Caracterización de las bacterias aisladas de los nódulos de las raíces

Las bacterias aisladas de los nódulos presentaron características desde color blanco opaco hasta translúcida o transparente. Algunas colonias tenían un tamaño de 1 a 5 mm de diámetro y otras menores a 1 mm. Se aislaron 48 cepas de los nódulos de 25 especies de plantas que nodularon.

Según la prueba del cambio del pH en azul de bromotimol, el 56% (27 de 48) de las cepas presentó un color amarillo indicando una reacción ácida (posiblemente del género *Rhizobium*). El 29% (14 de 48) mostró un color azul indicando una reacción alcalina (posiblemente del género *Bradyrhizobium*). El 15% (7 de 48) de las cepas presentaron reacciones ácidas y alcalinas en una misma placa de petri, esto indicó la presencia de ambos géneros en un nódulo (Cuadro 9).

Según la prueba de autenticidad de *Rhizobium*, el 37.5% (18 de 48) de las cepas indujeron nodulación en *Macroptilium atropurpureum*. De esas cepas, el 67% (12 de 18) se aisló de las especies pertenecientes a la subfamilia *Mimosoideae* y el 33% (6 de 18) restante se aisló de las *Papilionoideae*. Aunque 18 cepas nodularon *M. atropurpureum*, sólo 10 cepas pueden considerarse eficientes ya que nodularon más del 50% de las plantas. Estas cepas fueron las que se aislaron de *A. angustissima*, *A. mangium* (A) y *A. mangium* (B), *A. procera* (A) y *A. procera* (B), *G. sepium* (C), *I. vera* (A), *L. leucocephala* (A) y *S. saman* (B) (Cuadro 9). Las demás cepas nodularon *M. atropurpureum* en un bajo porcentaje de plantas. Tal es el caso del género *Calliandra* cuyas cepas no nodularon en siratro y la que no hizo sólo indujo nodulación en el 10% de las plantas, es decir una planta de diez que se inocularon (Cuadro 9)

Cuadro 10. Reacción de cepas aisladas de leguminosas arbóreas en azul de bromotimol e inducción de nodulación en *Macroptilium atropurpureum*.

No.	Especie	Código ¹	Color	Reacción (pH)	Posible género	Nodulación (%)
1	<i>A. angustissima</i>	Acan	Amarillo	ácida	<i>Rhizobium</i>	100
2	<i>A. auriculiformis</i>	Acau	Azul	alcalina	<i>Bradyrhizobium</i>	0
3	<i>A. mangium</i>	Acma(A)	Azul	alcalina	<i>Bradyrhizobium</i>	90
4	<i>A. mangium</i>	Acma(B)	Amarillo	ácida	<i>Rhizobium</i>	80
5	<i>A. lebeck</i>	Alle(A)	Amarillo	ácida	<i>Rhizobium</i>	20
6	<i>A. lebeck</i>	Alle(B)	Amarillo	ácida	<i>Rhizobium</i>	0
7	<i>A. lebeck</i>	Alle(C)	Amarillo	ácida	<i>Rhizobium</i>	0
9	<i>A. procera</i>	Alpr(A)	Amarillo	ácida	<i>Rhizobium</i>	100
10	<i>A. procera</i>	Alpr(B)	Amarillo/azul	ácida/alcalina	<i>Rhiz/Bradyrhiz</i>	90
11	<i>A. inermis</i>	Anin(B)	Azul	alcalina	<i>Bradyrhizobium</i>	0
12	<i>A. inermis</i>	Anin(A)	Azul	alcalina	<i>Bradyrhizobium</i>	0
13	<i>A. peregrina</i>	Anpe(A)	Amarillo	ácida	<i>Rhizobium</i>	0
14	<i>A. peregrina</i>	Anpe(B)	Amarillo	ácida	<i>Rhizobium</i>	0
15	<i>C. calothyrsus</i>	Caca(A)	Amarillo	ácida	<i>Rhizobium</i>	0
16	<i>C. calothyrsus</i>	Caca(B)	Amarillo	ácida	<i>Rhizobium</i>	0
17	<i>C. calothyrsus</i>	Caca(C)	Amarillo	ácida	<i>Rhizobium</i>	0
18	<i>C. houstoniana</i>	Caho(A)	Amarillo	ácida	<i>Rhizobium</i>	10
19	<i>C. houstoniana</i>	Caho(B)	Amarillo	ácida	<i>Rhizobium</i>	40
20	<i>C. fairchildiana</i>	Clfa(A)	Amarillo/azul	ácida/alcalina	<i>Rhiz/Bradyrhiz</i>	30
21	<i>C. fairchildiana</i>	Clfa(B)	Azul	alcalina	<i>Bradyrhizobium</i>	0
22	<i>C. arborea</i>	Coar(A)	Amarillo	ácida	<i>Rhizobium</i>	0
23	<i>C. arborea</i>	Coar(B)	Amarillo	ácida	<i>Rhizobium</i>	0
24	<i>D. sissoo</i>	Dasi(A)	Amarillo	ácida	<i>Rhizobium</i>	0
25	<i>D. sissoo</i>	Dasi(B)	Amarillo/azul	ácida/alcalina	<i>Rhiz/Bradyrhiz</i>	20
26	<i>E. cyclocarpum</i>	Ency	Azul	alcalina	<i>Bradyrhizobium</i>	0
27	<i>E. berteriana</i>	Erbe(A)	Azul	alcalina	<i>Bradyrhizobium</i>	0
28	<i>E. berteriana</i>	Erbe(B)	Amarillo/azul	ácida/alcalina	<i>Rhiz/Bradyrhiz</i>	0
29	<i>E. poeppigiana</i>	Erpo(A)	Azul	alcalina	<i>Bradyrhizobium</i>	0
30	<i>E. poeppigiana</i>	Erpo(B)	Amarillo/azul	ácida/alcalina	<i>Rhiz/Bradyrhiz</i>	0
31	<i>G. sepium</i>	Glse(A)	Amarillo	ácida	<i>Rhizobium</i>	0
32	<i>G. sepium</i>	Glse(B)	Amarillo	ácida	<i>Rhizobium</i>	0
33	<i>G. sepium</i>	Glse(C)	Amarillo	ácida	<i>Rhizobium</i>	60
34	<i>I. vera</i>	Inve(A)	Amarillo/azul	ácida/alcalina	<i>Rhiz/Bradyrhiz</i>	50
35	<i>I. vera</i>	Inve(B)	Azul	alcalina	<i>Bradyrhizobium</i>	0
36	<i>L. diversifolia</i>	Ledi(A)	Amarillo	ácida	<i>Rhizobium</i>	0
37	<i>L. diversifolia</i>	Ledi(B)	Amarillo	ácida	<i>Rhizobium</i>	10
38	<i>L. leucocephala</i>	Lele(A)	Amarillo	ácida	<i>Rhizobium</i>	70
39	<i>L. leucocephala</i>	Lele(B)	Amarillo	ácida	<i>Rhizobium</i>	0
40	<i>P. dulce</i>	Pidu(A)	Amarillo	ácida	<i>Rhizobium</i>	0
41	<i>P. dulce</i>	Pidu(B)	Amarillo/azul	ácida/alcalina	<i>Rhiz/Bradyrhiz</i>	0
42	<i>P. indicus</i>	Ptin(A)	Azul	alcalina	<i>Bradyrhizobium</i>	10
43	<i>P. indicus</i>	Ptin(B)	Azul	alcalina	<i>Bradyrhizobium</i>	30
44	<i>S. saman</i>	Sasa(A)	Azul	alcalina	<i>Bradyrhizobium</i>	0
45	<i>S. saman</i>	Sasa(B)	Azul	alcalina	<i>Bradyrhizobium</i>	60
46	<i>S. grandiflora</i>	Segr(A)	Amarillo	ácida	<i>Rhizobium</i>	0
47	<i>S. grandiflora</i>	Segr(B)	Amarillo	ácida	<i>Rhizobium</i>	30
48	<i>S. grandiflora</i>	Segr(C)	Amarillo	ácida	<i>Rhizobium</i>	0

¹Representa las dos primeras letras del género seguido de las dos primeras letras de la especie. La letra entre paréntesis en una misma especie indica aislados de una misma especie.

Después de la prueba de autenticidad las cepas se transfirieron en un medio de cultivo MLA en tubos con tapa de rosca y se colocaron en incubadora a 28 °C para su crecimiento. Para su conservación las cepas se almacenaron en el refrigerador (4 – 5 °C) del laboratorio de Fijación Biológica de Nitrógeno de la Universidad de Puerto Rico Recinto Mayagüez.

5.10 Enfermedades y plagas

En algunas de las especies se observaron síntomas de enfermedades y de plagas. Las plagas incluían la cochinilla algodonosa (*Planococcus citri*) en hojas y tallos de plantas de *E. cyclocarpum*, *Gliricidia sepium*, *Acacia angustissima* y *Pterocarpus indicus*. También hubo áfidos en brotes nuevos de una planta de *Pterocarpus indicus*. Además, se encontraron ácaros en las hojas de *Erythrina poeppigiana* (Figura 15).

Se encontraron síntomas de “oidio” o “mildiú” en hojas de *Acacia mangium*, *Andira inermis* y *Gliricidia sepium*. Este hongo provocó encogimiento y amarillamiento de los brotes nuevos de una planta de *Acacia mangium* (Figura 15).



15 a. *Pterocarpus indicus* con cochinilla y áfidos



15 b. *E. poeppigiana*
con ácaros

15 c. *G. sepium*
con oidio

15 d. *A. mangium*
con oidio

Figura 14. Síntomas de plagas y enfermedades en algunas plantas de leguminosas

Las plagas se eliminaron con una solución de agua, jabón líquido y aceite mineral en una proporción 10:1:½ (v/v) respectivamente. La solución se aplicó en las partes afectadas utilizando una esponja y evitando derramar el líquido en el suelo del tiesto.

En algunas especies se observaron plantas muertas. Aunque no se hicieron pruebas para comprobar el agente causal de la muerte de las plantas, se pudo notar que la mayoría de las plantas muertas estaban en el suelo enmendado (7 de 9 plantas). En el cuadro 8 se muestra el número de plantas muertas por especie y por tratamiento.

Cuadro 11. Número de plantas muertas por especie durante el experimento

Especie	Tratamiento	plantas muertas
<i>Pithecellobium carbonarium</i> *	Enmienda	3
<i>Acacia angustissima</i>	Enmienda	1
	Sin enmienda	1
<i>Calliandra houstoniana</i>	Enmienda	1
<i>Leucaena leucocephala</i>	Enmienda	1
<i>Sesbania grandiflora</i>	Enmienda	1
	Sin enmienda	1
Total		9

*Debido a la alta mortalidad de esta especie, ella no se incluyó en los análisis

En las raíces de once plantas se observaron agallas posiblemente de nematodos. De once plantas con agallas de nematodos, ocho (73%) pertenecían a las *Mimosoideae*, dos (18%) a las *Papilionoideae* y una a las *Caesalpinoidae* (9%). Las especies con más de 50% de plantas infectadas fueron: *S. saman*, *C. javanica*, *S. grandiflora* y *P. carbonarium*, lo que indica susceptibilidad a los nemátodos. En todas las plantas infectadas se observaron nódulos de rizobios y agallas de nematodos, excepto para *C. javanica* y *P. carbonarium* (cuadro 11) ya que ambas no nodularon. No se identificó la especie de nematodos presente en las raíces.

Cuadro 12. Especies de leguminosas arbóreas con agallas de nematodos en las raíces, seis meses después de la siembra.

Subfamilia / Especie	Número de plantas infectadas	% de plantas infectadas
<i>Mimosoideae</i>	8 (11)*	72.7
<i>A. procera</i>	2 (8)	25.0
<i>A. mangium</i>	3 (8)	37.5
<i>A. lebbek</i>	1 (8)	12.5
<i>L. diversifolia</i>	3 (8)	37.5
<i>C. arborea</i>	3 (8)	37.5
<i>E. cyclocarpum</i>	1 (8)	12.5
<i>S. saman</i>	6 (8)	75.0
<i>P. carbonarium</i>	4 (5)	80.0
<i>Papilionoideae</i>	2 (11)	18.2
<i>F. macrophylla</i>	2 (8)	25.0
<i>S. grandiflora</i>	4 (7)	57.0
<i>Caesalpinioideae</i>	1 (11)	9.0
<i>C. javanica</i>	6 (8)	75.0

*Los números en paréntesis son el total de plantas evaluadas

6. DISCUSIÓN

6.1 Análisis del suelo

La serie de suelo Humatas es representativa de la zona dedicada al cultivo del café en Puerto Rico. El pH inicial del suelo era muy ácido (4.08), pero cuando se aplicó la cal antes de la siembra de las plantas comenzó a reaccionar y el pH del suelo aumentó mostrando una tendencia a estabilizarse a partir del cuarto mes de la aplicación de CaCO_3 . El método de Abruña y Vicente (1955) fue eficiente para alcanzar el pH según la cantidad de la solución de $\text{Ca}(\text{OH})_2$. El pH de 6.5 se obtuvo a los cuatro meses de la aplicación de la cal y siguió subiendo hasta mostrar una tendencia a estabilizarse cuando alcanzó un pH de 7.26, ocho meses después del encalado. Las plantas se sacaron de los tiestos 7 meses después del encalado.

El encalado elimina la toxicidad por Al^{3+} y por H^+ a través de la reacción con OH^- . Otro beneficio del encalado es la adición de Ca^{2+} y de Mg^{2+} (cuando se usa cal dolomítica). El calcio y el magnesio son nutrientes esenciales para el crecimiento de las plantas y frecuentemente son deficientes en los suelos ácidos altamente meteorizados (Uchida y Hue, 2000).

6.2 Población de *Rhizobium* en el suelo

La población de *Rhizobium* (4.5×10^3 células g de suelo⁻¹ seco), fue superior a la reportada por Santana (2007) en las series Humatas (1.16×10^3 células 100 g de suelo⁻¹ seco) y Los Guineos (6.2×10^2 100 g de suelo⁻¹ seco). Santana (2007) atribuye a la baja cantidad de rizobios en el suelo Los Guineos a que antes de tomar la muestra para el recuento, el suelo se dejó en la intemperie cubierto con plástico y la solarización pudo reducir la población de rizobios.

Thies et al. (1991) en un experimento de *Rhizobium* en suelos de Hawaii encontraron una población de rhizobios nativos desde 0 a más de 3.5×10^4 g de suelo⁻¹. En dos lugares de Ultisoles con presencia de *Acacia* y otras leguminosas, los autores encontraron desde 61 hasta 3.6×10^4 rhizobios g⁻¹ de suelo, mientras que en un Mollisol, con *L. leucocephala*, la población estuvo entre 1.6×10^3 a más de 5.9×10^3 rhizobios g suelo⁻¹. Por otro lado, Abaidoo et al. (2007) realizaron un experimento para determinar la población de *Bradyrhizobium* nativo que nodulan genotipos TGx de soya en los suelos de 65 lugares en nueve países de África. Encontraron que la población estuvo entre 2 y 3.28×10^4 *Bradyrhizobium* g de suelo⁻¹.

La población de rhizobios nativos en el presente experimento se puede considerar alto, lo cual indica que bajo las condiciones de este suelo no sería necesario la inoculación de *Rhizobium*. Esto se basa en lo reportado por Thies et al. (1991) que encontraron que apenas con 50 rhizobios g de suelo⁻¹, se eliminó el efecto de la inoculación. Los autores además reportaron que cuando la población fue menor de 10 rhizobios g de suelo⁻¹, los rendimientos se incrementaron el 85% de las veces, mientras que cuando esta población fue superior a 10 rhizobios g de suelo⁻¹, los rendimientos solo se incrementaron en 6% de las observaciones.

6.3 Altura y diámetro del tallo de las plantas

6.3.1 Altura mensual

En la altura de la mayoría de las especies arbóreas, no respondieron a la enmienda a través del tiempo. Sólo *L. diversifolia*, *D. sissoo* y *E. poeppigiana*. Las dos primeras respondieron a la enmienda a partir del cuarto y quinto mes, mientras que la tercera respondió en los meses cuarto, quinto y sexto mes.

El incremento mensual de la altura de *L. diversifolia* se debió posiblemente al mejoramiento del pH del suelo (6.30 al quinto mes de la siembra) por la aplicación de CaCO₃. El mejor crecimiento de esta especie es consistente con lo reportado por Wei-Er y

Fuh-Jiunn (1988). Estos investigadores midieron la altura de *L. diversifolia* (K156) en un suelo con pH original de 4.35 e incrementado a 5.0, 6.0, 7.0 y 8.0 por la aplicación de CaCO_3 . Los autores encontraron que *L. diversifolia* creció mejor en suelo desde fuertemente ácido hasta neutro, y el rango óptimo de pH para su crecimiento fue entre 5.5 y 7.0. Al igual que lo encontrado por estos autores, el incremento de altura en el suelo con enmienda se debió posiblemente a la mayor disponibilidad de los nutrientes aplicados en la solución nutritiva sin nitrógeno y a una disminución en el aluminio intercambiable. La respuesta de *L. diversifolia* a la enmienda (CaCO_3 +nutrientes) puede ser de utilidad para el establecimiento y manejo de esta especie como sombra en sistemas de café, ya que según Brewbaker et al. (1983, 1990) está considerada como de alto valor económico o ecológico. En vista de esto se podría garantizar un mejor aprovechamiento de la especie si se toma en cuenta la aplicación de la enmienda en suelos ácidos como son los Ultisoles de la zona cafetalera de Puerto Rico.

Los resultados contradicen otros autores que encuentran que *L. leucocephala* responde significativamente al encalado y nutrientes y no concuerdan con *L. diversifolia* que sí respondió al encalado. Sin embargo, Rincón et al. (2004) reportaron que no se encontraron efectos del calcio y del fósforo en el número de nódulos de plantas de *L. leucocephala* cultivadas en invernadero en un suelo con pH de 5.2 y mezclado con cascarilla de arroz.

La especie *D. sissoo* es otra de las especies consideradas por Brewbaker et al. (1983, 1990) como de alto valor económico o ecológico. Sprent y Parsons (2000) reportaron que muchas de las especies del género *Dalbergia* son árboles y que su madera es utilizada para construcción de muebles de alta calidad y de instrumentos musicales. Son escasamente usados como sombra o forraje. Estos autores mencionan la especie *D. melanoxylon* como de relativo rápido crecimiento, que en menos de 10 años puede producir madera de tamaño y calidad adecuados para producir artesanía de alto valor. La mayor altura de *D. sissoo* a la enmienda reportada en este trabajo pudo haber sido por la disminución del aluminio intercambiable. La aplicación de CaCO_3 contribuye con la disminución del aluminio intercambiable en el suelo.

La especie *E. poeppigiana* se usa ampliamente en los agrosistemas en Sur y Centroamérica, y ha mostrado tolerancia a suelos con alta saturación de aluminio (Kass, 1994). El crecimiento constante de esta especie posiblemente fue debido a una mayor disponibilidad del fósforo en el suelo con la enmienda. La diferencia de la altura entre el suelo con enmienda y sin enmienda se hacía mayor en la medida que pasaba el tiempo y por supuesto aumentaba el pH por la reacción del CaCO_3 en el suelo.

De acuerdo con Mc Lean (1971) cuando se aplica cal a un suelo ácido ocurre una serie de eventos, la mayoría de manera simultánea. El carbonato de calcio en el suelo ácido se disocia y los iones de hidrógeno son neutralizados. La saturación de bases se incrementa en la medida en que el calcio (y el magnesio si está presente) reemplazan los iones de hidrógeno en la superficie del suelo, neutralizándolos y resultando en un incremento en el pH y un cambio en la razón de cationes básicos adsorbidos y en la solución del suelo. Ambos eventos usualmente hacen el suelo más favorable al crecimiento de la planta debido a una mayor disponibilidad de los nutrientes.

Con relación a la altura de las especies para las cuales no se detectó diferencias en la interacción enmienda por tiempo, *E. cyclocarpum* resultó ser la de mayor altura. Este resultado es consistente con lo reportado por Santana (2007) quien encontró que esta especie fue la que más creció entre todas las de semilla ortodoxa, en las series de suelo Humatas y Los Guineos. Los resultados de Santana no muestra la variación mensual en altura.

En un ensayo durante dos años de evaluación en plántulas de *E. cyclocarpum* de regeneración natural recién germinadas, trasplantadas en macetas y en el campo con un suelo Inceptisol y bajo sombra parcial, Di Estéfano y Fournier (1999) registraron una tasa de crecimiento máxima en altura de 5.7 cm mes^{-1} . Después de un año de crecimiento las plantas alcanzaron una altura máxima promedio menor a 40 cm. Según estos autores, aunque las diferencias en alturas no fueron significativas, observaron un mayor vigor en las plántulas en bolsas que en las sembradas directamente en el campo. Si asumimos que Di Estéfano y

Fourier (1999) calcularon la tasa de crecimiento substrayendo la altura anterior de la más reciente y promediando para todas las mediciones, entonces es posible concluir que el promedio de altura que se obtuvo en el presente ensayo (30 ± 17.4 cm/mes) fue aproximadamente seis veces más alto que el reportado por estos autores. La altura máxima (150 cm en el sexto mes después de la siembra) también fue superior al experimento que se cita (menos de 40 cm después de un año). Esto se debió posiblemente a que en el ensayo de Di Estéfano y Fourier (1999) hubo una alta mortalidad de plantas sembradas en el campo, con una reducción del sistema radicular por posible ataque de herbívoros o por efecto tóxico del hierro en el suelo. Otra causa de la mortalidad fueron los efectos de la escasez de agua los cuales se manifestaron primero en el tallo que en las raíces.

Según Di Estéfano y Fournier (1999), *E. cyclocarpum* es una especie de uso múltiple que puede crecer en zonas con clima seco a húmedo. Se considera que crece bien en sitios con precipitación de 750 a 2000 mm y temperaturas promedio entre 23 y 28°C. Los autores reportan que es un árbol de crecimiento rápido y puede establecerse en ambientes alterados. Montagnini (1992) menciona que esta especie ha sido utilizada en sistemas agroforestales como sombra de café y en asociación con pastos.

6.3.2 Longitud y diámetro del tallo al final del experimento

Sobre la longitud promedio del tallo, seis meses después de la siembra, no hubo efecto de la enmienda; sin embargo hubo diferencias entre especies indistintamente de la enmienda. Un alto cuadrado medio del error (695.43) frente a un bajo cuadrado medio de la interacción (800.62, apéndice 1), posiblemente no permitió detectar diferencias por la aplicación de enmienda. Además el valor de la DMS (51.46936) para la prueba de Tukey al 5% de significancia, tampoco permitió separar más las medias. Esto es de esperarse, pues la prueba de Tukey es una prueba conservadora, pero con mayor probabilidad de detectar diferencias reales.

Los resultados de la longitud del tallo de las plantas fueron en parte similares a los reportados por Santana (2007) en el suelo Humatas. El autor reporta que las especies de semillas ortodoxas con mayor altura después de 180 días fueron: *A. procera*, *C. houstoniana* y *E. cyclocarpum* (94.1, 99.5 y 133.6 cm, respectivamente) dentro de las *Mimosoideae* y también *C. fairchildiana* y *E. variegata* (99.5 y 131.3, respectivamente) de las *Papilionoideae*. La mayor altura tanto en suelo Humatas como en los Guineos fue registrado en *E. cyclocarpum* y *A. procera*.

La longitud del tallo de las especies *E. cyclocarpum*, *C. houstoniana* y *C. arborea*, fueron superiores a los reportados por Santana (2007). Sin embargo coincide en que las dos primeras fueron las más altas y la tercera fue la de menor crecimiento. Sin embargo para *A. procera* la altura (79.11 cm) fue inferior a la reportada por Santana (2007) (94.1 cm).

Se observa en estos resultados y los de crecimiento mensual que aunque *E. cyclocarpum* tuvo mayor altura en el crecimiento mensual, no fue la especie más alta al final del experimento. Esto implica que si se toma en cuenta la altura total de la especie, es importante incluir las más promisorias en un mismo agrosistema. De esa manera se cuenta con una variedad de especies de uso múltiple en el cafetal. Llama a la atención el hecho de que *L. leucocephala* fue de las más altas en el presente experimento y no en el de Santana (2007). Las causas posibles a este evento pueden ser: el estado de la semilla y la variedad utilizada (en nuestro experimento se utilizaron semillas frescas de *L. leucocephala* K-500), como al estado nutricional del suelo.

Con los promedios de longitud del tallo las especies se pueden clasificar como: 1) crecimiento rápido (>100 cm), 2) crecimiento medio (entre 50 y 100 cm) y 3) de crecimiento lento. En el cuadro siguiente se presenta una lista de las especies en cada grupo. La especie *I. nobilis* está en el grupo de crecimiento lento, sin embargo hay que tomar en cuenta que las plantas de esta especie se sembraron tres meses después de iniciarse el experimento.

Cuadro 13. Clasificación del crecimiento de las especies según la longitud del tallo.

Especies	Longitud del tallo (cm)	Crecimiento
<i>E. cyclocarpum</i>	184.25	R*
<i>L. leucocephala</i>	181.29	R
<i>C. houstoniana</i>	147.43	R
<i>F. macrophylla</i>	139.63	R
<i>A. peregrina</i>	134.13	R
<i>C. fairchildiana</i>	122.5	R
<i>A. angustissima</i>	120.42	R
<i>L. diversifolia</i>	114.25	R
<i>P. dulce</i>	106.76	R
<i>S. saman</i>	102.63	R
<i>C. calothyrsus</i>	90.13	M
<i>A. mangium</i>	89.25	M
<i>G. sepium</i>	85.63	M
<i>D. sissoo</i>	81.88	M
<i>S. grandiflora</i>	81.83	M
<i>C. javanica</i>	81.81	M
<i>A. procera</i>	79.11	M
<i>A. lebbeck</i>	77.69	M
<i>E. berteriana</i>	74.63	M
<i>P. indicus</i>	74.19	M
<i>A. auriculiformis</i>	73.75	M
<i>I. vera</i>	69.13	M
<i>A. pavonina</i>	65.06	M
<i>A. inermis</i>	60.81	M
<i>E. poeppigiana</i>	60	M
<i>I. nobilis</i>	49	L
<i>C. arborea</i>	24.56	L
<i>O. krugii</i>	16.25	L

*R.-crecimiento rápido, M.- crecimiento medio, L.- crecimiento lento

Dentro de las especies de crecimiento rápido se encuentran *E. cyclocarpum* y *L. Leucocephala*. Este crecimiento rápido puede ser una ventaja en el establecimiento de la sombra en el cafetal.

Sanginga et al. (1988) evaluaron el crecimiento de *L. leucocephala* en tiestos y en campo con la inoculación de *Rhizobium* y la fertilización con nitrógeno, fósforo y micronutrientes. En el experimento en tiestos encontraron que los micronutrientes incrementaron la altura de las plantas, con alturas entre 39.4 cm (no inoculadas) y 43.8 cm (inoculadas con *Rhizobium* más 90 mg N tiesto⁻¹), 10 semanas después de la siembra. En el experimento de campo encontraron que en términos generales los micronutrientes no incrementaron la altura de plantas. Las plantas registraron alturas máximas de 189 y 188 cm en el tratamiento con 80 kg de fósforo en un suelo areno limoso y un Alfisol, respectivamente.

Con relación al diámetro del tallo de las plantas en el presente ensayo, la interacción significativa indica que hubo un efecto de la enmienda en al menos una de las especies. Esto se observó para *E. poeppigiana* la cual respondió mejor a la enmienda que las otras especies.

Phouthavong et al. (1998) reportaron un diámetro de 20 y 38 mm en dos accesiones de *E. poeppigiana*, un año después del trasplante en un suelo areno-limoso con un pH de 4.6. Esto indica que la especie fue resistente a la alta acidez del suelo. Sin embargo una de las posibles causas del buen desarrollo se debió posiblemente a la aplicación de fertilizante en el ensayo (20 kg P y 30 kg N ha⁻¹, dos meses después del trasplante, más 20 kg P ha⁻¹ dos semanas después de la primera aplicación). El suelo tenía cantidades suficientes de nitrógeno y de fósforo para ser aprovechado por la planta.

6.4 Longitud de las raíces

La raíz es el órgano de la planta que le sirve para anclarse al suelo. Es la vía para la absorción de agua y nutrientes, y donde ocurre la interacción planta / microorganismos. En el presente ensayo, la enmienda no afectó la longitud de las raíces de las plantas. *I. vera* (81.9 cm) fue la especie con la mayor longitud de la raíz, y *O. krugii*, la de raíz más corta (19.93 cm). La mayoría de las especies fueron estadísticamente iguales. Aunque la aplicación de cal en un suelo ácido se ha reportado que promueve el desarrollo de la raíz, en el presente ensayo no se observó tal efecto.

Anegbeh y Tchoundjeu (2005) reportan que con relación a la adaptabilidad y a la forma de la raíz, *G. sepium* y *L. leucocephala*, han sido reportadas como de pobre comportamiento en suelos ácidos. Los autores encontraron que la mayor cantidad de raíces finas de *I. edulis*, se encontraban en los primeros 10-30 cm del perfil del suelo. Según los autores, estas raíces podrían reducir el crecimiento y el rendimiento de cultivos asociados debido a la competencia por agua, nutrientes y otros recursos. Afirman que la distribución vertical de las raíces finas de las especies leñosas indica que a mayor profundidad, menor número y peso de las raíces.

Por otro lado, Abnegbeh (2007) comparó el sistema radicular de *G. sepium*, *Bahuinia monandra*, *Dialium guineense*, *Albizia ferruginea* y *Berlinia grandiflora*, de 15 meses de edad, en un Ultisol con pH de 4.4. La especie *G. sepium* alcanzó una altura de 1.6 m y una longitud de raíz de 2.4 m obteniendo un crecimiento de la raíz de 0.16 m mes^{-1} . La longitud de raíz de *G. sepium* en el presente ensayo fue de 31.88 cm (0.32 m) en 6 meses, con un crecimiento mensual de 0.05 m. Este crecimiento representa la mitad que el reportado por Abnegbeh (2007), pero en menos de la mitad del tiempo. Una limitante en el presente ensayo era que la raíz principal y algunas secundarias estaban retorcidas cuando se sacaron de los tiestos, seis meses después de la siembra. Esto se debió al confinamiento en el tiesto durante un período relativamente corto, lo que pudo haber limitado el crecimiento potencial de los

árboles. Esta limitante debe tomarse en cuenta para futuros experimentos y en la producción de arbolitos para sombra en los agrosistemas de café.

La raíz principal de muchas plantas, en este experimento, estaba retorcida debido al confinamiento en los tiestos durante un tiempo relativamente corto. Esto pudo haber limitado el crecimiento potencial de los árboles y debe tomarse en cuenta para futuros experimentos o en la producción de arbolitos para sombra en los agrosistemas de café.

6.5 Peso seco de las plantas

Se registró un efecto positivo de la enmienda en las plantas. El peso seco promedio de todas las plantas para el tratamiento sin enmienda (17.21 g) fue superior al reportado por Santana (2007) (5.3 g), mientras que el valor máximo para el suelo sin enmienda fue de 38.90 g para *E. cyclocarpum* y el mínimo fue de 4.95 g para *D. sissoo*. Santana (2007) reportó un máximo de 20.40 g para *E. variegata* y un mínimo de 1.29 para *O. krugii*. En cuanto a esta última especie el comportamiento fue similar al obtenido por Santana (2007). En el presente ensayo la especie que respondió mejor a la enmienda fue *L. leucocephala* ya que obtuvo un peso seco de 65.28 g, mientras que sin enmienda fue de 24.27. Esto indica una diferencia de 41 g más en el suelo con enmienda. El comportamiento superior de *L. leucocephala* en el suelo enmendado es consistente con lo reportado por otros autores (Almeida et al., 1982; Duguma et al., 1988; Naidu, et al., 1990; Yamoah et al., 1998).

Con relación al índice raíz/tallo, de las plantas con relativo equilibrio de la raíz y el tallo, la mayor proporción (54%) pertenecen a la subfamilia *Papilionoideae*. Esta subfamilia parece tener una mayor capacidad de sobrevivir en una mayor diversidad de suelos y resistir a cambios severos de humedad debido a la masa radicular. Un mayor crecimiento de la raíz usando el carbohidrato del tallo provee más área superficial de absorción radicular y potencialmente más absorción de nitrógeno (Coder, 1998).

6.6 Número de nódulos

No se detectaron diferencias estadísticas significativas para el número de nódulos. Sin embargo, se observaron más de 100 nódulos en 7 especies (4 en suelo sin enmienda y 3 en suelo con enmienda). Entre estas especies las de mayor nodulación (aunque estadísticamente igual a las demás) fueron *C. fairchildiana* (183) e *I. vera* (176 nódulos planta⁻¹), ambas en el suelo sin enmienda. En cuanto al comportamiento de ambas especies en el suelo Humatas, estos resultados coinciden con Santana (2007). Este autor reportó un promedio de 234.69 nódulos planta⁻¹ para *C. fairchildiana* 180 días (6 meses después de la siembra) y 110 unidades para *I. vera* (300 días después de la siembra). Sin embargo, en el presente ensayo *C. fairchildiana* fue estadísticamente igual en el suelo con enmienda y en el sin enmienda. Esto no sucedió con *I. vera* que fue la única con diferencias entre los tratamientos con y sin enmienda. Esto sugiere que *I. vera* podría estar adaptada a suelos ácidos o que la especie de rizobio nativo en el suelo y homólogo a *I. vera* es más eficiente en el suelo no enmendado con CaCO₃ y nutrientes. El resultado es consistente con el hecho de que *I. vera* es una de las especies predominantes en las fincas de café bajo sombra en Puerto Rico (Arango, 2007). Sin embargo, Roskoski (1981) en evaluaciones de árboles de *I. vera* e *I. jinicuil* en una plantación en México, no encontró nódulos en las raíces de la primera, pero sí abundantes en la segunda. *Inga oerstediana* es otra especie reportada por Grossman et al. (2005) como de nodulación baja y limitada a los 90 y 150 días de la siembra en invernadero y en agrosistema de café.

En las especies que no nodularon, los resultados también coinciden parcialmente con Santana (2007). Las plantas de *A. pavonina* y *O. krugii* no nodularon en el suelo Humatas, pero sí nodularon en el suelo Los Guineos. La especie *A. pavonina* ha sido reportada con nódulos de rápido crecimiento de los cuales se aisló *Rhizobium* (Lim y Ng, 1977). Sin embargo, fue reportada como no noduladora por Allen y Allen (1981) y por Moreira (1995). Por otro lado, en el presente ensayo *S. grandiflora* y *L. diversifolia* no nodularon en el suelo

Humatas sin enmienda, mientras que Santana (2007) reporta 17 nódulos para la primera y 7 para la segunda en la misma serie de suelo.

6.7 Peso seco de los nódulos

El peso seco máximo de los nódulos en el presente ensayo (1.32 g) es similar a lo reportado por Santana (2007). Este autor reportó un peso máximo de 1.09 g en el suelo Humatas, 180 días después de la siembra. Sin embargo, las especies con la mayor biomasa de nódulos fueron distintas en ambos ensayos. En el presente ensayo la especie con más biomasa de nódulos fue *P. indicus*, mientras que en el ensayo de Santana (2007), lo fue *Albizia procera*. En el presente ensayo se obtuvieron pesos secos similares a los reportados por Santana (2007) (promedio 0.29 g y 0.24 g) respectivamente. Sin embargo, el porcentaje de plantas noduladas fue de 60% en el trabajo de Santana (2007) y de 75% en el presente estudio.

Mahmud et al. (2005) reportaron pesos secos de nódulos de 1.14, 1.25 y 1.38 g en *A. procera*, *L. leucocephala* y *P. juliflora*, respectivamente, 10 meses después de la siembra en tiestos. Los valores para *A. procera* (con=0.47 g, sin=0.42 g) y *L. leucocephala* (con=0.48 g, sin=0.46 g) en el presente ensayo son inferiores a los obtenidos por estos autores, debido posiblemente al tipo de suelo utilizado en ambos ensayos. El suelo usado por Mahmud et al. (2005) es moderadamente grueso a fino, de gris a gris verdoso y con un subsuelo areno limoso moderadamente grueso. Sin embargo, independientemente de la especie, y tomando en cuenta el tiempo, no hubo diferencias entre este ensayo (1.32 g seis meses después de la siembra) y el de Mahmut et al. (2005) (1.38 g diez meses después de la siembra).

6.8 Actividad de la nitrogenasa

Para la actividad total de la nitrogenasa, los datos del presente ensayo fueron inferiores a los reportados por Santana (2007). Este autor reportó un máximo de actividad total de 7.07 micromoles de C_2H_4 planta⁻¹ hora⁻¹ para la especie *A. lebbeck* 180 días después de la siembra. En el presente ensayo, esta especie tuvo una actividad total de la nitrogenasa de 2.40 nanomoles C_2H_4 planta⁻¹ hora⁻¹. Estos valores bajos pudieron ser debido a una reducción de la actividad total por el corte del tallo de la planta para usar sólo las raíces noduladas en el ensayo de reducción de acetileno. Así también, los resultados del presente ensayo son inferiores a los obtenidos por Santana (2007). Las tres especies más destacadas en cuanto a la actividad de la nitrogenasa en el estudio de Santana, fueron *A. procera*, *C. fairchildiana* y *F. macrophylla*. En el presente trabajo las tres especies más destacadas fueron: *E. poeppigiana*, *I. vera* y *A. inermis*.

Vessey (1994) menciona que mientras menos alterado esté el tejido de la planta, mejor será para medir a reducción de acetileno. El autor menciona que la actividad se puede ver reducida por factores como la exposición de las raíces a estrés por falta de carbohidratos cuando se corta el tallo de la planta. Esto reduce la actividad total de la nitrogenasa y además la magnitud de la inducción de acetileno puede reducirse o desaparecer.

Sobre la actividad específica de la nitrogenasa, la eficiencia de las especies fue menor que lo reportado por Santana (2007) y González-Ruiz et al. (2008). A los 180 días y en el suelo Humatas, Santana (2007) reportó una actividad específica de la nitrogenasa máxima de 160.69 micromoles peso seco de nódulos⁻¹ pta⁻¹ hr⁻¹, correspondiente a la especie *S. saman* (*Mimosoideae*). La especie más eficiente en el presente ensayo fue *A. mangium* (*Mimosoideae*) con 14.40 nanomoles peso seco de nódulos⁻¹ pta⁻¹ hr⁻¹.

González-Ruiz et al. (2008) reportaron una actividad específica promedio de 4.2 ± 1.9 micromoles peso seco⁻¹ hora⁻¹ en 4 árboles de *Erythrina lanata*, evaluadas *in situ* en un bosque seco tropical. Encontraron que la actividad varió entre especies y dentro de cada especie.

La baja actividad de la nitrogenasa registrada en el presente experimento pudo deberse debido a las condiciones de temperatura dentro del invernadero (28 °C). La temperatura promedio óptima que favorece la actividad de la nitrogenasa es de 15 a 26 °C. Otro factor que pudo afectar la actividad de la nitrogenasa fue la manipulación de las raíces al extraerlas de los tiestos. Singh y Wright (2003) encontraron que la manipulación del tallo y las raíces de plantas de *Pisum sativum* redujo la actividad de la nitrogenasa en mayor proporción que cuando se manipuló sólo el tallo de la planta.

Por otro lado, la fijación de nitrógeno pudo haberse medido también por el método Kjeldahl con el cual se determina el nitrógeno total en la planta. Sin embargo es importante aclarar que este método no discrimina entre el nitrógeno fijado de la atmósfera y el nitrógeno absorbido del suelo por la leguminosa.

6.9 Caracterización de las bacterias aisladas de los nódulos de las raíces

Las especies en su mayoría tenían bacterias que acidificaron el medio con bromotimol, evidenciando la posible presencia del género *Rhizobium*, como de rápido crecimiento. En segundo lugar la reacción alcalina indicando la posible presencia de colonias de crecimiento lento, posiblemente del género *Bradyrhizobium*. Esta característica es mencionada por Somasegaran y Hoben (1994). Una menor proporción de las cepas aisladas presentaron ambas reacciones, indicando la presencia de los dos géneros en un mismo nódulo, corroborando lo señalado por Somasegaran y Hoben (1994) que indican que un nódulo puede contener variaciones de una cepa o especie, o que no fueron completamente purificadas.

Algunas especies no fueron consistentes en cuanto a albergar un mismo tipo de cepa en los nódulos. Es el caso de *A. mangium*, con una cepa (A) con reacción alcalina y otra (B) de reacción ácida; *A. procera*, con una cepa (A) de reacción ácida y otra (B) que reaccionó alcalina. Las cepas aisladas de *I. vera* presentaron reacción ácida/alcalina (50% de nodulación) y alcalina (0% de nodulación). Este resultado difiere del reportado por Santana (2007) donde las cepas de *I. vera* en el suelo Humatas, además de que no indujeron nodulación, presentaron reacción ácida. Sin embargo en el suelo Los Guineos reportó un 10% de nodulación y reacción alcalina. En el caso de las cepas que no indujeron nodulación en *Macropodium atropurpureum*, esto probablemente se debió a que son especies no homólogas con la planta.

La presencia de diferentes cepas en nódulos de la misma planta, fue reportado por Bueno et al. (1996). También reportaron que *Leucaena leucocephala* noduló con todos los aislados con que se inoculó la planta. La observación de la reacción ácida/alcalina en algunas cepas aisladas de un nódulo de una misma especie de planta, coincide con lo reportado por estos autores.

La ausencia de nódulos en las plantas de *M. atropurpureum* inoculadas con cepas aisladas de las plantas del género *Calliandra*, coincide con lo reportado por Schröder (2000). El autor reportó la ausencia de nódulos en plantas de *M. atropurpureum* inoculadas con cepas aisladas de *Calliandra locoensis*. Esto podría indicar alta especificidad de la cepa de esta especie con el género *Calliandra*.

6.10 Enfermedades y plagas

Aunque aparecieron plantas infectadas por cochinilla, ácaros y “mildiu”, estos no influyeron negativamente en el normal desarrollo de las plantas, excepto para una planta de *A. mangium* donde se observó una proliferación de brotes nuevos afectados por “mildiu”. La

muerte de plantas en el suelo con enmienda se debió posiblemente a pudrición del tallo por el exceso de humedad debido a la compactación del suelo por la aplicación de CaCO_3 . Esto sugiere una susceptibilidad de estas especies al exceso de humedad.

El alto porcentaje de plantas de las *Mimosoideae* infectadas por nematodos (73%) sugiere que las especies de esta subfamilia podrían ser susceptibles al ataque. Sin embargo este fenómeno aparentemente no afectó la fijación de nitrógeno y el crecimiento de estas especies. La especie *Leucaena leucocephala* no presentó agallas de nematodos en sus raíces. Este fenómeno coincide con lo reportado por Vicente et al. (1986) quienes 50 días después de la siembra de *Leucaena leucocephala* encontraron resistencia de esta especie a la inoculación de dos especies de nematodos aislados en un suelo areno limoso de Puerto Rico.

7. CONCLUSIONES

Las especies *L. diversifolia*, *D. sissoo* y *E. poeppigiana* respondieron positivamente a la aplicación de enmienda (cal+nutrientes) para la altura mensual. Las demás especies no respondieron a la aplicación de enmienda ya que su altura mensual fue igual con y sin enmienda

Dentro de las especies que no respondieron a la enmienda, *E. cyclocarpum* fue la de mayor crecimiento mensual. Esta especie fue seguida por *A. peregrina* y *L. leucocephala*. Seis meses después de la siembra, las especies se comportaron igual en el suelo con enmienda y sin enmienda, es decir, no hubo un efecto de la enmienda en la altura total. La especie *E. cyclocarpum* (184 cm), *L. leucocephala* (181.29 cm), *C. houstoniana* (147 cm), *F. macrophylla* (140 cm) y *A. peregrina* (134 cm) fueron las especies que alcanzaron una mayor altura a los seis meses de edad.

En cuanto al diámetro del tallo hubo un efecto de la enmienda según la especie. Esto fue evidente en *E. poeppigiana* (con enmienda, 11.75 mm). Las demás especies no respondieron a la enmienda.

La enmienda no influyó en la variable raíz/tallo. Las especies *A. lebbeck* (0.98 g), *A. procera* (0.90) acumularon igual cantidad de biomasa en la raíz y en el tallo. Para las demás especies, se encontró una mayor biomasa en el tallo que en la raíz. Dentro de estas se encuentran, *A. peregrina* (0.85 g), *C. javanica* (0.72 g) y *E. berteroana* (0.7 g).

La especie *I. vera* presentó más nódulos en el tratamiento sin enmienda, es decir no respondió a la aplicación de la enmienda. Las demás especies se comportaron igual en enmienda y sin enmienda. Mientras que en cuanto al peso seco de nódulos *P. indicus* y *A. angustissima* respondieron mejor al suelo sin enmienda.

Bajo las condiciones del presente experimento, el peso seco de nódulos se podría utilizar para predecir el cambio en la actividad de la nitrogenasa. Se generó una ecuación con r^2 de 0.52% y 0.62 para el tratamiento con enmienda y sin enmienda, respectivamente.

La fijación de nitrógeno (actividad de la nitrogenasa) no fue afectada por la enmienda. Las especies tuvieron igual actividad tanto con enmienda como sin enmienda. *E. poeppigiana* (4.94 nanomoles de C_2H_4 planta⁻¹ hora⁻¹), *I. vera* (3.59), *A. inermis* (3.12), *S. saman* (3.03), *A. procera* (3.02), *E. cyclocarpum* (2.81) y también *P. indicus* (2.77), *G. sepium* (2.53), *A. lebbeck* (2.40), *A. mangium* (2.06), *F. macrophylla* (1.81), *C. fairchildiana* (1.79), *L. leucocephala* (1.74) y *E. berteriana* (1.55) fueron las de mayor actividad. Los nódulos de *A. mangium* y *E. poeppigiana* fueron más eficientes que las demás especies pues tuvieron una actividad específica de 14.40 y 14.40 nanomoles C_2H_4 peso seco⁻¹ hora⁻¹, respectivamente.

8. RECOMENDACIONES

Es recomendable el uso como sombra para café de las especies *Erythrina poeppigiana*, *Inga vera*, *Albizia procera* y *Leucaena leucocephala*. Estas especies podrían tener un mejor desarrollo con la aplicación de cal agrícola y nutrientes. También se recomienda como sombra la especie *Inga vera* que presentó un mayor número de nódulos en el suelo sin enmienda, indicando tolerancia de la especie a suelos ácidos o un efecto negativo de la enmienda sobre la especie (Cuadro 14).

Se debe advertir con respecto a *Leucaena leucocephala*, la cual es una especie invasora y por tanto debe podarse regularmente, sobre todo en la floración que es cuando se puede aprovechar la mayor cantidad de nitrógeno acumulado en las hojas. Esta práctica también evitaría la producción de frutos y de semillas.

Cuadro 14. Peso seco y número de nódulos para las especies con y sin enmienda

Especies	Peso seco de planta (g)		Número de nódulos	
	Con enmienda	Sin enmienda	Con enmienda	Sin enmienda
<i>Acacia angustissima</i>	-	-	-	-
<i>Acacia mangium</i>	-	-	-	-
<i>Acacia auriculiformis</i>	-	-	-	-
<i>Adenantha pavonina</i>	-	-	-	-
<i>Albizia lebeck</i>	-	-	-	-
<i>Albizia procera</i>	+	-	-	-
<i>Anadenanthera peregrina</i>	-	-	-	-
<i>Andira inermis</i>	-	-	-	-
<i>Calliandra calothyrsus</i>	-	-	-	-
<i>Calliandra houstoniana</i>	-	-	-	-
<i>Cassia javanica</i>	-	-	-	-
<i>Clitoria fairchildiana</i>	-	-	-	-
<i>Cojoba arborea</i>	-	-	-	-
<i>Dalbergia sissoo</i>	-	-	-	-
<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	-	-	-	-
<i>Erythrina berteroana</i>	-	-	-	-
<i>Erythrina poeppigiana</i>	+	-	-	-
<i>Flemingia macrophylla</i>	-	-	-	-
<i>Gliricidia sepium</i>	-	-	-	-
<i>Inga vera</i>	-	-	-	+
* <i>Inga nobilis</i> subsp. <i>quaternata</i>	-	-	-	-
<i>Leucaena diversifolia</i>	-	-	-	-
<i>Leucaena leucocephala</i>	+	-	-	-
<i>Ormosia krugii</i>	-	-	-	-
<i>Pithecellobium dulce</i>	-	-	-	-
<i>Pterocarpus indicus</i>	-	-	-	-
<i>Samanea saman</i>	-	-	-	-
<i>Sesbania grandiflora</i>	-	-	-	-

+ . Respuesta positiva, - . No hubo respuesta . * Esta especie se sembró tres meses después de las demás especies.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo deben ser validados en experimentos de campo tanto en la Sub-Estación Experimental de Adjuntas como en fincas en la zona de producción de café de Puerto Rico. El crecimiento inicial y la nodulación se pueden evaluar durante el primer año tomando en cuenta el nivel de competencia por agua y nutrientes.

Debido a que casi todas las plantas de *P. carbonarium* murieron en el tratamiento con enmienda, es importante realizar experimentos de invernadero en el que se incluya esta especie con diferentes dosis de cal agrícola en el suelo. De esa manera se puede comparar el desarrollo de la planta en suelo encalado y en el sustrato que se utiliza para la producción de arbolitos en la Subestación Experimental de Adjuntas. Además, se podría evaluar el efecto de la temperatura en el crecimiento de esta especie. Otra alternativa es la de hacer estudios de campo para evaluar el desarrollo de las especies a diferentes alturas y pH del suelo.

El estudio del manejo de especies de rápido crecimiento como el *E. cyclocarpum* puede arrojar información importante sobre competencia por agua con el café. El sistema radicular del *E. cyclocarpum* puede interferir con el normal desarrollo del árbol del café por lo que es necesario estudiar marcos de siembra y frecuencia de poda del follaje para regular la sombra. Además, esta especie presenta un crecimiento de raíces superficiales lo que indica posible competencia por nutrientes en los primeros horizontes del suelo.

Es importante el aislamiento e identificación de las especies de nematodos patógenos presentes en suelo Ultisol de la zona cafetalera. Pruebas en tiestos que incluyan la inoculación de la especie de nematodo identificada permitirá seleccionar las especies de árboles tolerantes y que puedan desarrollarse en presencia del patógeno.

La variabilidad genética en los árboles es una de las dificultades para poder desarrollar programas de producción de semillas de especies promisorias. Es importante la identificación de árboles sanos para utilizarse como árboles élite en la producción de semillas. Estas semillas podrían conservarse en un banco de semillas para evaluar su longevidad o

utilizarse en la producción de plántulas para ensayos posteriores. Además se podrían hacer pruebas moleculares para evaluar la diversidad genética en especies de árboles promisorios nativos e introducidos.

Las especies que se conserven en bancos de semillas podrían ser especies nativas las cuales deben implementarse como sombreadores en los agrosistemas de café en Puerto Rico. También podrían utilizarse especies introducidas tomando en cuenta que sean especies que no compitan o con baja competencia por nutrientes y agua, y que no sean hospederas de enfermedades o insectos que atacan al café. Debido a que en los cafetales de Puerto Rico predominan *Inga vera* y *Andira inermis*, se deben seleccionar nuevas especies arbóreas que contribuyan con la biodiversidad dentro del cafetal. Semillas de estas especies y otras con potencial para usarse como sombra pueden introducirse de bancos de semillas como el de Educational Concerns for Hunger Organization (ECHO) y de árboles élites seleccionados para propagación en otras islas del Caribe y de América Central.

9. LITERATURA CITADA

Abaidoo, R.C., Keyser, H.H., Singleton, P.W., Dashiell, K.E. y Sanginga, N. 2007. Population size, distribution, and symbiotic characteristics of indigenous *Bradyrhizobium* spp. that nodulate TGx soybean genotypes in Africa. *Applied Soil Ecology* 35:57–67.

Abruña, F. y Vicente, J. 1955. Refinement of a quantitative method for determining the lime requirement of soils. *J. of Agric. Univ. P. R.* 39:41-45.

Abruña, F., J. Vicente-Chandler, L.A. Becerra, and R. Bosque-Lugo. 1965. Effects of liming and fertilization on yields and foliar composition of high-yielding sun-grown coffee in Puerto Rico. *J. of Agric. Univ. P. R.* 49:413-428.

Abruña, F., Silva, S., Vicente-Chandler, J. 1966. Effects of yields, shade, and varieties on size of coffee beans. *J. of Agric. Univ. P. R.* 50:226-230.

Allen O. N., Allen E. K. 1981. *The Leguminosae: a source book of characteristics, uses and nodulation.* University of Wisconsin Press/Macmillan, Madison, WI. 812 p.

Almeida, J.E., Valarini, M.J. y Lopes, E.S. 1982. Response of *Leucaena leucocephala* to inoculation in a soil of pH 5.5. *Biological Nitrogen Fixation Technology for Tropical Agriculture.* Centro Internacional de Agricultura Tropical. CAB Abstracts. <http://www.cababstractsplus.org/google/abstract.asp?AcNo=19836748384>

Andrade, D. S., Murphy, P. J. y Guiller, K. E. 1999. Genetic diversity of rhizobial populations nodulating *Phaseolus vulgaris* in acid soils from Brazil. En: Martínez, E., y Hernández, G. (eds). *Highlights of nitrogen fixation research.* Kluwer. New York, USA. pp 291-294.

Anebeh, P. O. 2007. Complete excavation and root distribution of some agroforestry tree legumes in Nigeria. *IUFRO NFT News, Improvement and Culture of Nitrogen Fixing Trees* 10:5-6.

Anebeh, P.O. y Tchoundjeu, Z. 2005. Root distribution of two agroforestry tree legumes suitable for fodder production in Niger Delta Region, Nigeria. *IUFRO NFT News, Improvement and culture of nitrogen fixation*, 8: 4-5.

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, Depto. Agronomía y Suelos, Mayagüez, P.R. 126 p.

Arellano, R. 2001. Evaluación del escurrimiento y pérdida de suelo en agrosistemas de café. *Rev. Forest. Venez.* 45:9-14.

Ataroff, M. y Monasterio, M. 1997. Soil erosion under different management of coffee plantations in the Venezuelan Andes. *Soil Technology* 11:95-108.

Babbar, L. I. y Zak, D. R. 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 Giller, K. E. 2006. Relationships between rhizobial diversity and host legume nodulation and nitrogen fixation in tropical ecosystems. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 76:319-330

Bergersen F. J. 1980. *Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation*. Wiley, Chichester. 701 p.

Blair, G. J., Lithgow, K. B. y Orchard, P. W. 1988. The effects of pH and calcium on the growth of *Leucaena leucocephala* in an Oxisol and Ultisol soil. *Plant and Soil* 106:209-214.

Board on Science and Technology for International Development. 1994. Biological nitrogen fixation. National Academy of Science. Washington, D. C.
<http://www.nap.edu/readingroom/books/bnf/>.

Bolaños, M., Moraga, P., Barrios, M. y Haggard, J. 2007. Influence of shade types on quality and productivity of coffee in the pacific zone of Nicaragua. Second International Symposium. Multiestrata agroforestry systems with perennial crops. Making ecosystem services count for farmers, consumers and the environment. Poster presentation. Septiembre 17-21, 2007. Turrialba. http://web.catie.ac.cr/CD_multiestrata/Poster/session1/poster_sec1.htm.

Bornemisza, E. 1982. Nitrogen cycling in coffee plantations. *Plant and Soil* 67:241-246.

Bremner J.M. y Hauck R.D. 1982. Advances in methodology for research on nitrogen transformation in soils. En: *Nitrogen in Agricultural Soils*. Ed. F.J. Stevenson. Agronomy No. 22.. Am. Soc. of Agron., Madison, WI. p 467-502.

Brewbaker, J. L., Halliday, J. y Lyman, J. 1983. Economically important nitrogen fixing tree species. *Nitrogen Fixing Tree Research Report* 1: 35-40.

Brewbaker, J. L., Willwers, K. B. y Macklin, B. 1990. Nitrogen fixing trees: validation and prioritization. *Nitrogen Fixing Tree Research Report* 8: 8-16.

- Brockwell, J., Bottomley P. J. y Thies, J. E. 1995. Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility: A critical assessment. *Plant and Soil* 174:143-180.
- Bueno, A., Alameda, M., Schröder, E. C. 1996. *Rhizobium* tropicales de crecimiento rápido : experiencia de Puerto Rico. En: XVII Reunión Latinoamericana de Rhizobiología.. Memorias. Eds, J. Pijnenborg ; D. Ruiz; W. Siles. Santa Cruz, Bolivia. p 213-215.
- Chien, S. H., Carmona, G., Menon, R. G. y Hellums, D. T. 1993. Effect of phosphate rock sources on biological nitrogen fixation by soybean. *Fertilizer Research* 34: 153-159.
- Coder, K. D., 1998. Control of shoot/root balance in trees. University of Georgia Cooperative Extension Service Forest Resources Publication. FOR 98-3. 5 p. <http://warnell.forestry.uga.edu/service/library/for98-003/for98-003.pdf>.
- Cooperative Conservation America. 2009. Cooperative conservation case study. Restoring shaded coffee plantation in Puerto Rico. <http://www.cooperativeconservationamerica.org/viewproject.asp?pid=121>. Última actualización: 6 de abril del 2009.
- Cruz L. y Schröder E. 2006. Characterization of soil in the Puerto Rico coffee agrosystem. Caribbean Food Crops Society. Conferencia Anual. San Juan. Resumen. p 66.
- DaMatta, F. M. 2004. Ecophysiological constraints on the production of shaded and unshaded coffee: a review. *Field Crops Research* 86:99–114.
- Danso S. K. A .1985. Methods for estimating biological nitrogen fixation. En: Biological Nitrogen Fixation in Africa. Eds. H. Scali, S.O. Kenya. p 213-234. Nairobi MIRCEN. Nairobi.
- Danso S. K. A., Bowen G. D. y Sanginga, N. 1992. Biological nitrogen fixation in trees in agro-ecosystems. *Plant and Soil* 141: 177-196.
- Di Estéfano, J. F., Fournier, L. A. 1999. Crecimiento de la parte aérea y radicular de *Enterolobium cyclocarpum* (Guanacaste), Ciudad Colón, Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 23:77-87.
- Duguma, B., Kang, B. T. y Okali, D. U. U. 1988. Effect of liming and phosphorus application on performance of *Leucaena leucocephala* in acid soils. *Plant and Soil* 110:57-61.
- Escalante, E. E. 1995. Coffee and agroforestry in Venezuela. *Agroforestry Today*. 7 : 5-7.
- Estación Experimental Agrícola. 1999. Conjunto Tecnológico Para la Producción de Café. Publicación 104. Universidad de Puerto Rico. 29 p.

Estación Experimental Agrícola 2005. Informe de la Reunión de la Empresa del Café. Sub-Estación Experimental Adjuntas. Universidad de Puerto Rico. 4 p.

Faria, S. M. de, Lima, H. de, Franco, A. A., Mucci, E. S. F. y Sprent, J. I. 1987. Nodulation of legume trees from South East Brazil. *Plant and Soil* 99:347-356.

Farrel, J. G. y Altieri, M. A. 1995. Agroforestry systems. En: *Agroecology. The science of sustainable agriculture*. Ed. M. A. Altieri. pp 247-263. Westview, CO.

Gellings, C. W. y Parmenter, K. E. 2004. Energy efficiency in fertilizer production and use, En: *efficient use and conservation of energy*. Eds. Clark W. Gellings, y Kornelis Blok. En: *Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*. UNESCO. EOLSS Publishers, Oxford. <http://www.eolss.net>.

Franco, A. A. y Faria, M. S. de. 1997. The contribution of N₂-fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. *Soil Biol. Biochem.* 29:897-903.

Giller, K. E. 2003. Biological nitrogen fixation. En: Schroth, G. y Sinclair, F. L. (eds). *Trees, crops and soil fertility. Concepts and research methods*. CABI, Wallingford, UK. pp 259-269.

Giller, K. E., Cadisch, G., Ehaliotis C., Adams, E., Sakala, W. D. y Mafongoya, P. L. 1997. Building soil nitrogen capital in Africa. En: *Replenishing soil fertility in Africa*. Eds. R. J. Buresh, P. A. Sánchez y F. Calhoun. pp 151–192. SSSA, Madison, WI.

González-Ruiz, T., Jaramillo, V., Peña Cabriales, J. J. y Flores, A. 2008. Nodulation dynamics and nodule activity in leguminous tree species of a Mexican tropical dry forest. *Journal of Tropical Ecology* 24:107-110.

Grossman, J. M., Sheaffer, C., Wyse, D., Bucciarelli, B., Vance, C. y Graham, P. H. 2005. An assessment of nodulation and nitrogen fixation in inoculated *Inga oerstediana*, a nitrogen-fixing tree shading organically grown coffee in Chiapas, Mexico. *Soil Biol. Biochem.* 20:1-16.

Haggar, J., Barrios, M., Merlo, M., Munguia, R., Staver, C. y de Melo-Virginio, E. 2007. Shade-productivity interactions in coffee agroforestry trials in Costa Rica and Nicaragua. En: *Second International Symposium. Multiestrata Agroforestry Systems with Perennial Crops. Making ecosystems services count for farmers, consumers and the environment*. September 17-21, 2007. Oral presentations, session 1. 8 p. http://web.catie.ac.cr/CD_multiestrata/presentaciones_orales/session1/Shade_Productivity.pdf.

Hansen, A. P. 1994. Symbiotic N₂ fixation of crop legumes: achievements and perspectives. *Hohenheim Tropical Agricultural Series*. Center for Agriculture in the Tropics and Subtropics, University of Hohenheim, Germany. 248 p.

Hardarson G., Ed. 1990. Use of nuclear techniques in studies of soil-plant relationships. Training course series No. 2, IAEA, Vienna. 223 p.

Hardarson G. y Danso S. K. A. 1993. Methods for measuring biological nitrogen fixation in grain legumes. *Plant and Soil* 152: 19-23.

Hardarson G., Danso S. K. A. y Zapata F. 1987. Biological nitrogen fixation in field crops. En: *Handbook of Plant Science in Agriculture*. Ed. B R Christie. pp 165-192. CRC Press Inc., Boca Raton, FL.

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

Hardy R. W. F., Holsten R. D., Jackson E. K. y Burns R. C. 1968. The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: Laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.* 43:1185-1207.

Hardy R. W. F. y Knight, Jr. E. 1967. ATP-dependent reduction of azide and HCN by N₂-fixing enzymes of *Azotobacter vinelandii* and *Clostridium pasteurianum*. *Biochim. Biophys. Acta* 139: 69-90.

Havelka, U. D., Boyle, M. G. y Hardy, R. W. F. 1982. Biological nitrogen fixation. En: *Nitrogen in Agricultural Soils*. Ed. F. J. Stevenson. Am. Soc. of Agron. No. 22, Madison, WI. pp. 365-422.

Hernández, E. 1930. La erosión de los suelos en relación con el cultivo de café. *Revista de Agricultura de Puerto Rico*. pp. 23-41.

Hendershot, W. H., Lalonde, H. y Duquette, M. 1993. Soil reaction and exchangeable acidity. En: *Soil Sampling and Methods of Analysis*. Ed. M. R. Carter. Canadian Society of Soil Science. Lewis Publisher. pp 144 – 145.

Kass, D. L. 1994. *Erythrina* species-pantropical multipurpose tree legumes. En: Gutteridge, R. C. y Shelton, H. M., ed., *Forage tree Legumes in Tropical Agriculture*. CAB International, Wallingford, UK, p 84-96.

Kimemia, J. k., Odeny, D. A. y Mithamo, M.W. 2007. Influence of shade on soils and coffee yields. En: *Second International Symposium. Multiestrata Agroforestry Systems with Perennial Crops. Making ecosystems services count for farmers, consumers and the environment*. September 17-21, 2007. Poster Presentations, session 1. Turrialba, Costa Rica. 4 p. http://web.catie.ac.cr/CD_multiestrata/Poster/session1/poster_sec1.htm.

Knowles R. 1980. Nitrogen fixation in natural plant communities and soils. En: *Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation*. Ed. F. J. Bergersen. pp 557-582. Wiley, New York.

- Lewis, G., Schrire, B., Mackinder, B. y Lock, M. (eds). 2005. Legumes of the world. Royal Botanical Gardens. Kew, UK. 577 p.
- Lim, G. y Ng, H. L. 1977. Root nodules of some tropical legumes in Singapore. *Plant and Soil* 46: 317-27.
- Linblad, P. y Russo, R. 1986. C₂H₂-reduction by *Erythrina poeppigiana* in Costa Rican coffee plantation. *Agroforestry Systems* 4:33-37.
- Mc Lean, E. O. 1971. Potentially beneficial effects from liming: chemical and physical. *Soil Crop Sci. Soc. Fla. Proc.* 31:189-196.
- Mahmud, S., Rafiqul Hoque, A.T.M. y Mohiuddin, M. 2005. Nodulation behaviour and biomass productivity of three leguminous plant species at nursery stage in Chittagong University Soils. *Res. J. Agric. Biol. Sci.* 1: 89-93.
- Marchand, G., Ryan, M. C., Bethune, D. N. y Chu, A. 2002. Groundwater-surface water interaction and nitrate origin in municipal water supply aquifers, San Jose, Costa Rica. <http://www.portofentry.com/site/root/resources/technology/1699.html>.
- Méndez, V. E., Gliessman, S. R., Gilbert, G. S. 2007. Tree biodiversity in farmer cooperatives of a shade coffee landscape in western El Salvador. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 119:145–159.
- Mogollón, J. P., García-Miragaya, J.; Sánchez, L. F., Chacón, N.; y J. Araújo. 1996. Nitrógeno potencialmente disponible en suelos de cafetales bajo diferentes árboles de sombra. *Agronomía Tropical* 47:87-102.
- Molina, S. y Alemañy, S. 1997. Species codes for the trees of Puerto Rico and the U.S. Virgin Island. Gen. Tech. Rep. SO-122. Asheville, NC:U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Research Station. 67 p.
- Mondoñedo, J. R. 1957. Breve historia del café en el mundo. *Revista de Agricultura de Puerto Rico* 44: 3-7.
- Montagnini, F. 1992. Sistemas agroforestales. Principios y aplicaciones en los trópicos. Organización de Estudios Tropicales, San José, Costa Rica. 621 p.
- Moreira, F. M. S. 1995. Nodulação e crescimento de leguminosas em dois solos da Amazônia. *R. Bras. Ci. Solo, Campinas*, 19:197-204.
- Muñiz-Torres O. y Monroig-Ingles M. 1994. Región cafetalera de Puerto Rico: Características y manejo de los suelos. Universidad de Puerto Rico Recinto Universitario

- Piedras, de Mayagüez. Colegio de Ciencias Agrícolas. Servicio de Extensión Agrícola. 17 p.
- Munns, D. N. 1965. Soil acidity and growth of legume. I. Interactions of lime with nitrogen and phosphate on growth of *Medicago sativa* L. and *Trifolium subterraneum* L. Austral. J. Agric. Res. 16:733-741.
- Naidu, R., Tillman, R.W., Syers, J.K. y Kirkman, J.H. 1990. Lime-aluminium-phosphorus interactions and the growth of *Leucaena leucocephala*. I. Plant growth studies. Plant and Soil 126:1-8.
- O'Connel, D. A. 2004. Shade-grown coffee plantations in northern Latin America: a refuge for more than just birds & biodiversity. UCLA Journal of Environmental Law & Policy. University of California at Los Angeles. <http://www.thefreelibrary.com/Shade-grown+coffee+plantations+in+northern+Latin+America:+a+refuge...-a0116452004>.
- O'Connor, T., Rahayu S. y van Noordwijk, M. 2005. Birds in a coffee agroforestry landscape in Lampung. World Agroforestry Centre. p 1.
- Odee, D.W., Haukka, K., McInroy, S. G., Sprent, J. I., Sutherland, J. M. y Young, J. P. W. 2002. Genetic and symbiotic characterization of rhizobia isolated from trees and herbaceous legumes grown in soils from ecologically diverse sites in Kenya. Soil Biol. Biochem. 34:801-811.
- O'Hara, G. W., Howieson, J. G. y Graham, P. H. 2002. Nitrogen fixation and agricultural practice. En: Leigh, G. J.(ed.). Nitrogen fixation at the millennium. Elsevier, London. pp 391-420.
- Olson, R. A. y Kurtz, L. T. 1984. Crop nitrogen requirements, utilization, and fertilization. En: Nitrogen in Agricultural Soils. Ed. F. J. Stevenson. Am. Soc. of Agron. No. 22, Madison, WI. pp 567-604.
- Peoples M. B., Faizah A. W., Rerkasem B. y Herridge D. F. 1989. Methods for Evaluating Nitrogen Fixation by Nodulated Legumes in the Field. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra. 76 p.
- Peoples, M. B., Herridge, D. F. y Ladha, J. K. 1995. Biological nitrogen fixation: An efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production? Plant and Soil 174:3-28.
- Perfecto, I., Rice, R., Greenberg, R. y Van der Voort, M. 1996. Shade coffee: a disappearing refuge for biodiversity. Bioscience 46:598-608.

- Phouthavong, D. A. E. E. K., Phimphachanvongsod, V. y Phengsavanh, P. 1998. Assessment of fodder tree legumes in a lowland area of Lao PDR. En: Integrated crop-livestock production systems and fodder trees. Eds. A. C. de la Viña y F. A. Moog. 6th Meeting of the Regional Working Group on Grazing and feed resources for Southeast Asia. Proceedings. Legaspi, Philippines. pp 89-98.
- Rennie R. J. y Rennie A. D. 1983. Techniques for quantifying N₂ fixation in association with non-legumes under field and greenhouse conditions. *Can. J. Microbiol.* 29: 1022-1035.
- Rice, R. A. y Ward, J. R. 1996. Coffee, conservation, and commerce in the western hemisphere. Smithsonian Migratory Bird Center, Washington, D.C. 40 p. <http://nationalzoo.si.edu/ConservationAndScience/MigratoryBirds/Coffee/whitepaper.pdf>
- Ridley, A. M., Slattery, W. J., Helyar, K. R. y Cowling, A. 1990. Acidification under grazed annual and perennial grass based pastures. *Austral. J. Exp. Agric.* 30, 539–544.
- Rincón, J. J., Gallardo, Y., Leal, M. y Rojas Y. 2004. Efectos de diferentes relaciones de calcio y fósforo en el suelo sobre la nodulación de *Acacia mangium* (Willd) y *Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit., en condiciones de vivero. *Zootecnia Tropical* 22:167-173.
- Roskoski, J. P. 1981. Nodulation and N₂-fixation by *Inga jinicuil*, a woody legume in coffee plantations. I. Measurements of nodule biomass and field C₂ H₂ reduction rates. *Plant and Soil* 59:201-206.
- Roskoski, J. P. 1982. Nitrogen fixation in a Mexican coffee plantation. *Plant and Soil* 67: 283-291.
- Ryan, M. C., Graham, G. R. y Rudolph, D. L. 2001. Contrasting nitrate adsorption in andisols of two coffee plantations in Costa Rica. *J. Environ. Qual.* 30:1848–1852.
- Sahgal, M. y Johri, B. N. 2006. Taxonomy of rhizobia: Current status. *Current Science* 90:486-487.
- Sanginga, N., Bowen G. D. y Danso, S. K. A. 1990. Assessment of genetic variability for N₂ fixation between and within provenances of *Leucaena leucocephala* and *Acacia albida* estimated by ¹⁵N labelling techniques. *Plant and Soil* 127: 169-178, 1990.
- Sanginga, N., Mulongoy, K. y Ayanaba, A. 1988. Response of *Leucaena/Rhizobium* symbiosis to mineral nutrients in southwestern Nigeria. *Plant and Soil* 112:121-127.
- Santana, M. 2007. Fijación biológica de nitrógeno por leguminosas arbóreas para la sombra de café en Puerto Rico. Tesis M.S. Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, P.R. 90 p.

- Schöllhorn, R., Burris, R. H. 1967a. Reduction of Azide by the N₂-fixing enzyme system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 57:1317-1323.
- Schöllhorn, R., Burris, R. H. 1967b. Acetylene as a competitive inhibitor of N₂ fixation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 58:213-216.
- Schröder, E. C. 2000. New records of tropical legumes nodulation. En: Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity. Vol. 38. Ed. Springer. Resumen p. 631.
- Shearer G., Kohl H. 1986. N₂-fixation in field settings: Estimations based on natural ¹⁵N abundance. Austral. J. Plant Physiol. 13:699-757.
- Siebert, S. F. 2002. From shade- to sun-grown perennial crops in Sulawesi, Indonesia: implications for biodiversity conservation and soil fertility. Biodiversity and Conservation 11:1889-1902.
- Singh, G. y Wright, D. 2003. Faults in determining nitrogenase activity. Journal of Agronomy and Cop Science. 3:162-168.
- Somasegaran P., Hoben H. J. 1994. Handbook for Rhizobia: Methods in legume-Rhizobium technology. Primera edición. Springer-Verlag, New York. pp 192-398.
- Sprent, J. I. 2001. Nodulation in legumes. Royal Botanic Garden, Kew. 146 p.
- Sprent, J. I. 2007. Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. New Phytologist 174: 11–25.
- Sprent, J. I. y Parsons, R. 2000. Nitrogen fixation in legume and no legume trees. Field Crops Research 65:183-196.
- Stevenson, F. J. 1982. Origin and distribution of nitrogen in soil. En: Nitrogen in Agricultural Soils. Ed. F. J. Stevenson. pp 1-42. Am. Soc. of Agron. No. 22, Madison, WI.
- Tang, C., Hinsinger, P., Jaillard, B., Rengel, Z., Drevon, J.-J. 2001. Effect of phosphorus deficiency on the growth, symbiotic N₂ fixation and proton release by two bean (*Phaseolus vulgaris*) genotypes. Agronomie 2: 683–689.
- Thies, J. E., Singleton, P. W. y Bohlool, B. B. 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
- Thomas, R. J. 1995. Role of legumes in providing N for sustainable tropical pasture systems. Plant and Soil 174: 103–118.

- Triplett, E. W., Rolfe, B. G., Cocking, E. C., Kennedy, I. y Vanderleyden, J. 2007. A nitrogen story. *Microbe* 2: 372-373.
- Turk, D. y Keyser, H. H. 1992. Rhizobia that nodulate tree legumes: specificity of the host for nodulation and effectiveness. *Can. J. Microbiol.* 38:451-460.
- Uchida, R. y Hue, N. V. 2000. Soil acidity and liming. En: Plant nutrient management in Hawaii's soils, approaches for tropical and subtropical agriculture. Eds. R. Uchida y N.V. Hue. College of Tropical Agriculture and Human Resources, University of Hawaii, Manoa. pp. 101-111. <http://www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/pnm10.pdf>.
- USDA (United States Department of Agriculture). 1982. Soil Survey of Arecibo Area Northern Puerto Rico. University of Puerto Rico, Mayagüez Campus, College of Agricultural Science. pp 23,72.
- USDA (United States Department of Agriculture). 2007. Tropical products: World Market and Trade. Foreign Agricultural Service. Circular series FTROP 4-07. December 2007. 25 p. http://www.fas.usda.gov/tropical_arc.asp
- USDA (United States Department of Agriculture). 2009. Census of Agriculture 2007. Puerto Rico, island and municipio data. Volume 1. Geographic Area Series. Part 54. USDA-NASS. Washington, D. C. p 15, 204. http://www.agcensus.usda.gov/Publications/2007/Full_Report/Outlying_Areas/prv1.pdf
- Valles-de la Mora B., Cadisch G., Aluja-Schunemann A. 2003. Comparación de metodologías de isótopos para evaluar fijación de N atmosférico y su destino en suelos y plantas. *Agrociencia* 37:117-128.
- Vessey, J. K. 1994. Measurement of nitrogenase activity in legume root nodules: In defense of the acetylene reduction assay. *Plant and Soil*, 158:151-162.
- Vicente-Chandler, J., Abruña, F. y Silva, S. 1984. Experimentación y su aplicación al cultivo intensivo de café en Puerto Rico. Universidad de Puerto Rico. Colegio de Ciencias Agrícolas. Estación Experimental Agrícola. Boletín 273. 75 p.
- Vicente, N. E. 1986. Reaction of *Leucaena leucocephala* to populations of *Meloidogyne incognita* and *M. javanica* from Puerto Rico. *J. Agric. Univ. P. R.* 70: 157-158.
- Vincent J. M. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. IBP Handbook No 15. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 164 p.
- Weaver, P. L., Birdsey, A. 1986. Tree succession and management opportunities in coffee shade stands. *Turrialba* 36:47-58.

Wei-Er, C. y Fuh-Jiunn, P. 1988. Effect of the soil pH on the Growth and nutrients levels of seedling of *Leucaena diversifolia*. Resumen Bull. Taiwan For. Res. Inst. New Series. 3:133-146. http://www.tfri.gov.tw/enu/files/030301_1988.pdf.

Weir, B. S. 2008. The current taxonomy of rhizobia. New Zealand rhizobia website. <http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia.html>. Última actualización, 16 de noviembre, 2008.

Yamoah, C. F., Ngueguim, M. y Ngong, C. 1998. Stimulation of top and root growth of *Leucaena* with farm manure in the mid-altitude agro-ecological zone of North-West Cameroon. *Expl. Agric.* 34:313-322.

Zahran, H. H. 1999. *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63:968-989

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

10. APÉNDICES

Apéndice 1. Datos y curva de encalado del suelo utilizado en el experimento. El procedimiento utilizado para determinar la necesidad de encalado fue el sugerido por Abruña y Vicente (1955).

Se utilizó $\text{Ca}(\text{OH})_2$ a una concentración de 0.05N.

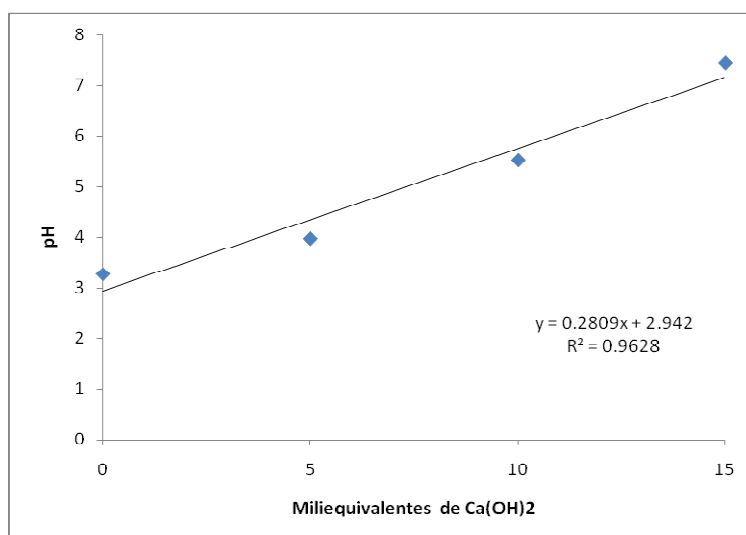
	miliequivalentes de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ /100 g	0	5	10	15
	mililitros de $\text{Ca}(\text{OH})_2$	0	10	20	30
Repeticiones	1	3.26	3.96	5.52	7.39
	2	3.28	3.98	5.52	7.48
	promedios	3.27	3.97	5.52	7.435

Cuadro con los promedios

pH del suelo	miliequivalentes de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ / 100 g suelo
3.27	0
3.97	5
5.52	10
7.435	15

$$y = 2.942 + 0.2809(12.5)$$

Para alcanzar un pH de 6.45 se aplicaron 12.5 ton ha^{-1}



Apéndice 2. Análisis de varianza y comparación de medias para la altura mensual de las especies leguminosas arbóreas que resultaron significativas para la interacción enmienda × tiempo.

L. diversifolia

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Altura	40	0.93	0.88	25.13

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo	60380.70	15	4025.38	20.03	<0.0001	
Enmienda	6451.60	1	6451.60	2.59	0.2062	(Enmienda*bloque)
bloque	846.60	3	282.20	1.40	0.2658	
Enmienda*bloque	7485.00	3	2495.00	12.42	<0.0001	
tiempo	42429.85	4	10607.46	52.79	<0.0001	
Enmienda*tiempo	3167.65	4	791.91	3.94	0.0135	
Error	4822.90	24	200.95			
Total	65203.60	39				

Test:Tukey Alfa:=0.05 DMS:=20.87963

Error: 200.9542 gl: 24

tiempo	Medias	n			
2	14.00	8	A		
3	26.00	8	A		
4	60.63	8		B	
5	80.38	8		B	C
6	101.00	8			C

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

Test:Tukey Alfa:=0.05 DMS:=34.83710

Error: 200.9542 gl: 24

Enmienda	tiempo	Medias	n				
sin	2	12.50	4	A			
con	2	15.50	4	A			
sin	3	22.00	4	A			
con	3	30.00	4	A	B		
sin	4	47.25	4	A	B	C	
sin	5	60.25	4		B	C	
con	4	74.00	4			C	D
sin	6	76.50	4			C	D
con	5	100.50	4				D
con	6	125.50	4				D
							E
							E

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

D. sissoo

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Altura	40	0.92	0.87	31.88

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo	39936.28	15	2662.42	17.84	<0.0001	
Enmienda	6630.63	1	6630.63	4.65	0.1199	(Enmienda*bloque)
bloque	3877.88	3	1292.63	8.66	0.0005	
Enmienda*bloque	4275.88	3	1425.29	9.55	0.0002	
tiempo	22348.90	4	5587.23	37.43	<0.0001	
Enmienda*tiempo	2803.00	4	700.75	4.69	0.0061	
Error	3582.50	24	149.27			
Total	43518.78	39				

Test: Tukey Alfa:=0.05 DMS:=37.99670

Error: 1425.2917 gl: 3

Enmienda	Medias	n
sin	25.45	20
con	51.20	20

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

Test: Tukey Alfa:=0.05 DMS:=17.99541

Error: 149.2708 gl: 24

tiempo	Medias	n
2	8.63	8
3	15.25	8
4	41.25	8
5	55.25	8
6	71.25	8

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

Test: Tukey Alfa:=0.05 DMS:=30.02486

Error: 149.2708 gl: 24

Enmienda	tiempo	Medias	n
sin	2	6.50	4
sin	3	10.00	4
con	2	10.75	4
con	3	20.50	4
sin	4	27.50	4
sin	5	37.00	4
sin	6	46.25	4
con	4	55.00	4
con	5	73.50	4
con	6	96.25	4

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

E. poeppigiana

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Altura	40	0.99	0.98	6.29

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo	10810.90	15	720.73	136.20	<0.0001	
Enmienda	1166.40	1	1166.40	88.36	0.0026	(Enmienda*bloque)
bloque	253.90	3	84.63	15.99	<0.0001	
Enmienda*bloque	39.60	3	13.20	2.49	0.0841	
tiempo	8676.15	4	2169.04	409.90	<0.0001	
Enmienda*tiempo	674.85	4	168.71	31.88	<0.0001	
Error	127.00	24	5.29			
Total	10937.90	39				

Test: Tukey Alfa:=0.05 DMS:=3.65663

Error: 13.2000 gl: 3

Enmienda	Medias	n
sin	31.15	20
con	41.95	20

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

Test:Tukey Alfa:=0.05 DMS:=3.38821

Error: 5.2917 gl: 24

tiempo	Medias	n				
2	18.00	8	A			
3	22.38	8		B		
4	38.88	8			C	
5	45.75	8				D
6	57.75	8				E

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

Test:Tukey Alfa:=0.05 DMS:=5.65314

Error: 5.2917 gl: 24

Enmienda	tiempo	Medias	n					
con	2	17.75	4	A				
sin	2	18.25	4	A				
sin	3	20.50	4	A	B			
con	3	24.25	4		B			
sin	4	32.75	4			C		
sin	5	37.50	4			C		
con	4	45.00	4				D	
sin	6	46.75	4				D	
con	5	54.00	4					E
con	6	68.75	4					F

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

Apéndice 3. Análisis de varianza y comparación de medias de la altura mensual de todas las especies excepto *L. diversifolia*, *D. sissoo* y *E. poeppigiana*

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Altura	960	0.83	0.79	36.87

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor (Error)
Modelo	1056080.61	191	5529.22	20.34	<0.0001
especie	323843.91	23	14080.17	8.35	<0.0001(especie*bloque)
bloque	414.60	3	138.20	0.51	0.6766
especie*bloque	116389.20	69	1686.80	6.20	<0.0001
tiempo	516267.90	4	129066.98	474.78	<0.0001
especie*tiempo	99165.00	92	1077.88	3.97	<0.0001
Error	208779.43	768	271.85		
Total	1264860.03	959			

Test:Tukey Alfa:=0.05 DMS:=34.87843

Error: 1686.7999 gl: 69

especie	Medias n							
Ency	102.20 40	A						
Anpe	70.32 40	A	B					
Pidu	63.45 40		B	C				
Clfa	62.80 40		B	C	D			
Flma	56.33 40		B	C	D	E		
Lele	55.73 40		B	C	D	E		
Caho	53.90 40		B	C	D	E		
Sasa	50.23 40		B	C	D	E	F	
Acma	46.13 40		B	C	D	E	F	G
Alle	44.50 40		B	C	D	E	F	G
Acan	42.10 40		B	C	D	E	F	G
Caca	42.05 40		B	C	D	E	F	G
Alpr	41.53 40		B	C	D	E	F	G
Caja	41.23 40		B	C	D	E	F	G
Erbe	40.93 40		B	C	D	E	F	G
Glse	39.93 40		B	C	D	E	F	G
Anin	38.10 40		B	C	D	E	F	G
Adpa	35.05 40			C	D	E	F	G
Acau	34.36 40			C	D	E	F	G
Ptin	30.88 40			C	D	E	F	G
Segr	28.15 40				D	E	F	G
Inve	26.68 40					E	F	G
Coar	15.35 40						F	G
Orkr	11.35 40							G

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

Test:Tukey Alfa:=0.05 DMS:=4.68466

Error: 271.8482 gl: 768

tiempo	Medias n					
6	77.76 192	A				
5	60.55 192		B			
4	47.11 192			C		
3	22.80 192				D	
2	15.38 192					E

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

Apéndice 4. Análisis de varianza y comparación de medias de la longitud del tallo de las plantas seis meses después de la siembra.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
longtallo	217	0.77	0.68	28.73

Datos desbalanceados en celdas.
Para otra descomposición de la SC
especifique los contrastes apropiados.. !!

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo	368858.99	61	6046.87	8.70	<0.0001	
Enmienda	6165.87	1	6165.87	8.12	0.0651	(Enmienda*bloque)
bloque	3462.05	3	1154.02	1.66	0.1781	
Enmienda*bloque	2276.88	3	758.96	1.09	0.3546	
especie	335337.56	27	12419.91	17.86	<0.0001	
Enmienda*especie	21616.64	27	800.62	1.15	0.2902	
Error	107790.89	155	695.43			
Total	476649.89	216				

Test: Tukey Alfa:=0.05 DMS:=51.46936

Error: 695.4251 gl: 155

especie	Medias	n																		
Ency	184.25	8	A																	
Lele	181.29	7	A																	
Caho	147.43	7	A	B																
Flma	139.63	8	A	B	C															
Anpe	134.13	8	A	B	C	D														
Clfa	122.50	8		B	C	D	E													
Acan	120.42	6		B	C	D	E	F												
Ledi	114.25	8		B	C	D	E	F	G											
Pidu	106.76	8		B	C	D	E	F	G	H										
Sasa	102.63	8		B	C	D	E	F	G	H	I									
Caca	90.13	8			C	D	E	F	G	H	I									
Acma	89.25	8			C	D	E	F	G	H	I									
Glse	85.63	8				D	E	F	G	H	I									
Dasi	81.88	8					E	F	G	H	I									
Segr	81.83	6					E	F	G	H	I									
Caja	81.81	8					E	F	G	H	I									
Alpr	79.11	8					E	F	G	H	I									
Alle	77.69	8					E	F	G	H	I									
Erbe	74.63	8					E	F	G	H	I	J								
Ptin	74.19	8					E	F	G	H	I	J								
Acau	73.75	8					E	F	G	H	I	J								
Inve	69.13	8						F	G	H	I	J								
Adpa	65.06	8							G	H	I	J	K							
Anin	60.81	8								H	I	J	K							
Erpo	60.00	8								H	I	J	K							
Inno	49.00	7									I	J	K							
Coar	24.56	8										J	K							
Orkr	16.25	8											K							

Letras distintas indican diferencias significativas ($p <= 0.05$)

Apéndice 5. Diámetro del tallo de las plantas seis meses después de la siembra.

Diámetro del tallo (mm)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
diamtallo	217	0.74	0.64	22.44

Datos desbalanceados en celdas.
Para otra descomposición de la SC
especifique los contrastes apropiados.. !!

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo	800.50	61	13.12	7.16	<0.0001	
Enmienda	15.91	1	15.91	6.81	0.0797	(Enmienda*bloque)
bloque	2.54	3	0.85	0.46	0.7089	
Enmienda*bloque	7.01	3	2.34	1.27	0.2851	
especie	664.16	27	24.60	13.42	<0.0001	
Enmienda*especie	110.88	27	4.11	2.24	0.0011	
Error	284.02	155	1.83			
Total	1084.51	216				

Test: Tukey Alfa:=0.05 DMS:=0.66035

Error: 2.3353 gl: 3

Enmienda	Medias	n	
con	6.31	108	A
sin	5.76	109	A

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

Test: Tukey Alfa:=0.05 DMS:=2.64198

Error: 1.8324 gl: 155

especie	Medias	n									
Erbe	9.88	8	A								
Erpo	9.25	8	A	B							
Cifa	9.25	8	A	B							
Ency	8.75	8	A	B	C						
Lele	7.86	7	A	B	C	D					
Anin	7.38	8	A	B	C	D	E				
Sasa	7.13	8		B	C	D	E	F			
Glse	7.00	8		B	C	D	E	F	G		
Alle	6.63	8		B	C	D	E	F	G	H	
Fima	6.63	8		B	C	D	E	F	G	H	
Alpr	6.25	8			C	D	E	F	G	H	I
Caho	6.14	7			C	D	E	F	G	H	I
Ptin	6.13	8			C	D	E	F	G	H	I
Segr	5.67	6				D	E	F	G	H	I
Inve	5.63	8				D	E	F	G	H	I
Adpa	5.63	8				D	E	F	G	H	I
Acma	5.13	8					E	F	G	H	I
Caja	5.13	8					E	F	G	H	I
Acau	4.88	8					E	F	G	H	I
Ledi	4.88	8					E	F	G	H	I
Anpe	4.50	8						F	G	H	I
Pidu	4.50	8						F	G	H	I
Coar	4.38	8							G	H	I
Acan	4.17	6								H	I
Caca	4.13	8								H	I
Orkr	3.91	8									I
Dasi	3.88	8									I
Inno	3.71	7									I

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

Test: Tukey Alfa:=0.05 DMS:=3.86932

Error: 1.8324 gl: 155

Enmienda	especie	Medias	n													
con	Erpo	11.75	4	A												
con	Erbe	10.25	4	A	B											
sin	Clfa	9.75	4	A	B	C										
con	Lele	9.67	3	A	B	C										
sin	Erbe	9.50	4	A	B	C										
con	Ency	9.50	4	A	B	C										
con	Clfa	8.75	4	A	B	C	D									
con	Glse	8.00	4	A	B	C	D	E								
sin	Ency	8.00	4	A	B	C	D	E								
con	Anin	7.50	4		B	C	D	E	F							
con	Sasa	7.25	4		B	C	D	E	F							
sin	Ptin	7.25	4		B	C	D	E	F							
sin	Anin	7.25	4		B	C	D	E	F							
sin	Sasa	7.00	4		B	C	D	E	F	G						
con	Alle	7.00	4		B	C	D	E	F	G						
con	Alpr	7.00	4		B	C	D	E	F	G						
con	Caho	7.00	3		B	C	D	E	F	G						
sin	Erpo	6.75	4		B	C	D	E	F	G	H					
con	Flma	6.75	4		B	C	D	E	F	G	H					
con	Segr	6.67	3		B	C	D	E	F	G	H					
sin	Lele	6.50	4		B	C	D	E	F	G	H					
sin	Flma	6.50	4		B	C	D	E	F	G	H					
sin	Alle	6.25	4			C	D	E	F	G	H					
con	Adpa	6.25	4			C	D	E	F	G	H					
sin	Inve	6.25	4			C	D	E	F	G	H					
sin	Glse	6.00	4			C	D	E	F	G	H					
sin	Alpr	5.50	4				D	E	F	G	H					
sin	Caho	5.50	4				D	E	F	G	H					
sin	Acma	5.50	4				D	E	F	G	H					
con	Ledi	5.50	4				D	E	F	G	H					
con	Caja	5.25	4				D	E	F	G	H					
con	Ptin	5.00	4				D	E	F	G	H					
sin	Caja	5.00	4				D	E	F	G	H					
con	Acau	5.00	4				D	E	F	G	H					
sin	Adpa	5.00	4				D	E	F	G	H					
con	Inve	5.00	4				D	E	F	G	H					
con	Acma	4.75	4					E	F	G	H					
sin	Acau	4.75	4					E	F	G	H					
con	Dasi	4.75	4					E	F	G	H					
sin	Segr	4.67	3					E	F	G	H					
sin	Orkr	4.57	4					E	F	G	H					
con	Pidu	4.50	4					E	F	G	H					
con	Anpe	4.50	4					E	F	G	H					
sin	Pidu	4.50	4					E	F	G	H					
sin	Anpe	4.50	4					E	F	G	H					
sin	Coar	4.50	4					E	F	G	H					
sin	Acan	4.33	3					E	F	G	H					
sin	Ledi	4.25	4					E	F	G	H					
con	Coar	4.25	4					E	F	G	H					
con	Caca	4.25	4					E	F	G	H					
con	Acan	4.00	3						F	G	H					
sin	Caca	4.00	4						F	G	H					
con	Inno	3.75	4						F	G	H					
sin	Inno	3.67	3						F	G	H					
con	Orkr	3.25	4							G	H					
sin	Dasi	3.00	4								H					

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

Apéndice 6. Análisis de varianza y comparación de medias para la longitud de las raíces de las leguminosas arbóreas evaluadas en el experimento.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
longraiz	217	0.55	0.37	34.80

Datos desbalanceados en celdas.
Para otra descomposición de la SC
especifique los contrastes apropiados.. !!

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo	67760.56	61	1110.83	3.12	<0.0001	
Enmienda	17.88	1	17.88	0.08	0.7951	(Enmienda*bloque)
bloque	2830.19	3	943.40	2.65	0.0508	
Enmienda*bloque	666.78	3	222.26	0.62	0.6002	
especie	51592.36	27	1910.83	5.37	<0.0001	
Enmienda*especie	12653.34	27	468.64	1.32	0.1517	
Error	55161.38	155	355.88			
Total	122921.94	216				

Test: Tukey Alfa:=0.05 DMS:=6.44210

Error: 222.2605 gl: 3

Enmienda	Medias	n	
sin	54.50	109	A
con	53.92	108	A

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

Test: Tukey Alfa:=0.05 DMS:=36.81928

Error: 355.8799 gl: 155

especie	Medias	n						
Inve	81.88	8	A					
Segr	77.83	6	A	B				
Pidu	77.44	8	A	B				
Lele	69.14	7	A	B	C			
Sasa	68.63	8	A	B	C	D		
Alpr	68.35	8	A	B	C	D		
Caja	65.13	8	A	B	C	D	E	
Ptin	62.88	8	A	B	C	D	E	F
Ledi	61.25	8	A	B	C	D	E	F
Anpe	61.13	8	A	B	C	D	E	F
Erpo	59.88	8	A	B	C	D	E	F
Cifa	59.63	8	A	B	C	D	E	F
Anin	59.06	8	A	B	C	D	E	F
Acau	58.50	8	A	B	C	D	E	F
Acma	56.88	8	A	B	C	D	E	F
Caho	55.43	7	A	B	C	D	E	F
Adpa	53.13	8	A	B	C	D	E	F
Ency	50.88	8	A	B	C	D	E	F
Acan	50.87	6	A	B	C	D	E	F
Flma	48.56	8	A	B	C	D	E	F
Erbe	48.25	8	A	B	C	D	E	F
Alle	43.50	8		B	C	D	E	F
Caca	40.25	8			C	D	E	F
Inno	36.00	7			C	D	E	F
Glse	31.88	8				D	E	F
Dasi	29.63	8					E	F
Coar	26.87	8						F
Orkr	19.93	8						

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

Apéndice 7. Análisis de varianza y comparación de medias para el peso seco de las plantas

Peso seco total

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
psecototal	217	0.74	0.63	44.10

Datos desbalanceados en celdas.

Para otra descomposición de la SC

especifique los contrastes apropiados.. !!

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo	31351.22	61	513.95	7.10	<0.0001	
Enmienda	945.21	1	945.21	21.62	0.0188	(Enmienda*bloque)
bloque	69.64	3	23.21	0.32	0.8103	
Enmienda*bloque	131.17	3	43.72	0.60	0.6131	
especie	24726.57	27	915.80	12.66	<0.0001	
Enmienda*especie	5478.63	27	202.91	2.80	<0.0001	
Error	11214.19	155	72.35			
Total	42565.41	216				

Test: Tukey Alfa:=0.05 DMS:=2.85728

Error: 43.7234 gl: 3

Enmienda	Medias	n	
con	21.38	108	A
sin	17.21	109	B

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

Test: Tukey Alfa:=0.05 DMS:=16.60128

Error: 72.3496 gl: 155

especie	Medias	n															
Ency	43.69	8	A														
Lele	41.84	7	A	B													
Flma	34.97	8	A	B	C												
Cifa	33.19	8	A	B	C	D											
Alpr	32.43	8	A	B	C	D	E										
Caho	30.34	7	A	B	C	D	E	F									
Erbe	29.40	8	A	B	C	D	E	F	G								
Alle	26.25	8		B	C	D	E	F	G	H							
Sasa	22.58	8			C	D	E	F	G	H	I						
Anpe	21.97	8			C	D	E	F	G	H	I	J					
Glse	19.10	8			C	D	E	F	G	H	I	J	K				
Anin	16.91	8				D	E	F	G	H	I	J	K				
Caja	16.87	8				D	E	F	G	H	I	J	K				
Ptin	15.96	8					E	F	G	H	I	J	K				
Inve	15.79	8						F	G	H	I	J	K				
Erpo	15.75	8						F	G	H	I	J	K				
Adpa	14.69	8						F	G	H	I	J	K				
Acma	13.60	8							G	H	I	J	K				
Ledi	12.99	8							G	H	I	J	K				
Pidu	12.44	8								H	I	J	K				
Acau	12.06	8								H	I	J	K				
Segr	11.60	6								H	I	J	K				
Acan	10.65	6								H	I	J	K				
Caca	9.41	8									I	J	K				
Dasi	8.77	8									I	J	K				
Coar	5.60	8										J	K				
Orkr	5.02	8											K				
Inno	4.44	7											K				

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

Test: Tukey Alfa:=0.05 DMS:=24.31344

Error: 72.3496 gl: 155

Enmienda	especie	Medias	n																				
con	Lele	65.28	3	A																			
con	Ency	48.47	4	A	B																		
con	Alpr	41.77	4	A	B	C																	
con	Flma	41.34	4	A	B	C	D																
sin	Ency	38.90	4		B	C	D	E															
sin	Clfa	35.31	4		B	C	D	E	F														
con	Erbe	35.19	4		B	C	D	E	F														
con	Caho	33.44	3		B	C	D	E	F	G													
con	Clfa	31.07	4		B	C	D	E	F	G	H												
sin	Alle	28.73	4		B	C	D	E	F	G	H	I											
sin	Flma	28.60	4		B	C	D	E	F	G	H	I											
sin	Caho	28.03	4		B	C	D	E	F	G	H	I	J										
con	Erpo	25.18	4		B	C	D	E	F	G	H	I	J										
sin	Lele	24.27	4		B	C	D	E	F	G	H	I	J										
con	Alle	23.76	4			C	D	E	F	G	H	I	J										
sin	Erbe	23.61	4			C	D	E	F	G	H	I	J										
sin	Sasa	23.23	4			C	D	E	F	G	H	I	J										
con	Glse	23.18	4			C	D	E	F	G	H	I	J										
sin	Alpr	23.09	4			C	D	E	F	G	H	I	J										
con	Anpe	22.92	4			C	D	E	F	G	H	I	J										
sin	Ptin	22.18	4			C	D	E	F	G	H	I	J										
con	Sasa	21.94	4			C	D	E	F	G	H	I	J										
sin	Anpe	21.02	4			C	D	E	F	G	H	I	J										
con	Ledi	19.33	4			C	D	E	F	G	H	I	J										
sin	Inve	19.16	4			C	D	E	F	G	H	I	J										
con	Segr	18.03	3			C	D	E	F	G	H	I	J										
con	Anin	18.00	4			C	D	E	F	G	H	I	J										
con	Adpa	17.59	4			C	D	E	F	G	H	I	J										
con	Caja	17.20	4				D	E	F	G	H	I	J										
sin	Acma	16.98	4					E	F	G	H	I	J										
sin	Caja	16.55	4					E	F	G	H	I	J										
sin	Anin	15.82	4					E	F	G	H	I	J										
sin	Glse	15.02	4					E	F	G	H	I	J										
con	Acau	13.06	4						F	G	H	I	J										
con	Pidu	12.64	4						F	G	H	I	J										
con	Dasi	12.59	4						F	G	H	I	J										
con	Inve	12.42	4						F	G	H	I	J										
sin	Pidu	12.24	4						F	G	H	I	J										
sin	Adpa	11.79	4						F	G	H	I	J										
sin	Acau	11.07	4						F	G	H	I	J										
con	Acan	10.75	3							G	H	I	J										
sin	Acan	10.55	3							G	H	I	J										
con	Caca	10.34	4							G	H	I	J										
con	Acma	10.23	4							G	H	I	J										
con	Ptin	9.75	4							G	H	I	J										
sin	Caca	8.49	4								H	I	J										
sin	Ledi	6.65	4									I	J										
sin	Erpo	6.33	4										I	J									
sin	Coar	6.26	4											I	J								
sin	Orkr	5.94	4												I	J							
sin	Segr	5.17	3													I	J						
sin	Dasi	4.95	4														I	J					
con	Coar	4.94	4															I	J				
con	Inno	4.77	4																I	J			
con	Orkr	4.10	4																	I	J		
sin	Inno	4.00	3																		I	J	

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

Apéndice 8. Análisis de varianza y comparación de medias para el índice raíz/tallo de las plantas

Índice Raíz/Tallo

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Indice psecoraiz/pse	217	0.61	0.45	42.20

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo	11.21	61	0.18	3.91	<0.0001	
Enmienda	0.46	1	0.46	5.36	0.1036	(Enmienda*bloque)
bloque	0.63	3	0.21	4.45	0.0050	
Enmienda*bloque	0.26	3	0.09	1.82	0.1463	
especie	8.86	27	0.33	6.98	<0.0001	
Enmienda*especie	1.01	27	0.04	0.79	0.7557	
Error	7.29	155	0.05			
Total	18.50	216				

Test:Tukey Alfa:=0.05 DMS:=0.12636

Error: 0.0855 gl: 3

Enmienda	Medias	n	
sin	0.56	109	A
con	0.47	108	A

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

Test:Tukey Alfa:=0.05 DMS:=0.42334

Error: 0.0470 gl: 155

especie	Medias	n							
Alle	0.98	8	A						
Alpr	0.90	8	A	B					
Anpe	0.85	8	A	B	C				
Caja	0.72	8	A	B	C	D			
Erbe	0.67	8	A	B	C	D	E		
Dasi	0.63	8	A	B	C	D	E	F	
Sasa	0.62	8	A	B	C	D	E	F	
Segr	0.62	6	A	B	C	D	E	F	
Clfa	0.60	8	A	B	C	D	E	F	G
Ptin	0.58	8	A	B	C	D	E	F	G
Flma	0.58	8	A	B	C	D	E	F	G
Glse	0.57	8	A	B	C	D	E	F	G
Ency	0.56	8	A	B	C	D	E	F	G
Ledi	0.53	8		B	C	D	E	F	G
Pidu	0.50	8		B	C	D	E	F	G
Inno	0.49	7		B	C	D	E	F	G
Caho	0.46	7			C	D	E	F	G
Inve	0.46	8			C	D	E	F	G
Anin	0.43	8			C	D	E	F	G
Erpo	0.38	8				D	E	F	G
Acau	0.38	8				D	E	F	G
Adpa	0.33	8				D	E	F	G
Coar	0.29	8					E	F	G
Lele	0.28	7					E	F	G
Caca	0.25	8					E	F	G
Acan	0.25	6					E	F	G
Acma	0.22	8						F	G
Orkr	0.19	8							G

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

Apéndice 9. Análisis de varianza y comparación de medias para el número de nódulos de las especies en el ensayo (datos transformados a la función $\sqrt{x+1}$).

Raíz del número de nódulos

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
raiznumnod	217	0.71	0.60	48.04

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo	2461.43	61	40.35	6.20	<0.0001	
Enmienda	22.78	1	22.78	1.31	0.3354	(Enmienda*bloque)
bloque	60.31	3	20.10	3.09	0.0289	
Enmienda*bloque	52.16	3	17.39	2.67	0.0494	
especie	1881.09	27	69.67	10.71	<0.0001	
Enmienda*especie	445.10	27	16.49	2.53	0.0002	
Error	1008.23	155	6.50			
Total	3469.67	216				

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=1.80180

Error: 17.3868 gl: 3

Enmienda	Medias	n	
sin	4.99	109	A
con	5.63	108	A

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0.05)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=4.97781

Error: 6.5047 gl: 155

especie	Medias	n						
Caja	1.00	8	A					
Adpa	1.00	8	A					
Orkr	1.00	8	A					
Inno	1.00	7	A					
Coar	2.43	8	A	B				
Ledi	2.96	8	A	B	C			
Segr	3.20	6	A	B	C			
Anpe	3.59	8	A	B	C			
Pidu	3.85	8	A	B	C	D		
Erbe	3.85	8	A	B	C	D		
Acan	3.93	6	A	B	C	D		
Caca	4.27	8	A	B	C	D		
Acma	4.54	8	A	B	C	D	E	
Lele	5.05	7	A	B	C	D	E	
Dasi	5.19	8	A	B	C	D	E	
Alle	5.36	8	A	B	C	D	E	
Acau	5.89	8	A	B	C	D	E	
Alpr	6.04	8		B	C	D	E	
Glse	6.13	8		B	C	D	E	
Sasa	6.40	8		B	C	D	E	
Ency	6.49	8		B	C	D	E	
Anin	6.84	8		B	C	D	E	F
Erpo	7.58	8			C	D	E	F
Caho	7.79	7			C	D	E	F
Ptin	8.76	8				D	E	F
Inve	9.47	8					E	F
Flma	11.64	8						F
Clfa	12.27	8						F

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0.05)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=7.29026

Error: 6.5047 gl: 155

Enmienda	especie	Medias	n												
sin	Segr	1.00	3	A											
con	Adpa	1.00	4	A											
con	Caja	1.00	4	A											
con	Orkr	1.00	4	A											
sin	Caja	1.00	4	A											
sin	Orkr	1.00	4	A											
con	Inno	1.00	4	A											
sin	Adpa	1.00	4	A											
sin	Ledi	1.00	4	A											
sin	Inno	1.00	3	A											
sin	Acan	1.33	3	A											
sin	Pidu	1.56	4	A											
con	Coar	1.84	4	A	B										
sin	Caca	2.84	4	A	B	C									
sin	Coar	3.02	4	A	B	C									
sin	Erbe	3.20	4	A	B	C									
sin	Glse	3.23	4	A	B	C									
con	Anpe	3.46	4	A	B	C	D								
sin	Anpe	3.73	4	A	B	C	D								
con	Acma	3.74	4	A	B	C	D								
con	Alle	4.39	4	A	B	C	D	E							
con	Erbe	4.50	4	A	B	C	D	E							
con	Lele	4.52	3	A	B	C	D	E							
con	Ledi	4.92	4	A	B	C	D	E							
con	Dasi	5.00	4	A	B	C	D	E							
sin	Ency	5.12	4	A	B	C	D	E	F						
sin	Acma	5.33	4	A	B	C	D	E	F						
sin	Erpo	5.37	4	A	B	C	D	E	F	G					
sin	Dasi	5.39	4	A	B	C	D	E	F	G					
con	Segr	5.40	3	A	B	C	D	E	F	G					
sin	Lele	5.45	4	A	B	C	D	E	F	G					
sin	Caho	5.63	4	A	B	C	D	E	F	G					
sin	Anin	5.65	4	A	B	C	D	E	F	G					
con	Caca	5.70	4	A	B	C	D	E	F	G					
con	Acau	5.73	4	A	B	C	D	E	F	G					
sin	Alpr	5.86	4	A	B	C	D	E	F	G					
con	Sasa	5.89	4	A	B	C	D	E	F	G					
sin	Acau	6.06	4	A	B	C	D	E	F	G	H				
con	Pidu	6.14	4	A	B	C	D	E	F	G	H				
con	Alpr	6.23	4	A	B	C	D	E	F	G	H				
sin	Alle	6.33	4	A	B	C	D	E	F	G	H				
con	Acan	6.53	3	A	B	C	D	E	F	G	H				
con	Inve	6.62	4	A	B	C	D	E	F	G	H				
sin	Sasa	6.91	4	A	B	C	D	E	F	G	H				
con	Ptin	6.97	4	A	B	C	D	E	F	G	H				
con	Ency	7.86	4	A	B	C	D	E	F	G	H				
con	Anin	8.04	4	A	B	C	D	E	F	G	H				
con	Glse	9.02	4		B	C	D	E	F	G	H				
con	Erpo	9.79	4			C	D	E	F	G	H				
sin	Ptin	10.54	4				D	E	F	G	H				
con	Flma	10.64	4				D	E	F	G	H				
con	Caho	10.66	3				D	E	F	G	H				
con	Clfa	11.32	4					E	F	G	H				
sin	Inve	12.32	4						F	G	H				
sin	Flma	12.63	4							G	H				
sin	Clfa	13.21	4								H				

Letras distintas indican diferencias significativas($p <= 0.05$)

Análisis de los datos originales

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
numnodulos	217	0.63	0.48	103.47

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo	521666.75	61	8551.91	4.29	<0.0001	
Enmienda	77.91	1	77.91	0.01	0.9206	(Enmienda*bloque)
bloque	21537.26	3	7179.09	3.60	0.0150	
Enmienda*bloque	19938.03	3	6646.01	3.33	0.0212	
especie	358718.49	27	13285.87	6.66	<0.0001	
Enmienda*especie	121395.06	27	4496.11	2.25	0.0011	
Error	309340.16	155	1995.74			
Total	831006.92	216				

Test:Tukey Alfa:=0.05 DMS:=35.22711

Error: 6646.0107 gl: 3

Enmienda	Medias	n	
sin	43.77	109	A
con	42.57	108	A

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

Test:Tukey Alfa:=0.05 DMS:=87.19184

Error: 1995.7430 gl: 155

especie	Medias	n					
Clfa	158.50	8	A				
Flma	139.38	8	A	B			
Inve	109.63	8	A	B	C		
Ptin	102.03	8	A	B	C	D	
Caho	73.00	7	A	B	C	D	E
Erpo	62.38	8		B	C	D	E
Acau	55.63	8		B	C	D	E
Anin	49.25	8			C	D	E
Glse	48.75	8			C	D	E
Ency	46.75	8			C	D	E
Sasa	42.63	8			C	D	E
Alpr	36.63	8			C	D	E
Alle	33.88	8			C	D	E
Dasi	33.00	8			C	D	E
Acan	29.50	6			C	D	E
Acma	29.25	8			C	D	E
Lele	27.57	7			C	D	E
Pidu	24.88	8			C	D	E
Caca	24.63	8			C	D	E
Anpe	16.13	8				D	E
Segr	15.67	6				D	E
Erbe	14.88	8				D	E
Ledi	12.50	8					E
Coar	8.62	8					E
Adpa	0.00	8					E
Orkr	0.00	8					E
Caja	0.00	8					E
Inno	0.00	7					E

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

Test:Tukey Alfa:=0.05 DMS:=127.69701

Error: 1995.7430 gl: 155

Enmienda	especie	Medias	n							
sin	Clfa	182.75	4	A						
sin	Inve	176.00	4	A	B					
sin	Flma	164.25	4	A	B	C				
sin	Ptin	153.30	4	A	B	C	D			
con	Clfa	134.25	4	A	B	C	D	E		
con	Caho	116.00	3	A	B	C	D	E	F	
con	Flma	114.50	4	A	B	C	D	E	F	
con	Erpo	95.25	4	A	B	C	D	E	F	
con	Glse	86.00	4	A	B	C	D	E	F	
sin	Acau	71.25	4	A	B	C	D	E	F	
con	Ency	67.50	4	A	B	C	D	E	F	
con	Anin	64.75	4	A	B	C	D	E	F	
con	Acan	58.00	3	A	B	C	D	E	F	
con	Ptin	50.75	4		B	C	D	E	F	
sin	Sasa	50.50	4		B	C	D	E	F	
con	Pidu	47.75	4			C	D	E	F	
sin	Alle	47.50	4			C	D	E	F	
con	Inve	43.25	4			C	D	E	F	
sin	Acma	42.75	4			C	D	E	F	
sin	Caho	40.75	4			C	D	E	F	
con	Acau	40.00	4			C	D	E	F	
sin	Dasi	38.75	4			C	D	E	F	
con	Alpr	38.25	4			C	D	E	F	
con	Caca	37.75	4			C	D	E	F	
sin	Alpr	35.00	4				D	E	F	
con	Sasa	34.75	4				D	E	F	
sin	Anin	33.75	4				D	E	F	
sin	Lele	31.75	4				D	E	F	
con	Segr	31.33	3				D	E	F	
sin	Erpo	29.50	4				D	E	F	
con	Dasi	27.25	4				D	E	F	
sin	Ency	26.00	4				D	E	F	
con	Ledi	25.00	4					E	F	
con	Lele	22.00	3					E	F	
sin	Anpe	20.50	4					E	F	
con	Alle	20.25	4					E	F	
con	Erbe	19.75	4					E	F	
con	Acma	15.75	4					E	F	
sin	Coar	12.75	4					E	F	
con	Anpe	11.75	4					E	F	
sin	Glse	11.50	4					E	F	
sin	Caca	11.50	4					E	F	
sin	Erbe	10.00	4					E	F	
con	Coar	4.50	4						F	
sin	Pidu	2.00	4						F	
sin	Acan	1.00	3						F	
sin	Adpa	0.00	4						F	
sin	Orkr	0.00	4						F	
sin	Inno	0.00	3						F	
sin	Caja	0.00	4						F	
con	Orkr	0.00	4						F	
con	Adpa	0.00	4						F	
con	Caja	0.00	4						F	
sin	Ledi	0.00	4						F	
con	Inno	0.00	4						F	
sin	Segr	0.00	3						F	

Letras distintas indican diferencias significativas($p <= 0.05$)

Apéndice 10. Análisis de varianzas y comparación de medias para el peso seco de los nódulos de las especies en el ensayo (datos transformados a la función $\sqrt{x+0.5}$).

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ²	Aj	CV
raizpseconod	217	0.67	0.54	14.92	

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo	5.38	61	0.09	5.20	<0.0001	
Enmienda	3.2E-04	1	3.2E-04	0.02	0.9081	(Enmienda*bloque)
bloque	0.11	3	0.04	2.11	0.1008	
Enmienda*bloque	0.06	3	0.02	1.20	0.3132	
especie	4.41	27	0.16	9.65	<0.0001	
Enmienda*especie	0.80	27	0.03	1.74	0.0191	
Error	2.63	155	0.02			
Total	8.00	216				

Test: Tukey Alfa:=0.05 DMS:=0.06151

Error: 0.0203 gl: 3

Enmienda	Medias	n	
con	0.87	108	A
sin	0.87	109	A

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

Test: Tukey Alfa:=0.05 DMS:=0.25403

Error: 0.0169 gl: 155

especie	Medias	n								
Sasa	1.19	8	A							
Ptin	1.12	8	A	B						
Alle	1.10	8	A	B	C					
Anin	1.07	8	A	B	C	D				
Ency	0.99	8	A	B	C	D	E			
Lele	0.97	7	A	B	C	D	E	F		
Erpo	0.97	8	A	B	C	D	E	F		
Alpr	0.97	8	A	B	C	D	E	F	G	
Cifa	0.96	8	A	B	C	D	E	F	G	H
Anpe	0.95	8	A	B	C	D	E	F	G	H
Inve	0.93	8		B	C	D	E	F	G	H
Erbe	0.92	8		B	C	D	E	F	G	H
Glse	0.89	8		B	C	D	E	F	G	H
Caho	0.85	7			C	D	E	F	G	H
Fima	0.82	8				D	E	F	G	H
Acma	0.82	8					E	F	G	H
Segr	0.80	6					E	F	G	H
Caca	0.76	8					E	F	G	H
Acau	0.76	8					E	F	G	H
Ledi	0.75	8					E	F	G	H
Pidu	0.75	8					E	F	G	H
Dasi	0.74	8					E	F	G	H
Acan	0.72	6						F	G	H
Coar	0.72	8							G	H
Inno	0.71	7								H
Adpa	0.71	8								H
Caja	0.71	8								H
Orkr	0.71	8								H

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

Test: Tukey Alfa:=0.05 DMS:=0.37205

Error: 0.0169 gl: 155

Enmienda	especie	Medias	n							
sin	Ptin	1.33	4	A						
sin	Sasa	1.27	4	A	B					
sin	Alle	1.17	4	A	B	C				
con	Sasa	1.12	4	A	B	C	D			
con	Erpo	1.10	4	A	B	C	D	E		
sin	Anin	1.07	4	A	B	C	D	E	F	
con	Anin	1.07	4	A	B	C	D	E	F	
con	Anpe	1.06	4	A	B	C	D	E	F	
con	Alle	1.02	4	A	B	C	D	E	F	
con	Ency	1.01	4	A	B	C	D	E	F	
con	Alpr	0.98	4	A	B	C	D	E	F	
con	Lele	0.98	3	A	B	C	D	E	F	
sin	Inve	0.97	4	A	B	C	D	E	F	
sin	Lele	0.97	4	A	B	C	D	E	F	
sin	Ency	0.96	4	A	B	C	D	E	F	
con	Cifa	0.96	4	A	B	C	D	E	F	
sin	Alpr	0.96	4	A	B	C	D	E	F	
sin	Cifa	0.96	4	A	B	C	D	E	F	
con	Erbe	0.94	4		B	C	D	E	F	
con	Ptin	0.92	4		B	C	D	E	F	
con	Segr	0.90	3		B	C	D	E	F	
sin	Erbe	0.90	4		B	C	D	E	F	
con	Glse	0.90	4			C	D	E	F	
sin	Glse	0.89	4			C	D	E	F	
con	Inve	0.89	4			C	D	E	F	
sin	Acma	0.87	4			C	D	E	F	
con	Caho	0.86	3			C	D	E	F	
sin	Erpo	0.84	4			C	D	E	F	
sin	Anpe	0.84	4			C	D	E	F	
sin	Caho	0.84	4			C	D	E	F	
con	Flma	0.82	4			C	D	E	F	
sin	Flma	0.82	4			C	D	E	F	
con	Caca	0.80	4				D	E	F	
con	Ledi	0.80	4				D	E	F	
con	Pidu	0.78	4				D	E	F	
con	Acma	0.76	4				D	E	F	
sin	Acau	0.76	4				D	E	F	
con	Acau	0.76	4				D	E	F	
con	Acan	0.74	3					E	F	
con	Dasi	0.74	4					E	F	
sin	Dasi	0.74	4					E	F	
sin	Caca	0.73	4					E	F	
sin	Coar	0.72	4						F	
sin	Pidu	0.72	4						F	
con	Coar	0.71	4						F	
sin	Acan	0.71	3						F	
sin	Inno	0.71	3						F	
sin	Segr	0.71	3						F	
sin	Ledi	0.71	4						F	
con	Caja	0.71	4						F	
sin	Adpa	0.71	4						F	
con	Inno	0.71	4						F	
con	Adpa	0.71	4						F	
sin	Caja	0.71	4						F	
sin	Orkr	0.71	4						F	
con	Orkr	0.71	4						F	

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

Separación de media para los datos originales.

Test:Tukey Alfa:=0.05 DMS:=0.78063

Error: 0.0746 gl: 155

Enmienda	especie	Medias	n					
sin	Ptin	1.32	4	A				
sin	Sasa	1.20	4	A	B			
sin	Alle	0.97	4	A	B	C		
con	Sasa	0.77	4	A	B	C	D	
sin	Anin	0.73	4	A	B	C	D	
con	Erpo	0.72	4	A	B	C	D	
con	Anin	0.68	4	A	B	C	D	
con	Anpe	0.65	4	A	B	C	D	
con	Alle	0.60	4	A	B	C	D	
con	Ency	0.53	4		B	C	D	
con	Lele	0.48	3		B	C	D	
con	Alpr	0.47	4		B	C	D	
sin	Inve	0.47	4		B	C	D	
sin	Lele	0.46	4		B	C	D	
con	Clfa	0.43	4		B	C	D	
sin	Ency	0.43	4		B	C	D	
sin	Alpr	0.42	4			C	D	
sin	Clfa	0.42	4			C	D	
con	Erbe	0.39	4			C	D	
con	Ptin	0.37	4			C	D	
con	Glse	0.33	4			C	D	
sin	Glse	0.32	4			C	D	
con	Segr	0.32	3			C	D	
sin	Erbe	0.31	4			C	D	
con	Inve	0.29	4			C	D	
sin	Acma	0.29	4			C	D	
con	Caho	0.24	3			C	D	
sin	Anpe	0.22	4			C	D	
sin	Erpo	0.21	4			C	D	
sin	Caho	0.21	4			C	D	
con	Flma	0.18	4				D	
sin	Flma	0.18	4				D	
con	Caca	0.14	4				D	
con	Ledi	0.14	4				D	
con	Pidu	0.10	4				D	
con	Acma	0.08	4				D	
sin	Acau	0.08	4				D	
con	Acau	0.07	4				D	
con	Acan	0.05	3				D	
con	Dasi	0.05	4				D	
sin	Dasi	0.04	4				D	
sin	Caca	0.04	4				D	
sin	Coar	0.02	4				D	
sin	Pidu	0.01	4				D	
con	Coar	3.5E-03	4				D	
sin	Acan	2.0E-03	3				D	
sin	Segr	0.00	3				D	
sin	Inno	0.00	3				D	
con	Inno	0.00	4				D	
sin	Ledi	0.00	4				D	
sin	Orkr	0.00	4				D	
con	Orkr	0.00	4				D	
sin	Adpa	0.00	4				D	
sin	Caja	0.00	4				D	
con	Caja	0.00	4				D	
con	Adpa	0.00	4				D	

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

Apéndice 11. Análisis y curva de regresión para el peso seco de nódulos y la actividad total de la nitrogensasa.

Análisis de regresión lineal

Enmienda	Variable	N	R ²	R ² Aj	ECMP
con	LN nanomoles	108	0.52	0.51	1.18

Coefficientes de regresión y estadísticos asociados

Coef	Est.	EE	LI(95%)	LS(95%)	T	p-valor	CpMallows
const	-22.15	3.31	-28.72	-15.59	-6.69	<0.0001	
raizpseconod	42.34	7.18	28.11	56.58	5.90	<0.0001	36.45
raizpseconod ²	-19.30	3.78	-26.79	-11.80	-5.11	<0.0001	27.83

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	125.88	2	62.94	56.15	<0.0001
raizpseconod	96.67	1	96.67	86.24	<0.0001
raizpseconod ²	29.22	1	29.22	26.06	<0.0001
Error	117.70	105	1.12		
Total	243.58	107			

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	125.88	2	62.94	56.15	<0.0001
raizpseconod	125.88	2	62.94	56.15	<0.0001
Error	117.70	105	1.12		
Total	243.58	107			

Enmienda	Variable	N	R ²	R ² Aj	ECMP
sin	LN nanomoles	109	0.64	0.64	1.21

Coefficientes de regresión y estadísticos asociados

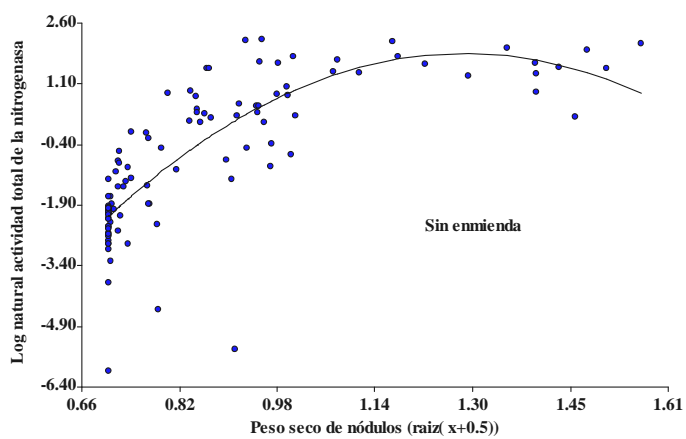
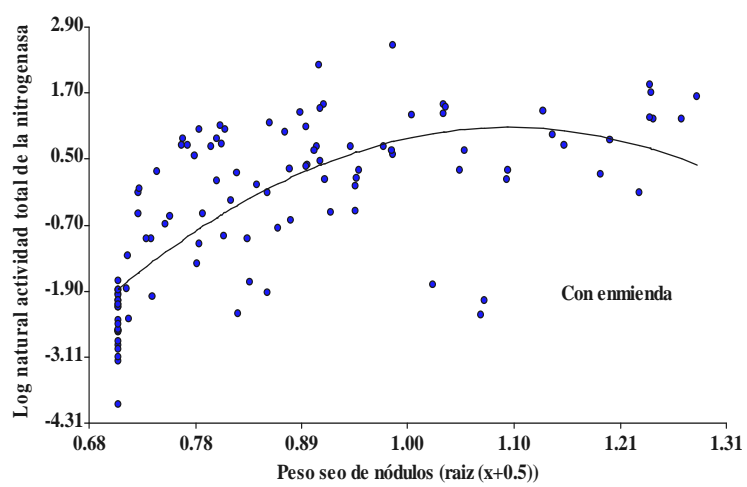
Coef	Est.	EE	LI(95%)	LS(95%)	T	p-valor	CpMallows
const	-18.20	2.03	-22.23	-14.17	-8.96	<0.0001	
raizpseconod	31.28	4.12	23.11	39.46	7.59	<0.0001	59.04
raizpseconod ²	-12.20	1.96	-16.09	-8.31	-6.22	<0.0001	40.28

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	219.53	2	109.76	95.17	<0.0001
raizpseconod	174.97	1	174.97	151.70	<0.0001
raizpseconod ²	44.55	1	44.55	38.63	<0.0001
Error	122.26	106	1.15		
Total	341.79	108			

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	219.53	2	109.76	95.17	<0.0001
raizpseconod	219.53	2	109.76	95.17	<0.0001
Error	122.26	106	1.15		
Total	341.79	108			



Apéndice 12. Análisis de varianza y comparación de medias para la actividad total de la nitrogenasa (datos originales y datos transformados al logaritmo natural).

Datos originales

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
nanomoles	217	0.49	0.29	112.64

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo	470.86	61	7.72	2.46	<0.0001	
Enmienda	1.1E-03	1	1.1E-03	4.7E-04	0.9840	(Enmienda*bloque)
bloque	12.88	3	4.29	1.37	0.2543	
Enmienda*bloque	6.77	3	2.26	0.72	0.5415	
especie	369.10	27	13.67	4.36	<0.0001	
Enmienda*especie	82.09	27	3.04	0.97	0.5143	
Error	486.25	155	3.14			
Total	957.10	216				

Test:Tukey Alfa:=0.05 DMS:=0.64936

Error: 2.2583 gl: 3

Enmienda	Medias	n	
sin	1.57	109	A
con	1.57	108	A

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

Test:Tukey Alfa:=0.05 DMS:=3.45689

Error: 3.1371 gl: 155

especie	Medias	n			
Caja	0.07	8	A		
Orkr	0.11	8	A		
Inno	0.12	7	A		
Adpa	0.12	8	A		
Segr	0.22	6	A	B	
Caca	0.25	8	A	B	
Coar	0.32	8	A	B	
Pidu	0.34	8	A	B	
Dasi	0.35	8	A	B	
Ledi	0.54	8	A	B	
Acan	0.62	6	A	B	
Caho	0.81	7	A	B	
Anpe	0.83	8	A	B	
Acau	1.35	8	A	B	
Erbe	1.55	8	A	B	C
Lele	1.74	7	A	B	C
Clfa	1.79	8	A	B	C
Flma	1.81	8	A	B	C
Acma	2.06	8	A	B	C
Alle	2.40	8	A	B	C
Glse	2.53	8	A	B	C
Ptin	2.77	8	A	B	C
Ency	2.81	8	A	B	C
Alpr	3.02	8	A	B	C
Sasa	3.03	8	A	B	C
Anin	3.12	8	A	B	C
Inve	3.59	8		B	C
Erpo	4.94	8			C

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

Datos transformados a logaritmo natural

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
LN_nanomoles	217	0.64	0.50	197.33

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo	381.97	61	6.26	4.59	<0.0001	
Enmienda	7.88	1	7.88	7.87	0.0676	(Enmienda*bloque)
bloque	5.86	3	1.95	1.43	0.2351	
Enmienda*bloque	3.00	3	1.00	0.73	0.5328	
especie	317.24	27	11.75	8.62	<0.0001	
Enmienda*especie	47.98	27	1.78	1.30	0.1605	
Error	211.28	155	1.36			
Total	593.25	216				

Test:Tukey Alfa:=0.05 DMS:=0.43245

Error: 1.0016 gl: 3

Enmienda	Medias	n	
sin	-0.78	109	A
con	-0.40	108	A

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0.05)

Test:Tukey Alfa:=0.05 DMS:=2.27871

Error: 1.3631 gl: 155

Apéndice 13. Análisis de varianza y comparación de medias para la actividad específica de la nitrogenasa.

Datos originales

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Actividad específica	217	0.43	0.21	111.47

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo	4961.53	61	81.34	1.91	0.0007	
Enmienda	65.78	1	65.78	2.67	0.2007	(Enmienda*bloque)
bloque	31.38	3	10.46	0.25	0.8639	
Enmienda*bloque	73.90	3	24.63	0.58	0.6291	
especie	3699.06	27	137.00	3.22	<0.0001	
Enmienda*especie	1091.41	27	40.42	0.95	0.5389	
Error	6585.13	155	42.48			
Total	11546.66	216				

Test:Tukey Alfa:=0.05 DMS:=2.14462

Error: 24.6325 gl: 3

Enmienda	Medias	n	
sin	5.30	109	A
con	6.40	108	A

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

Test:Tukey Alfa:=0.05 DMS:=12.72155

Error: 42.4847 gl: 155

especie	Medias	n		
Caja	0.00	8	A	
Inno	0.00	7	A	
Orkr	0.00	8	A	
Adpa	0.00	8	A	
Segr	0.77	6	A	
Anpe	2.32	8	A	B
Sasa	2.70	8	A	B
Ptin	3.01	8	A	B
Ledi	3.65	8	A	B
Caca	3.75	8	A	B
Caho	3.80	7	A	B
Clfa	4.25	8	A	B
Lele	4.61	7	A	B
Anin	5.10	8	A	B
Erbe	5.28	8	A	B
Ency	5.69	8	A	B
Alle	6.21	8	A	B
Alpr	6.98	8	A	B
Dasi	7.02	8	A	B
Coar	7.54	8	A	B
Pidu	8.11	8	A	B
Acan	10.20	6	A	B
Glse	10.38	8	A	B
Flma	10.66	8	A	B
Inve	10.76	8	A	B
Acau	10.93	8	A	B
Erpo	14.28	8		B
Acma	14.40	8		B

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

Datos transformados a logaritmo natural

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
LN_Actividad específ	160	0.47	0.22	65.58

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo	102.63	51	2.01	1.88	0.0031	
Enmienda	0.17	1	0.17	0.57	0.5055	(Enmienda*bloque)
bloque	0.30	3	0.10	0.09	0.9640	
Enmienda*bloque	0.88	3	0.29	0.28	0.8427	
especie	81.47	23	3.54	3.32	<0.0001	
Enmienda*especie	19.81	21	0.94	0.88	0.6120	
Error	115.34	108	1.07			
Total	217.97	159				

Test:Tukey Alfa:=0.05 DMS:=0.27332

Error: 0.2946 gl: 3

Enmienda	Medias	n	
con	0.23	84	A
sin	0.94	76	B

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0.05)

Test:Tukey Alfa:=0.05 DMS:=1.01628

Error: 1.0679 gl: 108

Enmienda	bloque	Medias	n			
con	2.00	0.03	22	A		
sin	4.00	0.07	16	A		
con	4.00	0.11	21	A		
con	1.00	0.23	21	A	B	
con	3.00	0.53	20	A	B	C
sin	3.00	1.13	19		B	C
sin	1.00	1.22	21		B	C
sin	2.00	1.30	20			C

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0.05)

Test:Tukey Alfa:=0.05 DMS:=2.17140

Error: 1.0679 gl: 108

especie	Medias	n									
Adpa	sd	0	A								
Orkr	sd	0		B							
Caja	sd	0			C						
Inno	sd	0				D					
Anpe	-0.19	7					E				
Sasa	0.72	8					E	F			
Ptin	0.86	8					E	F	G		
Caho	1.01	7					E	F	G	H	
Caca	1.09	7					E	F	G	H	
Erbe	1.31	8					E	F	G	H	
Clfa	1.36	8					E	F	G	H	
Alle	1.38	7					E	F	G	H	
Lele	1.40	7					E	F	G	H	
Anin	1.55	8					E	F	G	H	
Ency	1.61	8					E	F	G	H	
Alpr	1.61	8					E	F	G	H	
Flma	1.79	8					E	F	G	H	
Pidu	1.84	6					E	F	G	H	
Inve	2.09	8						F	G	H	
Dasi	2.13	6						F	G	H	
Glse	2.13	7						F	G	H	
Ledi	2.19	4						F	G	H	
Erpo	2.34	8						F	G	H	
Acma	2.56	7						F	G	H	
Acau	2.61	6						F	G	H	
Acan	3.01	3							G	H	
Coar	3.05	3								H	
Segr	11.97	3									I

Letras distintas indican diferencias significativas($p < 0.05$)