

Fijación biológica de N₂ por *Pachecoa venezuelensis* en dos suelos de sabana del Oriente Venezolano

Biological nitrogen fixation by *Pachecoa venezuelensis* in two East Venezuelan savanna soils

Marcano, Lisbeth¹; González, Marcial¹; Leal, Angel² y Michelena, Vicente³

¹ Laboratorio de Plantas y Semillas Forrajeras. Escuela de Ingeniería de Producción Animal. Universidad de Oriente. Monagas. ² Laboratorio de Biofertilizantes, Instituto Universitario de Tecnología José Antonio Anzoátegui, El Tigre. E-mail: chivo01@telcel.net.ve y ³ Laboratorio de Ecofisiología Vegetal. Universidad de Oriente. Monagas. E-mail: vicmiche@telcel.net.ve

RESUMEN

Con la finalidad de caracterizar el proceso de nodulación, la infectividad y efectividad de las cepas de rizobia y la eficiencia de la simbiosis *Rhizobium* spp.-leguminosa con la aplicación de nitrógeno en dos suelos del oriente venezolano, se realizó un experimento en condiciones de invernadero utilizando la leguminosa forrajera arbustiva *Pachecoa venezuelensis* en un arreglo estadístico de parcelas divididas con cuatro repeticiones y sesenta y cuatro combinaciones de tratamientos, donde las parcelas principales fueron los dos tipos de suelos: Jusepín y El Tigre; las subparcelas los dos niveles de nitrógeno edáfico: 0 y 20 kg N.ha⁻¹ y las sub-subparcelas las cepas de rizobia: UDO-R1, RC-14, la combinación de ambas cepas y sin inoculación. A los cuatro meses de la siembra se realizó la cosecha y se determinaron: la altura de las plantas, el peso seco del vástago, de raíz y de nódulos, la concentración de clorofila (a + b), y el porcentaje de nitrógeno del tejido vegetal. Las plantas crecidas en suelo de Jusepín alcanzaron la mayor altura promedio (77,67 cm) y los mayores pesos/planta de vástagos (6,50 g), de raíz (9,81 g) y de nódulos (0,05 g). Se determinó efecto significativo en la interacción *Rhizobium* spp.-*Pachecoa venezuelensis* para la concentración de clorofila (a + b). Las plantas crecidas en suelo de El Tigre sin inóculo ni nitrógeno tuvieron un mayor contenido de clorofila (5,69 mg/l/planta). El mayor porcentaje de nitrógeno (2,12 %) se encontró en el tratamiento sin inocular y sin nitrógeno en ambos suelos. Existen rizobia nativos en los suelos Jusepín y El Tigre capaces de nodular efectivamente a *Pachecoa*. El nitrógeno edáfico ejerció un efecto restrictivo en el contenido de clorofila y en el nitrógeno foliar cuando se inocula *Rhizobium* spp. a *Pachecoa venezuelensis*.

Palabras claves: *Pachecoa venezuelensis*, FBN, *Rhizobium* spp., rendimiento

ABSTRACT

With the purpose of characterizing the nodulation process, the infectiveness and effectiveness of rizobia strains and the efficiency of the symbiosis *Rhizobium* spp.-leguminous with nitrogen application in two soils of the Venezuelan Orinoquia, it was carried out an experiment under greenhouse conditions using *Pachecoa venezuelensis* a forage shrub leguminous. The statistical arrangement was split plot with four repetitions and sixty four combinations of treatments. The main plots were the two types of soils: Jusepín and El Tigre; the subplots the two levels of edaphic nitrogen: 0 and 20 kgN.ha⁻¹ and the sub-subplots the rizobia strains: UDO-R1, RC-14, the combination of both strains and without inoculation. Plants were harvested four months after planting. It was measured plants height; shoot, root and nodules dry weight; chlorophyll (a + b) concentration and foliage nitrogen. The plants grown in Jusepín soil reached the biggest height average (77.67 cm) and the biggest shoot (6.50 g/plant), root (9.81 g/plant) and nodules (0.05 g/plant) dry weights. Significant effect was found in *Rhizobium* spp - *Pachecoa venezuelensis* interaction in chlorophyll (a + b) concentration. The plants grown in El Tigre soil with neither inoculums nor nitrogen contained more chlorophyll (5.69 mg/l/plant) than other treatments. The biggest nitrogen percentage (2.12%) it was in the treatment non inoculated and without nitrogen in both soils. Native rizobia exist in both Jusepín and El Tigre soils able to infect *Pachecoa*. The edaphic nitrogen exerted a restrictive effect in both chlorophyll content and foliage nitrogen when *Rhizobium* spp inoculated *Pachecoa venezuelensis*.

Key words: *Pachecoa venezuelensis*, FBN, *Rhizobium* spp., yield

INTRODUCCIÓN

Una de las características más significativas de algunas leguminosas fijadoras de nitrógeno es su capacidad para asociarse simbióticamente con

bacterias del género *Rhizobium*. Esta relación se manifiesta a través de la nodulación. La planta suministra los carbohidratos necesarios para el metabolismo de las bacterias y éstas utilizan los carbohidratos como fuente de energía para

transformar el nitrógeno libre de la atmósfera, en una forma asimilable para la planta, para su posterior incorporación a las proteínas.

La fijación de nitrógeno por la simbiosis entre leguminosas y bacterias es un recurso natural capaz de proveer nitrógeno de bajo costo para insumos agrícolas, mejorar la calidad de los forrajes y de los cultivos, así como satisfacer las necesidades apremiantes de alimentos de más alta calidad en nuestro mundo de población creciente.

La propiedad de ciertos árboles y arbustos leguminosos de fijar N₂ simbióticamente reviste gran importancia tanto desde el punto de vista alimenticio como ecológico, porque la integración de estos en sistemas semiáridos-silvo-pastoriles permite la restauración y mantenimiento de la fertilidad del suelo, en adición al combate de la erosión y la desertización.

Pachecoa venezuelensis (L.) Burkard es una leguminosa arbustiva de aceptable valor nutritivo (Naves, 1988; Rodríguez y Silva, 1988). Fue introducida al Estado Monagas por González (1994) y evaluada agrónomicamente en suelos ácidos de sabana por González y Tovar (1998).

En Venezuela no se ha estudiado el proceso de fijación simbiótica de nitrógeno por los rizobia en *Pachecoa*. Es por ello que en el presente trabajo se evalúan el crecimiento y algunos aspectos relacionados con la fijación biológica de nitrógeno (FBN) en *Pachecoa venezuelensis*, en suelos de Jusepín, estado Monagas y de El Tigre, estado Anzoátegui.

MATERIALES Y METODOS

En el ensayo de invernadero se utilizaron muestras de suelos provenientes de la unidad Experimental de Leguminosas Forrajeras Arbóreas y Arbustivas de Suelos Ácidos (ELFARSA), de la Universidad de Oriente, ubicada en Jusepín, estado Monagas y de la Mesa de Guanipa, específicamente de la Estación Experimental de Sabana del Instituto Universitario de Tecnología José Antonio Anzoátegui (IUTJAA) ubicada en El Tigre, estado Anzoátegui.

En cada maceta de arcilla se dispusieron 4,0 kg de suelo y se fertilizaron uniformemente con Fosfopoder (150 kg.ha⁻¹) y cloruro de potasio (25 kg.ha⁻¹). El nitrógeno se aplicó en forma de urea en

los tratamientos correspondientes. Las semillas de *Pachecoa* se obtuvieron por trituración mecánica de secciones de frutos, seleccionándose las de color claro y de tamaño uniforme, se esterilizaron con cloruro de mercurio acidificado, se lavaron con abundante agua esterilizada y se sembraron en vermiculita previamente esterilizada en autoclave. Las semillas permanecieron en la oscuridad hasta su germinación.

Las cepas de *Rhizobium* UDO-R1 (aislada de nódulos de *Pachecoa* proveniente de El Tigre) y RC-14 (de la colección del IUTJAA) fueron crecidas en medio líquido de levadura-manitol, a temperatura ambiente por ocho días con agitación constante a 100 rpm. La concentración de rizobia (cel/ml) se determinó mediante la cámara de Petroff-Hausser (Vincent, 1970).

Al momento del trasplante se adicionó 1 ml de la suspensión bacteriana al suelo y se sembró una plántula por porrón. El riego se realizó *ad libitum*, con agua destilada, durante el tiempo que duró el experimento.

El diseño estadístico utilizado fue el de Parcelas Divididas, donde las parcelas principales fueron los dos tipos de suelos: Jusepín y El Tigre; las subparcelas los dos niveles de nitrógeno: 0 y 20 kg N.ha⁻¹; y las sub-subparcelas las cepas de rizobia: UDO-R1, RC-14, la combinación de ambas cepas y sin inoculación, para un total de 16 tratamientos y 64 unidades experimentales. Los tratamientos repetidos cuatro veces fueron: 1) Plantas no inoculadas y sin aplicación de nitrógeno (NI + 0); 2) plantas no inoculadas más 20 kg de nitrógeno (NI + 20); 3) plantas inoculadas con la cepa UDO-R1 sin nitrógeno (UDO-R1 + 0); 4) plantas inoculadas con la cepa UDO-R1 más 20 kg de nitrógeno (UDO-R1 + 20); 5) plantas inoculadas con la cepa RC-14 sin nitrógeno (RC-14 + 0); 6) plantas inoculadas con la cepa RC-14 más 20 kg de nitrógeno (RC-14 + 20); 7) plantas inoculadas con la combinación de ambas cepas sin nitrógeno (UDO-R1 + RC-14 + 0) y 8) plantas inoculadas con la combinación de ambas cepas con 20 kg de nitrógeno (UDO-R1 + RC-14 + 20), para los suelos de Jusepín y de El Tigre.

La clorofila se extrajo de discos de los folíolos de las hojas medias, con etanol al 95% (v/v), durante doce horas. Se midió la absorbancia del extracto a 650 y 665 nm y se calculó la concentración de clorofila mediante la fórmula: Clorofila ($\frac{a+b}{2}$) = 25,5

A₆₅₀ + 4,0 A₆₆₅ de Sestack, Catsky y Jarvis para el etanol (Wintermans y De Mots, 1965).

A los cuatro meses de la siembra se cosecharon las plantas, las cuales se extrajeron de las macetas con presión de agua, evitándose la pérdida de nódulos. Se separó el vástago de la raíz y los nódulos. Se midió la longitud de la parte aérea, la cual se secó al igual que la raíz y los nódulos, en estufa a 80 ° C hasta peso constante. Finalmente se determinó el peso seco de cada muestra. La parte aérea se molió en un molino Willey de 60 mallas/pulgada para las posteriores determinaciones de nitrógeno foliar.

Los datos se sometieron a un análisis de varianza según el arreglo estadístico y las diferencias entre tratamientos se determinaron mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan al 5 % de probabilidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el cuadro 1 se muestran algunas características físicas y químicas de los suelos de Jusepín y El Tigre donde se realizó el experimento.

Ambos suelos son ácidos, escasos en nutrimentos y de baja capacidad de intercambio catiónico efectiva. Sin embargo, la abundancia de leguminosas en la formación sabana soporta la hipótesis de que los rizobia podrían adaptarse bien a las condiciones del suelo, a pesar de ser de pH bajo y presentar, en algunos casos, niveles de aluminio tóxicos a las plantas (Holding y King, 1963).

El número de células /ml de caldo nutritivo de cada una de las cepas de *Rhizobium spp* estudiadas fue de 2,02x10⁸ y de 2,00x10⁸ para RC-14 y UDO-R₁ respectivamente. Estos valores se encuentran dentro de los rangos considerados apropiados para el título de rizobia en medio líquido.

Altura de la planta

El análisis de varianza de los datos de altura medidos en *Pachecoa venezuelensis* durante el periodo experimental señaló diferencias significativas entre los suelos estudiados. La prueba de Duncan, aplicada a los promedios indica que las plantas crecidas en el suelo de Jusepín obtuvieron una altura promedio de 77,67 cm la cual es significativamente mayor que la altura promedio (53,81cm) de las plantas que crecieron en el suelo procedente de El Tigre (Cuadro 2), a pesar de que los análisis de suelos muestran una pequeña diferencia de fertilidad a favor de este último. Las respuestas de las leguminosas tropicales a la inoculación varían de un sitio a otro, pero las características del suelo no son determinantes en la recomendación de un inoculante, sino el genotipo de la leguminosa (Holliday, 1985).

Peso seco de vástago, de raíz y de nódulos

En el Cuadro 3 se observa que las plantas del suelo de Jusepín duplicaron en peso seco de vástago, con un valor promedio de 6,51 g/planta al obtenido en las crecidas en suelo de El Tigre, las cuales promediaron 3,33 g/planta.

Cuadro 1. Características físicas y químicas de los suelos de Jusepín, estado Monagas y El Tigre, estado Anzoátegui donde se realizó el experimento con *Pachecoa venezuelensis* (L.) Burkard y dos cepas de *Rhizobium spp.* con ó sin nitrógeno.

Características	Unidad	Suelo		Metodología
		Jusepín	El Tigre	
pH		4,5	4,6	Potenciómetro 1:1
P	mg/kg	5,10	6,92	Bray No. 1
Ca ⁺⁺	cmol/kg de Suelo	1,25	1,75	NH ₄ Ac. pH 1,0 Absorción Atómica
Mg ⁺⁺	cmol/kg de Suelo	0,42	0,35	NH ₄ Ac. pH 1,0 Absorción Atómica
K ⁺	cmol/kg de Suelo	0,01	0,01	NH ₄ Ac. pH 1,0 Absorción Atómica
Al ⁺⁺⁺	cmol/kg de Suelo	0,32	0,24	NH ₄ Ac. pH 1,0 Absorción Atómica
CICE	cmol/kg de Suelo	2,00	2,31	∑ de Cationes, Acidez intercambiable
% Saturación Al	%	16,00	10,40	KCl 1,0 N
Materia Orgánica	%	0,53	1,38	Walkey-Black. Potenciómetro
Textura		af-fa	af	Bouyoucos

1/ Realizado en el Laboratorio de análisis de Suelos y Agua (LABSAS) de la Universidad de Oriente

Cuadro 2. Efecto de la inoculación y la aplicación de nitrógeno en la altura de las plantas de *Pachecoa venezuelensis* en dos suelos de las sabanas Orientales Venezolanas

Suelos	Altura de la planta (cm)	Ámbito *
Jusepín	77,67	a
El Tigre	53,81	b

* Letras iguales indican promedios estadísticamente iguales

Un comportamiento similar al descrito anteriormente se observó en el peso seco de la raíz y de los nódulos. Las plantas sembradas en el suelo de Jusepín obtuvieron mayor peso seco promedio de raíz (9,81/planta) que las plantas crecidas en suelo de El Tigre con un valor promedio por planta de 4,93 g (Cuadro 3).

El peso seco promedio de nódulos por planta en el suelo de Jusepín fue de 0,5 g, el cual fue significativamente mayor al de las plantas del suelo de El Tigre, donde no fue posible realizar las mediciones de peso por el pequeño tamaño de los nódulos, lo que imposibilitó su extracción de las raíces. Aunque el número de nódulos no se describe en este estudio, es importante señalar que las plantas no inoculadas fueron las que produjeron el mayor número de nódulos, especialmente las del suelo de Jusepín. Ello demuestra la presencia de rizobia nativos capaces de infectar a *Pachecoa* en éstos suelos. En la asociación rizobio-leguminosa se han encontrado muchas variantes: distintos tipos de nodulaciones en una misma prueba con diferentes cultivares, muchos nódulos pequeños e ineficientes, escasos nódulos grandes y, por último, numerosos nódulos grandes eficientes o ineficientes (Martínez *et al.*, 1998).

Cuadro 3. Efecto de la inoculación y la aplicación de nitrógeno en el peso seco del vástago, de la raíz y de los nódulos de las plantas de *Pachecoa venezuelensis* en dos suelos de las sabanas Orientales Venezolanas.

Suelo	Peso seco (g)		
	Vástago	Raíz	Nódulos
Jusepín	6,51 a*	9,81 a	0,05 a
El Tigre	3,33 b	4,93 b	0,00 b

* Letras iguales indican promedios estadísticamente iguales

Concentración de clorofila (a + b)

En cuanto a la variable concentración de clorofila (a + b) hubo diferencias significativas para el efecto simple de inóculos y en la interacción Inóculo x Nitrógeno x Suelo. En el Cuadro 4 se observa que los tratamientos sin inocular, con o sin aplicación de nitrógeno con suelo de El Tigre (NI+20 (T) y NI+0 (T)) indujeron las mayores concentraciones de clorofila, no difiriendo entre si, con valores promedios respectivos de 5,688 y 4,905 mg de clorofila/l/planta. Similar comportamiento se observó en los tratamientos [UDO-R1 + 20 (J)], [RC-14 + 20 (T)], [UDO-R1 + RC-14 + 20 (T)] y [UDO-R1 + 20 (T)] con promedios de 4,745; 4,698; 4,493 y 4,422 mg de clorofila/l/planta.

Los tratamientos NI+0; NI+20; UDO-R1+0; RC-14+0 y RC-14+20 en suelo de Jusepín arrojaron los valores promedios más bajos oscilando entre 2,997 y 2,701 mg de clorofila / l / planta. De manera

Cuadro 4. Efecto de la inoculación y la aplicación de nitrógeno sobre la interacción Inóculo * Nitrógeno * Suelo en la concentración de clorofila (a + b) de las plantas de *Pachecoa venezuelensis* en dos suelos de las sabanas Orientales Venezolanas.

Tratamientos	Concentración de clorofila (a + b) (mg/l/planta)	Ámbito *
NI+ 0 (T)	5,688	a
NI+20 (T)	4,905	a
UDO-R1+20 (J)	4,745	ab
RC-14+20 (T)	4,698	ab
UDO-R1+RC-14+20 (T)	4,493	ab
UDO-R1+20 (T)	4,422	abc
UDO-R1+RC-14+0 (T)	4,251	bc
UDO-R1+RC-14+20 (J)	3,855	bc
UDO-R1+0 (T)	3,795	bc
UDO-R1+RC-14+0 (J)	3,720	bc
RC-14+0 (T)	3,348	bc
NI+0 (J)	2,997	c
NI+20 (J)	2,980	c
UDO-R1+0 (J)	2,842	c
RC-14+0 (J)	2,715	c
RC-14+20 (J)	2,701	c

* Letras iguales indican promedios estadísticamente iguales

(T) : Suelo de El Tigre, estado Anzoátegui
(J): Suelo de Jusepín, estado Monagas

general los tratamientos en el suelo de El Tigre tuvieron mayores valores promedios cuando se les compara con los del suelo de Jusepín.

Nitrógeno del follaje

El mayor porcentaje de nitrógeno foliar (2,12%) se encontró en los tratamientos sin inocular y sin nitrógeno edáfico en ambos tipos de suelos (Cuadro 5). Ello indica que los rizobia nativos presentes en el suelo fueron más eficientes que las cepas introducidas en el proceso de incorporación de nitrógeno a la planta. La mezcla de las cepas en presencia de nitrógeno (UDO-R1 + RC-14 + 20) rindió los porcentajes más bajos de nitrógeno foliar, tanto en suelo de Jusepín como en El Tigre.

Es probable que el nitrógeno edáfico ejerciese un efecto deletéreo en el proceso de FBN y/o que las cepas nativas de rizobia sean más competitivas y eficientes en fijar nitrógeno que las cepas introducidas. Similar comportamiento ha sido reportado en otros cultivos tales como *Gliricidia sepium* (Jacq.) Walp. (González *et al.*, 2001 y Navarrete *et al.*, 1999); *Cajanus cajan* (L.) Mill. (Tomassi *et al.*, 1999); *Glycine max* (L.) Merrill. (Ruiz

Cuadro 5. Valores promedios de nitrógeno del follaje de las plantas de *Pachecoa venezuelensis* en dos suelos de las sabanas Orientales Venezolanas.

Tratamientos	Nitrógeno en follaje (%)
NI+0 (J)	2,12
UDO-R1+0 (J)	2,01
NI+20 (J)	1,94
UDO-R1+RC-14+0 (J)	1,91
UDO-R1+20 (J)	1,81
RC-14+0 (J)	1,78
RC-14+20 (J)	1,75
UDO-R1+RC-14+20 (J)	1,69
NI+ 0 (T)	2,12
UDO-R1+RC-14+0(T)	2,04
NI+20 (T)	1,91
UDO-R1+0 (T)	1,91
UDO-R1+20 (T)	1,78
RC-14+20 (T)	1,69
UDO-R1+RC-14+20(T)	1,65
RC-14+0 (T)	1,15
Duncan (0,05)	

(T) : Suelo de El Tigre, estado Anzoátegui

(J): Suelo de Jusepín, estado Monagas

et al., 2000); *Phaseolus vulgaris* L. y *Vicia faba* L. (Cámara y Waaijenberg, 2000), al evaluar cepas introducidas y nativas en presencia de nitrógeno edáfico. Aunque la ventaja de inocular no radica, muchas veces, en el incremento del rendimiento de las cosechas, sino en la eliminación de la necesidad de aplicar fertilizantes nitrogenados (Michelena, 1981).

CONCLUSIONES

En razón a los resultados obtenidos se puede confirmar la existencia de rizobia nativos en suelos de Jusepín y de El Tigre capaces de nodular eficientemente a *Pachecoa*. Los pesos secos del vástago, de la raíz y de los nódulos de las plantas crecidas en suelo de Jusepín fueron considerablemente mayores que los obtenidos en el suelo de El Tigre. Hubo efecto significativo en la interacción *Rizhobium spp.-Pachecoa venezuelensis* solamente en la variable concentración de clorofila. Se evidenció un efecto negativo del nitrógeno edáfico en el proceso de FBN en *Pachecoa*.

RECOMENDACIONES

Orientar la investigación relacionada con la asociación *Rizhobium spp.-Pachecoa venezuelensis* hacia la obtención de cepas de bacterias procedentes de los nódulos de *Pachecoa* crecida en suelo de Jusepín, y analizar el efecto que la antes mencionada asociación tiene como bioenmienda del suelo.

LITERATURA CITADA

- Cámara, B. y H. Saaijenberg. 2000. Estudios de fijación biológica de nitrógeno (FBN) en frijol y haba en la zona subandina de Bolivia. Memorias de la XX RELAR. Arequipa. Perú. p. 212-219.
- González, M. 1994. Comportamiento de *Pachecoa venezuelensis* en sabanas ácidas de Monagas. In VII Congreso Venezolano de Zootecnia. San Juan de los Morros. Estado Guárico. Venezuela. p.35.
- González, A.; M. González; A. Leal y V. Michelena. 2001. Evaluación de algunos parámetros relacionados con la fijación de nitrógeno en *Gliricidia sepium* (Jacq.) Walp. Revista UDO Agrícola 1 (1): 25-29.

- Holliday, J. 1985. La fijación biológica de nitrógeno como una agrotecnología transferible en el trópico. Memorias de la X Reunión Latinoamericana sobre *Rhizobium*. Maracay. Estado Aragua. Venezuela. (mimeografiado).
- Holding, A. J. and J. King. 1963. The effectiveness of indigenous population of *Rhizobium trifolii* in relation to soil factors. *Pl. Soil* 18: 191– 198.
- Martínez, R.; J. Casanova y L. Walon. 1998. Potencial de establecimiento de la fijación simbiótica de nitrógeno en germoplasma de maní. *Ciencia de la Agricultura Academia*. La Habana. Cuba. 160 p.
- Michelena, V. 1981. Fijación de nitrógeno por seis cepas de *Rhizobium* en cuatro cultivares de maní (*Arachis hypogaea* L). Trabajo de Ascenso. Universidad de Oriente. Escuela de Ingeniería Agronómica. Jusepín. Estado Monagas. Venezuela. 19 p.
- Navarrete, Y.; A. A. Leal y V. A. Michelena. 1999. Efecto de la coinoculación con rizobios y micorrizas en dos accesiones de *Gliricidia sepium* (Jacq.) Walp. *RABSU* 1 (1): 28-33.
- Naves, J. 1988. Evaluación agronómica y nutricional de *Pachecoa venezuelensis*. Trabajo de grado para Ingeniero Agrónomo. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Maracay, estado Aragua. Venezuela. 123 p.
- Rodríguez, E. y E. Silva. 1988. *Pachecoa venezuelensis*: crecimiento en época seca y evaluación con bovinos. Trabajo de grado para Ingeniero Agrónomo. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Maracay, estado Aragua. Venezuela. 131 p.
- Ruiz, D.; V. Oller y J. Orellana. 2000. Nodulación y desarrollo de la planta de soya en función de la reacción (pH) del suelo. *In Memorias de la XX RELAR*. Arequipa. Perú. p. 197-200.
- Tomassi, L.; A. A. Lealy V. A. Michelena, V. 1999. Evaluación fisiológica del quinchoncho (*Cajanus cajan* (L.) Mill.) sometido a estrés hídrico e inoculado con rizobios. *RABSU* 1 (1): 44-47.
- Tovar, B. J. y M. C. González. 1998. Comportamiento agronómico de *Pachecoa venezuelensis* en suelos ácidos del Estado Monagas. Trabajo de Grado para Ingeniero de Producción Animal. Escuela de Ingeniería de Producción Animal. Universidad de Oriente.. Maturín, estado Monagas. Venezuela. 60 p.
- Vincent, J. M. 1970. Manual práctico de rizobiología. 1^{ra} edición. Hemisferio Sur. Buenos Aires. Argentina. p. 63–140.
- Wintermans, J. y A. De Motts. 1965. Spectrophotometric characteristics of chlorophylls *a* and *b* and their pheophytins in ethanol. *Biochem. Bioph. Act* 109: 448-453.