

CARACTERIZACION Y EVALUACION DE LA EFECTIVIDAD DE LA FIJACION DE NITROGENO DE CEPAS DE RHIZOBIUM, ASOCIADAS A PUERARIA (*Pueraria phaseoloides*), COMO CULTIVO COBERTURA DE PALMA ACEITERA (*Elaeis guineensis* Jacq)

Gonzalo Romero¹ y Gustavo Bernal²

INTRODUCCION

La palma aceitera (*Elaeis guineensis* J.) es actualmente uno de los más importantes cultivos en el Ecuador principalmente por su extensión de 207.285 ha (Censo Palmero, 2005) sembradas por 5515 palmicultores (de los cuales el 87% son pequeños agricultores), el impacto socio-económico generando plazas de trabajo de manera directa (90000 personas) e indirecta, y por su potencial como bio-combustible. La palma aceitera es un cultivo que demanda importantes cantidades de nutrientes, especialmente de nitrógeno (N) y tiene una extracción constante de elementos nutritivos del suelo. El costo de la fertilización es una de las inversiones más altas del manejo del cultivo, por lo que se debe seleccionar adecuadamente los fertilizantes a utilizar y ejecutar prácticas culturales apropiadas que ayuden a mejorar la fertilidad de los suelos.

El uso de leguminosas de cobertura es importante como parte del manejo del suelo cultivado con palma. Estas leguminosas: 1) contribuyen con el control de la erosión del suelo protegiéndolo de las lluvias fuertes y de la luz directa del sol, 2) mejoran la condición del suelo al proveer cobertura con materiales orgánicos, 3) reducen la temperatura del suelo, 4) permiten la infiltración más rápida, reduciendo la escorrentía superficial, 5) estimulan la micro y macro flora del suelo, 6) proveen de N por medio de la fijación simbiótica de N₂ atmosférico, 7) controlan plagas al prevenir la infestación de insectos que aparecen en los troncos de palma caídas, y 8) controlan las malezas por competencia (Rankine y Hardter, 1998).

Para obtener mayor cantidad de material vegetal de la leguminosa de cobertura, y por lo tanto mayor contribución de nutrientes y de protección al suelo, una estrategia importante es seleccionar cepas de la bacteria benéfica del suelo conocida como *Rhizobium* (o comunmente “rizobio”), que fija N atmosférico en beneficio de la leguminosa. Si bien es cierto, existen en el mercado inoculantes de esta bacteria, éstos son productos importados elaborados con cepas foráneas, aisladas de suelos diferentes a los del Ecuador, y que lamentablemente resultan ser ineficientes bajo condiciones locales (Bernal, 2006). Es importante por lo tanto, encontrar cepas “nativas” (adaptadas) de las regiones ecuatorianas donde se cultiva la palma aceitera.

Este estudio tuvo como objetivos: 1) caracterizar fenotípicamente a los aislamientos “nativos” de *Rhizobium* asociados a la Pueraria, para conocer el género taxonómico de la bacteria, y 2) seleccionar las cepas más eficientes en fijar nitrógeno atmosférico al asociarse con la leguminosa, para la elaboración de inoculantes.

METODOLOGIA

Fase de laboratorio

Se recolectaron 60 muestras de suelo en los diferentes bloques de producción de palma en el Ecuador (San Lorenzo, Occidental, Guayas, y Oriental), donde el cultivo tiene importancia económica. Las

¹ Estudiante Egresado de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, IASA II. Becario de ANCUPA.

Correo electrónico: goromero@ancupa.com

² Microbiólogo de Suelos, Ph D., Director de Investigaciones de ANCUPA.

muestras de suelo fueron enviadas al INIAP (Estación Santa Catalina) para el análisis físico y químico. Además, en cada sitio se recolectaron raíces con nódulos para el aislamiento de la bacteria.

Los nódulos fueron primeramente desinfectados superficialmente según la metodología del CIAT (1988). Una vez desinfectados, cada nódulo fue colocado en un tubo plástico (Eppendorf) conteniendo 200 μ l de agua destilada estéril, para ser macerados individualmente. Entonces, una alícuota de 25 μ l de la suspensión bacteriana se sembró en platos Petri conteniendo medio de cultivo levadura, manitol, agar (LMA) (Vincent, 1975). Las placas fueron incubadas en estufa a 26 °C, por un período adecuado (7-14 días) que permitió visualizar claramente la formación de colonias.

Para verificar la pureza de cada aislamiento de la bacteria, se siguió la metodología del CIAT (1988). Se sometieron a tinción *Gram*, para luego ser sembrados en placas Petri conteniendo LMA con el indicador rojo congo en una concentración de 10ml/L, y en medio glucosa-peptona-agar (GPA) conteniendo púrpura de bromocresol (10 ml/L). Las placas fueron mantenidas en incubadora a una temperatura de 26° C, y por un período de 7 a 14 días.

Para conservar el germoplasma bacteriano, se preparó asépticamente una solución de peptona al 20% y otra de sucrosa al 10%, para luego ser liofilizadas de acuerdo a la metodología del Laboratorio de Microbiología del INIAP (Estación Santa Catalina). Para la reconstitución de las cepas almacenadas, se siguió la metodología de rutina del mismo laboratorio en mención.

La producción del caldo bacteriano, y la determinación de la concentración, se logró transfiriendo con el asa de platino una pequeña cantidad de la bacteria en frascos (100 ml) conteniendo medio de cultivo líquido. Luego por agitación se logró obtener los caldos bacterianos con una concentración aproximada de 10⁹ cel/ml (determinada por espectrometría). Esta concentración se logró obtener después de los tres días, aunque algunas cepas lograron alcanzar ésta concentración después de los ocho días de agitación. El caldo bacteriano de cada cepa con la concentración indicada, fue diluido con agua destilada estéril, hasta lograr una concentración final de 10⁵ cel/ml.

Para la caracterización fenotípica de las cepas asociadas a la Pueraria, se considero únicamente 40 aislamientos, en vista de que no se consiguió colonias puras de las 20 restantes en las pruebas correspondientes. A partir de las suspensiones bacterianas de 10⁵ cel/ml, de cada cepa se tomó una alícuota de 50 μ l para depositarse en un orificio de una placa ELISA. Con la ayuda de un multi-inoculador (multipunto) de 48 descargas, fueron transferidas cuidadosamente sobre la superficie del medio de cultivo conteniendo la sustancia química, y así determinar la resistencia de cada cepa a ese producto. Se determinaron las siguientes pruebas siguiendo las metodologías de Somasegaran y Hoben (1994); Bernal y Graham (2001): tiempo de crecimiento, morfología de colonias, producción de acidez o alcalinidad, crecimiento en fuentes de carbono y nitrógeno, resistencia a antibióticos, tolerancia a metales pesados, a diferente pH, salinidad, y fertilizantes.

Después de realizar las lecturas para cada prueba, la presencia o ausencia de crecimiento de cada cepa en cada producto, se registró en una matriz binaria en el programa NTSYS ver 5.0 (Numerical Taxonomical Statistics System). En cada prueba, el crecimiento de cada cepa se registró como positivo (1), y la ausencia de crecimiento como cero (0).

Una vez obtenida la matriz se aplicó la técnica de “cluster análisis” utilizando el método de UPGMA (Media Aritmética No Ponderada; Sneath & Sokal, 1973) mediante la utilización del coeficiente SM (Simple Match). Se generó así, un dendrograma, el cual permitió mostrar las relaciones fenotípicas entre las cepas estudiadas.

Fase de invernadero

Previa a la fase de campo, 41 cepas disponibles fueron evaluadas en invernadero para seleccionar las mejores, las mismas que fueron luego probadas en el campo. La fase de invernadero se realizó en las instalaciones del Centro de Investigaciones de Palma Aceitera CIPAL (km 37 vía Santo Domingo-Quinindé). Para la activación de las cepas en medio LMA, se siguió la metodología sugerida por Jerez (2004).

La desinfección y germinación de la semilla de *Pueraria* se realizó mediante la metodología de Vincent (1975). El sustrato para macetas se sometió a un análisis físico-químico, previo a la fertilización con P, K y micro nutrientes.

El inoculante fue preparado en medio líquido conteniendo levadura manitol, en tubos esterilizados. En condiciones de asepsia, se colocó con un asa de platino una alícuota de la cepa activada. Los tubos permanecieron por 72 horas en agitación constante, a una velocidad de 90 rpm. Se determinó la concentración de las cepas a 10^8 cel/ml.

Se utilizó un diseño completamente al azar, siendo la maceta desinfectada con alcohol aséptico, y conteniendo sustrato (turba y pomina, 3:1) estéril, la unidad experimental. Se colocó dos semillas de *Pueraria phaseoloides* previamente desinfectadas y pregerminadas. Las macetas fueron colocadas en un invernadero a 28° C, y 80% de humedad.

La semilla se inoculó (directamente al sustrato) con las cepas de “*Rhizobium*”, específicas de acuerdo al tratamiento, en una cantidad de 10ml (10^8 cel/ml). De acuerdo a la evapotranspiración del sustrato, se procedió a regar agua destilada estéril. A los 15, 30 y 45 días se incorporó elementos nutritivos en las macetas con medio Summerfield Nutritivo (Jerez, 2004). A los 60 días, las plantas fueron cosechadas y colocadas en fundas de papel.

Los parámetros medidos fueron: peso fresco de la parte aérea de la planta, peso seco de la parte aérea, número de nódulos, peso de nódulos frescos, peso de nódulos secos, porcentaje de nitrógeno en la parte aérea, determinación de Nitrógeno Total.

Fase de campo

Las mejores cepas seleccionadas en invernadero fueron evaluadas en el campo, en cuatro localidades: Palpailon (San Lorenzo), Alespalma (San Lorenzo), CIPAL (La Concordia), y ESPE (Quevedo). El suelo se preparó mediante la limpieza y remoción superficial, para posteriormente trazar los surcos a 0,50 m de distancia. Se efectuó el trazado de los bloques, cada uno con 4 parcelas que serían las unidades experimentales. Antes de la siembra se procedió a fertilizar todas las parcelas con fósforo, potasio y micro nutrientes, de acuerdo al análisis del suelo realizado en el INIAP (Estación Santa Catalina), y a los requerimientos del cultivo. Se aplicó urea (46% N, 80 kg/ha) únicamente en las unidades experimentales del tratamiento nitrogenado.

Para la preparación del inoculante, se procedió a reactivar las cepas liofilizadas en medio LMA, y luego en medio líquido LM, agitándolas hasta alcanzar una concentración de 10^8 cel/ml. Se seleccionó una turba como portadora de la bacteria, con alto contenido de materia orgánica (60%). La turba se colocó en fundas plásticas, para luego proceder a la esterilización en autoclave por una hora. Se colocó la suspensión bacteriana (10^8 cel/ml) en la turba en proporción 1:2, para incubarse durante 7 días.

Se aplicó un Diseño de Bloques Completamente al Azar, con la unidad experimental de siete surcos de 5,20 m largo x 0,5 m de ancho ($18,20$ m²), separados por 1 metro de distancia. Los bloques mantuvieron una distancia de 2 metros. La parcela neta estuvo constituida de 3 surcos centrales, siendo sus dimensiones de 4,20 de largo x 0,5 m de ancho, con una área total de $6,3$ m².

Las semillas se inocularon al momento de la siembra en dosis de 10 g de inoculante por kilogramo de semilla. Como adherente se usó una solución de azúcar al 25% (Bernal et al. 2002). La semilla se sembró manualmente con tres semillas por sitio, y a una distancia de 40 cm entre sitios. Antes de la siembra, se realizó un riego para garantizar un mejor establecimiento de la bacteria y la germinación de la semilla. Los riegos se realizaron dependiendo de las condiciones climáticas.

La cosecha se realizó manualmente a los 60 días de edad del cultivo. Las plantas fueron cortadas en la base del tallo y colocadas en fundas de papel. Estas fueron previamente identificadas de acuerdo al tratamiento, para luego determinar peso fresco y peso seco. Los datos tomados fueron: peso fresco de la parte aérea, peso seco de la parte aérea, peso de nódulos, porcentaje de nitrógeno total, y Nitrógeno Total.

RESULTADOS Y DISCUSION

En el laboratorio, siete cepas, presentaron un crecimiento rápido en medio LMA, con un tiempo de crecimiento de colonias de 3 días versus 9 días de las 43 restantes, las cuales fueron consideradas de crecimiento lento en el mismo medio de cultivo. Las cepas de crecimiento rápido resultaron ser de la Provincia de Esmeraldas (Quinindé y San Lorenzo) y una de la Provincia de Pichincha (zona límite con Esmeraldas). Las cepas de crecimiento rápido, formaron colonias circulares de apariencia acuosa de color blanco opaco, mientras que las cepas de crecimiento lento, tomaron una coloración cremosa opaca.

Un aspecto importante de señalar en relación a las fuentes de carbono, es que todas las cepas de la zona de San Lorenzo, fueron capaces de metabolizar los disacáridos: sacarosa, maltosa y lactosa, mientras que solamente cinco de la zona de Quinindé, (QE1, QE6, QE10, QE17 y QP19), una cepa proveniente del Oriente (OO34), y dos de la zona de Quevedo (QuLR46 y QuLR58) tuvieron la capacidad de metabolizar estos tres disacáridos. Con respecto a las fuentes de nitrógeno: glycine, triptofano y tirosina, los resultados demostraron que solo las cepas QE18 y QP19 de la zona de Quinindé, y las QuLR53 y QuLR58, de la zona de Quevedo, metabolizan estas fuentes de N. Las cepas de las dos zonas restantes no mostraron crecimiento notable en estas fuentes.

En cuanto a antibióticos, la kanamicina fue el antibiótico, al cual las cepas en estudio presentaron mayor tolerancia, con cinco cepas de Quinindé, una de San Lorenzo, una del oriente, y una de la zona de Quevedo. En el medio de cultivo conteniendo ácido nalidíxico, solo siete cepas mostraron crecimiento, de las cuales, cuatro correspondieron a Quevedo, una a Quinindé, una a San Lorenzo y una a la región amazónica. En estreptomycinina, a la concentración arriba indicada, crecieron siete, con tres pertenecientes Quinindé, tres a Quevedo y una al oriente. En espectinomycinina, ninguna de las cepas evidenció crecimiento a la concentración experimentada.

Los datos obtenidos en el análisis de metales pesados mostraron que cinco cepas de Quinindé (QE7, QE8, QZN15, QP19, QE26) crecieron en el medio de cultivo conteniendo los metales Zinc y Plomo, y solo una de San Lorenzo (SLE21) y una del oriente (OO34), crecieron en medio con este metal. Las cepas de Quevedo no toleraron ningún metal pesado.

Las cepas de Quinindé fueron las que más toleraron las concentraciones de antibióticos, y de metales pesados. Estos resultados, pueden estar relacionados con el hecho de la zona mencionada es tradicionalmente agrícola, sometida desde hace años a un manejo intensivo de la palma, con el uso de agroquímicos, a los cuales las cepas y microorganismos del suelo en general pudieron haberse adaptado a las condiciones adversas, generando tolerancia o resistencia a determinados productos químicos. Este hecho también se evidencia en la zona de Quevedo principalmente con antibióticos. Estudios microbiológicos de laboratorio, realizados por la Universidad Técnica Equinoccial (Bernal, 2006) evidenciaron una población alta de actinomicetos en las dos zonas, y se conoce que este grupo tiene la capacidad de producir una gama de antibióticos como mecanismo de sobre vivencia.

Posiblemente, el “rizobio” en estas zonas convive sinérgicamente con este grupo importante del suelo, generando mecanismos de resistencia a los antibióticos.

Las cepas provenientes de San Lorenzo y Oriente, que son zonas relativamente nuevas en la agricultura (en relación al cultivo de la palma) en su mayoría, la situación fue diferente, es decir no toleraron las concentraciones de antibióticos y metales pesados. Esto es un indicador que explica que el uso indiscriminado de productos químicos, afecta el desarrollo normal de microorganismos presentes en el suelo, y por lo tanto su biodiversidad.

En cuanto a pH del medio, los resultados mostraron que tres cepas de Quinindé (QE1, QE2, QE3), toleraron los tres diferentes niveles de pH estudiados (4.5, 5 y 8.5). Se encontró que tres cepas de la misma zona (QE18, QP19, QP20) fueron capaces de crecer a pH 4.5, y una (QZN45) a pH 8.5. Todas las cepas de San Lorenzo toleraron los pH 5 y 8.5, con excepción del pH 4.5. Las del oriente, únicamente la cepa OO34 tolero el pH 4.5. De la zona de Quevedo, las cepas QuZN47, QuG48 toleraron el pH 4.5, y dos cepas (QuLR46 y QuLR59) mostraron crecimiento en pH 8.5.

En relación a la salinidad, ninguna de las cepas estudiadas creció a las concentraciones de 0.5; 1 y 2%. Dos cepas de Quinindé (QE10 y QE18), y cuatro de Quevedo (QuZN49, QuZn50, QuLR55 y QuLr57) crecieron a concentraciones análogas a las cantidades de urea aplicadas en el campo (de 530 y 460 gr por planta año⁻¹). En cuanto al muriato de potasio, el aspecto más relevante, es que las cepas de Quevedo (QuZN49, QuZn50, QuLR55 y QuLr57) toleraron concentraciones análogas a las del campo (460, 370 y 180 gr por planta año⁻¹), mientras que las de Quinindé (QE18, QP19, QE26 y QE44) toleraron concentraciones solo de 370 y 180 gr por planta año⁻¹.

Los resultados mostraron que las cepas de crecimiento rápido, acidificaron el medio de cultivo LMA usando azul de bromotimol, y convirtiéndolo a una coloración amarillenta, con excepción de los aislamientos QE10, QE17, QE18 y SLE23, que alcalinizaron el medio de cultivo (color azul). Las cepas de crecimiento lento, alcalinizaron el medio de cultivo, pero así mismo se observó ciertas excepciones, como las cepas QP12, QZN15, QP19, SLE24, QE26, QZN29, QuLR46 y QuLR55 que no lo hicieron.

La Figura 1, originado después del análisis estadístico, logró identificar claramente a dos grupos principales, la misma que muestra la relación fenotípica de los aislamientos de rizobios asociados a la Pueraria. El primer grupo está conformado principalmente por aislamientos de las zonas de Quinindé y San Lorenzo (QE1, SLE23, SLE24, QE6, QE3, QP19, QP20, SLE21, QE10 y QE17), dos de Quevedo (QuLR46 y QuLR58), y una (OO34) del oriente. Estas cepas se diferenciaron del otro grupo con un coeficiente de agrupamiento de 0.21.

El segundo grupo incluye también cepas de Quinindé (QE2, QE4, QE7, QE8, QP12, QZN13, QZN15, QE18, QE26, QZN29, QZN41, QE43, QE44, QZN45), once de Quevedo (QuZN47, QuG48, QuLR49, QuLR50, QuLR55, QuLR51, QuLR53, QuLR54, QuLR57, QuLR59 y QuLR60), y dos del oriente (OS36, OS38). En este grupo se puede observar una mayor variabilidad entre los aislamientos.

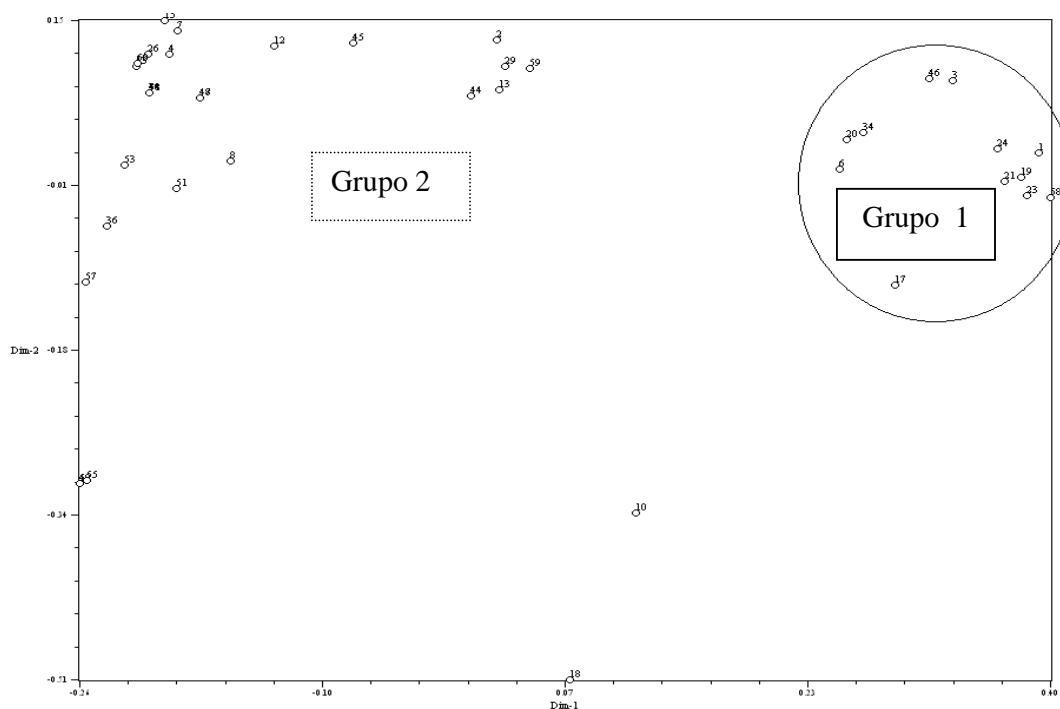


Figura 1. Agrupamiento de una colección de aislamientos de “*Rhizobium*” asociados a la Pueraria (*Pueraria phaseoloides*), en el cultivo de Palma Aceitera.

Una vez realizado el análisis estadístico de las variables consideradas en el estudio de invernadero, de las 41 cepas evaluadas, se seleccionaron las mejores, siendo el porcentaje de nitrógeno en la planta, peso seco de nódulos y peso seco de plantas las variables de mayor jerarquía para la selección. A nivel de campo, tomando en consideración los mismos parámetros considerados en invernadero, se logró identificar de acuerdo al sitio experimental, las mejores cepas fijadoras de nitrógeno por localidad. Estas fueron: la QuLR51 en el CIPAL, la CP12 en Alespalma, la CP12 en Palpailon, y la Qu LR 51 en la ESPE, las cuales pueden ser comercializadas como inoculantes de la leguminosa que se asocia con la palma.

La Tabla 1 muestra el caso de la superioridad de tres cepas “nativas” versus una cepa importada, y los testigos. El cuadro corresponde al porcentaje de nitrógeno de las mejores cepas en el sitio ESPE. En ésta variable, se determinó que las mejores cepas del sitio en mención, fueron la QuLR51, 43, y 12 con valores de 3.81%, 3.65%. y 3.55%, respectivamente, ubicados en un mismo rango de significación estadístico. Estas cepas fueron superiores a la cepa testigo (3.44%), y a los controles nitrogenados (3.38%) y cero (sin nitrógeno y sin cepa, 3.29%). Estos resultados indican, que algunos suelos palmeros del Ecuador poseen cepas “nativas” (adaptadas) de alta capacidad fijadora de nitrógeno, las mismas que pueden ser utilizadas en zonas donde la bacteria no se ha establecido y donde la simbiosis bacteria-leguminosa es deficiente. Las cepas mostrando superioridad bien podrían ser utilizadas como inoculantes en sitios donde la Pueraria necesita un mejor manejo dentro del sistema con palma.

Tabla 1. Porcentaje de nitrógeno de tres cepas evaluadas versus cepa importada y testigos. Sitio ESPE (Quevedo).

Cepa	%N
Qu LR 51	3.81 a
Cepa 43	3.65 a
Cepa 12	3.55 a
Testigo Cepa importada	3.44 ab
Testigo Nitrogenado	3.38 ab
Testigo sin nitrógeno y sin cepa	3.29 ab

Concluyendo, este estudio logró diferenciar dos grupos de bacterias fijadoras de N, asociadas a la leguminosa Pueraria. Este hecho es más evidente con las cepas aisladas de la zona de Quinindé (Provincia de Esmeraldas). Probablemente, existen al menos dos géneros de la bacteria (*Rhizobium* y *Bradyrhizobium*) haciendo simbiosis con esta leguminosa de cobertura de la palma. El primer grupo de cepas son de crecimiento rápido, y el otro, es cepas de crecimiento lento, respectivamente. Estos resultados permiten también considerarla a la Pueraria como una leguminosa que se asocia naturalmente con rizobios de taxonomía (en cuanto a género) diferente.

En términos generales, en las zonas productoras de palma aceitera del país, son las cepas de crecimiento lento las que prevalecen, asociadas a la leguminosa, pero un hecho interesante es que en la zona de Quinindé, las de crecimiento rápido son las que prevalece. Será importante, a través de un diagnóstico, determinar si la práctica de la inoculación es frecuente y desde hace que tiempo se lo ha realizado, y obviamente si la práctica ha tenido éxito en cuanto a fijación de nitrógeno en la leguminosa. Las cepas de las zonas de Quinindé y Quevedo mostraron ser las más tolerantes a condiciones adversas. Las condiciones de una agricultura más intensiva en ambas regiones, probablemente son causa para que estos microorganismos desarrollen mecanismos de adaptación.

En cuanto a la eficiencia de fijación de nitrógeno, las cepas la QuLR51 (CIPAL), CP12 (Alespalma), CP12 (Palpailon), y la Qu LR 51 (ESPE) fueron las mejores de acuerdo a los análisis estadísticos de los parámetros considerados tanto en invernadero como en campo. Estas cepas constituyen potenciales inoculantes de la Pueraria. La recomendación principal, de este estudio es por lo tanto probar a nivel de laboratorio algunos sustratos para seleccionar aquel que presente la mejor viabilidad de la bacteria en términos de concentración de células bacterianas por ml de sustrato, en el tiempo (2-3-6 meses). El mejor portador, permitirá la elaboración de inoculantes a nivel comercial para el gremio palmero Ecuatoriano.

BIBLIOGRAFIA

- Bernal, G. and P. Graham. 2001. Diversity in the rhizobia associated with *Phaseolus vulgaris* L. in Ecuador, and comparisons with Mexican bean rhizobia. *Can. J. Microbiol.* Vol 47. Number 6. pp: 526-534.
- Bernal, G., A. Suarez, M. Jerez, y D. Campaña. 2002. Inoculación de la semilla de leguminosas con la bacteria "*Rhizobium*". Proyecto PROMSA. Tríptico No 195. Estación Santa Catalina (INIAP).
- Bernal, G. 2006. Comunicación personal. Director de Investigaciones de ANCUPA.
- CIAT, 1988. Simbiosis Leguminosa-Rizobio. Manual de Métodos de Evaluación, Selección y Manejo Agronómico. Editores: Proyecto CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical)-UNDP de Evaluación, Selección y Manejo de la Simbiosis Leguminosa-Rizobio para aumentar la Fijación Biológica del Nitrógeno. Cali, Colombia.

- Jerez, M. 2004. Evaluación de Biotipos de *Bradyrhizobium* spp., en el cultivo del Maní (*Arachis hypogaea* L.) en las provincias de Manabí y Loja. Tesis Ing. Agr. Quito. Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrícolas. 127 p.
- Rankine, T.H. y R. Hardter. 1998. Guía de Campo. Serie en Palma Aceitera. Fase Inmadura. Volumen II. INPOFOS Y CANPOTEX. Traducido 2004. p 75-84.
- Sneath, H. and R.R. Sokal. 1973. Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. Eds. D. Kennedy. 573 p.
- Somasegaran, P. and H. Hoben. 1994. Handbook for rhizobia. Springer Laboratory. New York, U.S.A.
- Vincent, J. 1975. Manual Práctico de Rhizobiología. Centro Regional de Ayuda Técnica. Buenos Aires (Arg.). Editorial Hemisferio Sur. 200p.