

# Determinación de la fijación biológica de N<sub>2</sub> usando la técnica de abundancia natural del N<sup>15</sup> en tres ecotipos de cacahuate forrajero

## Assessment of N<sub>2</sub> fixation by three forage peanut ecotypes using <sup>15</sup>N natural abundance technique

Braulio Valles de la Mora<sup>a</sup>, Georg Cadisch<sup>b</sup>

### RESUMEN

Se midió la proporción de nitrógeno atmosférico (N<sub>2</sub>) biológicamente fijado, utilizando el método de abundancia natural de N<sup>15</sup>, en tres ecotipos de la leguminosa forrajera *Arachis pintoi* (Ap): CIAT 17434, 18744 y 18748, empleando el inoculante mejorado *Bradyrhizobium* CIAT 3101 (BS), y una mezcla de cepas nativas (NS) de un suelo de Veracruz, México. Como plantas de referencia, se usaron la leguminosa no-nodulante *Arachis hypogaea*, y las gramíneas forrajeras *Brachiaria arrecta*, *Brachiaria brizantha* y *Cynodon nlemfuensis*. El experimento se estableció en condiciones de invernadero, y se realizaron cinco muestreos. Los rendimientos más altos de materia seca se lograron con los ecotipos inoculados con BS (98.3 ± 10.0 g maceta<sup>-1</sup>) vs plantas con NS (19.9 ± 1.4 g maceta<sup>-1</sup>). Los valores de δ (delta) N<sup>15</sup> en los ecotipos 17434, 18744 y 18748 fueron, 8.4, 5.7, 7.7 ‰; y 1.2, 1.0 y 3.5 ‰ para NS y BS, revelando estos últimos una mayor dependencia del N<sub>2</sub> para crecer. Todas las plantas de referencia mostraron efectos positivos de BS sobre el porcentaje de N<sub>2</sub> fijado: 92.7 ± 1.8 vs 6.5 ± 7.6 con ecotipos inoculados con NS. Se concluyó que el N<sub>2</sub> fijado fue altamente dependiente de la cepa de *Rhizobium*, y *Bradyrhizobium* CIAT 3101 fue más eficiente para fijar N<sub>2</sub>. Los ecotipos *Arachis pintoi* CIAT 17434 y 18744 mostraron los más altos valores de fijación de N<sub>2</sub>. *Arachis hypogaea* destacó como planta de referencia debido a su patrón de crecimiento similar a *Arachis pintoi*.

**PALABRAS CLAVE:** *Arachis pintoi*, Plantas de referencia, *Bradyrhizobium*, Abundancia natural de N<sup>15</sup>.

### ABSTRACT

The percentage of nitrogen derived from N<sub>2</sub> fixation was measured by the <sup>15</sup>N natural abundance method, in three *Arachis pintoi* (Ap) ecotypes: CIAT 17434, 18744 and 18748, using an improved *Bradyrhizobium* strain CIAT 3101 (BS), and a mixing of native strains (NS). As reference plants, a non-nodulating *Arachis hypogaea*, *Brachiaria arrecta*, *B. brizantha* and *Cynodon nlemfuensis* were used. The experiment was set up under greenhouse conditions, and five harvests were done. Dry matter yield was highest in Ap ecotypes and BS (98.3 ± 10.0 g pot<sup>-1</sup>), vs plants with NS (19.9 ± 1.4 g pot<sup>-1</sup>). Values of δ (delta) <sup>15</sup>N in the ecotypes 17434, 18744 and 18748 were, 8.4, 5.7, 7.7 ‰, and 1.2, 1.0 and 3.5 ‰ for NS and BS, revealing for the later group more N<sub>2</sub> dependence to grow. All reference plants showed positive effects of the BS on the percentage of N<sub>2</sub> fixed: 92.7 ± 1.8 vs 6.5 ± 7.6 with ecotypes inoculated with NS. It was concluded that the N<sub>2</sub> fixed was highly dependent of the *Rhizobium* strain, and *Bradyrhizobium* CIAT 3101 strain was more efficient to fix N<sub>2</sub>. The *Arachis pintoi* ecotypes CIAT 17434 and 18744 showed the highest N<sub>2</sub> fixing values. *A. hypogaea* highlighted as reference plant considering its growth pattern similar to *A. pintoi*.

**KEY WORDS:** *Arachis pintoi*, Reference plants, *Bradyrhizobium* strain, <sup>15</sup>N natural abundance method.

### INTRODUCCIÓN

Las sabanas neo tropicales de América del Sur cubren alrededor de 250 millones de hectáreas, y

### INTRODUCTION

The neotropical savannas of South America cover about 250 million of hectares, and are connected

Recibido el 21 de abril de 2009. Aceptado para su publicación el 27 de octubre de 2009.

<sup>a</sup> Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Martínez de la Torre, Veracruz, 93600, México. Teléfono: +232 32 43941; braulio\_36@hotmail.com. Correspondencia al primer autor.

<sup>b</sup> Institute of Plant Production and Agroecology in the Tropics and Subtropics, University of Hohenheim, cadisch@uni-hohenheim.de.

se encuentran asociadas con otros importantes biomas como la cuenca del Amazonas y la región del Chaco en Bolivia, Paraguay y Argentina<sup>(1)</sup>. Las pasturas tropicales en esta región se encuentran sujetas a deterioro y degradación debido, entre otras causas, al sobrepastoreo y la subsecuente erosión del suelo, deficiencias minerales (principalmente N y P), y por la presencia de plagas y enfermedades<sup>(2)</sup>.

Desde hace muchos años, se ha propuesto en áreas tropicales, el uso de leguminosas fijadoras de N<sub>2</sub> para mejorar la fertilidad del suelo y en consecuencia la productividad de las pasturas<sup>(3)</sup>, ya que la fijación biológica de nitrógeno (N<sub>2</sub>) constituye una fuente gratuita de N, las leguminosas forrajeras tropicales representan una manera económica de disponer de N para el sistema suelo-planta-animal. Este aporte de N al sistema puede ser directo (N<sub>2</sub> fijado en granos cosechados, o en pastoreo por el ganado) o indirecto (N proveniente de la descomposición de los residuos vegetales). Sin embargo, los beneficios al sistema no son, en muchos casos, inmediatos, ya que se requiere mejorar otros factores complementarios tales como la presencia de cepas efectivas de *Bradyrhizobium*<sup>(4)</sup>, y la selección de leguminosas persistentes, para lograr los beneficios deseados<sup>(5)</sup>.

Ninguno de los métodos actualmente disponibles, determina el N simbióticamente fijado sin introducir algún error inherente al método, y se ha mencionado que no existe una manera fácil de medir la fijación de N<sub>2</sub>, además de que debe considerarse cuidadosamente el diseño experimental, ya sea para lograr mediciones precisas o para realizar determinaciones comparativas<sup>(3)</sup>. Los métodos de abundancia natural de N<sup>15</sup> y de dilución de N<sup>15</sup> han sido aplicados para estimar la proporción de N derivado de la fijación de N<sub>2</sub> en leguminosas forrajeras.

La abundancia natural de N<sup>15</sup> es un método basado en pequeñas diferencias entre el N<sub>2</sub> atmosférico (0.3663% de átomos N<sup>15</sup>) y el N del suelo. Considerando que el N del suelo es generalmente más abundante en N<sup>15</sup> que el N<sub>2</sub> atmosférico, se espera que plantas no-fijadoras de N, en las cuales la fuente primaria de este elemento es el suelo,

with other important biomes such as the Amazon basin and the Chaco region of Bolivia, Paraguay and Argentina<sup>(1)</sup>. Tropical grasslands in this region are subject to deterioration and degradation due to a number of causes including overgrazing and subsequent soil erosion, mineral deficiencies (mainly N and P), and attacks of pests and diseases<sup>(2)</sup>.

The use of legumes as N<sub>2</sub> fixers to improve soil fertility and consequently pasture productivity on tropical areas has been proposed since many years<sup>(3)</sup>. As biological atmospheric nitrogen (N<sub>2</sub>) fixation is a “free” source of N, tropical forage legumes are an economic way to provide N to the soil-plant-animal system. This input of N into the system can be direct (N<sub>2</sub> fixed in harvested grain or grazed by animals) or indirect (adding N to the soil through decomposing residues). However, the benefits to the system are, in many cases, not immediate as it is required to improve other complementary factors such as the presence of effective *Bradyrhizobium* strains<sup>(4)</sup> and the choice of persistent legumes in order to achieve the desired benefits<sup>(5)</sup>.

No method currently available can generally determine the amounts of N symbiotically fixed without introducing some error inherent to the method, and mentioned that there is no simple way to measure N<sub>2</sub>-fixation, and careful consideration should be given in designing experiments as to whether accurate measurements of N<sub>2</sub>-fixation or comparative assessments of N<sub>2</sub>-fixed are required<sup>(3)</sup>. <sup>15</sup>N dilution and <sup>15</sup>N natural abundance methods have been applied to estimate the proportion of N derived from N<sub>2</sub> fixation over a growth period of pasture legumes.

The natural <sup>15</sup>N abundance method is based on small differences between atmospheric N<sub>2</sub> (0.3663% atoms <sup>15</sup>N) and the soil N. Considering that soil N is generally more abundant in <sup>15</sup>N than the atmospheric N<sub>2</sub>, it would be expected that the non-fixing plants in which the primary N source is that derived from the soil, would have more <sup>15</sup>N than the fixing plants which take N<sub>2</sub> from the atmosphere and the soil. The accuracy of the N<sub>2</sub>-fixed with this method is affected by the degree and uniformity of the <sup>15</sup>N abundance in the soil where the pastures

deberían tener más N<sup>15</sup> que plantas fijadoras que toman el N<sub>2</sub> de la atmósfera y del suelo. La precisión con este método para el N<sub>2</sub> fijado, se ve afectado por el grado y uniformidad de la abundancia de N<sup>15</sup> en suelos con pasturas. Algunos autores han sugerido una escala mínima de enriquecimiento entre 2 a 7 ‰ (delta) unidades de N<sup>15</sup>(6).

La contribución de leguminosas mejoradas como componente forrajero es más importante cuando éstas se asocian con gramíneas, ya que se benefician del N fijado por las primeras(7). En años recientes, se han evaluado nuevas leguminosas forrajeras tropicales para mejorar la productividad y calidad de las pasturas. Algunos de estos géneros son (en orden alfabético) *Arachis*, *Centrosema*, *Desmodium*, *Mucuna* y *Stylosanthes*. Resultados de investigaciones en zonas cálidas y húmedas de México y otras partes de América Latina han mostrado que la leguminosa forrajera *Arachis pintoi* CIAT 17434 es un buen prospecto para asociarlo a gramíneas, debido a su mejor persistencia en el terreno y también por su alto valor nutritivo y palatabilidad(8,9,10).

Con el fin de determinar su valor e idoneidad en el mejoramiento de los sistemas de producción animal en el trópico, y en el mantenimiento o mejoramiento de los niveles de N en el suelo, es importante la cuantificación precisa del N<sub>2</sub> que puede ser simbióticamente fijado por estas leguminosas(11). La cepa de *Bradyrhizobium* CIAT 3101 se ha identificado como una cepa exitosa para inocular ecotipos de *A. pintoi*(12,13). Sin embargo, en el caso de cepas nativas de *Rhizobium*, y de acuerdo con varias experiencias(13-16), a la fecha es aun desconocido su papel para promover nodulaciones efectivas. Existe, en suelos tropicales, una gran diversidad de cepas nativas que pueden fijar N<sub>2</sub> requerido por cultivos de leguminosas, o para proporcionar nuevos aislamientos a fin de producir inoculantes efectivos(17).

Los objetivos de este estudio fueron, cuantificar la contribución de la fijación biológica de nitrógeno (FBN) por tres ecotipos de *Arachis pintoi*, empleando la técnica de abundancia natural de N<sup>15</sup>,

are growing. Some authors have suggested minimal soil enrichment ranged between 2 to 7 ‰ (delta) <sup>15</sup>N units(6).

The contribution of improved legumes as a forage component is more important when grown associated with grasses, because these take advantage of the N fixed by the legume(7). In recent years several new tropical forage legumes have been tested to improve pasture productivity and quality. Some of these genera are (in alphabetical order) *Arachis*, *Centrosema*, *Desmodium*, *Mucuna*, *Stylosanthes*. Research results from the hot humid areas of México and from other parts of Latin America showed that the forage legume *Arachis pintoi* CIAT 17434 is a good prospect to associate with grasses, because it shows better persistence than other legumes and also has high nutritive value and palatability(8,9,10).

An accurate quantification of the N<sub>2</sub> that can be symbiotically fixed by these legumes is important to determine their value and suitability in improving tropical animal production systems and maintaining or improving N levels in the soil(11). The *Bradyrhizobium* strain CIAT 3101 has been identified as a successful strain to inoculate *A. pintoi* ecotypes(12,13). However, in the case of native *Rhizobium* strains, their role to promote an effective nodulation is at date undefined according to several experiences(13-16). In tropical soils there is a great diversity of native strains that could fix N<sub>2</sub> required by legume crops or proportionate new isolates to produce effective inoculants(17).

The objectives of this study were to quantify the biological nitrogen fixation (BNF) contribution by three *Arachis pintoi* ecotypes, using the <sup>15</sup>N natural abundance technique, and to determine the most appropriate *Rhizobium* strain over the growth and N accumulation by the mentioned ecotypes.

Therefore, both improved and native strains were included in this experiment to gain experience about their potential to promote N<sub>2</sub> fixation.

## MATERIALS AND METHODS

The experiment was set up in the greenhouse at Imperial College at Wye, to assess N<sub>2</sub> fixation by

y determinar la cepa de *Rhizobium* más apropiada para el crecimiento y acumulación de N por los mencionados ecotipos.

Por lo anterior, se incluyeron en este experimento, cepas nativas e introducidas con el fin de adquirir experiencia acerca de su potencial para promover la fijación de N<sub>2</sub>.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se estableció en condiciones de invernadero en el Imperial College, Wye (Inglaterra), para determinar la fijación de N<sub>2</sub> por los ecotipos de *Arachis pintoi* CIAT 17434, 18744 y 18748 por el método de abundancia natural de N<sup>15</sup>, usando cuatro plantas de referencia: la leguminosa no-nodulante *Arachis hypogaea*, *Brachiaria arrecta*, *B. brizantha* y *Cynodon nlemfuensis*. Se usó un suelo del campo experimental de Wye College (condado de Kent), con un enriquecimiento en N<sup>15</sup> similar (7.5 ‰) a los suelos de Veracruz, México (7.7 ‰). El suelo se combinó con 1/3 de arena, y se caracterizó por un pH de 6.8, N total de 0.38% y δ N<sup>15</sup> de 7.5 ‰. Los valores de Ca, K y Mg fueron de 16.5, 0.8 y 0.9 cmol (+)/kg suelo; y de P, 30.9 m/g suelo, y un contenido de 11, 19, 24 y 46 % para arcilla, limo, arena fina y arena gruesa, respectivamente; clasificado como franco-arenoso. El suelo fue secado al aire y tamizado en malla de 2 mm.

Para los tres ecotipos de *Arachis pintoi*, *A. hypogaea* y *B. brizantha*, se empleó semilla esterilizada; y para las restantes especies se usó material vegetativo (estolones). Las semillas y estolones se sembraron en macetas esterilizadas (17.5 x 17.5 x 12.5 cm, 2 kg de la mezcla suelo-arena), y después de la emergencia de las plántulas, se dejaron sólo dos de ellas por maceta.

Después de la germinación, los ecotipos de *Arachis pintoi* fueron inoculados con la cepa de *Bradyrhizobium* CIAT 3101 (19 x 10<sup>7</sup> células maceta<sup>-1</sup>) o con una solución de suelo (1:5 suelo/agua destilada), mezcla de cepas nativas preparada de un suelo de Veracruz, México, con vegetación nativa. Al interior del invernadero, y durante todo

the *Arachis pintoi* ecotypes CIAT 17434, 18744 and 18748 by the natural <sup>15</sup>N abundance method, using four reference plants: a non-nodulating *Arachis hypogaea*, *Brachiaria arrecta*, *B. brizantha* and *Cynodon nlemfuensis*. A soil from Wye College Estate (Kent County, U.K.) was selected for the experiment based mainly on a similar δ <sup>15</sup>N enrichment (7.5 ‰) compared to native soils from Veracruz, Mexico (7.7 ‰). The soil, combined with 1/3 of sand was characterized by a pH of 6.8, total N % of 0.38, δ <sup>15</sup>N of 7.5 ‰, values of Ca, K and Mg were 16.5, 0.8 and 0.9 cmol (+)/kg soil, P 30.9 m/g soil, and a content of 11, 19, 24 and 46 % for clay, silt, fine and coarse sand, respectively; and classified as sandy loam. The soil was air dried and sieved through a 2 mm sieve.

Sterilized seeds of the three cultivars of *Arachis pintoi*, *A. hypogaea* and *B. brizantha* were available and vegetative materials (stolons) for the remainder species were collected from plant stock materials. Plants were sown in sterilized pots (17.5 x 17.5 x 12.5 cm, 2 kg of a sand-soil mixture) and after seedling emergence, these were thinned to leave two plants per pot.

After germination, *Arachis pintoi* ecotypes were inoculated with the *Bradyrhizobium* strain CIAT 3101 (19 x 10<sup>7</sup> cells pot<sup>-1</sup>) or with a soil solution (1:5 soil/distilled water) mixture of native strains prepared from a soil of Veracruz, Mexico, under native vegetation. Inside greenhouse, temperature and air humidity were around 26 °C and 70 %, respectively, throughout the entire experiment.

Nineteen days after planting of legumes and reference plants, were treated with an N-free nutrient solution twice a week at a volume of 200 ml week<sup>-1</sup>. Also, additionally 0.5 ml L<sup>-1</sup> of a micronutrients-stock solution was included at same frequency. In between the pots were watered at field capacity with deionised water.

Five harvests for dry matter yield of shoots on legumes and grasses were done every 73 d. The first harvest was 53 d after sown seeds, which was sufficient time for plants to nodulate and start to

el experimento, la temperatura y humedad del aire fueron de 26 °C y 70 %, respectivamente.

Diecinueve días después de la siembra, las leguminosas y las plantas de referencia se trataron con una solución nutritiva, dos veces por semana, a un volumen de 200 ml semana<sup>-1</sup>. Adicionalmente, y a la misma frecuencia, se añadió una solución de 0.5 ml L<sup>-1</sup> de micro-nutrientes. Cuando se requería, las plantas fueron regadas a su capacidad de campo con agua deionizada.

Se realizaron cinco cortes (tallos y hojas) tanto en leguminosas como en gramíneas, estimándose su materia seca, a una frecuencia en promedio de 73 días; pero el primer corte fue a los 53 días, tiempo que se consideró suficiente para que las plantas nodularan y empezaran a fijar N<sub>2</sub>. El periodo experimental, incluyendo el tiempo de establecimiento (53 días) fue de 345 días. No se realizó corte de uniformización. El material cosechado se secó a 40 °C en estufa de aire forzado, pesado y molido con malla fina (<1 mm), usando un molino de martillos. Se tomaron sub-muestras, las cuales fueron pesadas, colocadas en cápsulas y analizadas por duplicado para N% y δ N<sup>15</sup> 0/00, usando un espectrómetro de masas (Europa Scientific 20-20, Crewe, UK) acoplado a un analizador C/N (Roboprep).

La proporción del N total atmosférico derivado de la fijación (%Ndfa) por las leguminosas se calculó usando la siguiente ecuación<sup>(3)</sup>:

$$\%Ndfa = \frac{\delta N^{15} \text{ ref} - \delta N^{15} \text{ leg} \times 100}{\delta N^{15} \text{ ref} - B}$$

Donde *B* es el valor de δ N<sup>15</sup> de la leguminosa que crece con N<sub>2</sub> atmosférico como la única fuente de nitrógeno, δ N<sup>15</sup> ref y δ N<sup>15</sup> leg son las unidades δ N<sup>15</sup> (0/00) para la planta de referencia y leguminosa, respectivamente. Se emplearon valores de *B* de los tallos y hojas correspondiente a cada ecotipo (plantas maduras). Para los ecotipos 17434, 18744 y 18748 inoculados con cepas nativas estos valores fueron (0/00), 1.11, 1.54 y 0.61; mientras que para los ecotipos con la cepa de *Bradyrhizobium* CIAT 3101, los valores de *B*, calculados de un

fix N<sub>2</sub>. The experiment period, including the establishment period (53 d) was of 345 d. No uniformization harvest was done. Plant material was dried at 40 °C in a forced-air oven, weighed and ground to a fine powder (<1 mm) using a micro hammer mill. Ground samples were sub-sampled, weighed into tin capsules and analyzed, in duplicate, for %N and δ <sup>15</sup>N 0/00 using a stable isotope mass spectrometer (Europa Scientific 20-20, Crewe, UK), coupled to a C/N analyzer (Roboprep).

The proportion of total atmospheric N derived from fixation (%Ndfa) by the legumes was calculated using the following equation<sup>(3)</sup>:

$$\%Ndfa = \frac{\delta^{15}N \text{ ref} - \delta^{15}N \text{ leg} \times 100}{\delta^{15}N \text{ ref} - B}$$

where *B* is the δ <sup>15</sup>N of the legume grown with atmospheric N<sub>2</sub> as the only N source, δ <sup>15</sup>N ref and δ <sup>15</sup>N leg are the δ <sup>15</sup>N units (0/00) for reference plant and legume, respectively. *B*-values of shoots corresponding to each ecotype (mature plants) were used. For ecotypes 17434, 18744 and 18748 inoculated with native strains these values were (0/00) 1.11, 1.54 and 0.61; while for ecotypes with *Bradyrhizobium* strain CIAT 3101, the *B*-values, calculated from a previous experiment, were 0.08, - 0.18 and -0.29, respectively.

A randomized experimental design with a split-plot design with strains as main plots, and legumes and reference plants as sub-plots, replicated four times (pots). Data were analyzed by analysis of variance and treatment differences established by least significant difference at *P*≤0.01 using the statistic program GenStat<sup>(18)</sup>.

## RESULTS AND DISCUSSION

### *Dry matter yield (DMY)*

Results of DMY were consistently higher for ecotypes inoculated with the improved *Bradyrhizobium* strain CIAT 3101 (*P*<0.01) compared with native strains (Table 1). Since the second harvest onwards, DMY was always higher

experimento previo, fueron ( $^{0}/_{00}$ ) 0.08, - 0.18 y -0.29, respectivamente.

Se empleó un diseño completamente al azar, en parcelas divididas, con las cepas como parcelas principales, y las leguminosas y plantas de referencia como sub-parcelas, repetidas cuatro veces (macetas). Los datos fueron sometidos a análisis de varianza, y las diferencias entre tratamientos se determinaron por diferencia mínima significativa al nivel de  $P \leq 0.01$ , usando el programa estadístico GenStat<sup>(18)</sup>.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### *Rendimiento de materia seca (RMS)*

Los resultados de RMS fueron consistentes para los ecotipos con la cepa de *Bradyrhizobium* CIAT 3101 ( $P < 0.01$ ), comparados con las cepas nativas (Cuadro 1). Desde el segundo corte, el RMS fue siempre superior ( $P < 0.01$ ) para los ecotipos inoculados con la cepa 3101. En promedio, las leguminosas con cepas nativas produjeron sólo 14 % ( $4.0 \pm 0.79$  g maceta<sup>-1</sup>) del forraje producido por el otro grupo ( $28.6 \pm 4.5$  g maceta<sup>-1</sup>).

Considerando los grupos inoculados con la cepa CIAT 3101, el segundo y tercer corte mostraron un incremento significativo, probablemente debido a un mejoramiento de las condiciones ambientales y al largo del periodo de crecimiento. Se encontraron diferencias altamente significativas para las interacciones cepa/corte y ecotipo/corte. Los ecotipos de *Arachis pintoi* 17434 y 18744 inoculados con esta cepa mejorada, mostraron el más alto RMS acumulado, con  $152.0 \pm 4.3$  y  $162.5 \pm 4.8$  g maceta<sup>-1</sup>, respectivamente, y fueron diferentes ( $P < 0.01$ ) al ecotipo 18748 que promedió  $113.8 \pm 12.8$  g maceta<sup>-1</sup>. No se encontró una explicación a este comportamiento, considerando que todos fueron tratados con la misma cepa.

La ausencia de diferencias en RMS por efecto de las cepas al primer corte pudo deberse a una alta disponibilidad de N mineral durante las primeras semanas del experimento. Posteriormente, las diferencias fueron más evidentes a favor de las leguminosas con la cepa CIAT 3101.

( $P < 0.01$ ) for ecotypes inoculated with the strain CIAT 3101. On average, legumes with native strains yielded only 14 % ( $4.0 \pm 0.79$  g pot<sup>-1</sup>) of the herbage produced by the other group ( $28.6 \pm 4.5$  g pot<sup>-1</sup>).

Considering the groups with the strain CIAT 3101, the second and third harvest shown a significant increase, probably due to improved environmental conditions and length of growth period. Highly statistical differences were found also for interactions strain/harvest and ecotype/harvest. *Arachis pintoi* 17434 and 18744 inoculated with this improved strain, showed the highest cumulative DMY with  $152.0 \pm 4.3$  and  $162.5 \pm 4.8$  g pot<sup>-1</sup>, respectively and they were different ( $P < 0.01$ ) to the ecotype 18748 that averaged  $113.8 \pm 12.8$  g pot<sup>-1</sup>. There is not explanation to this performance considering that ecotypes were treated with the same strain.

The lack of difference in DMY between strains at the first harvest could be due to the availability of considerable amounts of mineral N during the first weeks of the experiment. After this, differences were more evident favoring to legumes with strain CIAT 3101.

Experimental evidences have been reported on the positive or negative effect of the improved

Cuadro 1. Rendimiento de materia seca de tres ecotipos de *Arachis pintoi* en cinco cortes y dos inoculantes (g maceta<sup>-1</sup>)

Table 1. Dry matter yield of three ecotypes of *Arachis pintoi* over five harvests and two inoculants (g pot<sup>-1</sup>)

Harvest	Inoculants		Average harvest/strain
	Native strain	CIAT 3101	
1	3.7 <sup>a</sup> (0.2)	3.7 <sup>a</sup> (0.3)	3.7 <sup>d</sup> (0.17)
2	5.0 <sup>b</sup> (0.6)	16.5 <sup>a</sup> (1.4)	10.7 <sup>c</sup> (1.4)
3	4.3 <sup>b</sup> (0.5)	46.5 <sup>a</sup> (5.2)	25.4 <sup>a</sup> (5.0)
4	2.9 <sup>b</sup> (0.3)	34.7 <sup>a</sup> (2.5)	18.8 <sup>b</sup> (3.5)
5	4.3 <sup>b</sup> (0.2)	41.4 <sup>a</sup> (1.5)	22.8 <sup>a</sup> (3.9)
1-5	20.2 <sup>b</sup> (2.2)	142.8 <sup>a</sup> (14.8)	81.5 (13.2)

abcd Means with same letters within column or row are not different ( $P < 0.01$ ).

Figures in brackets are standard errors of difference.

Se han reportado evidencias experimentales de la cepa mejorada *Bradyrhizobium* CIAT 3101, tanto sobre efectos positivos como negativos, en el rendimiento de materia seca de leguminosas. En Costa Rica, Villarreal y Vargas<sup>(19)</sup> usaron la misma cepa y los mismos ecotipos de *Arachis pintoi*, pero no encontraron una respuesta a la inoculación.

La presencia de cepas nativas efectivas y competitivas, o una alta disponibilidad de N mineral del suelo para las plantas, podría ser la razón para explicar esta falta de respuesta. Como aquí se observó, al final, el ecotipo 18744 fue el más productivo (644 g m<sup>2</sup>).

En Carimagua, Colombia, en suelos no perturbados, se evaluaron 31 cepas de *Bradyrhizobium* en kudzú (*Pueraria phaseoloides*), incluyendo la cepa mejorada CIAT 3101. Con esta cepa, la leguminosa produjo 49.7 mg of N planta<sup>-1</sup>, valor que fue similar al más alto obtenido con la que se consideró la mejor cepa (CIAT 3221) evaluada (54.7 mg of N planta<sup>-1</sup>)<sup>(20)</sup>.

En Brasil, y en condiciones de invernadero, se probó el efecto de 11 cepas mejoradas de *Bradyrhizobium*, así como de cepas nativas, comparándolas con plantas fertilizadas con N mineral, sobre la nodulación y RMS en *Arachis pintoi*. Noventa días después de la siembra, se encontró que la cepa CIAT 3101, fue estadísticamente comparable a los tratamientos con fertilizante nitrogenado, en términos de RMS y nodulación<sup>(14)</sup>. Otras referencias han destacado el papel de esta cepa para promover altos rendimientos de materia seca. También en Brasil, en un experimento donde se evaluaron 48 cepas, CIAT 3101 tuvo efectos positivos en RMS, N (%) y N total en *Arachis pintoi* CIAT 17434 y en el ecotipo BRA 031143, comparados con un tratamiento que incluía N mineral<sup>(12)</sup>.

#### *Rendimiento de N considerando las cepas de Rhizobium*

El N producido por las leguminosas inoculadas con la cepa CIAT 3101, fue claramente mayor que el N de las leguminosas con cepas nativas (Cuadro 2). Las cantidades acumuladas de N fueron diferentes ( $P < 0.01$ ) entre estos dos grupos. Por

*Bradyrhizobium* strain CIAT 3101 on legume dry matter yield. In Costa Rica, Villarreal and Vargas<sup>(19)</sup> using the same strain and same *Arachis pintoi* ecotypes, did not find response to inoculation.

The presence of effective and competitive native strains and/or high availability of soil mineral N to plants could be the reason for this lack of response. At the end, the ecotype 18744 was the most productive (664 g m<sup>2</sup>) as we observed here.

In undisturbed soil cores from Carimagua, Colombia, were evaluated 31 *Bradyrhizobium* strains in kudzú (*Pueraria phaseoloides*) including the improved strain CIAT 3101. With this strain the legume yielded 49.7 mg of N plant<sup>-1</sup> which was similar to the highest value obtained with the best strain (CIAT 3221) evaluated (54.7 mg of N plant<sup>-1</sup>)<sup>(20)</sup>.

In Brazil, under greenhouse conditions, was tested the effect of 11 improved *Bradyrhizobium* strains as well as native strains compared with plants fertilized with mineral N on nodulation and DMY on *Arachis pintoi*. Ninety days after planting they found that the strain CIAT 3101 was statistically comparable to N fertilized treatments in terms of DMY and nodulation<sup>(14)</sup>. Other references had highlighted the role of this strain to promote high dry matter yields. In Brazil, in an experiment where were tested 48 strains, the strain CIAT 3101 has a positive effect on dry matter yield, N (%) and total N on *Arachis pintoi* 17434 and the ecotype BRA 031143, compared to an N-mineral treatment<sup>(12)</sup>.

#### *N yield considering Rhizobium strains*

The N produced by the legumes inoculated with the strain CIAT 3101 was clearly larger than the N from legumes with native strains (Table 2). The cumulative amounts of N were different ( $P < 0.01$ ) between these groups. By harvest, ecotypes with native strains accumulated only at the first harvest large amount of N, but after that the N yield declined to a range of 48 to 71 mg N pot<sup>-1</sup>. By contrast, ecotypes with strain CIAT 3101 showed an increasing from the first to the fifth harvest.

The N yield in the case of ecotypes with native strains showed a pattern of decreasing yield after

corte, los ecotipos con cepas nativas acumularon una mayor cantidad de N sólo al primer corte, pero después de éste, declinó a un rango de 48 a 71 mg N maceta<sup>-1</sup>. En contraste, los ecotipos con la cepa CIAT 3101 mostraron un incremento desde el primero al quinto corte.

La producción de N, en el caso de los ecotipos con cepas nativas, mostró un patrón de disminución después del primer corte, probablemente debido a que las leguminosas usaron el N de sus semillas, así como el N mineral disponible, después de alterar el suelo al momento de la siembra, evitando, en los subsecuentes cortes, un crecimiento más vigoroso, o debido a la presencia de cepas nativas ineficientes en el suelo. Una tendencia opuesta se observó en los ecotipos con la cepa CIAT 3101.

Estos resultados concuerdan con Pinto *et al.*<sup>(14)</sup> en Brasil, quienes observaron en condiciones de invernadero, que *Arachis pintoi* tuvo un alto rendimiento de N cuando se inoculó con la misma cepa; en contraste, el rendimiento de N con cepas nativas fue muy pobre. Otros investigadores, en un experimento con jarras de Leonard, encontraron que la cepa mejorada CIAT 3101 tuvo un rendimiento de N significativamente más bajo al infectar plantas de *P. phaseoloides*<sup>(20)</sup>.

#### Rendimiento de N en plantas de referencia

El rendimiento de N en las gramíneas fue estadísticamente similar entre ellas y mayor que en la leguminosa no-nodulante ( $P < 0.01$ ; Cuadro 3); en promedio, las gramíneas produjeron 52 % más N que *Arachis hypogaea* durante todo el experimento. Después del segundo corte, el rendimiento de N en *B. arrecta* y *C. nlemfuensis* tendió a disminuir. La producción de N por corte en las plantas de referencia mostró diferencias ( $P < 0.01$ ) entre ellos, y se produjeron 56 % más N en el segundo corte que en los restantes, los que en promedio produjeron 64.3 mg maceta<sup>-1</sup>.

Aunque el contenido de N en la leguminosa no-nodulante *A. hypogaea* fue más alto comparado con las gramíneas, su bajo rendimiento de materia seca no permitió cantidades significativas de N (Cuadro 3). Lo contrario se observó para las

Cuadro 2. Rendimiento de nitrógeno de tres ecotipos de *Arachis pintoi* en cinco cortes y dos inoculantes (mg maceta<sup>-1</sup>)

Table 2. Nitrogen yield of three ecotypes of *Arachis pintoi* over five harvests and two inoculants (mg pot<sup>-1</sup>)

Harvest	Inoculants		Average harvest/strain
	Native strain	CIAT 3101	
1	147 <sup>a</sup> (10.9)	143 <sup>a</sup> (10.4)	145 <sup>c</sup> (7.4)
2	48 <sup>b</sup> (8.0)	258 <sup>a</sup> (18.7)	153 <sup>c</sup> (24.1)
3	65 <sup>b</sup> (6.7)	958 <sup>a</sup> (126.2)	511 <sup>ab</sup> (111.7)
4	50 <sup>b</sup> (3.6)	885 <sup>a</sup> (63.5)	467 <sup>b</sup> (92.4)
5	71 <sup>b</sup> (2.6)	1269 <sup>a</sup> (56.8)	670 <sup>a</sup> (127.9)
1-5	381 <sup>b</sup> (18.2)	3513 <sup>a</sup> (174.8)	1947 (337.7)

abc Means with same letters within column or row are not different ( $P < 0.01$ ).

Figures in brackets are standard errors of difference.

the first harvest; probably because legumes used their seed N as well as the soil mineral N available after the disturbance of soil at planting time, avoiding this fact, a more vigorous growth during the subsequent harvests, or could be due to the presence of inefficient native strains in the soil. An opposite tendency was observed in the ecotypes with the strain CIAT 3101.

This result is in agreement with Pinto *et al.*<sup>(14)</sup> in Brazil. They observed under greenhouse conditions, that *Arachis pintoi* had high N yield when was inoculated with the same strain; by contrast, N yield with native strains was very poor. Other researchers found that the improved strain CIAT 3101 resulted in significantly lower N yield when used to infect *P. phaseoloides* plants in a Leonard' jars experiment<sup>(20)</sup>.

#### N yield of reference plants

The N yield of grasses was statistically similar among them and larger than the non-nodulating legume ( $P < 0.01$ ; Table 3). Here, on average grasses produced 52 % more N than *Arachis hypogaea* during the whole experiment. After the second harvest N yield of *B. arrecta* and *C. nlemfuensis* tended to decrease. The N yield by harvest of



Cuadro 3. Rendimiento de nitrógeno de cuatro plantas de referencia en cinco cortes usando el método de abundancia natural de N<sup>15</sup> (mg maceta-1)

Table 3. N yield of the four reference plants at five harvests using the 15N natural abundance method (mg pot-1)

Reference plants	Harvest					
	1	2	3	4	5	1 - 5
<i>A. hypogaea</i>	9	73	50	36	52	220 <sup>b</sup> (5.8)
<i>B. arrecta</i>	98	140	120	78	59	495 <sup>a</sup> (49.1)
<i>B. brizantha</i>	20	131	88	43	72	354 <sup>a</sup> (17.9)
<i>C. nlemfuensis</i>	85	115	92	72	54	417 <sup>a</sup> (29.4)
Average harvest	53 <sup>c</sup> (10.1)	115 <sup>a</sup> (7.8)	87 <sup>b</sup> (9.1)	57 <sup>c</sup> (6.9)	59 <sup>c</sup> (5.1)	372 (29.3)

abc Means in the same row or column followed by the same letter are not different ( $P < 0.01$ ).

Figures in brackets are standard errors of difference.

gramíneas. Estas últimas, aun con un pobre contenido de N (1.2 %) presentaron altos rendimientos de materia seca, con 1.7 veces más N que *A. hypogaea*. El rendimiento de N logrado en el primer corte por *A. hypogaea* y *B. brizantha* fue muy bajo debido a que estas plantas fueron sembradas con semillas, por lo que al inicio del experimento su crecimiento fue más lento. Estas cantidades de N, comparadas con otras experiencias, son bajas. Se ha informado que el pasto *Dichanthium aristatum* produjo en un rango de 1.14 a 1.56 mg N g suelo<sup>-1</sup> en un experimento donde se midió la tasa de N transferido por la leguminosa *Gliricidia sepium* a esta gramínea en un sistema silvopastoril<sup>(21)</sup>.

En el segundo corte, el alto rendimiento de N registrado, se debió probablemente a que las plantas tuvieron acceso a una alta disponibilidad de N del suelo después del periodo de establecimiento. Luego de este corte, la subsiguiente caída en el rendimiento de N se debió muy probablemente a que las gramíneas agotaron el N del suelo, limitando así su rendimiento de materia seca y contenido de N; sin embargo, no hay otras evidencias disponibles.

#### Valores de $\delta N^{15}$

Los valores de  $\delta N^{15}$ , expresados como partes por millón (‰) relativos a la composición de N<sup>15</sup> en el N<sub>2</sub> atmosférico, de hojas y tallos de los ecotipos de leguminosas, se presentan en la Figura 1. Se

reference plants shown differences ( $P < 0.01$ ) among them; and 56 % more N was produced at the second harvest than in the other harvests, that on average yielded 64.3 mg pot<sup>-1</sup>.

Although the N content of the non-nodulating *A. hypogaea* was higher compared with the grasses its low dry matter yield did not allow it to produce significant amounts of N (Table 3). The opposite was true for the grasses. These materials even with a low N content (1.2 %) produced high dry matter yields resulting in a production of 1.7 fold more N than the non-nodulating legume. The N yield obtained at the first harvest by *A. hypogaea* and *B. brizantha* was very low because these plants were sown from seeds, thus at the beginning of the experiment a slow growth occurred. These amounts of N are lower compared to other experiences. It has been reported that the grass *Dichanthium aristatum* yielded in a range of 1.14 to 1.56 mg N g soil<sup>-1</sup> in an experiment where was measured the rate of N transferred by the legume *Gliricidia sepium* to this grass in a silvopastoral system<sup>(21)</sup>.

At the second harvest the high N yield registered was probably because the plants had still access to a high availability of soil mineral N after the establishment period. The subsequent decrease of N yield observed after this harvest was very probably because grasses exhausted the soil N pool, limiting their dry matter yield as well as their N content. However, there are not evidences for this matter.

encontraron claras diferencias entre los dos grupos inoculados, las cuales fueron más evidentes a partir del segundo corte ( $P < 0.01$ ). Los promedios para cada grupo, a lo largo de todo el experimento fueron,  $7.2 \pm 0.52 ‰$  y  $1.9 \pm 0.84 ‰$  para las cepas nativas y mejorada, respectivamente. En todos los casos, los valores más bajos se registraron en el último corte con  $6.2 \pm 0.18 ‰$  y  $-0.11 \pm 0.08 ‰$  para las cepas nativas y mejorada, respectivamente.

Los valores más bajos de  $\delta N^{15}$  en hojas y tallos se encontraron en las leguminosas con la cepa mejorada de *Bradyrhizobium*, en comparación con el grupo de *Rhizobium* nativo. En las primeras, fue más evidente que desde el segundo corte y hasta el final del experimento tendieron hacia valores negativos, indicando una substancial dilución del  $N^{15}$  con valores más cercanos al  $N_2$  atmosférico, lo cual reveló una mayor dependencia de las plantas por esta fuente de N para su crecimiento. Los valores de  $\delta N^{15}$  en tallos y hojas pueden variar de acuerdo a la leguminosa, tejido o cepa de *Rhizobium*.

Boddey *et al.*<sup>(11)</sup> informaron de variaciones en los valores de  $\delta N^{15}$  conforme pasaba el tiempo, en la leguminosa arborea no-nodulante *Senna spectabilis* en crecimiento al lado de parcelas (separados por 0.5 m) con árboles fijadores de  $N_2$  como *Calliandra calothyrsus*, *Gliricidia sepium* y *Codariocalyx gyroides*. Los promedios para los árboles fijadores, a 52, 65, 91 y 104 semanas post-siembra, fueron de: 4.07 4.17 4.12 y 3.63 ‰, respectivamente. Este comportamiento es similar al del presente experimento, donde, a través del tiempo, se observó una disminución en los valores de  $\delta N^{15}$ . En Brasil, Behling-Miranda *et al.*<sup>(22)</sup> determinaron la fijación de  $N_2$  en siete accesiones de *Arachis* usando como plantas de referencia a *Panicum maximum* cv Massai, *P. repens*, y las especies invasoras *Solanum viarum*, *Sonchus* spp y *Sida rhombifolia*. Ellos encontraron que las accesiones de *Arachis* presentaron una disminución en los valores de  $\delta N^{15}$  (promedio de  $1.97 ‰$ ) en comparación con las plantas testigo ( $6.99 ‰$ ). Esta última cifra sugirió que el N del suelo se enriqueció con  $\delta N^{15}$ , indicando también lo anterior, una mayor confianza en la técnica utilizada. Como sucedió en este experimento, las accesiones de

### Values of $\delta^{15}N$

Values of  $\delta^{15}N$ , expressed as parts by thousand (‰) relative to the composition of  $^{15}N$  in the atmospheric  $N_2$ , in legume shoots of ecotypes are shown on the Figure 1. There were clear differences between the two inoculated groups, and from the second harvest onwards were more evident ( $P < 0.01$ ). The average values for each group throughout the whole experiment were  $7.2 \pm 0.52 ‰$  and  $1.9 \pm 0.84 ‰$  for native and improved strain, respectively. In all cases lower values were recorded at the last harvest with  $6.2 \pm 0.18 ‰$  and  $-0.11 \pm 0.08 ‰$  for native and improved strain, respectively.

The lowest shoot  $\delta^{15}N$  values were found in legumes inoculated with the improved *Bradyrhizobium* strain, compared with the group of “native *Rhizobium* strains”, which was more evident since the second harvest reaching negative values at the end of the experiment. This indicated a substantial  $^{15}N$  dilution through  $N_2$  fixation and were more close to the atmospheric  $N_2$ , revealing more dependence of the plants for this source of N to grow. Signatures of

Figura 1. Valores de delta N15 (‰) en la parte aérea de tres ecotipos de *Arachis pintoi* (CIAT 17434, CIAT 18744 y CIAT 18748) inoculados con dos cepas de *Bradyrhizobium* en cinco cortes

Figure 1. Signatures of delta 15N (‰) of shoots of three ecotypes of *Arachis pintoi* (CIAT 17434, CIAT 18744 and CIAT 18748) inoculated with two *Bradyrhizobium* strains at five harvests

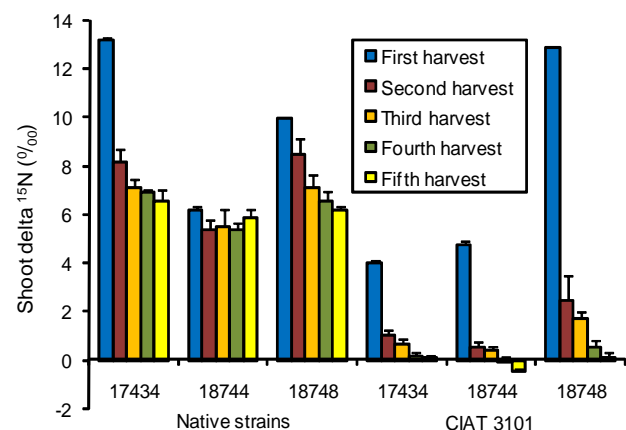
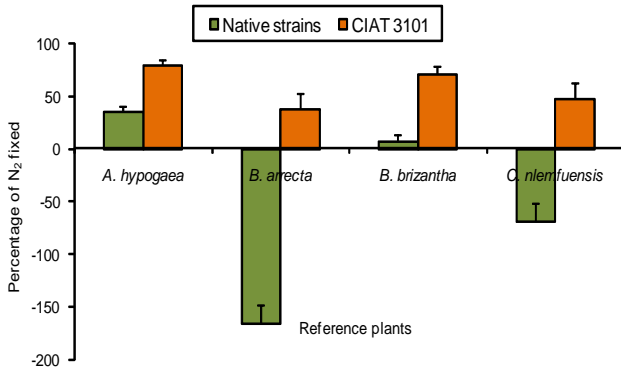


Figura 2. Porcentaje de N<sub>2</sub> fijado por *Arachis pintoi* (promedio de tres ecotipos usando cuatro diferentes plantas de referencia, por el método de abundancia natural de N<sup>15</sup>. Promedio de los cortes 1-2 (A) y 3-5 (B)

Figure 2. Percentage of N<sub>2</sub> fixed by *Arachis pintoi* (average of three ecotypes using four reference plants and applying the <sup>15</sup>N natural abundance method. Average of harvests 1st to 2nd (A) and 3rd to 5th (B)



Lines on top of bars are standard errors

*Arachis pintoi* inoculadas con la cepa mejorada registraron una caída en los valores de  $\delta$  N<sup>15</sup> conforme pasa el tiempo (Figura 1).

#### Porcentajes de N<sub>2</sub> fijado

En los primeros dos cortes, se registró una alta variabilidad en la fijación de N<sub>2</sub> (Figura 2), incluso con estimaciones negativas en ecotipos inoculados con la cepa nativa usando como plantas de referencia a *B. arrecta* y *C. nlemfuensis*. Sin embargo, desde el tercer corte hasta el final del experimento (Figura 3), todas las plantas de referencia presentaron un efecto positivo en el porcentaje de N<sub>2</sub> fijado, por efecto de la cepa mejorada:  $92.7 \pm 1.8$  %, en comparación con los ecotipos con cepas nativas ( $6.5 \pm 7.6$  %). Desde el tercer corte, los porcentajes de fijación de nitrógeno fueron altos independiente-mente de la planta de referencia usada. Para este grupo, no se encontraron diferencias estadísticas en la interacción planta-cepa.

El efecto de la cepa de *Bradyrhizobium* es evidente, independientemente del ecotipo de leguminosa, y las diferencias en el porcentaje de fijación de N<sub>2</sub>

$\delta$  <sup>15</sup>N in shoots could be variable according to the legume, tissue or type of *Rhizobium* strain.

Variations on  $\delta$  <sup>15</sup>N units over time have been reported by Boddey *et al*<sup>(11)</sup> in the non-nodulating legume tree *Senna spectabilis* growing on plots immediately alongside (within 0.5 m) to a N<sub>2</sub>-fixing trees *Calliandra calothyrsus*, *Gliricidia sepium* and *Codariocalyx gyroides*. Averages for the three fixing-legumes at 52, 65, 91 and 104 wk after planting, were: 4.07, 4.1, 4.12, and 3.63 ‰, respectively. This performance is similar to results of the present experiment, where reductions on  $\delta$  <sup>15</sup>N units over time were observed. In Brazil, Behling-Miranda *et al*<sup>(22)</sup> assessed the N<sub>2</sub> fixation of seven *Arachis* accessions using *Panicum maximum* cv Massai, *P. repens*, and the invasive plants *Solanum viarum*, *Sonchus* spp and *Sida rhombifolia* as reference plants. They found that accessions of *Arachis* spp showed a significant depletion on  $\delta$  <sup>15</sup>N units (average of 1.97 ‰) compared to control plants (6.99 ‰). This last value suggested that the soil N had, apparently, enrichment on  $\delta$  <sup>15</sup>N which increased the level of confidence of the used technique. As happened in this experiment, mainly with *Arachis pintoi* accessions inoculated with the improved strain, a depletion on  $\delta$  <sup>15</sup>N units were registered throughout the time (Figure 1).

#### Percentages of fixed N<sub>2</sub>

Large variability was found with N<sub>2</sub> fixation during the first two harvests (Figure 2) and negative N<sub>2</sub> fixation estimates resulted for the ecotypes inoculated with native strains using *B. arrecta* and *C. nlemfuensis* as reference plants. Since the third harvest until the end of the experiment (Figure 3) all reference plants showed the positive effect of the improved strain ( $P < 0.01$ ) on the percentage of N<sub>2</sub> fixed:  $92.7 \pm 1.8$  vs  $6.5 \pm 7.6$  with ecotypes inoculated with native strains. Since the third harvest, the percentage of N fixation was the highest, regardless of reference plant used. For this group no statistical differences were found for the interaction reference plant-strain.

The effect of the *Bradyrhizobium* strain is evident regardless of the legume ecotype, and differences

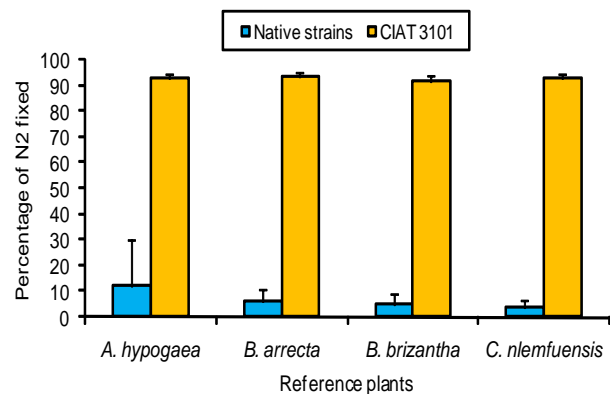
son considerables entre los dos grupos, promediando:  $21.6 \pm 3.2$  y  $86.2 \pm 2.4$  % ( $P < 0.01$ ), respectivamente. Los promedios de  $N_2$  (%) fijados por ecotipo (17434, 18744 y 18748), fueron, para cepas nativas: 8.8, 40.4 y 15.6 %; en tanto, para los ecotipos inoculados con la cepa mejorada de *Bradyrhizobium*, los valores fueron: 91.2, 89.5 y 78.0 %, respectivamente ( $P < 0.01$ ). Desde el primero al quinto corte, se encontró una tendencia de incremento en la fijación de  $N_2$  (%) para los ecotipos con la cepa mejorada, con promedios de  $63.1 \pm 11.7$ ,  $86.5 \pm 3.7$ ,  $84.6 \pm 3.1$ ,  $96.0 \pm 1.6$  y  $100.0 \pm 1.3$ , respectivamente. Por el contrario, la tendencia fue la opuesta para los ecotipos con cepas nativas (Figura 3). Esto puede explicarse por la ineficiencia en el establecimiento de una simbiosis efectiva, por parte de las cepas nativas de *Rhizobium* usadas aquí.

Los mejores resultados se obtuvieron con las leguminosas inoculadas con la cepa CIAT 3101, independientemente de la planta de referencia usada. Se ha encontrado que la cepa *Bradyrhizobium* CIAT 3101 mostró una alta eficiencia para fijar  $N_2$ , al compararla con 38 cepas nativas, donde la mitad de ellas presentaron baja efectividad o fueron inefectivas para fijar  $N_2$ <sup>(14)</sup>. En Veracruz, México, cepas nativas de *Rhizobium* provenientes de nódulos de la leguminosa arbórea *Gliricidia sepium* mostraron efectividad para fijar  $N_2$ , y varias de ellas registraron rendimientos altos de materia seca<sup>(15)</sup>.

Peoples *et al.*<sup>(23)</sup> no encontraron diferencias en la fijación de  $N_2$  por *A. hypogaea* al evaluar tres cepas de *Bradyrhizobium* (promedio de 101 kg ha<sup>-1</sup>) en comparación con cepas nativas (98 kg ha<sup>-1</sup>). Ellos atribuyeron esta falta de respuesta, a la presencia en el suelo de rhizobio efectivo naturalizado. También con *A. hypogaea* no-inoculada, se ha informado de valores de  $N_2$  fijado de 53 y 21 % en el primero y segundo año, respectivamente, usando cacahuate no-nodulante como planta de referencia<sup>(24)</sup>. En un experimento con especies de *Sylosanthes* no-inoculadas, se observaron aceptables niveles de  $N_2$  fijado (%): 82, 73, 77 y 64, para *S. capitata*, *S. guianensis*, *S. macrocephala* y *S. scabra*, respectivamente, lo cual sugirió la presencia de una población eficiente de *Rhizobium* nativo<sup>(25)</sup>.

Figura 3. Figura 3. Porcentaje de  $N_2$  fijado por *Arachis pintoi* (promedio de tres ecotipos) usando cuatro plantas de referencia y el método de abundancia natural de  $N_{15}$ . Cortes 3 a 5

Figure Percentage of  $N_2$  fixed by *Arachis pintoi* (average of three ecotypes) using four reference plants and applying the  $^{15}N$  natural abundance method. Harvests 3 to 5



Lines on top of bars are standard errors.

in percentage  $N_2$  fixed are very large between the two groups:  $21.6 \pm 3.2$  and  $86.2 \pm 2.4$  % ( $P < 0.01$ ). The averages %  $N_2$  fixed by ecotypes (17434, 18744 and 18748) were: for native strains 8.8, 40.4 and 15.6 %; while for ecotypes inoculated with the improved *Bradyrhizobium* strain %  $N_2$  fixed were 91.2, 89.5 and 78.0 %, respectively ( $P < 0.01$ ). A tendency to increase %  $N_2$  fixation throughout the experiment (from first to fifth harvest) was found for ecotypes with the improved strain; the averages (%) were  $63.1 \pm 11.7$ ,  $86.5 \pm 3.7$ ,  $84.6 \pm 3.1$ ,  $96.0 \pm 1.6$  and  $100.0 \pm 1.3$ , respectively. The opposite tendency was observed for ecotypes with native strains (Figure 3). The inefficiency to establishment of symbiosis of the *Rhizobium* native strains used here could explain this fact.

The best  $N_2$  fixation results were obtained with legumes inoculated with the strain CIAT 3101, irrespective of the reference plant used. It has been found that *Bradyrhizobium* strain CIAT 3101 showed a high efficiency to fix  $N_2$ , compared to 38 native strains, which half of them had low effectiveness or were ineffective to fix  $N_2$ <sup>(14)</sup>. In Veracruz, Mexico, native *Rhizobium* strains

También, se evaluaron siete accesiones de *Arachis* no-inoculadas usando el método de abundancia natural de N<sup>15</sup>, sin encontrar diferencias significativas para fijación de N<sub>2</sub> entre los materiales evaluados, y las cifras oscilaron de 36 % (BRA15121, equivalente a *Arachis pintoi* CIAT 18748) a 90 % (BRA31128), con 26 y 99 kg N ha<sup>-1</sup>, respectivamente<sup>(22)</sup>. Los autores atribuyeron esta alta variación como un resultado de las diferentes capacidades de las accesiones evaluadas en relación con el establecimiento de simbiosis con cepas nativas de *Bradyrhizobium*, considerando que las plantas no fueron inoculadas al momento de la siembra; como el terreno presentaba un gran número de leguminosas nativas, se asumió que el suelo tenía una población estable de *Bradyrhizobium*. El bajo nivel de N<sub>2</sub> fijado por *Arachis pintoi* CIAT 18748<sup>(22)</sup> fue similar al encontrado en este experimento.

La selección de una apropiada planta de referencia constituye todavía un dilema, debido a que los resultados no siempre son consistentes<sup>(26)</sup>. Considerando que este experimento se realizó en condiciones de invernadero, algunos de los criterios de selección para plantas de referencia, como es la “zona de enraizamiento”, no se pueden aplicar aquí, ya que las plantas que crecen en macetas no siempre muestran su verdadera arquitectura radicular, como es la proliferación de raíces finas o adventicias, y finalmente, un limitado volumen de raíces.

El grado de dependencia en la fijación de N<sub>2</sub> con la cepa mejorada y usando la leguminosa no-nodulante *A. hypogaea* como planta de referencia fue alta, comparado con un informe de Cadisch *et al*<sup>(24)</sup> quienes no encontraron diferencias al usar *A. hypogaea* (49 %) o maíz (48 %) como plantas de referencia durante el primer año en un experimento de campo. Estas últimas cifras son similares al dato de 47 % reportado por Peoples *et al*<sup>(23)</sup> usando también planta de cacahuate no-nodulante. Varios investigadores han informado acerca del uso de gramíneas forrajeras tropicales como plantas de referencia. En un experimento donde se empleó *B. decumbens* y *Paspalum plicatulum* como plantas de referencia para cuatro especies de *Stylosanthes*, se encontró que las

collected from nodules of *Gliricidia sepium* trees seedlings were effective for N<sub>2</sub> fixation, and several of these strains promoted higher values for total DMY<sup>(15)</sup>.

Peoples *et al*<sup>(23)</sup> did not find differences in N<sub>2</sub> fixation by *A. hypogaea* despite of the use of three *Bradyrhizobium* strains (average of three strains 101 kg ha<sup>-1</sup>) compared with native strains (98 kg ha<sup>-1</sup>). The lack of response was attributed to the presence of effective naturalized rhizobia in the soil. Also, with non inoculated *A. hypogaea*, it has been reported that a percentage of N<sub>2</sub> fixed of 53 and 21 % during the first and second year of the experiment, using a non-nodulating groundnut as reference plant<sup>(24)</sup>. An experiment using non inoculated *Stylosanthes* species showed good levels of N<sub>2</sub> fixed (%): 82, 73, 77 and 64 N<sub>2</sub> for *S. capitata*, *S. guianensis*, *S. macrocephala* and *S. scabra*, respectively, suggesting an efficient native *Rhizobium* population<sup>(25)</sup>.

Also, seven *Arachis* non-inoculated, accessions were evaluated using the <sup>15</sup>N natural abundance method, and significant differences were found among the tested accessions for N<sub>2</sub> fixation. Values ranged from 36 % (BRA15121, equivalent to the *Arachis pintoi* CIAT 18748) to 90 % (BRA31128), equivalent to 26 and 99 kg N ha<sup>-1</sup>, respectively<sup>(22)</sup>. Authors attributed this high variation as a result of the different abilities of the accessions tested, regarding the establishment of symbiosis with strains native of *Bradyrhizobium*, since the plants were not inoculated at planting. Whereas the area which had many native legumes, it was assumed that the soil had a population of *Bradyrhizobium* established. The low level of N<sub>2</sub> fixed by the *Arachis pintoi* CIAT 18748<sup>(22)</sup> was similar to the value found in this experiment.

The selection of an appropriate reference plant still constitutes a dilemma, because results are not always consistent<sup>(26)</sup>. Since this experiment has been carried out under greenhouse conditions, some of the selection criteria for a reference plant such as the “rooting zone” could not be applied here, because plants growing in pots not always show its truly root architecture as the proliferation of fine

leguminosas fijaron más  $N_2$  con *Paspalum plicatulum* (80 %) que con *B. decumbens* (71 %) como planta de referencia<sup>(25)</sup>.

Considerando que no siempre es posible comparar resultados de fijación de  $N_2$  obtenidos en invernadero, con aquellos realizados en campo, esto nos lleva a hacer algunas observaciones de experiencias en campo. En esta condición, se evaluó la respuesta a la inoculación del ecotipo de *Arachis pintoi* BRA 031143 (CIAT 22160) con cepas de rizobio seleccionadas, encontrándose que la cepa *Bradyrhizobium* CIAT 3101 fue inefectiva para esta leguminosa. La pobre respuesta fue atribuida a un alto nivel de N en el suelo<sup>(27)</sup>.

Los valores de  $N_2$  fijado reportados por Soares *et al.*<sup>(28)</sup> con *A. repens* BR 31861 y 31801, *A. pintoi* 31828 y 31496, fueron menores (70 %) a los aquí encontrados. Ellos mencionaron que estas leguminosas tuvieron un mejor desempeño, y destacaron que el 75 % del rendimiento de materia seca producida fue debido al nitrógeno fijado. Otros autores han mencionado que a altas tasas de fijación, cuando en las leguminosas los valores de  $d^{15}N$  son cercanos al 0 ‰, la metodología llega a ser relativamente insensible a cambios en los valores de  $d^{15}N$  en la planta de referencia<sup>(6,29)</sup>.

## CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

Las tasa de fijación de  $N_2$  estimadas por el método de abundancia natural, fueron más que aceptables; aunque el riesgo de errores está presente, cuando las plantas de referencia no son las adecuadas para una leguminosa en particular. Los cortes sucesivos confirmaron la idoneidad de *Arachis hypogaea* como planta de referencia debido a su similar patrón de crecimiento y sistema radicular. La cepa mejorada *Bradyrhizobium* CIAT 3101 fue más eficiente para fijar  $N_2$  que las cepas nativas.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), y al Consejo Nacional de Ciencia y

roots or adventitious roots, and finally, limited root volume.

The degree of dependency on  $N_2$  fixation with the improved strain obtained using non-nodulating *A. hypogaea* as a reference plant was higher compared with the report of Cadisch *et al.*<sup>(24)</sup> who found no differences using either *A. hypogaea* (49 %) or maize (48 %) as reference plant during the first year of a field experiment. These last values are more similar to the figure reported by Peoples *et al.*<sup>(23)</sup> of 47 % using also a non-nodulating groundnut. The use of tropical forage grasses as reference plants are reported by several researchers. In an experiment using *B. decumbens* and *Paspalum plicatulum* for four *Stylosanthes* species, they found that legumes species yielded more  $N_2$  fixed (80 %) using *Paspalum plicatulum* than *B. decumbens* (71 %) as reference plant<sup>(25)</sup>.

Considering that it is not always possible to compare results of  $N_2$  fixation obtained from glasshouses conditions with those from the field, this fact led us to make some observations from experiences under field situations. On this condition, was evaluated the response of *Arachis pintoi* ecotype BRA 031143 (CIAT 22160) to inoculation with selected rhizobia strains, and found that *Bradyrhizobium* strain CIAT 3101 was ineffective for this legume. The poor response of the strain was attributed to the already high level of N in the soil<sup>(27)</sup>.

The  $N_2$  fixation values found by Soares *et al.*<sup>(28)</sup> with *A. repens* BR 31861 and 31801, *A. pintoi* 31828 and 31496, were lower (70 %) than those found here. They mentioned that these legumes showed the best performance on the region, and pointed out that 75 % of the dry matter yielded was due to nitrogen fixed. Other authors have pointed out that at high fixation rates, when legume  $d^{15}N$  approaches 0 ‰, the methodology becomes relatively insensitive to changes in reference plant  $d^{15}N$ <sup>(6,29)</sup>.

## CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

Rates of  $N_2$  fixation estimated by the natural  $^{15}N$  abundance method were more than acceptable,

Tecnología (CONACYT) por su apoyo para la realización de estos estudios. A Jonathan Fear (Imperial College, Wye, UK) por su apoyo técnico en los análisis de isótopos.

## LITERATURA CITADA

- Vera RR. Research in agropastoral systems: Background and strategies. In: Guimaraes, EP Editores. Agropastoral systems for the tropical savannas of Latin America. CIAT publication No. 338. Cali, Colombia. 2004:3-10.
- Silva JE da, Resck DVS, Corazza EJ, Vivaldi L. Carbon storage in clayey Oxisol cultivated pastures in the "Cerrado" region, Brazil. *Agr Ecosyst Environ* 2004;103:357-363.
- Unkovich M, Herridge D, Peoples M, Cadisch G, Boddey R, Giller, K, Alves B, Chalk P. Measuring plant-associated nitrogen fixation in agricultural systems. ACIAR Monograph No. 136, 2008.
- Sanginga N, Thottappilly G, Dashiell K. Effectiveness of rhizobia nodulating recent promiscuous soyabean selections in the moist savanna of Nigeria. *Soil Biol Biochem* 2000;32:127-133.
- Giller KE, Cadisch G. Future benefits from biological nitrogen fixation: An ecological approach to agriculture. *Plant Soil* 1995;174:255-277.
- Unkovich MJ, Pate JS, Sanford P, Armstrong EL. Potential precision of the delta <sup>15</sup>N natural abundance method in field estimates of nitrogen fixation by crop and pasture legumes in South-West Australia. *Aust J Agric Res* 1994;45:119-132.
- Tessema Z, Baars RMT. Chemical composition, dry matter production and yield dynamics of tropical grasses mixed with perennial forage legumes. *Tropical Grasslands* 2006;40:150-156.
- Castillo-Gallegos E. Improving a native pasture with the legume *Arachis pintoi* in the humid tropics of México [Ph.D. Thesis]. Wageningen, Netherlands: Wageningen University; 2003.
- Ascencio L, Valles B, Castillo E, Jarillo J. Dinámica de población de plantas de *Arachis pintoi* CIAT 17434, asociada a gramas nativas en pastoreo, en el trópico húmedo de México. *Téc Pecu Méx* 2005;43(2):275-286.
- Castillo GE, Valles B, Mannetje L, Aluja A. Efecto de introducir *Arachis pintoi* sobre variables del suelo de pasturas de grama nativa del trópico húmedo mexicano. *Téc Pecu Méx* 2005;43(2):287-295.
- Boddey RM, Peoples MB, Palmer B, Dart PJ. Use of the <sup>15</sup>N natural abundance technique to quantify biological nitrogen fixation by woody perennials. *Nutr Cycling in Agroecosystems* 2000;57:235-270.
- Purcino HMA, Festin PM, Elkan GH. Identification of effective strains of *Bradyrhizobium* for *Arachis pintoi*. *Trop Agric* 2000;77:226-231.
- Thomas RJ. Rhizobium requirements, nitrogen fixation, and nutrient cycling in forage *Arachis*. In: Kerridge KC, Hardy B editors. Biology and agronomy of forage *Arachis pintoi*. Cali, Colombia: CIAT publication No.240;1994:84-94.
- Pinto PP, Carneiro JA, Vargas MAT, Purcino HA, Sá NMH. Indigenous rhizobia associated with *Arachis pintoi* in Cerrado soils of Brazil. *Pasturas Tropicales (Colombia)* 1999;21(2):25-28.
- although the risk of errors in the estimation of N<sub>2</sub> fixation with reference plants not well matched with the legume remains. Ecotypes of *Arachis pintoi* CIAT 17434 and 18744 showed the highest values of N<sub>2</sub> fixation. The successive harvests reinforced the eligibility of *Arachis hypogaea* as reference plant due to its similar growth pattern and root system. The improved *Bradyrhizobium* strain CIAT 3101 was more efficient to fix N<sub>2</sub> than the native strains.

## ACKNOWLEDGMENTS

To the National University of Mexico (UNAM), and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), for his support throughout a scholarship provided. To Jon Fear (Imperial College at Wye, UK), by his technical assistance on lab analyses.

*End of english version*

- 
- Melchor-Marroquin JI, Vargas HJJ, Ferrera CR, Krishnamurthy L. Screening *Rhizobium* spp strains associated with *Gliricidia sepium* along an altitudinal transect in Veracruz, Mexico. *Agroforestry Systems* 1999;46:25-38.
  - Castro S, Permigliani M, Vinocur M, Fabra A. Nodulation in peanut (*Arachis hypogaea* L.) roots in the presence of native and inoculated rhizobia strains. *Appl Soil Ecol* 1999;13:39-44.
  - Mendez NJRC, Mayz FJ. Comportamiento simbiótica de poblaciones rizobianas nativas de suelos de sabana en *Arachis hypogaea* L. *Rev Fac Agron (LUZ, Venezuela)* 2000;17:36-50.
  - GenStat Discovery. GenStat Discovery Edition 3. VSN International, UK. [on line] <http://www.vsnl.co.uk/downloads/genstat-discovery/>. Accessed Feb 22, 2009.
  - Villarreal M, Vargas W. Establecimiento de tres ecotipos de *Arachis pintoi* utilizando material vegetativo e inoculación en condiciones del trópico. Reunión Latinoamericana de Rhizobiología. Santa Cruz, Bolivia. 1996:133-135.
  - Sylvester-Bradley R, Mosquera D, Asakawa NM, Sanchez G. Promiscuity and responses to rhizobial inoculation of Tropical Kudzu (*Pueraria phaseoloides*). *Field Crop Res* 1991;27:267-279.
  - Sierra J, Nygren P. Transfer of N fixed by a legume tree to the associated grass in a tropical silvopastoral system. *Soil Biol Biochem* 2006;38:1983-1903.
  - Behling-Miranda CH, Vieira A. Cadisch G. Determinação da fixação biológica de nitrogênio no Amendoim Forrageiro (*Arachis* spp.) por intermédio da abundância natural de <sup>15</sup>N. *Rev Bras Zoot* 2003;32:1859-1865.

23. Peoples MB, Bell MJ, Bushby HVA. Effect of rotation and inoculation with *Bradyrhizobium* on nitrogen fixation and yield of peanut (*Arachis hypogaea* L, Cv Virginia Bunch). Aust J Agric Res 1992;43:595-607.
24. Cadisch G, Hairiah K, Giller KE. Applicability of the natural <sup>15</sup>N abundance technique to measure N<sub>2</sub> fixation in *Arachis hypogaea* grown on an Ultisol. Neth J Agric Sci 2000;48(1):31-45.
25. Behling-Miranda CH, Fernandes CD, Cadisch G. Quantifying the nitrogen fixed by *Stylosanthes*. Pasturas Tropicales (Colombia) 1999;21(1):64-69.
26. Chalk PM, Ladha JK. Estimation of legume symbiotic dependence: an evaluation of techniques based on <sup>15</sup>N dilution. Soil Biol Biochem 1999;31:1901-1917.
27. Purcino HMA, Sa NMH, Viana MCM, Scotti MR, Mendes IC, Vargas MAT. Response of *Arachis pintoii* to inoculation with selected rhizobia strains in Brazilian Cerrado soils under field conditions. Pasturas Tropicales (Colombia) 2003;25(2): 26-29.
28. Soares PG, Silva de Resende A, Urquiaga S, Campello EFC, Franco AA. Estabelecimento, produção de fitomassa, acúmulo de macronutrientes e estimativa da fixação biológica de nitrogênio em *Arachis*. Pasturas Tropicales (Colombia) 2006;28(2):18-25.
29. Danso SKA, Hardarson G, Zapata F. Misconceptions and practical problems in the use of <sup>15</sup>N soil enrichment techniques for estimating N<sub>2</sub> fixation. Plant Soil 1993;152:25-52.