



Efectividad simbiótica de rizobia aislados de suelos de sabana en frijol *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv. C1-12

Symbiotic effectiveness of rhizobia isolated from savannah soils in cowpea *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv. C1-12

J. Mayz^{1*} y C. Rivero²

¹Universidad de Oriente, Núcleo de Monagas, Campus "Juanico", Laboratorio de Rizobiología, Maturín, estado Monagas. ²Universidad de Oriente, Núcleo de Monagas, Postgrado en Agricultura Tropical, Campus "Juanico", Maturín, estado Monagas.

Resumen

La necesidad de enfrentar la insuficiencia de alimentos para la creciente población de Venezuela pone énfasis en el mejoramiento de la productividad agrícola con leguminosas como el frijol *Vigna unguiculata*; al involucrar aspectos tales como, la sustitución de insumos químicos por otros de base biológica. Así, las interacciones microorganismos-plantas tienen una gran significancia, debido a que serían una fuente no contaminante de nutrientes. En este contexto, la efectividad de siete aislados rizobianos fue evaluada en el cultivar de frijol C1-12 permitiendo demostrar bajo un diseño de Bloques al Azar con cuatro repeticiones que las cepas JV90, JV91, JV93 y JV94, fueron las más efectivas en la fijación de nitrógeno, de acuerdo con mediciones de nodulación, concentración de nitrógeno y componentes de crecimiento tales como peso seco de la parte aérea, número de hojas y altura del vástago.

Palabras clave: Rizobia, frijol, nodulación, fijación de nitrógeno.

Abstract

The challenge to produce enough food for the increasing population of Venezuela puts emphasis in agricultural productivity with legumes as cowpea; which involve aspects such as the substitution of chemical products for biological

inputs. Thus, interactions plant-micro organisms have a great significance, because they would be a non contaminant nutritional source. Seven rhizobial isolates were evaluated in cowpea cultivar C1-12 on a complete random design with four replications. Nodulation, nitrogen concentration and growing components such as dry weight and height of shoots and leaves number were measured. According to results the JV90, JV91, JV93 and JV94 strains were the most effective in nitrogen fixation.

Key words: *Rhizobia*, cowpea, nodulation, nitrogen fixation.

Introducción

La Academia Nacional de Ciencias de Estados Unidos (NAS, 1994) señaló que para el año 2050 se esperaba una población mundial de más de 5 billones. Además, indicó que la necesidad de nitrógeno fijado para la producción de los cultivos, se duplicaría, incrementándose a alrededor de 160 millones de toneladas por año y que si éste fuera suplido por fuentes industriales, se requerirían cerca de 270 millones de toneladas de carbón o su equivalente. Por otra parte, la FAO (2003), reseñó que para enfrentar el crecimiento de la población global en las décadas por venir y para reducir la pobreza, se necesitaría el mantenimiento e incremento significativo de la productividad agrícola en los países en desarrollo; lo cual requeriría incrementar los cultivos agrícolas base de la alimentación tanto en suelos fértiles como en marginales, usando sistemas de manejo integrado que permitan la utilización más precisa de suelo, agua y nutrimentos y explorar las posibilidades de limitar el uso de los insumos químicos y substituirlos con insumos de base biológica. Sobre este último aspecto, además enfatizó, existe la necesidad de investigación fundamental a nivel radical, de las bases físicas,

Introduction

The National Academy of Science of the United States (NAS, 1994) established an expected population of more than 5 billions people for the year 2050. Moreover, they expressed that necessity of fixed nitrogen for crop production, would be duplicate, increasing around of 160 millions tons per year and if nitrogen would be supplied by industrial sources, almost 270 millions tons of carbon or its equivalent would be required. On the other hand, the FAO (2003), mentioned that in order to confront growth of global population in next decades and to reduce poverty, the significant maintenance and increase of agricultural productivity would be needed on those underdeveloped countries; thus, it would be required to increase the agricultural crops as a nutrition base both in fertile and margin soils, using integrated management systems that permit the precise soil, water and nutrients use and to explore the possibilities of limiting the use of chemical inputs and substitute them with biological base inputs. About this, there is the necessity of essential research at radical level, of physical, biochemical, physiological and genetic bases of micro organism-plant interactions

bioquímicas, fisiológicas y genéticas de las interacciones microorganismo-planta y de la simbiosis. De esta manera, la utilización de nutrimentos y la fijación biológica de nitrógeno proporcionarían beneficios enormes para una agricultura sustentable.

El frijol (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) es consumido por millones de personas a nivel mundial, debido a su alto contenido de proteína (20-25%) (Fall *et al.*, 2003), y en Venezuela forma parte de la alimentación; sin embargo, ha sido cultivado por muchas décadas como un cultivo marginal. En los últimos años, los programas implementados han permitido un aumento de la producción del frijol hasta grados excedentarios, llegando a convertirse en un producto de exportación hacia Cuba (INDER, 2010). Actualmente, en el país, los sistemas de producción no consideran la fijación biológica de nitrógeno y la probable existencia natural en los suelos de bacterias fijadoras de nitrógeno, que podrían ayudar a minimizar el uso de fertilizantes químicos nitrogenados. En algunos estudios (Mayz *et al.*, 2003; Krasova-Wade *et al.*, 2006) se han encontrado cepas indígenas efectivas para algunas especies, cultivares o líneas de leguminosas, incluyendo el frijol, lo cual refuerza la importancia de la evaluación de la flora rizobiana indígena para este cultivo.

A fin de identificar rizobia nativos con mayor capacidad de fijación de nitrógeno en el cultivar de frijol C1-12, se evaluaron cepas aisladas de plantas de frijol del cultivar Tejero Criollo no inoculadas y cultivadas en suelos de sabana del estado Monagas.

and of symbiosis. Thus, the use of nutrients and biological fixation of nitrogen would give huge benefits for a sustainable agriculture.

Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) is consumed by millions of people at world level, because its high protein content (20-25%) (Fall *et al.*, 2003), and in Venezuela take part of feeding; however, cowpea have been cultivated by many decades like a marginal crop. Last years, the programs implemented have permitted an increase of cowpea production until excess degrees, becoming on an exportation product toward Cuba (INDER, 2010). Nowadays, in country, the production systems do not consider it on biological fixation of nitrogen and the probable natural existence in soils of nitrogen fixing bacteria, helping to minimize the use of nitrogen chemical fertilizers. In some studies (Mayz *et al.*, 2003; Krasova-Wade *et al.*, 2006) effective native strains have been found for several species, cultivars or leguminous lines, including cowpea, that reinforce the importance of native rhizobial flora evaluation for this crop.

In order to identify native *Rhizobia* with higher nitrogen fixation capacity in C1-12 cowpea cultivar, isolated strains of cowpea plants were assessed of cultivar "Tejero Criollo" not inoculated and cultivated in savanna soils of Monagas state.

Materials and methods

The experiment was carried out in the greenhouse of Post graduate

Materiales y métodos

El experimento se llevó a cabo en el umbráculo del Postgrado en Agricultura Tropical de la Universidad de Oriente, Núcleo de Monagas, Venezuela, donde se evaluaron 7 cepas rizobianas de crecimiento lento según la metodología de Mayz *et al.* (2003) en el cultivar de frijol C1-12, desarrollado por selección natural de la población original Tejero criollo (Valladares, 1990).

Se incluyeron dos tratamientos control no inoculados: uno fertilizado con KNO_3 ($0,75 \text{ gL}^{-1}$ de solución nutritiva): (N1) y otro sin fertilización nitrogenada: (N0). Se usó el diseño de Bloques al Azar con cuatro repeticiones por tratamiento.

Para la inoculación, las cepas JV90 a JV96, fueron cultivadas en caldo de extracto de levadura y manitol en un agitador orbital (60 rpm), por 10 días. Las plantas fueron inoculadas tres veces (al momento de la siembra y tres y seis días más tarde) con 2 mL de inóculo (células activas mL^{-1} : $1,06-1,10 \times 10^9$, OD_{670}). Las semillas seleccionadas por uniformidad de tamaño fueron superficialmente esterilizadas con 0,2% de HgCl_2 , luego lavadas varias veces con agua destilada estéril y finalmente puestas a germinar en cápsulas de Petri estériles con papel húmedo a temperatura ambiente. Dos plántulas con radículas de 1,0-1,5 de largo fueron transferidas a materos plásticos con 4 kg de arena "sandblast" estéril. Una planta por pote fue dejada a los 8 días después de la siembra, la cual fue regada diariamente con solución nutritiva de Sandman y cosechada a los 45

studies on Tropical Agriculture, Universidad de Oriente, Núcleo de Monagas, Venezuela, where 7 rhizobial strains of slow growth were evaluated according to the methodology of Mayz *et al.* (2003) in cowpea cultivar C1-12, developed by natural selection of the original population of "Tejero criollo" (Valladares, 1990).

Two control treatments not inoculated: one fertilized with KNO_3 (0.75 gL^{-1} of nutritive solution): (N1) and the other one without nitrogen fertilization: (N0). A randomized block design with four replications was used.

For inoculation, the JV90 to JV96 strains were cultivated on yeast extract and mannitol broth in an orbital shaker (60 rpm), during 10 days. Plants were three times inoculated (at sowing time and three and six days later) with 2 mL of inoculum (active cells mL^{-1} : $1.06-1.10 \times 10^9$, OD_{670}). Selected seeds by size uniformity were superficially sterilized with 0.2% of HgCl_2 , then washed several times using distilled water and finally germinated in sterile Petri dishes with humid paper at environmental temperature. Two plantules with radicles of 1.0-1.5 long were moved to plastic pots with 4 kg of sterile "sandblast" sand. One plant per pot was left 8 days after sowing, which was daily irrigated with Sandman nutritive solution and harvested at 45 days after sowing. They were evaluated: plants growth through out shoot dry weight, height and total leaves number and nodulation through out total nodules number, nodules number categorized

días después de la siembra. Se evaluaron: el crecimiento de las plantas a través del peso seco, altura y total de hojas del vástago y la nodulación por medio del número total de nódulos, del número de nódulos categorizados por color (rojos y blancos) y tamaño (1-2, >2-4, >4-6 mm de diámetro, considerándose los nódulos como esferas) y del peso seco total y por nódulo. Los pesos secos se registraron después del secado en estufa a 65°C por 72 h. La determinación del nitrógeno total de la parte aérea se realizó en un autoanalizador después de la digestión ácida de la materia seca.

Los datos fueron analizados mediante análisis de varianza, de acuerdo al diseño empleado, y también se correlacionaron. Las diferencias entre los tratamientos se detectaron mediante la Mínima Diferencia Significativa ($P \leq 0,05$), determinadas usando el programa estadístico Statistix versión 9.0.

Resultados y discusión

El crecimiento de frijol fue afectado por los tratamientos aplicados, señalado por los valores significativos encontrados mediante el análisis de varianza para el peso seco de la parte aérea, número de hojas y altura del vástago, con valores de F de 63,52, 15,23 y 41,69, respectivamente.

Las cepas JV90, JV91, JV93 y JV94 promovieron los mayores pesos secos del vástago (2,76, 2,78, 2,79 y 2,65 g.planta⁻¹, respectivamente); presentando promedios similares entre si y parecidos al control abonado con nitrógeno (N1: 2,69 g.planta⁻¹). En

by color (red and white) and size (1-2, >2-4 and >4-6 mm of diameter, nodules were considered as spheres) and total nodule dry weight and per nodule. The dry weights were registered after oven drying at 65°C during 72 h. Determination of total nitrogen of aerial part was done in an autoanalyzer after acid digestion of dry matter.

Data were analyzed by using analysis of variance, according to design used, and also were correlated. Differences between treatments were detected through the Least Significant Difference ($P \leq 0.05$), determined using the statistical program Statistix version 9.0.

Results and discussion

The cowpea growth was affected by treatments applied, advised by significant values found through the analysis of variance for dry weight of aerial part, number of leaves and shoot height, with F values of 63.52, 15.23 and 41.69, respectively.

The JV90, JV91, JV93 and JV94 strains promoted the higher shoot dry weights (2.76, 2.78, 2.79 and 2.65 g.plant⁻¹, respectively); showing similar averages among them and also similar to control fertilized with nitrogen (N1: 2.69 g.plant⁻¹). In contrast, the JV92, JV95 and JV96 strains induced the lower values of shoot dry weight with significant differences respect to the JV90, JV91, JV93 and JV94 strains and to treatment fertilized (around 50% of reduction), unlike in relation to the not fertilized control (N0), differences were not found (figure 1A).

contraste, las cepas JV92, JV95 y JV96 indujeron los menores valores de peso seco del vástago con diferencias significativas con respecto a las cepas JV90, JV91, JV93 y JV94 y al tratamiento fertilizado (alrededor de un 50% de reducción), no así en relación con el control no enmendado (N0), con el cual no mostraron diferencias (figura 1A).

En cuanto al número de hojas y a la altura del vástago, la tendencia fue parecida a la presentada por el peso seco de la parte aérea; es decir, los mayores valores para el número de hojas.planta⁻¹ fueron mostrados por las plantas inoculadas con las cepas JV90, JV91, JV93 y JV94 y el control no inoculado y fertilizado, con un promedio de 13,5. Similarmente, las mayores alturas del vástago (24,14 cm en promedio) se presentaron en las plantas cultivadas con los mismos tratamientos (figura 1B). Las correlaciones entre el peso seco y la altura ($r=0,99$) y entre el peso seco y el número de hojas ($r=0,99$) del vástago fueron estadísticamente significativas ($P\leq 0,05$).

Se observó una respuesta diferencial entre la nodulación inducida por las cepas de frijol inoculadas, indicada por los valores significativos encontrados en el análisis de varianza para el peso seco total de nódulos y para el peso seco por nódulo, presentando valores de F de 10,71 y 13,80, respectivamente.

El número de nódulos formados por las cepas inoculadas fue similar, con un promedio de 45,9 nódulos.planta⁻¹; sin embargo, se encontraron diferencias en cuanto al crecimiento y desarrollo de los

In relation to the number of leaves and to the shoot height, tendency was similar to those showed by dry weight of aerial part; the higher values for the number of leaves.plant⁻¹ were showed by plants inoculated with JV90, JV91, JV93 and JV94 strains and the control not inoculated and fertilized, with an average of 13.5. Similarly, the higher shoot heights (24.14 cm in average) were showed in plants cultivated with the same treatments (figure 1B). Correlations between dry weight and height ($r=0.99$) and between dry weight and number of leaves ($r=0.99$) of shoot were statistically significant ($P\leq 0.05$).

A differential response was observed between the nodulation induced by the inoculated cowpea strains, indicated by significant values found in the analysis of variance for total dry weight of nodules and for dry weight per nodule, showing F values of 10.71 and 13.80, respectively.

The number of nodules formed by inoculated strains was similar, with an average of 45.9 nodules.plant⁻¹; nevertheless, differences in relation to the growth and development in nodules were found, reflecting in total dry weight and per nodule, and in size and color. The induced nodules by the JV90, JV91, JV93 and JV94 strains showed a higher total dry weight, per nodule and size and all of them were red color; with respective averages of 103.01 mg.plant⁻¹, 2.22 mg.nodule⁻¹ and higher than 2 and up to 6 mm diameter. In contrast plants inoculated with JV92, JV95 and JV96 strains, showed lower number of

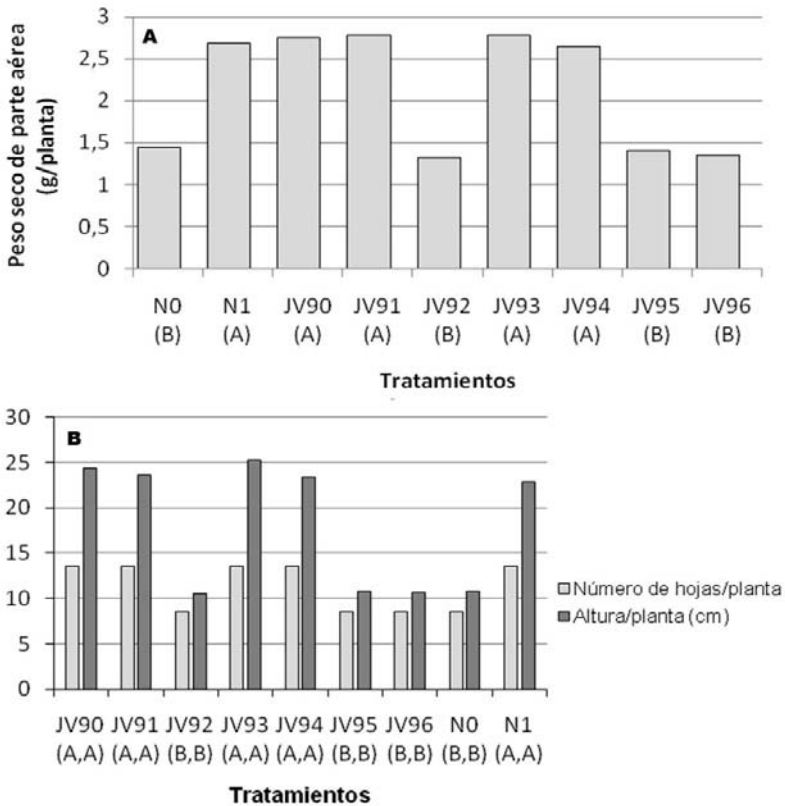


Figura 1. Cambios en el peso seco (A), número de hojas y altura (B) del vástago de plantas de frijol, en relación con los tratamientos aplicados. N0: no fertilizado, no inoculado; N1: fertilizado, no inoculado; (JV90-JV96): inoculado con las cepas rizobianas especificadas. Letras distintas entre paréntesis indican promedios estadísticamente diferentes (Prueba de la Mínima Diferencia Significativa, $P \leq 0,05$).

Figure 1. Changes in dry weight (A), number of leaves and height (B) of cowpea plant shoot, in relation to treatments applied. N0: neither fertilized nor inoculated; N1: fertilized, no inoculated; (JV90-JV96): inoculated with rhizobium strains specified. Different letters show means statistically different (Test of Minimum Significant Difference, $P \leq 0.05$).

nódulos, reflejado en el peso seco total y por nódulo, y en el tamaño y color. Los nódulos inducidos por las cepas JV90, JV91, JV93 y JV94, pre-

nodules, smaller size and white color (figure 2 and table 1).

The nitrogen concentration was affected by treatments applied

sentaron mayor peso seco total, por nódulo y tamaño, y todos fueron de color rojo; con promedios respectivamente de 103,01 mg.planta⁻¹, 2,22 mg.nódulo⁻¹ y mayores de 2 y hasta 6 mm de diámetro. En contraste, las plantas inoculadas con las cepas JV92, JV95 y JV96, presentaron menor número de nódulos, más pequeños y de color blanco (figura 2 y cuadro 1).

La concentración de nitrógeno fue afectada por los tratamientos aplicados ($F=59,9$), la cual siguió un patrón similar al peso seco del vástago, con los mayores promedios presentados por las plantas inoculadas con las cepas JV90, JV91, JV93 y JV94, los cuales correspondieron a 4,43, 4,30, 4,20 y 4,20%, respectivamente, valores estadísticamente similares entre si y parecidos al control no inoculado y fertilizado (4,23%) (figura 3). Las correlaciones de la concentración de nitrógeno con el peso seco, la altura de la planta y el número de hojas fueron estadísticamente significativas, alcanzando valores de $r=0,99$ para cada relación.

Se ha señalado que factores genéticos tanto de la leguminosa hospedera como de los rizobia controlan el proceso de fijación de nitrógeno. La asociación mutualística es iniciada cuando los flavonoides de la planta incitan la expresión de los genes rizobiales de la nodulación (genes *nod*), que en su turno, inducen la síntesis de la señales de la nodulación (señales Nod), que activan el programa de desarrollo que conduce a la formación de los nódulos en la planta hospedera. Una señalización inefectiva puede afectar negativamen-

($F=59,9$), which followed a pattern similar to shoot dry weight, with the higher averages showed by plants inoculated with the JV90, JV91, JV93 and JV94 strains, which corresponded to 4.43, 4.30, 4.20 and 4.20%, respectively, statistically similar values among them and also similar to the not inoculated and fertilized control (4.23%) (figure 3). The correlations of nitrogen concentrations with dry weight, plant height and the number of leaves were statistically significant, reaching values of $r=0.99$ for each relation.

It has been reported that genetic factors both host leguminous and rhizobium control the nitrogen fixation process. The mutualistic association is observed when plant flavonoids promote the expression of rhizobial genes of nodulation (*nod* genes), that induces synthesis of nodulation signals (Nod signals), activating development program taking to the formation of nodules in host plant. One ineffective signaling can affect in a negative way the development of an appropriate number of nodules for the maintenance of a supply of nitrogen necessary for the growth support, avoiding development of normal nodules and effectively functional through its effect on any or all the following aspects: growth of infection threads, formation of nodular primordia, establishing of a typical infection, biosynthesis of leghaemoglobin, hormonal balance and tissue organization. The Nod signals stimulate the protein secretion in the extra cellular environment (Nops proteins), being

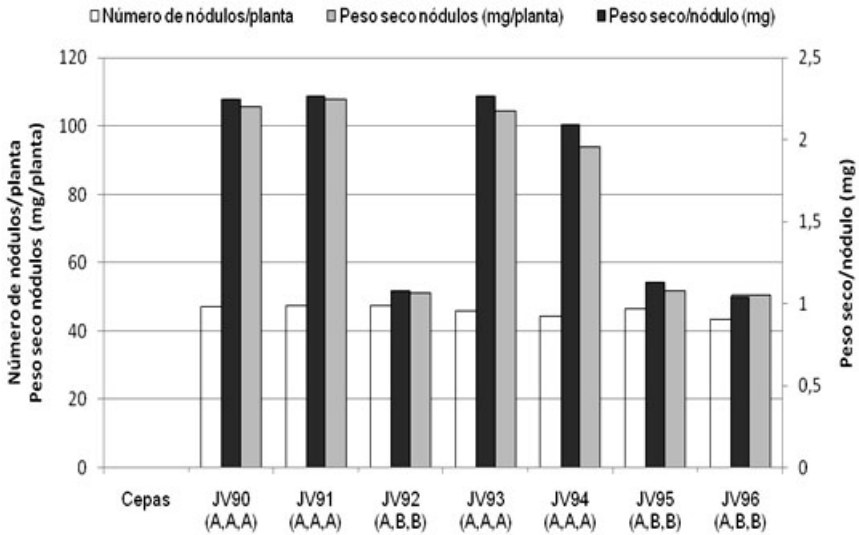


Figura 2. Variaciones en el número, peso seco total e individual de nódulos de frijol inoculado individualmente con cepas de rizobia (JV90-JV96). Medias con la misma letra no difieren significativamente entre si (Prueba de la Mínima Diferencia Significativa, $P \leq 0,05$).

Figure 2. Variations on number, total dry weight and individual of cowpea nodules individually inoculated with rhizobium strains (JV90-JV96). Means with the same letter not differ in a significant way among them (Least Significant Difference Test, $P \leq 0.05$).

te el desarrollo de un número apropiado de nódulos para el mantenimiento de un suministro adecuado de nitrógeno necesario para el sustento del crecimiento, impidiendo el desarrollo de nódulos normales y efectivamente funcionales a través de su efecto sobre alguno o todos de los siguientes aspectos: crecimiento de los hilos de infección, formación del primordio nodular, establecimiento de una infección típica, biosíntesis de leghemoglobina, balance hormonal y organización tisular. Se ha indicado

attributed to them the determination of host range to be infect, with chemical nature and level of Nod signals (Arango and Gage, 2009). Thus, differences on effectiveness of rhizobial strains in different species, lines or cultivars based on previous acceptances, could focus the JV92, JV95 and JV96 strains behavior in this cowpea cultivar; that is to say, they could be produced ineffective Nod signals. The strains proved in this cultivar had a similar behavior in cultivar TVu 9-6 (Mayz *et al.*, 2003).

Cuadro 1. Número de nódulos por tamaño y color de plantas de frijol inoculadas con las cepas de crecimiento lento JV90-JV96.**Table 1. Number of nodules per size and color of cowpea plants inoculated with strains of slow growth JV90-JV96.**

Cepa	Tamaño y color nodular		
	1-2	>2-4	>4-6 (mm)
JV90		33,0(R)	14,0(R)
JV91		34,8(R)	12,7(R)
JV92	47,3(B)		
JV93		37,0(R)	9,0(R)
JV94		33,3(R)	11,0(R)
JV95	46,5(B)		
JV96	48,3(B)		

(B): Nódulos de color blanco; (R): Nódulos de color rojo.

además, que las señales Nod estimulan la secreción de proteínas en el ambiente extracelular (proteínas Nops), a las cuales se les atribuye la determinación del rango de hospederos a infectar, conjuntamente con la naturaleza química y el nivel de las señales Nod (Arango y Gage, 2009). Así, las diferencias en la efectividad de cepas rizobianas en diferentes especies, líneas o cultivares soportadas por las asunciones anteriores, podrían enmarcar la conducta de las cepas JV92, JV95 y JV96 en este cultivar de frijol; es decir, se podrían haber producido señales Nod inefectivas. Las cepas probadas en este cultivar tuvieron una conducta similar en el cultivar TVu 9-6 (Mayz *et al.*, 2003).

En este estudio, se muestra la existencia de cepas efectivas para este cultivar de frijol (C1-12) en los suelos de sabana y la evidente variabilidad entre las cepas nativas, al tiempo que enfatiza la importancia de evaluar las

In this study, the existence of effective strains is showed for this cowpea cultivar (C1-12) in savanna soils and the evident variability between native strains, and also, emphasizes the importance of evaluating the native strains, genetic and physiologically adapted to the edapho-climatic conditions, before inoculating with other strains of different origin. Krasova-Wade *et al.* (2006) proved that when effective native strains are re-introduced on origin environment, they properly behave; thus, there are results where native strains, besides of being competitive, are more effective in cowpea than in those inoculated strains from a commercial inoculum or those introduced from other countries.

Conclusions

According to the typology of nodulation (number of nodules, total

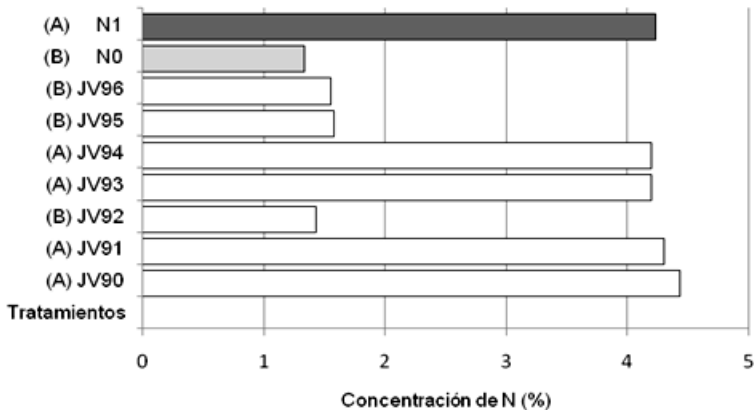


Figura 3. Efecto de los tratamientos aplicados sobre la concentración de nitrógeno del vástago de frijol. N0: no fertilizado, no inoculado; N1: fertilizado, no inoculado; (JV90-JV96): inoculado con las cepas rizobianas especificadas. Letras distintas indican promedios estadísticamente diferentes (Prueba de la Mínima Diferencia Significativa, $P \leq 0,05$).

Figure 3. Effect of treatments applied on nitrogen concentration of cowpea shoot. N0: Neither fertilized nor inoculated; N1: fertilized, not inoculated; (JV90-JV96): inoculated with strains rhizobium specified. Different letters show means statistically different (Least Significant Difference Test, $P \leq 0,05$).

cepas indígenas, las cuales están genética y fisiológicamente adaptadas a las condiciones edafo-climáticas, antes de proceder a inocular con otras cepas de diferente origen. Krasova-Wade *et al.* (2006) demostraron que cuando cepas indígenas efectivas son reintroducidas en el ambiente de origen, ellas se comportan en concordancia; así se han encontrado resultados donde las cepas nativas, además de ser competitivas, son más efectivas en frijol que las cepas inoculadas procedentes de un inoculo comercial o introducidas de otros países.

and per nodule weight, size and color), the values of growth components (dry weight, height and shoot leave number) and those estimated from nitrogen concentration, the JV90, JV91, JV93 and JV94 strains, were the more effective in nitrogen fixation in cultivar C1-12.

End of english version

Conclusiones

De acuerdo con la tipología de la nodulación (número de nódulos, peso

total y por nódulo, tamaño y color), los valores de los componentes de crecimiento (peso seco, altura y número de hojas del vástago) y los estimados de la concentración de nitrógeno, las cepas JV90, JV91, JV93 y JV94, fueron las más efectivas en la fijación de nitrógeno en el cultivar C1-12.

Literatura citada

Arango, C. y D. Gage. 2009. HPrK Regulates succinate-mediated catabolite repression in the Gram-Negative symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 191(1):298-309.

Fall, L., D. Diouf, M.A. Fall, F. Abaye y M. Gueye. 2003. Genetic diversity in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) varieties determined by ARA and RADP techniques. *Afr. J. Biotechnol.* 2(2):48-50.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2003. Selected issues in agricultural technology. p.297-327. En: J. Bruinsma (Ed.). *World agriculture: towards 2015-2030. An FAO perspective.* Earthscan Publ. Ltd, London.

Instituto Nacional de Desarrollo Rural (INDER). 2010. Agricultura al día 26-03-2010. Disponible en: http://www.inder.gob.ve/agricultura_al_dia.php.

Krasova-Wade, T., O. Diouf, I. Ndoye, C.E Sall., S. Braconnier y M. Neyra. 2006. Water-condition effects on rhizobia competition for cowpea nodule occupancy. *Afr. J. Biotechnol.* 5 (16):1457-1463.

Mayz, J., F. Campos y N. Valladares. 2003. Evaluation of rhizobial (*Rhizobium* sp.) isolates for their effects on cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] growth and yield. *Trop. Agric.* 80(1):36-40.

National Academic of Science (NAS). 1994. Biological Nitrogen Fixation: Research Challenges- A Review of Research Grants Funded by the U.S. Agency for International Development. *Nat. Acad. Press, Washington D.C.* 59 p.

Valladares, N. 1990 Nuevas líneas experimentales de frijol (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) para la ecología de sabana, desarrolladas por selección individual de la población original "Tejero Criollo". Premio Agropecuario Banco Consolidado. 115 p.