

Determinación de la fijación biológica del nitrógeno en suelos de la altiplanicie de Maracaibo utilizando N^{15}

Determination of biological nitrogen fixation in soils of the Maracaibo plain using N^{15}

Isidro Meléndez^{1,2}
Edigso Martínez³

Resumen

Para evaluar la fijación biológica del N_2 atmosférico en cultivares de frijol [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] usando la técnica de la dilución isotópica con N^{15} , se condujo un experimento en el Campo Experimental "Ana María Campos", de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia. Los suelos son de textura franco arenosa a arenosa, clasificados como Typic haplargids. Se evaluaron cuatro mutantes de frijol OJO NEGRO: ON 30(1), ON 30(4), ON 30(5) y ON 30(6) y la variedad ON Criollo. El diseño experimental utilizado fue en bloques al azar, con cinco tratamientos y cuatro repeticiones. Las variables estudiadas fueron rendimiento de materia seca y N total, porcentaje de N y N^{15} en exceso, porcentaje de N derivado del N_2 atmosférico y del fertilizante, cantidad de N_2 fijado, N derivado del fertilizante y rendimiento en grano. El cultivar ON 30(5) presentó el mayor rendimiento de materia seca en las vainas y el ON 30(4) presentó el menor valor. El ON Criollo presentó el más alto porcentaje de N en tallos+hojas y el ON 30(5) el valor más bajo. Todos los cultivares presentaron una alta fijación de N_2 atmosférico, no encontrándose diferencias significativas entre ellos. No hubo respuesta en rendimiento en grano entre los cultivares de frijol.

Palabras claves: *Vigna unguiculata*, N^{15} , fijación biológica.

Recibido el 29-07-93 • Aceptado el 26-11-93

Los autores agradecen a la Lic. Yusmary Espinoza, CENIAP- FONAIAP. Maracay por la realización de los Análisis de N total y N^{15}

1 Proyecto financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia y el Organismo Internacional de Energía Atómica. Viena. Austria.

2 Dpto. de Edafología. Facultad de Agronomía. LUZ. Apartado 15205. Maracaibo, 4005, Venezuela

3 Dpto. de Agronomía.

Abstract

One experiment was carried out to evaluate the biological nitrogen fixation in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] using the N^{15} isotope dilution method at the "Ana María Campos" experimental station of the Agronomy School, of the University of Zulia. Soils have a sandy-loam to sandy texture. The soils are classified as Typic Haplargids. Four mutants of cowpea OJO NEGRO were evaluated: ON 30(1), ON 30(4), ON 30(5) and ON 30(6), and the original variety ON Criollo. The experimental layout was a randomized block design, with five treatments and four replications. The variable factors that were studied were: dry matter and total N yield, percentage of N and N^{15} in excess, percentage of N derived from atmosphere and from fertilizer, amount of N_2 fixed and N from fertilizer, and grain yield. The ON 30(5) cultivar presented the highest dry matter yield in pods and the ON 30(4) the lowest dry matter yield. The ON Criollo cultivar presented the highest percentage of N in stems+leaves and the ON 30(5) the lowest value. All cultivars showed a high N fixation from the atmosphere, but there was no difference in N fixation between them. There was no increase in grain yield between the cultivars that were used.

Key words: *Vigna unguiculata*, N^{15} , biological fixation.

Introducción

De todos los sistemas de fijación biológica de nitrógeno (N), el proceso de fijación simbiótica por las leguminosas es el más conocido y estudiado. La fijación biológica del N por los microorganismos en las plantas de leguminosas es un factor muy importante en el mantenimiento de la fertilidad de los suelos, lo cual permite que las leguminosas sean cultivadas en suelos de baja fertilidad, sin o con aplicación de cantidades de fertilizante nitrogenado.

Existen varios métodos para medir la fijación de N atmosférico (N_2) (1), sin embargo, en esta investigación se consideró solamente el uso de los métodos isotópicos.

Ultimamente, los estudios sobre la cuantificación de N_2 usando el

método de dilución isotópica del N^{15} se han incrementado (4). El principio de la dilución isotópica y las ecuaciones envueltas han sido reseñadas por Danso (6) y Rennie (26). El método envuelve el crecimiento de plantas fijadoras y no fijadoras de N_2 (cultivo de referencia) en suelos con aplicación de fertilizantes orgánicos o inorgánicos enriquecidos con N^{15} (11, 14).

El uso del concepto del Valor "A" (10, 15), resulta en una habilidad para medir cuantitativamente la cantidad de nutrientes del suelo en unidades del fertilizante normal o corriente. La cantidad de nitrógeno fijado por un cultivo de leguminosa puede ser medido en término del fertilizante corriente mediante la sustracción del Valor "A", obtenido con

un cultivo no nodulante, del Valor "A" obtenido con un cultivo nodulante.

La utilización del concepto del Valor-A, permite la aplicación de diferentes dosis de nitrógeno y enriquecimiento con N^{15} de un fertilizante dado, tanto al cultivo de leguminosa como al de referencia para estimar el N_2 fijado (11). El principio del concepto del Valor-A radica en que una planta con más de una fuente de nitrógeno disponible absorberá este elemento a partir de cada una de ellas en proporción a sus cantidades relativas, es decir, que no habrá

preferencia por una fuente de nitrógeno sobre la otra (15).

Aunque el concepto del Valor-A ha sido sujeto a controversia (3, 4, 7, 30), muchos estudios usando este concepto han reportado estimados satisfactorios de N_2 fijado (23, 31).

El presente trabajo pretende evaluar las diferencias en fijación biológica de N_2 atmosférico en cuatro mutantes Elites y la variedad original de frijol (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) tipo Ojo Negro, mediante la utilización de la técnica de la dilución isotópica de N^{15} en suelos de la Altiplanicie de Maracaibo.

Materiales y métodos

El experimento se llevó a cabo en el Campo Experimental "Ana María Campos" de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia, bajo condiciones de una zona de bosque seco tropical. Los suelos son de textura de franco arenosa a arenosa y clasificados taxonómicamente como Typic haplargids, familia franco-sa fina.

Para medir la fijación biológica de nitrógeno se utilizó semilla de cuatro mutantes de frijol [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] obtenidos a través del Proyecto de Mutación Inducida y que resultaron ser promisorias, las cuales son las siguientes: Ojo Negro 30(1), Ojo Negro 30(4), Ojo Negro 30(5) y Ojo Negro 30(6). También se utilizó la variedad original Ojo Negro (O.N. Criollo). Como cultivo de referencia (que no nodule) se utilizó una gramínea, en este caso el sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Monch].

Al cultivo de frijol se le aplicó una dosis baja de nitrógeno, 20 Kg N ha⁻¹ y para el cultivo de sorgo se aplicó una dosis de 100 Kg N ha⁻¹. Se aplicó una dosis básica de fósforo y potasio de 40 Kg P ha⁻¹ y 40 Kg K ha⁻¹ para ambos cultivos.

Como fuente de nitrógeno marcado (N^{15}) se usó sulfato de amonio con un enriquecimiento del 11% y sulfato de amonio comercial. Como fuente de fósforo y potasio se utilizó superfosfato triple (46% P) y cloruro de potasio (60% K) respectivamente.

El diseño experimental consistió en bloques al azar con seis tratamientos y cuatro repeticiones, para un total de 24 tratamientos. Cada tratamiento (parcela) constó de cinco hileras de siembra, con una distancia de siembra entre hileras de 0.60 m y entre plantas de 0.05 m. Largo de la hilera 8 m.

El nitrógeno marcado $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2 \text{N}^{15}$ solamente fue utilizado en las tres hileras centrales en un área de 1.8 m por 1 m de largo, lo cual dará un área de 1.8 m². Para el resto del área de las hileras se utilizó el sulfato de amonio comercial.

El nitrógeno marcado $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2 \text{N}^{15}$ se aplicó en bandas y en disolución acuosa una vez germinadas las semillas y emergido las plántulas de frijol. La disolución se hizo al 5% de enriquecimiento con N^{15} para la dosis de 20 Kg N ha⁻¹ que fue aplicada al frijol y de 1% de enriquecimiento con N^{15} para la dosis de 100 Kg N ha⁻¹ aplicado al sorgo.

El control de maleza se realizó en forma manual con escardilla. A fin de garantizar la cosecha se aplicó riego en forma complementaria durante el ciclo de cultivo.

Todos los cultivares fueron cosechados al mismo tiempo cuando las plantas no habían madurado y así evitar las pérdidas de hojas por senescencia. La cosecha se hizo removiendo todo el material vegetal cortado a ras del suelo en las tres hileras centrales de cada tratamiento. El largo de la hilera cosechada fue de 1 m.

Las plantas de frijol se separaron en sus diferentes partes (vainas, tallos y hojas) y se pesó el material fresco. Cada una de estas partes se picaron en pequeños fragmentos (2 cm). Cada una de las submuestras se obtuvo mezclando y dividiendo en cuartos de porción. El peso fresco y seco se obtuvo a partir de las submuestras preparadas. El secado de las submuestras se hizo en estufa a

70°C, para realizar la determinación de la materia seca (MS) de cada parte de las plantas de frijol, y en el caso del sorgo se tomó toda la planta.

El nitrógeno total fue determinado mediante la aplicación del procedimiento del método de Kjeldahl (2) y el nitrógeno isotópico (N^{15}) se analizó mediante el uso del método de Dumas y el espectrómetro de Emisión Óptica, marca NOI-6E (16, 9). A cada uno de los valores de N^{15} determinados se le resta la abundancia natural de nitrógeno atmosférico de 0.3663% para así obtener el porcentaje de átomos de N^{15} en exceso para cada muestra.

Para los cálculos se consideraron los datos básicos primarios tales como:

- 1 Rendimiento de Materia Seca (M.S.) en Kg ha⁻¹ de tallo+hojas y vainas del frijol y la planta entera del sorgo
- 2 % N de cada parte de la planta cosechada
- 3 % N^{15} átomos en exceso en el material vegetal
- 4 % N^{15} átomos en exceso del fertilizante (fert.) aplicado

A partir de los datos básicos primarios se calcularon los siguientes:

$$5 \text{ N total (Kg ha}^{-1}\text{)} = \frac{\text{M.S. de cada parte de la planta} \times \% \text{ N}}{100}$$

$$6 \text{ \%NdFert} = \frac{\%^{15}\text{N átomos en exceso de cada parte de planta}}{\%^{15}\text{N átomos en exceso } \partial \text{ fert.}}$$

$$7 \text{ A suelo} = \frac{100 - \% \text{NdFert. (sorgo)}}{\% \text{NdFert. (sorgo)}} \times \text{A Fert. (sorgo)}$$

$$8 \text{ A (suelo+fij.)} = \frac{100 - \% \text{NdFert (frijol)}}{\% \text{NdFert (frijol)}} \times \text{A fert (frijol)}$$

$$9 \text{ Afij} = \text{A (suelo + fij)} - \text{A suelo}$$

$$10 \text{ \% NdFij} = \text{A fij} \times \frac{\% \text{NdFert (frijol)}}{\text{A Fert (frijol)}}$$

$$11 \text{ \% NdSuelo} = \text{A suelo} \times \frac{\% \text{NdFert (frijol)}}{\text{A Fert (frijol)}}$$

$$12 \text{ \% NdFert} = 100 - (\% \text{ NdFij} + \% \text{ NdSuelo})$$

$$13 \text{ Cant. de N fijado (Kg ha}^{-1}\text{)} = \frac{\% \text{Ndfij}}{100} \times \text{N total (Kg ha}^{-1}\text{)}$$

donde:

$\% \text{ NdFert} =$	$\% \text{ N en la planta derivado del fertilizante aplicado}$	$\text{A fert} =$	cantidad de fertilizante aplicado
$\text{A suelo} =$	cantidad de N disponible en el suelo	$\text{A (suelo+fij)} =$	cantidad de N obtenidos del suelo y N_2 fijado
		$\% \text{ Ndfij.} =$	$\% \text{ N derivado de la fijación de } \text{N}_2 \text{ atmosférico}$
		$\% \text{ Nds} =$	$\% \text{ N derivado del suelo}$

Resultados y discusión

Los resultados serán presentados de acuerdo a las variables objeto de estudio.

Rendimiento de materia seca y de N total.

Los resultados obtenidos muestran que se detectaron diferencias significativas entre los cultivares para la variable rendimiento de materia seca en las vainas (Cuadro 1),

observándose que el cultivar ON 30(5) fue el que arrojó el máximo valor, con 1169 Kg ha^{-1} , y el cultivar ON 30(4) fue el que tuvo el valor más bajo 698.2 Kg ha^{-1} . El resto de los cultivares, ON 30(6) ON 30(1) y ON Criollo mostraron rendimientos intermedios. En cuanto a las variables rendimiento de materia seca en tallos + hojas no se detectaron diferencias estadísticas significativas. Sin

Cuadro 1. Grupo de medias para rendimiento de materia seca (MS) y N total (NT) (Kg N ha⁻¹) en tallo+hojas (T+H) y vainas de cultivares de frijol y sorgo.

Cultivares	Dosis N (Kg h ⁻¹)	MS		NT	
		T+H	vaina	T+H	vaina
ON Criollo	20	3338 a	749 ab	104.7 a	26.7 a
ON 30(1)	20	3537 a	1093 ab	77.9 a	39.4 a
ON 30(4)	20	3386 a	698 b	102.5 a	26.6 a
ON 30(5)	20	3776 a	1169 a	82.7 a	40.3 a
ON 30(6)	20	3694 a	1143 ab	90.4 a	41.7 a
sorgo	100	7426	-	99.0	

Análisis estadístico para frijol solamente.

Medias con letras iguales no difieren significativamente al nivel $\alpha=0.05$ según la Prueba "T"

embargo, el ON 30(5) presenta los valores más altos, y el ON Criollo 30(4) los valores más bajos.

No se encontraron diferencias significativas para la variable N total en tallos+ hojas y vainas en los cultivares probados. Los valores de N total en tallos+hojas están en el rango que va desde 77.9 Kg N ha⁻¹ para el ON 30(1) hasta 104.7 Kg N ha⁻¹ para el ON Criollo. Los valores en las vainas van desde 26.6 Kg N ha⁻¹ para el ON 30(4), hasta 41.7 Kg N ha⁻¹ para el ON 30(6) (Cuadro 1).

Porcentaje de N y de N¹⁵ átomos en exceso.

Se encontraron diferencias significativas para la variable porcentaje de N en tallos+hojas (Cuadro 2), detectándose tres grupos diferentes de medias, el grupo a, con los cultivares ON Criollo, ON 30(4) y ON 30(6), el grupo b, los cultivares ON 30(1), ON 30(4) y el ON 30(6), y en el

grupo c, ON 30 (1), ON 30 (5) y el ON 30(6). El cultivar ON Criollo mostró el más alto porcentaje de N en tallo+hojas (3.05 %), y el ON 30 (5), tuvo el valor más bajo (2.15 % N). El resto de los cultivares presentaron valores intermedios. En cuanto a la variable porcentaje de N en las vainas no se encontraron diferencias significativas. No se encontraron diferencias significativas entre los cultivares de frijol para la variable átomos de N¹⁵ en exceso (Cuadro 1). En cuanto a esta variable los cultivares que muestran los valores más bajos es un indicativo de que presentan una alta capacidad de fijación de N₂ atmosférico y una baja utilización del N proveniente del fertilizante aplicado. En cambio, cultivares con valores muy altos indican una tendencia a una baja capacidad de fijación de N₂ atmosférico y una alta utilización del N proveniente del fertilizante.

Cuadro 2. Medias para porcentaje de N (%N) y N^{15} átomos en exceso ($\% N^{15}$ át. exc.) en tallo+hojas (T+H) y vainas de cultivares de frijol y en sorgo.

Cultivares	Dosis N (Kg ha ⁻¹)	% N		% N^{15} át. exc.	
		T+H	vaina	T+H	vaina
ON Criollo	20	3,05 a	3,57 a	0,508 a	0,552 a
ON 30(1)	20	2,22 bc	3,65 a	0,553 a	0,540 a
ON 30(4)	20	2,99 ab	3,91 a	0,551 a	0,500 a
ON 30(5)	20	2,15 c	3,47 a	0,655 a	0,594 a
ON 30(6)	20	2,45 abc	3,59 a	0,507 a	0,528 a
sorgo	100	1,31	-	0,648	

Análisis estadísticos para frijol solamente

Medias con letras iguales no difieren significativamente al nivel $\alpha 0.05$ según la Prueba "T"

Fijación de N

En el Cuadro 3, se muestran las medias para las variables de los porcentajes del N derivado de la fija-

ción de N_2 atmosférico, del N derivado del suelo y del N derivado del fertilizante. Se observa en este cuadro, que aún cuando no hubo diferen-

Cuadro 3. Medias para porcentajes de nitrógeno derivado de la fijación del N_2 atmosférico (Ndfij), nitrógeno derivado del suelo (Nds) y nitrógeno derivado del fertilizante (Ndfert), en tallo+hojas (T+H) y vainas de los cultivares de frijol y sorgo.

Cultivares	T+H			vainas		
	Ndfij %	Nds %	Ndfert %	Ndfij %	Nds %	Ndfert %
ON Criollo	60.1 a	29.7 a	10.1 a	56.2 a	32.7 a	11.1 a
ON 30(1)	53.1 a	35.9 a	11.0 a	55.2 a	34.0 a	10.8 a
ON 30(4)	55.4 a	33.6 a	11.0 a	60.1 a	29.9 a	10.0 a
ON 30(5)	45.4 a	41.5 a	13.1 a	53.1 a	35.0 a	11.9 a
ON 30(6)	58.9 a	30.9 a	10.2 a	57.8 a	31.6 a	10.6 a
sorgo	0.0	35.1	64.8			

Análisis estadístico para frijol solamente

Medias con letras iguales no difieren significativamente al nivel $\alpha 0.05$ según la Prueba "T"

cia significativa, en general, todos los cultivares de frijol presentaron un alto porcentaje de fijación de N₂ atmosférico. Los porcentajes de N derivados de la fijación de N₂ atmosférico se presentaron en un rango que va de 45.4% para el ON 30(5) hasta 60.1% para el ON Criollo en tallos+hojas, y en cuanto a las vainas, el rango va de 53% para el ON 30(5) hasta 60.1 para el ON 30(4). También se puede observar en esta cuadro, la alta utilización del N derivado del fertilizante por el cultivo de sorgo, usado como cultivo de referencia.

N derivado del fertilizante y de la fijación atmosférica.

Se detectaron diferencias estadísticas significativas entre los diferentes cultivares de frijol, para la variable cantidad de N derivado del

fertilizante en las vainas (Cuadro 4). Se observa que los cultivares ON 30(1) y ON 30(5) presentaron los valores más altos de N derivado del fertilizante, y el ON 30(4) presentó el valor más bajo de utilización de N proveniente del fertilizante. El ON Criollo y el ON 30(6) presentaron valores intermedios de utilización. De acuerdo a estos resultados, el cultivar ON 30(4), que presentó el valor más bajo de utilización del N proveniente del fertilizante, fue el cultivar que mostró el valor más bajo de átomos de N¹⁵ en exceso (Cuadro 2), el más alto porcentaje de N derivado de la fijación de N₂ atmosférico (Cuadro 3) y la más alta cantidad de N derivado de la fijación (Cuadro 4). Esto es un indicativo de que el cultivar ON 30(4) presenta una buena capacidad de fijación de N prove-

Cuadro 4 Grupo de medias para N derivado del fertilizante aplicado (Ndfert) Kg N ha⁻¹) y N derivado de la fijación de N₂ atmosférico (Ndfij) (Kg N ha⁻¹) en tallo+hojas (T+H) y vainas de los cultivares de frijol y sorgo.

Cultivares	Dosis N (Kg ha ⁻¹)	Ndfert		Ndfij	
		T+H	vaina	T+H	vaina
On Criollo	20	10.2 a	3.1 a	61.3 a	14.4 a
On 30(1)	20	8.3 a	4.5 a	42.2 a	22.3 a
ON 30(4)	20	11.6 a	2.7 b	51.6 a	16.2 a
ON 30(5)	20	10.8 a	4.7 a	33.0 a	21.0 a
ON 30(6)	20	9.3 a	4.3 a	52.7 a	23.5 a
Sorgo	100	60.9	-	-	-

Análisis estadístico para frijol solamente

Medias con la misma letra no difieren significativamente al nivel α0.05 según la Prueba "T"

niente de la atmósfera. En relación a la variable cantidad de N derivado del fertilizante en tallos+hojas y cantidad de N fijado (Kg N ha^{-1}) no se detectaron diferencias significativas entre los cultivares.

Rendimiento en grano, utilización del N y eficiencia de fijación.

En cuanto a la variable rendimiento en grano (Cuadro 5), no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los

Cuadro 5 Grupo de medias para rendimiento en grano (Kg ha^{-1}) y la relación Kg semilla / Kg N fijado para cada uno de los cultivares de frijol.

Cultivares	Rendimiento promedio de semilla (Kg ha^{-1})	Relación Kg semilla / Kg N ₂ fijado
ON Criollo	1167.5 a	15.43
ON 30(1)	1021.1 a	15.82
ON 30(4)	1188.0 a	17.51
ON 30(5)	1330.0 a	24.61
ON 30(6)	1140.7 a	14.96

Medias con letras iguales no difieren significativamente al nivel $\alpha 0.05$ según Prueba "T"

diferentes cultivares de frijol utilizados. Al establecer la relación Kg de semilla / Kg de N₂ fijado (obtenido a partir de los Cuadros 4 y 5) cultivares con valores altos en cuanto a esta relación sugieren una alta conversión de N fijado por Kg de semilla.

El estudio de los componentes del rendimiento, como porcentaje de

N (Cuadro 2), el porcentaje de N₂ fijado (Cuadro 3), el rendimiento de materia seca, de N total y de grano (Cuadro 1 y 5), indican algunas diferencias varietales en la eficiencia de conversión de N a materia seca. Todos los cultivares tuvieron rendimientos en grano que no difieren significativamente. Sin embargo, el ON 30(5) el cual arrojó el rendimiento en grano más alto, tuvo el más bajo porcentaje de N (estadísticamente significativo) en tallos+hojas y presentó uno de los más altos

rendimientos de N total en la vainas. Esto sugiere que este cultivar, bajo las condiciones en las que se realizó el experimento, podría ser un eficiente convertidor de N ante que un acumulador. El ON 30(4) y el ON Criollo, los cuales presentan rendimiento en grano similares, pero más bajos que el ON 30(5) (Cuadro 5), tuvieron uno de los porcentajes de N más altos en tallos+hojas (Cuadro 2)

y los más bajos en rendimiento de N total en las vainas (Cuadro 1), lo cual indica que estos cultivares probablemente tienen la tendencia a

comportarse más como acumuladores que como convertidores de N en semilla.

Conclusiones

- 1 El cultivar ON 30(5) fue el que produjo el mayor contenido de materia seca, mientras que el contenido más bajo lo produjo el cultivar ON 30(4).
- 2 En relación al porcentaje de N en tallos+hojas, el cultivar ON Criollo mostró el más alto valor (3.05% N) y el ON 30(5) el valor más bajo (2.15% N).
- 3 En cuanto a la fijación de N₂ atmosférico, todos los cultivares evaluados presentaron un alto porcentaje de fijación.
- 4 Los cultivares ON 30(1) y ON 30(5) presentaron los valores más altos de utilización del N proveniente del fertilizante aplicado y el ON 30(4) presentó el valor más bajo de utilización.
- 5 El método de dilución isotópica ofrece un gran potencial para la evaluación final de los cultivares ya que se puede distinguir entre el nitrógeno fijado y el derivado de otras fuentes, tales como suelo y fertilizante.
- 6 Se recomienda para futuras investigaciones relacionadas con el uso de técnicas isotópicas, la selección de un adecuado cultivo de referencia, como un cultivar de frijol que no nodule, que permita obtener valores de fijación más precisos.

Literatura citada

1. Bergersen, F.J. (Ed) 1980. Methods for evaluating Biological Nitrogen Fixation, John Wiley & Sons, Chichester, 701 p.
2. Bremner, J.M. and Hauck. 1982. Advances in methodology for research on nitrogen transformations in soils. In F.J. Stevenson (Ed). Nitrogen in Agricultural soils. ASA-CSSA-SSSA, Madison, Wisconsin, USA. Agronomy Monograph No. 22. pp:467-502.
3. Broadbent, F.E., T. Naskashima and G.Y. Chang. 1982. Estimation of nitrogen fixation of isotope dilution in field and greenhouse experiments. Agronomy Journal. 74(4):625-628.
4. Chalk, P.M. 1985. Estimation of N₂ fixation by isotope dilution: An appraisal of techniques involving N¹⁵ enrichment and their application. Soil Biology and Biochemistry. 17(3):389-410.
5. Comisión para el Plan Nacional de Aprovechamiento de los Recursos Hidráulicos (COPLANARH) 1974. Inventario Nacional de Tierras. Región del Lago de Maracaibo. Publicación No. 34. Caracas, Venezuela.
6. Danso, S.K.A. 1986. Estimation of N₂-fixation by isotope dilution: an appraisal of techniques involving N¹⁵ enrichment and their application - comments. Soil Biology and Biochemistry. 18(3): 243-244. Review.
7. Deibert, E.J., M. Bijeriego and R.A. Olson 1979 Utilization of N¹⁵ fertilizer by nodulating and non nodulating soybean isolines. Agronomy J. 71(6): 717-723.

8. EweL, J. y A. Madriz. 1968. Zonas de vida de Venezuela. Ministerio de Agricultura y Cría, pp 1264. Caracas. Venezuela.
9. Faust, H. (Ed) 1981. Interregional Training Course on the use of N^{15} on soil Science and Plant Nutrition. ZFI-Mitteillungen N. 38. Academy of Sciences. GDR. Leibzig. 1-181.
10. Fried. M. and H. Broeshart. 1967. The soil plant system in relation to inorganic nutrition. 358 pp. Academic press, New York and London.
11. Fried, M. and H. Broeshart. 1975. An independent measurement of the amount of nitrogen fixed by a legume crop. *Plant and Soil*. 43(3): 707-711.
12. Fried, M. and H. Broeshart. 1981. A further extension of the method for independently measuring the amount of nitrogen fixed by a legume crop. *Plant and Soil*. 62:331-336.
13. Fried. M., S.K.A. Danso and F. Zapata. 1983. The methodology of measurement of N_2 fixation by non-legumes as inferred from field experiments with legumes. *Canadian J. of Microbiology*. 29. 1053-1062.
14. Fried. M. and V. Middelboe. 1977. Measurement of amount of nitrogen fixed by a legume crop. *Plant and Soil*. 47(3):713-715.
15. Fried. M. and L.A. Dean. 1952. A concept concerning the measurement of available soil nutrient. *Soil Science*. 73(4): 263-271.
16. Friedler. R. and G. Proksch. 1975. The determination of N^{15} by emission and mass spectrometry in biochemical, analysis. A review. *Anal. Chim. Acta*. 78. 1-62.
17. Hardarson, G. 1985. The use of N^{15} methodology to assess N fixation and guideline for improvement of N_2 fixation in grain legumes. Biological Nitrogen fixation of grain legumes. FAO/LAEA Agricultural Biotechnology Laboratory. Seibersdorf. Vienna, Austria.
18. Hardarson, G., F. Zapata and S.K.A. Danso. 1984. Field evaluation of symbiotic nitrogen fixation by rhizobial strains using N^{15} methodology. *Plant and Soil*. 82:369-375.
19. Henzell, E.F., A.E. Martin, P.J. Ross and K.P. Haydock. 1968. Isotopic studies on the uptake of nitrogen by pasture plants. IV. Uptake of nitrogen from labelled plant material by Rhodes grass and siratro. *Australian J. of Agricultural Research*. 19(1):66-77.
20. International Atomic Energy Agency. 1983. A guide to the use of nitrogen-15 and radioisotopes in studies of plant nutrition: calculations and interpretation of data. Technical document-288. 65 pp. Vienna, Austria.
21. Ministerio de Minas e Hidrocarburos. 1956. Léxico Estratigráfico de Venezuela. Dirección de Geología. Publicación Especial. No. 1. pp: 727. Caracas, Venezuela.
22. Peters, W., N. Noguera, G. Materano y G. Romero. 1983. Estudio detallado de suelos de la Granja Experimental "Ana María Campos" de la Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia. Facultad de Agronomía. Maracaibo.
23. Phillipps, D.A. and Bennett, J., 1978. Measuring symbiotic nitrogen fixation in rangeland plots of trifolium subterranum, L. and Bromus mollis L. *Agronomy J.* 70(4):671-674.
24. Reichardt, K., G. Hardarson, F. Zapata, C. Kirda and S.K.A. Danso. 1987. Site variability effect on field measurement of symbiotic nitrogen fixation using the isotope dilution method. *Soil Biology and Biochemistry*. 19 (4):243-244.
25. Rennie, R.J., 1986. Comparison of methods of enriching a soil with N^{15} to estimate dinitrogen fixation by isotope dilution. *Agronomy J.* 78(5): 785-790.
26. Rennie, R.J., S. J.B. Dubetz, Bole and H.H. Muendel. 1982. Dinitrogen fixation measured by N^{15} isotope dilution in two Canadian soybean cult. vars. *Agronomy J.* 74(4): 725-730.
27. Rennie, R.J. and D.A. Rennie. 1983. Techniques for quantifying N^2 fixation in association with field legumes and greenhouse conditions. *Canadian Journal of Microbiology*. 29:1022-1035.
28. Richards, J.E. and R.J. Soper. 1979. Effects of N fertilizer on yield, protein content, and symbiotic N fixation in fababean. *Agronomy J.* 71(5):807-811.

29. Vargas, A., E. Nucette y R. López. 1988. Estudio especial de suelos y caracterización física Proyecto Centro Frutícola. MARNR. División de Información e Investigación del Ambiente. Zona 5. Maracaibo, Venezuela.
30. Vasilas, B.L. and G.E. Ham. 1984. Nitrogen fixation in soybeans: an evaluation of measurement techniques, *Agronomy J.* 76(5):759-764.
31. Wagner, G.H. and F. Zapata. 1982. Field evaluation of reference crops in the study of nitrogen fixation by legumes using isotope techniques. *Agronomy J.* 74(4):607-612.
32. Witty, J.F., 1983. Estimating N₂ fixation in the field using N¹⁵ labeled fertilizer. Some problems and solutions. *Soil Biology and Biochemistry.* 15(6):631-639.