

Inoculación y Riego con Aguas Residuales de *Casuarina* en Vivero¹

H. Ramírez Saad*, M. Valdés Ramírez**, R. Cruz Cisneros***

ABSTRACT

A nursery assay was carried out to evaluate the growth of *Casuarina equisetifolia*, inoculated with *Frankia* and/or ectomycorrhizal and VAM fungi. Initial irrigation was done with sewage water. During the first months of growth, waste-water induced dwarf seedlings; establishment of plant-microorganism symbiosis was also deficient (low percentage of nodulated plants, low nodule numbers and low degree of mycorrhization). After the rainy season, statistically significant differences were observed among treatments in terms of biomass; treated plants with *Frankia* + *Pisolithus tinctorius* increased by 350% in relation to the control plants; this treatment also greatly increased nodule biomass.

RESUMEN

Se montó un ensayo en vivero con el fin de evaluar el desarrollo de *Casuarina equisetifolia*, cuando es inoculada con *Frankia* y/o hongos endo- y ectomicorrízicos, regándola con aguas residuales desde el principio de su desarrollo. Este tipo de riego, durante los primeros meses de crecimiento, produjo enanismo en las plántulas, y estableció deficientemente las simbiosis planta-microorganismo, es decir, los porcentajes de plantas con nódulos fueron bajos, su número escaso y los niveles de micorrización pequeños. Después de la estación lluviosa se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos, en términos de su biomasa, registrándose un incremento de 350% entre las plantas-testigo y las inoculadas con *Frankia* y *Pisolithus tinctorius*. Con este último tratamiento el tamaño de los nódulos también se incrementó considerablemente.

Palabras clave: *Casuarina equisetifolia*, *Frankia*, *Glomus intraradices*, *Pisolithus tinctorius*, ectomicorriza, micorriza vesículo-arbuscular, plantas actinorrízicas.

INTRODUCCION

Casuarina es un árbol capaz de fijar el nitrógeno atmosférico, gracias a su asociación con *Frankia*, bacteria filamentosa, Gram-positiva. Este árbol, por asociación con un actinomiceto, pertenece al llamado grupo de plantas actinorrízicas (24), nombre genérico para más de 200 especies vegetales, distribuidas en 24 géneros y 8 familias de plantas superiores.

La infección de la planta con la bacteria tiene lugar en las raíces y provoca la proliferación anormal de las células radiculares para formar, como las leguminosas, nodosidades o nódulos en cuyo interior ocurre la fijación del N molecular (23).

Las plantas actinorrízicas son utilizadas tradicionalmente en muchos países de diferentes maneras: como cultivo primario para madera y pulpa (*Casuarina* y *Alnus*); como plantas nodrizas (*Eleagnus*); como plantaciones en la recuperación de suelos (*Eleagnus*, *Purshia*), y para evitar la erosión del suelo (*Hippophäe*) (2). La *Casuarina* es plantada a lo largo de costas y desiertos, pues puede fijar dunas, aminorar la velocidad del viento y disminuir la aspersión de las sales; un ejemplo es la llamada "muralla verde de *Casuarina*", franja de 0.5 km a 5 km de ancho por 3000 km de largo, localizada en las costas del Mar de China Meridional (16).

Los árboles fijadores de N pueden desempeñar un papel importante en los países tropicales, no sólo como productores de madera y de leña sino también como

¹ Recibido para publicación el 25 de octubre de 1991. Este trabajo fue patrocinado por la *National Academy of Sciences/National Research Council* (EE UU.) mediante un donativo de la Agencia Internacional para el Desarrollo (AID). Los autores agradecen al Dr. Dwigth Baker de la Universidad de Yale, por haber proporcionado la cepa de *Frankia* Cc13, además de sus valiosos consejos para el manejo de estas actinobacterias; a la M.Sc. Susan Parent de *Premier Peat Moss Ltd.* (Canadá), por la generosa donación del inoculante de *G. intraradices*; a J.M. Matus y a M. Quintos Escalante, por su asistencia en laboratorio, y al personal del vivero Los Remedios, por su apoyo en el mantenimiento de las plantas.

* Depto. de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana, Xochimilco, Méx.

** Depto. de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Apartado Postal 63-246, México, D.F. 02800, Méx.

*** Depto. de Botánica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México, D.F., Méx.

componentes mayores de la producción agrícola por las siguientes razones:

- Son plantas capaces de crecer en suelos muy pobres o totalmente desprovistos de N; es decir, degradados e inutilizables para la agricultura (6).
- Al fijar grandes cantidades de N pueden, en buena medida, regenerar suelos degradados mediante su aporte de materia orgánica, permitiendo la reinstalación de cultivos anuales en rotación o de cultivos intercalares en sistemas agroforestales (6, 16).
- Este grupo de plantas, también, es capaz de asociarse con hongos micorrícicos; la presencia de estos microorganismos en sus raíces les confiere una mejor nutrición mineral, en virtud de su mayor eficiencia en la absorción y transporte de nutrimentos del suelo (4, 5, 20).

Se ha comprobado que, en muchos viveros mexicanos donde se produce *C. equisetifolia* (L.), la práctica de inoculación con *Frankia* en cualquiera de sus variantes es desconocida, por lo que, cuando las plantas son transportadas al lugar de reforestación, llevan sus raíces desprovistas de nódulos y una vez trasplantadas no están en posibilidad de adquirir el simbiote, ya sea por la edad y el desarrollo de la planta misma, o porque los suelos carecen de cepas nativas del actinomiceto capaces de infectar espontáneamente las plantas.

Otro problema importante, presente en muchos viveros del país, es el abastecimiento de agua para riego, el cual se hace con aguas residuales. Sólo en el Valle de México existen 12 plantas para tratamiento de este tipo de aguas, cuyo destino principal es el riego de jardines públicos y viveros. El tratamiento consiste básicamente en la eliminación de sólidos y, eventualmente, del color.

En los viveros de algunos estados, se riega incluso con aguas residuales crudas, aunque en general se trata de evitar este tipo de riego para las plantas jóvenes, ya que en ocasiones no existe otra opción. Este problema seguramente se acentuará en un futuro cercano, puesto que la situación actual del suministro general de agua es muy precaria.

Se decidió hacer un ensayo en vivero, con el propósito de producir plantas de *C. equisetifolia* inoculadas, tanto con *Frankia* como con hongos micorrizógenos, sometiéndolas desde un principio a riego con aguas residuales, tal como se procede actualmente en

algunos viveros y como, probablemente, se procederá en muchos viveros del país.

MATERIALES Y METODOS

Fase de laboratorio

Preparación de inoculantes

Frankia CcI3. Se cultivó en medio DPM líquido (1), en sistema estacionario a 28 °C, propagándose durante cuatro meses mediante pases sucesivos de 10 d cada uno; la cosecha se hizo por centrifugación a 500 rpm y lavado con solución salina estéril (0.85%). El paquete celular obtenido se pasó por un homogeneizador y se diluyó 1:100 con solución salina estéril. Esta suspensión se dividió en cuatro fracciones iguales, las cuales se aplicaron a las plantas de los tratamientos respectivos, previa dilución.

G. intraradices. Se utilizó un inoculante, que contiene raicillas de poro infectadas con el hongo en una base de turba neutralizada.

P. tinctorius. Se cultivo durante tres meses en frascos conserveros de 1 l con solución nutritiva de Melin y Norkrans, en soporte de vermiculita-turba (15). Se obtuvieron 700 g en base húmeda de soporte que contenía micelio del hongo ectomicorrícico, dividiéndolo posteriormente en dos fracciones para los tratamientos respectivos.

Ensayo en vivero

Ubicación

El vivero Los Remedios pertenece al Programa de Desarrollo Rural del Estado de México; se encuentra localizado en el Municipio de San Juan Totoltepec, (19° 29'N, 99° 16'O), al NO de la zona conurbada de la ciudad de México, con una precipitación media anual de 790 mm y una temperatura promedio de 15.6 °C, que corresponde a un clima templado subhúmedo (10).

Análisis físico-químico del suelo

El suelo que se utiliza en el vivero para llenar los envases, es recolectado en un bosque de pino-oyamel, el cual se mezcla en partes iguales con la lama de río

(aluvión) y resulta un suelo con textura de arena migajosa y pH de 5.6 (7); con 1.59 ppm de P asimilable considerado como muy bajo (11) y 9% de materia orgánica, que le confiere la característica de extremadamente rico (11).

Tratamiento e inoculación

Se recolectó semilla de *C. equisetifolia* proveniente de un solo árbol, que fue sembrada en un semillero previamente fumigado con Basamide (BASF Mexicana) a razón de 15 g/m², para prevenir una infección temprana por hongos micorrizógenos nativos o patógenos.

Las plántulas de 70 d fueron trasplantadas a envases de vivero, llenos de suelo fumigado previamente con Basamide (75 g/m²). Se establecieron los siguientes tratamientos:

- 1) *C. equisetifolia* sin inocular (testigo)
- 2) *C. equisetifolia* + *Frankia* CcI3
- 3) *C. equisetifolia* + *G. intraradices*
- 4) *C. equisetifolia* + *P. tinctorius*
- 5) *C. equisetifolia* + *Frankia* CcI3 + *G. intraradices*
- 6) *C. equisetifolia* + *Frankia* CcI3 + *P. tinctorius*.

Cada tratamiento constó de 200 plantas, divididas en cuatro grupos repartidos por distribución de bloques al azar. La inoculación con *Frankia* se hizo en el momento del trasplante del almácigo al envase de vivero, diluyendo la fracción correspondiente de la suspensión en una regadera manual con 10 l de agua, y regando lo más homogéneamente posible las 200 plantas de cada tratamiento.

G. intraradices se inoculó tomando con una cucharilla 0.25 g del inoculante, depositándolo en el hoyo en que se transplantó la plántula.

De igual forma se aplicaron 1.5 g aproximadamente del inoculante que contenía el hongo ectomicorrizógeno *P. tinctorius*.

Riego

Todos los bloques de plantas recibieron riego con aguas residuales por inundación del terreno, una vez a

la semana durante los primeros ocho meses, hasta la llegada de la época de lluvias, en la que recibieron agua según la precipitación natural.

Evaluación

Transcurridos 10 meses del trasplante e inoculación se efectuó la primera evaluación con 15 plantas de cada tratamiento. La segunda se hizo seis meses después, pasada la estación de lluvias.

Las variables consideradas fueron la altura de la parte aérea y el diámetro del tallo a la altura del cuello, como medias necesarias para calcular el volumen, mediante la fórmula D^2H (21), peso seco de la parte aérea, número de nódulos por planta, porcentaje de plantas noduladas y porcentaje de micorrización VA; éste último se determinó mediante el montaje de raicillas en portaobjetos, teñidas previamente según Phillips y Hayman (18).

RESULTADOS

Toda la plantación mostró escaso crecimiento desde el trasplante e inoculación hasta iniciado el siguiente período de lluvias —fecha de la primera evaluación.

Seis meses después, en la segunda evaluación, se hizo patente la respuesta de las plantas en su desarrollo. En la primera, las variables volumen y peso seco, consideradas como indicadoras del crecimiento, no mostraron diferencias estadísticas significativas. A partir del final del período de lluvias, y en el momento de la segunda evaluación, las diferencias en el crecimiento fueron notables, que varió en función de los tratamientos.

Nodulación

En la primera evaluación se observó un porcentaje bajo de plantas con nódulos, tanto en los tratamientos inoculados sólo con *Frankia*, como con la bacteria + *G. intraradices*; pero cuando se inoculó junto con *P. tinctorius*, el número de plantas noduladas llegó a 93%, aunque en este mismo período los valores promedio del número de nódulos por planta fueron bajos, según se aprecia en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Valores de nodulación y micorrización VA de *C. equisetifolia* cultivada en vivero, regadas al inicio con aguas negras (1a evaluación) y con agua de lluvia (2a evaluación).

	1a Evaluación			2a Evaluación		
	Plantas noduladas (%)	Nódulos/planta	Micorrización (%)	Plantas noduladas (%)	Nódulos/plantas	Micorrización ((%)
Testigo	0	0	4.28	53	0.73	6.83
<i>Frankia</i>	40	0.9	7.59	100	8.8	4.87
<i>G. intraradice</i>	0	0	22.4	0	0	12.75
<i>P. tinctorius</i>	0	0	43.2	13	0.13	10.55
<i>Frankia</i> + <i>G. intraradices</i>	40	0.6	6.5	100	20.53	19.25
<i>Frankia</i> + <i>P. tinctorius</i>	93.3	4.2	6.3	100	28.93	18.55

Los valores son promedio de 15 plantas muestreadas

Al final del experimento, se registraron aumentos notables tanto en la proporción de plantas noduladas, que fue de 100% en todos los tratamientos inoculados con *Frankia*, como en el número promedio de nódulos por planta, el cual sufrió incrementos respecto de la primera evaluación; en este punto destacaron como valores más altos que correspondieron a las inoculaciones dobles, *Frankia* + *G. intraradices* y *Frankia* + *P. tinctorius*, que comparados con el tratamiento inoculado únicamente con *Frankia* mostraron valores, en el número promedio de nódulos por planta, incrementados en 2.3 y 3.3 veces, respectivamente (Cuadro 1).

Es importante señalar que el tamaño de los nódulos en las inoculaciones dobles también fue mayor que cuando se inoculó solo con *Frankia*; destacando entre ellos los nódulos correspondientes al tratamiento *Frankia* + *P. tinctorius* cuyo tamaño fue de 5 veces a 10 veces mayor que los nódulos de las plantas inoculadas únicamente con *Frankia* (datos no consignados).

Micorrización

Todas las plantas resultaron micorrizadas por hongos VA, aun aquellas con tratamientos no inoculados, aunque la proporción de raicillas infectadas mostró, en general, valores bajos (Cuadro 1).

Volumen

Se registraron incrementos importantes en la segunda evaluación; destacaron los tratamientos inoculados con *Frankia* sola y en combinación con *P. tinctorius*, cuyos incrementos fueron de 515% y 350% respectivamente, de acuerdo con la primera evaluación; mientras que los tratamientos testigo y *P. tinctorius* solo, arrojaron los incrementos más bajos. Las diferencias significativas estadísticamente se dieron entre las plantas testigo y las inoculadas con *Frankia* + *P. tinctorius* (Cuadro 2).

Cuadro 2. Valores de crecimiento de *C. equisetifolia* cultivada en vivero, regada al inicio con aguas negras (1ª evaluación) y con agua de lluvia (2ª evaluación).

Tratamiento	1ª Evaluación		2ª Evaluación	
	Peso seco (g)	Volumen (cm ³)	Peso seco (g)	Volumen (cm ³)
Testigo	3.05 abc	15.54 ab	7.90 a	29.99 a
<i>Frankia</i>	1.72 a	8.90	13.47 ab	54.71 abc
<i>G. intraradice</i>	3.51 cd	14.17 ab	12.26 ab	50.37 abc
<i>P. tinctorius</i>	5.38 d	22.76 b	9.33 ab	39.91 ab
<i>Frankia</i> + <i>G. intraradices</i>	3.25 bcd	17.10 ab	12.95	59.11 bc
<i>Frankia</i> + <i>P. tinctorius</i>	3.46	10.04 ab	15.73 b	72.61 c

Los valores son el promedio de 15 plantas. En cada columna los valores con la misma letra, no presentan diferencia estadística significativa ($P = 0.05$), según la prueba de Scheffé.

Peso seco

El comportamiento fue similar al de las otras variables, es decir en la primera evaluación el peso seco presentó valores bajos, que se incrementaron notablemente para la segunda evaluación, sobre todo en el caso de las plantas inoculadas solamente con *Frankia*, cuyo aumento fue del 683 por ciento.

Al final del ensayo, es decir, al cabo de 16 meses, los valores de crecimiento de las plantas expresados en peso seco mostraron diferencias estadísticas significativas ($P = 0.05$) entre los tratamientos; de ellas destacaron las encontradas entre las plantas testigo y las inoculadas con *Frankia* + *P. tinctorius*. (Cuadro 2).

DISCUSION

El objetivo primordial de este estudio fue evaluar el desarrollo de *C. equisetifolia* inoculada con diferentes microorganismos simbioses (*Frankia*) y hongos ecto- y endomicorrícicos, y regada con aguas residuales desde el inicio de su crecimiento.

Los ensayos al inocular *Casuarina* en vivero, realizados anteriormente en otros países, se han efectuado con riego de agua corriente (5). Los resultados obtenidos permiten indicar qué resultados se pueden esperar de la producción de plantas en muchos viveros, en donde se establecerá el riego con aguas residuales y en otros donde ya se ha establecido.

Los efectos sugieren que este tipo de riego sobre las plántulas es negativo, pues les indujo enanismo en el inicio del desarrollo, fenómeno que no fue determinado en ensayos previos realizados con variedades de *Casuarina* de mayor edad y riego inicial con agua corriente (19). Estas observaciones fueron previamente señaladas por los trabajadores del vivero, no sólo en *Casuarina*, sino también para otras plantas producidas en el mismo lugar. Otro hecho notable fue que las asociaciones microbianas no se establecieron plenamente durante los primeros meses del desarrollo de la planta, sino después de fijada la estación lluviosa.

Lo anterior podría explicarse si se considera que la precipitación pluvial provoca un lavado de sales, metales pesados y materiales orgánicos coloidales. Estos componentes, aislada o conjuntamente, están presentes en las aguas residuales (17, 22), afectando de alguna manera el desarrollo inicial de las plántulas y el estable-

cimiento de las simbiosis. También, un exceso de material orgánico podría conducir a una alta concentración de CO_2 en el suelo e inhibir el desarrollo radicular (14). Al respecto habría que considerar tanto el exceso de materia orgánica contenida en la mezcla de suelo en el envase del vivero, como una cantidad variable, pero siempre presente en el agua de riego.

Es pertinente señalar que cualquiera sea el factor o los factores inhibidores, el grado de afectación en esta primera etapa del crecimiento hacia la asociación tripartita *Casuarina* - *Frankia* - *Pisolithus* es bajo, ya que la proporción de plantas noduladas cuando se inocula con ambos microorganismos es de 93%, aunque el número de nódulos por planta es sólo de cuatro; este es el valor más alto obtenido en las condiciones adversas de la primera evaluación (Cuadro 1).

En la segunda evaluación, se observó que algunas plantas de tratamientos no inoculados formaron nódulos, debido, probablemente, al efecto del tipo de riego por inundación de terreno y a los desniveles del mismo. Se incrementó también la nodulación y micorrización de las plantas inoculadas. La nodulación creció en mayor proporción cuando se inocularon con *Frankia* y un hongo micorrícico juntos. El mayor aumento, no sólo en el número de nódulos sino también en su tamaño, lo dio la inoculación con *P. tinctorius*. Esto podría explicarse por el efecto combinado de una mejor nutrición mineral proporcionada por el micelio extensivo exterior del hongo micorrícico (3, 5) y por la producción fúngica de fitohormonas (8). Estos atributos permitirían considerar a *P. tinctorius*, como microorganismo de los llamados "helpers" (9, 12, 13).

El porcentaje de micorrización VA se incrementó especialmente en las plantas tratadas con inoculaciones dobles, lo que podría significar un estímulo de la bacteria hacia los hongos micorrizógenos. Este efecto ha sido observado por Barea *et al.* (3) en leguminosas inoculadas con *Rhizobium* y hongos MVA.

Finalmente se puede observar que, en las condiciones particulares de este ensayo, la producción primaria de las plantas, medida como peso seco o volumen, registró incrementos notables en todos los tratamientos, con respecto de las plantas-testigo no inoculadas, que es la forma habitual de producción en el vivero. Sin embargo se debe destacar que los aumentos estadísticamente significativos ($P = 0.05$) se obtuvieron al inocular *C. equisetifolia* simultáneamente con *Frankia* + *P. tinctorius*.

LITERATURA CITADA

1. BAKER, D.D.; O. KEEFE, D. 1984. A modified sucrose fractionation procedure for isolation of *Frankia* from actinorhizal root nodules and soil samples. *Plant and Soil* (The Netherlands) 78:23-28.
2. BAKER, D.D. 1986. Actinorhizal trees useful in cool to cold regions. *Nitrogen Fixing Trees Highlights* (EE.UU.) 86/03.
3. BAREA, J.M.; AZCON - AGUILAR, C.; AZCON, R. 1987. Vesicular - arbuscular mycorrhiza improve both symbiotic N₂ fixation and N uptake from soil as assessed with a ¹⁵N technique under field conditions. *New Phytologist* (U.K.) 106:717-725.
4. DIAGME, O.; LE TACON, F. 1982. Interactions between fertilization, mycorrhiza formation and nodulation in *Alnus incana*. *Coloques de l'INRA* (France) 13:199-206.
5. DIEM, H.G.; GAUTHIER, D. 1982. Effect de l'infection endomycorhizienne (*Glomus mossae*) sur la nodulation et la croissance de *Casuarina equisetifolia*. *Comptes Rendus de l'Académie de Sciences de Paris* (France) 249(3):215-218.
6. DOMMERGES, Y. 1987. Comment accroître la fixation symbiotique de l'azote par les arbres en milieu tropical? In *Séminaires: Les arbres fixateurs d'azote et l'amélioration biologique de la fertilité du sol*. Actes France, ORSTOM p. 18-32.
7. FOTH, H.D.; JACOBS, H.S.; WITHIEE, L.V. 1973. *Laboratory manual for introductory soil science*. 3th Ed. USA, Iowa, WCB.
8. FRANKENBERGER JUNIOR, W.T.; POTH, M. 1987. Biosynthesis of indole-3-acetic acid by the pine ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. *Applied and Environmental Microbiology* (USA) 53:2908-2913.
9. GARBAYE, J.; BOWEN, G.D. 1987. Effect of different microflora on the success of ectomycorrhizal inoculation of *Pinus radiata*. *Canadian Journal of Forest Research* (Can.) 17:941-943.
10. GARCIA, E. 1988. Modificación al Sistema de Clasificación climática de Köppen para adaptarlo a las condiciones de la República mexicana. Enriquetta García (Ed.). México, D.F. 232 p.
11. JACKSON, M.L. 1982. Análisis químico de suelos. Barcelona, Omega. p. 67-71, 203-213, 300-304.
12. KNOWLTON, S.; BERRY, A.; TORREY, J.G. 1979. The role of rhizosphere microorganisms in nodule formation in *Alnus rubra* Bong. In *Symbiotic Nitrogen fixation in the management of temperate forest*. J.C. Gordon, C.T. Wheeler, D.A. Perry (Eds.) Corvallis, Oregon, USA. Oregon State University. p. 479-480.
13. KNOWLTON, S.; BERRY, A.; TORREY, J.G. 1990. Evidence that associated soil bacteria may influence root hair infection of actinorhizal plants by *Frankia*. *Canadian Journal of Microbiology* (Can.) 26:971-977.
14. LEVITT, J. 1980. *Responses of plants to environmental stress II*. 2nd Ed., Orlando, USA, Academic Press Inc. p. 225-226.
15. MARX, D.H.; KENNEDY, D.S. 1982. Production of ectomycorrhizal fungus inoculum. In *Methods and principles of mycorrhizal research*. N.C. Shennik (Ed.). St. Paul, Minn., USA. The American Phytopathological Society. p. 131-147.
16. NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. 1984. *Casuarinas: Nitrogen-fixing trees for adverse sites*. National Academy Press. Washington, D.C. 118 p.
17. NIELSEN, J.S.; HRUDEY, S.E. 1983. Metal loadings and removal at a municipal activated sludge plant. *Water Research* (USA) 17:1041-1052.
18. PHILLIPS, J.M.; HAYMAN, D.S. 1970. Improved procedure for cleaning tree roots and staining parasitic and vesicular - arbuscular mycorrhizae fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* (U.K.) 55:158-161.
19. RAMIREZ-SAAD, H.; VALDES, M. 1989. Sewage watering at the nursery improves growth and nodulation of Casuarinas. *Nitrogen Fixing Tree Research Reports* (USA) 7:87-88.
20. ROSE, S.L.; YOUNGBERG, C.T. 1980. Tripartite associations in snowbrush (*Ceanothus velutinus*): Effect of vesicular - arbuscular mycorrhizae on growth, nodulation, and nitrogen fixation. *Canadian Journal of Botany* 59:34-39.
21. RUEHLI, E.; MARX, D.H.; MUSE, H.D. 1984. Calculated nondestructive indices of growth response for young pine seedlings. *Forest Science* (USA) 30:469-474.
22. SMOCK, L.A.; KUENZLER, F.J. 1983. Seasonal changes in the forms and species of iron and Mn in a seasonally-inundated floodplain swamp. *Water Research* (USA) 17:1287-1294.
23. TORREY, J.G. 1978. Nitrogen fixation by actinomycete-nodulated angiosperms. *BioScience* (USA) 28:585-592.
24. TORREY, J.G.; THEPKEMA, J.D. 1979. Symbiotic nitrogen fixation in actinomycete-nodulated plants. *Botanical Gazette* (USA) Suppl. 140:i-ii.