

NODULACION DE *ELAEAGNUS ANGUSTIFOLIA* L. EN EL BOSQUETE DE VALDEMORO (MADRID)

M. F. SCHMITZ¹, Y. ARANDA¹, M. L. ESTEBAN¹ y F. BERMÚDEZ DE CASTRO¹

RESUMEN

Se estudia la distribución del endofito de *Elaeagnus angustifolia* y la capacidad noduladora del suelo en un bosque de Valdemoro (Madrid). La presencia de dicho endofito y su capacidad para inducir nódulos fijadores de nitrógeno es normal y comparable a la de otros lugares con plantas actinorrizas. Se comprueba la relación que existe entre el pH del suelo y su poder nodulador y la influencia de la cobertura arbórea sobre este proceso. Los nódulos obtenidos son efectivos y reducen acetileno a niveles considerados normales en plantas actinorrizas.

INTRODUCCION

Alnus glutinosa (L.) Gaertn. y *Elaeagnus angustifolia* L. fueron las primeras angiospermas no leguminosas en las que se demostró la nodulación radical y la fijación de nitrógeno atmosférico (NOBBE & HILNER, 1904). Sin embargo, los estudios posteriores siguieron dos tendencias muy diferentes, ya que, mientras existen numerosas publicaciones sobre alisos, la literatura científica producida sobre *Elaeagnus* sp. es más bien escasa, sobre todo en lo que se refiere a la investigación del comportamiento de las plantas en condiciones naturales.

En los últimos años se han intensificado los estudios sobre especies de *Elaeagnus* con el fin de investigar los niveles de fijación de nitrógeno, la incidencia del entorno sobre las tasas de diazotrofia, la posibilidad de inoculaciones cruzadas con otros endofitos y su capacidad para crecer en suelos degradados o pobres en nutrientes (RODRÍGUEZ-BARRUECO, 1970; DONOVAN *et al.*, 1976; SILVESTER, 1977; RUFFNER, 1978; FESSENDEN, 1979; RODRÍGUEZ-BARRUECO & MIGUEL, 1979; CARPENTER, 1982), impulsados, quizá, por el interés que diversas especies de *Elaeagnus* tienen como ornamentales y para recuperar suelos degradados. Por ello, hoy día conocemos 26 especies o variedades de *Elaeagnus* con nódulos radicales en las que se han evaluado las tasas de fijación de nitrógeno (UEMURA & SATO, 1975; BOND, 1976; BECKING,

1977; ASPIRAS *et al.*, 1980; BOND & WHEELER, 1980).

En la Península Ibérica se viene empleando habitualmente *E. angustifolia* en parques y jardines y para recuperar márgenes de carreteras; los viveros de entidades oficiales y particulares comercializan un buen número de plantones cada año y en Valdemoro (Madrid) hay un bosque con árboles nodulados que han pasado la etapa de ecesis para entrar en competencia (RON, 1971). Este bosque ha sido reseñado en el Programa Biológico Internacional (IBP) por indicación de Rodríguez-Barrueco, investigador español que colaboró en dicho Programa (BOND, 1976). En este lugar hemos realizado los estudios cuyos resultados discutimos a continuación.

MATERIALES Y METODOS

Localización y descripción de la zona estudiada

El bosque está situado en el término municipal de Valdemoro (coordenadas UTM 30TUK 448492), sobre los sedimentos de un fondo de valle plano, por donde discurre el arroyo de la Cañada. El suelo es un solonchak yesoso, gley alcalino, con gran concentración de sales solubles que eflorescen en la superficie durante el verano. Se encuentra en una pradera juncal salina mediterránea (RIVAS-GODAY & RIVAS-MARTÍNEZ, 1963) estudiada por RON (1971) que constituye un lugar de refugio muy importante para animales, singularmente aves (ESTEBAN *et al.*,

¹ Departamento de Ecología. Facultad de Biología. Universidad Complutense. 28040 Madrid.

1987). Se distinguen tres zonas netamente diferenciadas: A, con 258 árboles ha⁻¹, cobertura arbórea del 60,28%; B, con densidad de 3,3, cobertura del 4,74%, y C, con 8,43 árboles ha⁻¹ y cobertura del 14,58%.

Recogida de muestras del suelo

En cada zona, después de retirar la hojarasca se recogieron muestras de suelo a 5-20 cm de profundidad con una azadilla esterilizada a la llama, unas cerca de la base del tronco y otras fuera del dosel. Cada réplica era la suma de varias muestras elementales.

Cultivo en tierra

Se empleó el método descrito por RODRÍGUEZ-BARRUECO (1968), con las condiciones de cultivo que señala BERMÚDEZ DE CASTRO (1975).

Las plántulas se obtuvieron sembrando semillas de los árboles de Valdemoro tratadas con H₂SO₄ cdo. y agua a 60° C (RODRÍGUEZ-BARRUECO, 1970), en perlabón esterilizado y saturado con solución nutritiva de Crone a 1/4 de su concentración (pH = 5,0) y 1 ml l⁻¹ de oligoelementos de Hoagland. A diario se regaron con la solución indicada, que fue sustituida por Crone con nitrógeno cuando en las plántulas aparecieron las primeras hojas. El trasplante a las macetas con las tierras de Valdemoro se realizó a los treinta días de la germinación, después de lavar las raíces con agua destilada estéril.

Cultivo hidropónico

Cuarenta y cinco días después del trasplante las plantas noduladas se pasaron a recipientes cilíndricos de 12 cm de diámetro y 11 cm de altura, donde se mantuvieron en solución de Crone sin nitrato a la mitad de su concentración habitual.

Análisis

El pH del suelo se midió con un peachimetro en suspensión acuosa (20 g de tierra en 20 ml de agua destilada) después de agitar durante veinte minutos.

Para el análisis de nitrógeno total se utilizó el método de Kjeldahl, determinando el amonio libera-

do con un electrodo específico para amonio ORION 95-10-00 conectado a un mV/pH-metro CRISON DIGIT 501.

La actividad reductora de acetileno (ARA) se evaluó por el método de HARDY *et al.* (1973) y las medidas se realizaron en un cromatógrafo de gases KONIK KNK-2000-SERIES C fabricado por Konik Instruments, S. A., Barcelona, con detector de ionización de llama y columna de Porapak R 80/100 de 150 cm de longitud y 3,2 mm de diámetro, empleando nitrógeno como gas portador.

RESULTADOS

Distribución del endofito nodular

Para determinar la existencia y distribución del endofito se recogieron seis muestras de suelo en cada una de las zonas del bosque, tres a pie de árbol y otras tres lejos del dosel. En la Tabla I se indica la capacidad de los suelos ensayados para producir nódulos en plántulas de *E. angustifolia* y su pH.

Para asegurar que la nodulación no se debía a contaminaciones accidentales entre las muestras, se establecieron controles en perlabón estéril. De esta manera se comprobó que ninguna de las plantas control presentaba nódulos, asegurando así la no contaminación por el microorganismo simbiote que, por salpicadura o a través del agua de drenaje, pudiera haber pasado de tiesto a tiesto.

Para detectar las posibles diferencias entre la capacidad noduladora de las muestras tomadas cerca y lejos del árbol, se compararon las medias de dichos grupos de muestras dentro de cada zona con el estadístico «t» de Student. De esta manera se observó que no existían diferencias significativas entre las muestras recogidas cerca y lejos de los árboles en ninguna de las tres zonas en las que se dividió el área de estudio.

Una vez comprobada la homogeneidad interna de las muestras de las tres zonas consideradas, se realizó la misma prueba entre las zonas para poner de manifiesto una posible capacidad noduladora diferencial (Tabla II). Así, se observó que las plantas cultivadas en suelos procedentes de la zona A presentaban un porcentaje de nodulación significativamente mayor ($p \leq 0,001$) que las plantas cul-

TABLA I
CAPACIDAD NODULADORA Y pH DE LOS SUELOS DEL BOSQUETE DE *ELAEAGNUS ANGUSTIFOLIA* EN VALDEMORO (MADRID)

Origen del suelo	Muestra (1)	Nodulación (%)	pH
Zona A*	1 (-)	80,0	7,7
	2 (-)	90,0	7,7
	3 (-)	70,0	7,7
	4 (+)	100,0	7,9
	5 (+)	100,0	7,8
	6 (+)	55,5	7,9
	\bar{x}	82,85	7,78
Zona B**	1 (-)	40,0	8,0
	2 (-)	44,4	7,8
	3 (-)	33,3	7,8
	4 (+)	50,0	7,9
	5 (+)	37,5	8,0
	6 (+)	50,0	7,9
	\bar{x}	42,53	7,9
Zona C***	1 (-)	100,0	7,8
	2 (-)	100,0	7,8
	3 (-)	60,0	7,8
	4 (+)	70,0	7,8
	5 (+)	100,0	7,7
	6 (+)	70,0	7,9
	\bar{x}	83,33	7,8
Tiestos control	C ₁ §	0,0	
	C ₂	0,0	
	C ₃	0,0	
	C ₄	0,0	
	C ₅	0,0	

* Nodulación escasa en los árboles y abundantes en los arbustos.
 ** Nodulación muy escasa.
 *** Nodulación abundante.
 (1) (-) Muestra recogida lejos del árbol. (+) Muestra recogida a pie de árbol.
 § Los tiestos control contenían perlábón esterilizado.

TABLA II
DIFERENCIAS DE SIGNIFICACION ENCONTRADAS ENTRE LA CAPACIDAD NODULADORA DE LOS SUELOS RECOGIDOS EN LAS ZONAS A, B Y C DEL BOSQUETE DE VALDEMORO Y ENTRE LOS VALORES DE pH DE LOS MISMOS SUELOS AL APLICAR EL TEST «t» DE STUDENT

Capacidad noduladora			pH		
t _{A-B}	t _{A-C}	t _{B-C}	t _{A-B}	t _{A-C}	t _{B-C}
5,18	-0,07	-5,04	-2,15	-0,35	2,24
***	NS	***	*	NS	**

*** Diferencia significativa para $p \leq 0,001$.
 ** Diferencia significativa para $p \leq 0,05$.
 * Diferencia significativa para $p \leq 0,1$.
 NS = Diferencia no significativa.

tivadas en los suelos de la zona B. Lo mismo ocurría con las plantas cultivadas en los suelos de la zona C, en las que el porcentaje de nodulación superaba de manera estadísticamente significativa al de las plantas cultivadas en los suelos de la zona B ($p \leq 0,001$). La comparación realizada entre la capacidad noduladora de las zonas A y C no dio diferencias significativas a un nivel de probabilidad aceptable.

De igual manera se procedió a comprobar las diferencias entre los valores de pH de los suelos muestreados (Tabla II). Los resultados obtenidos indican que el pH de los suelos de la zona B es significativamente mayor que el de la zona A ($p \leq 0,1$) y que el pH de la zona C ($p \leq 0,05$). La comparación realizada entre los pH de las zonas A y C no dio diferencias significativas. Parece existir, pues, una coincidencia entre la capacidad de nodulación de los suelos y su pH, de tal forma que al comparar dos zonas en las que el porcentaje de nodulación es significativamente distinto, el pH también lo es, con valores menores en las zonas en las que la nodulación es mayor, como entre A y B y entre B y C. Sin embargo, cuando no existen diferencias significativas de nodulación, tampoco las hay de pH (zonas A y C).

A la vista de estos resultados y para comprobar si realmente existía variación conjunta en la capacidad noduladora y el pH, se realizó un análisis de regresión lineal simple (Fig. 1). Para comprobar la

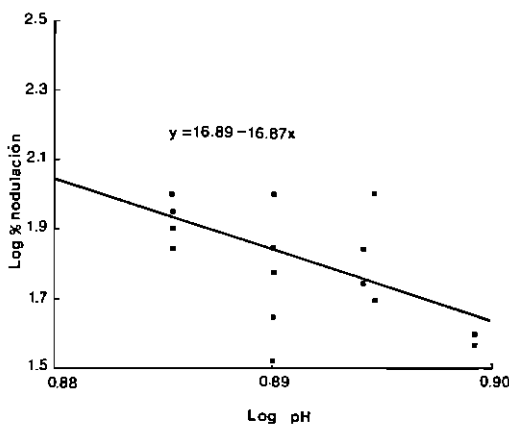


Fig. 1. Porcentaje de nodulación de los suelos del bosque de *E. angustifolia* expresado en función del pH. Datos normalizados mediante transformación logarítmica.

TABLA III
ANÁLISIS DE LA VARIANZA PARA COMPROBAR LA SIGNIFICACION DE LA REGRESION

	s s	d f	M S	F
Variación explicada	0,13	1	0,13	6,72*
Error	0,32	16	0,02	
Total	0,45	17		

* $p \leq 0,019$.

significación de la regresión se utilizó un anova y el estadístico F (Tabla III). Se observa una relación negativa, apareciendo diferencias estadísticamente significativas entre ambas variables.

En la Fig. 2 se comparan los porcentajes de cobertura de los árboles, los de nodulación de las plantas cultivadas en los suelos de las tres zonas del bosque y el pH de estos suelos.

Crecimiento y actividad reductora de acetileno de las plantas noduladas

Las plantas de la experiencia anterior se pasaron a cultivo hidropónico, donde se mantuvieron en so-

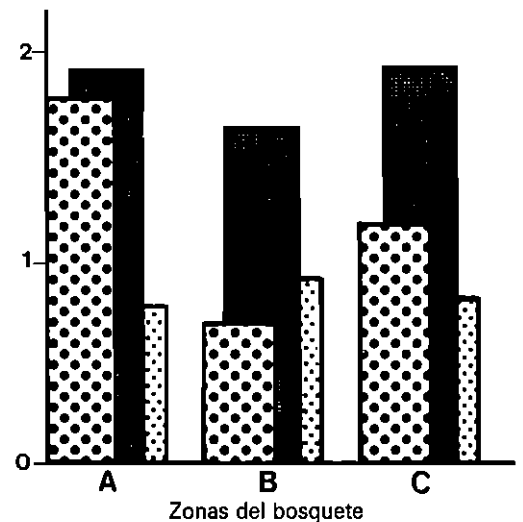


Fig. 2. Valores medios de pH y de los porcentajes de cobertura arbórea y de nodulación inducida por los suelos de las tres zonas en las que se ha dividido el bosque de *E. angustifolia* de Valdemoro. Los resultados se expresan en logaritmos decimales. [puntos] pH, [rayas] cobertura arbórea, [sólido] nodulación.

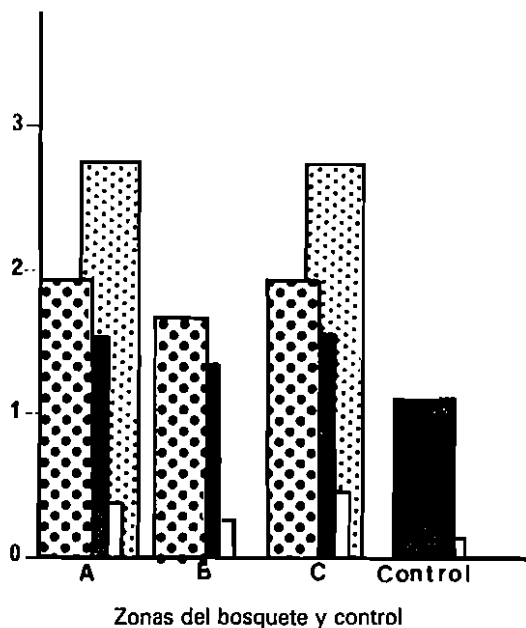


Fig. 3. Valores medios del porcentaje de nodulación, biomasa, contenido de nitrógeno total y actividad reductora de acetileno de las plantas de *E. angustifolia* crecidas en los suelos de las tres zonas en las que se ha dividido el bosque de Valdemoro y de las plantas control. Los resultados se expresan en logaritmos decimales. [stippled] nodulación, [solid black] biomasa, [white] N_{total}, [dotted] actividad reductora de acetileno.

lución nutritiva de Crone sin nitrógeno durante diecisiete semanas, al cabo de las cuales se midió la biomasa expresada en peso seco, el contenido de nitrógeno y la actividad reductora de acetileno (ARA). En la Tabla IV se indican los valores que toman estas variables en las tres zonas consideradas. Las plantas de la zona C tenían mayor biomasa al cosecharlas, les seguían las de la zona A y luego las de la zona B (Tabla IV, Fig. 3). Este hecho se corresponde con lo que sucede con los porcentajes de nodulación y los contenidos de nitrógeno total. La concentración de nitrógeno tiene valores mínimos en las plantas crecidas en perlábón. Se realizó un análisis de la varianza de clasificación simple entre la biomasa de las plantas cultivadas en las tres zonas y se comprobó que los valores de biomasa eran significativamente diferentes con $p \leq 0,01$ (Tabla V). Se observó posteriormente con la «t» de Student que existían diferencias altamente significativas ($p \leq 0,001$) entre la biomasa de las plantas de las zonas A y C y la biomasa de las plantas control ($t = 4,24$ y $7,55$ respectivamente). Los valores de biomasa de las plantas crecidas en los suelos de la zona B y la de las plantas control eran diferentes con probabilidad mucho menor ($t = 2,07$, $p \leq 0,1$).

Los valores de ARA obtenidos en las zonas A y C son normales para *E. angustifolia* y muy semejan-

TABLA IV

VALORES DE BIOMASA, NITRÓGENO TOTAL Y ACTIVIDAD REDUCTORA DE ACETILENO (ARA) DE LAS PLANTAS DE *ELAEAGNUS ANGUSTIFOLIA* CULTIVADAS EN SOLUCION DE CRONE SIN NITRÓGENO

Origen del suelo	Biomasa (mg)	Nitrógeno total (mg g ⁻¹)	ARA (nM C ₂ H ₄ g ⁻¹ h ⁻¹)
Zona A	$\bar{x} = 378,61$ $s = 124,19$ $n = 12$	35,62	559,0 (153,8-964,2)*
Zona B	$\bar{x} = 248,60$ $s = 11,63$ $n = 3$	22,03	0,0
Zona C	$\bar{x} = 498,50$ $s = 96,61$ $n = 12$	37,96	551,9 (376,2-865,2)*
Tiestos control	$\bar{x} = 130,84$ $s = 53,24$ $n = 5$	12,34	

* Intervalo de valores obtenidos.

TABLA V

ANÁLISIS DE LA VARIANZA UNIDIRECCIONAL DE LA COMPARACION ENTRE LA BIOMASA DE PLANTAS DE *ELAEAGNUS ANGUSTIFOLIA* EN LAS TRES ZONAS EN LAS QUE SE DIVIDIO EL BOSQUETE DE VALDEMORO

	s s	d f	M S	F
Zonas del bosque 0,17	2	0,08	6,6*	
Error 0,3	24	0,01		
Total 0,47	26			

* $p \leq 0,01$.

tes en ambas zonas (Tabla IV). La falta de actividad registrada en la zona B no debe interpretarse en el sentido de que los nódulos no fijasen nitrógeno, ya que el crecimiento y el color verde de las hojas no indicaban deficiencias nutricionales, sino que tuvieran una actividad baja que, unida al número muy pequeño de plantas noduladas, hizo que la biomasa de nódulo en las muestras recogidas no alcanzara el umbral de la actividad detectable en el cromatógrafo de gases.

DISCUSION

Aunque a primera vista parece más apropiado aislar del suelo el microorganismo simbiote, cultivarlo, hacer recuentos microbianos e inoculaciones en plantas, el método aquí seguido, que ha sido contrastado y usado anteriormente por otros autores (RODRÍGUEZ-BARRUECO, 1968; BERMÚDEZ DE CASTRO *et al.*, 1976), presenta las ventajas de reproducir mejor las condiciones de campo y distorsionar lo menos posible los microambientes en los que se desarrollan las poblaciones microbianas, de tal forma que las raíces de las plantas exploran el suelo del tiesto como lo hacen en el campo y alcanzan los lugares en los que se encuentran los endofitos, manteniendo las interacciones de sinergia, competencia y predación que existen naturalmente en el suelo.

En general, según el criterio de MCKINTOSH & BOND (1970), de los resultados obtenidos se deduce que el endofito de *E. angustifolia* es muy abundante en todo el bosque, aunque en la zona B se produce una inhibición evidente porque la densidad microbiana disminuye o porque la capacidad noduladora está parcialmente inhibida. En este lugar coinciden tres circunstancias: abundan-

cia de *Juncus maritimus* Lam. que prácticamente cubre todo el suelo, salvo debajo de los árboles de *E. angustifolia*; densidad reducida de éstos, y terrenos bajos encharcados en época de lluvias. Por ello cabe pensar que la inhibición más o menos intensa del endofito causada por los juncos y la que posiblemente ocasionen por alelopatía las semillas de *E. angustifolia* al germinar, influyan en la distribución del endofito y en la distribución rara y anormal del árbol en esta zona. Esta presencia esporádica de ejemplares de *E. angustifolia* trae consigo un efecto rizosfera menos intenso que interfiere en la regulación óptima de la microflora edáfica. Así, la disminución de exudados, secreciones y lisados que excretan las raíces (ROVIRA *et al.*, 1979) repercute de forma directa a través de interrelaciones sinérgicas o antagónicas sobre la población de *Frankia elaeagni* (Schröter) Becking, que manifiesta menor capacidad noduladora tanto en las experiencias de laboratorio como en el campo. Además, los vertidos de las factorías cercanas al bosque podrían repercutir negativamente en el crecimiento, nodulación y diazotrofia de los ejemplares de *E. angustifolia* en esta zona, de modo semejante a como el aluminio perjudica a *Trifolium repens* L. (WOOD *et al.*, 1983) y el cadmio a *Phaseolus vulgaris* L. (BARCELÓ *et al.*, 1983), *Alnus rubra* Bong. (WICKLIFF *et al.*, 1980) y *A. glutinosa* (MENA & BERMÚDEZ DE CASTRO, 1984).

La relación entre la capacidad noduladora y el pH sugiere respuestas muy precisas de la planta y del microorganismo a variaciones pequeñas de pH, ya que los pH de las tres zonas no parecen estar *a priori* fuera del intervalo adecuado para la nodulación, que, aunque no bien conocido, se sitúa por encima de 5,4 (RODRÍGUEZ-BARRUECO, 1970) y se cree cercano a la neutralidad, pues cuando se encalan los suelos ácidos aumenta la producción de nódulos, como se ha observado en *E. umbellata* Thunb. (HENSLEY & CARPENTER, 1982). Los cambios de pH afectan al endofito, al huésped y, de modo especial, a la interacción de ambos, cuyo intervalo óptimo se vuelve más restringido que el de ambos simbioses por separado, lo que se puede traducir en un número anormal de nódulos pequeños y aislados que no llegan a formar racimos nodulares y provoca una reducción drástica del nitrógeno fijado (RODRÍGUEZ-BARRUECO, 1966; RODRÍGUEZ-BARRUECO & BOND, 1968), como sucede en las plantas crecidas en los suelos de la

zona B y en árboles de esta zona que se caracterizan por su nodulación deficiente.

El pH se comporta como una variable síntesis (*major factor*) que influye en el incremento de la nodulación pero, al expresar un conjunto de interacciones del suelo, puede estar muy condicionado por la cobertura arbórea, quien sea, en definitiva, la responsable de la capacidad noduladora, al modificar las condiciones edáficas a través de metabolitos procedentes de la fijación de nitrógeno que por diversas vías llegan al suelo.

Otras de las variables que influyen en la capacidad noduladora es la concentración $N-NO_3^-$, también afectada por el pH. Se sabe que la nodulación de *E. angustifolia* es muy sensible frente a la cantidad de nitrógeno combinado en el medio, pues el número de pelos radicales es muy bajo y, por ello, cualquier interferencia en el proceso infeccioso ocasiona bajadas importantes en los porcentajes de nodulación.

La actividad reductora de acetileno media y los intervalos de actividad de las zonas A y C son normales en plantas actinorrizas. En alisedas oscila entre 12 y 18.000 $nM C_2H_4 g^{-1}h^{-1}$; en matorrales de

Myrica sp., entre 282 y 6.082; de *Colletia* sp., entre 311 y 10.471; de *Discaria* sp., entre 460 y 7.166, y en formaciones de *Casuarina* sp., entre 600 y 21.000. Se estima que el ARA es de 12.300 $nM C_2H_4 g^{-1}h^{-1}$ en *Hippophae* sp., de 9.600 en *Coriaria* sp. y de 2.800 en *Shepherdia* sp., dependiendo de la edad, estado fisiológico de las plantas y condiciones edáficas y climáticas (PIZELLE, 1975; CARPENTER *et al.*, 1979; BERMÚDEZ DE CASTRO, 1981; BERMÚDEZ DE CASTRO & ALONSO, 1983).

Aunque las plantas cultivadas en este trabajo se encuentran en los niveles bajos de ARA, debemos señalar que son del mismo orden que los datos obtenidos en nuestro laboratorio con árboles de *E. angustifolia* de parques madrileños y que las medidas realizadas por nosotros en alisedas y matorrales de *M. gale* en la zona centro de la Península Ibérica. Estos datos nos indican que el endofito no sólo ha penetrado en el huésped y formado nódulos radicales, sino que es efectivo con respecto a la fijación de nitrógeno atmosférico, ya que cabe la posibilidad de que un microorganismo, aunque sea homólogo con el huésped y llegue a nodular, no posea la capacidad para reducir acetileno por incompatibilidad genética o por deformaciones morfológicas.

SUMMARY

It is studied the distribution of *Elaeagnus angustifolia* endophyte and the soil nodulating ability in a bluff in Valdemoro (Madrid). The presence of the mentioned endophyte and its power to induce nitrogen-fixing nodules is normal and comparable to other places with actinorhizal plants. It is proved the relation that exists among the soil pH and its nodulating capacity and the tree cover on this process. The obtained nodules are effective and reduce acetylene to levels considered normal in actinorhizal plants.

BIBLIOGRAFIA

- ASPIRAS, R. B.; MIRANDA, H. C., y PABALE, R. C., 1980: «Dinitrogen fixation in the root nodules of *Elaeagnus philippensis* Kalikasan». *Philipp. J. Biol.*, 9: 104-107.
- BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C., y CABOT, C., 1983: «Efectos del cadmio sobre el crecimiento y la productividad de *Phaseolus vulgaris*». V. Reunión S.E.F.V. Murcia. *Resúmenes*. 55.
- BECKING, J. H., 1977: «Dinitrogen-fixing associations in higher plants other than legumes». In: R. W. F. Hardy & W. S. Silver (Eds.). *A Treatise of Dinitrogen Fixation*. John Wiley y Sons. New York. 185-275.
- BERMÚDEZ DE CASTRO, F., 1975: «Nuevas investigaciones sobre la inoculación cruzada entre las especies fijadoras de nitrógeno *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. y *Myrica gale* L.» *An. Edaf. Agrobiol.*, 34: 569-582.

- BERMÚDEZ DE CASTRO, F., 1981: «Diazotrofia como técnica en agronomía y silvicultura». In: C. Vicente (ed.). *Productividad Vegetal*. Univ. Complutense. Madrid. 191-225.
- BERMÚDEZ DE CASTRO, F., y ALONSO, M., 1983: «Nodulación y diazotrofia de plantas actinorrizas en la República Argentina». *Studia Oecologica*, 4: 183-190.
- BERMÚDEZ DE CASTRO, F.; MIGUEL, C., y RODRÍGUEZ-BARRUECO, 1976: «A study of the capacity of soils to induce nodules in *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. and *Myrica gale* L., with special reference to the specificity of the endophytes». *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 127A: 307-315.
- BOND, G., 1976: «The results of the IBP survey of root-nodule formation in non-leguminous angiosperms». In: P. S. Nutman (ed.). *Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants*. Cambridge Univ. Press. Cambridge. 443-474.
- BOND, G., y WHEELER, C. T., 1980: «Non legume nodule systems». In: F. J. Bergensen (ed.). *Methods for evaluating Biological Nitrogen Fixation*. John Wiley & Sons. London. 187-211.
- CARPENTER, C. V.; BARIBO, L. E.; ROBERTSON, L. R.; VAN DEBOGART, F., y ONUFER, G. M., 1979: «Acetylene reduction by excised root nodules from *Alnus rubra* and *Alnus sinuata*». In: J. C. Gordon, C. T. Wheeler y D. A. Perry (eds.). *Symbiotic Nitrogen Fixation in the Management of Temperate Forest*. Oregon St. Univ. Corvallis. 475.
- DOVANAN, R. P.; FELDER, R. M., y ROGERS, H. H., 1976: *Vegetative stabilisation of mineral waste heaps*. U. S. Proct. Agency in Research Triangle Park. 306 pp.
- ESTEBAN, M.; DORDA, J.; MULLER, A., y BERMÚDEZ DE CASTRO, F., 1987: «Estudios en ecosistemas diazotróficos. III. El bosque de *Elaeagnus angustifolia* L. de Valdemoro (Madrid)». *Bol. Est. Cent. Ecol.*, 31: 83-91.
- FESSENDEN, R. L., 1979: «Use of actinorhizal plants for land reclamation and amenity planting in U.S.A. and Canada». In: C. J. Gordon, C. T. Wheeler y D. A. Perry (eds.). *Symbiotic Fixation in the Management of Temperate Forest*. Oregon St. Univ. Corvallis. 403-419.
- HARDY, R. W. F.; BURNS, C. R., y HOLSTEN, R. D., 1973: «Applications of the acetylene-ethilene assay for measurement of nitrogen fixation». *Soil Biol. Biochem.*, 5: 47-81.
- HENSLEY, D. L., y CARPENTER, P. L., 1982: «Growth and nitrogen fixation (acetylene reduction) of *Elaeagnus umbellata* grown in Ca(OH)₂-amended acid soil». *Hortscience*, 17: 351-352.
- MCKINTOSH, A. H., y BOND, G., 1970: «Diversity in the nodular endophytes of *Alnus* and *Myrica*». *Phyton*, 27: 79-90.
- MENA, C., y BERMÚDEZ DE CASTRO, F., 1984: «Incidencia del cadmio en el crecimiento de *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn». *Studia Oecologica*, 5: 117-134.
- NOBBE, F., e HILTNER, L., 1904: «Über das Stickstoffsammungsvermögen der Erlen und Elaeagnaceen». *Naturw.*, 2: 366.
- PIZELLE, G., 1975: «Variations saisonnières de l'activité nitrogenasique des nodules d'*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn., d'*Alnus incana* Moench. et d'*Alnus cordata* (Lois.) Desf.» *C. R. Acad. Paris* 281: 1.829-1.832.
- RIVAS-GODAY, S., y RIVAS-MARTÍNEZ, S., 1963: *Estudio y clasificación de los pastizales españoles*. Min. Agricultura. Madrid, 269 pp.
- RODRÍGUEZ-BARRUECO, C., 1966: «Fixation of nitrogen in root nodules of *Alnus jorullensis* H.B.K.». *Phyton* 23: 103-110.
- RODRÍGUEZ-BARRUECO, C., 1968: «The occurrence of the root-nodule endophytes of *Alnus glutinosa* and *Myrica gale* in soils». *J. Gen. Microbiol.*, 52: 189-194.
- RODRÍGUEZ-BARRUECO, C., 1970: «Efecto del nitrógeno combinado sobre el desarrollo nodular y crecimiento de *Elaeagnus angustifolia*». *An. Edaf. Agrobiol.*, 30: 149-161.
- RODRÍGUEZ-BARRUECO, C., y BOND, G., 1968: «Nodule endophytes in the genus *Alnus*». In: J. M. Trappe, J. F. Franklin, R. F. Tarrant y G. M. Hansen (eds.). *Biology of Alder*. Forest Serv. Dept. Agric. Portland. 185-192.

- RODRÍGUEZ-BARRUECO, C., y MIGUEL, C., 1979: «Hosts plant-endophyte specificity in actynomicete-nodulated plants». In: J. C. Gordon, C. T. Wheeler y D. A. Perry (eds.). *Symbiotic Nitrogen Fixation in the Management of Temperate Forest*. Oregon St. Univ. Corvallis. 143-159.
- RON, M. E., 1971: «Sobre el carácter subespontáneo de *Elaeagnus angustifolia* L.». *An. Real Acad. Farmacia*, 37: 229-240.
- ROVIRA, A. D.; FÓSTER, R. C., y MARTÍN, J. K., 1979: «Note on terminology: Origin, nature and nomenclature of the organic materials in the rhizosphere». In: J. L. Harley y R. Scott Russell (eds.). *The Soil Root Interface*. Academic Press. London. 1-4.
- RUFFNER, J. D., 1978: «Reclamation of coal-mined land in Southwest». *J. Soil Water Cons.*, 33: 75-79.
- SILVESTER, W. B., 1977: «Dinitrogen fixation by plant associations excluding legumes». In: R. W. F. Hardy y A. H. Gibson (eds.). *A Treatise on Dinitrogen Fixation*. John Wiley y Sons. New York, 141-190.
- UEMURA, S., y SATO, T., 1975: «Non-leguminous root nodules in Japan (A supplementary report)». In: H. Takahashi (ed.). *Nitrogen Fixation and the Nitrogen Cycle*. Jap. Comm. Int. Biol. Prog. Synthesis, 12: 17-24.
- WICKLIFF, C.; EVANS, H. J.; CARTER, K. R., y RUSSELL, S. A., 1980: «Cadmium effects on the nitrogen fixation system of red alder». *J. Environm. Qual.*, 9: 180-184.
- WOOD, M.; COOPER, J. E., y HOLDING, A. J., 1983: «Aluminium toxicity and nodulation of white clover». *5th Int Symp. on N₂-Fixation. Noordwijkerhout. Abstracts*. 7B-15.