

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE NODULAR DE RIZOBIOS APLICADOS
A SEMILLAS DE TRÉBOL BLANCO MEDIANTE PREINOCULACIÓN

por

Ornella SABATINI RODRÍGUEZ

TESIS presentada como uno de
los requisitos para obtener el
título de Ingeniero Agrónomo

MONTEVIDEO

URUGUAY

2018

Tesis aprobada por:

Director:

Dr. Jorge Monza

Dra. Pilar Irisarri

Ing. Agr. Mónica Rebuffo

Fecha: 18 de septiembre de 2018

Autora:

Ornella Sabatini

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada quiero agradecer a mi familia por el apoyo incondicional y darle la bienvenida a mi sobrina Olivia Muniz. También quiero agradecer a mi tutor Jorge Monza a Pilar Irisarri y Mónica Rebuffo por ser guías durante todo el proceso de la carrera. En especial quiero recordar a todos mis compañeros de cursos en estos 5 años y a todos los del departamento de Biología Vegetal por la colaboración, en especial a mis compañeros de trabajo de Bioquímica: Pame, Fer, Isma, Nico, Caro, Belu, Bel, Sofi, Mai, Pedro, Junior, Nacho, Santi, Esteban, Omar, Martita, Pedro y Mariana.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VI
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	3
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	6
3.1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	6
3.2. CONDICIONES DE CRECIMIENTO EN LABORATORIO.....	6
3.3. INOCULACIÓN DE SEMILLAS Y DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE RIZOBIOS EN TURBA.....	7
3.4. RECUENTO DE RIZOBIOS EN SEMILLAS.....	7
3.5. TIEMPO DE APARICIÓN DEL PRIMER NÓDULO Y NÓDULOS TOTALES.....	8
3.6. EVALUACIÓN DE LAS SEMILLAS PREINOCULADAS EN CONDICIONES DE CAMPO.....	8
3.7. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE RIZOBIOS EN SUELO.....	9
3.8. DESINFECCIÓN Y CONSERVACIÓN DE NÓDULOS.....	9
3.9. AISLAMIENTO DE RIZOBIOS DESDE NÓDULOS.....	9
3.10. EXTRACCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE ADN.....	10
4. <u>RESULTADOS</u>	11
4.1. ENSAYO EN CONDICIONES DE LABORATORIO.....	11
4.1.1. <u>Semillas preinoculadas conservadas a 4°C</u>	11
4.1.2. <u>Semillas preinoculadas conservadas a temperatura ambiente</u>	14
4.2. ENSAYOS EN CONDICIONES DE CAMPO.....	16
4.2.1. <u>Ensayo I: semillas sembradas 15 días después de preinoculadas</u>	16
4.2.2. <u>Ensayo II: semillas sembradas 30 días después de preinoculadas</u>	16
5. <u>DISCUSIÓN</u>	19
6. <u>CONCLUSIONES</u>	21
7. <u>RESUMEN</u>	22

8. SUMMARY..... 23

9. BIBLIOGRAFÍA..... 24

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Composición del YEM.....	6
2. Preinoculación vs. inoculación convencional en semillas conservadas a 4°C.....	13
3. Comparación de los tratamientos de preinoculación e inoculación convencional sobre semillas de trébol blanco almacenadas a temperatura ambiente.....	15
4. Porcentaje de ocupación de nódulos por el inoculante comercial en plantas desarrolladas a partir de semillas preinoculadas e inoculadas convencionalmente en dos sitios.....	18
Figura No.	
1. Dendrograma representativo de perfiles ERIC de aislamientos de nódulos obtenidos en La Estanzuela.....	17

1. INTRODUCCIÓN

Los rizobios pueden establecer simbiosis con leguminosas y reducir nitrógeno atmosférico a amonio mediante un proceso conocido como fijación biológica de nitrógeno (FBN). En Uruguay, desde 1960 se promueve la inoculación de leguminosas forrajeras como una alternativa para disminuir el uso de fertilizantes nitrogenados. *Trifolium pratense* (trébol rojo) y *Trifolium repens* (trébol blanco), usados en diferentes mejoramientos, se inoculan desde el año 1967 con *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* cepa U204 (=CIAT 2445) introducida de Estados Unidos. Esta práctica consiste en la incorporación de un alto número de rizobios a la semilla o al suelo, con el objetivo de promover la colonización de la rizósfera por cepas eficientes y que nodulen a la leguminosa.

En Uruguay, la producción y uso de inoculantes rizobianos están regulados por el MGAP, y la normativa generada y promovida hace que nuestro país, junto a Nueva Zelanda y Canadá, sea un referente a nivel mundial (Date, 2000).

Los inoculantes se presentan en soporte turba, que consiste en impregnar ese soporte estéril con un cultivo de alta concentración bacteriana, o en forma líquida diseñados en base a la obtención de caldos con alta concentración de bacterias. Otra alternativa es el tratamiento de preinoculación que requiere de plantas de tratamiento de semilla con equipos que aseguren la dosificación exacta del inóculo, así como también de otros componentes (fungicidas, insecticidas, etc.). El objetivo de esta formulación es brindar a los productores una semilla tratada e inoculada, pronta para sembrar, evitando la heterogeneidad de la inoculación convencional o manual. Esta tecnología puede brindar ventajas logísticas al productor ya que permite extender el tiempo entre la inoculación y la siembra sin afectar la nodulación y la FBN. De todas formas, evaluaciones de este procedimiento realizadas en 1972–1974 (Brockwell et al. , 1975) y en 1999–2002 (Gemmell et al. , 2002) plantean como dificultad la baja sobrevivencia de los rizobios sobre la semilla. En particular en semillas pequeñas como las de trébol en las que no se logra cumplir con el requerimiento del mínimo de rizobios por semilla establecido por la normativa del MGAP que exige una carga de 1000 UFC/semilla.

La técnica de preinoculación de semillas en nuestro país se encuentra en etapa experimental. En el presente trabajo de tesis se pretende evaluar este procedimiento en condiciones de laboratorio y de campo a través de la viabilidad de los rizobios sobre las semillas, característica que debe ser

conocida para garantizar que su uso no constituye un riesgo económico para el productor.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Los tréboles son leguminosas perennes, estoloníferas, de ciclo invernal y en primavera se registra su máximo productivo (Carámbula, 2003). Se utilizan principalmente para alimentar animales mediante pastoreo pero pueden utilizarse para ensilaje o forraje (Dewhurst et al. , 2009). Las leguminosas se utilizan como pasturas debido a su valor nutritivo, además de ser utilizadas para el mejoramiento del suelo para los cultivos siguientes de la rotación. Además tienen buena adaptación a características de suelos muy usuales en Uruguay, tales como texturas medias pesadas y suelos húmedos (Langer 1981, Carámbula 2003).

La familia de las leguminosas se destaca por conferir sostenibilidad a la rotación ya que para su productividad no se requieren aplicaciones excesivas de pesticidas, herbicidas ni fertilizantes y pueden ser cultivadas en ambientes marginales; esto tiene importancia económica y ambiental. Las leguminosas también pueden disminuir la erosión del suelo ya que mejoran su estructura y aumentan la materia orgánica. Las características anteriores generan un aumento en la rentabilidad agrícola del suelo (Rebuffo et al., 2006).

Leguminosas como el trébol establecen simbiosis con bacterias, las cuales se asocian a la raíz de la planta. Los rizobios son bacilos Gram negativos, presentan un metabolismo aerobio y son capaces de fijar nitrógeno atmosférico. La planta se ve beneficiada ya que la simbiosis le permite colonizar con mayor facilidad suelos marginales y requieren menos fertilizantes nitrogenados. Los beneficios de la fijación biológica de nitrógeno (FBN) hacen que el desarrollo de inoculantes rizobianos sea de suma importancia en todos los países, ya que favorece el crecimiento de las leguminosas.

El trébol presenta problemas de implantación en suelos Uruguayos, se detecta dificultad en la nodulación y fijación de nitrógeno eficiente, debido a la presencia de cepas nativas que compiten por la ocupación de nódulos con el inoculante y la ausencia de rizobios específicos (Dutto, 2002). La presencia de rizobios nativos competitivos y adaptados a condiciones edafológicas y ambientales compromete la habilidad de cepas inoculantes para ocupar nódulos (Sadowsky y Graham, 1998). El trébol blanco es el que presenta mayores problemas de implantación, su pequeño tamaño de semilla dificulta alcanzar el número adecuado de rizobios en superficie (Dutto, 2002).

En la agricultura la metodología que se emplea para utilizar esta simbiosis se denomina inoculación. La metodología de inoculación no debe limitarse a recubrir las semillas con rizobios vivos, sino que también debe

optimizar las chances de éstos rizobios para infectar las raíces y colonizar. Esta determinado que cuanto mayor sea el número de rizobios por semilla, mayor será la nodulación, la fijación de N₂ y el rendimiento del cultivo (Catroux et al. , 2001).

La legislación sobre inoculantes rizobianos para leguminosas (Decretos 546/981 y 7/99) prohíbe la venta de inoculantes y semillas pre-inoculadas que no hayan sido previamente registrados y aceptados por el Laboratorio de Microbiología del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca del Uruguay (MGAP) y marca los siguientes requisitos: (1) >2000 millones de UFC/gr o ml de inoculante a la elaboración y > 1000 millones de UFC/gr o ml al vencimiento, (2) libre de contaminantes, (3) formulados con la/s cepas recomendadas y suministradas por el MGAP.

Las cepas utilizadas como inoculantes deben ser eficientes en la FBN, competitivas frente a otras cepas presentes y persistentes en el suelo (Labandera, 2007). Además, deben tener la habilidad de crecer en condiciones industriales y sobrevivir en el soporte. Los soportes para los inoculantes rizobianos más utilizados en Uruguay son los líquidos acuosos (28 inoculantes registrados, todos para soja) e inoculantes sólidos en base a turba estéril (45 inoculantes registrados).

El método más utilizado es la técnica de inoculación convencional; consiste en la mezcla de la semilla con el inoculante inmediatamente previo a la siembra, las semillas quedan recubiertas con el inoculante, aunque la distribución del mismo suele ser heterogénea. Esta técnica, además de ser simple, es de gran practicidad, ya que no requiere labores adicionales ni equipamiento especial.

La práctica de pre-inoculado comenzó en la década del 70, no obteniéndose en ese momento resultados exitosos (Thompson et al. 1975, Brockwell y Bottomley 1995). El uso de inoculantes líquidos ha determinado que esta práctica tenga auge intentando prolongar la sobrevivencia de los rizobios sobre la semilla. Existen alternativas tecnológicas que incluyen el uso de aditivos, bioprotectores, polímeros y el uso del "coating" para mejorar la sobrevivencia (Deaker et al. , 2004).

El MGAP a través de la DGSA para la validación de la tecnología de semillas preinoculadas y su comercialización, realiza los registros de estos insumos monitoreando el número de células por semilla en el tiempo así como el mantenimiento de las capacidades de nodulación y FBN. Dicho registro exige:

1. Determinación de rizobios cultivables sobre la semilla en función del tiempo. En el caso de los tréboles, el tamaño pequeño de semilla determina una concentración mínima exigible de 1000 UFC/semilla.
2. Identificación de la cepa del inoculante mediante técnicas moleculares.
3. Número más probable (NMP)
4. Determinación de parámetros de nodulación y producción de biomasa aérea en condiciones controladas.
5. Determinación de eficiencia agronómica a campo.

Para ser registradas las semillas pre-inoculadas deben obtener recuentos de UFC/semilla iguales o superiores a los descritos según el tamaño de semilla. Estos se deberán corresponder con los recuentos obtenidos a partir de la técnica de NMP. Además no deberán presentar diferencias significativas respecto a la inoculación convencional (inoculación con inoculante turba y siembra inmediatamente posterior a la inoculación) para los parámetros número, peso seco de nódulos y/o producción de materia seca en los ensayos en condiciones controladas.

En los ensayos de eficiencia agronómica en campo, las tecnologías a validar deberán presentar respuesta igual o superior a la inoculación convencional u otras tecnologías ya recomendadas (MGAP. DGSSAA, 2017).

Otros requisitos para la obtención del registro es que el inoculante y curasemillas utilizados en el tratamiento de semillas estén registrados en el MGAP, así como que el registrante esté asociado a una planta de tratamiento de semillas con el fin de garantizar el proceso.

La evaluación de la ocupación de nódulos es necesaria para conocer la efectividad de colonización de nódulos que tuvo el inóculo sobre otras cepas presentes en el suelo, pero este conocimiento ha sido incierto por la falta de técnicas precisas y aplicables a gran número de aislados. Actualmente la ocupación de nódulos se realiza mediante diferentes estrategias, siendo una de ellas la generación de perfiles genómicos (Svenning et al. 2001, Denton et al. 2002, Yates et al. 2005, Sotelo et al. 2011, Batista et al. 2015).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. 1. MATERIAL BIOLÓGICO

Como hospedero se utilizó *Trifolium repens* L. (trébol blanco) de tipo intermedio 'Estanzuela Zapicán'. Las semillas suministradas por M. Rebuffo (INIA La Estanzuela) y R. Reyno (INIA Tacuarembó) se conservaron a 4°C. Como inoculante rizobiano se utilizó a la cepa U204, el inoculante comercial para tréboles (MGAP. DGSSAA, 2017).

3. 2. CONDICIONES DE CRECIMIENTO EN LABORATORIO

Las plantas crecieron en tubos de 15 mL de medio Jensen sin nitrógeno o macetas con arena vermiculita (1:1) estéril. Cuando crecieron en maceta se regaron 3 veces por semana, 2 veces con agua destilada y una vez con solución de riego Hornum (Handberg y Stougard, 1992) sin nitrógeno. Las plantas se crecieron en cámara de crecimiento con una intensidad lumínica de 200 μ E. m⁻². s⁻¹, con un fotoperiodo de 16/8 h (luz/oscuridad) a 24 °C.

La cepa usada como inoculante creció en medio YEM (Yeast Extract Manitol, Vincent, 1970) cuya composición Figura en el Cuadro 1, en placa o en medio líquido en agitación orbital a 120 rpm.

Cuadro 1. Composición del YEM con modificaciones

K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
Manitol	5 g *
Extracto de levadura	1 g
Agar	15 g
Rojo Congo 0. 25 % (medio sólido)	5 mL
H ₂ O destilada	1000 mL
pH	6. 8 – 7. 2

*Concentración del medio original 0,4g / L.

Fuente: Vincent (1970)

3. 3. INOCULACIÓN DE SEMILLAS Y DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE RIZOBIOS EN TURBA

Las semillas preinoculadas suministradas por las fábricas de inoculantes Calister S. A. y Lage y Cía S. A. , que definieron una metodología de preinoculación, se conservaron según el ensayo a 4°C y a temperatura ambiente. Para la inoculación convencional se utilizó inoculante en turba suministrado por las fábricas de inoculantes, que se aplicó a las semillas según las instrucciones de los fabricantes.

La determinación de rizobios en turba se realizó según el procedimiento recomendado por el Laboratorio de Microbiología del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca del Uruguay (Labandera y Mayans, 2006). Se homogeneizó el contenido de la bolsa, se sanitizó la zona de la cual se extrajeron los 10 g del inoculante. La muestra se suspendió en 90 mL de solución de NaCl 0,85 % estéril, esta se agitó durante 15 min y se realizaron diluciones seriadas. Las diluciones 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} se sembraron por triplicado y por extensión en placas con medio YEM. A los 3 días se realizó el recuento de colonias. El conteo se realizó en placas que presentaron entre 30 y 300 colonias, promediando los resultados entre las repeticiones.

3. 4. RECUENTO DE RIZOBIOS EN SEMILLAS

La viabilidad del inoculante se evaluó en semillas preinoculadas entre 1 y 90 días después de aplicado el inoculante y en semillas inoculadas de forma convencional antes de 4 h después de inoculadas. El número de rizobios cultivables por semilla se determinó según el procedimiento recomendado por el Laboratorio de Microbiología del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca del Uruguay (en el año 2013). Para esto, en 90mL de solución de NaCl 0,85 % y 360 μ L de Tween 80 se colocaron 90 semillas inoculadas y se agitaron durante 15 min con un vortex. Con la suspensión obtenida se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-6} , en NaCl 0,85 % estéril. De cada dilución se sembró por extensión en superficie 100 μ L. Cada dilución se sembró por triplicado en medio YEM. Las placas se incubaron a 27°C durante 5 días y para estimar el número de unidades formadoras de colonia (UFC) se utilizaron placas que presentaron entre 30 y 300 colonias.

El análisis estadístico se realizó a través de InfoStat, para el recuento de rizobios en semillas a 4°C se determinaron diferencias significativas mediante

LSD Fisher con corrección de p-valor mediante Bonferroni, $\alpha = 0,1$. Mientras que a temperatura ambiente se indican diferencias significativas mediante DGC, $p < 0,01$.

3. 5. TIEMPO DE APARICIÓN DEL PRIMER NÓDULO Y NÓDULOS TOTALES

La determinación de nódulos totales inducidos a los 30 días y el tiempo de aparición del primer nódulo se realizó en tubos con medio Jensen, para lo que se sembró para cada tratamiento (preinoculada, inoculada convencionalmente y sin inocular) una semilla por tubo, con 8 repeticiones. Los nódulos se contaron durante 30 días, cada 48 h. Los nódulos totales inducidos a los 30 días también se determinaron en maceta en las que se sembraron 5 semillas en cada una y se realizaron 5 repeticiones.

El análisis estadístico para las variables nódulos/planta tubo y aparición del primer nódulo (días) de semillas almacenadas a 4°C, se realizó mediante LSD Fisher con corrección de p-valor mediante Bonferroni, $p < 0,01$ mientras que para nódulos/planta macetas se realizó DGC con corrección de p-valor mediante Bonferroni, $p < 0,01$.

El análisis estadístico para las variables evaluadas en semillas almacenadas a temperatura ambiente fue DGC, $p < 0,01$.

3. 6. EVALUACIÓN DE LAS SEMILLAS PREINOCULADAS EN CONDICIONES DE CAMPO

Se realizaron dos ensayos en campo en La Estanzuela y en Glencoe, dos años consecutivos, con semillas preinoculadas 15 y 30 días antes de la siembra, conservadas a temperatura ambiente. En Glencoe sobre suelos Subeutrico melánico abruptico y en La Estanzuela sobre Brunosol éutrico típico de la unidad Ecilda Paullier-Las Brujas se sembraron 4 parcelas de 1,25 x 5 m. Previo a la siembra se determinó el número de rizobios cultivables según se describe en 3. 3. La inoculación convencional fue realizada según las instrucciones de los fabricantes.

Para evaluar la ocupación de nódulos por el inoculante aplicado respecto a las cepas presentes en el suelo se identificaron aislamientos de nódulos

mediante sus perfiles ERIC. Para esto, a los 6-7 meses después de la siembra se cosecharon nódulos de raíz principal de 10 plantas de cada parcela. Los nódulos se desinfectaron superficialmente y conservaron a -20°C (Gutiérrez, 2017) y se aislaron rizobios (3. 7) de 80 nódulos de cada tratamiento, de cada sitio. A partir de cultivos puros de rizobios (3. 8) se aisló el ADN y se amplificó con primers ERIC (3. 9). Los perfiles se resolvieron en geles de agarosa que se analizaron con el programa Gel Compar II versión 6. 5. De cada tratamiento y de cada sitio se resolvieron entre 25 y 40 perfiles.

3. 7. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE RIZOBIOS EN SUELO

Antes de la siembra se determinó la cantidad de rizobios que nodulan trébol por gramo de suelo según el número más probable (NMP), siguiendo el procedimiento usado por el Laboratorio de Microbiología del MGAP (Protocolo técnico para registro de inoculantes, Recuento de rizobios viables por la técnica del número más probable (NMP) – diluciones e infección en plantas). El procedimiento consiste en inocular el hospedero con diluciones del inoculante en condiciones asépticas. A los 30 días se contabilizan las plantas que nodularon. Los recuentos se realizan en tubos con medio Jensen y de cada dilución se hacen 4 repeticiones.

3. 8. DESINFECCIÓN Y CONSERVACIÓN DE NÓDULOS

La desinfección superficial de nódulos se realizó mediante un lavado con agua suficiente para remover el suelo adherido, 1 min en etanol 70 %, enjuagues con agua estéril y 3 min en una solución de NaClO al 4 %, seguida de enjuagues con agua estéril. Los nódulos se conservaron en glicerol 20 % en una solución de NaCl 0,85 %, a -20 °C.

3. 9. AISLAMIENTO DE RIZOBIOS DESDE NÓDULOS

Los nódulos desinfectados se maceraron entre dos portaobjetos estériles, sobre 20 µL de agua estéril. Con un ansa se recolecto muestra en el punto de maceración del nódulo y se sembró por estría en placa con medio YEM y se hicieron sucesivos repiques hasta la obtención de un cultivo puro.

3. 10. EXTRACCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE ADN

La extracción de ADN a partir de cultivos puros se realizó siguiendo en general el procedimiento usado por Rivas et al. (2001). Para ello se centrifugó 1 mL de cultivo a 13.000 rpm 2 min y se extrajo el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 100 µL de NaOH 0,05 M y se incubó 4 min a 100 °C seguido de 2 min en hielo. Se agregaron 500 µL de agua MiliQ estéril, se centrifugó a 13.000 rpm 2 min y se recogieron 100 µL del sobrenadante que se conservó -20 °C en microtubos, no más de 5 días.

La amplificación de ADN se realizó con cebadores ERIC(De Bruijn, 1992):

ERIC1 5' ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC 3' y
ERIC2 5' AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG 3'

La amplificación por PCR se realizó según Agiuset al. (1997) en un volumen final de 25 µL: 2,5 µL de buffer NH₄SO₄ (10X), 2 µL de MgCl₂ (25 mM), 0,5 µL de dNTPs (10 mM), 2 µL del cebador ERIC1 y ERIC2 (25 µM), 0,2 µL de Taq ADN polimerasa y 5 µL de ADN genómico. El programa utilizado fue: 1 ciclo de 5 min a 95 °C, 30 ciclos de 1 min a 54 °C, 6 min a 65 °C y una fase final de elongación de 16 min a 65 °C.

Los productos de amplificación se resolvieron en geles de agarosa 1,2% (p/v) en buffer TAE 1X con 2 µL SyBrSafe cada 100 mL. En cada pocillo se sembraron 6 µL compuestos por 5 µL del producto de amplificación y 1 µL de buffer de carga ó 5 µL de marcador de peso molecular (GeneRuler 1 KbPlus ADN Ladder, Fermentas). La electroforesis se llevó a cabo a 100 volts (10vol/cm) durante 1 h. El gel se visualizó en transiluminador UV y se registró con un equipo Kodak MI SE.

Los perfiles ERIC se analizaron con el software GelCompar versión 6.5 y se consideraron las bandas con tamaños entre 250 y 1200 pb, de buena intensidad y definición. La diversidad de perfiles se estimó mediante el análisis de conglomerados (análisis de clúster). Se utilizó el coeficiente de Dice30 para calcular la similitud genética y se agruparon mediante el método UPGMA.

4. RESULTADOS

El principal problema de las semillas preinoculadas es la sobrevivencia del inoculante, que puede traer como consecuencia baja nodulación de las plantas. En este trabajo se evaluó la nodulación de plantas desarrolladas a partir de semillas con diferentes tiempos de preinoculadas, en relación a semillas inoculadas de manera convencional. Para esto se realizaron ensayos en condiciones controladas en laboratorio y en condiciones de campo. Como inoculante en ambos ensayo se utilizó la cepa U204, el inoculante comercial que se usa para trébol blanco y trébol rojo.

4. 1. ENSAYO EN CONDICIONES DE LABORATORIO

Con las semillas preinoculadas se realizaron dos ensayos, uno con semillas conservadas a 4°C y otro con semillas conservadas a temperatura ambiente. En ambos las semillas se sembraron a diferentes tiempos después de preinoculadas, y las inoculadas convencionalmente antes de las 4 h de realizado el procedimiento. En cada ensayo se determinó el número de bacterias cultivables por semilla, el tiempo de aparición del primer nódulo en tubos con medio Jensen y el número total de nódulos por planta en tubos con medio Jensen y en macetas con arena vermiculita.

4. 1. 1. Semillas preinoculadas conservadas a 4°C

Las semillas inoculadas convencionalmente se sembraron antes de las 4 h después de aplicado el inoculante y las preinoculadas en intervalos de tiempo hasta los 90 días (Cuadro 1). Hasta 60 días después de inoculadas el número de rizobios cultivables se mantuvo por encima del valor requerido por la normativa del MGAP para tréboles ($1,0 \times 10^3$ UFC/semillas). A los 90 días de inoculadas el número de rizobios cultivables fue unas 10 veces inferior al exigido por el MGAP (Cuadro 1) y estadísticamente diferente al resto de los tiempos ensayados. El número de rizobios cultivables en turba, con la cual se inocularon las semillas inoculadas convencionalmente, fue $4,1 \times 10^9$ UFC/semilla.

Para establecer el tiempo de aparición del primer nódulo se realizó un ensayo en tubos con medio Jensen, que también se usó para determinar el número de nódulos por planta a los 24 días. El tiempo de aparición del primer

nódulo fue a los 14 días con semillas sembradas 15 y 30 días después de preinoculadas, al igual que en el tratamiento control. En las semillas sembradas 90 días después de inoculadas la aparición del primer nódulo fue a los 18 días (Cuadro 1).

El número de nódulos por planta a los 15 y 30 días después de preinoculadas fue igual al tratamiento control y mayor al de las plantas provenientes de semillas sembradas a los 90 días de inoculadas (Cuadro 1).

El ensayo en macetas se realizó para estimar el número de nódulos por planta en una situación más similar a lo que ocurre en el suelo. En plantas de 30 días, desarrolladas a partir de semillas preinoculadas, la cantidad de nódulos formados fue la misma en los tratamientos de semillas sembradas 30, 60 y 90 días después de preinoculadas y menor al inducido en plantas desarrolladas de semillas sembradas 15 días desde su preinoculación (Cuadro 1).

Cuadro 2. Preinoculación vs. inoculación convencional en semillas conservadas a 4°C. Como referencia se usaron semillas inoculadas convencionalmente, sembradas antes de 4 h después de realizada la inoculación.

Tratamiento	Tiempo después de la inoculación	UFC/semilla *	Aparición del primer nódulo (días)	Nódulos por planta	
				Tubos**	Macetas***
inoculación convencional	4 h	13. 550 a	14 b	4,0 ab	5,6 a
Pre-inoculadas	15 días	12. 000 a	14 b	5, 3 a	5,5 a
	30 días	14. 420 a	14 b	3,4 abc	4,6 b
	60 días	4. 300 b	16 ab	2,9 bc	4,8 b
	90 días	366 c	18 a	1,7 d	4,4 b

Los valores son la media de dos ensayos.

*Las unidades formadoras de colonia (UFC) son la media de 5 repeticiones.

** El número de nódulos por planta en tubo son la media de 8 repeticiones.

***El número de nódulos por planta en maceta son la media de 5 repeticiones.

Letras diferentes en nódulos/planta tubo, aparición del primer nódulo (días) y UFC/semilla indican diferencias significativas mediante LSD Fisher con corrección de p-valor mediante Bonferroni, = a 0,1.

Letras diferentes en nódulos/planta macetas indican diferencias significativas mediante DGC con corrección de p-valor mediante Bonferroni, p< 0,01.

4. 1. 2. Semillas preinoculadas conservadas a temperatura ambiente

El número de rizobios cultivables en semillas conservadas a temperatura ambiente se determinó 1, 7, 15, 30, 60 y 90 días después de la inoculación y las semillas inoculadas convencionalmente antes de las 4 h después de realizado el procedimiento. La cantidad de rizobios cultivables se mantuvo por encima del valor requerido para trébol por el MGAP ($1,0 \times 10^3$ UFC/semillas) hasta 30 días después de preinoculadas. De todas formas, la cantidad de rizobios cultivables fue menor en las semillas preinoculadas en todos los tiempos ensayados, en comparación al tratamiento de semillas inoculadas convencionalmente, y a los 60 y 90 días no se detectaron rizobios cultivables con el método utilizado (Cuadro 2). El número de rizobios cultivables en turba, con la cual se inocularon las semillas inoculadas convencionalmente fue $1,6 \times 10^8$ UFC/semillas.

El tiempo de aparición del primer nódulo fue a los 12 días, tanto en los tratamientos 1, 7 y 15 días después de preinoculadas y el tratamiento control. La aparición del primer nódulo en los tratamientos sembrados 30, 60 y 90 días después de la preinoculación fue mayor en cada uno de los tiempos (Cuadro 2).

En las mismas plantas, se determinó el número de nódulos totales a los 30 días de crecimiento en condiciones controladas. Hasta 15 días después de preinoculadas las semillas, el número de nódulos por planta fue el mismo al inducido en plantas desarrolladas a partir de semillas inoculadas convencionalmente (Cuadro 2). Las plantas desarrolladas a partir de semillas preinoculadas a los 30, 60 y 90 días antes de la siembra presentaron entre sí la misma cantidad de nódulos (Cuadro 2).

Cuadro 3. Comparación de los tratamientos de preinoculación e inoculación convencional sobre semillas de trébol blanco almacenadas a temperatura ambiente.

Tratamiento	Tiempo después de la inoculación	UFC/semilla*	Aparición del primer nódulo (días)	Nódulos por planta	
				Tubos**	Macetas***
inoculación convencional	4 h	19. 875 a	12 d	3,6 a	5,5 a
Pre-inoculadas	1 día	15. 275 b	12 d	3,9 a	5,3 a
	7 días	13. 533 b	12,4 d	3,8 a	5,7 a
	15 días	10. 233 b	12,4 d	4,6 a	5,3 a
	30 días	4. 833 c	14,4 c	2,6 b	4,3 b
	60 días	<30	16 b	2,6 b	4,4 b
	90 días	<30	17,6 a	1,7 b	4,4 b

Los valores son la media de dos ensayos.

*Las unidades formadoras de colonia (UFC) son la media de 5 repeticiones.

<30, corresponde a un valor menor al detectable por el método de recuento en placa.

** El número de nódulos por planta en tubo son la media de 8 repeticiones.

***El número de nódulos por planta en maceta son la media de 5 repeticiones. Letras diferentes en UFC/semilla, Nódulos/ planta y Nódulos/planta Macetas indican diferencias significativas mediante DGC, $p < 0,1$.

4. 2. ENSAYOS EN CONDICIONES DE CAMPO

Se sembraron semillas a los 15 y 30 días después de preinoculadas en dos localidades, La Estanzuela, con larga historia de inoculación de trébol, y Glencoe con menor uso de trébol. Para establecer la ocupación de nódulos en plantas provenientes de semillas preinoculadas se usó como referencia el procedimiento convencional de inoculación con la cepa comercial U204. En ambos sitios se determinó el NMP de rizobios en el suelo y el número de rizobios por semilla, que siempre fue superior al requerido por la normativa (Cuadro 3). A partir de los nódulos se aislaron rizobios y se generaron perfiles ERIC que se analizaron con el software Gel Compare.

4. 2. 1. Ensayo I: semillas sembradas 15 días después de preinoculadas

En Estanzuela se evaluaron los perfiles ERIC de 37 aislamientos de nódulos de raíz principal desarrollados en plantas de semillas preinoculadas, sembradas 15 días después de la preinoculación. En este sitio, con un NMP de 5×10^4 rizobios/g de suelo, el 35 % de los nódulos estaban ocupados por el inoculante comercial (Cuadro 3), mientras que en el tratamiento inoculación convencional, de 40 aislamientos analizados el 83 % de los perfiles ERIC eran iguales al inoculante (Cuadro 3).

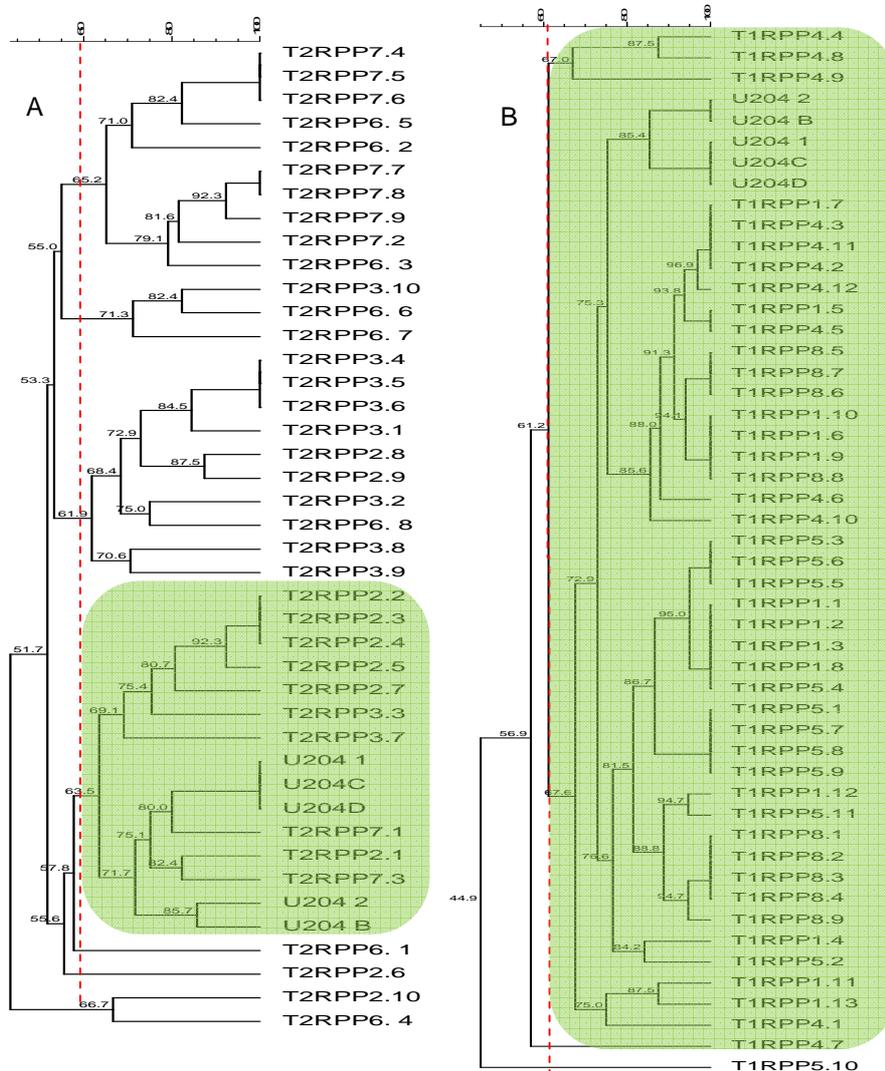
En Glencoe se evaluaron 27 aislamientos de nódulos de raíz principal desarrollados en plantas provenientes de semillas preinoculadas, sembradas 15 días después de la preinoculación. En este sitio, con un NMP fue 7×10^1 rizobios/g de suelo, el 33% de los nódulos estaban ocupados por la cepa comercial. En el tratamiento inoculación convencional, de 25 aislamientos analizados, el 60% de los perfiles ERIC eran iguales al del inoculante.

4. 2. 2. Ensayo II: semillas sembradas 30 días después de preinoculadas

Se analizaron los perfiles ERIC de 37 aislamientos de nódulos de raíz principal, de plantas desarrolladas de semillas 30 días después de preinoculadas, sembradas en La Estanzuela en un suelo con un NMP de 5×10^4 rizobios/g de suelo. El 27% de los perfiles son iguales al del inoculante, cepa U204 (Figura 1), mientras que en el tratamiento con inoculación convencional el inoculante comercial ocupó 95% de los nódulos (Cuadro 3).

En la Figura 1 se muestra un ejemplo representativo de cómo se analizó la ocupación de nódulos a partir de semillas inoculadas convencionalmente y preinoculadas.

En Glencoe, con un NMP de 7×10^1 rizobios/g de suelo se analizaron 32 aislamientos de nódulos de raíz principal. El 16% de los perfiles ERIC eran iguales al del inoculante, cepa U204, mientras que en el tratamiento con inoculación convencional el 50% de los perfiles eran iguales al inoculante (Cuadro 1).



A. T2RPP_ _ Semillas preinoculadas. B. T1RPP_ _ Semillas inoculadas convencionalmente. Se consideran iguales entre sí a los perfiles con una similitud del 60% o

más (identificados dentro de recuadros verdes). Los perfiles se analizaron con el software Gel Compare.

Figura 1. Dendrograma representativo de perfiles ERIC de aislamientos de nódulos obtenidos en La Estanzuela

Cuadro 4. Porcentaje de ocupación de nódulos por el inoculante comercial en plantas desarrolladas a partir de semillas preinoculadas e inoculadas convencionalmente en dos sitios.

	Semillas sembradas 15 días después de preinoculadas		Semillas sembradas 30 días después de preinoculadas	
	Estanzuela	Glencoe	Estanzuela	Glencoe
Rizobios viables (UFC/semilla)	10. 233		4. 833	
Nódulos ocupados	35%	33%	27%	15%
	inoculación convencional			
Nódulos ocupados	83%	60%	95%	50%

5. DISCUSIÓN

La evaluación de la nodulación de plantas desarrolladas a partir de semillas preinoculadas permitió establecer la relación entre la cantidad de rizobios que se encuentran en estado cultivable sobre la semilla y el número de nódulos inducidos, e inferir sobre las ventajas y limitaciones de esta técnica respecto a la inoculación convencional. Para esto se realizaron ensayos con semillas después de diferentes tiempos de aplicado el inoculante, en condición de laboratorio y en campo.

La determinación de rizobios sobre semillas conservadas a 4°C puso en evidencia que hasta 30 días después de inoculadas la viabilidad no varió, y fue la misma a la de las semillas inoculadas convencionalmente (Cuadro 1). La disminución de rizobios cultivables por semilla a los 60 días no afectó el tiempo de aparición del primer nódulo ni la cantidad de nódulos totales, pero a los 90 días el número de rizobios cultivables por semilla fue inferior al requerido por el MGAP (1000 UFC/semilla) y la nodulación no se afectó en el ensayo en macetas pero sí en el ensayo en tubo (Cuadro 2).

En las semillas preinoculadas conservadas a temperatura ambiente la viabilidad se mantuvo igual hasta los 15 días, pero a los 30 días la cantidad de rizobios cultivables descendió a la mitad respecto a los tiempos anteriores (Cuadro 2) y a partir de los 60 días no se detectaron formas cultivables. El hecho de que en un medio determinado no se desarrollen colonias no indica necesariamente que no haya bacterias viables, dado que las bacterias pueden ser viables pero estar en estado no cultivable (Xu et al. , 1982). Es posible que los rizobios en presencia de la planta hospedera u otras variables del suelo puedan pasar a formas cultivables e inducir la formación de nódulos (Cuadro 2).

Por esto, la metodología utilizada puede llevar a una subestimación de la cantidad de rizobios viables, pero en cualquier caso sería la misma para todos los casos.

En el ensayo realizado con semillas preinoculadas conservadas a temperatura ambiente ocurrió algo similar en cuanto a la sobrevivencia y nodulación. En la medida que aumentó el tiempo post-inoculación disminuyó la cantidad de UFC/semilla, aumentó el tiempo de aparición del primer nódulo y disminuyó el número total de nódulos en tubos y macetas a partir de los 30 días. De todas formas, si bien en ese tiempo había casi 5 veces más rizobios por semilla que los requeridos, se afectó la nodulación en términos de tiempo y nódulos totales.

Los ensayos en campo se realizaron en dos años sucesivos, en dos sitios, Estanzuela y Glencoe. En ambos ensayos se evaluó, en semillas que permanecieron 15 y 30 días después de preinoculadas, el número de rizobios cultivables sobre semillas y la ocupación nódulos en raíz primaria. La amplificación y secuenciación de ADN extraído de rizobios aislados de los nódulos de las plantas desarrolladas a partir de semillas preinoculadas, puso en evidencia una mayor diversidad de cepas que la observada en los tratamientos en los que las semillas fueron inoculadas de forma convencional, en los que prevalecía el inoculante aplicado. Esto evidencia por un lado una menor capacidad de inducir nódulos cuando el inoculante se aplica por preinoculación, y por otro la diversidad de cepas presentes en nuestros suelos capaces de nodular tréboles. Conocer la diversidad de las poblaciones nativas es importante ya que son quienes compiten con el inoculante y es determinante para el desarrollo del inoculante y el éxito de la inoculación (Lindström y Mausavi 2010, Batista et al. 2015) y a su vez son la fuente de selección.

El número de rizobios sobre semillas preinoculadas, en los dos tiempos ensayados en campo, fue mayor al requerido por el MGAP. De todas formas, a los 15 días de preinoculadas presentaron el doble de rizobios cultivables que a los 30 días.

En el ensayo a campo con semillas sembradas 15 días después de aplicado el inoculante, la ocupación de nódulos por éste fue aproximadamente la mitad respecto a cuándo se realizó inoculación convencional. En el tratamiento con semillas sembradas 30 días después de la inoculación la ocupación de nódulos por el inoculante comercial fue tres veces menos que cuando se inoculó convencionalmente.

La preinoculación tiene ventajas sobre la inoculación convencional en la medida que permite la siembra directa de las semillas sin tener que realizar el productor la inoculación. Sin embargo, a partir de los 15 días se observa que la pérdida de la capacidad de pasar a formas cultivable o de la viabilidad como tal, hace que la cepa usada como inoculante ocupe menos nódulos en la raíz primaria. Más que la búsqueda de cepas que toleren mejor esta condición, los esfuerzos se deberían centrar en desarrollar una forma de preinoculación que aumente la sobrevivencia. En semillas de mayor tamaño como soja se han logrado resultados satisfactorios, pero en semillas de pequeño tamaño como las de trébol, el desafío es mayor.

6. CONCLUSIONES

La disminución en el número de rizobios cultivables por semilla no siempre se asocia a disminución en la nodulación ni tiempo de aparición del primer nódulo, probablemente porque ese valor se subestima al expresar como número de viables, cuando lo que se determina son los rizobios cultivables.

La conservación de semillas preinoculadas a baja temperatura prolonga la vida del inoculante, si bien en la práctica no es una estrategia que se pueda implementar.

En el campo, la ocupación de nódulos por la cepa aplicada como preinoculante induce menos nódulos que en las semillas inoculadas convencionalmente, por lo que es necesario desarrollar formulaciones que mejoren la sobrevivencia.

7. RESUMEN

En Uruguay el trébol blanco y el trébol rojo se inoculan con la cepa U204 de *Rhizobium leguminosarum* sv *trifolii*. El método de inoculación utilizado es el peleteo de la semilla con el inoculante crecido en base turba. A partir de la década del 70 en algunos países se comenzó a usar otra forma de inoculación, conocida como preinoculación. Esta técnica consiste en adherir los rizobios a las semillas, con sustancias que permiten conservar su viabilidad. La técnica presenta como principal limitación la conservación de rizobios viables en semillas pequeñas como las de trébol. En Uruguay esta técnica se encuentra en desarrollo, y en este trabajo se evaluó la sobrevivencia de los rizobios y la capacidad de estos de inducir nódulos en raíces de plantas desarrolladas a partir de semillas preinoculadas, tomando como referencia semillas inoculadas convencionalmente. Se realizaron ensayos con semillas preinoculadas a diferentes tiempos después de aplicado el inoculante, en condiciones de laboratorio y de campo. En condición de laboratorio las semillas almacenadas a 4°C mantuvieron el número de rizobios viables a los 30 días después de inoculadas las semillas, pero el valor disminuyó a los 60 días aunque se mantuvo por encima del mínimo requerido por el MGAP. A los 90 días la cantidad de rizobios viables fue inferior a la requerida según las normas nacionales. En semillas almacenadas a temperatura ambiente la viabilidad se mantuvo hasta 15 días después de aplicado el inoculante, a los 30 días descendió a la mitad respecto a los tiempos anteriores, y a partir de los 60 días no se detectaron formas cultivables. El tiempo de aparición del primer nódulo se retrasó respecto a la inoculación convencional en semillas almacenadas a 4 °C después de 90 días de preinoculadas, mientras que a temperatura ambiente se retrasó a partir de los 30 días. El número de nódulos inducidos en plantas crecidas en tubo a partir de semillas preinoculadas conservadas a 4 °C, disminuyó a los 90 días, mientras que a temperatura ambiente lo hizo a partir de 30 días. En macetas, el número de nódulos en plantas desarrolladas de semillas preinoculadas conservadas a 4 °C y a temperatura ambiente disminuyó a los 30 días de la preinoculación. En condiciones de campo, en el tratamiento con semillas sembradas 15 días después inoculadas la ocupación de nódulos por el inoculante fue la mitad respecto al tratamiento de inoculación convencional. Cuando las semillas se sembraron 30 días después inoculadas, la ocupación de nódulos por el inoculante fue tres veces menor respecto a las inoculadas convencionalmente.

Palabras clave: Trébol blanco; *Trifolium repens*; Preinoculación; *Rhizobium leguminosarum*.

8. SUMMARY

In Uruguay, inoculation of red and white clover is done with the U204 *Rhizobium leguminosarum* sv *trifolii* strain. The inoculation method used is pelleting the seed with the inoculant grown on peat. After the 70s, some countries started using another method for the inoculation, known as preinoculation. This technique consists of attaching the rhizobia to the seeds using substances that allow the conservation of its viability. The technique's main limitation is the preservation of viable rhizobia in small seeds, such as clover. Said technique is being developed in Uruguay; and this paper studies rhizobia viability as well as its capability of inducing nodes in the roots of preinoculated seeds compared to seeds inoculated conventionally. We performed trials with preinoculated seeds using different timeframes after the inoculant was applied and using both laboratory and field conditions. Within the laboratory, seeds stored at 4 °C kept the same number of viable rhizobia 30 days after the inoculation occurred, but this value decreased after 60 days; although it was above the minimum required by the Ministry (MGAP). After 90 days had passed, the amount of viable rhizobia was below the national requirements. In the case of seeds stored at room temperature their viability lasted 15 days after the application of the inoculant; after 30 days it had decreased to half of what was observed previously; and after 60 days no arable forms were detected. The appearance of the first nodule was delayed in relation to conventional inoculation for those seeds stored at 4 °C 90 days after the preinoculation, while seeds stored at room temperature showed delays after 30 days. The amount of nodules for those plants grown in tubes using preinoculated seeds stored at 4 °C decreased after 90 days, while the seeds stored at room temperature showed a decrease after 30 days of the preinoculation. In field conditions, for those seeds planted 15 days after their preinoculation the appearance of nodules was a half compared to the conventional inoculation treatment. When seeds were planted 30 days after the inoculation took place, the appearance of nodules was a third compared to those inoculated conventionally.

Keywords: White clover; *Trifolium repens*; Preinoculation; *Rhizobium leguminosarum*.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Agius, F. ; Sanguinetti, C. ; Monza, J. 1997. Strain-specific fingerprints of *Rhizobium loti* generated by PCR with arbitrary and repetitive sequences. *FEMS Microbiology Ecology*. 24: 87-92.
2. Batista, L. ; Irisarri, P. ; Rebuffo, M. ; Coitiño, M. ; Sanjuán, J. ; Monza, J. 2015. Nodulation competitiveness as a requisite for improved rhizobial inoculants of *Trifolium pratense*. *Biology and Fertility of Soils*. 51(1):11-20.
3. Brockwell, J. ; Herridge, D. ; Roughley, R. ; Thompson, J.; Gault, R. 1975. Studies on seed pelleting as an aid to legume seed inoculation. 4. Examination of preinoculated seed. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry*. 15:780-787.
4. _____; Bottomley, P. 1995. Recent advances in inoculant technology and prospects for the future. *Soil Biology and Biochemistry*. 27(4): 683-697.
5. Carámbula, M. 2003. Pasturas y forrajes: potenciales y alternativas para producir forraje. Buenos Aires, Hemisferio Sur. 357 p.
6. Catroux, G. ; Hartmann, A. ; Revellin, C. 2001. Trends in rhizobial inoculant production and use. *Plant Soil*. 230: 21 - 30.
7. Date, R. 2000. Inoculated legumes in cropping systems of the tropics. *Field Crop Research*. 65(2): 123-136.
8. Deaker, R. ; Roughley, R. ; Kennedy, I. 2004. Legume seed inoculation technology—a review. *Soil Biology & Biochemistry*. 36:1275–1288.
9. De Bruijn, F. 1992. Use of Repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 58(7): 2180 - 2187.
10. Denton, M. ; Coventry, D. ; Murphy, P. ; Howieson, J. ; Bellotti, W. 2002. Competition between inoculant and naturalized *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* for nodulation of annual clovers in alkaline soils. *Crop and Pasture Science*. 53(9): 1019-1026.

11. Dewhurst, R. ; Delaby, L. ; Moloney, A. ; Boland, T. ; Lewis, E. 2009. Nutritive value of forage legumes used for grazing and silage. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*. 12:167-187.
12. Dutto, P. 2002. Recomendaciones para situaciones con problemas: inoculación de leguminosas. *Revista del Plan Agropecuario*. no. 102: 54-57.
13. Gemmell, F. ; Varjo, J. ; Strandstrom, M. ; Kuusk, A. 2002 Comparison of measured boreal forest characteristics with estimates from TM data and limited ancillary information using reflectance model inversion. *Remote Sensing Environment*. no. 81:365-377.
14. Gutiérrez, P. 2017. Evaluación de rizobios para el desarrollo de un inoculante eficiente y competitivo de *Trifolium repens*. Tesis de Maestría en Ciencias Agrarias. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 129 p.
15. Handberg, K. ; Stougaard, J. 1992. *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *The Plant Journal*. 2: 487-496.
16. Labandera, C.; Mayans, M. 2006. Control de inoculantes en Uruguay. In: Curso Internacional de Producción de Biofertilizantes Desde Laboratorio Hasta la Aplicación en Campo (23º, 2006, Bogotá). Memorias. Bogotá, Colombia, Universidad Nacional de Bogotá. Departamento de Microbiología de Suelos. Dirección General de Recursos Naturales. pp. 115-125.
17. _____. 2007. Actividades en fijación biológica de nitrógeno: situación actual y perspectivas en Uruguay. In: Izaguirre-Mayoral, M. L.; Labandera, C.; Sanjuán, J. eds. Biofertilizantes en Iberoamérica una visión técnica, científica y empresarial. Montevideo, Red Iberoamericana de Biofertilizantes Microbianos para la Agricultura. pp. 75-78.
18. Langer, R. 1981. Las pasturas y sus plantas. Montevideo, Uruguay, Hemisferio Sur. 514p.
19. MGAP. DGSSAA (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección General de Servicios Agrícolas, UY). 2017. Sistema de control de calidad de inoculantes: catálogo de la colección nacional de cepas de rizobios de Uruguay. (en línea). Montevideo.

s.p. Consultado 6 jul. 2018. Disponible en
<https://www.mgap.gub.uy/dgsainoculantesweb/inicioweb.aspx>

20. Rebuffo, M. ; Bemhaja, M. ; Risso, D. 2006. Utilization of forage legumes in pastoral systems: state of art in Uruguay. Lotus Newsletter. 3: 22-33.
21. Rivas, R. ; Velázquez, E. ; Valverde, A. ; Mateos, P. ; Martínez-Molina, E. 2001. A two primers random amplified polymorphic DNA procedure to obtain polymerase chain reaction fingerprints of bacterial species. Electrophoresis. 22(2): 1086-1089.
22. Sadowsky, M. ; Graham, P. 1998. Soil biology of the Rhizobiaceae. In: Spink, H. P. ; Kondorosi, A. ; Hooykaas, P. J. J. eds. The Rhizobiaceae. Molecular Biology of Plant Associated Bacteria. Dordrecht, Kluwer. pp. 155-172.
23. Sotelo, M. ; Irisarri, P. ; Lorite, M. ; Casaretto, E. ; Rebuffo, M. ; Sanjuan, J. ; Monza, J. 2011. Diversity of rhizobia nodulating Lotus corniculatus grown in northern and southern regions of Uruguay. Applied Soil Ecology. 49: 197-207.
24. Svenning, M. ; Gudmundsson, J. ; Fagerli, I. ; Leinonen, P. 2001. Competition for nodule occupancy between introduced strains of Rhizobium leguminosarum biovar trifolii and its influence on plant production. Annals of Botany. 88(1): 781 - 787.
25. Thompson, R. ; Battarbee, R. ; O'Sullivan, P. ; Oldfield, F. 1975. Magnetic susceptibility of lake sediments. Limnology Oceanography. 20: 687-698
26. Vincent, J. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. Oxford, Blackwell. 6 p. (IBP Handbook no. 15).
27. Yates, R. ; Howieson, J. ; Real, D. ; Reeve, W. ; Vivas-Marfisi, A. ; O'Hara, G. 2005. Evidence of selection for effective nodulation in the Trifolium spp. Symbiosis with Rhizobium leguminosarum biovar trifolii. Australian Journal of Experimental Agriculture. 45(3):189-198.