

UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA

FACULTAD DE AGRONOMIA

CONTRIBUCION AL ESTUDIO, EN TRIFOLIUM SUBTERRANEUM
Y TRIFOLIUM POLYMORPHUM, DE LA RELACION RHIZOBIUM-
RHIZOBIUM Y RHIZOBIUM-PLANTA (x)

TESIS DE GRADO

EDUARDO INDARTE

1969

(x) Trabajo realizado en el Laboratorio de Microbiología de Suelos y Control de Inoculantes del Ministerio de Ganadería y Agricultura.

INTRODUCCION

En la presente década, el Uruguay ha tenido una aceleración del proceso de tecnificación en lo que a mejoramiento de pasturas se refiere, ya sea por introducción de nuevas especies o aumento de la capacidad productiva de las pasturas nativas por agregado de fertilizantes. Este aumento en el número de Hás. de pasturas implantadas anualmente ha determinado que una serie de problemas relacionados con métodos de siembra, uso de inoculantes, fertilización, mezclas de especies, manejo, persistencia etc., hayan sido detectados y muchos de ellos investigados con éxito.

Particularmente, el uso de mejores inoculantes es un aspecto que ha merecido especial consideración por su estrecha relación con el aumento de producción de las leguminosas forrajeras.

Una de las leguminosas más usadas en las distintas mezclas de especies forrajeras es el Trifolium subterraneum, estimándose que ha sido utilizado en la siembra de más del 50% del total de Hás. de pasturas existentes actualmente en el país. La evolución del uso de Trifolium subterraneum se muestra en el cuadro siguiente:

CONSUMO DE SEMILLA DE TRIFOLIUM SUBTERRANEUM

(Miles de Kgs)

1960	1961	1962	1963	1964	1965	1966	1967	1968
15,7	29,0	59,0	54,8	122,1	279,6	347,7	346,4	551,9

(x) Fuente: Comisión Honoraria del Plan Agropecuario.

Es de hacer notar que a partir del año 1965 el T. subterraneum es la leguminosa más usada en el Uruguay, estando por encima de Medicago sativa y Trifolium repens.

Observaciones realizadas en los últimos años sobre el comportamiento de T. subterraneum, principalmente en siembras realizadas por el método de introducción directa en el tapiz(za patas) de la semilla y por siembras en cobertura sin laboreo-previo del suelo, indican, en algunos casos, disminución progresiva de la capacidad productiva de esta especie e incluso no persistencia de la misma. En general el proceso de disminución de su capacidad productiva y/o no persistencia, se halla asociado a la presencia de Trifolium polymorphum una leguminosa nativa que actúa como especie dominante en la mayoría de los casos determinando fuerte competencia en perjuicio de Trifolium subterraneum.

Trifolium polymorphum crece en suelos de profundidad y-textura muy variada, en amplios rangos de pH y en asociaciones diversas con distintas gramíneas nativas. Generalmente se favorece con pastoreo intensivo. La gran adaptabilidad, carácter cosmopolita y resistencia al pastoreo justifican un estudio detallado de las posibilidades de mejoramiento. (CASTELLS) (24).

La relación competitiva entre T. subterraneum y T. polymorphum indicada anteriormente puede ser considerada a dos niveles.

a) Por competencia entre las plantas en si, en la obtención de agua, luz, nutrientes, calor.

b) Por competencia sobre las bacterias que viven en simbiosis a nivel de sus raíces.

El efecto de competencia entre Rhizobium ha sido establecido por varios investigadores.

CHATEL, GREENWOOD y PARKER (5) determinan como problema microbiológico el fracaso de tréboles anuales en el segundo y siguientes años en el oeste de Australia. Basándose en toxicidad de extractos de suelos y crecimientos en suelos estériles y no estériles, sugieren que la causa principal de las diferen-

entre las distintas performances obtenidas son de tipo biológico. Establecen que existen considerables diferencias entre las especies de R. trifolii en colonizar suelos catalogados como -- "problemas".

SCHEFFLER Y LOW (18) estudiaron las características simbióticas de 21 aislamientos de cepas de Rhizobium provenientes de tréboles nativos, 24 aislamientos provenientes de tréboles inoculados y dos cepas provenientes de un inoculante comercial. Determinaron que el Rhizobium nativo fué generalmente poco efectivo sobre Trifolium pratense, un poco mejor en Trifolium repens y muy efectivo en Trifolium fragiferum y Trifolium subterraneum.

HELY, BERGERSON y BROCKWELL (11) en ensayos de implantación de T. subterraneum sobre un suelo podzólico amarillo de New England en la región de Nueva Gales del Sur, encontraron que la bacteria nodulante, introducida en la semilla es una inoculación normal, en poblar el suelo en la inmediata vecindad de las raíces, siendo este fracaso debido a competencia de otros Rhizobium del suelo.

VINCENT (20) en trabajos realizados en tres tipos de suelos de 18 localidades distintas del Distrito de Lismore, en los cuales crecía espontáneamente Trifolium repens y Trifolium pratense pero no Trifolium subterraneum, demostró que cepas aisladas de cuatro especies de tréboles son generalmente efectivas en asociación con T. repens y T. pratense pero casi siempre parásitas en T. subterraneum.

VINCENT y WATERS (22) continuando las investigaciones iniciadas por VINCENT (20) en suelos clasificados como "problemas" del Distrito de Lismore, establecen que la naturaleza desfavorable de esos suelos está dada por la población de Rhizobium presente y por la incapacidad de las cepas agregadas en el inoculante para persistir y multiplicarse por un efecto de competencia entre cepas que depende de la capacidad de cada cepa para competir y del propio suelo.

NICOL y THORNTON citados por VIRTANEN y MIETTINEN (23) establecen la existencia de efectividad diferencial de las cepas introducidas en contacto con la semilla, en relación a su competencia con las cepas naturales presentes en el suelo. En su trabajo, algunas de las cepas introducidas compitieron con más éxito que otras con las cepas nativas.

BROCKWELL, DUDMAN, GIBSON, HELY y ROBINSON (3) sostienen que una cepa de Rhizobium presente en un inoculante debe incluir dentro de sus características la habilidad para competir con Rhizobium nativos en la producción de nódulos. Con la finalidad de demostrar diferencias entre las cepas en cuanto a este carácter, se inocularon grupos de semillas de Trifolium subterraneum v. M. Baker con las cepas comerciales TAL, UNZ 29 y WA67 y se sembraron en un suelo que tenía una población de Rhizobium nativos de 7.700 Rh/grm. Los resultados mostraron no solamente diferencias entre las cepas en cuanto a habilidad para formar nódulos en competencia con Rhizobium nativos, sino también que a los niveles de inoculación usados en el experimento, las cepas inoculantes fueron sobrepasadas en número por los Rh. nativos presentes en el suelo en una proporción de aproximadamente 77 : 1.

JOHNSON y MEANS (15) estudiaron la relación competitiva existente entre cepas de Rhizobium japonicum y la cepa comercial 76, en ensayos de laboratorio y de campo. Los resultados mostraron que 13 sobre un total de 299 cepas estudiadas tuvieron ventaja competitiva frente a la cepa 76 en ensayos de invernáculo y que 6 de las cepas evaluadas en cuanto a habilidad para competir con la cepa 76, mostraron igual grado de competencia cuando fueron evaluadas entre ellas.

IRELAND y VINCENT (13) en experimentos con 4 variedades de Trifolium subterraneum (B. Marsh, Yarloop, Woogenellup, Dalganoo) inoculados con 4 cepas (TA2, CC242, TAL, UNZ29) y sembradas directamente en el tapiz, encontraron que las plantas podían

clasificarse en dos grupos según su aspecto: efectivo y no efectivo y que las cepas UNZ29 y CC242 tenían una performance pobre en la var. Yarloop y buena en la var. Woogenelup. Estos autores sugieren que la pobre performance de estas cepas en Yarloop se debió a una severa competencia por parte de Rhizobium nativos presentes en el suelo y que la variedad Woogenelup tuvo mejor performance debido a que se comporta como huésped inconveniente para los Rh. nativos lo que posibilita una rápida infección por parte de UNZ29 y CC242.

IRELAND (12) continuando con los trabajos de IRELAND y VINCENT (11) en ensayos de Trifolium subterraneum inoculados con distintos niveles de Rh/semilla de las cepas TAL y UNZ29 y sembrado en el tapiz, sobre un suelo que contenía 10^5 Rh. trifolii por gramo, encontró que las plantas eran noduladas por los Rhizobium nativos, los cuales aparecían como inefectivos en T. subterraneum.

BROCKWELL y DUDMAN (2) estudiaron la habilidad de 3 cepas de Rhizobium trifolii usadas en inoculantes comerciales (WA 67, - UNZ29, TAL) para formar nódulos en Trifolium subterraneum. Los experimentos se realizaron en un suelo con alta población de Rh. nativos. Los resultados obtenidos mostraron que gran parte de los nódulos habían sido formados por Rhizobium nativos y que las cepas WA67 y TAL eran igualmente eficientes para competir con los Rh. nativos y que estas dos, a su vez, tenían una performance superior a UNZ29.

GIBSON (9) estudiando la relación simbiótica entre Trifolium subterraneum Var. Woogenellup y un número de cepas de Rhizobium trifolii en ensayos en tubos y en macetas, encontró que algunas cepas introducidas fallaban en nodular adecuadamente la planta huésped cuando la siembra era realizada en suelos que contenían 10^4 Rh. nativos/grano. Bajo las mismas condiciones otras tres cepas formaron alta proporción de nódulos (más de 80%).

BROCKWELL (1) comparando métodos de inoculación y técni-

cas de recubrimiento de semillas establece que los Rhizobium nativos ya presentes en el suelo compiten con los Rhizobium introducidos en el inoculante en forma intensa y que esta competencia se establece a nivel de la zona de pelos absorbentes por los sitios de infección y por los exudados de la raíz necesarios para la multiplicación inicial de las bacterias nodulantes. Si las razas nativas de alto poder competitivo tienen bajo poder de fijación de Nitrógeno, la planta tendrá un crecimiento pobre.

VINCENT (19) establece la existencia de efectos competitivos entre cepas introducidas y cepas nativas y coincide con BROCKWELL (18) en que esta competencia se establece por los lugares de infección sugiriendo además la existencia de relación entre tamaño de nódulos y poder competitivo. El poder competitivo estaría determinado en parte por la habilidad de una cepa en formar nódulos de un cierto tamaño y a una determinada velocidad. Algunos resultados en cambio, indican que cuando las semillas de algunas leguminosas son infectadas simultáneamente por varias cepas de Rhizobium capaces de formar nódulos, todas tienen posibilidad de nodular, habiéndose obtenido nodulación simultánea de cepas efectivas y no efectivas (DUNHAM y BALDWIN citados por VIR TANEN y MIETTINEN) (23).

La existencia de un problema de competencia en el Uruguay fué establecido por el Laboratorio de Microbiología de Suelos y Control de Inoculantes del Ministerio de Ganadería y Agricultura. DATE (8) determinó que en muchos lugares la nodulación posterior al año de establecimiento de la pastura es complicada por la presencia de Rhizobium nativos de Trifolium polymorphum, los cuales rápidamente incrementan en número debido a la respuesta de esta leguminosa al agregado de fosfato cuando la siembra. La cepa de Trifolium polymorphum es altamente competitiva y aparece como -inefectiva en Trifolium subterraneum según este autor. BATHYANY y NAVARRO (17) resumiendo algunos resultados obtenidos observan ineficacia de la cepa de T. polymorphum en T. subterraneum en en

sayos de laboratorio y al mismo tiempo llaman la atención sobre la importancia del problema por la amplia difusión del T. polymorphum en los distintos suelos del país.

La identificación de "suelos problemas" para la implantación de T. subterraneum y la existencia de fenómenos de competencia, llevaron a DATE (7) a recomendar en su informe al gobierno del Uruguay "investigar el empleo de mayores densidades de inoculantes con el objeto de incrementar las posibilidades de que las bacterias nodulantes se establezcan en el suelo en competencia con las poblaciones indígenas de Rhizobium trifolii y además dar comienzo a estudios de competencia entre Rhizobium trifolii del nativo Trifolium polymorphum y otras cepas de Rhizobium de efectividad conocida..."

a) La importancia del Trifolium polymorphum en cuanto a su capacidad forrajera; b) La posibilidad de mejorarla por el uso de mejores cepas inoculantes; c) Su influencia en cuanto a los problemas de implantación de Trifolium subterraneum; d) La importancia de Trifolium subterraneum como leguminosa introducida en la mayoría de las Hás. de pasturas mejoradas del Uruguay y e) La evidencia del significado del fenómeno de competencia entre Rhizobium aportada por los autores citados anteriormente, llevaron a planear el presente trabajo.

OBJETIVOS

1) Estudiar la influencia de cepas autóctonas. (Rh. trifolii) sobre el desarrollo de Trifolium subterraneum como contribución al conocimiento de los mecanismos de la posible competencia entre cepas, principalmente en siembras en el tapiz y sobre el tapiz.

2) Estudiar la posibilidad de mejoramiento de la capacidad productiva de Trifolium polymorphum por medio de su relación simbiótica.

3) Contribuir al estudio de la competencia entre cepas de Rh. trifolii nativas y cepas de Rh. trifolii introducidas, en el país.

MATERIALES Y METODOS

A. MATERIAL

1/ Cepas usadas, según origen.

- a) Rh. trifolii de la colección del Laboratorio de Microbiología de Suelo y Control de Inoculantes del Ministerio de Ganadería y Agricultura: U20, U28, U65, U149, U150, U166, U168.
- b) Rh. trifolii aislados de nódulos de Trifolium polymorphum: R1, R2, R3, R4, R5, R7, R8, R9, R10, R11, R12, R14, R15, R71, R72, R73, R74, R75, R76, R77, R326, R327, R328.
- c) Rh. trifolii aislados de nódulos de plantas malas de Trifolium subterraneum: R78, R79, R80, R81, R82, R83, R84, R85, R86, R87, R88, R89, R90, R93.

2/ Material de laboratorio.

Se utilizó el material corriente del Laboratorio de Microbiología. El material específico usado para las pruebas de nodulación y efectividad fue descrito por DATE R. (7).

B. MÉTODOS

El trabajo se realizó en varias etapas. En primer término se eligió el material base (a). Una vez elegido este material se realizó prueba de efectividad de las cepas en Trifolium subterraneum (b) prueba de efectividad en plantas de Trifolium polymorphum de cepas efectivas en T. subterraneum (c) y ensayo de competencia de cepas efectivas y no efectivas (d).

a) Elección del material.

(a-1) El procedimiento de recolección de este material se hizo según técnicas descritas por DATE, 1965 (7). Las cepas utilizadas tienen tres orígenes distintos: nódulos de plantas,

suelo y colección del Laboratorio de Microbiología del Suelo y - Control de Inoculantes del Ministerio de Ganadería y Agricultura.

La obtención del Rhizobium del nódulo se realizó esterilizando la superficie de éste con bicloruro de mercurio 1:1000 y macerando posteriormente o simplemente fraccionando para obtener jugo nodular, el cual fué usado como material de aislamiento en cajas de Petri con medio de cultivo M79. La obtención de Rhizobium del suelo se realizó haciendo suspensiones en diluciones - crecientes e inoculando con esta suspensión, plantas de Trifolium subterraneum desarrolladas asépticamente en tubos con medio Jensen. Luego de comprobada la nodulación positiva se re-aisló el Rhizobium del nódulo perteneciente a la planta que había sido inoculada con la dilución más alta. Una vez obtenido el aislamiento del material nodular, se verificó si las colonias usadas en los repiques eran R. trifolii. Para esto se inocularon plantas de Trifolium repens y T. subterraneum en tubos con medio Jensen con la suspensión de cada cultivo. Las cepas que figuran en la lista son Rhizobium trifolii que nodularon con ambas especies.

(a-2) Para comprobar que las cepas utilizadas constituyen un material autóctono se realizó test serológico de aglutinación frente a sueros de cepas usadas en inoculantes comerciales (cepas introducidas) aplicando la técnica descrita por VINCENT (1941) . Los resultados de este test se muestran en el Cuadro I.

b) Prueba de efectividad en Trifolium Subterraneum de las cepas elegidas. Ensayo en solarium.

El método usado es el de test de selección de cepas en el laboratorio. Con una suspensión en agua estéril de cada cepa, se inocularon 5 tubos conteniendo plantas de T. subterraneum. Como con-

trol se usaron 5 tubos con plantas a los cuales se les agregó K NO₃ 5/000 (testigo N); 5 tubos inoculados con una cepa conocida como eficaz (U-28) y 5 tubos sin tratamiento ninguno. Después de 5 semanas en solarium, en el cual los tubos se distribuyeron al azar, se evaluaron los resultados, mediante peso verde de parte aérea de cada planta. (Gráfica I y Cuadro II).

c) Prueba de efectividad en Trifolium polymorphum con cepas efectivas en T. subterraneum.

Utilizando la misma técnica descrita en b., las cepas más efectivas de la colección del Ministerio de Ganadería y Agricultura fueron probadas en plantas de T. polymorphum asépticamente desarrolladas. La evaluación de resultados se realizó tomando peso verde de la parte aérea. (Cuadro III).

d) Ensayo de competencia de cepas efectivas y no efectivas.

Se trabajó a dos niveles: (d-1) Solarium y (d-2) Invernaculum.

(d-1) Solarium. Se trabajó con cultivos de cepa U-28, muy efectiva y cepa R-5 autóctona e inefectiva seleccionada al azar dentro del grupo de cepas inefectivas (serológicamente negativas a U-28 y U-20). Como inoculantes se usaron cultivos en caldos M-79, los cuales después de 48 horas fueron llevados a la misma concentración por observación de turbidez. Los tres inoculum usados fueron controlados en un recuento viable de plantas (Cuadro IV A). Plantas de T. subterráneo en tubos fueron inoculados con proporciones diferentes de las dos cepas:

R-5	U-28
100 %	---

95 %	5%
75 %	25%
50 %	50%

Después de seis semanas se tomó peso verde de parte aérea observando simultáneamente la nodulación. (Cuadro IV B)

(d-2) Invernáculo. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los ensayos anteriores, se realizaron tres ensayos utilizando unidades de hojalata para la siembra de los diferentes tratamientos.

(d-2-1) Repetición de lo efectuado en solarium (d-1) -- usando la cepa R5 y semillas pidorizadas (pellets).

El pellet se preparó usando turba inoculada con los distintos tratamientos descriptos en el (d-1). Los resultados se muestran en el Cuadro IV D.

(d-2-2) Pellets con diferentes concentraciones de cepa efectiva. Se prepararon pellets con turba inoculada con las siguientes concentraciones de cepa efectiva (U-28) desarrollada en caldo M-79.

- a. Caldo concentrado
- b. Diluido 1 : 10
- c. Diluido 1 : 100
- d. Diluido 1 : 1000

(d-2-3) Pellets con diferentes concentraciones de cepa efectiva sembrados en suelos impregnados con diferentes concentraciones conocidas de una cepa inefectiva (R-5). Los pellets usados fueron controlados en recuentos viables en plantas (Cuadro IV C). Se realizó este ensayo impregnando el suelo en unidades de hojalata, con una suspensión en agua destilada de la cepa R-5.

Se establecieron las siguientes concentraciones de R-5 - en el suelo.

- a. 10^6 Rh/gr.
- b. 10^4 Rh/gr.
- c. 10^2 Rh/gr.

Series de cada uno de estos suelos con diferentes concentraciones de cepa inefectiva fueron sembradas con pellets preparados con turba inoculada con diferentes concentraciones de cepa efectiva, estableciéndose el siguiente esquema:

<u>Suelo</u>	<u>Pellets</u>
R-5 a 10^6 Rh/gr.	U-28 concentrado
R-5 a 10^6 Rh/gr.	U-28 dilución 1:10
R-5 a 10^6 Rh/gr.	U-28 dilución 1:100
R-5 a 10^6 Rh/gr.	U-28 dilución 1:1000
R-5 a 10^6 Rh/gr.	Testigo
R-5 a 10^6 Rh/gr.	Testigo $\frac{1}{4}$ N
R-5 a 10^4 Rh/gr.	U-28 concentrado
R-5 a 10^4 Rh/gr.	U-28 dilución 1:10
R-5 a 10^4 Rh/gr.	U-28 dilución 1:100

DISCUSION DE RESULTADOS

IDENTIFICACION DE CEPAS NATIVAS

De un total de 54 cepas estudiadas, 46 se mostraron serológicamente negativas y 8 positivas frente a los antisueros - U20 y U28 (cepas usadas en los inoculantes comerciales).

De las 8 cepas positivas, 3 son originarias de nódulos de Trifolium polymorphum, 3 fueron aisladas de muestras de suelo y 2 son originarias de la colección del Laboratorio de Microbiología de Suelos y Control de Inoculantes. Es de hacer notar que el test de aglutinación se realizó hasta una dilución de 1:400.

De esta manera las cepas que se mostraron negativas son realmente autóctonas y distintas a las cepas de los inoculantes, las que se mostraron positivas son idénticas a las cepas introducidas en los inoculantes comerciales o probablemente tienen una constitución antigénica similar. No se realizó la identificación completa de las cepas positivas en razón de que escapan al objetivo de este trabajo. Las cepas positivas representan el 11% del material total. Este porcentaje coincide con otros trabajos realizados en Uruguay (Thompson J. comunicación personal) y sugieren la necesidad de futuros trabajos en relación a la importancia de cepas nativas con comportamiento similar a las cepas introducidas.

EFFECTIVIDAD DE CEPAS NATIVAS SOBRE TRIFOLIUM SUBTERRANEUM

Las cepas probadas tuvieron un comportamiento variable en cuanto a su capacidad para fijar N, la que fué medida a través del peso seco de parte aérea de la planta huésped. Aunque — existe diferencia significativa entre cepas, es de esperar una — variación mayor a la observada ampliando el período de ensayo. En este caso la cosecha se realizó a las 5 semanas de la siembra por razones de disponibilidad de material de laboratorio. Los resultados obtenidos permiten agrupar las cepas nativas estudiadas en tres grupos diferentes:

- a) Cepas que difieren positiva y significativamente con el testigo no inoculado.
- b) Cepas que no presentan diferencias significativas con el testigo no inoculado.
- c) Cepas que difieren negativa y significativamente con el testigo no inoculado.

El primer grupo representa el 27,5% del total de cepas — nativas estudiadas, el segundo grupo el 68,5% y el tercer grupo el 4%. O sea que el 27,5% de las cepas nativas estudiadas fueron capaces de formar una asociación simbiótica eficiente con el Trébol subterraneum aunque esta eficiencia fué menor que la demostrada por las cepas comerciales U28, U149 y U150.

El 68,5% no presentaron diferencia significativa con el testigo no inoculado y por lo tanto no fueron capaces de formar una asociación simbiótica eficiente, aunque en todos los casos — se observó formación de nódulos.

El 4% de las cepas estudiadas se comportaron como parásitas de la planta huésped, puesto que su asociación con esta determinó una disminución del desarrollo de su parte aérea comparándola con una planta no inoculada. La existencia de esta variación

en la relación simbiótica entre Trifolium subterraneum y las cepas nativas y la posibilidad de establecer tres grupos distintos de comportamientos permite hacer varias consideraciones.

La presencia en el suelo de Rhizobium nativos efectivos en Trifolium subterraneum ha sido señalada por algunos investigadores (14) (18) y este hecho puede cumplir un papel importante en cuanto a la persistencia de esta leguminosa en una pastura. Trifolium subterraneum es una especie anual y por lo tanto su persistencia depende del éxito de la resiembra.

Cuando una semilla de esta leguminosa procedente de una planta ya existente en el tapiz y sin bacterias nodulantes en su periferia, se pone en contacto con el suelo, tiene condicionado su posterior crecimiento a la infección de sus raíces por bacterias que sean eficientes en la fijación de N. El hecho de que existan bacterias nodulantes nativas eficientes sobre Trifolium subterraneum aumenta las posibilidades de sobrevivencia de esta planta.

Los resultados obtenidos y que se muestran en el Cuadro II y Gráfica 1 permiten realizar una segunda consideración. Si uno de los factores condicionantes del éxito o fracaso en la siembra de Trifolium subterraneum es la presencia de Rhizobium nativos en el suelo con habilidad competitiva, como se señala más adelante, el hecho de que exista una variación amplia en la eficiencia de estos Rhizobium nativos sobre esta especie y que un porcentaje de estos sean eficientes, permite pensar en la posibilidad de encontrar una cepa nativa que sea por lo menos tan eficiente como las cepas usadas en los inoculantes comerciales. Esta cepa tendría la ventaja adicional de su adaptación al medio lo que le permitiría sobrevivir en condiciones de competencia y podría ser multiplicada para ser usada como inoculante. Este aspecto se considera especialmente importante en el estudio de los problemas de implantación de Trifolium subterraneum en algunos suelos con dominancia de Trifolium polymorphum.

La presencia en el suelo de bacterias nodulantes nativas -

que forman una asociación ineficiente con Trifolium subterraneum tiene un efecto variable sobre el crecimiento de esta leguminosa, dependiendo la magnitud de este efecto en parte de las habilidades de competencia por los lugares de infección de las cepas nativa e introducida respectivamente (22) (23) (3) (21) (15) (13) (12). Si el suelo tiene un número alto de Rhizobium nativos con mayor habilidad competitiva que los Rhizobium introducidos en el inoculante pero ineficientes en la fijación de N evidentemente se producirá una falla en la implantación.

Similares consideraciones se pueden hacer respecto a las bacterias nodulantes nativas que se comportan como parásitas en Trifolium subterraneum. La existencia de este tipo de bacterias ha sido señalado por algunos autores (20) (16) (6) y su acción depresiva parece debida a sustancias solubles que afectan el crecimiento de otros Rhizobium (6) y/o a sustancias fitotóxicas que tienen efecto negativo sobre el crecimiento de la planta huésped y que son producidas por Rhizobium inefectivos o parásitos (16).

En el presente estudio solamente dos cepas nativas (R83), (R87) se comportaron como parásitas y aunque esto representa un porcentaje bajo del total de cepas estudiadas, es necesario tener en cuenta el tamaño relativamente pequeño de la muestra analizada que no permite hacer generalizaciones sobre el grado de incidencia de este tipo de cepa en fallas de implantación o resiembra de Trifolium subterraneum. De todas maneras se destaca la existencia de este hecho en el estudio realizado.

COMPORTAMIENTO DE CEPAS EFECTIVAS EN TRIFOLIUM SUBTERRANEUM SOBRE
EL DESARROLLO DE TRIFOLIUM POLYMORPHUM

El uso de cepas de Rhizobium con alta capacidad para fijar N es uno de los caminos posibles para el mejoramiento de la capacidad productiva de Trifolium polymorphum. Esta leguminosa responde considerablemente al agregado de N, tal como se muestra en el Cuadro III y Cuadro II y resultados similares han sido indicados por algunos autores (17). Esta respuesta también es notable en observaciones de campo. Los resultados obtenidos al inocular Trifolium polymorphum con las cepas U20, U28, U149 y U150 muestran que ninguna de estas cepas, usadas en los inoculantes comerciales son efectivas en T. polymorphum. No existe diferencia significativa entre el peso verde de parte aérea de esta especie inoculada con U20, U28, U149 y U150 y el testigo sin inocular.

Aunque no existe diferencia significativa entre las cepas consideradas es posible esperar una variación mayor, ampliando el número de cepas estudiadas e incluyendo Rhizobium nativos aislados de T. polymorphum. Es necesario tener en cuenta, no solamente la habilidad de una cepa para fijar N sino también la interacción entre línea huésped y especificidad de la bacteria (10) (13) o sea que dos cepas pueden fijar la misma cantidad de N. con un huésped pero pueden diferir entre sí con otro huésped distinto.

La especificidad cepa X huésped en una especie puede considerarse a tres niveles según algunos autores. (10)

- a) Una cepa nodula una línea de una especie pero no otra.
- b) Una cepa que generalmente forma nódulos efectivos en la mayoría de las líneas de una especie, sin embargo puede formar nódulos inefectivos en una o más líneas de esa especie.
- c) Efectividad diferencial. Todas las plantas son noduladas en forma efectiva pero la efectividad varía entre líneas distintas.

La existencia de más de un tipo de T. polymorphum (17) y la variación encontrada dentro de cada tipo hace que se destaque el aspecto considerado anteriormente en relación a trabajos de mejoramiento de esta leguminosa a través de sus bacterias nodulantes.

EFFECTO DE LA COMPETENCIA ENTRE CEPAS NATIVAS E INTRODUCIDAS EN
TRIFOLIUM SUBTERRANEUM

El recuento viable de los inóculos usados en el ensayo dieron resultados similares para las dos cepas: 850 millones de Rh/cc (Cuadro IV A) siendo posible realizar las mezclas directamente a base de volúmenes.

Los resultados muestran que cuando la cepa nodulante es solamente R5, en razón de que no existe otra cepa en contacto con la raíz de T. subterraneum (Tratamiento U28: 0-R5:100) no existe diferencia en el desarrollo de esta leguminosa comparándola con una planta no inoculada. Pero al aumentar la proporción de la cepa efectiva U.28 se obtiene un mayor desarrollo de la planta huésped y la diferencia es significativa aún a niveles bajos de la cepa efectiva (Tratamiento U28:5% - R5:95%) U28 se muestra como muy hábil para formar nódulos efectivos aún en presencia de un mayor proporción de nódulos nativos inefectivos y este comportamiento diferenciado demostraría una mayor habilidad de competencia de U28 que de R5. Según algunos investigadores este mayor poder competitivo estaría dado por el establecimiento de cierta inmunidad después de la entrada de la primera cepa que impide la acción de otras cepas de baja virulencia. (HILTNER, L citado por VIRTANEN y MIETTINEN) (23) otros autores no están de acuerdo con el efecto de "inmunización" determinado por la primera cepa y sugieren que el mayor poder competitivo de una cepa está dado por un mayor crecimiento inicial de la cepa invasora, el cual controla el crecimiento de la otra cepa. (NICOL Y THORNTON citados por VIRTANEN y MIETTINEN) (23).

Ha citado también como factor importante en el mayor o menor poder competitivo de una cepa, la cantidad de nódulos por gramo de raíz formado por cada cepa. Este número sería específico para cada cepa y la velocidad con que se alcanza ese número sería variable entre distintas cepas. Se considera importante la velocidad de formación de los nódulos en razón de que luego de que-

las raíces fueran saturadas con los nódulos formados por una cepa, la otra cepa competidora no formaría nódulos. (CHEN citado por VIRTANEN y MIETTINEN) (23).

En razón de que U28 se comporta como efectiva aún a muy bajos niveles, en relación a una cepa nativa inefectiva, se puede considerar que dicha cepa tiene "vigor competitivo", el cual ha sido sugerido como condición importante por algunos autores (13).

Este ensayo de competencia, fué realizado también en invernáculo (Cuadro IV D) utilizando unidades de hojalata y semilla pildorizada (pellets). Se comprueba nuevamente la inefectividad de R5. No existe diferencia significativa entre R5 y el testigo no inoculado. U28 se comporta como efectiva existiendo diferencia significativa con el testigo no inoculado.

Todos los tratamientos, excepto U28 concentrado y Nitrógeno, no presentan diferencias significativas con el testigo.

Diferencias significativas entre A₁ y A₃ y más aún entre A₃ y A₅ reiteran el efecto favorable de U-28.

Aparentemente los resultados obtenidos en invernáculo no coinciden con los obtenidos en solarium y discutidos anteriormente. Esta diferencia puede ser debida a que en el ensayo de invernáculo el caldo R5 usado era más concentrado que el caldo de U28 (Cuadro IV C) y las mezclas realizadas están referidas a volúmenes. Por lo tanto puede haber sido necesario mayor porcentaje de U28 en la mezcla para contrarrestar la mayor concentración de R5. Los resultados obtenidos en los ensayos anteriores llevaron a planear un nuevo trabajo que incluyera estudios relacionados con la competencia entre la cepa efectiva U28 y la cepa nativa inefectiva R5 a distintos niveles de concentración.

Se establecieron condiciones similares a las existentes en el campo: Distintas concentraciones de cepa U28 efectiva en contacto con la semilla y distintos niveles de cepa inefectiva R5 en el suelo. Los resultados (Cuadro IV E) muestran diferencia significativa solamente para los tratamientos que incluyen N. Los

restantes, inclusive aquellos que incluyen U28 concentrado no muestran diferencia significativa con el testigo. Se considera que no es posible obtener conclusiones válidas de este ensayo - que incluso ha dado resultados contradictorios con los presentados anteriormente, en razón de que se entiende que los datos obtenidos pueden haber sido influidos por los siguientes factores:

- a) Alto % de M.O en el suelo utilizado (6,2 %).
- b) Alto número de Rhizobium trifolii nativos en el suelo y probable presencia de cepas nativas efectivas - en Trifolium subterraneum (14.000 Rh/g.).

CONCLUSIONES

a) Las cepas elegidas se mostraron en un 89% negativas frente a los antisueros de las cepas usadas en los inoculantes comerciales, el 11% restante se mostró positivo. Esto se demuestra que pueden existir cepas nativas con comportamiento similar a las cepas introducidas. Es necesario tener en cuenta este hecho en futuros trabajos que incluyen test serológicos.

b) Los ensayos realizados muestran una variación amplia en la efectividad de cepas de Rhizobium trifolii nativos sobre Trifolium subterraneum.

Se pueden establecer tres grupos de comportamiento: efectivas, inefectivas y parásitos. Las cepas parásitas representan un 4% del total estudiado y deberán tener prioridad en ensayos de competencia, principalmente en cuanto a la determinación de su virulencia.

La existencia de cepas nativas efectivas e inefectivas tiene considerable importancia en la implantación y persistencia de Trifolium subterraneum, dependiendo esta importancia del mayor o menor grado de poder competitivo de cada una de ellas. Se considera necesario ampliar la búsqueda de cepas nativas que sean efectivas en Trifolium subterraneum y que simultáneamente den la ventaja adicional de su adaptación al medio.

c) Los ensayos realizados de efectividad de cepas comer-

ciales sobre Trifolium polymorphum demostraron que las cepas usadas son inefectivas en esta leguminosa. La existencia de una respuesta altamente significativa de Trifolium polymorphum al agregado de N, muestra la necesidad de ampliar la búsqueda de una cepa eficaz que contribuya al mejoramiento de esta leguminosa tan ampliamente distribuida.

d) Los trabajos con semillas de Trifolium polymorphum -- presentan varios inconvenientes:

- 1/ Dificil recolección y limpieza de la semilla.
- 2/ Amplia variación en el tamaño de la semilla.
- 3/ Germinación irregular dentro del período de ensayo.
- 4/ Desarrollo pobre en medio Jensen.

e) Los ensayos de competencia en solarium entre una cepa autóctona inefectiva (R5) y una cepa introducida y efectiva (U28) muestran una alta capacidad de competencia de U28 frente a R5.

Los resultados de los ensayos de competencia en invernaculum que incluyen concentraciones diferentes de cepa efectiva -- en contacto con la semilla y concentraciones diferentes de cepa nativa en el suelo no permiten sacar conclusiones.

Se considera que en investigaciones similares se deberá tener en cuenta los siguientes factores.

- 1/ Bajo contenido de M.O en los suelos utilizados en los ensayos.
- 2/ Suelos sin o con baja población de Rhizobium nativos.

Este trabajo tiene carácter solamente preliminar y su principal función pretende ser únicamente la de detectar algunos factores. La metódica usada, los resultados obtenidos y las dificultades planteadas pueden servir para orientar algunos aspectos de futuras investigaciones que se realicen sobre el tema.

AGRADECIMIENTOS

Al Cuerpo Técnico y Ayudantes del Laboratorio de Microbiología de Suelos y Control de Inoculantes por su constante ayuda, sin la cual no hubiera sido posible llevar a cabo este trabajo.

A la cátedra de Microbiología de la Facultad de Agronomía por su colaboración en el planeamiento del trabajo y revisión bibliográfica.

A los Técnicos Regionales del Plan Agropecuario por su colaboración en el aporte de muestras para la obtención de cepas nativas.

TEST SEROLOGICO DE LAS CEPAS USADAS

Cepa	Antisuero U20 + U28	Cepa	Antisuero U20 + U28
R 1	-	R 84	-
R 3	-	R 85	-
R 4	-	R 86	-
R 5	-	R 87	-
R 7	-	R 88	-
R 8	-	R 89	-
R 9	-	R 90	-
R 10	-	R 93	-
R 11	-	R 326	-
R 12	-	R 327	-
R 13	-	R 328	-
R 14	-	R 449	+ U20
R 15	-	R 450	-
R 38	-	R 451	-
R 41	-	R 452	-
R 71	-	R 453	+ U20
R 72	-	R 454	-
R 73	+ U20	R 455	+ U20

Cepa	Antisuero U20 + U28	Cepa	Antisuero U20 + U28
R 74	-	R 456	-
R 75	+ U28	R 465	-
R 76	+ U20	R 466	-
R 77	-	R 467	-
R 78	-	U 28	+ U 28
R 79	-	U 149	-
R 81	-	U 150	+ U 20
R 82	-	U 166	-
R 83	-	U 168	-

Quadro I
(Continuación)

PESO SECO EN MGRS. DEL DESARROLLO AEREO DE
TRIFOLIUM SUBTERRANEUM EN TUBOS, INOCULADO CON DIFERENTES CEPAS

Cepa	$\bar{X}$	T = 100
R 1	120,2	110,6
R 3	114,4	105,34
R 4	125,8	115,83
R 5	117,6	108,28
R 7	119,8	110,31
R 8	133,0	122,46
R 9	112,2	103,31
R 10	123,6	113,81
R 11	119,8	110,31
R 12	119,6	110,12
R 13	122,4	112,70
R 14	124,8	114,9
R 15	116,4	107,18
R 38	126,8	116,75
R 41	127,4	117,31
R 71	118,2	108,83
R 72	113,6	104,60

Cepa	$\bar{X}$	T = 100
R 88	141	129,83
R 89	130,6	120,25
R 90	116,6	107,36
R 93	119	109,57
R 326	117,4	108,10
R 327	122,2	112,52
R 328	148	136,27
R 449	111,8	102,94
R 450	108	99,44
R 451	122,8	113,07
R 452	127,2	117,12
R 453	140	128,91
R 454	128,8	118,60
R 455	111,8	102,375
R 456	127,6	117,49
R 465	140,4	129,28
R 466	119,4	109,94

Cepa	$\bar{X}$	T = 100
R 73	112,4	103,49
R 74	108,2	99,63
R 75	120,4	110,86
R 76	144,4	132,96
R 77	124,0	114,18
R 78	146,8	135,17
R 79	135	124,30
R 81	146	134,43
R 82	108	99,44
R 83	69	63,53
R 84	114,6	105,52
R 85	130,4	120,07
R 86	115	105,89
R 87	89	81,95

Cepa	$\bar{X}$	T = 100
R 467	126,2	116,20
U 28	170	156,53
U149	179	164,82
U150	177,8	163,72
U166	121,4	111,78
U168	115,8	106,62
T	108,6	100
N	189,4	174,4

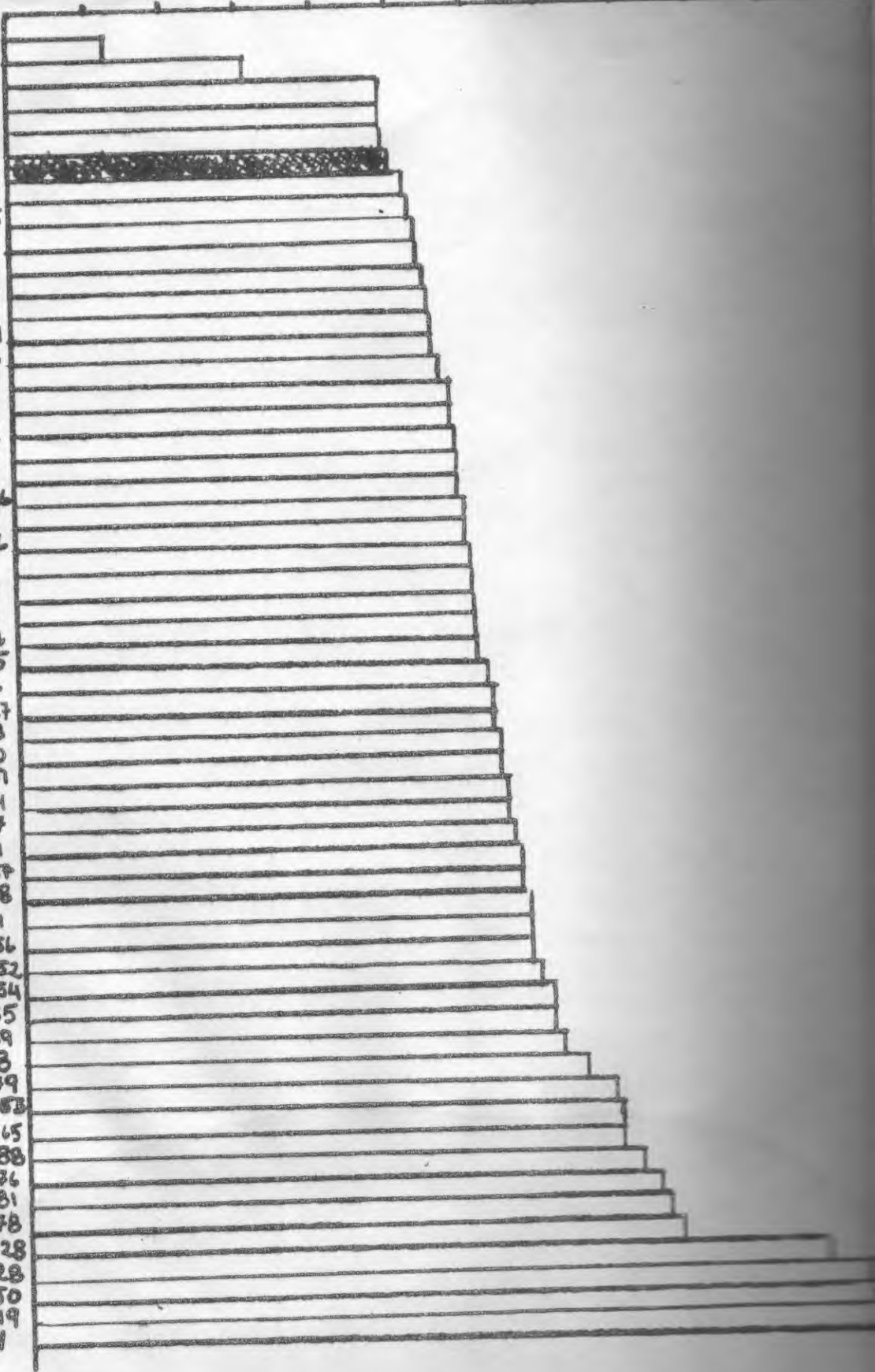
Quadro II
(Continuación)

150
140
130
120
110
100
90
80
70
60

283
" 87
" 74
" 82
" 450
T
" 449
" 455
" 9
" 73
" 72
" 3
" 84
" 86
" 168
" 15
" 90
" 5
" 71
" 324
" 93
" 466
" 1
" 7
" 11
" 12
" 75
" 166
" 327
" 13
" 10
" 451
" 14
" 77
" 4
" 467
" 38
" 41
" 436
" 452
" 454
" 85
" 89
" 8
" 39
" 453
" 465
" 88
" 76
" 81
" 78
" 328
U28
U150
U149
N

CEPAS

GRAFICA 1



PESO VERDE EN MGS. DEL CRECIMIENTO AEREO DE
TRIFOLIUM POLYMORPHUM INOCULADO CON CEPAS
EFFECTIVAS EN TRIFOLIUM SUBTERRANEUM

Ensayo en solarium

	U 20	U 28	U 149	U 150	N	T
Hgs. (x)	11	11	9	11	22	10
% Testigo	110	110	90	110	220	100

(x) Promedio de 10 repeticiones para cada tratamiento.

RECUESTO VIABLE EN PLANTAS DE LOS CALDOS USADOS

Caldo	cc	10^6	10^7	10^8	10^9	10^{10}	Rh/cc 10^6	log.
R5	1 cc	+	+	+	-	-	850	8,92
U28	1 cc	+	+	+	-	-	850	8,92

Cuadro IV A

PESO VERDE EN MGS. DE PARTE AEREA DE
TRIFOLIUM SUBTERRANEUM INOCULADO CON
MEZCLAS DE CEPAS DESARROLLADAS EN SOLARIUM

U28: 0	U 28: 5%	U 28: 25%	U 28: 50%	N	T
R 5: 100%	R 5 : 95%	R 5 : 75%	R 5 : 50%		
193,6	231	232,4	216	245	160

RECUESTO VIABLE DE RHIZOBIUM EN PLANTAS, DE LOS PELLETS USADOS

EN ENSAYO DE COMPETENCIA

Diluciones

Pellet	Cant	Diluciones					Rh/ Pellet	log.
		-2 Sem. 10	-3 10	-4 10	-5 10	-6 10		
U28 - 100 %	100	++	++	++	--	--	850	2,92
U28 - 1:10	100	++	++	--	--	--	85	1,92
U28 - 1:100	100	++	--	--	--	--	9	0,95
U28 - 1:1000	100	++	--	--	--	--	9	0,95
R 5 - 100%	100	++	++	++	+-	+-	9000	3,95
U28(5%) + R5(95%)	100	++	++	++	+-	--	3000	3,47
U28(25%) + R5(75%)	100	++	++	++	--	--	850	2,97
U28(50%) + R5(50%)	100	++	++	++	+-	--	3000	3,47

CRECIMIENTO AEREO DE TRIFOLIUM SUBTERRANEUM
INOCULADO CON MEZCLAS VARIABLES DE UNA CEPA
EFFECTIVA Y UNA CEPA INEFFECTIVA

(Peso seco en mgrs.)

	Tratamiento	mgrs. (1)
A1	U 28 concentrado	895
A2	R 5 concentrado	782
A3	U 28:50% + R 5: 50%	821
A4	U 28:25% + R 5: 75%	801
A5	U 28:5% + R 5: 95%	782
A6	T	769
A7	N	927

(1) Promedio/planta

CRECIMIENTO AEREO DE TRIFOLIUM SUBTERRANEUM INOCULADO (PELLETS)
A 4 NIVELES DE CEPA EFECTIVA (U 28) Y SEMBRADO EN SUELO
IMPREGNADO CON 3 CONCENTRACIONES DE CEPA INEFECTIVA(R5)

Ensayo en Invernaculum

Tratamiento	R5/gr. suelo	grs. (1)
U 28 concentrado	---	0.765
U 28 1 : 10	---	0.764
U 28 1 : 100	---	0.762
U 28 1 : 1000	---	0.760
T	---	0.753
N	---	0.886
U 28 concentrado	10 ⁶	0.756
U 28 1 : 10	10 ⁶	0.742
U 28 1 : 100	10 ⁶	0.770
U 28 1 : 1000	10 ⁶	0.722
No inculado	10 ⁶	0.820
N	10 ⁶	0.882
U 28 concentrado	10 ⁴	0.801
U 28 1 : 10	10 ⁴	0.712
U 28 1 : 100	10 ⁴	0.746
U 28 1 : 1000	10 ⁴	0.730
No inculado	10 ⁴	0.729
N	10 ⁴	0.853
U 28 concentrado	10 ²	0.761
U 28 1 : 10	10 ²	0.793
U 28 1 : 100	10 ²	0.836
U 28 1 : 1000	10 ²	0.768
No inculado	10 ²	0.856
N	10 ²	0.900

(1) Prom. por planta.

APENDICE

- 81. - Nódulo T. polymorphum. Estación Piñera. Paysandú. Campo Natural.
- 82. - Nódulo T. polymorphum. Camino de los Indios. Rocha. Campo Natural.
- 83. - Nódulo T. polymorphum. Camino de los Indios. Rocha. Campo Natural.
- 84. - Nódulo T. polymorphum. Melo. R-26. Campo Natural.
- 85. - Nódulo T. polymorphum. R-8, Km. 98. Campo Natural.
- 87. - Nódulo T. polymorphum. N-15. Km.-8 Campo Natural.
- 88. - Nódulo T. polymorphum. Establecimiento Ing. Thompson. Mercedes. Campo Natural.
- 89. - Nódulo T. polymorphum. R-3, Km. 249. Campo natural.
- 810 - Nódulo T. polymorphum. Establecimiento Yaffura, Flores. Campo Natural.
- 811 - Nódulo T. polymorphum. Tres Bocas, Young. Campo Natural.
- 812 - Nódulo T. polymorphum. Suc. J. Aguerre. Durazno. Campo Natural.
- 814 - Nódulo T. polymorphum. Estación Guaycurú, San José. Campo Natural.
- 815 - Nódulo T. polymorphum. R-11, Km 64. Campo Natural.
- 816 - Del Suelo. (Empalme R-10 y R-26). Campo Natural.
- 841 - Del Suelo. Estación Piñera, Paysandú. Campo Natural.
- 871 - Nódulo T. polymorphum. Arroyo El Soldado. Lavalleja. Campo Natural.
- 872 - Idem a R-71. Otra planta.
- 873 - Idem a R-71. Otra planta.
- 874 - Idem a R-71. Otra planta.
- 875 - Idem a R-71. Otra planta.
- 876 - Idem a R-71. Otra planta.
- 877 - Idem a R-71. Otra planta.
- 878 - Nódulo de T. subterraneum. Planta mala, mejor mod. Prod. convencional 1er. año. Erazú, Sarandí del Yf.

- #79 - Idem a R-78; otra planta.
- #80 - Idem a R-78; otra planta.
- #81 - Nódulo de T. subterraneum. Siembra cobertura 1er. año.
Estación Mansavillagra. Florida.
- #82 - Idem a R-81; otra planta.
- #83 - Idem a R-81; otra planta.
- #84 - Idem a R-81; otra planta.
- #85 - Idem a R-81; otra planta.
- #86 - Idem a R-81; otra planta.
- #87 - Idem a R-81; otra planta.
- #88 - Nódulo de T. subterraneum. Planta mala, mejor nod. Siembra cobertura. 1er. año. La Sierra. Rocha.
- #89 - Nódulo de T. subterraneum. Planta mala, nod. mejor. Pradera convencional. 2o. año. Estación Lomas. Rocha.
- #90 - Idem a R-89; otra planta.
- #91 - Idem a R-89; otra planta.
- #326- Nódulo de T. polymorphum. Camino de los Indios. Rocha.
Pradera IV año.
- #327- Idem a R-326; otra planta.
- #328- Idem a R-326; otra planta.
- #449- Del Suelo. Trinidad. Pradera 3 años.
- #450- Del Suelo. Santos Citiño. Paso de Aguiar. Zapata 1o. año.
Entre líneas.
- #451- Del suelo. Vicente Misvielle, P. de Amarillo. zapata 1 año.
entre líneas.
- #452- Del Suelo. Walter Vidales. Rincón del Rey. zapata 1er.año
entre líneas.
- #453- Del Suelo. J. José Martínez. Las Cañas. zapata 1er. año
entre líneas.
- #454- Idem a R-453.
- #455- Del Suelo. Arrozal Laguna Merin. P. de Cachimba.
- #456- Idem a R-452.
- #456- Idem a R-455.
- #467- Del Suelo. Dr. C. Peñagaricano. Treinta y Tres.

- U29 - TA-1. Australia.
U28 - Aislado en 1963 de inoculante Nitragin en T.S.
U65 - Nódulo de T. polymorphum. Laboratorio Pando. (P-9).
U149- -WA-67 (SU-432) específico para T.S. v. Marrar.
U150- -TA-I/65. (SU-573).
U166- Nódulo de T. polymorphum. Rocha. Octubre de 1967.
U168- De Suelo. Establecimiento Sr. Batista. Ensayo Basalto.
Paysandú.

Lillian F. m.

Quidatz

BIBLIOGRAFIA

1. BROCKWELL, J. "La semilla pelleteada como una ayuda en la inoculación de semillas de leguminosas"
World Crops. Vol. 15, pp. 334 - 338. 1963.
2. BROCKWELL, J. and DUDMAN, W.F. "Ecological studies of root-nodule bacteria introduced to field environments. 2. Initial competition between need inocula in the nodulation of Trifolium subterraneum L. seedlings".
3. BROCKWELL, J., DUDMAN, W.F., GIBSON A. H., HELY F. W. and ROBINSON A. C. "An integrated programme for the improvement of legume inoculant strains". 1968.
Trans. 9th. Int. Congr. Soil Sci. Vol. 2 pp 103 - 114.
4. CASTELLS A. "Mejoramiento de leguminosas forrajeras"
Rev. "La Estanzuela" Misc. No. 7, pp 111 - 114, 1969.
5. CHATEL D. L., GREENWOOD R. M. and PARKER C. A. "Saprophytic competence as an important character in the selection of Rhizobium for inoculation".
9th International Congress of Soil Science Transactions. Vol. II, paper 7.
6. CHEN H. K., NICOL H. and THORNTON H. G. "The growth of nodule bacteria in the expressed juices from legumes roots bearing effective and ineffective nodules".
Proc. Roy. Soc. B 129, pp 475 - 491.- 1940.
7. DATE R. A. "Inoculación de leguminosas y producción de inoculantes para leguminosas".
Inf. Gob. del Uruguay. PAO No. 2012. 1965.
8. DATE R. A. "Legume inoculations and Rhizobium studies in Uruguay".
Rhizobium Newsletter, Vol. 10, No. 2, pp 125 - 131, 1965.
9. GIBSON A. H. "Nodulation failure in Trifolium subterraneum L. cv. Woogenellup (Syn. Marrar).
Aust. J. Agric. Res. 19 (6): 907 - 918. 1968.

10. GIBSON A. H. and BROCKWELL J. "Symbiotic characteristics of subspecies of Trifolium subterraneum".
Aust. J. Agric. Res. 19 : pp 891 - 905, 1968.
11. SELLY F. W., BERGERSON F.J. and BROCKWELL J. "Microbial antagonism in the rhizosphere as a factor in the failure of inoculation of subterranean clover".
Aust. J. Agric. Res. 8 : pp 24 - 44. 1957.
12. IRELAND J.A. "The effect of level of inoculation and lime pelleting upon competition for nodulation of subterranean clover".
Rhizobium Newsletter. Vol 11. No. 2, pp 170 - 175. 1965.
13. IRELAND J. and VINCENT J. M. "Competition for nodulation of subterranean clover in the Lismore District".
Rhizobium Newsletter. Vol. 10, No. 1, pp. 23 - 26. 1964.
14. JENKINS H. V., VINCENT J. M. and WATERS L.M. "The root nodule bacteria as factors in clover establishment in the red basaltic soils of the Lismore Districts, N.S.W. III: field inoculations trials".
Aust. J. Agric. Res. 5 : pp 77 - 89. 1954.
15. JOHNSON H. W. and MEANS U. M. "Selection of competitive strains of soybean nodulating bacteria".
Agronomy J. 56 : pp 60 - 62. 1964.
16. JORDAN D. C. and GARRARD E. H. "Studies on the legume root nodule bacteria. I. Detection of effective and ineffective strains".
Can. J. Botany. 29 : pp 360 - 372.
17. MATARRO G. y BATTHYANY C. "Trifolium polymorphum en Uruguay"
Actas 4ta. Reunión. Lat. Riz. P.Alegre (En Imp.) 1968.
18. SCHEFFLER J.G. and LOUW H. A. "The symbiotic characteristics of the clover rhizobia in the soils of the Stellenbosch District".
S. Africa. J. Agric. Sci. 10 : pp. 395 - 402. 1967.

19. VINCENT J.M. "The root nodule bacteria of legumes".
Proc. of the Linn.Soc. N.S.W. Vol. LXXIX Parts 1-2. 1954.
20. VINCENT J.M. "The root nodule bacteria as factors in clover establishment in the red basaltic soils of the Lismore District, New South Wales. I. A survey of native strains".
Aust. J. Agric. Res. 5 : pp. 55 - 60. 1954.
21. VINCENT J.M. "Australian studies of the root nodule bacteria. A review.
Proc. Linn. Soc. N.S.W. Vol. LXXXVII Part. 1. 1962.
22. VINCENT J.M. and WATERS L.M. "The root nodule bacteria as factors in clover establishment in the red basaltic soils of the Lismore District, N.S.W. II: Survival and success of inocula in laboratory trials".
Aust. J. Agric. Res. 5 : pp. 61 - 76. 1954.
23. VIRTANEN A. and MIETTINEN J.K. "Competition between rhizobial strains".
Plant Physiology, Vol. III, pp. 587 - 591. 1963.