

UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA
FACULTAD DE AGRONOMIA
CATEDRA DE MICROBIOLOGIA

5 MAR. 1971.

METODOS DE SELECCION DE CEPAS DE
RHIZOBIUM TRIFOLII (Dangeard)
PARA TRIFOLIUM SUBTERRANEUM L.C.V.
BACCUS MARSH

I. ENSAYOS DE LABORATORIO

E. C. SCHRODER

JULIO DE 1970

BIBLIOTECA FACULTAD DE AGRONOMIA

UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA
FACULTAD DE AGRONOMIA
CATEDRA DE MICROBIOLOGIA

MÉTODOS DE SELECCIÓN DE CEPAS DE RHIZOBIUM TRIFOLII
(Dangeard) PARA TRIFOLIUM SUBTERRANEUM L. Cv. BACCUS MARSH

I. ENSAYOS DE LABORATORIO

E. C. SCHRODER

JULIO DE 1970

FE DE ERRATAS

pág 2,3 y 7 donde dice : lehemoglobina debe decir: leghemoglobina

pág 3 dice dice : ajustada debe decir: ajustado

pág 4 Tabla II Los resultados de los pesos están expresados en mg y
los de N total en $\text{mg} \times 10^2$

pág 6 Cuadro II b) peso verde total. Entre R71 y R452 debe ir R87

pág 8 donde dice R7 debe decir: U7

pág 9 donde dice: efective debe decir: effective

MÉTODOS DE SELECCIÓN DE CEPAS DE RHIZOBIUM TRIFOLII
(Dangeard) PARA TRIFOLIUM SUBTERRANEUM L.C.V. 'BACCUS
MARSH'

1. ENSAYOS DE LABORATORIO

por E.C. SCHRODER (1)

BIBLIOTECA FACULTAD DE AGRONOMIA

RESUMEN

Se han constatado problemas en la introducción de Trifolium subterraneum L. en suelos superficiales sobre basalto. Para obtener un buen establecimiento es necesario el uso de cultivares adaptados con cepas efectivas en las condiciones de campo.-

Baccus Marsh tuvo un buen comportamiento por lo que se hizo una selección para este cultivar, resultando U185 (WU290), U150 (TA1/65) y R134 las mejores cepas.-

Las correlaciones calculadas entre: número de nódulos, peso verde total, peso verde de la parte aérea y peso seco de la parte aérea, resultaron altamente significativas. Tanto el peso verde como el peso seco son útiles como método de selección de cepas.-

I. INTRODUCCION

Aproximadamente el 21% de la superficie del territorio nacional presenta como material geológico una roca efusiva básica, basalto. (BOSSI, 1966). Sobre este material madre se desarrollan principalmente suelos superficiales y muy superficiales. Estudios del régimen hídrico han determinado que estos suelos pasan por un largo período durante el verano casi sin ninguna humedad disponible para las plantas (LABALLA et al., 1968). Dadas estas características, la utilización de estos suelos se restringe a la cría ovina. La inclusión de una leguminosa podría mejorar la producción de forraje y las condiciones de fertilidad del suelo (CIDE, 1963). Las leguminosas anuales de ciclo invernal serían las de mejor adaptación a estas condiciones y el método de implantación más adecuado, la sembradora a zapa-tas (soil-seeder). La instalación del trébol subterráneo fracasó en el primer año (siembra en cobertura) o en el segundo (siembra convencional) (MUR-GUIA, 1965) (LABANDERA et al., 1968) (QUADRELLI, 1968). A fin de estudiar este problema se instalaron ensayos de evaluación de especies y variedades de leguminosas. Entre los cultivares de trébol subterráneo de buena adaptación y rendimiento figura el Baccus Marsh (BONNET, 1969) (SACCONE y TER-MEZANA, 1970) por lo que se consideró importante la búsqueda de una cepa de RHIZOBIUM TRIFOLII que se adaptara a las condiciones de esa zona. En los ensayos de introducción de especies y variedades que se realizan actualmente (CARAMBULA y TERMEZANA, com.por.) se utiliza N aportado por fertilizantes, a los efectos de establecer cuales son las variedades que se adaptan mejor, para luego seleccionar cepas de alta capacidad de fijación (GIBSON y BROCKWELL, 1968).-

El presente trabajo informa sobre la selección de cepas de RHIZOBIUM TRIFOLII para el cultivar Baccus Marsh de trébol subterráneo realizada en laboratorio, a fin de seleccionar cepas de efectividad potencial. Las cepas pre-seleccionadas en laboratorio se prueban luego en macetas en invernáculo y en condiciones de campo.-

(1) Cátedra de Microbiología, Facultad de Agronomía, Garzón 780, Montevi-

Para hacer esta preselección se hicieron distintas determinaciones con la finalidad de correlacionarlas entre sí y determinar su valor como método para seleccionar cepas. Muchos parámetros son utilizados para evaluar la capacidad de fijación de distintas cepas de RHIZOBIUM. Algunos se refieren a las características de los nódulos como: fecha de aparición del primer nódulo (GIBSON, 1968), número de nódulos y peso verde o seco de los mismos (DOBEREINER *et al.* 1966). Otras al rendimiento de la planta tales como el peso verde y peso seco, total o de la parte aérea; agua y cenizas de parte aérea (SCHIEL *et al.*, 1964).--

La mayor parte de las mediciones se refieren al contenido en N de la planta, sea evaluado como porcentaje en N de la planta o partes de ésta como cantidad (total o neta) de N, o midiendo el aumento relativo a través de un índice (E_N de GIBSON, 1965). Recientemente se ha propuesto la evaluación de la velocidad de fijación (HARDY *et al.*, 1968) determinando la actividad de la nitrogenasa por la reducción del acetileno en etileno cuyas variaciones se miden por cromatografía de gases. Este es un método simple, rápido y tiene una sensibilidad 10^5 veces mayor que el del N^{15} .--

VIRTANEN *et al.*, (1947) demostró que existía una relación estrecha entre la tasa de lehemoglobina en los nódulos y la eficiencia de la simbiosis y GRAHAM y PARKER (1961) encontraron una correlación altamente significativa entre contenido de lehemoglobina y contenido de N en la parte aérea en Lupinus digitatus.--

BROCKWELL propuso un método rápido para estimar la capacidad de fijación de cepas de RHIZOBIUM TRIFOLII (1956) y RHIZOBIUM MELILOTI (1958) utilizando variedades de hoja roja con alto contenido en antocianina. Otro método rápido para seleccionar cepas fue propuesto por WROBEL y ZIEMIECKA (1964) quienes encontraron que la energía respiratoria de hojas jóvenes, medida por el método respirométrico, estaba correlacionada con la efectividad de la cepa usada.--

Otros autores han tratado de encontrar propiedades de los rhizobios in vitro, capaces de indicar la actividad fijadora en simbiosis; así se han comunicado correlaciones entre efectividad y cantidad de asparagina utilizada (GUPTA y SEN, 1963), velocidad de utilización de glucosa (GUPTA y SEN, 1965), succinato (KATZNELSON y ZAGALLO, 1957), efecto enlentecedor de la D-leuciglicina (JORDAN y SAN CLEMENTE, 1955), susceptibilidad a la neomicina, y viomicina y kanamicina (SCHWINGHAMER, 1964), a ciertos D-aminoácidos y anti-metabolitos (SCHWINGHAMER, 1968), y a ciertos fagos líticos (KLECZKOWSKA, 1950).--

Sin embargo, la efectividad depende de la combinación cepa-planta huésped por lo que es necesario una evaluación agronómica en condiciones de campo para una selección definitiva.--

II. M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

A) MATERIALES

1. Semillas.--Semilla certificada de *Trifolium subterraneum* cv. 'Bacchus Marsh'
2. Cepas.--A fin de poder generalizar las observaciones relativas a la comparación de las distintas determinaciones se utilizó un rango amplio de cepas que va de cepas altamente efectivas a parásitas. Las cepas utilizadas son subcultivos de la colección del Lab. de Microbiología de Suelos y Control de Inoculantes del M.G.A., obtenidas gracias a la gentileza del Dr. C. BATTHYANY. La identificación utilizada y su procedencia figuran en la TABLA 1.--

TABLA 1. IDENTIFICACION Y PROCEDENCIA DE LAS CEPAS PROBADAS

CEPA	ORIGEN
U7	NZ29, Nueva Zelanda
U11	NZ29, Nueva Zelanda
U16	Lab. Dispert, Uruguay
U28	M.G.A., Uruguay
U90	INTA A-4, Argentina
U91	3 DIK-5, E.E.U.U.
U150	TA 1/65, Australia (SU573)
U185	WU290, Australia
R1	Trifolium polymorphum, Est. Piñera, Paysandú, Uruguay
R42	Suelo. Estación Piñera, Paysandú, Uruguay
R71	T. polymorphum. Sr. Ugarte, Lavalleja, Uruguay
R72	Idem a R71, otra planta
R82	T. subterraneum. Est. Mansavillagra, Florida, Uruguay
R-83	Idem a R82, otra planta
R87	Idem a R82, otra planta
R134	T. subterraneum, Sr. A. Fillat, Durazno, Uruguay
R450	Suelo. Sr. S. Coitiño, Paso Aguiar, Uruguay
R452	Suelo. Sr. W. Vidales, Rincón del Rey, Uruguay
R455	Suelo. Puntas de Cachimba. Arrozal. Laguna Merim. Uruguay.

3. Medios de cultivo.-Las cepas se mantenían en tubos con medio de la siguiente composición (basada en FRED, BALDWIN y McCOY, 1932): Mannitol 10 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2g; NaCl 0,1 g; $CaCO_3$ 4g; extracto de levadura 1 g; agar 15 g; 10 ml de una solución de Rojo Congo; agua destilada hasta 1 lt. El pH es ajustada a 6,8-7,0 y el medio esterilizado en autoclave a 121°C durante 15 minutos.-

Las plantas crecieron en el medio de JENSEN (1942): $CaHPO_4$ 1g; K_2HPO_4 0,2 g; NaCl 0,2 g; $FeCl_3$ 0,1g; agar 10-15g; agua destilada a 1 lt. El pH se ajustó a 6,5 con NaOH y se esterilizó en tubos a 121°C durante 15 minutos.-

B) MÉTODOS

1.-Plantas.-Las semillas se esterilizaron superficialmente mediante un lavado con alcohol etílico (96°) seguido de $HgCl_2$ 1:500 durante 4 minutos y lavado 4 veces con agua destilada estéril. Luego de germinada se sembraron asépticamente 2 semillas en tubos de 180 x 20 mm conteniendo medio JENSEN, cerrados con tapones de algodón.-

2.-Cepas.-Los cultivos de RHIZOBIUM TRIFOLII Crecieron en estufa a 28°C hasta tener un buen desarrollo.-

3.-Inoculación.-Se hizo una suspensión del cultivo con agua destilada estéril y se inoculó con 0,2 ml cada tubo con 2 plantas. El número total de tratamientos fue 21, ya que además de las 19 cepas se incluyó un testigo sin inocular y un control al que se agregó 1 ml por tubo de una solución al 0,05% de KNO_3 . El nitrato se agregó a los 15 días de la inoculación, cuando todas las plantas estaban noduladas, para hacer comparables los tratamientos. Se hicieron 12 repeticiones de cada tratamiento.-

4.-Desarrollo.-Las plantas crecieron en cajones conteniendo cada uno dos hileras de tubos de ensayo por lo que las raíces no recibían luz directa. La iluminación era lateral usando tubos fluorescentes (blanca) durante 14 horas diarias, sin control de la temperatura.-

5.-Cosecha y determinaciones efectuadas.-Las plantas se cosecharon a las 8 semanas de la inoculación y se hicieron las siguientes determinaciones: a) número de nódulos, b) peso verde total, c) peso verde de la parte aérea, d) peso seco de la parte aérea (85°C), e) porcentaje de nitrógeno orgánico. Para tomar los pesos se utilizó una balanza analítica con sensibilidad hasta 0,1 mg. Debido al pequeño tamaño de algunas de las muestras (escaso crecimiento de las plantas en los tubos) el porcentaje de N se calculó sobre una muestra compuesta formada por las 12 repeticiones y se efectuó un solo análisis por tratamiento.-

6.-Diseño y análisis estadístico.-El diseño fue el de parcelas al azar y los resultados se analizaron estadísticamente mediante el Análisis de la Variancia. Para determinar diferencias significativas entre tratamientos se aplicó la Prueba de TUKEY. Con la finalidad de comparar las distintas determinaciones se calculó la correlación entre algunas de las determinaciones y se hizo el correspondiente test de significancia.-

III. R E S U L T A D O S

En la TABLA II se expresan^{IV} los promedios de cada tratamiento para cada determinación.-

TABLA II.-RESULTADOS expresados en promedios de 12 repeticiones para cada tratamiento.-

Nº de TRAT.	CEPA	Nº de NO-DULOS/TUBO	PESO VERDE TOTAL	PESO VERDE PARTE AEREA	PESO SECO PARTE AEREA	N %	N TOTAL
1	NO3K2	-	316,3	129,4	24,6	2,53	62,23
2	Testigo	-	203,7	61,8	16,0	1,90	30,40
3	U7	47,9	253,8	172,8	25,8	3,84	99,07
4	U11	46,4	262,9	179,2	25,5	3,36	85,68
5	U16	57,3	194,2	117,4	20,2	2,92	58,98
6	U28	63,1	255,9	173,4	25,9	3,15	81,58
7	U90	60,4	196,1	111,1	21,5	2,54	54,61
8	U91	50,1	267,9	177,8	27,6	2,72	75,07
9	U150	31,7	287,7	201,7	28,6	3,71	106,10
10	U185	35,0	319,1	216,7	31,0	3,66	113,46
11	R1	No nodula	163,9	56,9	18,5	1,74	32,19
12	R42	38,2	251,6	157,7	27,2	3,05	82,96
13	R71	63,0	133,2	61,1	16,8	2,01	33,76
14	R72	79,4	135,7	58,8	17,7	2,82	49,91
15	R82	85,6	139,6	59,9	18,0	1,70	30,60
16	R83	78,3	138,4	56,8	17,7	1,87	33,09
17	R87	62,9	125,5	63,7	16,0	2,06	32,96
18	R134	71,8	292,2	191,0	29,9	3,01	89,99
19	R450	80,1	152,5	59,0	18,1	1,89	34,20
20	R452	80,5	125,4	50,1	16,2	1,99	32,23
21	R455 ^(a)	65,0	109,5	50,7	15,2	2,29	34,80

(a) Aglutinación positiva con suero de U20 (TAI) (INDARTE, 1970).-

Todas las repeticiones de cada cepa estaban noduladas antes de

transcurridos 15 días desde la fecha de inoculación, excepto la cepa R1 que no fue capaz de nodular en ninguna de las repeticiones.-

En el cuadro I se presente el Análisis de Variancia para cada una de las características:

CUADRO 1

a) Análisis de Variancia para el número de nódulos

FUENTE	GL	SC	CM	F	
Tratamientos	17	55 474	3 322	6,47 ⁺⁺	
Error	198	101 590	513,08		C.V.= 37,1%
TOTAL	215	158 0 64			

b) Análisis de Variancia para el peso verde total

FUENTE	GL	SC	CM	F	
Tratamientos	20	1,1810	0,05905	33,07 ⁺⁺	
Error	231	0,4124	0,001785		C.V.= 20,4%
TOTAL	251	1,5934			

c) Análisis de Variancia para el peso verde de la parte aérea

FUENTE	GL	SC	CM	F	
Tratamientos	20	0,7118	0,03559	26,58 ⁺⁺	
Error	231	0,3093	0,001339		C.V.= 31,9%
TOTAL	251	1,0211			

d) Análisis de Variancia para el peso seco de la parte aérea

FUENTE	GL	SC	CM	F	
Tratamientos	20	0,006662	0,0003331	24,5 ⁺⁺	
Error	231	0,00001555			C.V.=16%
TOTAL	251	0,009794			

++ Diferencia significativa al 1%

Debido a que hay diferencia altamente significativa en todos los casos, se aplicó la Prueba de TUKEY para ver entre que tratamientos había diferencias y los resultados se resumen en el Cuadro II

C U A D R O II - PRUEBA DE TUKEY

a) Número de nodulos Nivel de significancia=5%

R452	R450	R72	R83	R134	R455	U28	R71	R87	U90	U16	U91	U7	U11	R42	U185	U150
------	------	-----	-----	------	------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	----	-----	-----	------	------

b) Peso verde total. Nivel de significancia, 1%.--

N	R134	U150	U91	U11	U28	U7	R42	T	U90	U16	R1	R450	R82	R83	R72	R71	R452	R455
---	------	------	-----	-----	-----	----	-----	---	-----	-----	----	------	-----	-----	-----	-----	------	------

c) Peso verde de la parte aérea. Nivel de significancia, 1%.--

U150	R134	U11	U91	U28	U7	R42	N	U16	U90	R87	T	R71	R82	R450	R72	R1	R83	R455
------	------	-----	-----	-----	----	-----	---	-----	-----	-----	---	-----	-----	------	-----	----	-----	------

d) Peso seco de la parte aérea. Nivel de significancia 1%.--

R134	U150	U91	R42	U28	U7	U11	N	U90	U16	R1	R450	R82	R72	R83	R71	R452	T	R87
------	------	-----	-----	-----	----	-----	---	-----	-----	----	------	-----	-----	-----	-----	------	---	-----

tratamientos subrayados con la misma línea no difieren significativamente (5 o 1% RESP.)--

Los valores encontrados para las correlaciones y el resultado de su test de significancia se aprecian en el CUADRO III

CUADRO III Correlaciones entre algunas de las determinaciones

$r_{a.b}$	=	-0,356	$t= 5,57^{++}$
$r_{b.c}$	=	0,887	$t= 20,4^{++}$
$r_{b.d}$	=	0,879	$t= 29,1^{++}$
$r_{c.d}$	=	0,923	$t= 38,0^{++}$

$^{++}$ Diferencia significativa al nivel 1%

IV DISCUSION

A) Selección de cepas efectivas.-

a) Número de nódulos.-Al analizar estadísticamente el número de nódulos, se encuentra que hay diferencia altamente significativa entre las 18 cepas estudiadas; el número más bajo de nódulos se encontró en las cepas U150, U185 y R42. Los nódulos formados por estas cepas serían altamente en la fijación de N₂ que con un menor número de nódulos alcanzan mayor desarrollo. Es de hacer notar que las plantas crecieron de a pares en un pequeño volumen de medio, por lo que formarían menos nódulos que aisladas (NUTMAN, 1953). No se puede determinar una característica importante para especies anuales como el trébol subterráneo, como es la velocidad de infección, propiedad indicadora del poder competitivo de las cepas. Sin embargo, la característica más importante no es sólo el número de nódulos sino el volumen y la duración del tejido central que contiene los bacteroides y la lehemoglobina (CHEN y THORNTON, 1940). Se explica así el hecho de que la cepa R134 haya propiciado un desarrollo apreciable, lo que logró mediante un gran número de nódulos poco eficientes.-

b) Peso verde total.-Se encontró diferencia altamente significativa entre los 21 tratamientos, correspondiendo a las cepas U185, R134 y U150 y al control NO₂K los mayores rendimientos observados, difiriendo estadísticamente al nivel 1% del testigo sin inocular, lo que indica la elevada capacidad de fijación de las cepas mencionadas. Se comprobó que las cepas R71, R87, R452 y R455 diferían negativamente del testigo sin inocular en forma altamente significativa.-

c) Peso verde de la parte aérea.-El análisis estadístico mediante la Prueba F indicó que habían diferencias altamente significativas entre los 21 tratamientos; al aplicarse la prueba de TUKEY las cepas U185, U150, R134 y U11 diferían en forma positiva y altamente significativa del control con N, que a su vez difería del testigo sin inocular.-

d) Peso seco de la parte aérea.-Aplicada la prueba de TUKEY a las medias de los tratamientos, la cepa U185 era superior en forma altamente significativa al control con N, siguiendo inmediatamente

e) Contenido en N.-El resultado obtenido en el análisis de N debe ser considerado una aproximación, debido a que se efectuó una única determinación por ser la muestra de muy pequeño tamaño. GIBSON (1967) encontró que las leguminosas tienen un crecimiento restringido dentro de los tubos en que se limita la difusión del CO_2 . Entre las cepas de mayor contenido en N total se ubican U185, U150 y R7. Si se toma como criterio de efectividad un porcentaje de N superior al 2,5% (ALLEN, 1957) se incluyen además otras 8 cepas como efectivas (U11, U28, R42, R134, U16, R72, U91 y U90), siendo el conjunto de las 11 superior al Control con N. HAYDOCK y NORRIS, (1967) concluyeron que los controles con nitrato deben ser usados con precauciones y que el uso de porcentajes de N como standard de comparación para las plantas fijando N simbióticamente conduce a errores, debido a que opera un sistema diferente.-

Se observó un descenso en la posición que ocupan el testigo sin inocular y sobre todo el control con NO_3K al pasar del peso verde total al peso aéreo, verde o seco, lo que indica que el rendimiento en el peso verde total era propiciado en gran parte por un gran desarrollo radicular. Esto se asocia fácilmente con la carencia de nódulos de estos tratamientos permitiendo el desarrollo de todas las raíces posibles, lo que no ocurre en los tratamientos inoculados por formarse nódulos en los puntos de origen de las raíces laterales (NUTMAN, 1956, 1958, 1959, 1962). Esto está de acuerdo con los resultados de DARBYSHIRE (1966), quien obtuvo mayor número y largo de raíces laterales con ciertas concentraciones de NO_3K .-

Considerando el peso verde total es posible formar 3 grupos de cepas, tomando como base al testigo sin inocular (INDARTE, 1969).-

- a) cepas efectivas, que difieren significativamente del testigo sin inocular,
- b) cepas inefectivas, que no presentan diferencias significativas con el testigo inoculado,
- c) cepas parásitas que difieren del testigo sin inocular en forma significativa.-

El primer grupo incluye las cepas U185, U150 y R134; utilizándose actualmente las 2 primeras para la fabricación de inoculante comercial específico para trébol subterráneo (Lab. de Microbiología de Suelos y Control de Inoculantes, M.G.A.). La cepa R134 fue aislada de una planta de trébol subterráneo de una pradera convencional en su 3er. año, y estudiada serológicamente no fue identificada como cepa agregada en el inoculante, por lo que se trataría de una cepa nativa de gran poder competitivo.-

La clasificación de las cepas en los 3 grupos mencionados únicamente se pudo efectuar al determinar el peso verde total, ya que el bajo rendimiento del testigo sin inocular no permitió encontrar diferencias negativas con significancia estadística cuando se determinó el peso aéreo.-

En resumen, el análisis de los datos indica que existen grandes diferencias entre las cepas utilizadas en este ensayo en su capacidad de fijar N, cualquiera sea el método utilizado para detectar estas diferencias.-

De los resultados obtenidos en esta preselección de laboratorio, se desprende que la cepa a recomendar para *Trifolium subterraneum* cv. "Bacchus Marsh" sería la U185, siendo las R134 y U150 cepas de buen comportamiento.-Una recomendación definitiva para las condiciones de los suelos basálticos se obtendrá una vez finalizadas las selecciones que se llevan a cabo en macetas con suelo en invernáculo y en las condiciones de campo.-

B) Metodología empleada.-

No existe una característica que sea aceptada universalmente como índice para evaluar la capacidad fijadora de la combinación *Rhizobium-leguminosas*, utilizándose diferentes métodos y criterios para seleccionar cepas efectivas de rhizobios, dependiendo de las condiciones y finalidad perseguida.-

Muchas diferentes determinaciones pueden ser consideradas y al hacer las comparaciones pueden utilizarse 3 controles distintos como patrón: a) Testigo sin inocular, b) cepa de referencia y c) control con nitrógeno.-

Si bien en este trabajo se determinaron 5 diferentes características, únicamente 4 de ellas pueden ser comparadas estadísticamente para ver si pueden sustituirse una por otra sin alterar los resultados en forma significativa. En este caso, las 4 características utilizadas tuvieron correlaciones altamente significativas lo que permite evaluar las cepas por cualquier método. Sin embargo, el número de nódulos es la característica que presenta mayor Coeficiente de Variación y la respuesta significativa pudo obtenerse debido al elevado número de grados de libertad del ensayo. Visto que F_c dió diferencias muy por encima de la F tabla, se considera innecesario utilizar un número tan elevado de repeticiones cuando se prueban muchas cepas en condiciones de laboratorio. Al reducir el número de repeticiones puede resultar que no se encuentren diferencias significativas en el número de nódulos, pero sí en el rendimiento de la planta, esta característica sería usada entonces por razones prácticas.-

V. AGRADECIMIENTOS.-

El autor está en deuda con el Laboratorio de Microbiología de Suelos y Control de Inoculantes por el suministro de las cepas y la discusión de la metodología; con el Ing.Agr. J.A.BONILLA por el análisis estadístico y con el Ing.Agr. J.ZAMALVIDE por la colaboración en los análisis de nitrógeno.-

SUMMARY

There have been recorded some problems in the introduction of *Trifolium subterraneum* in basaltic superficial soils. To obtain a good establishment it is necessary the use of adapted cultivars with effective strains in field conditions. Baccus Marsh behaved well so a selection for this cv., the better strains were U185 (WE290), U150 (TA1/65) and R134.-

The correlations estimated between number of nodules, total green weight shoot green weight and shoot dry weight were highly significant. Any of the weights is useful as strain selection method.-

- 1.-ALLEN, O.N.-1957 - Experimente in Soil Bacteriology. 3rd ed. Minneapolis, Minnesota, Burgess Publishing, Co.-
- 2.-BONNET, C.-1969 - Evaluación de Especies y Variedades de Leguminosas-La Estanzuela, Miscelánea Nº 7:7-12.-
- 3.-BOSSI, J.-1966 - Geología del Uruguay. Montevideo, Universidad de la República. Departamento de Publicaciones.-
- 4.-BROCKWELL, J.A.-1956 - The use of the red leaf strains of subterranean clover for rapid evaluation of strain effectiveness in RHIZOBIUM TRIFOLII. J.Austral.Inst.Agric.Sc. 22:260-265.-
- 5.-BROCKWELL, J.A.-1958 - The use of an anthocyanin-rich variety of barrel medic, MEDICAGO TRIBULOIDES Desr., for prompt assessment of strain effectiveness in RHIZOBIUM MEMILOTTI. J. Austral. Inst. Agric.Sci. 24:342-346.-
- 6.-CHEN, H.K. and THORNTON, J.G.-1940.-The structure of effective nodules and its influence on nitrogen fixation. Proc.Roy.Soc. 129:208.
- 7.-C.I.D.E.-1963 - Estudio Económico y Social de la Agricultura en el Uruguay. Sector Agropecuario.-
- 8.-DARBYSHIRE, J.F.-1966 - Studies on the physiology of nodule formation. IX. The influence of Combined Nitrogen, Glucose, Light Intensity and Day Length on root-hair infection in Clover.- Annals of Botany 30 (120):625-638.-
- 9.-DOBEREINER, J.-ARRUDA, N.B. y LENIBADO, A.F.-1966.-Avaliacao da Fixacao do Nitrogenio, em Leguminosas, pela regressao do Nitrogenio Total das plantas sobre o peso dos Nodulos. Pesq. Agropec. bras. 1:233-237.-
- 10.-FRED, E.B., BALDWIN, I.L. and MCCOY, E.-1932.-Root nodule bacteria and leguminous plants. Madison, University of Wisconsin.-
- 11.-GIBSON, A.H.-1965 - Physical environment and symbiotic nitrogen fixation. II. Root temperature effects on the relative nitrogen assimilation rate. Aust. J. biol. Sci. 18:295-310.-
- 12.-GIBSON, A.H.-1967 - Carbon dioxide limitations of plant growth in tube culture, with special reference to legume-nodulation studies. Aust. J. Biol. Sci. 20:837-842.-
- 13.-GIBSON, A.H.-1968.-Nodulation failure in Trifolium subterraneum L. cv. Woogenellup (syn. Marrar.). Aust. J. Agric. Res. 19(6):907-918.
- 14.-GIBSON, A.H. and BROCKWELL, J.-1968 - Symbiotic characteristics of subspecies of Trifolium subterraneum L. Aust. K. Agric. Res. 19 (6):891-905.-
- 15.-GRAHAM, P.H. and PARKER, C.A.-1961 - Leghaemoglobin and symbiotic nitrogen fixation. Aust. J. Sci. 23:231-232.-
- 16.-GUPTA, K.G. and SEN, A.-1963 - Utilization of combined nitrogen by RHIZOBIUM SPP. from some common cultivated legumes in relation to their efficiencies. Indian J. Agric. Sci. 33:240-243.-
- 17.-GUPTA, K.G. and SEN, A.-1965 - The relationship between glucose consumption by RHIZOBIUM Spp. from some common cultivated legumes and their efficiencies. Plant. Soil 22:229-238.-
- 18.-HARDY, R.W.F., HOLSTEN, R.D., KACKSON, E.K. and BURNS, R.C.- 1968 - The acetylene-ethylene assay for N₂: Laboratory and field evaluation. Plant. Physiol. 43(8):1185-1207.-
- 19.-HAYDOCK, K.P. and NORRIS, D.O.-1967 - Opposed curves for nitrogen percent on dry weight given by RHIZOBIUM dependent and nitrate dependent legumes. Aust. H. Sci. 29:426-427.-

- 20.-INDARTE, E.-1969 - Contribución al estudio, en TRIFOLIUM SUBTERRANEUM y TRIFOLIUM POLYMORPHUM, de la relación RHIZOBIUM-RHIZOBIUM y RHIZOBIUM-Planta. Tesis de grado, Universidad de la República - Facultad de Agronomía.-
- 21.-JENSEN, H.L.-1942 - Nitrogen fixation in leguminous plants. Proc. Linn. Soc. N.S.W., 67:98-108.-
- 22.-JORDAN, D.C.-and SAN CLEMENTE, C.L.-1955 - The utilization of peptides and L and D-acids by effective and ineffective strains of RHIZOBIUM MEBILOTI. Can. J. Microbiol. 3:879-884.-
- 23.-KATZNELSON, H. and KAGALLO, A.C.-1957 - Metabolism of rhizobia in relation to effectiveness. Can. J. Microbiol. 3:879-884.-
- 24.-KLECZKOWSKA, J.-1950 - A study of phage resistant mutants of RHIZOBIUM TRIFOLII. J. Gen. Microbiol. 4: 298-310.-
- 25.-LABANDERA, C. MARKGRAF, S., QUADRELLI, A., SCHRODER, E.-1968 - Sobrevivencia de RHIZOBIUM TRIFOLII en suelos superficiales de basalto. Actas de la IV Reunión Latinoamericana sobre Inoculantes para Leguminosas. Porto Alegre, Brasil.-
- 26.-LABELLA, S.J., MARRERO, M., MASSIMINO, L y RISSO, D.F.,-1968 - Proyecto Basalto. Informe del Segundo Año - Universidad de la República, Facultad de Agronomía - MIMEOGRAFIADO.-
- 27.-LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA DE SUELOS Y CONTROL DE INOCULANTES, M.G.A. Nómina de Técnicos, Cepas e Inoculantes de América Latina, 1970 - Mimeografiado.-
- 28.-MURGUIA, J.-1965 - Nodulación en suelos basálticos del Uruguay. Actas de la II Reunión Latinoamericana sobre Inoculantes para Leguminosas. IDIA, Suplemento Nº 15:76-79.-
- 29.-NUTMAN, P.S.-1953 - Studies on the physiology of nodule formation. IV The mutual inhibitory effects on nodule production of plants grown in association. Ann. Bot. (N.S.) 17:95-126.-
- 30.-NUTMAN, P.S.-1956 - The influence of the legume in root-nodule symbiosis. A comparative study of the host determinants and functions. Biol. Rev. 31:109-51.-
- 31.-NUTMAN, P.S.-1958 - The physiology of nodule formation. In Nutrition of the Legumes, Proc. 5th Easter School Agric. Sci., Univ. of Nottingham, pp. 87-106.- Butterworths Scientific Publications, London.-
- 32.-NUTMAN, P.S.-1959 - Some observations on root-hair infection by nodule bacteria. J. exp. Bot. 10:250-63.-
- 33.-NUTMAN, P.S.-1962 - The relation between root-hair infection by RHIZOBIUM and nodulation in TRIFOLIUM and VICIA. Proc. roy. Soc. B. 156:122-37.-
- 34.-QUADRELLI, Ana M.-1968 - Implantación de Leguminosas en suelos superficiales (resiembra-2º año). Actas de la IV Reunión Latinoamericana sobre Inoculantes para Leguminosas. Porto Alegre, Brasil. 318-329.-
- 35.-SACCONE, R. y TERMEZANA, A.-1970 - Búsqueda de especies y variedades. Informe Proyecto Basalto 1967-1970 - Facultad de Agronomía-Mimeografiado. 21-27.-
- 36.-SCHIEL, E. DIEGUEZ, R.N., SERVY, E.M. PACHECO BASURCO, J.C., OLIVERO, E.L.G. de y ENOKIDA, E.-1964 - Equivalencia entre valores tradicionalmente empleados para seleccionar rizobios y otras determinaciones. R.I.A. Serie 2: Biología y Producción Ve-

- 37.-SCHWINGHAMER, E.A.-1964 - Association between antibiotic resistance and ineffectiveness in mutant strains of RHIZOBIUM SPP. Can.J.Microbiol.10:221-223.-
- 38.-SCHWINGHAMER, E.A.-1968 - Loss of effectiveness and infectivity in mutants of RHIZOBIUM resistant to metabolic inhibitors. Can.J.Microbiol.14:355-367.-
- 39.-VIRTANEN, A.I., ERKAMA, J.M.
y LINKOLA, H.-1947 - Relation between N fixation and leghemoglobin content of leguminous root nodules. Acta Chem. Scand., 1:861-70.-
- 40.-WROBEL, T. and ZIEMIECKA, J.C.-1964 - The Microrespirometric method as a means for studying the effectiveness of RHIZOBIUM strains. 8th International Congress of Soil Science, Bucharest, Rumania - Transaction XX III:1047-51.-

Edna Shaw
Lillian Tiden
Carl B. H.

Robert H. Jones

BIBLIOTECA FACULTAD DE AGRONOMIA