UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

RESPUESTA A LA INOCULACION DE *LOTUS ULIGINOSUS* EN SITIOS CON Y SIN ANTECEDENTES DE *LOTUS CORNICULATUS*

por

Gabriela BIASSINI
Valeria DE MAIO

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

MONTEVIDEO
URUGUAY
2005

Tesis aprobada por:

Director: _____
Nombre completo y firma

_____
Nombre completo y firma

_____
Nombre completo y firma

Fecha: _____

Autor: _____
Nombre completo y firma

_____
Nombre completo y firma

AGRADECIMIENTOS

Nuestro reconocimiento al Ing. Agr. Martín Jaurena, por su invalorable orientación y apoyo en las tareas efectuadas.

Al director de Tesis Ing. Agr. Carlos Labandera, por su asesoramiento y autorización para el desarrollo de éste trabajo.

A los Ing. Agr. Walter Ayala y Juan Carlos Millot, miembros del tribunal de Tesis, por su colaboración en la presentación del trabajo final.

A I.N.I.A Treinta y Tres por permitirnos realizar el ensayo a campo dentro de su Estación Experimental Palo a Pique.

A la Lic. María Mayans, por su apoyo y estímulo.

Al Ing. Agr. Oscar Bentancour, por su paciencia y dedicación.

A todos nuestros amigos y familiares por ser nuestro sustento no sólo de este trabajo en particular sino de toda nuestra carrera.

A Maca, amiga incondicional
que siempre permanecerá
en nuestro corazón

TABLA DE CONTENIDO

Página

PAGINA DE APROBACIÓN..... II
AGRADECIMIENTOS..... III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES..... IV

1. INTRODUCCIÓN..... 1

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA..... 4

2. 1 IMPORTANCIA DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO *LOTUS*..... 4

2. 2 TAXONOMIA DE LOS RIZOBIOS..... 6
2. 2. 1 Caracterización de cepas de *Rhizobium*..... 8

2. 3 SIMBIOSIS RIZOBIO-LEGUMINOSA..... 9

2. 4 COMPETENCIA ENTRE CEPAS DE RIZOBIOS PARA LA FORMACIÓN DE NODULOS..... 13
2. 4. 1 Factores que intervienen en la competencia..... 14
2. 4. 1. 1 Factores ambientales..... 14
2. 4. 1. 2 Factores inherentes al rizobio..... 16
2. 4. 1. 3 Factores inherentes de la planta..... 18
2. 4. 1. 4 Factores inherentes a la simbiosis..... 19
2. 4. 1. 5 Otros factores..... 19
2. 4. 2 Evaluación de la habilidad competitiva..... 20

2. 5 INOCULACION DE LEGUMINOSAS..... 21

3. MATERIALES Y MÉTODOS.....23

3. 1 RESPUESTA A LA INOCULACIÓN EN CAMPO..... 23
3. 1. 1 Sitio experimental..... 23
3. 1. 2 Inoculantes e inoculación..... 24
3. 1. 3 Siembra y fertilización..... 27
3. 1. 4 Diseño experimental y tratamientos..... 27
3. 1. 5 Variables evaluadas..... 27

3. 1. 6 Análisis estadístico 29

3. 2 EVALUACIÓN DE CEPAS EN INVERNÁCULO 31
3. 2. 1 Instalación del ensayo 31
3. 2. 2 Cepas utilizadas 32
3. 2. 3 Caracterización de cepas y aislamientos 32
3. 2. 4 Inoculación 33
3. 2. 5 Siembra y Fertilización 34
3. 2. 6 Diseño experimental y tratamientos 34
3. 2. 7 Variables evaluadas 35
3. 2. 8 Análisis estadístico 35

3. 3 EVALUACIÓN DE CEPAS EN CÁMARAS DE CRECIMIENTO DE PLANTAS 36
3. 3. 1 Eficiencia de cepas en *L. corniculatus* 36
3. 3. 2 Competencia de cepas para la formación de nódulos 37

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 39

4. 1 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA A LA INOCULACIÓN EN CAMPO . 39
4. 1. 1 Recuento de rizobios en el suelo, semilla e inoculante 39
4. 1. 2 Evaluaciones en etapa de implantación 42
4. 1. 2. 1 Evaluación del estado de las plántulas 42
4. 1. 2. 2 Evaluación temprana de la nodulación 44
4. 1. 3 Evaluación de forraje 46
4. 1. 3. 1 Primer corte 46
4. 1. 3. 2 Segundo corte 49
4. 1. 3. 3 Tercer corte 50
4. 1. 3. 4 Cortes acumulados 52
4. 1. 3. 5 Evolución de la producción del *L. uliginosus* en los sucesivos cortes 54

4. 2 EVALUACIÓN DE CEPAS EN INVERNÁCULO 56
4. 2. 1 Caracterización de cepas y aislamientos 56
4. 2. 2 Respuesta a la inoculación de *L. uliginosus* en cilindros de suelo sin historia de *L. corniculatus* 58
4. 2. 3 Respuesta a la inoculación de *L. uliginosus* en cilindros de suelo con historia de *L. corniculatus* 63

4. 3 EVALUACIÓN DE CEPAS EN CAMARA DE CRECIMIENTO DE PLANTAS 64
4. 3. 1 Eficiencia de cepas en *L. corniculatus* 64

4. 3. 2 Competencia de cepas para la formación de nódulos 66

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS 72

6. RESUMEN 74

7. BIBLIOGRAFIA 76

8. ANEXOS 91

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Figura Nº

1 Disposición de tratamientos en parcelas en campo 23
2 Plántulas de *Lotus corniculatus* y *L.. uliginosus* inoculadas con alícuotas de las diluciones sucesivas de las muestras de los suelos 24
3 Esterilización de semillas (Vincent, 1970) 25
4 Recuento de viables en placas de petri 26
5 Escala de nodulación utilizada en la etapa de implantación del *L. uliginosus* 28
6 Disposición de tratamientos en invernáculo 31
7 Colonias de *Rhizobium* (coloración amarilla) y *Bradyrhizobium* (coloración azul) en medio agar glucosa peptona con púrpura de bromocresol pH= 6.8 33
8 Preparación de inoculantes 34
9 Sobrevivencia de rizobios en semillas inoculadas de *L. uliginosus* con las cepas en estudio 42
10 Indice de nodulación ponderado medio según antecedente y método de siembra 46
11 Contribución relativa de *L. uliginosus* en función de la inoculación en sitios experimentales con y sin historia previa de *L. corniculatus* 48
12 Respuesta a la inoculación de *Lotus uliginosus* (tomada en noviembre, 2005) 50
13 Respuesta a la inoculación en la contribución de *L. uliginosus* para ambos sitios 54
14 Evolución de la tasa de crecimiento de *L. uliginosus* en el sitio con antecedente de *L. corniculatus* 55
15 Evolución de la tasa de crecimiento de *L. uliginosus* en el sitio sin antecedente de *L. corniculatus* 56
16 Respuesta a la inoculación de *L. uliginosus* (tomada en setiembre, 2005) 60
17 Producción de forraje y contribución de *L. uliginosus* en función de tratamientos de inoculación, relativo al control sin inocular 61
18 Nódulos efectivos e inefectivos en raíces de *L. corniculatus* a los 56 días de instalado el ensayo 66

Cuadro Nº

1 Origen de las cepas 25
2 Escala de nodulación (adaptada de Master Class In Rhizobium Technology, 2000) 28
3 Origen de las cepas de rizobios utilizadas 32
4 Concentraciones y relaciones cuantitativas esperadas entre la cepa parásita U510 (*L. corniculatus*) y las cepas efectivas 37
5 Número más probable de rizobios por gramo de suelo según especie y antecedente 39
6 Concentración de rizobios viables x 10^2/semilla inoculada de *L. uliginosus* con las cepas en estudio en función del tiempo 41
7 Número de plántulas de *L. uliginosus* totales y porcentaje de plántulas verdes en función del antecedente y tratamientos de inoculación 43
8 Implantación y eficiencia simbiótica de *L. uliginosus* según antecedente de *L. corniculatus* y método de siembra 44
9 Indice de nodulación ponderado medio según antecedente y cepa utilizada 45
10 Producción de forraje expresado en kg MS/há y contribución de *L. uliginosus* según antecedente 47
11 Producción de forraje total y partición del mismo de acuerdo a tratamientos y antecedentes 47
12 Producción de forraje total y partición del mismo de acuerdo a tratamientos de inoculación y método de siembra 49
13 Producción de forraje en kg MS/há y contribución de *L.uliginosus* según antecedente de *L. corniculatus* 51
14 Producción de forraje total y partición del mismo de acuerdo a tratamientos y antecedentes de *L. corniculatus* 52
15 Producción de forraje total y partición del mismo de acuerdo a tratamientos y antecedentes de *L. corniculatus*. 53
16 Caracterización de cepas y aislamientos de rizobios utilizados y recuento de viables en placas de las suspensiones empleadas en la formulación de los inoculantes 57
17 Producción de forraje y contribución de *L. uliginosus* en función de tratamientos de inoculación 59

18 Producción de forraje de otras especies en función de tratamientos de inoculación 62
19 Producción de forraje de *L. uliginosus* bajo distintos tratamientos de inoculación 63
20 Biomasa de parte aérea de *L .corniculatus* e índice de eficiencia relativo de acuerdo al tratamiento de inoculación (cepas de *L. uliginosus*)..... 65
21 Concentraciones y relaciones cuantitativas observadas entre la cepa parásita U510 (*L. corniculatus*) y las cepas efectivas 67
22 Eficiencia simbiótica de las cepas comerciales puras y en competencia con la cepa inefectiva 68
23 Eficiencia simbiótica de las cepas comerciales puras y en competencia con la cepa inefectiva 69

1. INTRODUCCIÓN

Lotus uliginosus cv Maku (ex pedunculatus) fue el material pionero de la especie a nivel comercial, liberado en Nueva Zelanda en 1975. En la década del 80 INIA comenzó la evaluación de este material en Uruguay en mejoramientos en cobertura de campo natural, en la región del Cristalino del centro del país; extendiendo el análisis en la década del 90 a las zonas de sierras y lomadas de la región Este (Carámbula et al., 1994; Ayala et al., 2003). Los ensayos realizados mostraron el buen comportamiento de este cultivar, debido fundamentalmente a su aporte invernal, y a su adaptación a suelos ácidos, excesiva humedad y/o bajo nivel de fósforo.

Actualmente, se puede afirmar que *L. uliginosus* cv Maku se ha expandido a nivel nacional, fundamentalmente en la región Este. Al mismo tiempo se han detectado problemas en la implantación de mejoramientos y semilleros provocados por fallas en el establecimiento de la simbiosis rizobio- leguminosa. Una de las razones para esta situación podría derivarse de la marcada especificidad simbiótica entre cepas de rizobios y especies del género *Lotus*. *Lotus corniculatus* y *Lotus tenuis* forman un grupo simbiótico efectivo con cepas del género *Mesorhizobium*, mientras que *Lotus uliginosus* y *Lotus subbiflorus* lo hacen con cepas del género *Bradyrhizobium*. Las cepas de cada grupo son parásitas o inefectivas en los huéspedes del otro.

Existen poblaciones nativas y/o naturalizadas de rizobios en el suelo, que de acuerdo a su grupo simbiótico, podrían afectar el establecimiento de la simbiosis y la implantación de la leguminosa. Esta situación se ha observado en siembras de *L. uliginosus y L. subbiflorus,* en muchos suelos del país con historia de *L. corniculatus* inoculado con la cepa U510 (ex U226).

Adicionalmente, las poblaciones nativas efectivas para *L. uliginosus* y *L. subbiflorus* se encuentran en muy bajas concentraciones.

Sumado al problema de compatibilidad / incompatibilidad cepa-huésped, aparecen otros aspectos vinculados al manejo de los inoculantes y de la inoculación, en particular demoras entre inoculación y siembra, contacto con pesticidas o fertilizantes e inoculantes mal almacenados entre otros, que se traducen en bajo número de rizobios sobre la semilla generándose una relación desfavorable frente a la presencia en el suelo de poblaciones nativas o naturalizadas inefectivas.

Adicionalmente, las condiciones ambientales postsiembra sin duda jugarán un rol fundamental en el éxito relativo del establecimiento de la simbiosis y de la leguminosa.

De lo anterior se desprende que existiría una alta respuesta a la inoculación de la especie con inoculantes elaborados con cepas específicas seleccionadas.

El objetivo general de este trabajo es profundizar el conocimiento de las interacciones entre las cepas utilizadas en los inoculantes comerciales y las poblaciones nativas y/o naturalizadas de rizobios y realizar una selección primaria de cepas para *Lotus uliginosus* cv. Maku.

Se plantea lograr el objetivo general a través de los siguientes objetivos específicos:

1- Evaluar el efecto de diferentes alternativas de inoculación y métodos de siembra en *Lotus uliginosus* cv Maku, en el establecimiento y nodulación de la especie en potreros con y sin antecedentes de *Lotus corniculatus.*

2- Evaluar el comportamiento en invernáculo de diferentes cepas y aislamientos de rizobios en *Lotus uliginosus* cv Maku, en cilindros de suelo con y sin antecedentes de *Lotus corniculatus.*

3- Estudiar la habilidad competitiva de cepas efectivas de rizobios en *Lotus uliginosus*, en presencia de la cepa parásita U510.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2. 1 IMPORTANCIA DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO *LOTUS*

A nivel nacional, los sistemas de producción ganaderos se basan en las siguientes alternativas forrajeras: pasturas naturales, praderas cultivadas mezcla de gramíneas-leguminosas y pasturas mejoradas. El potencial de producción del campo natural, está limitado principalmente por la baja disponibilidad de nutrientes, especialmente N y P (Del Pino y Hernández, 2002). Es así que el mejoramiento de campo natural, se basa en la fertilización fosfatada y siembra de leguminosas inoculadas, teniendo como ventaja, una elevada productividad y menores modificaciones al ecosistema que la sustitución total de la vegetación nativa por una pastura cultivada. No obstante, los verdeos y pasturas cultivadas son una herramienta productiva fundamental en zonas agrícola - ganaderas y lecheras, así como en situaciones específicas de intensificación creciente de predios ganaderos.

Las especies de leguminosas más utilizadas en los mejoramientos forrajeros son: *Trifolium repens, Trifolium pratense*, *Lotus corniculatus* y *Lotus subbiflorus*. Recientemente se ha incorporado *Lotus uliginosus*, mientras que *Lotus tenuis*, no ha sido hasta el momento muy difundido en el país.

L. corniculatus, es una leguminosa perenne estival introducida en Uruguay hace varias décadas, muy adaptada a suelos de baja y media fertilidad, resistente a la sequía, de alto valor nutritivo, buena persistencia, lo cual lo hace especialmente recomendable para mezclas forrajeras siendo la especie de *Lotus* más sembrada a nivel nacional. El cultivar San Gabriel es el más

ampliamente utilizado, mostrando buenos rendimientos invernales y tempranos en primavera (Carámbula, 1977).

L. tenuis, originaria de la región del Mediterráneo, se introdujo en un establecimiento del Dpto de Rocha hace más de 50 años por un productor francés desde la Cuenca del Salado, colonizando y naturalizándose en varias zonas del país (Millot, com. pers). Es una leguminosa perenne, de ciclo primavero-estivo-otoñal, adaptada a suelos mal drenados y salinos, con pH que varían entre 4.8 y 8. El cultivar Larrañaga, evaluado en INIA La Estanzuela, superó en 11% la producción de *L. corniculatus.* La capacidad de colonización y persistencia permite calificar a la especie como promisoria para ser utilizada en mejoramientos extensivos de campo natural (Carámbula, 2002).

L. subbiflorus cv el Rincón, es una variedad protegida, seleccionada en la Estancia "El Rincón" del departamento de Florida a partir de su introducción como impureza de leguminosas importadas hace más de 25 años. Es una leguminosa fundamentalmente anual de ciclo invernal que se adapta a un amplio rango de suelos, incluidos los superficiales de media a baja fertilidad, pH bajo y mal drenaje. Tiene gran persistencia por resiembra natural y capacidad para implantarse en cobertura, lo que facilita la operación, minimiza costos y permite mejoramientos forrajeros con mínima alteración del tapiz natural.

L. uliginosus cv Maku se liberó en Nueva Zelanda en 1975 y se introdujo en nuestro país hace varios años. Es un material tetraploide inducido y desarrollado sobre materiales diploides originarios de Nueva Zelanda y Portugal. Es una leguminosa perenne estival con muy buena adaptación a las condiciones ecológicas del país integrándose a la vegetación nativa en forma exitosa, lo que permite su uso en mejoramientos extensivos. Se recomienda

principalmente para suelos con elevada acidez, excesiva humedad y/o bajos niveles de fósforo (Carámbula et al., 1994).

2. 2 TAXONOMIA DE LOS RIZOBIOS

Los rizobios se caracterizan por su habilidad para infectar las raíces de las leguminosas e inducir la formación de nódulos. Se dividen en cinco familias: Rhizobiaceae, Phyllobacteriaceae, Hyphomicrobiaceae, Bradyrhizobiaceae y Methylobacteriaceae. A los efectos del presente trabajo, los géneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium* y *Bradyrhizobium* se incluyen dentro de las familias Rhizobiaceae, Phyllobacteriaceae y Bradyrhizobiaceae respectivamente (Bergey´s Manual, 2005).

Ya en 1997, Jarvis et al., propusieron la reclasificación de *R*. loti (anteriormente incluido en el género *Rhizobium* según Jordan, 1982) en *Mesorhizobium* loti, basándose principalmente en las características de crecimiento "intermedio" de éste grupo de bacterias en medios de cultivo, en relación al agrupamiento general de las cepas de rizobios en crecimiento rápido y lento. Adicionalmente, se empleó como criterio el hecho de que en *M*. loti los genes de nodulación (genes *nod*) y fijación de nitrógeno (genes *nif* y *fix*), generalmente son cromosomales, y no están determinados en los plásmidos simbióticos (*pSym*) como en la mayoría de los rizobios de crecimiento rápido (Rosemberg et al., 1981; Pankhurst et al., 1983; Chúa et al., 1985; Monza et al., 1992; Young, 1996).

Lodeiro et al., (2003), diferencian a los géneros basándose en sus tasas de crecimiento, fuentes de carbono utilizadas, variaciones del pH en medios de cultivos, ubicaciones de genes *nod* y % de C (cistina) + G (guanina) del ADN.

Adicionalmente, Wang y Martinez (2004) proponen a la morfología de las colonias como otro criterio de clasificación.

En base a la integración de estos criterios, el género *Bradyrhizobium*, comprende bacterias en forma de bacilos, de crecimiento lento y productoras de álcali en medio agar levadura manitol (ALM). Las colonias son circulares, rara vez traslúcidas, blancas y convexas, con diámetros menores a 1 mm después de 7 días de incubación. Utilizan como sustrato hexosas, glicerol, manitol, malato y succinato. No utilizan sacarosa ni citrato. La secuencia de ADN tiene entre un 61-65% de C + G, la ubicación de los genes nod es cromosomal.

El género *Rhizobium* comprende bacterias en forma de bacilos de crecimiento rápido y productoras de ácido en medio ALM. Las colonias generalmente son blancas o beige, circulares, cóncavas, semitranslúcidas u opacas y mucilaginosas; miden 2-4 mm de diámetro a los 3-5 días de incubación en ALM. Son químio-organotróficas, utilizan una gran variedad de carbohidratos y ácidos orgánicos como fuente de carbono y energía. Los genes *nod* se ubican en plásmidos simbióticos y el porcentaje de C + G en su ADN es de 59-63 %.

El género *Mesorhizobium* se integra con bacterias en forma de bacilos, de crecimiento lento a moderado y productoras de ácido en medio ALM. Las colonias en ALM son circulares convexas, semitraslúcidas y muscilaginosas con diámetros de 1 a 2 mm después de 5 a 7 días de incubación. Son bacterias quimio-organotróficas que usan como fuente de carbono y de energía hexosas, ácidos orgánicos, excepto piruvato, malato y fumarato. No utilizan ramnosa ni rafinosa. La secuencia de ADN tiene 59-64% de C + G y la ubicación de los genes *nod* es cromosomal. Correa et al., (2001) demostraron que este género posee capacidad para crecer a pH=4.

Las bacterias capaces de nodular especies del género *Lotus* incluyen cepas de crecimiento intermedio (*Mesorhizobium* loti) y de crecimiento lento (*Bradyrhizobium* sp.) (Jordan, 1982, 1994; Jarvis et al., 1997).

Existe una marcada especificidad entre las especies del género *Lotus* y sus simbiontes (Burton, 1985; Castro et al., 1996; Wacek, 1994). *Lotus corniculatus* y *L. tenuis* forman asociaciones efectivas preferentemente con cepas de crecimiento "rápido", mientras que *Lotus subbiflorus* y *L. uliginosus* lo hacen con cepas de crecimiento lento. No obstante existen cepas (U261= NZP2037) de crecimiento "rápido" que nodulan efectivamente a las cuatro especies de *Lotus*. Sin embargo esta simbiosis no logra alcanzar los rendimientos que se obtienen con las cepas específicas (Perez y Labandera, 1998).

2. 2. 1 Caracterización de cepas de *Rhizobium*

Existen muchos métodos para caracterizar cepas de rizobios que incluyen técnicas microbiológicas, bioquímicas, serológicas, de resistencia intrínseca a antibióticos, perfil de lipopolisacáridos y técnicas moleculares. Dentro de éstas últimas la electroforesis de proteínas, es útil para caracterizar genéticamente los individuos de una población, basándose en las frecuencias genotípicas y génicas. Por tal motivo, dicha técnica se utiliza ampliamente para la identificación de la estructura y diversidad genética de poblaciones naturales de organismos.

Las proteínas más usadas en éste tipo de estudio son las isoenzimas. El término se aplica a las múltiples formas moleculares de la misma enzima, que se encuentran en una especie como resultado de la presencia de más de un gen que codifica para la misma. Desempeñan una misma actividad catalítica

pero pueden tener propiedades cinéticas diferentes, y el número de isoenzimas para una determinada enzima está relacionado con el número de compartimientos subcelulares donde se realiza la misma reacción catalítica (Selander et al., 1986). Difieren entre sí en la secuencia de aminoácidos que poseen, lo que determinará diferente carga neta y por ende diferente movilidad electroforética. Las diferencias en la movilidad de las isoenzimas sometidas a un campo eléctrico resultan de diferencias a nivel de la secuencia de DNA que las codifica (Ferreira y Grattapaglia, 1996).

Consecuentemente la técnica se basa en la determinación de la capacidad de las proteínas de migrar a través de un campo eléctrico de manera diferencial utilizando como soporte papel acetato o gel de almidón, poliacrilamida o agarosa.

2. 3 SIMBIOSIS RIZOBIO-LEGUMINOSA

El establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa es un proceso complejo, donde la formación de nódulos (infectividad) y la captación del N_2 (efectividad) se dan en etapas sucesivas.

El proceso de infección de los rizobios está precedido de la colonización de la rizósfera y de la adherencia a la raíz. Esta unión es el evento más temprano de contacto físico planta / bacteria y depende de factores propios de la bacteria (polisacáridos, proteínas superficiales, fimbrias y microfibrillas de celulosa), de la planta (proteínas y moléculas pequeñas liberadas en los exudados radiculares) y del ambiente (cationes divalentes, pH, temperatura, humedad, presencia de otros microorganismos competidores).

Lodeiro et al., (2003) establecieron que los exudados de la planta activan la expresión de la mayoría de los genes de nodulación. Estos genes tienen como función la biosíntesis y secreción del factor Nod, encargado de iniciar el proceso de desarrollo y diferenciación del nódulo. Paralelamente, se produce la infección de la raíz por parte de los rizobios, ocurriendo una deformación o enrulamiento de los pelos radiculares. Los rizobios quedan atrapados en la curvatura interior del pelo radicular y posteriormente penetran al mismo formando el *hilo de infección*, el cuál da origen a un canal a través del cual migran los rizobios hacia la zona de formación del nódulo. Por último, se produce la invasión de los nódulos y la diferenciación de los rizobios en bacteroides capaces de fijar nitrógeno. La reacción que llevan a cabo los bacteroides en los nódulos, consiste en la reducción de N_2 a amonio (NH_4), con la participación de la enzima nitrogenasa. Esta reacción requiere ATP y leghemoglobina, proteína globular cuya función es atrapar y transferir el oxígeno, estimulando la oxidación de la reserva del carbono. La leghemoglobina es codificada por un gen de la leguminosa (Ott. et al., 2005), se localiza en el nódulo fuera de la bacteria y es distinta para cada tipo de rizobio (Sanchéz Yánez, 1997).

La reacción mediante la cual se reduce el N_2, se resume de la siguiente manera (Gregerson et al., 1999):

$$N_2 + 10H^+ + 8e^- + 16\ ATP \longrightarrow 2NH_4 + H_2 + 16\ ADP + P_i$$

El nitrógeno reducido, es asimilado en compuestos orgánicos por la enzima Glutamino sintetasa de los nódulos de las plantas (GS) y Glutamato sintasa (GOGAT), (Gonnet et al., 1998). La GS es crucial en el proceso asimilatorio como catalizadora en la conversión de N inorgánico (amonio) a su forma orgánica (glutamina). El nitrógeno amino desde glutamina es luego

transformado a 2-oxoglutamato para producir dos moléculas de glutamato las cuales pueden servir como sustrato de la GS y así completar el ciclo GS/GOGAT (Lea et al., 1990). La mayoría del N fijado es rápidamente transferido a asparagina que, junto con glutamina, son transportadas por el xilema desde los nódulos en *Lotus* spp. Esto ha sido demostrado por Egli et al (1989) y Reynolds et al (1982), quienes observaron que la actividad de la nitrogenasa, GS y GOGAT, aumentan durante el desarrollo del nódulo.

Paralelamente al proceso de fijación, las hojas reducen el $C0_2$ en azúcares durante la fotosíntesis y lo transportan a la raíz donde los bacteroides del rizobio lo usan como fuente de energía para proveer ATP al proceso de inmovilización de N_2 (Sanchez Yañez, 1997).

Una simbiosis efectiva para la fijación de N, requiere una apropiada interacción entre la planta y la bacteria. Pankhurst et al (1985); Woomer et al (1997), establecen que la efectividad de la simbiosis leguminosa – rizobio es el resultado de interacciones complejas entre los genomas de la planta y de la bacteria. Pankhurst (1981), establece que las características físico- químicas del medio (Ca, pH, fosfato, sulfuros, K, Mo y Co) también influyen en la habilidad de las cepas de rizobios para formar nódulos efectivos en la leguminosa huésped.

De acuerdo con Pankhurst y Jones (1979), los nódulos radiculares formados en las leguminosas varían en efectividad. Adicionalmente Jordan (1974) citado por Pankhurst et al (1985) estableció que ciertas cepas de rizobios forman nódulos efectivos en especies de leguminosas estrechamente relacionadas pero inefectivos en otras. Por lo tanto la producción de nódulos inefectivos no sería debida a la incapacidad del rizobio de fijar N, sino a una incompatibilidad entre los rizobios y su planta huésped. En relación a lo anterior Brockwell et al

(1994), mostraron una marcada especificidad huésped-cepa en nodulación y fijación de N. Una hipótesis que intenta explicar lo anterior se basa en que la producción de lectinas por la planta juega un rol importante en el reconocimiento rizobio –leguminosa (Hirsch, 1999; Hirsch et al., 1998). A su vez Pankurst y Layzell (1984), sugieren que las especies de *Lotus pedunculatus* y *L. corniculat*us difieren en su contenido de flavonoides en las raíces, existiendo una respuesta diferente de las cepas de rizobios a estos compuestos. Estudios realizados por Pankhurst y Jones (1979) describieron el caso de una cepa (NZP2037= U261) que desarrolla nódulos efectivos sobre *L. pedunculatus* pero inefectivos sobre *L. corniculatus*. Contrariamente Perez y Labandera (1998), trabajando con la misma cepa observaron nódulos efectivos en las cuatro especies de *Lotus*.

Norris (1965) mostró que cepas aisladas de *L. uliginosus* no eran capaces de infectar a *L. glaber* ni *L. corniculatus.* A su vez Barrientos et al (2002) mostraron que algunas de las cepas de *Bradyrhizobium* sp. infectan a *L. glaber* pero forman nódulos inefectivos (muchos nódulos pequeños y blanquecinos). Gault et al (1994) señalaron que *Bradyrhizobium* sp. (Lotus) es específico sobre *L. uliginosus*. Pankhurst et al (1985) estudiando la efectividad de nódulos inducidos por *R. loti* y *Bradyrhizobium sp*. en *L. pedunculatus*, observaron que los nódulos producidos por la cepa NZP2037= U261 eran más grandes y con corteza más fina, en relación a la cepa CC814s = U529 la cuál mostró nódulos más chicos pero con una mayor zona de infección lo que determinó mayor reducción de acetileno.

En Escocia (Lowe y Holding, 1970) y en Irlanda (Sherwood y Masterson, 1974), encontraron que aislamientos de *R. trifolii* de poblaciones nativas de *Trifolium repens* eran más eficientes con ecotipos naturalizados que en cultivares comerciales. A su vez Moënne-Loccoz et al (1994) encontraron que la

ocupación nodular de cepas introducidas con la inoculación declina con los años, siendo desplazadas por cepas nativas o naturalizadas más competitivas De lo anterior se desprende que los programas de selección de cepas de rizobios para su uso en inoculantes deben considerar tanto criterios de efectividad como de competencia saprofítica (Freire et al., 1983).

Los parámetros normalmente utilizados para evaluar eficiencia se relacionan con nodulación (número y peso seco de nódulos), producción de materia seca de parte aérea y raíz, producción de grano y N total. Adicionalmente pueden utilizarse otros métodos como la reducción de acetileno para medir actividad nitrogenasa o el uso de técnicas isotópicas (N^{15}) para evaluar fijación de nitrógeno en campo. Este último parámetro resulta muy efectivo para medir pequeñas diferencias en fijación de N ya que la variabilidad experimental es muy pequeña (C. V= 1- 3 %) (Labandera, 1988).

2. 4 COMPETENCIA ENTRE CEPAS DE RIZOBIOS PARA LA FORMACIÓN DE NODULOS

Se define como la habilidad de una cepa de rizobio para formar nódulos en un huésped particular, en presencia de otra u otras cepas del mismo grupo de inoculación (Dowling y Broughton, 1986).

De acuerdo con Jones et al (1978), si una cepa de rizobio produce un alto porcentaje de nódulos en presencia de otras, se califica como competitiva.

Temprano et al (1991) consideran que la competencia, se da en dos etapas, en la primera, las cepas compiten para colonizar el suelo y la rizósfera y en la segunda, las cepas presentes en la rizósfera compiten en el proceso de

infección de la raíz y formación de nódulos. Este autor señala la importancia de los factores del medio ambiente edáfico en la primera etapa, mientras que en la segunda influirían más las características de las cepas de rizobios y de la leguminosa huésped.

2. 4. 1 Factores que intervienen en la competencia

Los factores involucrados en la competencia entre cepas de rizobios para la formación de nódulos son complejos y pueden dividirse en ambientales, inherentes a los rizobios involucrados, de la planta huésped y a la simbiosis (Temprano et al., 1991; Sadowsky, 2000).

2. 4. 1. 1 Factores ambientales

El efecto de la acidez del suelo sobre la competencia, se debe a que las cepas de rizobios varían en su tolerancia a la acidez, siendo las más sensibles más lentas en la formación de nódulos (Franco y Munns, 1981). Las cepas de crecimiento rápido son sensibles a condiciones ácidas y tolerantes a condiciones alcalinas. Por otro lado, cepas de crecimiento lento crecen bien a pH alto (pH=9) y moderadamente en pH ácido (pH=5) (O´Hara et al., 2004; Dowling y Broughton, 1986). Temprano et al (1991) mostraron que una cepa de *Bradyrhizobium japonicum* en un suelo de pH 4.9 produjo más del 80% de los nódulos frente a una cepa de *Rhizobium fredii.* En condiciones de pH 8.1, formó menos del 5% de los nódulos. A su vez dentro de un género particular de rizobio varía la tolerancia a la acidez. Tal es el caso de dos cepas de *R. leguminosarum* bv *trifoli,* en donde la formación de nódulos a pH 5 fue mayor con una cepa y a pH 7, mayor con la otra (Jones y Morley, 1981 citado por

Temprano et al., 1991). A pH 5.9 una cepa de *Bradyrhizobium japonicum* dominó en la nodulación de soja, y a pH 8.3 lo hicieron otros serogrupos (Temprano et al., 1991).

La temperatura es otro factor que influye en la habilidad de los rizobios para persistir y competir en el suelo. Dowling y Broughton (1986), demostraron que cepas de rizobios de crecimiento rápido y lento, difieren en la sensibilidad a la temperatura para la formación de nódulos. A temperaturas de 23-25°C, una cepa de crecimiento rápido dominó en la rizósfera y formó más nódulos; mientras que a temperaturas de 26-30°C lo hizo una de crecimiento lento (Weber y Miller, 1972). Pankhurst y Layzell (1984), trabajando en *Lotus uliginosus* cv Maku a 12ºC, observaron que una cepa de crecimiento lento produjo mayor número de nódulos y fue más eficiente que otra de crecimiento rápido.

Al igual que lo mencionado para el factor pH del suelo, existen dentro de géneros diferente habilidad competitiva de acuerdo a variaciones en la temperatura del suelo. Comparando dos cepas de *R. trifolii*, Hardarson y Jones (1979) citado por Dowling y Broughton (1986), demostraron que una de éstas cepas formó más nódulos a 12°C, siendo la otra más competitiva a 25°C.

Guss y Döbereiner (1972) trabajando con *Phaseolus vulgaris* determinaron que temperaturas máximas diurnas superiores a 32°C afectaron la fijación de N, y que éste efecto pudo ser compensado por algunas cepas de *Rhizobium* mediante el aumento del número de nódulos.

La humedad también afecta la movilidad y capacidad de los rizobios para colonizar la rizósfera (Temprano et al., 1991). La tolerancia a condiciones extremas de humedad y temperatura depende del origen de los aislamientos.

Hartel y Alexander (1984) citado por Dowling y Broughton (1986), mostraron que cepas de *Bradyrhizobium* aisladas de áreas áridas fueron más tolerantes a la desecación y altas temperaturas que cepas aisladas de zonas más frías. Un aislamiento de Tanzania (lugar con sequías frecuentes) fue más competitivo en condiciones extremas de sequía que aislamientos provenientes de Europa.

De todo esto se desprende que un programa de selección de cepas de rizobios, destinadas a la preparación de inoculantes comerciales debería basarse en una serie de parámetros: eficiencia en la fijación del nitrógeno, sobrevivencia en el suelo y capacidad competitiva para la formación de nódulos (Temprano et al., 1991).

Adicionalmente, es relevante que la selección se realice en campo, en el marco agronómico de la leguminosa huésped considerando diferentes años y localidades.

2. 4. 1. 2 Factores inherentes al rizobio

En las relaciones de competencia entre cepas nativas e introducidas es muy importante considerar la relación entre el tamaño de las poblaciones nativas de rizobios del suelo y la concentración de las células introducidas a través de la inoculación (Temprano et al., 1991; Dowling y Broughton ,1986; Vargas et al., 2000). Miranda et al (1985), trabajando en *Centrosema* en condiciones controladas evaluaron cuatro cepas puras (C-106, C-551, CEN GG 26 y CEN GC 29) y las mezclas frente a testigos sin inocular con y sin nitrógeno. Concluyeron que la cepa C-106 fue la más efectiva, pero la menos competitiva en la formación de nódulos. Por lo cual la introducción de C-106 en suelos con poblaciones nativas inefectivas comprometería su capacidad de formar nódulo.

Por otra parte, Franco y Vincent (1976) y Ames-Gottfred y Christie (1989) observaron que una cepa inefectiva en *Stylosanthes guianensis* y en *Trifolium repens* resultó ser la más competitiva. Sin embargo Robinson (1969), estableció que existe una relación entre la efectividad y la habilidad competitiva de cepas de rizobios. Trabajos realizados por Labandera y Vincent (1975) demostraron que no siempre existe una relación directa entre eficiencia y competitividad.

Brown y Ahmad (1996) mostraron que cepas de rizobios introducidas fueron más competitivas para la formación de nódulos, que cepas nativas. A su vez Lowther y Ronson (1996) mostraron que las poblaciones nativas tenían una gran variabilidad, alcanzando concentraciones de 10^6 bacterias por gramo de suelo. En estas circunstancias resultó difícil introducir cepas de rizobios con éxito. Sin embargo Temprano et al (1991), mostraron que la población nativa podía ser desplazada aumentando la concentración del inóculo en la semilla a sembrar. Esto último está de acuerdo con los trabajos de Dutto et al (2000), que mostraron la importancia de concentraciones crecientes de la cepa U204 en semillas inoculadas de *T. repens* en la implantación, en presencia de poblaciones nativas inefectivas derivadas de la presencia de *T. polymorphum* en suelos de Uruguay.

Dowling y Broughton (1986); Weaver y Frederick (1974) citado por Kremer y Peterson (1982) sugirieron que para formar 50% de nódulos con los rizobios del inoculante, se requiere una concentración en el inoculante 1000 veces mayor a la de la población nativa. Baraibar et al (1999), encontraron que la concentración de *R*. loti en suelos de Uruguay, sin historia de leguminosas comprendió un rango de 10^1 - 10^5, siendo posible encontrar valores máximos de 1×10^6.

Otro factor vinculado a las relaciones de competitividad, es la movilidad ya que facilita la colonización de la rizósfera aumentando la probabilidad de formar nódulos en competencia (Temprano et al., 1991). Los mismos autores trabajando en diferentes suelos, mostraron que plantas de alfalfa inoculadas con una cepa nativa de *R. meliloti* y un mutante no móvil fueron noduladas mayoritariamente por la primera.

2. 4. 1. 3 Factores inherentes de la planta

La planta tiene un rol importante en la expresión de la capacidad competitiva de una cepa de *Rhizobium*. Existen cultivares de soja que no nodulan con cepas de *Bradyrhizobium japonicum* del serogrupo USDA123; por el contrario éstas cepas son muy competitivas en el cultivar Williams (Temprano et al., 1991).

De acuerdo con Temprano et al (1991) existen genotipos vegetales que excluyen determinados microsimbiontes, bloqueando algunas etapas del proceso de nodulación. Esto es de importancia agronómica y representa nuevas herramientas para el mejoramiento genético de las leguminosas en simbiosis. Estos resultados coinciden con lo obtenido en el proyecto de evaluación y mejoramiento genético de nuevas leguminosas forrajeras para áreas de ganadería extensiva en Uruguay (Labandera, 2004).

Consecuentemente sería importante desarrollar un programa paralelo de investigación a los efectos de entender las bases moleculares involucradas en los aspectos de la competencia (Dowling y Broughton, 1986).

2. 4. 1. 4 Factores inherentes a la simbiosis

Entre los factores relacionados a la simbiosis, hay evidencias de que los genes del huésped y del microsimbionte contribuyen a la competencia por la formación de nódulos. Los genes involucrados en la habilidad para nodular y competir se denominan *nfe* (San Juan y Olivares, 1989). La presencia de estos genes, determina mayor habilidad competitiva para la formación de nódulos. Temprano et al., (1991) trabajando con *R. meliloti*, mostraron que mutaciones en una región (*nfe*) de 5 Kb del plásmido críptico *pRmeGR4b,* redujeron la eficiencia para nodular y la competitividad de la cepa GR4 en raíces de alfalfa.

Irisarri (1997), determinó que un plásmido de la cepa U510 (ex U226) contribuye a la simbiosis ya que su ausencia disminuye la competitividad de la cepa para la formación de nódulos en *Lotus corniculatus*.

2. 4. 1. 5 Otros factores

Existen otros factores que afectan la concentración de las poblaciones de rizobios y consecuentemente las relaciones de competencia. Entre ellos se encuentran factores bióticos (microorganismos, bacteriocinas) y fisicoquímicos, en particular los agroquímicos podrían jugar un papel importante.

Dowling y Broughton (1986) y Temprano et al (1991) establecen que los rizobios al igual que otras bacterias del suelo pueden ser infectados por un amplio rango de microorganismos. Entre ellos se destacan, *Bdellovibrio* (parásito intracelular) y protozoarios predadores.

Estudios del efecto de fungicidas, herbicidas e insecticidas señalan resultados complejos, sin claras evidencias acerca de su efecto sobre la población de rizobios. (Burton y Curley, 1975; Kao y Wang, 1981). Sin embargo Brockwell (1977) citado por Burton (1985), señala que algunas cepas de rizobios son más tolerantes que otras a los fungicidas.

Los herbicidas adicionados directamente al suelo o a la planta no han mostrado efectos adversos sobre la nodulación o la fijación de N, excepto cuando son usados en exceso (Kapusta y Rouwenhorst, 1973 citado por Burton, 1985). Adicionalmente Kao y Wang (1981) mostraron que los herbicidas no inhiben la infección pero disminuyen la nodulación por daño directo sobre la planta.

El conocimiento de la compatibilidad de rizobios con plaguicidas es escaso y difícil de interpretar debido a que a menudo estos productos se utilizan como tratamientos combinados. De acuerdo con Brockwell (1977) citado por Burton (1985) los insecticidas serían menos tóxicos para los rizobios que los fungicidas, aunque las evidencias al respecto son limitadas.

2. 4. 2 Evaluación de la habilidad competitiva

Para evaluar la habilidad competitiva de una cepa, es necesario identificarla en los nódulos de modo de poder establecer que porcentaje de ellos han sido formados por dicha cepa. Para la identificación se utilizan diferentes técnicas: bioquímicas, serológicas, resistencia o sensibilidad frente a antibióticos y moleculares. Normalmente las relaciones de competencia se estudian de a pares controlando las relaciones cuantitativas de los competidores en el inóculo y en la raíz en crecimiento (Labandera y Vincent, 1975). Estos trabajos pueden

también extenderse al estudio de la habilidad competitiva de una cepa frente a poblaciones naturalizadas en los suelos, en invernáculo o en campo con todas las variables naturales actuando sobre el sistema experimental. Para apreciar el efecto de éstas variables los ensayos suelen repetirse en distintas localidades y años (Lodeiro et al., 2003).

2. 5 INOCULACION DE LEGUMINOSAS

A pesar de que los rizobios son habitantes comunes en los suelos agrícolas, frecuentemente su población es insuficiente o de baja efectividad para alcanzar una relación benéfica con la leguminosa, por lo cual es necesaria la inoculación. En el caso del *Lotus uliginosus*, existen en el suelo rizobios capaces de nodular la especie pero se encuentran en muy baja concentración y presentan niveles de efectividad inferiores a la cepa comercial. La inoculación de la semilla permite incorporar bacterias específicas especialmente seleccionadas por su habilidad para fijar nitrógeno. De esta manera la planta obtiene mediante la simbiosis, el nitrógeno necesario para su desarrollo determinando un ahorro sustancial de fertilizantes nitrogenados.

El éxito de la inoculación depende entre otros factores, de la cepa utilizada. En Uruguay, las cepas para las diferentes leguminosas sembradas son seleccionadas y suministradas a la Industria de Inoculantes por el Departamento de Microbiología de Suelos (RENARE, MGAP). El otro factor determinante del éxito de la inoculación refiere a la concentración de la cepa en el inoculante y especialmente en la semilla inoculada. La normativa de control de calidad vigente en el país exige una concentración de 2×10^9 y 1×10^9 rizobios vivos / gramo de inoculante en fábrica y al vencimiento respectivamente. Estos niveles de exigencia, la dosis de inoculación

recomendada y los materiales utilizados permiten lograr concentraciones adecuadas mínimas de rizobios en la semilla inoculada que aseguran el establecimiento de una simbiosis funcional (Labandera et al., 1982). Sin embargo debido a los múltiples factores implicados en la simbiosis rizobio-leguminosa, es difícil determinar el número óptimo de células sobre la semilla (Parle et al., 1973; Peres y Vidor, 1980; Labandera et al., 1982). Un ejemplo de esta situación está representada por la siembra de *L. uliginosus* en potreros con antecedentes de *Lotus corniculatus*. En estas situaciones se deben de extremar todos los cuidados respecto del inoculante y de la inoculación.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. 1 RESPUESTA A LA INOCULACIÓN EN CAMPO

3. 1. 1 Sitio experimental

Se eligieron dos potreros dentro de la Unidad Experimental Palo a Pique (INIA Treinta y Tres) con y sin historia de *Lotus corniculatus*, pertenecientes a la unidad de suelo Alférez sobre cristalino del este (Figura N° 1 y Anexo N° 1 sección 2.). El sitio con antecedentes fue mejorado en el año 1993 y renovado en 1999.

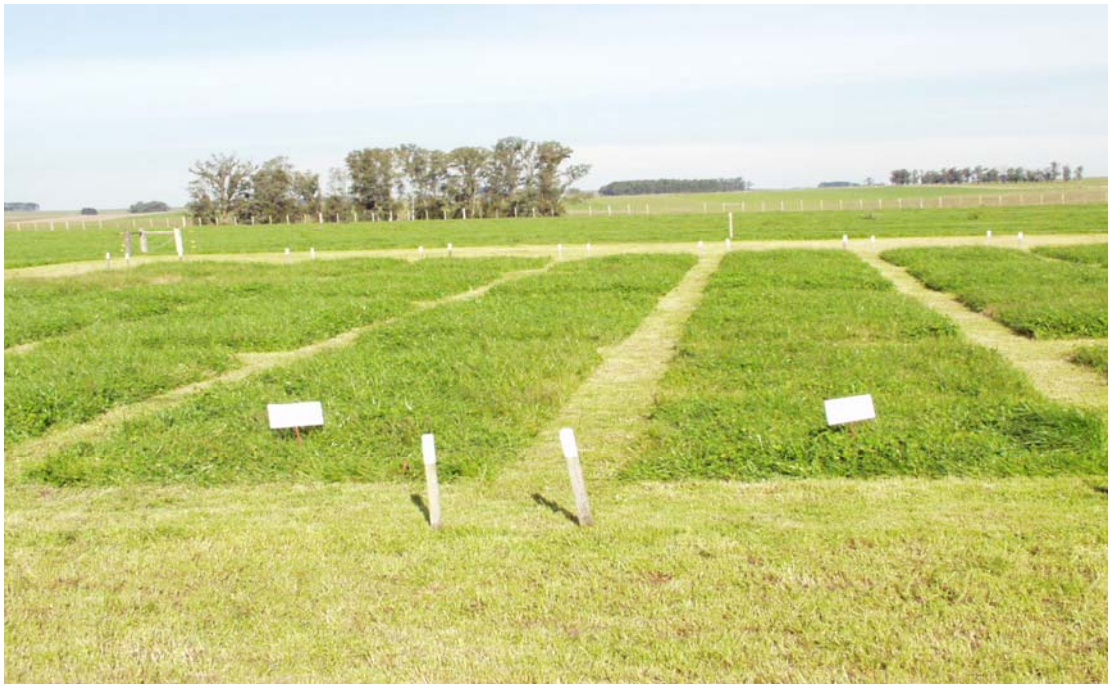
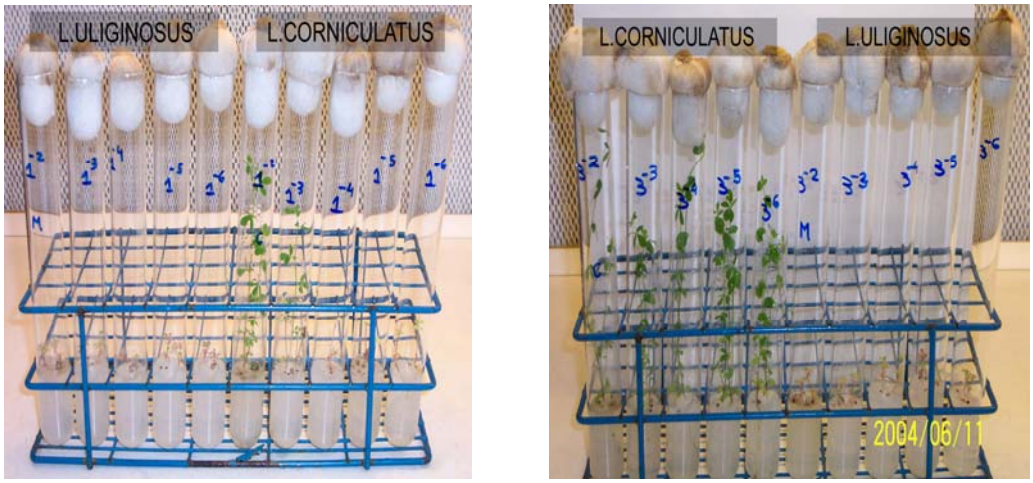


Figura Nº 1: Disposición de tratamientos en parcelas en campo

Se realizaron recuentos de rizobios nativos y naturalizados a partir de una muestra de suelo compuesta de cada uno de los potreros siguiendo la técnica del Número Más Probable (NMP) en plántulas de *L. corniculatus* y *L. uliginosus* (Anexo N° 1 sección 3. y Figura Nº 2).



suelo sin antecedente de *L.corniculatus* suelo con antecedente de *L.corniculatus*

Figura Nº 2: Plántulas de *Lotus corniculatus* y *L.. uliginosus* inoculadas con alícuotas de las diluciones sucesivas de las muestras de los suelos

3. 1. 2 Inoculantes e inoculación

Para el recuento de rizobios viables sobre semilla inoculada, se utilizó semilla de *Lotus uliginosus* esterilizada superficialmente con alcohol al 95% durante 3 minutos, hipoclorito de sodio al 3% durante 1 minuto y 5 lavados con agua estéril (Vincent, 1970) (Figura N° 3).

Figura Nº 3: Esterilización de semillas (Vincent, 1970)

La inoculación se realizó con inoculante en base turba estéril formulado con las siguientes cepas: U526, específica de *Lotus uliginosus*, U531 específica de *Lotus subbiflorus* y la mezcla de ambas en una proporción 1-1 (Cuadro N° 1). Para la inoculación se utilizaron las dosis recomendadas por el Dpto. de Microbiología de Suelos: 200 gr de inoculante turba, 1.5 lt de adherente, 5 Kg de $CaCO_3$ malla 300 cada 25 Kg de semilla. Las semillas inoculadas se mantuvieron a temperatura y humedad ambiente.

Cuadro N° 1: Origen de las cepas

Código **U**	Origen	Pl. huésped	Otras designaciones
526	N. Zelanda	*L. uliginosus*	NZP2309
531	Uruguay	*L. subbiflorus*	NC3

Se realizaron determinaciones del número de rizobios por semilla por el método de viables en placa con medio M-79 con rojo congo pH 6.8 (Anexo N° 2 sección 1.). Se utilizaron 2 repeticiones en las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} a tiempo cero (enseguida de la inoculación) y luego de 24, 48, 72 y 168 horas (Figura Nº 4). La suspensión de rizobios se realizó a partir de una muestra de 90 semillas inoculadas en 90 ml de agua estéril, agitándose durante 10 minutos. Las placas se mantuvieron invertidas en estufa a 28ºC (Anexo N° 3 sección 1.).

Figura Nº 4: Recuento de viables en placas de petri

El recuento de rizobios en los inoculantes, se realizó a partir de una muestra de 10 gramos de cada inoculante en 90 mL de agua estéril, con 2 repeticiones en la dilución 10^{-8} siguiendo la metodología descripta para las semillas (Anexo N° 3 sección 2.).

3. 1. 3 Siembra y fertilización

La siembra se realizó el 31/05/04, a una densidad de 3 kg/há, fertilizándose a la siembra con 60 unidades de P_2O_5/há de fosforita natural (0-10/28-0).

3. 1. 4 Diseño experimental y tratamientos

Se evaluaron 4 alternativas de inoculación (U526, U531, U526 + U531 y testigo sin inocular) y dos métodos de siembra manuales (en línea y al voleo). La siembra en línea consistió en 5 líneas/parcela simulando una siembra a chorrillo. Se definieron 32 parcelas experimentales por sitio de 10 m² cada una con 4 repeticiones por tratamiento, dispuestas en un diseño en bloques completamente aleatorizados (Anexo N° 1 sección 1.).

3. 1. 5 Variables evaluadas

Se evaluó la implantación de *L. uliginosus* mediante el estado inicial de las plántulas y su nodulación temprana. El estado de las plántulas se midió mediante el número de plántulas verdes o cloróticas a los 90 días postsiembra para cada tratamiento. Se utilizó un muestreo al azar con tres repeticiones por tratamiento utilizando un rectángulo de 20 x 50 cm. Paralelamente se realizó una evaluación temprana de la nodulación en base a una escala subjetiva de 10 puntos basada en el tamaño, cantidad y distribución de los nódulos en el sistema radicular. La escala fue adjudicada por estimación visual, a 4 plántulas (2 verdes y 2 cloróticas) de cada parcela dentro de cada sitio (Cuadro N° 2 y Figura N° 5). Se determinó un índice de nodulación ponderando la proporción de plántulas verdes y cloróticas con la escala adjudicada para cada tratamiento.

Cuadro N° 2: Escala de nodulación (adaptada de Master Class In Rhizobium Technology, 2000)

N° de la escala	Observaciones de nódulos
0	Sin nódulos
1	1 nódulo inefectivo en raíces secundarias
2	2 nódulos inefectivos en raíces secundarias
3	3 nódulos inefectivos en raíces secundarias
4	4 nódulos inefectivos o más en raíces secundarias
5	1 nódulo chico efectivo en raíces secundarias
6	2 nódulos chicos efectivos en raíces secundarias
7	3 nódulos chicos efectivos o más en raíces secundarias
8	1 nódulo grande efectivo en la corona
9	2 nódulos grandes efectivos en la corona
10	Corona completamente cubierta con nódulos efectivos

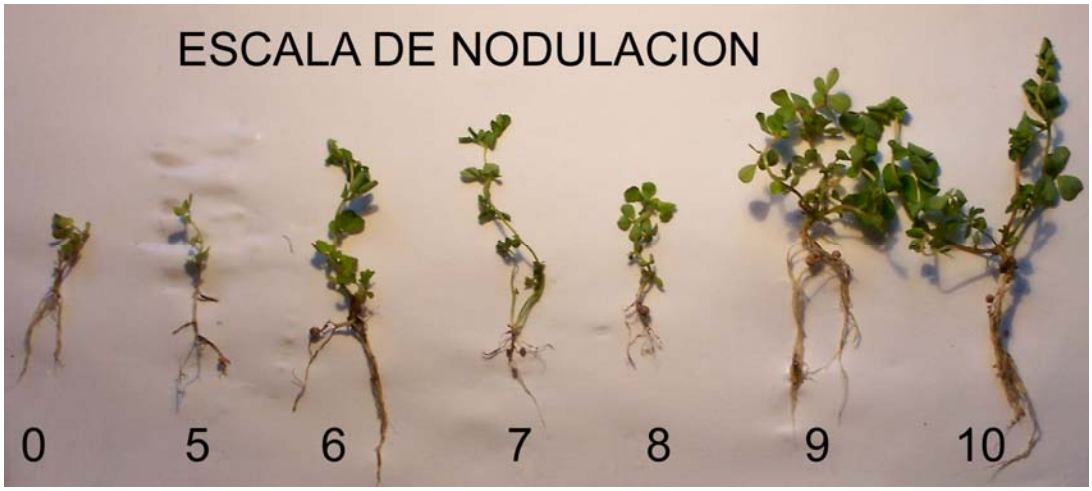


Figura N° 5: Escala de nodulación utilizada en la etapa de implantación del *L. uliginosus*

La eficiencia de la fijación biológica de nitrógeno se evaluó mediante el rendimiento de forraje. Para el sitio con historia el forraje se desglosó en: *Lotus*

uliginosus cv Makú, *L. corniculatus* cv San Gabriel, *Trifolium repens* y otras especies. En el sitio sin historia, se separó la biomasa en *Lotus uliginosus cv* Maku y en otras especies. Se analizó para ambos sitios el porcentaje de *L. uliginosus* en el total de forraje, realizándole una transformación angular a dicha variable debido a que habían valores que se encontraban muy por encima de la media. Para ambos sitios el primer corte se realizó a los 160 días postsiembra a 6 cm. Seis meses después (12/05/05) se realizó un segundo corte no pudiéndose evaluar el sitio con historia debido a un imprevisto ajeno al ensayo (ingreso de novillos a las parcelas). El último corte para ambos sitios, fué a los 4 meses del segundo (12/09/05), a una altura de 3 cm. El área de corte fue de 6.35 m^2. Se determinó la tasa de crecimiento diaria del *L. uliginosus* de acuerdo al intervalo entre cortes.

3. 1. 6 Análisis estadístico

Para todos los análisis estadísticos de los experimentos del presente trabajo, se utilizó el programa SAS versión 8.2. Para evaluar el efecto de los tratamientos de inoculación y de los métodos de siembra sobre las variables evaluadas en la etapa de implantación, se ajustaron modelos lineales generalizados, usando el procedimiento GENMOD del paquete estadístico SAS (Anexo N° 4 secciones 1 y 2). Los contrastes entre pares de medias se realizaron usando el Test de razón de verosimilitud.

Para evaluar en cada corte el efecto de los tratamientos de inoculación y métodos de siembra sobre la producción de forraje: total, *L. uliginosus*, *L. corniculatus*, *T. repens* y otras especies se ajustó un modelo lineal general para cada antecedente (Anexo N° 4 secciones 3., 4., 5., 6. y 7.). Para evaluar los

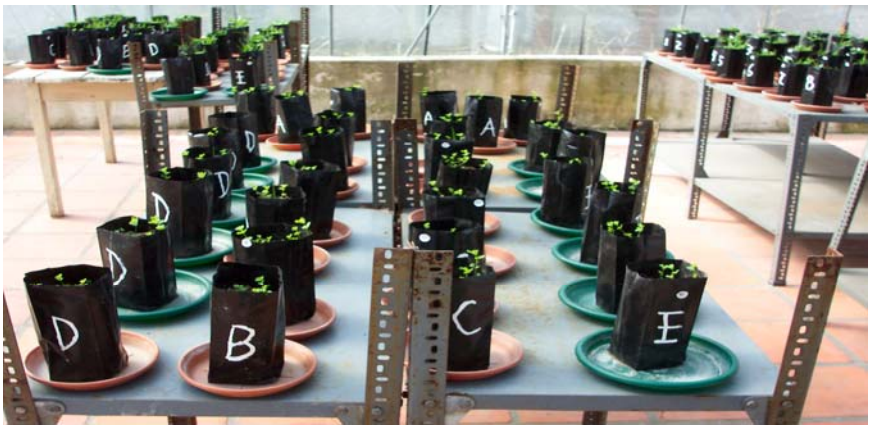
mismos efectos sobre los cortes acumulados dentro de cada antecedente se ajustó un modelo lineal mixto de medidas repetidas en el tiempo, usando el procedimiento MIXED del paquete estadístico SAS (Anexo N° 4 secciones 8. y 9.). Las medias de los efectos significativos fueron separadas usando el Test de tukey.

3. 2 EVALUACIÓN DE CEPAS EN INVERNÁCULO

3. 2. 1 Instalación del ensayo

El ensayo se instaló en el invernáculo del Departamento de Microbiología de Suelos, MGAP, utilizando cilindros de suelo de 50.26 cm^2 (Vincent, 1975) extraídos de ambos sitios con el tapiz existente. En los cilindros de suelo del sitio con antecedente de *Lotus corniculatus* se eliminó la competencia del tapiz, no así en los del sitio sin historia. Se utilizó semilla de *Lotus uliginosus* cv Maku previamente seleccionada y esterilizada superficialmente (Vincent, 1970). En la figura N° 6 se observa la instalación del ensayo.

6 A- cilindros de suelo sin historia



6 B- cilindros de suelo con historia

Figura Nº 6: Disposición de tratamientos en invernáculo

3. 2. 2 Cepas utilizadas

El estudio del potencial simbiótico en los cilindros de suelo se realizó con las cepas que figuran en el cuadro siguiente.

Cuadro N° 3: Origen de las cepas de rizobios utilizadas

Código**U**	Origen	Pl. huésped	Otras designaciones
510[1]	Australia	*L. corniculatus y L. tenuis*	B816(Vincent),CIAT 24,U226
526	N. Zelanda	*L. uliginosus*	NZP2309
531	Uruguay	*L. subbiflorus*	NC3
529[2]	Australia	*L. subbiflorus*	CC814s,U416
525[2]	N. Zelanda	*L .uliginosus*	NZP2089
534[2]	Australia	*L. uliginosus*	WSM166
EB7[3]	Tbo,Uy	*L. parviflorus*	-
EB75[3]	Uruguay	*L. coimbrensis*	-
ME190[3]	Pdu,Uy	*L. angustissimus*	-
LC627[3]	Flores,Uy	*L. uliginosus*	-
PP5[3]	Tr.y Tres,Uy	*L. uliginosus*	-
GMI6[3]	Paysandú,Uy	*L. uliginosus*	-
LC1[3]	Flores,Uy	*L. uliginosus*	-
G627[3]	Paysandú,Uy	*L. uliginosus*	-
MM305[3]	Uruguay	*L. uliginosus*	-

[1] cepa utilizada en la elaboración de los inoculantes comerciales para *L. corniculatus*

[2] cepas de colección recomendadas para *L. uliginosus*

[3] las letras que anteceden a los números de los aislamientos corresponden al nombre del colector o localidad

3. 2. 3 Caracterización de cepas y aislamientos

Se sembró una anzada de cada cepa o aislamiento en medio M-79 con azul de bromotimol pH = 6.8 (Anexo N° 2 sección 1.), y se observó producción de ácido o álcali por viraje del indicador para establecer sus tasas de crecimiento y por ende el género (Figura N° 7). De ésta manera se separaron cepas y

aislamientos de crecimiento lento y rápido. Al mismo tiempo se sembró una anzada de cada cepa o aislamiento en forma de estría única en el medio agar glucosa peptona con púrpura de bromocresol pH= 6.8 (Anexo N° 2 sección 2.) observándose ausencia o presencia de colonias a las 24 horas de crecimiento en estufa a 28 °C.

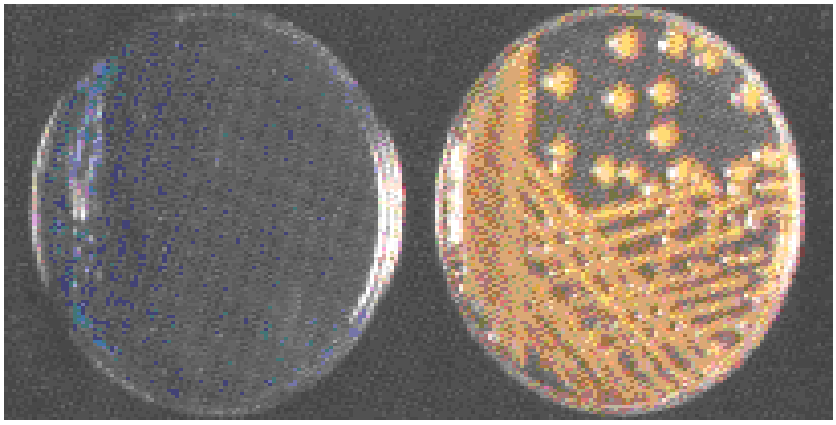


Figura Nº 7: Colonias de *Rhizobium* (coloración amarilla) y *Bradyrhizobium* (coloración azul) en medio agar glucosa peptona con púrpura de bromocresol pH= 6.8

3. 2. 4 Inoculación

La preparación de las suspensiones para la elaboración del inoculante consistió en el agregado de 9 mL de agua estéril a un cultivo puro de cada una de las cepas o aislamientos en estudio (colección del Departamento de Microbiología de Suelos). Las suspensiones obtenidas se ajustaron a los valores 3 y 4 de la escala de Mc Farland equivalentes a una concentración aproximada de 1 a 1.2 x 10^9 rizobios/mL (Lenette et al, 1974) (Anexo N° 3

sección 3.). Con éstas suspensiones se prepararon inoculantes base turba en una relación peso - volumen de 1 - 1 (Figura Nº 8). Adicionalmente se hicieron recuentos de viables en placa de cada una de las 15 suspensiones (Anexo N° 3 sección 2.).

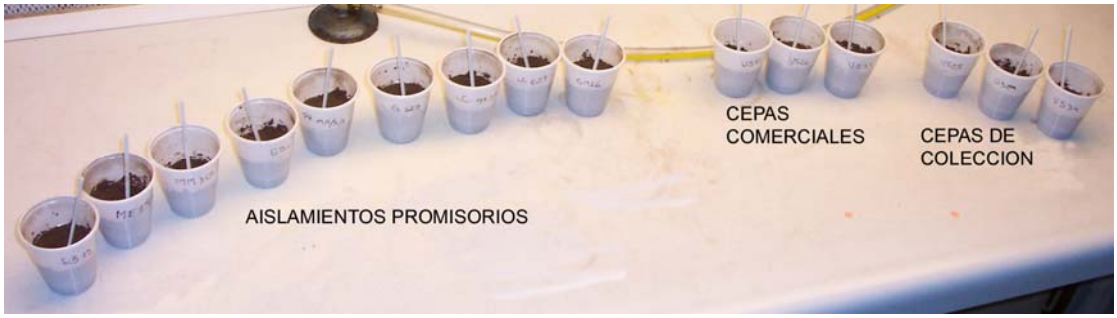


Figura Nº 8: Preparación de inoculantes

3. 2. 5 Siembra y Fertilización

Se realizó al voleo el 19/07/04 a una densidad de 0.12 gr de semilla inoculada / cilindro. Se aplicó fosforita natural (0-10/28-0) a razón de 0.11 gramos / cilindro para obtener 60 unidades de P_20_5/há. Después de la emergencia los cilindros fueron estandarizados por raleo a 5 plantas. El riego se mantuvo durante todo el experimento con agua deionizada.

3. 2. 6 Diseño experimental y tratamientos

Los cilindros se dispusieron siguiendo un diseño completamente al azar con seis repeticiones, instalándose en forma separada de acuerdo al antecedente. Las cepas asignadas para los cilindros de suelo del sitio con historia fueron

U510, U526, U531 y U529; estas y las restantes cepas y aislamientos que figuran en el cuadro N° 3 integraron los tratamientos para los cilindros de suelo del sitio sin historia. Para ambos sitios se utilizó un testigo sin inocular.

3. 2. 7 Variables evaluadas

El peso seco de la parte aérea se usó como estimador de la fijación biológica de nitrógeno. Para el sitio sin historia el peso seco se desglosó en *Lotus uliginosus* cv Makú y otras especies. Se realizaron tres cortes de parte aérea para ambos sitios, el primero a los 60 y 90 días después de la siembra para el sitio con y sin historia respectivamente, el segundo a los 105 y el tercero a los 150 días. Se tomo en cuenta la altura (aproximadamente 15 cm) y la acumulación de forraje.

3. 2. 8 Análisis estadístico

Para evaluar en cada corte y en la producción acumulada el efecto de los tratamientos de inoculación sobre el peso seco de la parte aérea de *L. uliginosus* y de otras especies se ajustó un modelo lineal generalizado, usando el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS (Anexo N° 5 secciones 1., 2., 3. y 4.). Las medias de los efectos significativos fueron separadas usando el Test de tukey.

3. 3 EVALUACIÓN DE CEPAS EN CÁMARAS DE CRECIMIENTO DE PLANTAS

3. 3. 1 Eficiencia de cepas en *L. corniculatus*

En plántulas de *L. corniculatus* cv San Gabriel se evaluaron las cepas recomendadas para *Lotus uliginosus* cv Maku (U526, U529 y U531), la cepa y aislamientos de mejor comportamiento en el primer corte de invernáculo (U534, ME190 y G627). Sumado a ésto se evaluaron la cepa comercial U510 y el aislamiento LC1 dado su crecimiento rápido en medio M-79. Se trabajó con semillas escarificadas y esterilizadas superficialmente (Vincent, 1970), sembrándose dos semillas por tubo conteniendo medio para plantas libre de nitrógeno pH = 7 (Anexo Nº 2 sección 3.).

Los tubos se inocularon con 1 mL de una suspensión homogénea obtenida con 9 mL de agua estéril aplicados sobre un cultivo fresco de las cepas en estudio. Previo a la inoculación las suspensiones de cada cepa se ajustaron al valor 1 de la escala de Mc Farland lo que equivale a 3×10^8 rizobios/mL (Anexo N° 3 sección 3.). El tratamiento con nitrógeno se realizó con 1 mL de una solución de KNO_3 al 0.5%.

Se siguió un diseño completamente al azar con 9 tratamientos y 9 repeticiones. El peso seco de la parte aérea (promedio de las 2 plántulas / tubo) se usó como estimador de la fijación biológica de nitrógeno. Se utilizó el índice de eficiencia relativa (Brockwell et al., 1966) que mide el peso seco en relación a los controles sin inocular con y sin el agregado de nitrógeno y se expresa en porcentaje de acuerdo a la siguiente fórmula: IER= (PsTI-PsC)/(PsN-PsC) x 100, donde TI= inoculado, C= control y N= nitrógeno. Para evaluar el efecto de los tratamientos de inoculación sobre la variable estudiada se ajustó un modelo

lineal mediante el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS (Anexo N° 6 sección 1.). Las medias de los efectos significativos fueron separadas usando el Test de tukey.

3. 3. 2 Competencia de cepas para la formación de nódulos

Se llevo a cabo partiendo de semillas esterilizadas superficialmente y pregerminadas (Vincent, 1970) de *Lotus uliginosus* cv Makú sembradas en tubos conteniendo medio libre de N pH =7 (Anexo N° 2 sección 3.) inoculados con las siguientes cepas en cultivo puro: U526, U531, U529, U510 y en mezclas con la U510 (cepa parásita). La inoculación se realizó con la metodología descripta en el punto 3. 3. 1, utilizando concentraciones de 10^6 rizobios/mL para las cepas puras y relaciones 10:1 y 1000:1 de la cepa inefectiva a efectiva (Cuadro N° 4).

Cuadro N° 4: Concentraciones y relaciones cuantitativas esperadas entre la cepa parásita U510 (*Lotus corniculatus*) y las cepas efectivas

Tratamiento	Concentración/mL	Relación esperada cepa parásita:cepa efectiva
U510	10^6	1 : 0
U526	10^6	0 : 1
U529	10^6	0 : 1
U531	10^6	0 : 1
U510 : U526	$10^6 : 10^5$	10 : 1
U510 : U526	$10^6 : 10^3$	1000 : 1
U510 : U529	$10^6 : 10^5$	10 : 1
U510 : U529	$10^6 : 10^3$	1000 : 1
U510 : U531	$10^6 : 10^5$	10 : 1
U510 : U531	$10^6 : 10^3$	1000 : 1
Nitrógeno*		
Testigo		

*aplicado 1 semana post inoculación como KNO_3 0.5%

El trabajo se realizó en cámara de crecimiento para plantas en condiciones controladas de luz (grolux para plantas de 40 watts), temperatura (20º C diurna y 18º C nocturna) y fotoperíodo (12 hs) durante 60 días. Se realizó un diseño completamente al azar con 6 repeticiones por tratamiento, ajustando un modelo igual que el establecido para el ensayo del punto 3. 3. 1. Se analizó el peso seco de parte aérea y raíz de forma de evaluar el comportamiento individual de las cepas puras y en mezcla con la cepa parásita.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. 1 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA A LA INOCULACIÓN EN CAMPO

4. 1. 1 Recuento de rizobios en el suelo, semilla e inoculante

El recuento de la población nativa de rizobios resulta de interés ya que el establecimiento de la simbiosis con cepas efectivas puede estar condicionado por la competencia con cepas del suelo. El cuadro Nº 5 presenta el número más probable (NMP) de rizobios en el suelo en ambos sitios experimentales.

Cuadro N° 5: Número más probable de rizobios por gramo de suelo según especie y antecedente

Especie	Antecedente	Otoño	Invierno
L. corniculatus	sin historia	1.7×10^3	5.8×10^1
	con historia	5.9×10^5	2.4×10^3
L. uliginosus	sin historia	1.7×10^2	n . d
	con historia	n . d	3.8×10^2

n . d, no se detectan rizobios en las muestras

En ambos sitios se detectaron rizobios nativos / naturalizados capaces de nodular *L. corniculatus* y *L. uliginosus*. En el sitio con historia, la población naturalizada (10^3 a 10^5 rizobios/gr de suelo) inefectiva en *L. uliginosus* podría ejercer una presión importante sobre el establecimiento de la simbiosis con cepas introducidas. Sin embargo la alta concentración de rizobios lograda en las semillas inoculadas de *L. uliginosus* contrarresta dicho efecto (Cuadro N° 6).

La concentración de rizobios/gramo de suelo detectada en plantas de *L. corniculatus* fue sensiblemente mayor a la que se detectó en plantas de *L. uliginosus* en ambas estaciones. A su vez se reveló una caída significativa en la concentración de bacterias capaces de nodular *L. corniculatus* en el invierno. Esta situación coincide con lo descrito por Hafeez, (1996); Baraibar et al (1999). A su vez Baraibar et al (1999), analizando cuantitativamente poblaciones de rizobios para *Lotus* en muestras de 10 suelos de Uruguay sin historia previa de leguminosas, encontraron nodulación efectiva en *L. corniculatus* e inefectiva en *L. pedunculatus* y *L. subbiflorus.* Contrariamente Pankhurst y Greenwood (1977) citado por Brose (1992), constatan que en suelos de Nueva Zelanda, las cepas para *L. pedunculatus* son más frecuentes y están mejor distribuidas que las de *L. corniculatus*. En base a lo anterior se puede concluir que el antecesor es un factor determinante de las características simbióticas de las poblaciones naturalizadas de rizobios.

La calidad del inoculante refiere al número de rizobios viables / gramo de producto y determina el número de rizobios por semilla al momento de la inoculación (Half, 1976). La concentración del inoculante formulado con la cepa U526 fue de 6.2×10^9 rizobios/mL y de 8.6×10^9 para el formulado con la cepa U531.

La concentración de rizobios por semilla al momento de la inoculación y su sobrevivencia son aspectos claves en el establecimiento de la simbiosis principalmente en situaciones de suelos con alta concentración de rizobios inefectivos.

Cuadro Nº 6: Concentración de rizobios viables x 10^2/semilla inoculada de *L. uliginosus* con las cepas en estudio en función del tiempo

Hs después de la inoculación	U 531	U 526	U 531+ U 526	Promedio
0	11	47	41	42*
24	23	22	25	23
48	5	12	10	9
72	0	6	7	4
168	1	2	1	1.3

*el dato excluye el valor de la cepa U531 a to

El recuento realizado para la cepa U531 en el tiempo cero no es confiable posiblemente debido a errores de muestreo y manipulación.

Los datos muestran una caída significativa de la concentración de rizobios en la semilla en función del tiempo. Half (1976) en semillas de *T. repens* y Kremer y Peterson (1982) en semillas de *Phaseolus vulgaris, Glycine Max* y *Vigna unguiculata* obtuvieron comportamientos similares. La sobrevivencia fue de 27 y 12% a las 48 y 72 horas respectivamente (Figura N°9), mientras que el recuento a las 168 horas muestra la presencia de una población remanente. El número de rizobios (4200/semilla) en el momento de la inoculación (0hs), sería un nivel aceptable y estaría de acuerdo con Labandera et al (2001), que demostraron que a partir de 1000 rizobios/ semilla de *T. repens* se obtiene una implantación exitosa en situaciones de alta competitividad con cepas parásitas en campo.

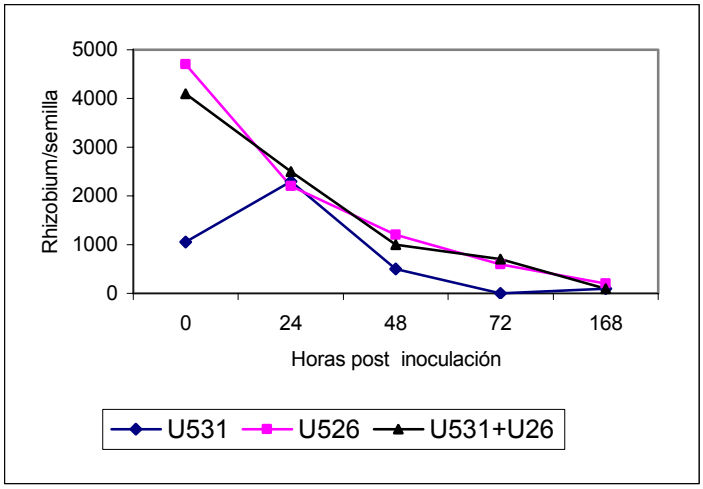


Figura N° 9: Sobrevivencia de rizobios en semillas inoculadas de *L. uliginosus* con las cepas en estudio

4. 1. 2 Evaluaciones en etapa de implantación

4. 1. 2. 1 Evaluación del estado de las plántulas

El efecto de los tratamientos (inoculación por método de siembra) en la implantación de *L. uliginosus* se evaluó mediante una estimación del estado de las plántulas (verdes y cloróticas) y su índice de nodulación.

El número de plántulas totales de *L. uliginosus* promediando los tratamientos inoculados y el testigo sin inocular fue de 252 y 174 plántulas/m^2 para el sitio con y sin historia respectivamente. Se logró un buen establecimiento de *L. uliginosus* independientemente de la historia del sitio. La situación planteada contrasta con lo postulado por Pérez y Labandera (1996) y Labandera et al (1990) acerca de las dificultades en la introducción de una nueva especie de

Lotus en campos con historia previa de *Lotus* de otro grupo simbiótico. Labandera et al (1990) mostraron que el porcentaje de implantación de *L. subbiflorus* inoculado con la cepa LS2, fue de 20.2 y 1.5% para dos sitios con historia de *L. corniculatus* y 34 y 30.8% para dos sitios sin historia. Las cepas utilizadas y la concentración de rizobios en el suelo y en las semillas inoculadas podrían explicar por lo menos en parte éstas diferencias.

Existió una respuesta importante a la inoculación en *L. uliginosus* para ambos sitios. En el sitio con historia de *Lotus corniculatus* los tratamientos inoculados superaron a los tratamientos sin inocular (85 > 24 % plántulas verdes, P<0.001; 201 > 72 plántulas verdes/m^2, P<0.01). De la misma manera para el sitio sin antecedente fue de 87 > 33% plántulas verdes y 163 > 43 plántulas verdes/m^2 con una P<0.001(Anexo Nº 4 sección 1. y Cuadro N° 7).

Cuadro N° 7: Número de plántulas de *L. uliginosus* totales y porcentaje de plántulas verdes en función del antecedente y tratamientos de inoculación

	Tratamiento	U526	U526+U531	U531	Testigo	P>F
con historia	N° pl.totales/m^2	252	243	218	293	>0,05
	N° pl.verdes/m^2	224 a	208 a	172 a	72 b	<0,05
	% de pl.verdes	89 a	86 a	79 a	24 b	<0,001
sin historia	N° pl.totales/m^2	186	171	209	130	>0,05
	N° pl.verdes/m^2	161 a	152 a	177 a	43 b	<0,001
	% de pl.verdes	87 a	89 a	85 a	33 b	<0,001

Datos refieren a un promedio de 24 observaciones por tratamiento

En ambos sitios no se observaron diferencias entre tratamientos de inoculación.

La interacción método de siembra x tratamiento no fue significativa (P>0.05) sobre ninguna de las variables analizadas (Anexo Nº 4 sección 1.). El efecto del método de siembra fue significativo sobre el número de plántulas totales/m^2 observándose una superioridad de la siembra en línea para ambos sitios. En el sitio sin antecedente los tratamientos sembrados en línea presentaron un mayor número de plántulas verdes, no existiendo diferencias significativas entre métodos de siembra en el sitio con antecedente (Cuadro Nº 8). Resulta difícil una explicación para ésta situación ya que en escenarios de alta competitividad debería esperarse un mejor comportamiento de la siembra en línea por mayor concentración de rizobios.

Cuadro Nº 8: Implantación y eficiencia simbiótica de *L. uliginosus* según antecedente de *L. corniculatus* y método de siembra

Antecedente	Variable	Línea	Voleo	Probabilidad
Sin historia de *L.corniculatus*	N° pl.totales/m^2	216 a	136 b	<0.05
	N° pl verdes/m^2	162 a	84 b	<0.01
Con historia de *L.corniculatus*	N° pl.totales/m^2	326 a	192 b	<0.01
	N° pl verdes/m^2	172	140	>0.05

4. 1. 2. 2 Evaluación temprana de la nodulación

Para evaluar el éxito relativo del establecimiento de la simbiosis para cada tratamiento de inoculación se utilizó la escala de nodulación (Cuadro N° 2 y Figura N° 5 de la sección 3. 1. 5) ponderando el índice de nodulación con la proporción de plántulas verdes y cloróticas.

Las plántulas presentes en el sitio sin historia de *L. corniculatus*, exhibieron mayor índice de nodulación. En ambos sitios se observó una situación

contrastante en la nodulación de *L. uliginosus* entre las cepas utilizadas y el testigo sin inocular con una P<0.001 (Anexo Nº 4. sección 2.). En el sitio con antecedente de *L. corniculatus* los tratamientos de inoculación promediaron un valor 6.1 de la escala, mientras que el testigo presentó un valor de 2. Del mismo modo el sitio sin antecedente mostró valores de 7.8 y 2.6 respectivamente (Cuadro N° 9).

Cuadro Nº 9: Indice de nodulación ponderado medio según antecedente y cepa utilizada

Antecedente	Tratamiento	Indice
Con historia de *L. corniculatus*	U526	6.4 a
	U531	5.5 b
	U526+U531	6.5 a
	Testigo	2.0 c
Sin historia de *L. corniculatus*	U526	7.9 a
	U531	7.8 a
	U526+U531	7.6 a
	Testigo	2.6 b

En cuanto al método de siembra, los resultados obtenidos en el sitio con historia muestran que la siembra al voleo presentó mejor nodulación con una P<0.01, no observándose diferencias significativas en el sitio sin antecedentes (P>0.05) (Anexo Nº 4 sección 2. y Figura Nº 10).

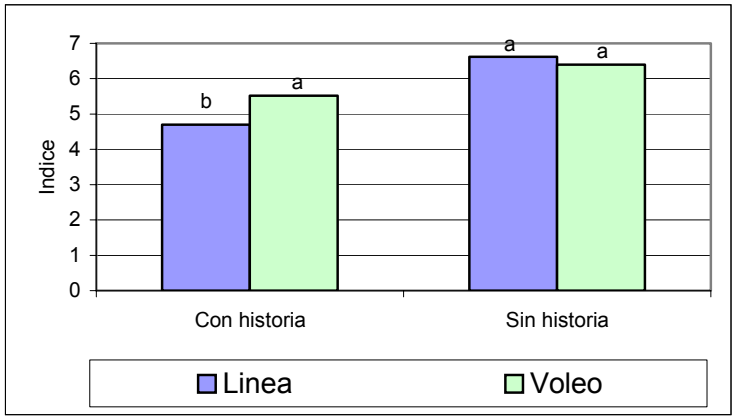


Figura Nº 10: Indice de nodulación ponderado medio según antecedente y método de siembra

Es importante resaltar que los resultados de nodulación muestran que la cepa U526 y su mezcla con la U531 presentaron una mejor habilidad competitiva en presencia de cepas naturalizadas que nodulan *L. corniculatus* (Cuadro N° 9). En tal sentido podría resultar interesante estudios posteriores de competencia para determinar la ocupación nodular cuando se trabaja con mezcla de cepas (U526 + U531).

4. 1. 3 Evaluación de forraje

4. 1. 3. 1 Primer corte

El sitio con antecedente tuvo una mayor producción de forraje total (promediando tratamientos inoculados y no inoculados) 8.5 veces superior al sitio sin antecedente (4558 vs.536 kg MS/Há). Esto se debió fundamentalmente al aporte de otras especies (principalmente *Lolium multiflorum)* ya que la contribución de *T. repens* y *L. corniculatus* fue menor. Esta mayor producción

se explicaría por la fertilidad residual dada la historia de mejoramiento con leguminosas. Si bien en ambos sitios la contribución de *L. uliginosus* en el total fue escasa dada la lenta implantación de la especie, la respuesta a la inoculación fue marcada (Cuadro Nº 10).

Cuadro N° 10: Producción de forraje expresado en kg MS/há y contribución de *L. uliginosus* según antecedente

Antecedente de *L. corniculatus*	Tratamientos	Total	Otras sps	*L.uliginosus*	% de *L.uliginosus*
Sin antecedente	inoculados	567	523	44	7.3
	sin inocular	504	500	5	0.8
Con antecedente	inoculados	4631	4195	56	1.2
	sin inocular	4484	4276	9	0.2

Datos de tratamientos inoculados refieren a un promedio de 24 unidades experimentales

Datos de tratamientos no inoculados refieren a un promedio de 8 unidades experimentales

Los resultados estadísticos del primer corte para ambos sitios (160 días postsiembra), se detallan en el siguiente cuadro.

Cuadro N° 11: Producción de forraje total y partición del mismo de acuerdo a tratamientos y antecedentes

			U526	U531	U526 + U531	Testigo	P>F	DMS (α=0.05)	W Tukey (α=0.05)	Línea	Voleo	P>F	DMS (α=0.05)	C.V (%)
con historia	kg MS/há	T.rep.	119	259	711	194	>0,05	-	-	193	449	>0,05	-	199
		L.cornic.	19	12	21	4.5	>0,05	-	-	18	10.0	>0,05	-	121
		L.ulig.	64 a	59 a	45 ab	9.1 b	<0,05	33,78	45,27	25 b	63 a	<0,01	23,88	74
		otras sps	4380	4184	4020	4277	>0,05	-	-	4380	4050	>0,05	-	24
		Total	4581	4514	4797	4484	>0,05	-	-	4615	4572	>0,05	-	14
	%	L.ulig.	1.4 a	1.3 a	1.0 a	0.2 b	<0,001	-	-	0.56 b	1.38 a	<0,01	-	36
sin historia	kg MS/há	L.ulig.	29	56	46	4.5	>0,05	-	-	32	35	>0,05	-	144
		otras sps	584	439	546	500	>0,05	-	-	524	511	>0,05	-	27
		Total	614	495	592	504	>0,05	-	-	556	546	>0,05	-	27
	%	L.ulig.	4.6 ab	10.0 a	7.4 a	0.8 b	<0,01	-	-	5.2	6.2	>0,05	-	51

Existió una respuesta inicial a la inoculación en contribución de *L. uliginosus* tanto para el sitio con historia (1.2 % inoculado / 0.2% no inoculado) como para el sin historia (7.3 % inoculado / 0.8% no inoculado) siendo la probabilidad de esa respuesta de P<0.001 para ambos sitios (Anexo Nº 4 secciones 3. y 4.). Adicionalmente, en el sitio con antecedente la respuesta también se observó en la producción de *L. uliginosus* (56 kg MS/há inoculado / 9.1 kg MS/há no inoculado, P<0.01) (Anexo Nº 4 sección 3.). La producción de forraje total y sus componentes fue superior en el sitio con antecedente, probablemente debido a la historia de mejoramientos de este sitio, lo cual coincide con el mayor nivel de fósforo detectado por análisis (Anexo N° 1 sección 2.).

Para ninguno de los sitios estudiados se detectaron diferencias entre tratamientos de inoculación, diferenciándose del testigo sin inocular en el sitio con antecedente las cepas U526 y U531; de la misma manera la cepa U531 y la mezcla U526 + U531 en el sitio sin antecedente (Cuadro N° 11 y Figura N° 11).

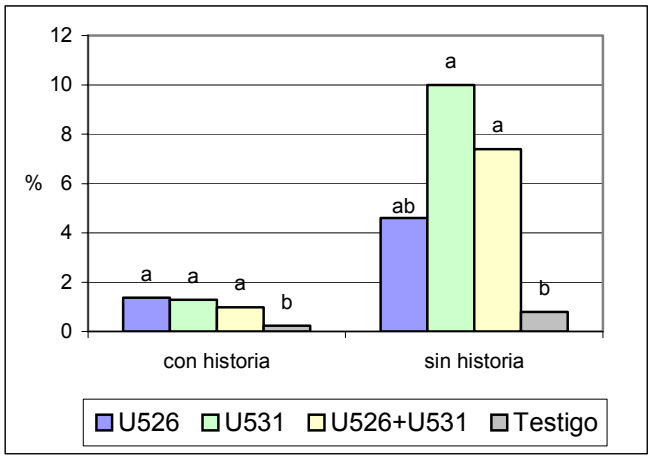


Figura N° 11: Contribución relativa de *L. uliginosus* en función de la inoculación en sitios experimentales con y sin historia previa de *L. corniculatus*

En lo que respecta al método de siembra para el sitio sin antecedente de *L. corniculatus*, no hubo diferencias en cuanto a sembrar en línea o al voleo para ninguno de los componentes del rendimiento analizados. Sin embargo para el sitio con antecedente se obtuvo una mejor implantación con la siembra al voleo. Se hubiese esperado una mejor implantación del *L. uliginosus* en la siembra en línea respecto a la siembra al voleo, especialmente en el sitio con antecedentes de *L.. corniculatus* (Dutto y Perez, 1998).

La interacción tratamiento de inoculación x método de siembra no fue significativa para las variables de interés (P>0.05) (Anexo Nº 4 secciones 3. y 4.).

4. 1. 3. 2 Segundo corte

Este segundo corte se realizó a los seis meses del primero (11,5 meses postsiembra) evaluándose solamente el sitio sin antecedente. Los resultados obtenidos se muestran en el siguiente cuadro:

Cuadro N° 12: Producción de forraje total y partición del mismo de acuerdo a tratamientos de inoculación y método de siembra

			U526	U531	U526 + U531	Testigo	P>F	DMS (α=0.05)	W Tukey (α=0.05)	Línea	Voleo	P>F	C.V (%)
sin historia	kg MS/há	L.ulig.	89 a	49 ab	77 a	13 b	<0.001	36.84	49.37	72	72	>0.05	62
		Otras	301	277	363	385	>0.05	-		247	381	>0.05	51
		Total	390	326	440	398	>0.05	-		318	453	>0.05	46
	%	L.ulig.	23 a	15 a	18 a	3.3 b	<0.001	-	-	24 a	16 b	<0.05	52

Los datos del segundo corte y la figura Nº 12 muestran una respuesta significativa del *L. uliginosus* (P<0.001) a los tratamientos de inoculación. La

cepa U526 y la mezcla U526 + U531 superan al testigo sin inocular en producción de forraje. La siembra en línea mostró una ventaja comparativa en el aporte relativo de *L. uliginosus*.

La interacción método de siembra x tratamiento de inoculación no fue significativa para ninguna de las variables analizadas (Anexo Nº 4 sección 5.).

Figura Nº 12: Respuesta a la inoculación de *Lotus uliginosus* (tomada en noviembre, 2005)

4. 1. 3. 3 Tercer corte

El tercer corte se realizó a los 4 meses del segundo (15,5 meses postsiembra). El sitio con antecedente mantiene mayor producción de forraje total (3367 vs.1403 kg MS/Há), lo que se debe fundamentalmente al aporte de otras especies principalmente *Lolium multiflorum*. Sin embargo la producción de *L. uliginosus* fue menor en éste sitio lo que se debería a la mayor competencia

ejercida por las otras especies. Esta situación también se evidencia en la contribución relativa del *L. uliginosus* en ambos sitios que resultó mayor en el sitio sin historia (Cuadro Nº 13).

Cuadro N° 13: Producción de forraje en kg MS/há y contribución de *L.uliginosus* según antecedente de *L. corniculatus*

Antecedente de *L. corniculatus*	Tratamientos	Total	Otras sps	*L.uliginosus*	% de *L.uliginosus*
Sin antecedente	inoculados	1650	861	789	48
	sin inocular	1155	946	209	16
Con antecedente	inoculados	3610	2802	463	13
	sin inocular	3123	2557	228	7

Promedio en kgMS/há de 32 unidades experimentales

Se mantiene la respuesta a la inoculación para ambos sitios. Esta fue significativa (P<0.05) en el sitio con historia siendo la producción de *L. uliginosus* para los tratamientos inoculados y sin inocular 463 y 228 kg MS/há respectivamente (Anexo Nº 4 sección 6.). Del mismo modo la respuesta a la inoculación (789 y 209 kg MS/há) en el sitio sin antecedente fue significativa (P<0.001) (Anexo Nº 4 sección 7.). A pesar de la lenta implantación de la especie, en éste corte la producción de *L. uliginosus* superó a la de *T. repens* y *L. corniculatus,* en el sitio con historia*.* La contribución relativa de *L. uliginosus* en la mezcla resultó consistentemente mayor en el sitio sin historia. Los resultados no muestran un efecto del método de siembra (Cuadro Nº 14).

Cuadro N° 14: Producción de forraje total y partición del mismo de acuerdo a tratamientos y antecedentes de *L. corniculatus*

			U526	U531	U526 + U531	Testigo	P>F	DMS (α=0.05)	W Tukey (α=0.05)	Línea[1]	Voleo[1]	P>F	C.V (%)
con historia	kg MS/há	T.rep.	283	257	223	263	>0.05	-	-	217	257	>0.05	64
		L.cornic.	95	106	74	80	>0.05	-	-	67	116	>0.05	88
		L.ulig.	306	569	513	228	>0.05	-	-	420	505	>0.05	67
		otras sps	2981	2646	2779	2557	>0.05	-	-	2677	2928	>0.05	17
		Total	3665	3577	3589	3123	>0.05	-	-	3423	3787	>0.05	13
	%	L.ulig.	8.5	16	15	6.9	>0.05	-	-	12	14	>0.05	39
sin historia	kg MS/há	L.ulig.	831 a	709 a	828 a	209 b	<0.001	278.56	373.36	848	730	>0.05	41
		otras sps	823	922	838	946	>0.05	-	-	811	911	>0.05	29
		Total	1654 a	1630 a	1665 a	1155 b	<0.01	318.35	426.68	1658	1641	>0.05	20
	%	L.ulig.	51 a	43 a	49 a	16 b	<0.001	-	-	50	45	>0.05	24

[1] promedio de tratamientos inoculados

La interacción método de siembra x tratamiento de inoculación no fue significativa en las variables de interés para ninguno de los dos sitios (Anexo Nº 4 sección 6. y 7.).

4. 1. 3. 4 Cortes acumulados

La información del cuadro N° 15, sigue mostrando una mayor expresión en la producción de forraje de otras especies y en el total para el sitio con antecedente en relación al sitio sin antecedente independientemente de que los datos refieren solo a la información de dos cortes .

Cuadro N° 15: Producción de forraje total y partición del mismo de acuerdo a tratamientos y antecedentes de *L. corniculatus*.

			U526	U531	U526 + U531	Testigo	P>F	DMS (α=0.05)	W Tukey (α=0.05)	Línea[1]	Voleo[1]	P>F	C.V (%)
con historia *	kg MS/há	T.rep.	402	515	934	484	>0.05	-	-	439	795	>0.05	105
		L.cornic.	114	118	94	83	>0.05	-	-	88	129	>0.05	72
		L.ulig.	369 ab	627 a	558 ab	237 b	<0.05	269.76	361.56	552	584	>0.05	58
		otras sps	7361	6831	6799	6841	>0.05	-	-	7008	6986	>0.05	18
		Total	8246	8091	8385	7645	>0.05	-	-	7987	8496	>0.05	11
	%	L.ulig.	4.4 ab	7.7 a	6.7 ab	3.1 b	<0.05	-	-	5.8	7.0	>0.05	32
sin historia	kg MS/há	L.ulig.	950 a	813 a	909 a	268 b	<0.001	307.64	412.34	940	842	>0.05	40
		otras sps	1708	1638	1701	1878	>0.05	-	-	1548	1817	>0.05	18
		Total	2658 a	2451 ab	2610 a	2146 b	<0.05	340.5	456.37	2488	2658	>0.05	13
	%	L.ulig.	36 a	33 a	35 a	12 b	<0.001	-	-	38	31	>0.05	23

* información relativa a éste sitio refiere solo a dos cortes

[1] promedio de tratamientos inoculados

Para ambos sitios los cortes acumulados muestran una respuesta significativa de *L. uliginosus* a la inoculación, tanto en producción de forraje como en contribución relativa (Anexo Nº 4 secciones 8. y 9.). El sitio con historia presentó una producción de *L. uliginosus* de 518 kg MS/há promediando los tratamientos inoculados y de 237 kg MS/há para los no inoculados (P<0.05). De la misma manera en la contribución de *L. uliginosus* los tratamientos inoculados superaron al testigo con una P<0.01 (6.3 y 3.1 %). Estos parámetros son mucho más elocuentes en el sitio sin historia (891 y 268 kg MS/há; 35 y 12 %), siendo la respuesta significativa con una P<.0.001 (Cuadro Nº 15 y Figura N° 13).

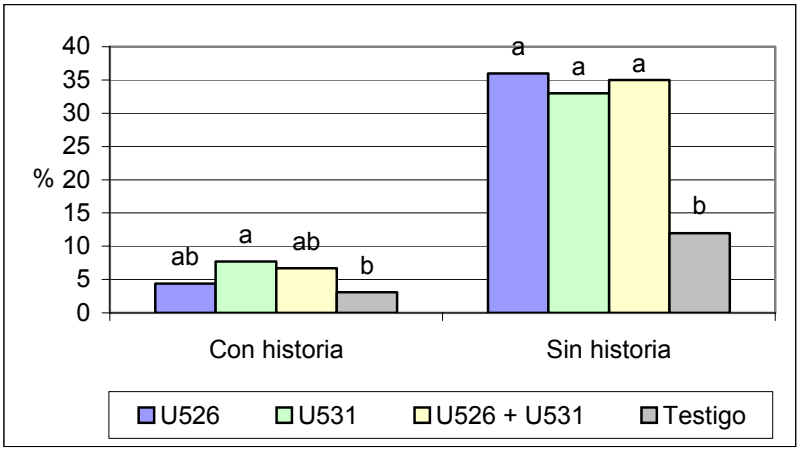


Figura N° 13: Respuesta a la inoculación en la contribución de *L. uliginosus* para ambos sitios

Para ambos sitios no se observaron diferencias significativas entre cepas, diferenciándose la cepa U531 del testigo en el sitio con antecedente de *Lotus corniculatus*.

Los datos no muestran diferencias entre la siembra en línea y al voleo.

4. 1. 3. 5 Evolución de la producción del *L. uliginosus* en los sucesivos cortes

En el sitio con historia de *L. corniculatus* la tasa de crecimiento diaria de *L. uliginosus,* desde la siembra hasta el primer corte resultó en 0.34 y 0.06 kgMS/há/día para los tratamientos inoculados y sin inocular respectivamente. Entre el segundo y el tercer corte, estas tasas fueron de 3.76 y 1.85 kgMS/há/día (Figura Nº 14).

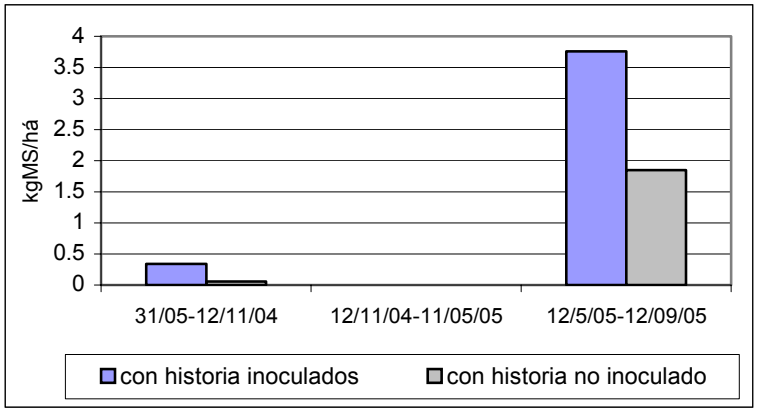


Figura N° 14: Evolución de la tasa de crecimiento de *L. uliginosus* en el sitio con antecedente de *L. corniculatus*

En el sitio sin historia de *L. corniculatus* las tasas de crecimiento de *L. uliginosus* para los tratamientos inoculados y no inoculados fueron hasta el primer corte 0.25 y 0.024 kg MS/há/día, entre el primero y el segundo corte 0.40 y 0.072 kg MS/há/día y entre el segundo y el tercero 6.42 y 1.70 kg MS/há/día respectivamente (Figura Nº 15).

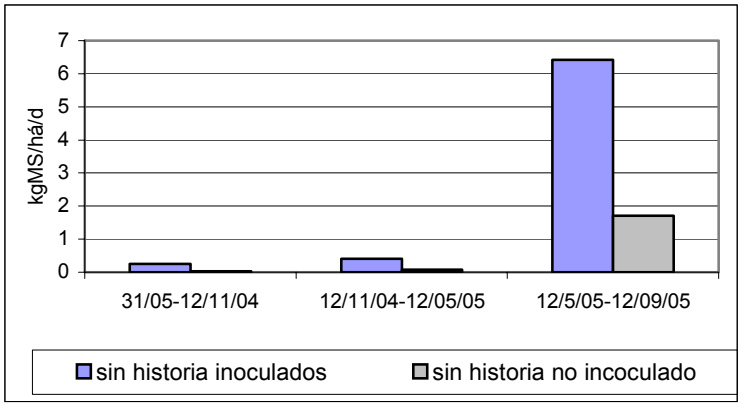


Figura N° 15: Evolución de la tasa de crecimiento de *L. uliginosus* en el sitio sin antecedente de *L. corniculatus*

Las tasas de crecimiento resultaron muy bajas durante el primer año, lo que confirma la lenta implantación de la especie. Estas tasas mejoran con la inoculación y fueron superiores en el sitio sin historia excepto en el primer corte.

4. 2 EVALUACIÓN DE CEPAS EN INVERNÁCULO

4. 2. 1 Caracterización de cepas y aislamientos

La caracterización de cepas y aislamientos consistió en la determinación de sus tasas de crecimiento mediante la observación de viraje del indicador en medio M-79 con azul de bromotimol pH = 6.8 (Anexo N° 2 sección 1. y Cuadro N° 16).

Cuadro Nº 16.: Caracterización de cepas y aislamientos de rizobios utilizados y recuento de viables en placas de las suspensiones empleadas en la formulación de los inoculantes

Cepa	Viraje del indicador	Tasa de crecimiento	Crecimiento en M-79 con púrpura de bromocresol	N° rizobios/mL *10^9
U525	Azul	Lento	Ausencia	12. 0
U526	Azul	Lento	Ausencia	6. 3
U534	Azul	Lento	Ausencia	14. 0
U531	Azul	Lento	Ausencia	12. 0
EB7	Azul	Lento	Ausencia	12. 0
U529	Azul	Lento	Ausencia	2. 2
ME190	Azul	Lento	Ausencia	11. 0
G627	Azul	Lento	Ausencia	8. 8
LC627	Azul	Lento	Ausencia	13. 0
PP5	Azul	Lento	Ausencia	0. 6
EB75	Azul	Lento	Ausencia	1. 5
MM305	Amarillo	Rápido	Ausencia	8. 3
GMI6	Amarillo	Rápido	Ausencia	3. 7
U510	Amarillo	Rápido	Ausencia	3. 6
LC1	Amarillo	Rápido	Ausencia	1. 4

Nº rizobios/mL, refieren a la media de dos repeticiones en la dilución -7

El método de caracterización utilizado permite distinguir entre cepas de crecimiento rápido y lento. Las cepas comerciales U526 y U531 presentaron crecimiento lento y producción de álcali, mientras que la U510 mostró crecimiento rápido y producción de ácido en medio M-79 lo cual coincide con los resultados de Fulchieri et al (2001) y Monza et al (1992). Sin embargo Jordan (1982, 1994) y Jarvis et al (1997), propusieron que las bacterias capaces de nodular especies del género *Lotus* incluyen cepas de crecimiento intermedio (*Mesorhizobium* loti) y de crecimiento lento (*Bradyrhizobium* sp). De ésta manera se infiere que las cepas y aislamientos clasificados como de crecimiento rápido, en realidad serían de crecimiento intermedio y por lo tanto pertenecerían al género *Mesorhizobium*. Correa et al (2001) y Lodeiro et al (2003) trabajando con la cepa U510 la definieron como de crecimiento

intermedio y clasificaron como *Mesorhizobium.* A su vez la cepa U529 (CC814s) de *Bradyrhizobium sp*. mostró crecimiento lento y produjo reacción alcalina en medio M-79.

Por otra parte los aislamientos provenientes de plantas de *L. uliginosus*, resultaron de crecimiento rápido (GMI6, MM305 y LC1) y lento (LC627, G627 y PP5). Sin embargo los aislamientos ME190, EB7 y EB75, obtenidos de plantas de *L. angustissimus, L. parviflorus* y *L. conimbricencis* respectivamente (INIA Glencoe), mostraron producción de álcali y crecimiento lento. El diámetro de las colonias para los aislamientos y cepas utilizadas, fue de 4 a 6 mm para el grupo de crecimiento rápido y de 0.5 a 1 mm para el de crecimiento lento. Lo que coincide con Wang y Martinez Romero (2004), quienes observaron que colonias de *Bradyrhizobium* varían dentro de estos rangos de diámetro de colonia.

4. 2. 2 Respuesta a la inoculación de *L. uliginosus* en cilindros de suelo sin historia de *L. corniculatus*

En los tres cortes y en los cortes acumulados el peso seco de parte aérea de *L. uliginosus* presentó diferencias significativas entre tratamientos con una $P<0.001$(Anexo Nº 5 sección 1. y Cuadro Nº 17).

Cuadro Nº 17: Producción de forraje y contribución de *L. uliginosus* en función de tratamientos de inoculación

Tratamiento	mg MS *L. uliginosus* /maceta				% *L.uliginosus***
	1°Corte*	2° Corte*	3° Corte*	Acumulado	
G627	156 a	438 a	504 a	1098 a (713)	37 (529)
ME190	104 ab	414 ab	309 bcd	827 ab (538)	32 (457)
U526	108 ab	311 abc	396 ab	815 ab (529)	28 (400)
PP5	68 bc	239 abcd	345 abc	650 ab (422)	23 (329)
U525	90 abc	229 abcd	293 bcd	612 abc (397)	21 (300)
U534	108 ab	328 abc	151 def	587 bc (381)	22 (314)
LC1	86 abc	283 abcd	206 cde	575 bcd (373)	23 (329)
U529	81 abc	201 abcd	269 bcd	551 bc (351)	18 (257)
LC627	62 bc	198 abcd	278 bcd	538 bc (349)	19 (271)
U531	64 bc	141 bcd	258 bcd	463 cd (300)	16 (229)
MM305	72 bc	208 abcd	143 def	423 bcd (274)	17 (243)
GMI6	35 bc	121 cd	265 bcd	421 bcd (273)	17 (243)
EB7	62 bc	204 abcd	142 def	408 bcd (264)	16 (229)
EB75	71 bc	184 acd	133 def	388 bcd (251)	16 (229)
Testigo	37 bc	60 cd	57 ef	154 cd (100)	7(100)
U510	17 c	12 d	9 f	38 d (25)	2 (29)
Promedio***	76	223	235	534	
C.V %	50	62	39	45	
DMS(α=0.05)	44.3	158.6	104.2	278.4	
W tukey(α=0.05)	78.7	281.9	185.3	494.9	

Medias de tratamiento, con igual letra dentro de cada corte no difieren significativamente según el test de Tukey(P<0.05)

*promedio en mg de 6 repeticiones por tratamiento

** contribución de *L.uliginosus* en la materia seca total acumulada

***promedio en mg de MS, de 96 soil cores

Datos entre paréntesis refieren al % de MS relativo al control sin inocular y al incremento en % de aporte de *L uliginosus* respecto al control

La información del cuadro N° 17 y la figura Nº 16 muestran una respuesta significativa (P<0.001) a la inoculación tanto en lo que respecta a la producción acumulada de *L. uliginosus* como a su porcentaje de contribución a la biomasa total (Anexo Nº 5 sección 3.).

Figura Nº 16: Respuesta a la inoculación de *L. uliginosus* (tomada en setiembre 2005)

Tal como era de esperar la cepa U510 tuvo un comportamiento parásito con rendimientos de forraje inferiores pero sin diferencias significativas al tratamiento sin inocular durante todo el experimento. Se destaca el comportamiento de los aislamientos G627, ME190, PP5 y el de la cepa comercial U526 con rendimientos de *L. uliginosus* que superaron en 7.13, 5.38, 4.22 y 5.29 veces respectivamente al control sin inocular, lo cual también se reflejó en el porcentaje de contribución del *L. uliginosus* (Figura N° 17). El peso seco de la parte aérea y la contribución de *L. uliginosus* presentaron una correlación de 0.9563 con un intervalo de confianza donde el límite inferior con 95 % de confianza es 0.93516 y el superior 0.97071. Estos resultados son una nueva indicación de la alta especificidad existente entre pares simbióticos.

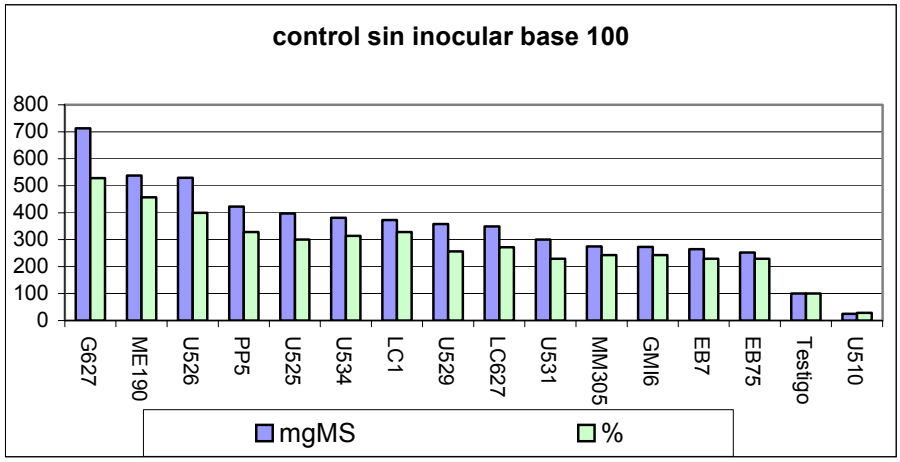


Figura N° 17: Producción de forraje y contribución de *L. uliginosus* en función de tratamientos de inoculación, relativo al control sin inocular

En el cuadro Nº 18 y en el Anexo Nº 4 sección 3, se observa que no hubo respuesta a la inoculación en la producción de otras especies. Esto podría ser consecuencia de la competencia ejercida por el *L. uliginosus* y a que la duración del experimento no fue suficiente como para que las gramíneas hicieran uso del N fijado por la leguminosa.

Cuadro N° 18: Producción de forraje de otras especies en función de tratamientos de inoculación

	mg MS de otras especies/maceta *			
Tratamiento	1° Corte	2° Corte	3° Corte	Acumulado
G627	561	546	795 b	1902 ab
ME190	462	574	733 b	1770 b
U526	527	639	981 ab	2147 ab
PP5	568	686	895 ab	2149 ab
U525	651	592	994 ab	2237 ab
U534	579	638	924 ab	2141 ab
LC1	550	558	761b	1869 ab
U529	583	742	1170 a	2495 a
LC627	574	662	1064 ab	2300 ab
U531	714	643	990 ab	2347 ab
MM305	498	678	852 ab	2028 ab
GMI6	529	628	958 ab	2115 ab
EB7	622	718	854 ab	2194 ab
EB75	472	653	918 ab	2043 ab
Testigo	513	574	834 ab	1921 ab
U510	564	532	774 b	1870 ab
C.V	27	19	19	17
DMS(α=0.05)	-	-	203.7	389.3
Wtukey(α=0.05)	-	-	362	692

Medias de tratamiento, con igual letra dentro de cada corte no difieren significativamente según el test de Tukey($P<0.05$)

*promedio en mg de 6 repeticiones por tratamiento

Los resultados obtenidos están de acuerdo con Castro et al (1993) quienes lograron aislamientos de *L. subbiflorus* y *L. uliginosus* superiores a la cepa comercial. Para culminar el proceso de selección y recomendar éstas cepas en la fabricación de inoculante comercial para *L. uliginosus* sería necesario probar la efectividad, adaptación y persistencia de las mismas en condiciones de campo, fundamentalmente en suelos con antecedentes de *L. corniculatus*. Parecería existir un conjunto de aislamientos con buena capacidad simbiótica en particular el G627 que sería bueno integrar al programa nacional de

evaluación de cepas para estudiar su potencial para la elaboración de inoculantes comerciales en diferentes suelos y localidades.

4. 2. 3 Respuesta a la inoculación de *L. uliginosus* en cilindros de suelo con historia de *L. corniculatus*

Se analizó el efecto de los tratamientos de inoculación sobre la producción de biomasa de *L. uliginosus* en cada corte, resultando no significativo para los tres cortes analizados. Sin embargo en el segundo corte, tercer corte y cortes acumulados, se observó una respuesta a la inoculación contrastando las cepas efectivas y el testigo sin inocular (Anexo Nº 5 sección 2. y cuadro Nº 19). En el cuadro Nº 19 se muestra el rendimiento de forraje de *L. uliginosus* obtenida en cada corte.

Cuadro Nº 19: Producción de forraje de *L. uliginosus* bajo distintos tratamientos de inoculación

	mg MS de *L. uliginosus*/maceta			
Tratamiento	1° corte*	2° corte*	3° corte*	Acumulado
U526	521	2031	1488	4040
U531	550	1923	1472	3994
U510	639	1819	1205	3662
U529	691	1723	1180	3598
Testigo	651	1506	1043	3200
Promedio **	610	1800	1278	3699
C.V %	34	17	24	17
P>F cepas efectivas/testigo	>0.05	<0.01	<0.05	<0.05

*promedio en mg de 6 repeticiones por tratamiento

**promedio en mg de MS, de 30 soil cores

Resulta difícil de explicar el comportamiento de la cepa parásita U510, en la producción de *L. uliginosus* en relación a los antecedentes de *L. corniculatus*. Sin embargo esto podría explicarse por la fertilidad residual derivada de la historia de mejoramiento, la ausencia de gramíneas y la mayor tasa de mineralización de N que puede ocurrir en condiciones de invernáculo.

4. 3 EVALUACIÓN DE CEPAS EN CAMARA DE CRECIMIENTO DE PLANTAS

4. 3. 1 Eficiencia de cepas en *L. corniculatus*

Se utilizaron las cepas recomendadas para *L. uliginosus* y aislamientos con mejor comportamiento en el primer corte del ensayo de invernáculo en cilindros de suelo sin historia. Adicionalmente se utilizó la cepa comercial U510 y el aislamiento LC1 dado su crecimiento rápido en medio M-79. El objetivo consistió en estudiar más profundamente las relaciones de especificidad entre especies del mismo género. Los resultados se presentan en el cuadro N° 20.

Las concentraciones reales determinadas mediante recuento de viables se ubicaron en un rango de 0.3 a 6 $x10^8$ rizobios/mL.

Cuadro N° 20: Biomasa de parte aérea de *L .corniculatus* e índice de eficiencia relativo de acuerdo al tratamiento de inoculación (cepas de *L. uliginosus*)

Tratamiento	mg MS/tubo *	IER %
U510	19.0 b	54
LC1	12.0 c	18
U531	9.6 dc	6
G627	8.5 d	0
ME190	8.6 d	1
U526	8.1 d	-1
U534	7.2 d	-6
U529	7.8 d	-3
Control sin N	8.4 d	0
Control con N	27.9 a	100

* promedio de 9 repeticiones

C.V = 18 %

DMS (α=0.05) = 2.066, W tukey (α=0.05) = 3.3843

Los datos del cuadro Nº 20 muestran diferencias significativas entre tratamientos de inoculación con una P<0.001 (Anexo 6 sección 1.). La cepa comercial U510 es la cepa de mejor comportamiento mientras que el conjunto de cepas efectivas en *L. uliginosus* resultaron con índice de eficiencia relativo cercanos o inferiores al control sin inocular. Esto está de acuerdo con trabajos anteriores que demuestran la alta especificidad interespecífica entre cepas de rizobios y especies del género lo cual se observa en la figura Nº 18. El aislamiento LC1 de crecimiento rápido fue el único que presentó nodulación efectiva, aunque el IER resultó muy bajo.

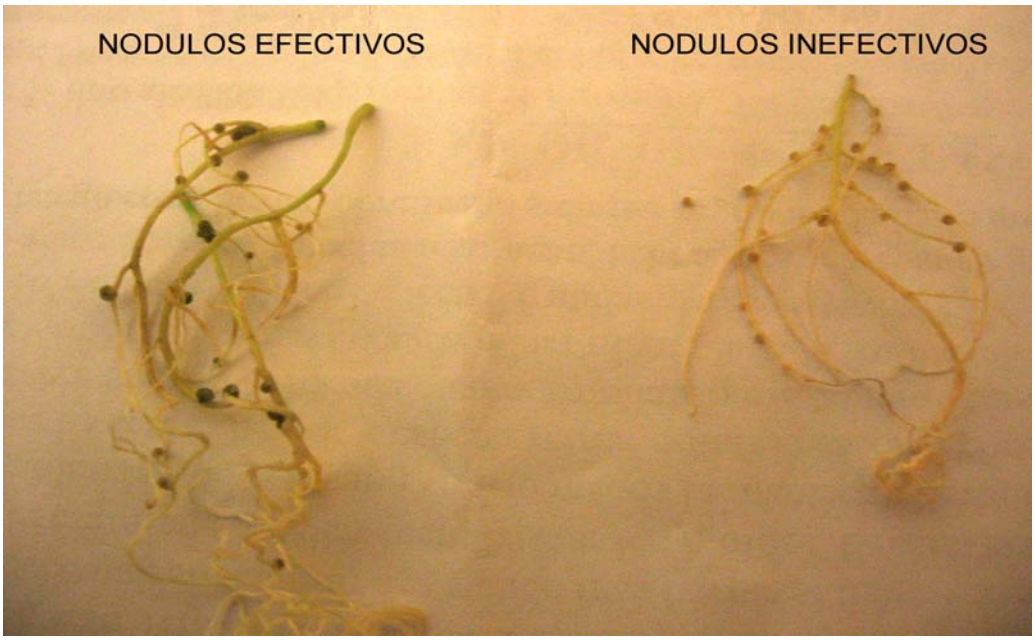


Figura Nº 18: Nódulos efectivos e inefectivos en raíces de *Lotus corniculatus* a los 56 días de instalado el ensayo

4. 3. 2 Competencia de cepas para la formación de nódulos

El cuadro Nº 21 muestra la concentración de las suspensiones de las cepas puras y de las mezclas de cada una de ellas con la cepa inefectiva U510, a los efectos de la determinación de la habilidad competitiva. Asimismo, se presentan las relaciones reales en cada caso particular. Los estudios de competencia se realizaron con relaciones inóculo de cepa inefectiva a efectiva del siguiente orden de magnitud 10:1 y 1000:1.

Cuadro N° 21: Concentraciones y relaciones cuantitativas observadas entre la cepa parásita U510 (*Lotus corniculatus*) y las cepas efectivas

Tratamiento	Concentración/mL**	Relación observada cepa inefectiva : cepa efectiva
U510	5×10^6	1 : 0
U526	2×10^6	0 : 1
U529	0.6×10^6	0 : 1
U531	1.4×10^6	0 : 1
U510 : U526	$5 \times 10^6 : 2 \times 10^5$ $5 \times 10^6 : 2 \times 10^3$	25 : 1 2500 : 1
U510 : U529	$5 \times 10^6 : 6 \times 10^5$ $5 \times 10^6 : 0.6 \times 10^3$	83 : 1 8300 : 1
U510 : U531	$5 \times 10^6 : 1.4 \times 10^5$ $5 \times 10^6 : 1.4 \times 10^3$	36 : 1 3600 : 1
Control c/N *		
Control s/N		

* se aplicó 1ml de KNO_3

** concentraciones determinadas por recuento de viables en placas

Los tratamientos tuvieron un efecto significativo ($P<0.001$) sobre el peso de parte aérea y raíz de *L. uliginosus* (Anexo Nº 6 sección 2. y cuadros Nº 22 y 23).

Para comparar la eficiencia simbiótica de las cepas puras, respecto a sus mezclas con la cepa parásita, se expone el siguiente cuadro:

Cuadro N° 22: Eficiencia simbiótica de las cepas comerciales puras y en competencia con la cepa inefectiva

Tratamiento	Relación esperada cepa inefectiva : cepa efectiva	mg MS PA/ tubo **	Rend. relativo a U526
U510	1 : 0	6.0 g	28
U526	0 : 1	21.4 bc	100
U529	0 : 1	25.1 b	117
U531	0 : 1	18.5 cd	86
U510 : U526	10 : 1	24.7 b	115
	1000 : 1	17.0 d	79
U510 : U529	10 : 1	15.4 ed	72
	1000 : 1	16.2 d	76
U510 : U531	10 : 1	15.6 ed	73
	1000 : 1	11.4 ef	53
Control c/N*		45.9 a	214
Control s/N		7.5 gf	35

*1 ml de KNO3 a los 10 días de instalado el ensayo

** promedio de 6 unidades experimentales

C.V = 19.7 %

DMS (α=0.05) = 4.3

Realizando un análisis individual del comportamiento de cada cepa efectiva en presencia de la cepa parásita, se observó que las cepas U526 y U531 en condiciones extremas de competencia disminuyeron su rendimiento en 21 y 38 % respectivamente. La cepa U529 deprimió su eficiencia simbiótica en un 39% ya en bajas concentraciones de la cepa parásita.

El efecto de la competencia de la cepa parásita en el peso seco de la raíz no fue significativo para ninguna de las cepas evaluadas (Anexo Nº 6 sección 2. y cuadro Nº 23). Las cepas efectivas mantuvieron su habilidad para producir nódulos en competencia con la cepa parásita aún en condiciones extremas.

Cuadro N° 23: Eficiencia simbiótica de las cepas comerciales puras y en competencia con la cepa inefectiva

Tratamiento	Relación esperada cepa inefectiva : cepa efectiva	mg MS raíz/ tubo**	Rend. relativo a U526
U510	1 : 0	4.1 bc	80
U526	0 : 1	5.1 bc	100
U529	0 : 1	7.8 b	153
U531	0 : 1	6.9 b	135
U510 : U526	10 : 1	5.7 b	112
	1000 : 1	4.7 bc	92
U510 : U529	10 : 1	5.2 bc	102
	1000 : 1	6.6 b	129
U510 : U531	10 : 1	7.6 b	149
	1000 : 1	6.3 b	124
Control c/N		29.2 a	573
Control s/N		1.5 c	29

** promedio de 6 unidades experimentales

C.V = 44%

DMS (α=0.05) = 3.8

En resumen, en presencia de la cepa parásita las tres cepas efectivas, disminuyeron su eficiencia, siendo la cepa comercial U526 la menos sensible a la competencia. Estos resultados están de acuerdo con Labandera y Vincent (1975); Robinson (1969) y Marques Pinto et al (1974), quienes encontraron que cepas efectivas fueron más competitivas que las inefectivas en la formación de nódulos. Sin embargo en éste trabajo queda demostrado adicionalmente que cepas efectivas en *L. uliginosus* tuvieron diferente respuesta frente a la cepa parásita.

Integrando los resultados obtenidos en los diferentes experimentos, a continuación se sintetizan los aspectos considerados más relevantes. En todos los experimentos se observó una respuesta a la inoculación de *L. uliginosus* excepto en el suelo con historia de *Lotus corniculatus* en condiciones de

invernáculo. Esta respuesta fue observada en producción de forraje y porcentaje de *Lotus uliginosus.* Si bien en los tratamientos inoculados también se esperaría una mayor producción de forraje total derivado de la incorporación de N al sistema, la escasa duración del experimento no permitió sacar conclusiones al respecto. En la etapa de implantación estimaciones del vigor de plántulas y del estado de la nodulación dan una idea temprana del comportamiento entre tratamientos inoculados y sin inocular pero no fueron una buena herramienta para discriminar entre cepas.

En el experimento de parcelas a campo no se pudieron establecer comparaciones estrictas entre los sitios con y sin antecedente de *Lotus corniculatus* dada la diferencia en manejos anteriores. Pese a ello, en el sitio con historia la implantación de *L. uliginosus* fue más lenta principalmente por efecto de la competencia de *T. repens* y *Lolium multiflorum* provenientes del banco de semillas y posiblemente por la presencia de cepas de rizobios parásitas en alta concentración. En ésta última situación se destaca la necesidad de una correcta inoculación para evitar fracasos en la implantación. El efecto de competencia ejercida por la cepa parásita se pudo demostrar en condiciones controladas.

El método de siembra no afectó la producción acumulada de *Lotus uliginosus*. Sin embargo en el sitio sin historia la siembra en línea tuvo un efecto importante en la implantación y en producción inicial presentando mayor número de plántulas verdes y mejor producción en el 2º corte respectivamente. En el sitio con historia la siembra al voleo presentó mejor nodulación y producción de *Lotus uliginosus* en el primer corte respecto a la siembra línea, este comportamiento fue inverso a lo esperado dado que la mayor concentración de inoculante en la línea de siembra permitiría una mayor

capacidad competitiva frente a altas concentraciones de la cepa parásita en el suelo.

En el sitio con historia la cepa U531 es el único tratamiento que se diferencia del testigo sin inocular lo cual sugiere que podrían existir interacciones cepa x antecedente relacionadas a diferentes capacidades competitivas en presencia y ausencia de la cepa parásita. En tal sentido sería importante partir de una situación común y aplicar un diseño de parcelas divididas o líneas cruzadas. En estas situaciones además de la producción de forraje de *Lotus uliginosus* seria interesante estimar la habilidad competitiva de las cepas mediante técnicas que permitan detectar la ocupación nodular.

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

1. El sitio con antecedentes de *Lotus corniculatus* mostró una mayor expresión en la producción de materia seca total. Esto se debió fundamentalmente al aporte de *Lolium multiflorum* y de las leguminosas introducidas *T. repens* y *L. corniculatus*. Consecuentemente el sitio con antecedentes resultó un ambiente competitivo para el establecimiento de *L uliginosus.*

2. Se encontró una respuesta a la inoculación en la producción y contribución relativa de *L. uliginousus*. En el sitio con y sin antecedente de *L. corniculatus* los tratamientos inoculados duplicaron y triplicaron al testigo sin inocular respectivamente.

3. No se encontraron diferencias entre la siembra en línea y al voleo en la producción acumulada de *L. uliginosus,* para todos los tratamientos en su conjunto.

4. En condiciones de invernáculo también existió una respuesta a la inoculación en la producción y contribución relativa de *L. uliginosus*, con diferencias muy marcadas entre cepas y aislamientos. Se obtuvo un grupo promisorio de cepas y aislamientos destacándose el aislamiento G627 con comportamiento superior a la cepa comercial U526. La cepa U510 mostró una performance inferior al control sin inocular durante todo el experimento, evidenciando su comportamiento parásito.

5. En condiciones controladas de cámara de crecimiento la cepa parásita confirmó la relación de especificidad entre géneros de *Lotus*.

6. La presencia de la cepa parásita junto a las cepas efectivas U529, U526 y U531 provocó una caída en peso seco de parte aérea, siendo la cepa comercial U526 la de mayor habilidad competitiva.

En resumen, los resultados claramente indican que es posible introducir *L. uliginosus* inoculado aún en condiciones con antecedentes de *Lotus corniculatus*. En éstos casos habría que extremar todos los factores culturales involucrados (evitar siembras con fertilizantes de reacción ácida, evitar un período prolongado entre inoculación y siembra, utilizar una concentración adecuada de rizobios en el inoculante, controlar el tapiz, etc).

Se abre la posibilidad de profundizar en estudios de prospección, evaluación y selección de cepas, con el objetivo de desarrollar inoculantes con cepas más eficientes y competitivas.

6. RESUMEN

Se evaluó la respuesta a la inoculación de *Lotus uliginosus* cv Maku y las interacciones entre las cepas utilizadas en los inoculantes comerciales y las poblaciones nativas y/o naturalizadas de rizobios. Se evaluaron 4 alternativas de inoculación (U526, U531, U526 + U531 y control sin inocular) y dos métodos de siembra (línea y voleo) en sitios contiguos, con y sin antecedentes de *Lotus corniculatus*.

Existió una respuesta a la inoculación en la producción y contribución relativa de *L. uliginosus*, siendo más marcada en el sitio sin antecedentes. Esto se explica por la competencia ejercida por el tapiz y la población de rizobios naturalizada debido a la historia de mejoramiento en el sitio con antecedentes. La cepa nativa U531 se diferenció del testigo sin inocular en el sitio con antecedentes. No se encontraron diferencias entre los métodos de siembra en la producción acumulada de *L. uliginosus.*

Paralelamente se evaluó el comportamiento en invernáculo de diferentes cepas y aislamientos de rizobios en *Lotus uliginosus* cv Maku, en cilindros de suelo con y sin antecedentes de *Lotus corniculatus.* Las cepas y aislamientos asignados para los cilindros de suelo sin antecedentes fueron: U510, U526, U531, U529, U525, U534 y EB7, EB75, ME190, LC627, PP5, GMI6, LC1, G627 y MM305 respectivamente; asignándose las 4 primeras cepas a los cilindros de suelo con antecedentes.

Existió una respuesta a la inoculación con diferencias muy marcadas entre cepas y aislamientos, destacándose el comportamiento de un grupo promisorio, en especial el del aislamiento (G627) superior al de la cepa comercial (U526).

Con la cepa y aislamientos promisorios en *Lotus uliginosus* se inocularon plántulas de *Lotus corniculatus* creciendo en tubos con medio libre de nitrógeno (Jensen, 1942), demostrándose la alta especificidad interespecífica entre cepas de rizobios y especies del género *Lotus.*

Se realizó un experimento en laboratorio para estudiar la competencia y habilidad competitiva de cepas efectivas de rizobios en *L. uliginosus* (U531, U526 y U529) en presencia de la cepa parásita U510 con relaciones 10:1 y 1000:1 de la cepa inefectiva a efectiva, para lo cual se utilizaron plántulas de *L. uliginosus* sembradas e inoculadas en tubos con medio libre de nitrógeno pH=7 (Jensen, 1942).

En presencia de la cepa parásita las cepas efectivas U529, U531 y U526 presentaron una caída en su eficiencia simbiótica, siendo la cepa comercial U526 menos sensible al efecto de la competencia.

7. BIBLIOGRAFIA

1. ACUÑA, H; HELLMAN, P; BARRIENTOS, L; FIGUEROA, M; DE LA FUENTE, A. 2004. Estimación de la fijación de nitrógeno en tres especies del género *Lotus* por el método de la dilución isotópica. Agro-ciencia 20(1):5-15.

2. AMES-GOTTFRED, N.P; CHRISTIE, B.R 1989. Competition amongst strains of *Rhizobium leguminosarum* boivar *trifolii* and use of a Diallel analysis in assessing competition. Applied and Environmental Microbiology 55(6):1599-1604.

3. AYALA, W; BERMÚDEZ, R; FERRES, S. 2003. Lotus Maku: en los 90 una promesa hoy una firme realidad. Revista Plan Agropecuario N° 107: 46- 50.

4. BARAIBAR, A; FRIONI, L; GUEDES, M.E; LJUNGGREN, H. 1999. Symbiotic effectiveness and ecological characterization of indigenous *Rhizobium loti* populations in Uruguay. Pesquisa Agropecuária Brasileira 34(6):1011-1017.

5. BARRIENTOS,L; HIGUERA,M; ACUÑA,H; GUERRERO,J; ORTEGA, F; SEGUEL,I. 2002. Symbiotic effectiveness of indigenous strains of *Mesorhizobium* loti and *Bradyrhizobium* sp. in three lotus plants species. Agricultura Técnica 62(2):226-236.

6. BERGEY´S MANUAL OF SISTEMATYC BACTERIOLOGY. 2005. The proteobacteria. George Garrity 2da edición vol II: 2815p.

7. BORSANI, O; DIAZ, P; URRESTARAZU, H. 1997. Diferentes métodos para la determinación de la actividad nitrato reductasa en tejidos de *Lotus* sp. Agrociencia 1 (1):50-54.

8. BROCKWELL, J; HELY, F.W; NEAL-SMITH, C.A.1966. Some symbiotic characteristics of rhizobia responsible for spontaneous, effective field nodulation of *Lotus hispidus*. Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry 6:365-370.

9. BROCKWELL, J; HEBB, M.D; KELLMAN, M.1994. Symbiotaxonomy of Lotus species and symbiotically related plants and of the root-nodule bacteria. In: Beuselinck, P. R and Robert, C. A, ed, Proceedings of the First International *Lotus* Symposium. Columbia, MO University Extension, University of Missouri-Columbia, 30-35.

10. BROSE, E. 1992. Seleção de rizobio para *L. pedunculatus* em solo acido. Pesquisa Agropecuária Brasileira 27(3):409-415.

11. BROWN, P.D; AHMAD, M.H.1996 Competitive interaction among strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli in the nodulation of kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). Biology and Fertility of Soils 21(1-2):7-9.

12. BURTON, J.C; CURLEY, R.L. 1975. Compatibility of *Rhizobium japonicum* with chemical seed protectans. Agronomy Journal 67:807-808.

13. BURTON, J.C. 1985. *Rhizobium* relationships. Chapter 5, pp.161-184 in Taylor, N.L. (Editor).

14. CARÁMBULA, M. 1977. Producción y manejo de pasturas sembradas. Montevideo, Ed. Hemisferio Sur 463 p.

15. _____. AYALA, W; CARRIQUIRY, E.1994. Lotus pedunculatus: Adelantos sobre una forrajera que promete. INIA Treinta y Tres. Serie Técnica 45,13p.

16. _____. 2002. Pasturas y forrajes: Potencial y alternativas para producir forraje. Montevideo, Ed. Hemisferio Sur 357 p.

17. CASTRO, S; RUSSEL, H; BARAIBAR, A.1996. Evaluación de cepas e inoculantes para diferentes especies del género *Lotus.* In XVIII Reunión Latinoamericana de *Rhizobium*. Bolivia. Asociación Latinoamericana de Rhizobiología p 457-460.

18. CORREA, O; ARANDA, A; BARNEIX, A.2001. Effects of ph on growth and nodulation of two forage legumes. Journal of Plant Nutrition. 24(9):1367-1375.

19. CHUA, K.Y; PANKHURST, C.E; MC DONALD, P.E; HOPCROFT, D.H; JARVIS, B.D; SCOTT, D.B. 1985. Isolation and characterization of transposon Tn5 induced symbiotic mutants of *Rhizobium* loti. Journal of Bacteriology 162:335-343.

20. DEL PINO, A; HERNÁNDEZ, J. 2002. Ciclaje de fósforo por animales bajo pastoreo en campo natural y mejoramientos con leguminosas sobre suelos de basalto. Agrociencia 6(2):47-52.

21. DOWLING, D.N; BROUGHTON, W.J. 1986. Competition for nodulation of legumes. Annual Review Microbiology 40:131-157.

22. DUTTO, P; LABANDERA, C. 1996. Selección de cepas para *Lotus subbiflorus*. In XVIII Reunión Latinoamericana de *Rhizobium*. Bolivia. Asociación Latinoamericana de Rhizobiología. p 467-468.

23. _____. PEREZ, E. 1998. Inoculación de Lotus. Revista Plan Agropecuario N° 82 :32-33

24. _____.2002. Inoculación de leguminosas. Revista Plan agropecuario N°102: 54-57

25. EGLI, M.A; GRIFFITH, S.M; MILLER, S.S; ANDERSON, M. P; VANCE, C.P.1989. Nitrogen assimilating enzyme activities and enzyme protein during development and senescence of effective and plant gene-controle ineffective alfalfa nodules. Plant Physiology 91:898-904.

26. FABIANO, E; ARIAS, A., 1990. Identification of inoculant strains and naturalized populations of *Rhizobium leguminosarum bv. Trifolii* using complementary methodologies. World Journal of Microbiolgy and Biotechnology 6:121-127.

27. FERREIRA, M.E; GRATTAPAGLIA, E. 1996. Introdução ao uso de Marcadores Moleculares em analise genetico (Documento 20). 2ª Ed./EMBRAPA, 220 p, Centro de Recursos Genéticos y Biotecnología, Brasilia, Brasil.

28. FRANCO, A.A; VINCENT, J.M. 1976. Competition amongst rhizobial strains for the colonization and nodulation of two tropical legumes. Plant and Soil 45: 27-48.

29. _____. MUNNS, D.N. 1981. Soil constraints to legume production. In Grahaman P. H. and Harris S.C (eds). Biology nitrogen fixation technology for tropical agriculture CIAT Cali, Colombia. pp 173-182

30. FREIRE, J.R.J; KOLLING, J; VIDOR, C; PEREIRA, J.S; KOLLING, I.G; MENDES, N.G 1983. Sobrevivência e competição por sitios de nodulação de estirpes de *Rhizobium japonicum* na cultura da soja. Revista Brasileira de Ciência do Solo, 7:47-53.

31. FULCHIERI, M; ESTRELLA, M; IGLESIAS, A.2001. Characterization of *Rhizobium loti* strains native from the Salado River Basin. Studies on symbiotic potential. http://www.psu.missouri.edu/lnl/v30/fulchieri.htm

32. GAULT, R.R; PILKA, D.M; BROCKWELL, J. 1994. Nodulation studies on legumes exotic to Australia: symbiotic relationships between *Chamaecytisus palmensis* (tagaste) and *Lotus* spp. Australian Journal of Experimental Agriculture 34:385-394.

33. GIBSON, A.H; DATE, R.A; IRELAND, J.A; BROCKWELL, J. 1976. A comparision of competitiveness and persistence amongst five strains of *Rhizobium trifolii*. Soil Biology & Biochemistry 8: 395-401.

34. GONNET, S; DIAZ, P; BORSANI, O. 1998. Fijación y asimilación de nitrógeno en nódulos de *Lotus corniculatus.* Agro-ciencia II(1):84-88.

35. GREGERSON, R.G; ROBINSON, D.L; VANCE, C.P.1999.Carbon and Nitrogen Metabolism in *Lotus.* In: P.R Beuselinck (ed.) Trefoil: The Science and

Technology of Lotus.p:167-185. CSSA Special Publication N° 28. Am. Soc. Agron/ Crop. Sci.Soc.Am Madison, Wis, USA.

36. GUSS, A; DöBEREINER, J.1972. Efeito da adubacão nitrogenada e da temperatura do solo na fixação do nitrogênio em Feijão. Pesquisa Agropecuaria Brasileira. Série Agronômica 7:87-92.

37. HAFEES, Z; NAEEM, F; ASHRAF, M; MALIK, K.2004.Competitiveness of intoduced strains for nodulation in fodder legumes. Pakistan Journal of Botany 36 (1):159-166.

38. HAFEEZ, F.Y; SHAH, N.H; HUSSAIN, A; MALIK, K.A. 1996. Influence of seasonal variation on the indigenous population of Rhizobium leguminosarum and competitive ability of introduced rizobia in lentil. Lens Newsletter 23 (1/2):32-37.

39. HALF, C.N. 1976. Some factors affecting the survival of *Rhizobium trifolii* on white clover. Proceedings New Zeland Grassland Association 38:182-186.

40. HIRSCH, A.M; GOLDBERG, R.B; RHIJN, P.1998. *Lotus corniculatus* nodulation specificity is change by the presence of a soybean lectin gene. Plant Cell 10(8): 1233-1249.

41. _____.1999. Role of lectins (and rhizobial exopolisaccharides) in legume nodulation. Current opinion in Plant Biology 2(4): 320-326.

42. IRISARRI, P; SOTELO, M.1996. Competencia por la nodulación entre cepas de *Rhizobium loti*. In XVIII Reunión Latinoamericana de *Rhizobium*. Bolivia. Asociación Latinoamericana de Rhizobiología. p 333-334.

43. _____.1997. Un plásmido de rhizobium loti involucrado en la competencia por la nodulación. Agrociencia 1(1):44-49.

44. JARVIS, B.D.W., PANKHURST, C.E. and PATEL J.J. 1982 *Rhizobium loti* a a new species of legume root nodule bacteria. International Journal of Systematic Bacteriology 32: 378-380.

45. _____. VAN BERKUM, P; CHEN, W. X; NOUR, S. M; FERNANDEZ, M. P; CLEYET-MAREL, J. C; GILLIS, M. 1997. Transfer of *Rhizobium loti, Rhizobium huakuii, Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. International Journal of Systematic Bacteriology 47:895-898.

46. JONES, D.G; BROMFIELD, E.S.P 1978. Study of the competitive ability of streptomycin and spectinomycin mutants of *Rhizobium trifolii* . Annals of Applied Biology. 92:221-228.

47. _____. BROMFIELD, E.S.P 1980. Studies on double strain occupancy of nodules and the competitive ability on Rhizobium trifolii on red and white clover grown in soil an agar. Ann. Appl. Biol. 94:51-59.

48. _____. 1982. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchananm 1980 to *Bradyrhizobium japonicum* gen. Nov., genus of slow growing root nodule bateria. Intternational Journal of Systematic Bacteriology 32:378-380.

49. _____. 1994. Group IV. Gram-negative aerobic/microaerophilic rods and cocci. In John G. Holt *et al*. (eds.) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. Williams and Wilkins, Baltimore, USA. p. 71-174.

50. KAO, T.C; WANG, C.C.1981.Effect of herbicides on growth of rhizobia and development of root nodules. Journal of the Agriculture Association of China (New Series) 114:61-72.

51. KREMER, R.J; PETERSON, H.L .1982. Effect of inoculant carrier on survival of Rhizobium on inoculated seed. Soil Science 134(2):117-125.

52. LONG S. 1989. Rhizobium-legume nodulation: Life together in the underground. Cell 56: 203-214.

53. LABANDERA, C.A; VINCENT, J.M. 1975. Competition between and introduced strain and native Uruguayan strains of *Rhizobium trifolii.* Plant and Soil 42(2):327-347.

54. _____. BARAIBAR, A; MILIAN, A. 1982. Caracteres culturales y simbióticos de cepas de *Rhizobium* de interés comercial. In XI Reunión Latinoamericana de *Rhizobium* (11, 1982, Lima) 1982. Anales. Lima, Perú. Asociación Latinoamericana de Rhizobiología. p 19-25.

55. _____. 1988. Fijación Biológica del Nitrógeno e Inoculación de Leguminosas. Jornada Técnica. Departamento de Microbiología de Suelos. MGAP. Uruguay.

56. _____. RUSSEL, H; PASTORINI, D; CURBELO, S. 1990. Comportamiento simbiótico de *L.subbiflorus spp. subbiflorus.* II Seminario Nacional de Campo Natural Tacuarembó. Ed. Hemisferio Sur. pp 271-275.

57. _____.1996. Aplicaciones agronómicas de la fijación biológica del nitrógeno en Uruguay: un enfoque. In XVIII Reunión Latinoamericana de *Rhizobium*. Bolivia. Asociación Latinoamericana de Rhizobiología. pp 353-365.

58. _____.2001. Aspectos rizobiológicos vinculados a la implantación y productividad de *Trifolium repens, Trifolium alexandrinum* y *Trifolium vesiculosum.* Informe final Proyecto FPTA 115.

59. _____. 2004. Enfoque rhizobiológico para mejorar la performance de leguminosas forrajeras promisorias para zonas ganaderas, con énfasis en la región de basalto. Departamento de Microbiología de suelos, Montevideo, Uruguay. Informe final proyecto FPTA 97.

60. LEA, P.J; BLACKWELL, R; CHEN, F-L; HECHT, U. 1990. Enzyimes of ammonia assimilation. In Enzymes of Primary Metabolism.(ed) 257-276.

61. LIEVEN-ANTONIOU, C.A; WHITTAM, T.S. 1997. Specificity in the symbiotic association of *Lotus corniculatus* and *Rhizobium loti* from natural populations. Molecular Ecology 6:629-639.

62. LOCHNER, H; SRTIJDOM B.W; LAW, I.J 1989. Unaltered nodulation competitiveness of strain of *Bradyrhizobium* sp. (L*otus*) after a decade in soil. Applied and Environmental Microbiology 55(11):3000-3008.

63. LODEIRO, A. R; LOPEZ GARCIA, S. L; MONGIARDINI, E; QUELAS, J. I; PERTICARI, A. 2003. Los rizobios y la inoculación de las leguminosas para la fijación simbiótica de nitrógeno. In: Albanesi, A.; Anriquez, A.; Luna, S; Kunst, C y Ledesma, R. eds. Microbiología Agrícola. Un aporte de la investigación Argentina. Universidad Nacional de Santiago del Estero, pp 159-194.

64. LOWE, J. F; HOLDING, A. J. 1970. Influence of clover source and nutrient manganese concentrations on the Rhizobium/white clover association. p. 70-89. Ocasional Symposium Nº 6. In J. Lowe (ed.) White Clover Research. British Grassland Society.

65. MARQUEZ PINTO, C; YAO, P.Y; VINCENT, J., M. 1974. Nodulating competitiveness amongst strains of *Rhizobium melliloti* and *R. trifolii.* Australian Journal of Agricultural Research 25(2):317-329.

66. MARTINEZ de DRETS, G; ARIAS, A; ROVIRA de CUTINELA, M. 1974. Fast and slow growing rizobia: differences in sucrose utilization and invertase activity. Canadian Journal of Microbiology 20:605-609.

67. MASTER CLASS IN RHIZOBIUM TECHNOLOGY.2000. Montevideo, Tacuarembó. 78 p.

68. MIRANDA, C.H.B; SEIFFERT, N.F; SOUTO, S.M.1985. Especificidade e competitividae de estirpes de rhizobium em Centrosema sob condicões controladas. Pesquisa Agropecuaria Brasileira 20 (10):1157-1161.

69. MOËNNE-LOCCOZ, Y; SEN, D; KRAUSE, E. S; WEAVER, R. W. 1994. Plasmid profiles of *rhizobia* used in inoculants and isolated from clover fields. Agronomy Journal 86:117-121.

70. MONZA, J; FABIANO, E; ARIAS, A. 1992. Characterization of an indigenous population of *Rhizobia* nodulating *Lotus corniculatus*. Soil Biology & Biochemistry 24(3):241-247.

71. _____. DIAZ,P; BORSANI,O.1996.Utilización microaeróbica del nitrato por rizobios que nodulan especies del género *Lotus* sp. . In XVIII Reunión Latinoamericana de *Rhizobium*. Bolivia. Asociación Latinoamericana de Rhizobiología. pp , 237-238.

72. NORRIS, D. 1965. Acid production by *Rhizobium*: A unifying concept. Plant Soil 22:143-166.

73. O´HARA, G; YATES, R; HOWIESON, J; NANDASENA, K.2004.Root-nodule bacteria from indigenous in the north-west of Western Australia and their interaction with exoctic legume. Soil Biology & Biochemistry 36(8):1319-1329.

74. OTT, T; DONGEN, J; BOCK, V.2005. Symbiotic leghemoglobin are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. Current Biology 15(6):531-535.

75. PANKHURST, C.E. 1977. Symbiotic effectiveness o antibiotic resistant mutants of fast and slow growing strains of *Rhizobium* nodulating *Lotus* species. Canadian Journal Microbiology 23:1026-1033.

76. _____. JONES, W.T. 1979. Effectiveness of *Lotus* root nodules. Journal of Experimental Botany 30(119): 1095-1107.

77. _____. 1981. Effect of nutrient supply on nodule effectiveness and *Rhizobium* strain competition for nodulation of *Lotus pedunculatus.* Plant and Soil 60:325-339.

78. _____. BROUGTHON, W.J; WIENEKE, U. 1983. Transfer of a indigenous plasmid of Rhizobium loti two other rizhobia and Agrobacterium tumefaciens. Journal General Microbiology 129:2535-2543.

79. _____. LAYZELL, D.B. 1984. The effect of bacteria strain and temperature on the nitrogenasa activity of *Lotus pedunculatus* cv Maku roots nodules. Plant Physiology 62:404-409.

80. _____. WOOD, S.M; LAYZELL, D.B; NEWCOMB, W. 1985. A morphometric study of effective nodules induced by *Rhizobium loti* and *Bradyrhizobium* sp. *(Lotus)* on *Lotus pedunculatus.* Canadian Journal of Botany 63:43-53.

81. PARLE, J.N ; DOUGLAS, J.A ; BAILIE, T.S. 1973. The survival on seed on *Rhizobium meliloti* from commercial inoculants. Proceedings New Zeland Grassland Association 34:253-258.

82. PERES, R; VIDOR, C. 1980. Relação entre concentração de celulas no inoculante e competição por sitios de infecção nodular entre estirpes de *Rhizobium japonicum* em soja. Revista Brasileira Ciencia do Solo 4:139-143.

83. PERES, R., SUHET, R. e VARGAS, M. 1986. Sobrevivência de estirpes de *Rhizobium japonicum* na superficie de sementes de soja inoculadas. Pesquisa Agropecuária Brasileira 21 (5):489-493.

84. PEREZ, E; NOGUEIRA M. 1994. especificidad y competencia de cepas que nodulan *L.subbiflorus* y su identificación por inmunodot. Tesis Ing. Agr Montevideo Uruguay, Facultad de Agronomía 127p.

85. _____. LABANDERA, C.1996. Uso de la técnica inmunoblot en el control de calidad de inoculantes de *Lotus* spp. In XVIII Reunión Latinoamericana de *Rhizobium*. Bolivia. Asociación Latinoamericana de Rhizobiología. pp, 521-522.

86. _____. LABANDERA, C.1998. Especificidad simbiótica del género Lotus. In XIX Reunión Latinoamericana de *Rhizobium*. Maturín, Venezuela. Asociación Latinoamericana de Rhizobiología. pp,

87. REYNOLDS, P; BOLAND, M.J; BLEVINKS, D.G; SHUBERT, K.R; RANDALL, D.D 1982. Enzymes of amide and ureide biogenesis in developing soybean nodules. Plant Physiology 69:1334-1338.

88. ROBINSON, A.C.1969. Competition between effective and ineffective strains of *Rhizobium trifolii* in the nodulation of *Trifolium subterraneum*. Australian Journal of Agricultural Research 20(5):827-841.

89. RONSON, C.W; LOWTHER, W.L. 1996. Issues affecting the competitiveness of white clover rhizobia in New Zeland pastures. In: Special publication- Agronomy Society of New Zeland Abstracts 11:87-90.

90. ROSEMBERG, C; BOISTARD, P; DENARIE; CASSEDELBART, F. 1981. Genes controlling early and late function in symbiosis are located on a megaplasmid in *Rhizobium melliloti.* Molecular Gen. Genetic. 185: 326-333.

91. ROUGHLEY, R.J; BLOWES, W.M; HERRIDGE, D.F. 1976. Nodulation of *Trifolium subterraneum* by introduced rhizobia in competition with naturalized strains. Soil Biology & Biochemistry 8:403-407.

92. RUSCHEL, A; REUSZER, H.1973. Fatores que afetam a simbiose *Rhizobium phaseoli – Phaseolus vulgaris.* Pesquisa Agropecuaria Brasileira. Série Agronomica 8:287-292.

93. _____.1987. Efeito sazonal sobre o desenvolvimento e fixação biolõgica de nitrogênio de diferentes espêcies de *Azolla*. Pesquisa Agropecuaria Brasileira 22 (6):559-565.

94. RUSSELL, P.E; JONES, D.G. 1975. Variation in the selection of *Rhizobium trifolii* by varieties of red and white clover. Soil Biology & Biochemistry 7:15-18.

95. SADOWSKY, M.J. 2000. Competition for nodulation in the soybean-*Bradyrhizobium* symbiosis. In. Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for the analysis of a biological process. Triplett, E.W. ed. pp 279-293.

96. SAITO, S.M.T. 1982. Avaliação em campo da capacidade de fixação simbiótica de estirpes de *Rhizobium phaseoli.* . Pesquisa Agropecuaria Brasileira 17 (7):999-1006.

97. SAN JUAN, J; OLIVARES, J. 1989. Implications of *nifA* in regulations of genes located ona Rhizobium meliloti cryptic plasmids that affect nodulation efficiency. Journal Bacteriology 171:4154-4161.

98. SANCHEZ-YAÑEZ, J.M.1997. Inoculación de leguminosas con *Rhizobium*. http://www.monografias.com/trabajos16/rhizobium/rhizobium.shtml.

99. SELANDER, R.K; CAUGANT, D.A; OCHMAN, H; MUSSER, J.M; GILLMOUR, M.N; WHITTAM, T.S. 1986. Methods of multilocus enzyme

electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. Applied and Environmental Microbiology 51(5):873-884.

100. SHERWOOD, M.T; MASTERSON, C.L.1974. Importance of using the correct test host in assessing the effectiveness of indigenous populations of Rhizobium trifolii. Irish Journal Agricultural Research 13:101-110.

101. SOMASEGARAN, P; HOBEN, H.J.1985. Methods in legume-*Rhizobium* technology. University of Hawaii NifTtal (eds).USA. 367 p.

102. TEMPRANO, F; RODRIGUEZ-NAVARRO, D.N; ORIVE, R. 1991. Competencia por la nodulación entre estirpes de Rhizobium y su importancia agrícola. In Megías Gijo, M., Palomares Diaz, A.J y Ruiz Barranquero, F.eds. Aportaciones a la biología de la fijación del nitrógeno atmosférico. Sevilla. Secretariado de publicaciones de la Universidad de Sevilla. Cap. 27. pp 371-382.

103. THIES, J.D; SINGLETON, P.W; BOHLOOL B.B. 1991. Influence of the size of indigenous rizobial population on establishment and symbiotic performance of introduced rizobia on field-ground legumes. Applied and Environmental Microbiology 57(1):19-28.

104. VANCE, C; GRAHAM, P.1995.Nitrogen fixation in agriculture: application and perspective.10th International Congress on Nitrogen fixation, Russia.77-86.

105. VARGAS. M; MENDES, I; HUNGRIA, M. 2000. Response of field-grown bean to inoculation and nitrogen fertilization in two Cerrados soils. Biology and Fertility of Soils 32 (3):228-233.

106. VINCENT, J.M; DATE, R.A. 1962. Determination of the number of root nodule bacteria in the presence of the others organisms. Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry 2 (4):5-7.

107. _____. 1970. Manual práctico de Rizobiología. Carlos Batthyany trad. 1ª edición, Montevideo, Uruguay. Hemisferio Sur eds. 200 p.

108. WACEK, T.J.1994. *Rhizobium* species associated with *Lotus*. In Proccedings First International *Lotus* Symposium, Missouri. 1994. p. 22-24.

109. WANG, T; MARTINEZ ROMERO, J. 2004. La taxonomia de *Rhizobium*. http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_12/

110. WEBER, C.F; MILLER, V.L.1972. Effect of soil temperature on Rhizobium japonicum serogroup distribution in soybean nodules. Agronomy Journal 64:796-798.

111. WOOMER, P; GILLER.K; GEORGE, T; KAHINDI, J.H.P; de SOUZA MOREIRA, F.M; KARANJA, N.K.1997.Agricultural intensification, soil biodiversity and ecosystem function in the tropics: the role of nitrogen –fixing bacteria. Applied Soil Ecology 6(1):55-76.

112. YOUNG, J. P. W. 1996. Phylogeny and taxonomy of rhizobia. Plant Soil 186:45-52.

2. Análisis de suelos

	pH		%MO	ppm P	meq/100gr de muestra			
Antecedente	**H_2O**	**KCl**			**K**	**Ca**	**Mg**	**Na**
Con historia	5.3	4.4	2.9	6	0.24	5.3	1.7	0.24

	pH		%MO	ppm P	meq/100gr de muestra			
Antecedente	**H_2O**	**KCl**			**K**	**Ca**	**Mg**	**Na**
Sin historia	5.4	4.5	3.4	3	0.25	6	2.3	0.19

3. Número más probable (NMP) de rizobios en los suelos de ambos sitios experimentales

Mediante ésta técnica se estimó la población de rizobios presentes en ambos suelos a través de la formación de nódulos en plantas inoculadas con alícuotas de 1 mL de diluciones seriadas de la muestra de los suelos con y sin historia. En las condiciones establecidas para éste método se debe formar un nódulo en la planta hospedante si una célula de rizobio está presente en la alícuota (Vincent y Date, 1962).

Se utilizaron semillas de *Lotus uliginosus* cv Maku y de *Lotus corniculatus* cv San Gabriel escarificadas con papel lija 220 y esterilizadas superficialmente (Vincent, 1970). Posteriormente las semillas se esparcieron sobre placas conteniendo agar-agua al 0.8%, permaneciendo 48 horas en estufa a 28°C para favorecer la velocidad de germinación. Una vez pregerminadas las semillas, se seleccionaron aquellas que presentaron adecuada morfología y largo de radícula similar. Se sembraron dos semillas en cada tubo para planta de 200 mm x 25 mm, con 18 mL de medio Jensen pH=7 (sección 3. Anexo N° 2). Se procuró que las semillas quedaran ubicadas diametralmente opuestas y las radículas incluidas en el medio nutritivo.

Las plántulas se inocularon 7 días posteriores a la siembra con 1 mL de las diluciones seriadas (10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} y 10^{-6}) de las muestras de suelos. Para el huésped *Lotus corniculatus* se realizaron 4 repeticiones para cada dilución y para *Lotus uliginosus* cv Maku, se utilizaron 2 repeticiones. Finalmente los tubos se mantuvieron durante 45 días en cámara de crecimiento para plantas bajo condiciones controladas de luz (grolux de 40 watts), fotoperíodo (12 horas) y temperatura (20°C diurna y 18ºC nocturna).

Los resultados de NMP fueron determinados para las estaciones de otoño e invierno 2004 según la siguiente tabla de Fisher and Yates (1953) citado por Vincent y Date, (1962).

Tabla: Determinación del número más probable (NMP) por el método de dilución en plantas

Número de unidades positivas de 4 diluciones testeadas por		**NMP en la alícuota de la dilución más baja**
Duplicado	**Cuadruplicado**	
8	16	>700
	15	
7	14	690
	13	340
6	12	180
	11	100
5	10	59
	9	31
4	8	17
	7	10
3	6	5.8
	5	3.1
2	4	1.7
	3	1.0
1	2	0.58
0	1	<0.5
	0	

NMP por gramo del inoculante = (m x d) / (v x g), donde:
m= NMP de la tabla
v= volumen de la alícuota
d= menor dilución en las series
g= peso seco del inoculante en la dilución inicial
Factores aproximados por 95% Duplicado = 6 Cuadruplicado = 3.5

ANEXO N° 2

1. Extracto de Levadura Manitol Agar (M-79 Vincent, 1975)

K_2HPO_4	0.5 g/L
$MgSO_4.7H_2O$	0.2 g/L
NaCl	0.1 g/L
Manitol	10 g/L
Extracto de levadura	0.4 g/L
Agua destilada	csp 1L
Agar	15 g/L

pH=6.8

*Colorante azul de bromotimol

Solución alcohólica al 0.5% m/v

*Colorante Rojo Congo

10cc/L de una solución acuosa al 0.25% m/v

2. Agar glucosa peptona con púrpura de bromocresol (Somasegaran y Hoben, 1985)

Glucosa	5 g/L
Peptona	10 g/L
Agua destilada	1 L
Agar	15 g/L

pH a 6.8

*Colorante Púrpura de bromocresol

Solución alcoholica al 1% m/v

3. Medio de cultivo libre de Nitrógeno para plantas (Jensen, 1942)

$CaHPO_4$ ……	1 g/L
K_2HPO_4 ……	0.2 g/L
$MgSO_4.7H_2O$ ……	0.2 g/L
NaCl ……	0.2 g/L
$FeCl_3$ ……	0.01 g/L
Agua destilada ……	1 L
Agar ……	8 g/L

Solución de micronutrientes 1ml /L*

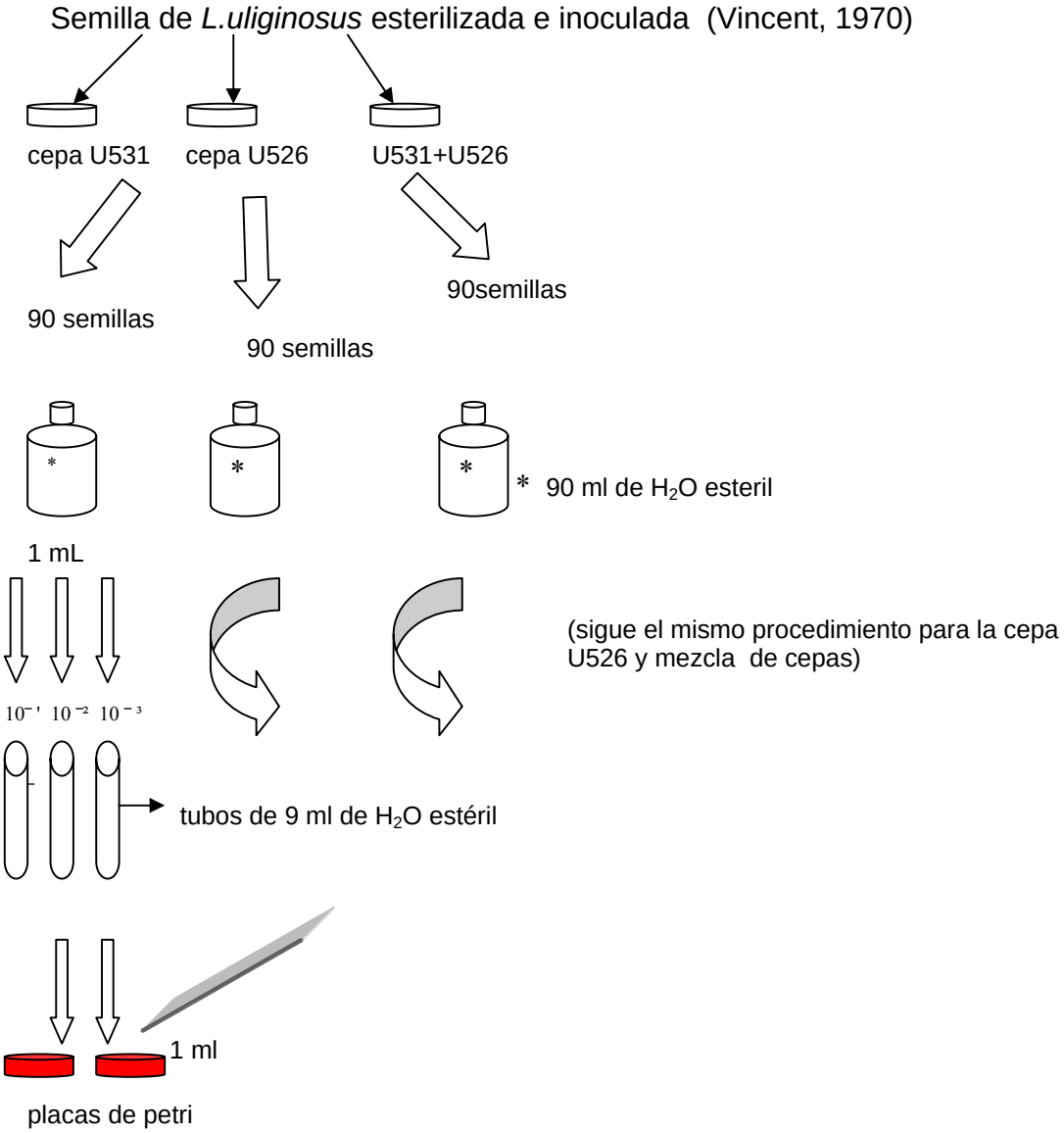
pH, para lotus = 7

*Solución de micronutrientes para medios de cultivos

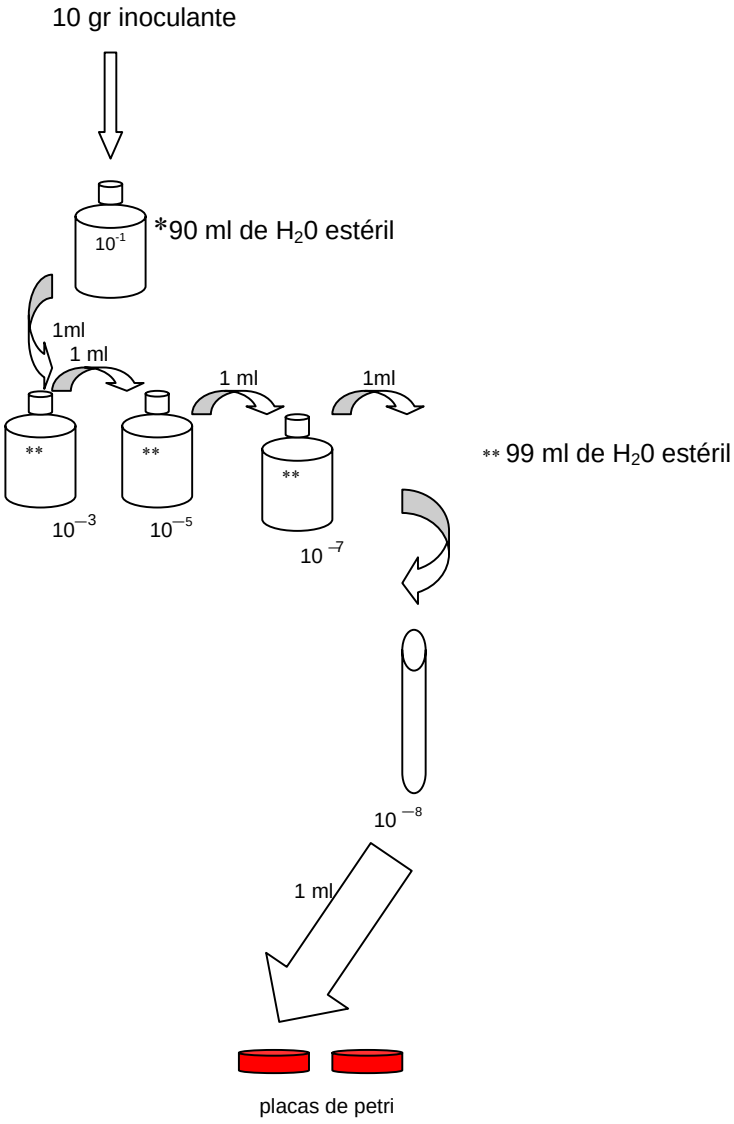
$Na_2B_40_2$ ……	2.34 g/L
$MnSO_4.4H_2O$ ……	2.03 g/L
$ZnSO_4.7H_2O$ ……	0.22 g/L
$Na_2MoO_4.2H_2O$ ……	0.126 g/L
$CuSO_4.\ 5H_2O$ ……	0.08 g/L

ANEXO N° 3

1. Esquema de recuento de viables por semilla inoculada para ensayo de campo



2. Esquema de recuento de viables por gramo de inoculante



3. Escala de Mc Farland (Lenette et al., 1974)

Tubo	Cloruro de bario 1%(ml)	Ácido sulfúrico 1%(ml)	Densidad aprox. de bacterias(millón/ml)
1	0.1	9.9	300
2	0.2	9.8	600
3	0.3	9.7	900
4	0.4	9.6	1.200
5	0.5	9.5	1.500
6	0.6	9.4	1.800
7	0.7	9.3	2.100
8	0.8	9.2	2.400
9	0.9	9.1	2.700
10	1.0	9.0	3.000

ANEXO N° 4

1. Análisis estadístico del estado de plántulas de *L.uliginosus*

Modelo estadístico

$g(pijkl) = \mu + \alpha i + \beta j(\alpha i) + \tau k + \lambda l + (\alpha\tau)ik + (\alpha\lambda)il + (\tau\lambda)kl + (\alpha\tau\lambda)ikl$

donde:

g(pijkl) es la función logit de la probabilidad de obtención de plantas verdes

μ es la media general

αi es el efecto del i-ésimo antecesor

$\beta j(\alpha i)$ es el efecto del j-ésimo bloque dentro del i-ésimo antecesor

τk es el efecto del k-ésimo tratamiento

λl es el efecto del l-ésimo método de siembra

$(\alpha\tau)jk$ es la interacción entre antecesor y tratamiento

$(\alpha\lambda)jl$ es la interacción entre antecesor y método de siembra

$(\tau\lambda)kl$ es la interacción entre tratamiento y método de siembra

$(\alpha\tau\lambda)ikl$ es la interacción entre antecesor, tratamiento y método de siembra

Número plantas verdes para el sitio con antecedentes de *L. corniculatus*

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F	Chi^2	Pr > Chi^2
Bloque	3	0.26	0.8564	0.77	0.8573
Inoc	3	3.51	0.0332	10.52	0.0146
Metsiem	1	0.64	0.4324	0.64	0.4235
Inoc*Metsiem	3	0.94	0.4369	2.83	0.4179

Contraste

	Gl	F Value	Pr > F	Pr > ChiSq
Inoc todos-T	1	9.63	0.0054	0.0019

Número plantas verdes para el sitio sin antecedentes de *L. corniculatus*

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F	Chi2	Pr > Chi2
Bloque	3	3.24	0.0426	9.72	0.0211
Inoc	3	5.59	0.0056	16.76	0.0008
Metsiem	1	7.08	0.0146	7.08	0.0078
Inoc*Metsiem	3	0.10	0.9596	0.30	0.9605

Contraste

	Gl	F Value	Pr > F	Pr > ChiSq
Inoc todos-T	1	16.42	0.0006	<.0001

Número plantas totales para el sitio con antecedentes de *L. corniculatus*

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F	Chi^2	Pr > Chi^2
Bloque	3	0.63	0.6045	1.89	0.5963
Inoc	3	0.51	0.6821	1.52	0.6779
Metsiem	1	9.71	0.0052	9.71	0.0018
Inoc*Metsiem	3	0.16	0.9250	0.47	0.9262

Número plantas totales para el sitio sin antecedentes de *L. corniculatus*

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F	Chi^2	Pr > Chi^2
Bloque	3	3.70	0.0279	11.09	0.0112
Inoc	3	0.95	0.4350	2.85	0.4159
Metsiem	1	5.37	0.0307	5.37	0.0205
Inoc*Metsiem	3	0.49	0.6956	1.46	0.6920

Porcentaje de plantas verdes para el sitio con antecedentes de *L. corniculatus*

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F	Chi^2	Pr > Chi^2
Bloque	3	2.38	0.0982	7.15	0.0673
Inoc	3	29.78	<.0001	89.35	<.0001
Metsiem	1	2.09	0.1634	2.09	0.1487
Inoc*Metsiem	3	1.55	0.2303	4.66	0.1984

Contraste

	Gl	F Value	Pr > F	Pr > ChiSq
Inoc todos-T	1	87.02	<.0001	<.0001

Porcentaje de plantas verdes para el sitio sin antecedentes de *L. corniculatus*

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F	Chi^2	Pr > Chi^2
Bloque	3	1.52	0.2381	4.56	0.2066
Inoc	3	21.70	<.0001	65.10	<.0001
Metsiem	1	1.42	0.2463	1.42	0.2330
Inoc*Metsiem	3	0.78	0.5199	2.33	0.5066

Contraste

	Gl	F Value	Pr > F	Pr > ChiSq
Inoc todos-T	1	64.76	<.0001	<.0001

2. Análisis estadístico de la nodulación temprana del *L. uliginous*

Modelo estadístico

$$g(pijkl) = \mu + \alpha i + \beta j(\alpha i) + \tau k + \lambda l + (\alpha\tau)ik + (\alpha\lambda)il + (\tau\lambda)kl + (\alpha\tau\lambda)ikl$$

donde:

g(pijkl) es la función logit acumulada de la probabilidad de obtención de cada punto de la escala de nodulación

μ es la media general

αi es el efecto del i-ésimo antecesor

$\beta j(\alpha i)$ es el efecto del j-ésimo bloque dentro del i-ésimo antecesor

τk es el efecto del k-ésimo tratamiento

λl es el efecto del l-ésimo método de siembra

$(\alpha\tau)jk$ es la interacción entre antecesor y tratamiento

$(\alpha\lambda)jl$ es la interacción entre antecesor y método de siembra

$(\tau\lambda)kl$ es la interacción entre tratamiento y método de siembra

$(\alpha\tau\lambda)ikl$ es la interacción entre antecesor, tratamiento y método de siembra

INDICE DE NODULACION

Fte. de variación	Gl	Chi2	Pr > Chi2
Bloque(Antec)	6	15.96	0.0140
Antec*METSIEM	1	5.82	0.0159
Antec*Trat	3	8.37	0.0390
Antec*METSIEM*Trat	3	6.79	0.0790

Contrastes para el sitio con antecedentes de *L. corniculatus*

	Gl	Chi2	Pr > Chi2
trat CM-T	1	24.76	<.0001
trat CR-T	1	12.44	0.0004
trat CR+CM-T	1	19.29	<.0001
METSIE L-V	1	6.75	0.0094

Contrastes para el sitio sin antecedentes de *L. corniculatus*

	Gl	Chi2	Pr > Chi2
trat CM-T	1	38.29	<.0001
trat CR-T	1	38.80	<.0001
trat CR+CM-T	1	34.73	<.0001
METSIE L-V	1	0.63	0.4284

3. Análisis estadístico del primer corte para el sitio con antecedentes de *L. corniculatus*

Modelo estadístico

$$Y_{ijkl} = \mu + \tau_i + \lambda_j + (\tau\lambda)_{ij} + \beta_k + \varepsilon_{ijk} + \varphi_l + (\tau\varphi)_{il} + (\lambda\varphi)_{jl} + (\tau\lambda\varphi)_{ijl} + \varepsilon_{ijkl}$$

donde:

Y_{ijk} es la variable de respuesta

μ es la media general

τ_i es el efecto del i-ésimo tratamiento

λ_j es el efecto del j-ésimo método de siembra

$(\tau\lambda)_{ij}$ es la interacción entre tratamiento y método de siembra

β_k es el efecto del k-ésimo bloque

ε_{ijk} es el error experimental (variabilidad entre parcelas)

φ_l es el efecto del l-ésimo corte

$(\tau\varphi)il$ es la interacción entre tratamiento y corte

$(\lambda\varphi)jl$ es la interacción entre método de siembra y corte

$(\tau\lambda\varphi)ijl$ es la interacción entre tratamiento, método de siembra y corte

$\varepsilon ijkl$ es el error de las medidas repetidas (dentro de parcelas)

Producción de forraje total

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F
Bloque	3	7.15	0.0017
Trat	3	0.40	0.7510
Mets	1	0.04	0.8492
Trat*Mets	3	0.93	0.4439

	Gl	CME
Error	21	392433.9

C. V	Media
13.63617	4594.000

Producción de forraje de *L. uliginosus*

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F
Bloque	3	1.95	0.1532
Trat	3	4.59	0.0127
Mets	1	10.55	0.0038
Trat*Mets	3	1.98	0.1486

	Gl	CME
Error	21	1055.30506

C. V	Media
73.77819	44.03125

CONTRASTE

	Estimate	Error estándar	t Value	Pr > |t|
c/inoc-test	45.5416667	13.2621332	3.51	0.0021

Producción de forraje de *L. corniculatus*

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F
Bloque	3	0.96	0.4322
Trat	3	1.46	0.2545
Mets	1	1.53	0.2297
Trat*Mets	3	3.81	0.0252

	Gl	CME
Error	21	289.19792

C. V	Media
121.1996	14.03125

Producción de forraje de *T. repens*

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F
Bloque	3	0.87	0.4700
Trat	3	1.40	0.2714
Mets	1	1.29	0.2686
Trat*Mets	3	1.00	0.4134

	Gl	CME
Error	21	407127.22

C. V	Media
198.9679	320.6875

Producción de forraje de otras especies

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F
Bloque	3	2.43	0.0940
Trat	3	0.19	0.9024
Mets	1	0.88	0.3595
Trat*Mets	3	0.45	0.7176

	Gl	CME
Error	21	986428.41

C. V	Media
23.56168	4215.281

Porcentaje de *L. uliginosus* sin transformar

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F
Bloque	3	4.05	0.0204
Trat	3	5.20	0.0076
Mets	1	13.41	0.0015
Trat*Mets	3	1.84	0.1702

	Gl	CME
Error	21	0.40787455

C. V	Media
65.90396	0.969063

Porcentaje de *L. uliginosus* transformado

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F
Bloque	3	3.90	0.0231
Trat	3	8.60	0.0006
Mets	1	14.00	0.0012
Trat*Mets	3	1.71	0.1948

	Gl	CME
Error	21	0.00097047

C. V	Media
36.22290	0.086002

CONTRASTE

	Estimate	Error estándar	t Value	Pr > |t|
c/inoc-test	0.06313356	0.01271793	4.96	<.0001

4. Análisis estadístico del primer corte para el sitio sin antecedentes de *L. corniculatus*

Producción de forraje total

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F
Bloque	3	0.90	0.4585
Trat	3	1.30	0.3006
Mets	1	0.04	0.8512
Trat*Mets	3	1.51	0.2422

	Gl	CME
Error	21	22453.31707

C. V	Media
27.18110	551.2813

Producción de forraje de *L. uliginosus*

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F
Bloque	3	0.92	0.4481
Trat	3	1.67	0.2044
Mets	1	0.03	0.8585
Trat*Mets	3	1.65	0.2091

	Gl	CME
Error	21	2397.05952

C. V	Media
144.5307	33.87500

Contraste

	Estimate	Error estándar	t Value	Pr > |t|
c/inoc-test	39.166667	19.9877443	1.96	0.0635

Producción de forraje de otras especies

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F
Bloque	3	1.33	0.2918
Trat	3	1.60	0.2203
Mets	1	0.07	0.7922
Trat*Mets	3	0.94	0.4375

	Gl	CME
Error	21	19541.1265

C. V	Media
27.01085	517.5313

Porcentaje de *L. uliginosus* sin transformar

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F
Bloque	3	1.09	0.3747
Trat	3	2.37	0.0991
Mets	1	0.14	0.7125
Trat*Mets	3	1.55	0.2321

	Gl	CME
Error	21	51.934708

C. V	Media
126.5630	5.694063

Porcentaje de *L. uliginosus* transformado

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F
Bloque	3	1.30	0.3009
Trat	3	5.73	0.0050
Mets	1	0.06	0.8142
Trat*Mets	3	1.54	0.2333

	Gl	CME
Error	21	0.01146366

C. V	Media
51.10717	0.209498

Contraste

	Estimate	Error estandar	t Value	Pr > |t|
c/inoc-test	0.16942961	0.04371052	3.88	0.0009

5. Análisis estadístico del segundo corte para el sitio sin historia

Modelo estadístico

$$Yijkl = \mu + \tau i + \lambda j + (\tau\lambda)ij + \beta k + \varepsilon ijk + \varphi l + (\tau\varphi)il + (\lambda\varphi)jl + (\tau\lambda\varphi)ijl + \varepsilon ijkl$$

donde:

Yijk es la variable de respuesta
μ es la media general
τi es el efecto del i-ésimo tratamiento
λj es el efecto del j-ésimo método de siembra
$(\tau\lambda)ij$ es la interacción entre tratamiento y método de siembra
βk es el efecto del k-ésimo bloque
εijk es el error experimental (variabilidad entre parcelas)
φl es el efecto del l-ésimo corte
$(\tau\varphi)il$ es la interacción entre tratamiento y corte
$(\lambda\varphi)jl$ es la interacción entre método de siembra y corte
$(\tau\lambda\varphi)ijl$ es la interacción entre tratamiento, método de siembra y corte
$\varepsilon ijkl$ es el error de las medidas repetidas (dentro de parcelas)

Producción de forraje total

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F
Trat	3	0.55	0.6528
Mets	1	3.44	0.0778
Trat*Mets	3	0.55	0.6557

C. V	Media
46	388.6625000

Producción de forraje de *L. uliginosus*

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F
Trat	3	7.32	0.0015
Mets	1	0.01	0.9422
Trat*Mets	3	0.12	0.9496

C. V	Media
62	56.8968750

Producción de forraje de otras especies

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F
Trat	3	0.73	0.5476
Mets	1	3.83	0.0638
Trat*Mets	3	0.66	0.5843

C. V	Media
51	331.7718750

Porcentaje de L. uliginosus

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F
Trat	3	10.37	0.0002
Mets	1	4.71	0.0416
Trat*Mets	3	0.99	0.4150

C. V	Media
52	15.8843750

6. Análisis estadístico del tercer corte para el sitio con historia

Modelo estadístico

$$Yijkl = \mu + \tau i + \lambda j + (\tau\lambda)ij + \beta k + \varepsilon ijk + \varphi l + (\tau\varphi)il + (\lambda\varphi)jl + (\tau\lambda\varphi)ijl + \varepsilon ijkl$$

Producción de forraje total

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F
Trat	3	2.67	0.0739
Mets	1	4.27	0.0513
Trat*Mets	3	2.71	0.0707

C. V	Media
13	3489.20

Producción de forraje de *L. uliginosus*

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F
Trat	3	2.88	0.0602
Mets	1	0.97	0.3349
Trat*Mets	3	2.57	0.6431

C. V	Media
67	403.9090625

Contraste

	Gl	F Value	Pr > F
Inoc todos-T	1	4.48	0.0464
Inoc todos-T LINEA	1	2.62	0.1203
Inoc todos-T VOLEO	1	1.89	0.1840

Producción de forraje de *L. corniculatus*

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F
Trat	3	0.38	0.7672
Mets	1	3.36	0.0809
Trat*Mets	3	2.63	0.0768

C. V	Media
88	88.5415625

Producción de forraje de *T. repens*

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F
Trat	3	0.24	0.8705
Mets	1	0.04	0.8434
Trat*Mets	3	0.06	0.9815

C. V	Media
64	255.7584375

Producción de forraje de otras especies

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F
Trat	3	1.26	0.3127
Mets	1	1.30	0.2677
Trat*Mets	3	2.37	0.0999

C. V	Media
17	2740.99

Porcentaje de *L. uliginosus* sin transformar

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F
Trat	3	2.76	0.0676
Mets	1	0.37	0.5506
Trat*Mets	3	0.92	0.4497

Media

11.4759375

Porcentaje de *L. uliginosus* transformado

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F
Trat	3	2.56	0.0826
Mets	1	0.55	0.4668
Trat*Mets	3	0.98	0.4202

C. V	Media
39	0.3236239

7. Análisis estadístico del tercer corte para el sitio sin historia

Modelo estadístico

$$Yijkl = \mu + \tau i + \lambda j + (\tau\lambda)ij + \beta k + \varepsilon ijk + \varphi l + (\tau\varphi)il + (\lambda\varphi)jl + (\tau\lambda\varphi)ijl + \varepsilon ijkl$$

Producción de forraje total

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F
Trat	3	5.24	0.0074
Mets	1	0.28	0.6019
Trat*Mets	3	0.34	0.7994

C. V	Media
20	1526.18

Producción de forraje de *L. uliginosus*

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F
Trat	3	9.73	0.0003
Mets	1	0.68	0.4180
Trat*Mets	3	0.61	0.6141

C. V	Media
41	644.1250000

Contraste

	Gl	F Value	Pr > F
Inoc todos-T	1	28.12	<.0001
Inoc todos-T LINEA	1	18.13	0.0004
Inoc todos-T VOLEO	1	10.51	0.0039

Producción de forraje de otras especies

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F
Trat	3	0.44	0.7256
Mets	1	0.05	0.8178
Trat*Mets	3	1.10	0.3709

C. V	Media
29	882.0625000

Porcentaje de *L. uliginosus* sin transformar

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F
Trat	3	9.85	0.0003
Mets	1	0.40	0.5330
Trat*Mets	3	0.74	0.5385

Media
39.5000000

Porcentaje de *L. uliginosus* transformado

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F
Trat	3	10.40	0.0002
Mets	1	0.36	0.5561
Trat*Mets	3	0.70	0.5649

C. V	Media
24	0.6661482

8. Análisis estadísticos de cortes acumulados para el sitio con historia

Modelo estadístico

$$Yijkl = \mu + \tau i + \lambda j + (\tau\lambda)ij + \beta k + \varepsilon ijk + \varphi l + (\tau\varphi)il + (\lambda\varphi)jl + (\tau\lambda\varphi)ijl + \varepsilon ijkl$$

Producción de forraje total

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F
Trat	3	0.92	0.4472
Mets	1	0.87	0.3612
Trat*Mets	3	1.52	0.2376

C. V	Media
11	5274.70

Producción de forraje de *L. uliginosus*

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F
Trat	3	3.76	0.0263
Mets	1	2.07	0.1647
Trat*Mets	3	0.52	0.6749

C. V	Media
58	591.3898438

Contraste

	Gl	F Value	Pr > F
Inoc todos-T	1	7.06	0.0148

Producción de forraje de *L. corniculatus*

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F
Trat	3	0.38	0.7681
Mets	1	1.73	0.2025
Trat*Mets	3	3.30	0.0403

C. V	Media
72	102.6228125

Producción de forraje de *T. repens*

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F
Trat	3	1.20	0.3347
Mets	1	1.41	0.2979
Trat*Mets	3	0.98	0.4212

C. V	Media
105	576.4062500

Producción de forraje de otras especies

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F
Trat	3	0.38	0.7707
Mets	1	0.10	0.7552
Trat*Mets	3	1.21	0.3318

C. V	Media
18	4343.80

Porcentaje de *L. uliginosus* transformado

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F
Trat	3	4.03	0.0207
Mets	1	1.84	0.1896
Trat*Mets	3	0.58	0.6349

C. V	Media
32	0.3880742

Contraste

	Gl	F Value	Pr > F
Inoc todos-T	1	8.22	0.0092

Porcentaje de *L. uliginosus* sin transformar

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F
Trat	3	3.84	0.02461
Mets	1	1.30	0.2677
Trat*Mets	3	0.42	0.7439

Media
17.2126094

9. Análisis estadístico de cortes acumulados para el sitio sin historia

Modelo estadístico

$$Yijkl = \mu + \tau i + \lambda j + (\tau\lambda)ij + \beta k + \varepsilon ijk + \varphi l + (\tau\varphi)il + (\lambda\varphi)jl + (\tau\lambda\varphi)ijl + \varepsilon ijkl$$

Producción de forraje total

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F
Trat	3	3.99	0.0214
Mets	1	0.20	0.6627
Trat*Mets	3	1.45	0.2564

C. V	Media
13	2466.145

Producción de forraje de *L. uliginosus*

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F
Trat	3	9.16	0.0005
Mets	1	0.50	0.4863
Trat*Mets	3	0.31	0.8145

C. V	Media
40	734.875

CONTRASTE	Gl	F Value	Pr > F
Inoc todos-T	1	26.58	<.0001

Producción de forraje de otras especies

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F
Trat	3	0.83	0.4904
Mets	1	1.24	0.2771
Trat*Mets	3	2.47	0.0897

C. V	Media
18	1731.285

Porcentaje de *L. uliginosus* sin transformar

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F
Trat	3	8.83	0.0006
Mets	1	1.31	0.2655
Trat*Mets	3	0.66	0.5864

Media
28.9162

Porcentaje de *L. uliginosus* transformado

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F
Trat	3	9.28	0.0004
Mets	1	1.02	0.3238
Trat*Mets	3	0.61	0.6189

C. V	Media
23	28.9162

CONTRASTE	Gl	F Value	Pr > F
Inoc todos-T	1	27.47	<.0001

ANEXO N° 5

1. Análisis estadístico de los tres cortes para cilindros de suelo sin historia

Modelo estadístico

$Y_{ijkl} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$

donde:

Y_{ijk} es la variable de respuesta

μ es la media general

τ_i es el efecto del i-ésimo tratamiento

ε_{ij} es el error experimental (variabilidad entre macetas)

Peso seco de parte aérea de *L. uliginosus*

PRIMER CORTE

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F
Trat	15	4.58	<.0001
	Gl	CME	
Error	80	0.00148485	

C.V	Media
50.45465	0.076373

SEGUNDO CORTE

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F
Trat	15	4.13	<.0001

		Gl	CME
Error		80	0.01904983
C.V	Media		
61.87380	0.2200069		

TERCER CORTE

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F
Trat	15	11.73	<.0001

		Gl	CME
Error		80	0.00823019
C.V	Media		
38.62891	0.234851		

Peso seco de parte aérea de otras especies

PRIMER CORTE

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F
Trat	15	1.10	0.3732

		Gl	CME
Error		80	0.02282311
C.V	Media		
26.95324	0.560501		

SEGUNDO CORTE

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F
Trat	15	1.63	0.0834

		Gl	CME
Error		80	0.01396661
C.V	Media		
18.79955	0.628634		

TERCER CORTE

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F
Trat	15	2.67	0.0025
	Gl	CME	
Error	80	0.03142475	
C.V	Media		
19.56183	0.906205		

2. Análisis estadístico de los tres cortes para cilindros de suelo con historia

Modelo estadístico

$Yijkl = \mu + \tau i + \varepsilon ij$

Peso seco de parte aérea de *L. uliginosus*

PRIMER CORTE

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F
Trat	4	0.71	0.5903
	Gl	CME	
Error	25	0.04331259	
C.V	Media		
34.10148	0.610287		

CONTRASTE

	Gl	t value	Pr> t
Efectivas/testigo	50	-0.50	0.6210

SEGUNDO CORTE

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F
Trat	4	2.66	0.0561
	Gl	CME	
Error	25	0.09062157	

C.V	Media
16.71555	1.800923

CONTRASTE	Gl	t value	Pr> t
Efectivas/testigo	50	3.02	0.0039

TERCER CORTE

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F
Trat	4	2.48	0.0694
	Gl	CME	
Error	25	0.09233453	

C.V	Media
23.78977	1.277297

CONTRASTE	Gl	t value	Pr> t
Efectivas/testigo	50	2.64	0.0110

3. Análisis estadístico de cortes acumulados para cilindros de suelo sin historia

Modelo estadístico

$Y_{ijkl} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij} + \varphi_k + (\tau\varphi)_{ik} + \varepsilon_{ijk}$

Peso seco de parte aérea de *L. uliginosus*

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F
Trat	15	6.58	<.0001
	Gl	CME	
Error	80	0.05872125	

C.V	Media
45.40041	0.533750

CONTRASTE

	Estimate	t Value	Pr> t
control-resto s/U510	-0.44642857	-4.36	<.0001

Peso seco de parte aérea de otras especies

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F
Trat	15	2.02	0.0232
	Gl	CME	
Error	80	0. 11479750	

C.V	Media
16.12938	2.100625

CONTRASTE

	Estimate	t Value	Pr> t
control-resto s/U510	-0.21190476	-1.48	0.1428

4. Análisis estadístico de cortes acumulados para cilindros de suelo con historia

Modelo estadístico

$$Y_{ijkl} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij} + \varphi_k + (\tau\varphi)_{ik} + \varepsilon_{ijk}$$

Peso seco de parte aérea de *L. uliginosus*

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F
Trat	4	1.67	0.1884
	Gl	CME	
Error	25	0.39425941	

C.V	Media
17.02317	3.688507

CONTRASTE	Estimate	t Value	Pr> t
control-resto s/U510	-0.66299444	-2.24	0.0342

ANEXO N° 6

1. Análisis estadístico para el ensayo de eficiencia de cepas en *L. corniculatus*

Modelo estadístico

$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$

donde:

Y_{ijk} es la variable de respuesta

μ es la media general

τ_i es el efecto del i-ésimo tratamiento

ε_{ij} es el error experimental (variabilidad entre tubos)

Peso seco de parte aérea de *L. corniculatus*

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F
Trat	9	82.44	<.0001
	Gl	CME	
Error	71	4.342394	

C.V	Media
17.84450	11.67778

2. Análisis estadístico para el ensayo de competencia entre cepas para la formación de nódulos

Modelo estadístico

$Yijk = \mu + \tau i + \varepsilon ij$

Peso seco de parte aérea de *L. uliginosus*

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F
Trat	11	47.36	<.0001
	Gl	CME	
Error	60	0.00001374	

C.V	Media
19.78836	0.018735

Peso seco de raíz de *L. uliginosus*

Fte. de variación	Gl	F Value	Pr > F
Trat	11	27.00	<.0001
	Gl	CME	
Error	60	0.00001098	

C.V	Media
43.92281	0.007546