



FACULTAD DE
AGRONOMIA
UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA

**EVALUACION DE CEPAS DE *Sinorhizobium meliloti*
PARA ALFALFA**

por

**Gabriel CASTIGLIONI OJEDA
Juan Javier PARRA MAINERO**

TESIS

1999

MONTEVIDEO

URUGUAY

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

EVALUACIÓN DE CEPAS DE *Sinorhizobium meliloti* PARA ALFALFA

por

Gabriel CASTIGLIONI OJEDA
Juan Javier PARRA MAINER●

TESIS presentada como uno de los
requisitos para obtener el título de
Ingeniero Agrónomo.(Orientación
Agrícola lechera)

MONTEVIDEO●
URUGUAY
1999

Tesis aprobada por :

Director :

Ing. Agr. Pablo Dutto

Dra. Lilián Frioni

Dr. Jorge Monza

Fecha :

19-11-99

Autor :

Gabriel Castiglioni Ojeda

Juan Javier Parra Mainero

AGRADECIMIENTOS

Manifestamos nuestro agradecimiento al Ministerio de Agricultura y Pesca, por haber permitido la realización de este trabajo en la División Suelos y Aguas, Laboratorio de Microbiología de Suelos y Control de Inoculantes de la Institución.

Nuestro reconocimiento al Ing. Agr. Pablo Dutto, Director de esta Tesis, por su invaluable apoyo y orientación en las tareas efectuadas.

Al Ing. Agr. Carlos Labandera, Director del Laboratorio de Microbiología de Suelos y Control de Inoculantes por su apoyo en los trabajos realizados.

Nuestro especial agradecimiento a todo el personal del laboratorio, por su incondicional ayuda en la realización de esta Tesis.

A familiares y amigos que de una forma u otra colaboraron en este trabajo.

Por último, a nuestros padres, nuestro muy especial reconocimiento por su constante apoyo e incondicional confianza .

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADRO E ILUSTRACIONES.....	VI
1. INTRODUCCIÓN.....	
	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	
	2
2.1 IMPORTANCIA DEL NITRÓGENO EN EL SISTEMA AGROPECUARIO.....	2
2.2 PÉRDIDAS DE NITRÓGENO EN EL SISTEMA.....	2
2.3 APORTES DE NITRÓGENO AL SISTEMA.....	3
2.3.1 <u>Aportes de fertilizantes nitrogenados</u>	3
2.3.2 <u>Fijación biológica de nitrógeno (FBN)</u>	3
2.4 ASOCIACIÓN RIZOBIO-LEGUMINOSA.....	4
2.4.1 <u>Aspectos generales</u>	4
2.4.2 <u>Factores que afectan la persistencia de los rizobios en el suelo</u>	4
2.5 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE CEPAS.....	5
2.5.1 <u>Especificidad y efectividad</u>	5
2.5.1.1 <u>Parámetros usados para evaluar efectividad</u>	5
2.5.2 <u>Competencia para formar nódulos</u>	7
2.5.2.1 <u>Competencia exitosa con las cepas nativas</u>	7
2.5.2.2 <u>Factores que intervienen en la competencia</u>	7
2.5.2.3 <u>Evaluación de la competencia</u>	8
2.5.2.4 <u>Relaciones entre efectividad y habilidad competitiva</u>	9
2.5.3 <u>Persistencia de los rizobios introducidos en el suelo</u>	9
2.5.4 <u>Habilidad industrial</u>	10
2.5.5 <u>Estabilidad genética</u>	10
2.5.6 <u>Selección para condiciones específicas: temperatura y agroquímicos</u>	10
2.6 ALFALFA.....	11
2.6.1 <u>Principales características</u>	11
2.6.2 <u>Situación actual de la alfalfa en Uruguay</u>	12
2.7 ALFALFA EN SUELOS ÁCIDOS.....	13
2.7.1 <u>Problemas</u>	12
2.7.2 <u>Causas</u>	13
2.7.2.1 <u>Efecto de la acidez sobre la planta</u>	13
2.7.2.2 <u>Efecto de la acidez sobre la simbiosis</u>	13
2.7.2.3 <u>Efecto del pH sobre el crecimiento del rizobio</u>	14

2.7.3 <u>Correcciones</u>	16
2.7.3.1 <u>Encalado</u>	16
2.7.3.2 <u>Selección de plantas</u>	16
2.7.3.3 <u>Selección de rizobios</u>	17
2.7.3.4 <u>Agregado de fósforo</u>	18
<u>3. MATERIALES Y MÉTODOS</u>	19
3.1 EFECTO DEL pH SOBRE EL CRECIMIENTO DE LA ALFALFA.....	19
3.1.1 <u>Origen y características de las variedades</u>	19
3.1.2 <u>Siembra</u>	19
3.1.3 <u>Diseño experimental y parámetros</u>	19
3.2 SELECCIÓN DE CEPAS <i>Sinorhizobium meliloti</i> EFICIENTES	
A pH ÁCIDO Y/O NEUTRO.....	20
3.2.1 <u>Procedencia de las cepas a evaluar</u>	20
3.2.2 <u>Bacterioteca</u>	20
3.2.2.1 <u>Aislamiento y conservación de las cepas de <i>Sinorhizobium meliloti</i></u>	21
3.2.2.2 <u>Caracterización simbiótica de rizobios de alfalfa a dos pH</u>	21
3.2.3 <u>Diseño experimental y parámetros</u>	21
3.3 EFECTO DEL pH SOBRE EL CRECIMIENTO DE <i>Sinorhizobium meliloti</i> ...	22
3.3.1 <u>Diseño experimental y parámetros</u>	22
3.4 EFECTO DEL CALCIO EN LA NODULACIÓN Y PRODUCCIÓN	
DE MATERIA SECA DE LA ALFALFA EN pH ÁCIDO.....	22
3.4.1 <u>Siembra e inoculación</u>	22
3.4.2 <u>Diseño experimental y parámetros</u>	22
<u>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	23
4.1 EFECTO DEL pH SOBRE EL CRECIMIENTO DE LA ALFALFA	23
4.2 SELECCIÓN DE CEPAS <i>Sinorhizobium meliloti</i> EFICIENTES	
A pH ÁCIDO Y/O NEUTRO.....	24
4.3 EFECTO DEL pH SOBRE EL CRECIMIENTO DE <i>Sinorhizobium</i>	
<i>meliloti</i>	25
4.4 EFECTO DEL CALCIO EN LA NODULACIÓN Y PRODUCCIÓN	
DE MATERIA SECA DE LA ALFALFA EN pH ÁCIDO.....	25
<u>5. CONCLUSIONES</u>	27
<u>6. RESUMEN</u>	28
<u>7. SUMMARY</u>	29
<u>8. BIBLIOGRAFÍA</u>	30
<u>9. APÉNDICES</u>	36

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

	Página
Cuadro 1: Producción de materia seca (MS) en ton/año en promedio de 20 años para situaciones contrastantes de Trébol blanco, Lotus, Trébol rojo y Alfalfa.....	11
Cuadro 2: Forraje total producido en la vida productiva (ton MS/ha) de Trébol blanco, Lotus, Trébol rojo y Alfalfa en Uruguay, y distribución estacional (%) de cada una.....	12
Cuadro 3: Requerimientos de fósforo para la instalación de diferentes especies de leguminosas en suelos de texturas medias y pesadas del sur y litoral de Uruguay.....	12
Cuadro 4: Características de las variedades de alfalfa utilizadas.....	19
Cuadro 5: Producción media de materia seca en mg/tubo para distintas variedades comerciales de alfalfa a pH 5,2 y 7,0	23
Cuadro 6: Producción media de materia seca en mg/tubo de las plantas de alfalfa cv. Chaná inoculadas con las cepas seleccionadas a pH 7,0.....	24
Cuadro 7: Desarrollo de las colonias (escala 1 a5) media de dos repeticiones por tratamiento de las cepas comerciales de alfalfa U137 y U143.....	25
Cuadro 8: Producción media de materia seca en mg/tubo para plantas inoculadas con las cepas comerciales de alfalfa a pH 5,2 y con distintos niveles de calcio en el medio de cultivo	26

1. INTRODUCCIÓN

La alfalfa en Uruguay es la leguminosa forrajera de mayor producción y persistencia. Esta planta no se comporta bien en suelos con mal drenaje, ácidos, con presencia de horizonte B textural y/o baja disponibilidad de fósforo; lo cual ha sido determinante para su limitada adopción en áreas no tradicionalmente alfalferas.

Dada la importancia de la fijación biológica del nitrógeno (FBN) en la producción de esta leguminosa, es posible que alguno de los factores antes mencionados afecten a la planta indirectamente a través de su acción sobre el rizobio o la simbiosis. Por ejemplo, en los suelos ácidos los problemas pueden estar dados por un efecto directo en el crecimiento de la planta, en la sobrevivencia de los rizobios, o por afectar la simbiosis.

De acuerdo a estos antecedentes en esta tesis se plantean los siguientes objetivos a los efectos de contribuir a resolver la problemática planteada y aumentar la información disponible sobre el tema:

- 1 Estudiar el efecto directo del pH sobre el crecimiento de la alfalfa.
- 2 Seleccionar cepas de *Sinorhizobium meliloti* eficientes a pH ácido y/o neutro.
- 3 Estudiar el efecto de distintos pH en el crecimiento de *Sinorhizobium meliloti*.
- 4 Estudiar el efecto del calcio en la simbiosis *Sinorhizobium meliloti*-alfalfa en pH ácido.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 IMPORTANCIA DEL NITRÓGENO EN EL SISTEMA AGROPECUARIO

La función principal del nitrógeno (N) en los seres vivos es formar parte de las moléculas de aminoácidos y proteínas. El N también es constituyente de otros compuestos como vitaminas, coenzimas, clorofila y ácidos nucleicos (ADN, ARN) (Morón, 1996).

El N es de suma importancia en la agricultura, incrementando los rendimientos, modificando la composición química y calidad de los vegetales. Favorece el crecimiento vegetativo, el tamaño de los granos y su porcentaje de proteínas; aumenta la absorción de fósforo y potasio (Frioni, 1990).

Dado que el 98-99% del N total que se encuentra en el suelo está en forma orgánica y que para la planta sólo es disponible en forma inorgánica, ésta es dependiente de la mineralización realizada por la flora microbiana del suelo. Como el N aportado por ésta vía es insuficiente para las grandes cantidades demandadas por las plantas, para lograr óptimas producciones, se hacen necesarios los aportes realizados por los fertilizantes y/o la FBN.

La relación entre las formas orgánicas e inorgánicas del nitrógeno en el suelo se da a través de procesos biológicos realizados fundamentalmente por los microbios, siendo éstos los principales responsables de las transformaciones de la materia orgánica y del ciclaje de nutrientes en el suelo.

La mineralización es el proceso biológico que transforma N orgánico en N inorgánico. El N amoniacal y el N nítrico pueden ser absorbidos por plantas (asimilación) o microorganismos (inmovilización) para luego ser incorporados en compuestos orgánicos. El N contenido en la materia vegetal (raíces y parte aérea) no consumido por los animales, así como las deyecciones animales, retornan al suelo para entrar en el proceso de descomposición.

La cantidad y calidad del sustrato (materia orgánica humificada, residuos frescos, etc.) así como factores ambientales como temperatura y humedad son determinantes en la cantidad de N mineralizado (Morón, 1996).

2.2 PÉRDIDAS DE NITRÓGENO EN EL SISTEMA

Según Morón (1996) las pérdidas de N en el sistema agropecuario son las siguientes:

a) volatilización de $N-NH_3$ hacia la atmósfera, siendo importante en suelos alcalinos, con altas temperaturas y cuando los fertilizantes son aplicados en superficie.

b) lixiviación de $N-NO_3^-$, debido a la solubilidad de los nitratos y nitritos en agua los cuales pueden ser llevados a horizontes fuera del contacto con las raíces.

c) desnitrificación de $N-NO_3^-$ a gases (N_2 , N_2O), es la vía de mayores pérdidas de fertilizantes nitrogenados que provoca mediante la liberación de óxidos de nitrógeno a la atmósfera, entre ellos el óxido nitroso que se oxida a nítrico, la lluvia ácida.

d) erosión.

e) productos animales (leche, carne, lana, grano, forraje, etc.).

f) deyecciones animales fuera del área productiva (salas de ordeño, caminos, etc.).

2.3 APORTES DE NITRÓGENO AL SISTEMA

2.3.1 Aportes de fertilizantes nitrogenados

La utilización de fertilizantes nitrogenados produce un considerable aumento en los rendimientos de cultivos y pasturas. Sin embargo, debido a su alto costo energético y económico, así como a los problemas ecológicos, de salud pública y de sustentabilidad ambiental derivados de su uso, resulta conveniente la sustitución de éstos por otras formas más ecológicas y económicas para aportar N al suelo (Franco, 1996).

2.3.2 Fijación biológica de nitrógeno (FBN)

La FBN derivada de la asociación rizobio-leguminosa es la forma más económica de obtener alimentos ricos en proteína sin la aplicación de fertilizantes nitrogenados. Estos últimos, son de alto costo energético ya que se requieren 400 a 500 °C y entre 100 y 200 atm de presión para la producción de NH_3 , que es el componente básico de los fertilizantes, mientras que la FBN se lleva a cabo a temperatura ambiente y presión normal.

Dentro de la FBN, la simbiosis rizobio-leguminosa ocupa el papel más importante, con el 80% del N fijado y el 20% restante es fijado por organismos en vida libre o por bacterias asociadas a plantas no leguminosas. Dicho N es entregado en forma gradual al suelo, manejándose cantidades máximas entre 500-700 Kg/ha/año. Altas producciones de forraje (10 ton/ha) se consiguen con 300 Kg/ha de N absorbidos por la planta (Morón, 1996).

2.4 ASOCIACIÓN RIZOBIO-LEGUMINOSA

2.4.1 Aspectos generales

La familia leguminosae ha logrado su gran éxito ecológico debido a su capacidad de interactuar con bacterias del suelo genéricamente conocidas como rizobios, actualmente clasificadas en los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium* y *Mesorhizobium*. Esta interacción, mediante la formación de nódulos, permite la fijación de N atmosférico para ser utilizado por las plantas.

2.4.2 Factores que afectan la persistencia de los rizobios en el suelo

Según Hervas y Lluch (1991) entre los factores ambientales que pueden afectar la viabilidad y capacidad de nodulación de los rizobios del suelo se encuentran los siguientes :

a) pH la acidez afecta la capacidad de nodulación y la actividad de la nitrogenasa, variando entre especies y cepas de rizobios la susceptibilidad a ésta. Los efectos negativos se pueden deber al pH bajo *per se*, toxicidad del aluminio o manganeso por aumento de su solubilidad a pH bajos, a la deficiencia o baja disponibilidad de calcio, magnesio, fósforo y molibdeno; o a la combinación de estos factores.

b) temperatura es un factor que puede limitar la persistencia y competitividad de las especies y cepas de rizobios, existiendo grandes diferencias entre éstas en su capacidad de crecimiento, supervivencia y nodulación.

c) salinidad la mayoría de las cepas de *Sinorhizobium* sobreviven a condiciones de salinidad lo que no estaría limitando la simbiosis con las leguminosas (Pagliano, 1985).

d) manejo del suelo chacras con varios años de rotación agrícola y suelos con estiércol contienen mayor número de rizobios, lo que indicaría que el manejo del suelo es más importante que la frecuencia del cultivo huésped en promover altas poblaciones de rizobios (Pagliano, 1985).

e) herbicidas y pesticidas en diversas investigaciones se ha puesto de manifiesto que los rizobios son sensibles a bajas concentraciones de funguicidas y el tratamiento de semillas con éstas sustancias con frecuencia provoca una escasa nodulación. Existe comprobada variabilidad entre especies y cepas de rizobios en la resistencia a funguicidas. Los herbicidas ejercen su efecto directamente sobre la planta, no influyendo en forma directa sobre la supervivencia de los rizobios en el suelo (Hervas y Lluch, 1991).

f) rizósfera diferentes especies de rizobios pueden encontrarse en la rizósfera de una leguminosa coexistiendo especies que pueden nodular y otras que no. La mayor cantidad de rizobios en la rizósfera que en el suelo, se debe a que es una zona rica en nutrientes (aminoácidos, carbohidratos y vitaminas) por los cuales compiten las distintas especies de rizobios. Esto último puede ser una causa de las fallas de

inoculación, cuando los rizobios incluidos en los inoculantes comerciales no logran competir satisfactoriamente con los nativos (Pagliano, 1985).

g) humedad la desecación, sobre todo si es repentina, afecta la sobrevivencia de los rizobios en el suelo (Diatloff y Hutton, 1974).

2.5 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE CEPAS

2.5.1 Especificidad y efectividad

La asociación entre la leguminosa y los rizobios presenta diferentes niveles de especificidad: formación de nódulos, habilidad para fijar nitrógeno y nivel de dicha fijación, o sea, grado de efectividad (Pagliano, 1985).

La habilidad para producir nódulos es específica de la asociación huésped-microsimbionte y estaría limitada sólo en parte por los grupos taxonómicos a los cuales pertenecen ambos (Vincent, 1967). La instalación de la simbiosis y su eficiencia dependen una y otra de la aptitud específica del huésped y de la bacteria (Date, 1965).

El hecho de que se cumpla el primer requisito que es la afinidad huésped-cepa con la consiguiente formación de nódulos, no asegura la habilidad de dichos nódulos para fijar nitrógeno (efectividad). Una cepa dada raramente se comporta uniformemente con varios huéspedes, hecho que ocurre a nivel de especie, aunque también se observó a nivel de variedad dentro de la especie (Vincent, 1967).

Para lograr una combinación leguminosa-rizobio efectiva, es posible intervenir modificando la población de cepas que coloniza un suelo, mediante la inoculación de semillas o al suelo con cepas seleccionadas (Gili *et al.*, 1996).

2.5.1.1 Parámetros usados para evaluar efectividad

La capacidad fijadora de N de las cepas se establece por medio del número de nódulos, peso seco y contenido de N de la parte aérea en pruebas de laboratorio y ensayos a campo (Abril y Kopp, 1992).

Por mucho tiempo se ha observado que en asociaciones completamente inefectivas los nódulos son abundantes, pequeños y blancos. El número de nódulos producidos también da indicios de los diferentes grados de efectividad. En general, a menor número mayor eficiencia (Bergensen, 1985).

La tendencia parece indicar que pocos nódulos y grandes corresponden a plantas de mayor desarrollo (Frontera *et al.*, 1992).

Se propone como índice interesante muy relacionado con el número de nódulos, el peso de los mismos secos o verdes que además estaría altamente correlacionado con el N fijado (Döbereiner, 1965).

El contenido de leghemoglobina en los nódulos, que puede determinarse visualmente por la coloración interna de los mismos y estableciendo una escala de pigmentación que vaya de incolora a roja, está altamente correlacionado con el contenido de N de la planta, aunque no es correcto usarlo como medida absoluta (Nackie Martinez, 1974).

La nodulación en la raíz principal es una característica fácil de determinar y válida cualitativamente para evaluar la eficiencia de la simbiosis (Pagliano, 1985).

Las cepas de rizobios pueden diferir en el tiempo que emplean en la formación de nódulos desde los primeros estadios de la infección (Hervas y Lluch, 1991).

La velocidad de aparición del primer nódulo, es un indicador de la eficiencia de la cepa que se estudia. Las plantas noduladas tempranamente fijan más N_2 (Hely, 1963).

Un índice muy deseable de tener en cuenta es el peso seco de las plantas, especialmente en leguminosas forrajeras (Date, 1965).

El N total y el rendimiento de la planta están muy correlacionados. Como se ha comprobado que la relación entre la parte aérea de las plantas y las raíces es mayor cuando las plantas poseen un adecuado nivel de N que cuando carecen de éste, la diferenciación entre los niveles de fijación basados en el peso seco total, pueden aún perfeccionarse usando sólo, peso de la parte aérea (Shroeder, 1970).

A su vez el peso fresco guarda estrecha relación con el peso seco cuando las plantas están en buen estado de desarrollo y por lo tanto el peso fresco puede sustituir a este último, pesándose inmediatamente de la cosecha. Si bien las determinaciones de peso seco requieren trabajo extra (secado) se ven libradas de las pérdidas que representa el uso de material fresco y que puede llevar a datos menos uniformes. Además con peso seco se puede cosechar y pesar en momentos distintos (Vincent, 1975).

Este autor propone como índice para evaluar el mejoramiento obtenido por la nodulación, a la vez que estimar las diferencias de fijación de nitrógeno logradas por cepas diferentes, el logaritmo del rendimiento en peso seco de los tratamientos inoculados menos el logaritmo del peso seco de los no inoculados. Cuanto mayor sea la diferencia entre la resta, más eficiente será la cepa.

El uso del isótopo estable ^{15}N constituye una de las mejores pruebas de la fijación del N_2 (Frioni, 1990).

La eficiencia de la fijación de N medida por la actividad de la nitrogenasa mediante la reducción del acetileno a etileno, es un buen indicador, seguro y válido de la eficiencia de la simbiosis (Koch y Evans, 1967).

2.5.2 Competencia para formar nódulos

2.5.2.1 Competencia exitosa con las cepas nativas

La competitividad de las cepas se puede definir como la capacidad para formar nódulos, con una determinada leguminosa, en presencia de otras cepas de rizobios del mismo grupo de inoculación (Hervaz y Lluich, 1991).

La habilidad de una cepa de rizobio para competir con éxito con otros rizobios por la formación de nódulos es una característica importante, habiéndose demostrado la existencia de diferencias cualitativas (Pagliano, 1985).

Se ha demostrado que el huésped sería capaz de seleccionar de un suelo heterogéneo las poblaciones de rizobios más efectivas para formar nódulos. Esta mayor competitividad estaría asociada con la velocidad de nodulación (Robinson, 1969).

2.5.2.2 Factores que intervienen en la competencia

a) planta huésped : la planta es determinante de la capacidad competitiva de las cepas de rizobios. El huésped no solo determina la ocurrencia de la nodulación sino el número de raíces invadidas, la velocidad y el número de nódulos formados. El caso extremo del control de la nodulación por la planta se presenta en algunos genotipos vegetales, que excluyen a determinados microsimbiontes, bloqueando alguna etapa del proceso de nodulación (Hervas y Lluich, 1991).

b) microflora autóctona: muchos suelos contienen poblaciones indígenas de rizobios compatibles, que en muchos casos son inefectivos con una especie de leguminosa en particular, pero altamente competitivos. Es por eso que las cepas efectivas del inoculante deben ser además capaces de competir con los rizobios nativos. Una propiedad adicional que se desea es la persistencia de las cepas introducidas al suelo, particularmente importante para leguminosas forrajeras (Wilson *et al.*, 1996).

c) ambiente físico : pH, temperatura, desecación, niveles de fertilidad, afectan la dinámica de los rizobios en el suelo y por lo tanto modifican su capacidad relativa para producir nódulos en competencia.

pH: Las cepas de rizobios muestran diferente sensibilidad; los rizobios del grupo *Medicago* son menos tolerantes a condiciones ácidas, en cambio los de trébol pueden crecer hasta pH menores de 5 (Lie, 1968).

Temperatura: Es un factor que regula las poblaciones cualitativa y cuantitativamente. Ejerce sus efectos en todos los estadios fundamentalmente en las etapas tempranas y hasta la infección existiendo una amplia gama de tolerancia y sensibilidad (Barrios *et al.*, 1963).

Las temperaturas altas afectarían la multiplicación de los rizobios en la rizósfera alterando el número, distribución y rango de formación de los nódulos . Las bajas temperaturas también afectan la infección de la raíz por parte de los rizobios a la vez que el crecimiento y multiplicación de los mismos (Roughley y Dart, 1970).

Nitrógeno combinado: bajos niveles de éstas formas de nitrógeno mineral en el suelo son estimuladoras (Pate y Dart, 1961), siendo negativos los efectos en niveles más elevados (Pons *et al.*, 1976).

Calcio : La interacción de cepa-nivel de calcio fue altamente significativa en la infección y sobrevivencia de los rizobios (Brockwell, 1970). No así la presencia de magnesio y potasio, cuyos efectos serían adversos (Franco y Döbereiner, 1967).

2.5.2.3 Evaluación de la competencia

La capacidad de competencia de las cepas se evalúa a tres niveles: competencia por la adhesión a la superficie radical, competencia por la colonización de la raíz y competencia por la formación de nódulos (Balatti y Jardim Freire, 1996).

a) Adhesión a la superficie radical: es crítico el tiempo que media entre la siembra de la semilla inoculada y la formación de una rizósfera capaz de mantenerse o permitir la multiplicación del rizobio (Brockwell, 1970). Si la mortalidad es grande (por condiciones físicas o químicas desfavorables, actividades competitivas antagónicas y predadores de la microflora del suelo) no permanecerán núcleos de población para colonizar la rizósfera cuando emerjan las radículas. La competencia en esta etapa se da por espacio y nutrientes (Brockwell y Dudman, 1968).

b) Colonización de la raíz: la capacidad de las cepas de colonizar la superficie de la raíz es una característica inherente a la cepa misma (Labandera y Vincent, 1975). Si bien las leguminosas ejercen un efecto estimulador en la población de rizobios presentes en la rizósfera, se han encontrado diferencias en la habilidad de diferentes cepas de rizobios para colonizar la raíz del huésped vegetal y el suelo (Pagliano, 1985).

c) Formación de nódulos: es ésta una característica inherente a la asociación huésped-bacteria y a su grado de especificidad. La fecha de aparición del primer nódulo o momento de invasión (en situación de competencia) da idea de la agresividad de la cepa (Labandera y Vincent, 1975).

La nodulación temprana con un adecuado número de nódulos es un criterio interesante a tener en cuenta en selección por cuanto representa una temprana fuente de nitrógeno para la joven planta. Se encuentran marcadas diferencias entre las cepas en la velocidad de aparición del primer nódulo (Márques Pintos *et al.*, 1974).

El porcentaje de nódulos que forma cada cepa en función de su representatividad relativa, es indicador del éxito en competencia (Diatloff y Brockwell, 1976).

El peso fresco de la planta es una medida indirecta, ampliamente usada como índice de efectividad que representa la proporción de nódulos efectivos. Valores altos de peso fresco indicarán que la cepa efectiva es la más competitiva (Amarger, 1975).

2.5.2.4 Relaciones entre efectividad y habilidad competitiva

Amarger (1975) estudió la habilidad competitiva de cepas de *Sinorhizobium meliloti* efectivas con respecto a sus mutantes inefectivos, de forma que competencia y efectividad pudieron ser confrontados sobre las mismas bases genéticas. Se inocularon plantas con una mezcla de las cepas efectivas y no efectivas y se evaluaron los porcentajes de nódulos correspondientes de cada una. Se halló una relación proporcional en los nódulos igual a la mezcla lo que indica una misma habilidad competitiva entre las cepas efectivas y sus mutantes inefectivas.

Es importante la utilización de cepas efectivas y competitivas en la formación de los inoculantes comerciales, especialmente en las leguminosas inoculadas, ya que no pueden acoplar simultáneamente el uso de N mineral del suelo o del fertilizante (Carrilho Neto y Lemos, 1996).

2.5.3 Persistencia de los rizobios introducidos en el suelo

La persistencia de rizobios en el suelo, es la capacidad para multiplicarse y sobrevivir en ese medio a lo largo del tiempo (Hervas y Lluç, 1991).

Una cepa debería ser capaz de persistir en el suelo en los años sucesivos a la implantación, sobrevivir a los efectos deletéreos del ambiente y adherirse a nuevas raíces sin las ventajas que el primer año le confirió la inoculación (Brockwell y Dudman, 1968).

2.5.4 Habilidad industrial

Una cepa seleccionada para producción comercial de inoculantes debe poseer la aptitud de multiplicarse con facilidad en los medios corrientemente usados en la industria (Date, 1965).

Por otra parte la sobrevivencia de los rizobios en los inoculantes está determinada por varios factores: la cepa, el soporte, su esterilidad o el grado y tipo de contaminación, la temperatura de almacenamiento, y el agente neutralizante (Balatti y Jardim Freire, 1996). El grado de contaminación por otros microorganismos no solo afecta la sobrevivencia de los rizobios sino que además altera su estado fisiológico (Van Shreven, 1964).

2.5.5 Estabilidad genética

Dada la frecuencia de mutaciones encontradas en cepas de rizobios, se hace imprescindible la evaluación cualitativa y cuantitativa de las cepas que se utilizan en la fabricación de los inoculantes comerciales. Frecuentemente la pérdida de capacidad simbiótica no se asocia a cambios en las características culturales de las cepas (Labandera y Vincent, 1975). Una cepa que manifiesta falta de estabilidad genética no será recomendada para la producción comercial (Vincent, 1964)

Vincent (1975) estudió la eficiencia en condiciones controladas de 110 cepas de *Sinorhizobium meliloti* aisladas de nódulos de *Medicago sativa* L. El 30% presentó mayor producción de materia seca que el testigo con KNO_3 , pero en un experimento posterior solamente el 23% de las mismas mantuvo un comportamiento superior al testigo; el 59% redujo su eficiencia (Gili *et al.*, 1992).

2.5.6 Selección para condiciones específicas: temperatura y agroquímicos

La resistencia a temperaturas adversas es una característica adaptable de los rizobios y posible de ser usada en los programas de selección de cepas para inoculantes (Pagliano, 1985).

Es bien conocida la sensibilidad que manifiestan los rizobios a diferentes productos protectores de la semilla o a los herbicidas. Los diferentes niveles de toxicidad están relacionados al principio activo y a su concentración. Dada la variabilidad existente sería importante la selección de rizobios tolerantes (Diatloff, 1970); sin perjuicio de la implementación de prácticas agronómicas compatibles.

2.6 ALFALFA

2.6.1 Principales características

Esta leguminosa perenne de ciclo estival es uno de los cultivos forrajeros más antiguos. Sus bondades han permitido que se le haya denominado como “reina de las forrajeras”. Planta prototipo de los cultivos henificables y de los pastoreos rotativos, presenta cualidades excelentes, por sus altos rendimientos en calidad y cantidad de forraje, por su carácter mejorador de suelos y restaurador de fertilidad en las rotaciones, así como por su adaptación satisfactoria a regiones muy diversas.

La alfalfa se adapta a un rango amplio de condiciones climáticas sobreviviendo a temperaturas tan bajas como 60°C bajo cero (Alaska) y tan altas como 54°C sobre cero (California). Crece bien en suelos francos, profundos, con subsuelo permeable y especialmente con buen drenaje. Requiere niveles apropiados de calcio y no soporta suelos de reacción ácida (Carámbula, 1977).

Una de las características de mayor interés de esta especie es su persistencia productiva. Se obtienen buenas producciones de alfalfa de tercer o cuarto año cuando se han logrado establecer un buen número de plantas el primer año, que se mantienen vivas y vigorosas a lo largo de los años (Rebuffo, 1998).

Cabe resaltar que la alfalfa es la forrajera de mayor producción en un año malo, casi el doble que el resto de las leguminosas. Además, tiene las mayores producciones promedio y también las máximas producciones en un año bueno, como se muestra en el cuadro 1.

Cuadro 1: Producción de materia seca (MS) en ton/año en promedio de 20 años para situaciones contrastantes de Trébol blanco, Lotus, Trébol rojo y Alfalfa.

	Trébol blanco	Lotus	Trébol rojo	Alfalfa
Producción Mínima	2,5	2,1	3,2	5,2
Producción Media	7,5	7,6	10	11,5
Producción Máxima	14	14,3	17,9	19,8

Fuente: Formoso com. pers., 1998

Como se puede observar en el cuadro 2 la alfalfa es la leguminosa de mayor producción estival y total en la vida productiva, todo esto lleva a que se la considere en nuestras condiciones como la leguminosa más confiable para la producción de forraje (Formoso com. pers., 1998).

Cuadro 2 : Forraje total producido en la vida productiva (ton MS/ha) de trébol blanco, Lotus, trébol rojo y alfalfa en Uruguay, y distribución estacional (%) de cada una.

	Trébol blanco	Lotus	trébol rojo	alfalfa
Total (ton MS/ha)	15,1	21,5	17,4	32,8
Otoño	12	12	9	9
Invierno	23	14	15	6
Primavera	52	49	50	39
Verano	13	25	26	46

Fuente: Díaz Lago *et al.*, 1996

La instalación de una pastura de leguminosa perenne es la etapa más crítica para obtener una pastura productiva debido a que las especies perennes son de establecimiento lento, presentan un escaso volumen radicular y son sembradas en una época (otoño) en la cual las temperaturas bajan rápidamente (Bordoli com. pers., 1998).

La alfalfa es la leguminosa de mayores requerimientos de fósforo como puede observarse en el cuadro 3.

Cuadro 3: Requerimientos de fósforo para la instalación de diferentes especies de leguminosas en suelos de texturas medias y pesadas del sur y litoral de Uruguay.

ESPECIE	Rango crítico de P Bray N°1 (ppm 0-15 cm de profundidad)
Alfalfa	20-25
Trébol blanco	15-16
Trébol rojo	12-14
Lotus	10-12

Fuente: Bordoli com. pers., 1998

2.6.2 Situación actual de la alfalfa en Uruguay

En Uruguay la alfalfa es la especie forrajera de mayores costos en el año de implantación. Requiere niveles de fósforo alto, uso de herbicidas, y el costo de la semilla por hectárea es elevado, ya que tanto el precio de la semilla como la densidad de siembra son altos (Rebuffo, 1998).

Debido a estos factores y a los problemas de implantación en los años 80 disminuyó significativamente el área sembrada de alfalfa. Este fenómeno se mantuvo hasta los primeros años de los 90, a partir de los cuales se ha impuesto un nuevo

paquete tecnológico, que incluye una reducción de la densidad de siembra y mayor ajuste de la fertilización fosfatada; lo que unido a la aparición de variedades más productivas y persistentes, y a un menor precio de los herbicidas redujo sustancialmente el costo de implantación de la alfalfa, provocando un incremento en el área sembrada (Formoso com. pers., 1998).

2.7 ALFALFA EN SUELOS ÁCIDOS

2.7.1 Problemas

Los suelos ácidos limitan el tipo de cultivo que puede desarrollarse, como su productividad. Algunos cultivos de importancia afectados son las praderas y las leguminosas de grano (Barrientos *et al.*, 1994). Dentro de las leguminosas forrajeras la alfalfa es la que más reciente su producción en suelos con esta característica (Bordoli com. pers., 1998).

La acidez del suelo es un problema complejo debido en parte, a elevadas concentraciones de iones H^+ especialmente cuando el pH es inferior a 5, a toxicidad del aluminio y manganeso, y disponibilidad limitada de calcio, molibdeno y fósforo (Barrientos *et al.*, 1994).

2.7.2 Causas

2.7.2.1 Efecto de la acidez sobre la planta

La alfalfa aparece como la especie más sensible a la toxicidad del aluminio en suelos ácidos, pero puede crecer bien en una solución de cultivo a pH 4,0. El crecimiento de la alfalfa está limitado por concentraciones de 20 μM de aluminio en una solución nutritiva y se inhibe completamente con 80 μM de aluminio.

La toxicidad del aluminio afecta severamente el crecimiento de las raíces por adelgazamiento de los ápices radicales y de las raíces laterales, y reducción de las ramificaciones finas y pelos radicales. Como consecuencia las raíces pueden explorar un volumen limitado de suelo, y presentan serias limitantes para absorber nutrientes y agua (Barrientos *et al.*, 1994).

2.7.2.2 Efecto de la acidez sobre la simbiosis

La iniciación, establecimiento y control de la asociación entre la leguminosa y el rizobio son sensibles a la acidez (Coventry y Evans, 1989).

La fijación de nitrógeno en alfalfa está fuertemente afectada por el pH del suelo; cuando es menor a 6,0 la fijación de nitrógeno se reduce notoriamente debido a una nodulación pobre que se manifiesta a partir de ese pH (Sparrow *et al.*, 1993).

En experimentos con plantas creciendo en medios de agar se observó que pH 5,3-5,4 fue el nivel crítico para la formación de nódulos en alfalfa (Rice *et al.*, 1977).

Resultados obtenidos con distintas leguminosas muestran consistentemente que las etapas tempranas de la nodulación (adhesión, invasión e infección) son las más sensibles a la acidez. La adhesión y la nodulación son sensibles al pH y a los cationes divalentes en solución (Coventry y Evans, 1989).

Los efectos de la acidez del suelo en la nodulación y en la fijación de nitrógeno pueden ser aún más complicados por la existencia de poblaciones indígenas inefectivas de rizobios capaces de competir con los rizobios del inóculo por sitios de nodulación (Rice, 1975).

Bajos niveles de calcio en el suelo reducen la nodulación y el crecimiento de las leguminosas. La sensibilidad al calcio de las etapas tempranas de la nodulación, sugiere que las etapas de reconocimiento y asociación pueden estar involucradas (Coventry y Evans, 1989).

Las limitaciones provocadas por la toxicidad del aluminio puede afectar cualquier etapa de la simbiosis, por ejemplo : sobrevivencia del rizobio en el suelo, su multiplicación en la rizósfera, la infección de las raíces, en la formación y funcionamiento de los nódulos, y el crecimiento de la planta (Barrientos *et al.*, 1994).

Altas concentraciones de manganeso reducen el número de nódulos, pero es difícil separar esta respuesta de la sensibilidad que por si misma tiene la planta. La nodulación es más sensible que el metabolismo de la planta huésped a las deficiencias de molibdeno. Los requerimientos de molibdeno por parte de la nitrogenasa exceden a los de cualquier otra parte de la planta. Se obtuvieron incrementos significativos en el rendimiento de las leguminosas con el agregado de trazas de molibdeno en suelos ácidos (Coventry y Evans, 1989).

2.7.2.3 Efecto del pH sobre el crecimiento del rizobio

En suelos ácidos las poblaciones de algunos rizobios pueden ser bajas y ciertas especies y cepas pueden estar ausentes (Coventry y Evans, 1989).

El componente más sensible en la simbiosis entre especies de *Medicago* y *Sinorhizobium meliloti* es el simbiote procarionta. Esta observación es consistente con otros datos que sugieren que *Sinorhizobium meliloti* es de las bacterias que nodulan raíces la más sensible a la acidez (Clarke *et al.*, 1993).

El nivel crítico de pH en el suelo para la sobrevivencia del rizobio y una adecuada formación de nódulos está alrededor de pH 6,0.

El efecto de la concentración de H^+ puede ser sobre un proceso externo de la membrana citoplasmática (motilidad, sistema sensitivo, transporte de solutos) o sobre un proceso interno (catabolismo, biosíntesis de macromoléculas) los cuales sean sensibles a la acidez.

El rizobio debe mantener su pH interno entre 7,2-7,5 ; por lo tanto las cepas que bajo condiciones de acidez no logran mantener su pH interno disminuyen su crecimiento frente a otras que si tienen esa capacidad, esto sugiere que algún proceso citoplasmático esencial es sensible a la acidez.

La acidez puede impedir la expresión de genes flagelares no permitiéndole al rizobio escapar de zonas de alta concentración de H^+ del suelo o colonizar la raíz del huésped por menor capacidad competitiva.

El pH ácido también afecta la propiedad de carga de los solutos y sus proteínas transportadoras específicas de membrana y por lo tanto disminuye el crecimiento de los rizobios.

Se han descubiertos ciertos genes como son actA, phrR y actS los cuales estarían involucrados en la tolerancia de *Sinorhizobium meliloti* a condiciones de acidez.

El conteo de *Sinorhizobium meliloti* indica menor número de esos organismos a pH del suelo bajos, por lo que se lo considera un factor importante para explicar el pobre crecimiento de la alfalfa a esos pH (Glenn *et al.*, 1997).

En un experimento realizado para estudiar las relaciones ecológicas entre especies de *Medicago* y *Sinorhizobium meliloti* en suelos de varios niveles de pH, se aprecia una significativa relación entre el pH del suelo y el número de rizobios. El pH del suelo fue el principal factor que determinó la población de *Sinorhizobium meliloti*. A pH mayor a 7 el tamaño de la población de *Sinorhizobium meliloti* en el suelo fue de 89.000 por g; por debajo de pH 6 fue de solo 37 por g (Brockwell *et al.*, 1991).

La concentración de calcio en el medio tiene un marcado efecto en el crecimiento y sobrevivencia de la cepa de rizobio. Esto es especialmente importante en condiciones de acidez (Clarke *et al.*, 1993).

El aluminio incrementa el inicio de la división celular de los rizobios, el tiempo que les toma dividirse, y en algunas situaciones la división es incompleta. Altos niveles de manganeso tienen un efecto directo y negativo sobre el crecimiento de los rizobios y bajos niveles de fósforo disminuyen el crecimiento de los mismos (Coventry y Evans, 1989).

2.7.3 Correcciones

2.7.3.1 Encalado

Mediante el encalado de suelos ácidos se logran importantes aumentos en la materia seca producida, número y peso de nódulos, y de la actividad de la enzima nitrogenasa puesto que el aluminio tóxico de la solución del suelo es neutralizado por el carbonato aplicado, proporcionando un ambiente favorable para que el mecanismo de la fijación simbiótica de nitrógeno funcione eficientemente (Barrientos *et al.*, 1994). Sin embargo, el encalado no es económicamente viable en muchos casos por las grandes áreas y los costos de transporte (Rice, 1982).

En ciertos casos se pueden obtener resultados satisfactorios mediante el peleteado de la semilla con CaCO_3 que genera un microambiente favorable para el desarrollo de los rizobios y resulta en una adecuada nodulación (Stout *et al.*, 1997).

La nodulación de leguminosas está relacionada con el tamaño de la población de rizobios en la rizósfera, en suelos moderadamente ácidos donde hay supervivencia pobre con inoculante normal, se puede aumentar la nodulación usando mayores niveles de inóculo en la semilla (White, 1986).

2.7.3.2 Selección de plantas

Las especies vegetales y los genotipos dentro de una especie varían marcadamente en su tolerancia al aluminio, exhibida en términos de mejor crecimiento radical y aéreo, y por lo tanto mayor eficiencia en la utilización de los nutrientes. Pudiendo ser ésta una solución a los problemas de toxicidad del aluminio (Barrientos *et al.*, 1994).

Existen diferencias entre especies en la habilidad para nodular con altos niveles de aluminio y en la sensibilidad de la simbiosis a la acidez. También se encuentran diferencias entre cultivares de las mismas especies, en el tiempo de inicio de la nodulación y en el número de nódulos, bajo estrés que involucraba aluminio, H^+ y calcio (Coventry y Evans, 1989).

En alfalfa la selección de plantas para suelos ácidos y con estrés mineral (toxicidad de aluminio y manganeso) mostró que la tolerancia de la planta es multigenética y heredable; y que la utilización de cepas de *Sinorhizobium meliloti* ácido-tolerantes incrementaba el rendimiento de las plantas cuando se las comparaba con cepas susceptibles.

En un solo ciclo de selección el comportamiento de los germoplasmas ácido tolerantes en suelos ácidos (4,4 y 4,8 bajo fósforo y aplicación de potasio) resultó en un pobre crecimiento de la planta y no hubo diferencias entre germoplasmas. Sin

embargo, cuando se aplicaron altos niveles de fósforo el germoplasma seleccionado por resistencia a la acidez dio un buen rendimiento en suelos de pH 4,4 y 4,8 (Bouton *et al.*, 1981).

Se realizó un estudio de campo durante dos años para determinar si los germoplasmas ácidos tolerantes de alfalfa podrían ser combinados con cepas de *Sinorhizobium meliloti* ácido tolerantes para el establecimiento en suelos moderadamente ácidos o ricos en aluminio. En el primer año los germoplasmas ácido sensibles y ácido tolerantes inoculados con cepas ácido tolerantes tuvieron significativamente mayor número y peso de nódulos, y mayor reducción de acetileno que los controles no inoculados en suelos ácidos (pH 5,0 Al>0,25 cmol Kg⁻¹). Estas diferencias no fueron observadas en el segundo año porque hubo contaminación de las parcelas. En el primer año no se observaron diferencias significativas en pesos de plantas. Sin embargo, en el segundo año los germoplasmas ácido tolerantes inoculados tuvieron mayores pesos de plantas que los germoplasmas ácido sensibles inoculados. En el segundo año los germoplasmas ácido tolerantes y ácido sensibles inoculados en suelos sin calcio presentaron un peso de plantas 71% y 16% respecto a los germoplasmas inoculados en suelos con calcio, respectivamente. Los resultados muestran la importancia de la combinación de germoplasmas de alfalfa resistentes a la acidez y aluminio con *Sinorhizobium meliloti* ácido tolerantes donde la aplicación de calcio no es práctica o económicamente viable (Hartel y Bouton, 1989).

2.7.3.3 Selección de rizobios

Las cepas de rizobios difieren en su supervivencia en suelos de pH menores de 5,5. *Sinorhizobium meliloti* está generalmente ausente o presente en un número insuficiente para adecuados niveles de nodulación a esos pH. (Barber, 1980). Sin embargo, hay diferencias entre cepas de *Sinorhizobium meliloti* en el grado de tolerancia a altas concentraciones de H⁺ y aluminio, los cuales podrían ser seleccionados para utilizarlos en la elaboración de inoculantes comerciales para condiciones de estrés ácido (Glenn *et al.*, 1997).

El porcentaje de aislamientos de rizobios existentes en el suelo a pH 5,0 es mayor que el porcentaje de aislamientos efectivos, lo cual indica, que la menor efectividad de los rizobios puede ser un problema más severo que la no tolerancia a la acidez (Stout *et al.*, 1997).

Un criterio válido para seleccionar rizobios es atender a la capacidad de un rápido crecimiento, particularmente en situaciones de alto H⁺ y aluminio, y tal vez baja disponibilidad de fósforo.

La tolerancia a un factor relacionado a la acidez no significa que los rizobios sean tolerantes a los otros factores. Por lo tanto, obtener rizobios tolerantes a un

rango de factores relacionados a la acidez sería lo más efectivo en un programa de selección (Coventry y Evans, 1989).

Con el descubrimiento de la existencia de genes involucrados en la resistencia del rizobio a la acidez puede ser una solución la manipulación los mismos en el laboratorio para crear cepas ácido tolerantes (Glenn *et al.*, 1997).

2.7.3.4 Agregado de fósforo

La alfalfa tiene bajos rendimientos cuando crece sin agregado de fósforo o encalado. Los efectos de la deficiencia de fósforo son importantes como evidencia del significativo incremento en crecimiento cuando se agrega fósforo a pH del suelo 4,8; conjuntamente a esto hay un descenso de la concentración de aluminio en el tejido a niveles potenciales no tóxicos. El aparente bloqueo del aluminio por parte del fósforo concuerda con trabajos anteriores (Brooks *et al.*, 1982).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 EFECTO DEL pH SOBRE EL CRECIMIENTO DE LA ALFALFA

3.1.1 Origen y características de las variedades

Se evaluaron en este experimento por producción de materia seca a pH 5,2 y pH 7,0 las siguientes variedades comerciales de *Medicago sativa*: Chaná, Crioula, Monarca, WL320, P30, P105, P205, P5715, P5683 y P5929. Dichas variedades difieren en la presencia de latencia invernal y persistencia ;lo que se observa en el cuadro 4.

Cuadro 4 : Características de las variedades de alfalfa utilizadas

VARIEDAD	LATENCIA INVERNAL	PERSISTENCIA
Chaná	corta	larga
Crioula	corta	larga
Monarca	ausente	media
WL 320	larga	larga
P 30	ausente	media
P 105	ausente	media
P 205	larga	larga
P 5715	corta	larga
P 5683	corta	larga
P 5929	ausente	media

Fuente : Rebuffo, 1998 y Labandera, 1999.

3.1.2 Siembra

Se sembraron semillas estériles y pregerminadas en tubos de ensayo (200 x 25mm), conteniendo 20mL de medio Jensen a pH 5,2 y 7,0 (ver apéndice nº1). A los 12 días de la siembra, se les agregó 1 mL de solución de KNO₃ al 1% por tubo.

3.1.3 Diseño experimental y parámetros

Se utilizó un diseño totalmente al azar con diez repeticiones por variedad. Debido a la imposibilidad de realizar este estudio con todas las variedades en forma conjunta, el experimento se subdividió en grupos de variedades. Se utilizó el método estadístico S.A.S Inc NC CARY U.S.A 1998.

La evaluación se realizó por peso seco de la parte aérea. Las plantas se cosecharon a los 36 días de sembradas, se separó la parte aérea a la altura de la corona y luego se secó en estufa a 65°C hasta peso constante.

3.2 SELECCIÓN DE CEPAS DE *Sinorhizobium meliloti* EFICIENTES A pH ÁCIDO Y/O NEUTRO

3.2.1 Procedencia de las cepas a evaluar

Los aislamientos de rizobios a seleccionar se obtuvieron de chacras con una o varias de las siguientes características:

- Alfalfa con edad mayor a cinco años
- Chacras con historia previa de alfalfa, actualmente sin alfalfa
- Cultivos de alfalfa sin inocular
- Chacras con pH ácido
- Chacras ubicadas en áreas representativas de la producción de alfalfa

Se realizaron tres giras de recolección de muestras de suelo de los departamentos de Canelones, San José y Florida; a las que se sumaron muestras más puntuales extraídas de los departamentos de Rocha, Treinta y Tres, Lavalleja, Durazno, Paysandú y Tacuarembó. En macetas conteniendo muestras de estos suelos se sembró semilla de alfalfa cv “Chaná” desinfectada superficialmente (ver apéndice n°2).

También se recolectaron muestras de plantas de trébol de olor (*Melilotus sp.*) de las cuales se separaron nódulos y en la tierra se sembró alfalfa cv “Chaná” desinfectada superficialmente (ver apéndice n°2).

Se realizó un análisis de suelo de cada una de las muestras para determinar pH, fósforo y calcio.

Adicionalmente se trabajó con aislamientos de cepas de rizobios a partir de nódulos que mostraron mejor comportamiento en pH ácido (ver apéndice n°2).

3.2.2 Bacterioteca

3.2.2.1 Aislamiento y conservación de las cepas de *Sinorhizobium meliloti*

Se buscaron los nódulos de mayor tamaño, que estuvieran cerca del cuello de la planta, con el propósito de realizar una selección de aquellas cepas que hubieran realizado nodulaciones tempranas.

De cada maceta se extrajeron dos nódulos; cada uno de ellos se desinfectó superficialmente y se aplastó con una varilla de vidrio en agua estéril, dentro de una caja de Petri. De la suspensión originada se realizaron estrías por agotamiento en medio de cultivo extracto de levadura manitol agar (M 79) con rojo congo a pH 7,0 (ver apéndice n°1). Las placas se incubaron invertidas a 28C°. Se eligió una colonia

aislada, y se realizaron repiques en tubos róscados con medio extracto de levadura manitol agar.

3.2.2.2 Caracterización simbiótica de rizobios de alfalfa a dos pH

Generalidades

Se evaluaron 57 cepas de rizobios (ver apéndice nº3) en su capacidad de fijación de nitrógeno en condiciones controladas (pH 5,2 y pH 7,0). Se usó como huésped alfalfa cv “Chaná”.

Siembra e inoculación

Se sembraron semillas estériles pregerminadas en tubos de ensayo (200x25mm), conteniendo c/u 20mL de medio Jensen sin nitrógeno a pH 5,2 y 7,0 (ver apéndice nº1). A los 4-6 días de sembradas, se inocularon esas plantas con 1mL de una suspensión de las cepas obtenidas a partir de un cultivo en agar inclinado.

Tratamientos testigos

Se usaron cuatro tratamientos de referencia: tratamiento sin nitrógeno (T) y otro con nitrógeno (N) (a las plantas se les agregó 1 mL/tubo de solución de KNO₃ al 1%, y cepas de referencia (las plantas se inocularon con las cepas U137 y U143 usadas en el inoculante comercial empleado en el país).

3.2.3 Diseño experimental y parámetros

Se utilizó un diseño de parcelas al azar con cuatro repeticiones por tratamiento. Debido a la imposibilidad de realizar este estudio con todas las cepas en forma conjunta, el experimento se subdividió en grupos de cepas. Cada grupo contó con sus respectivos testigos: tratamiento con y sin nitrógeno, y cepas de referencia. Se utilizó el método estadístico S.A.S Inc NC CARY U.S.A 1998.

Luego de un primer período de selección se eligieron 13 de las 57 cepas probadas por mayor producción promedio de MS que las cepas comerciales a pH 7,0 y/o 5,2 (ver apéndice nº3), y se las evaluó de idéntica forma.

La evaluación se realizó por peso seco de la parte aérea. Las plantas se cosecharon a los 48 días de sembradas, se les separó la parte aérea a la altura de la corona y luego se secó en estufa a 65°C hasta peso constante.

3.3 EFECTO DEL pH SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Sinorhizobium meliloti*

Se evaluó la habilidad de las cepas comerciales de *Sinorhizobium meliloti* U137 y U143 para crecer en extracto de levadura manitol agar con rojo congo a pH 5,0; 5,2 ; 5,4 ; 5,6 y 5,8 ; los cuales luego de ser esterilizados en autoclave tuvieron un pH final de 5,1 ;5,2 ; 5,5 ; 5,6 y 5,7 respectivamente. Las cepas se sembraron en cajas de Petri en estrias por agotamiento. Las placas se incubaron invertidas a 28°C durante 6 días (ver apéndice n°1).

3.3.1 Diseño experimental y parámetros

Se utilizó un diseño experimental de tratamientos al azar con dos repeticiones por tratamiento. Se utilizó el método estadístico S.A.S Inc NC CARY U.S.A 1998.

La evaluación se realizó por estimación subjetiva del desarrollo de las colonias efectuado por 3 observadores independientes en base a un índice de 1 (escaso crecimiento) a 5 (abundante crecimiento).

3.4 EFECTO DEL CALCIO EN LA NODULACIÓN Y PRODUCCIÓN DE MATERIA SECA DE LA ALFALFA EN pH ÁCIDO

3.4.1 Siembra e inoculación

Se sembraron semillas esterilizadas pregerminadas de alfalfa cv “Chaná” en tubos de ensayo (200 x 25mm), conteniendo 20mL de medio Jensen a pH 5,2 (ver apéndice n°1).

A los 5 días de sembradas, se inocularon 1/3 de esas plantas con 1mL de una suspensión de un cultivo, en agar inclinado de las cepas comerciales de *Sinorhizobium meliloti* U 137, otro tercio con U 143 y a las restantes se les agregó 1 mL de KNO₃ al 1% por tubo. Se utilizaron tres niveles de calcio soluble (cloruro de calcio) en el medio Jensen: 0 - 0,025 y 0,25 g/L.

3.4.2 Diseño experimental y parámetros

Tratamiento testigo : se usó un solo tratamiento de referencia que fue testigo sin calcio (las plantas crecen en el tubo sin el agregado de calcio soluble). Se utilizó un diseño de tratamientos al azar con cinco repeticiones por tratamiento. Se utilizó el método estadístico S.A.S Inc NC CARY U.S.A 1998.

La evaluación se realizó por peso seco de la parte aérea. Las plantas se cosecharon a los 33 días de sembradas y se les separó la parte aérea a la altura de la corona, luego se secó en estufa a 65°C hasta peso constante.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 EFECTO DEL pH SOBRE EL CRECIMIENTO DE LA ALFALFA

Las medias registradas en el cuadro 5 nos indican claramente que la alfalfa no se ve afectada por el pH dentro de los rangos utilizados. Esto es coincidente con lo publicado por Barrientos *et al.* (1994) donde expresa que la alfalfa es capaz de crecer bien en solución de cultivo a pH 4,0.

Cuadro 5: Producción media de materia seca en mg/tubo para distintas variedades comerciales de alfalfa pH 5,2 y pH 7,0.

VARIEDAD	pH 5,2		VARIEDAD	pH 7,0
Monarca	372.4 a		Monarca	369.8 a
5683	366.2 ab		5929	350.5 ab
5715	328.6 bc		5683	334.4 ab
Crioula	323.2 c		Crioula	329.9 bc
Chaná	321.9 c		Chaná	326.9 bc
P30	303.2 cd		P30	321.8 bc
5929	297.9 cd		P105	291.9 c
P105	296.6 cd		5715	291.8 c
WL320	267.2 de		P205	250.3 d
P205	247.8 e		WL320	245.7 d
Media	312.5A		Media	311.3A

Valores con diferente letra difieren significativamente al 5%.

Esta tendencia se refiere a la producción de MS, pero no brinda información sobre el comportamiento simbiótico, ya que el parámetro MS no fue usado para cuantificar FBN debido a que el experimento solo buscaba obtener información sobre el crecimiento de la alfalfa a pH ácido.

Se encontraron diferencias significativas entre variedades de alfalfa en producción de MS y no así entre pH. Solo la variedad 5929 fue significativamente superior al 5% a pH 7,0 con respecto a pH 5,2 para éste parámetro. Se observa una tendencia de interacción significativa al 8 % entre las distintas variedades y el pH, ya que algunas se comportan mejor a pH ácido (pH 5,2) y otras lo hacen a pH neutro (pH 7,0) (ver apéndice n°6).

Estos resultados no estarían cerrando la investigación sobre el hésped como forma de contribuir a resolver el problema de la baja producción de la alfalfa en condiciones de acidez; ya que no se consideró el comportamiento simbiótico a pH ácido; a su vez la tendencia de algunas variedades a comportarse mejor a pH 5,2 pueden estar marcando una adaptación genética para condiciones de acidez.

4.2 SELECCIÓN DE CEPAS DE *Sinorhizobium meliloti* EFICIENTES A pH ÁCIDO Y/O NEUTRO

A pH 7,0 el máximo valor lo obtuvo el tratamiento sin inocular con N combinado, como se desprende del cuadro 6. La cepa 1 fue la que obtuvo el mayor rendimiento en MS, siendo significativamente superior al 1%, a todas las demás cepas probadas e incluso a las dos cepas comerciales.

Cuadro 6 : Producción media de materia seca en mg/tubo de las plantas de alfalfa cv. Chaná inoculadas con las cepas seleccionadas a pH 7,0

CEPA	pH 7,0
N	432.4 a
1	272.2 b
84	219.0 c
12	176.8 d
U143	176.0 d
81	175.6 d
8	170.8 d
88	167.0 de
90	150.6 def
U137	149.6 def
27	148.6 def
16	130.4 efg
76	130.0 efg
18	128.2 efg
17	128.2 efg
3	118.2 fg
T	103.0 g

Valores con diferente letra difieren significativamente al 5%.

El rendimiento de la cepa 1 fue un 63% del obtenido por el tratamiento con N combinado; y un 82% y 55% superior que las cepas comerciales U137 y U143 respectivamente.

También se destacó la cepa 84 que fue significativamente superior a todas las cepas al 5%. Las cepas 8, 12, 81, 88 tuvieron rendimientos promedios aceptables, pero sin encontrarse diferencias significativas con las comerciales.

Se encontró gran variabilidad entre cepas a pH 7,0, lo que demuestra la viabilidad de un programa de selección.

A pH 5.2 el escaso rendimiento en MS de la alfalfa se debe a la ausencia de nodulación debida a la sensibilidad de la simbiosis a la acidez como es citado en la bibliografía por Rice (1975), Rice *et al.* (1977), Coventry y Evans_ (1989) y Sparrow *et al.* (1993); o al pobre crecimiento del rizobio en pH del suelo ácido como lo expresan Coventry y Evans_ (1989), Clarke *et al.* (1993) y Glenn *et al.* (1997).

4.3 EFECTO DEL pH SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Sinorhizobium meliloti*

El cuadro 7 muestra que el pH ácido afecta marcadamente el crecimiento de las cepas de *Sinorhizobium meliloti* (ver apéndice nº4). Esto está de acuerdo con lo publicado en 1993 por Clarke *et al.*, donde se señala que el componente más sensible en la simbiosis entre especies de *Medicago* y *Sinorhizobium meliloti* es el simbiote procariota y con Glenn *et al.*, 1997 que indica un menor número de rizobios en suelos ácidos lo que podría ser considerado un factor importante para explicar el pobre crecimiento de la alfalfa a ese pH.

Cuadro 7: Desarrollo de las colonias (escala 1 a 5) media de dos repeticiones por tratamiento de las cepas comerciales de alfalfa U137 y U143.

pH	5,1	5,2	5,5	5,6	5,7
MEDIA	1.0000 d	2.0833 c	3.8333 b	3.8333 b	5.0000 a

*Valores con diferente letra difieren significativamente al 5%.

4.4 EFECTO DEL CALCIO EN LA NODULACIÓN Y PRODUCCIÓN DE MATERIA SECA DE LA ALFALFA EN pH ÁCIDO

El cuadro 8 muestra que existen diferencias significativas debidas al tratamiento sin inocular con nitrógeno combinado(ver apéndice nº6). No existen diferencias significativas entre los tratamientos con calcio ni interacción cepa niveles de calcio. Es importante señalar que las plantas inoculadas no produjeron nódulos en ninguno de los niveles de calcio. Sin embargo las plantas creciendo con nitrógeno combinado tienden a responder al incremento en los niveles de calcio (ver apéndice nº5).

Cuadro 8: Producción media de materia seca en mg/tubo para plantas inoculadas con las cepas comerciales de alfalfa a pH 5,2 y con distintos niveles de calcio en el medio de cultivo.

Cepa	CALCIO			F
	0.0 g/L	0.025 g/L	0.25 g/L	
U137	90.8 a	108.2 a	101.8 a	NS
U143	106.8 a	90.6 a	105.6 a	NS
N	204.4 b	214.6 b	226.0 b	NS
F	++	++	++	

*Valores con diferente letra difieren significativamente al 5%

Esto no coincide con lo expuesto por Coventry y Evans. (1989) y Clarke *et al.* (1993) que señalan efectos positivos del calcio en la sobrevivencia y el crecimiento del rizobio, en la nodulación y crecimiento de la alfalfa en condiciones de acidez. Sin embargo, podría existir un efecto positivo en campo mediante el encalado, por descenso de los niveles aluminio y manganeso intercambiables a niveles no tóxicos en suelos ácidos (Barrientos *et al.*, 1994).

5. CONCLUSIONES

- La alfalfa crece bien dentro de los rangos estudiados de pH (5,2-7,0) si se le aportan los nutrientes necesarios. Por lo tanto, el efecto directo de la acidez sobre la planta no sería la causa para su baja producción en esas condiciones.
- Algunas variedades (5683, 5715 y WL 320) tienden a producir más MS a pH 5,2 que a pH neutro cuando crecen en presencia de nitrógeno combinado. Esto podría sugerir una adaptación genética de las mismas a la acidez, lo que debería ser estudiado en futuros trabajos.
- La alfalfa creciendo a pH 5,2 e inoculada con las cepas seleccionadas en ningún caso noduló, por lo tanto tuvo bajo rendimiento en MS; esto puede explicar la pobre performance del cultivo en suelos ácidos.
- El crecimiento de los rizobios se ve marcadamente afectado por el pH ácido (5,1), lo que podría explicar la ausencia de nodulación en alfalfa a pH 5,2.
- El agregado de calcio no favoreció la nodulación de la alfalfa en condiciones de acidez, que continuó sin nodular con las cepas analizadas.
- Dentro de las cepas evaluadas, dos de ellas (cepas 1 y 84) obtuvieron rendimientos significativamente superiores a las restantes y a las dos cepas comerciales a pH 7,0.
- Las cepas mostraron gran variabilidad en producción de MS a pH 7,0, lo que confirma la viabilidad de un programa de selección de cepas.
- Los datos obtenidos dejan una línea de investigación abierta para continuar profundizando en las causas y posibles soluciones al problema de la alfalfa en suelos ácidos.

6. RESUMEN

La alfalfa se caracteriza por ser la forrajera usada en el país, de mayor producción de MS, presentando un alto nivel de fijación de nitrógeno atmosférico en simbiosis con *Sinorhizobium meliloti*. Sin embargo, esta planta no se adapta bien a suelos con pH ácido, lo que restringe su producción en áreas con estas características. La limitada producción de la alfalfa en suelos ácidos puede deberse a un efecto directo del pH sobre el crecimiento de la planta y/o del rizobio; o sobre la simbiosis.

Como respuesta a este problema se plantearon como objetivos: estudiar el efecto directo del pH sobre el crecimiento de la alfalfa; seleccionar cepas de *Sinorhizobium meliloti* eficientes a pH ácido y/o neutro; estudiar el efecto de distintos pH en el crecimiento de *Sinorhizobium meliloti* y estudiar el efecto del calcio en la simbiosis *Sinorhizobium meliloti*-alfalfa en pH ácido. Se evaluó el crecimiento de 10 variedades comerciales de alfalfa a pH 5,2 y 7,0, sin limitantes de nitrógeno, se aislaron cepas de rizobio y se inocularon plantas de alfalfa en tubos con medio Jensen con estas cepas para evaluar la producción de MS a pH 5,2 y 7,0. En todos los casos se utilizaron las cepas comerciales como referencia.

Los resultados permiten concluir que la alfalfa no es afectada por el pH en los rangos utilizados (5,2-7,0), mientras los rizobios sí son afectados, ya que ninguna de las 13 cepas analizadas noduló a pH 5,2. El agregado de calcio no favoreció la nodulación en condiciones de acidez. A pH 7,0 se encontraron 2 cepas que obtuvieron rendimientos mayores a las otras probadas y a las cepas comerciales. No se encontraron cepas promisorias a pH 5,2.

De los resultados obtenidos se infiere la importancia de continuar con esta línea de trabajo ya que la planta huésped en si misma no presenta problemas para crecer a pH ácido si se le aportan los nutrientes necesarios.

7. SUMMARY

Medicago sativa, one of the main “pastures” used in our country with a great production of MS, has a high level of N₂-fixation in symbiotic conditions with *Sinorhizobium meliloti*. However, this plant does not adapt well to acid soils, which is an important restriction for its production in such areas. Its limitation to grow in acid soils could be due to a direct effect of the pH on the plant growth and/or on the rhizobia, or on the symbiosis itself.

As a response to this problem we set up the following objectives: to study the effect of the pH on the plant growth; to select strains of *Sinorhizobium meliloti* which are efficient at pH acid or/and neutral; to study the effect of different pH on the development of *Sinorhizobium meliloti*; and to study the effect of calcium on the symbiosis *Sinorhizobium meliloti* - *Medicago sativa* at pH acid. Ten commercial varieties of *Medicago sativa* were evaluated at pH 5,2 and 7,0 without nitrogen limitation. Strains of rhizobia were isolated and inoculated in *Medicago sativa* in order to evaluate MS production at the above mentioned pH. Commercial standards were used as references in all the cases.

Through these studies we could conclude that the plant is not affected by the pH in a range between pH 5,2-7,0, while rhizobia are in fact affected by such pH, none of the 13 strains evaluated nodulated at pH 5,2. The supply of calcium did not improve nodulation in the acid conditions. Two strains were found at pH 7,0, which had better performance than the rest, including the reference strains. No promising strains were found at pH 5,2.

The results obtained with this research infer the importance of keeping track of this investigation, since the plant itself does not present any restriction to grow at pH acid when supplying the nutrients.

8. BIBLIOGRAFÍA

- 1- ABRIL, A.; KOPP, S. 1992. Evaluación de cepas de *Rhizobium sp.* Para *Macroptilium atropurpureum* y *Centosoma Virginianum* en el centro-norte de la Provincia de Córdoba. In Reunión Latinoamericana de Rhizobiología ,(16a., 1992, Santa Rosa, La Pampa) Anales. Santa Rosa, La Pampa, ALAR, p 217

- 2- ALCARAZ, M.; PASTOR, M.; BALETTI, A. 1992. Estudios sobre preinoculación de semillas. In Reunión Latinoamericana de Rhizobiología ,(16a., 1992, Santa Rosa, La Pampa) Anales. Santa Rosa, La Pampa, ALAR, pp 99-107

- 3- AMARGER, N. 1975. Competition between strains of *Rhizobium* for the formation of nodules: Selection of competitive strains. 5° American *Rhizobium* Conference (5°, Aug.11-14).paginas

- 4- BALATTI, P.; JARDIM FREIRE, J.R. 1996. Legume inoculants. Selection and Characteritacion of strains. Production, use and management. Argentina, Kingraf. 148p

- 5- BARBER, L. E. 1980. Enumeration, effectiveness, and pH resistance of *Rhizobium meliloti* populations in Oregon soils. Soil Science Soc. American Journal 44:537-539

- 6- BARRIENTOS, L. ; CAMPILLO, R. ; MÉNDEZ, E. 1994. La acidez del suelo y su efecto sobre la Fijación simbiótica de Nitrógeno en leguminosas forrajeras. Agricultura técnica(Chile) 54 (2) :118-123

- 7- BARRIOS, S.; RAGGIO, N.; RAGGIO, M.1963.Efects of temperature in infection of isolates bean roots by *Rhizobium*.Plant Physiology 38: 171-174

- 8- BERGERSEN, F. J. 1985.Reconocimiento de cepas por la estructura de sus nódulos. *Rhizobium* Newsletter (1): 30

- 9- BOUTON, H; SUMMER, M. E.; GIDDENS, J. E. 1981. Alfalfa, *Medicago sativa* L, in highly weathered, acid soils. II Yield and acetylene reduction of a plant germplasm and *Rhizobium meliloti* inoculum selected for tolerance to acid soil. Plant and Soil 60:205-211

- 10- BROCKWELL,.; DUDMAN, W.F.1968. Ecological studies or root nodule bacteria introduced into field environment.II: Initial competition. Australian Journal Agriculture Research 19: 749-757

- 11- _____ ; J.1970. Ecological determinants in legume Rhizobia associations. *Rhizobium* Newsletter (2)15

- 12- _____; DUDMAN, W.F. 1968. Ecological studies on root nodule bacteria introduced into field environment. II: Initial competition. *Australian Journal of Agriculture Research* 19: 749-757
- 13- _____; PILKA, A.; HOLLIDAY, R. A. 1991. Soil pH is a major determinant of the numbers of naturally occurring *Rhizobium meliloti* in non-cultivated soils in central New South Wales. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 31:211-219
- 14- BROOKS, C.O.; BOUTON J. H.; SUMMER M.E. 1982. Alfalfa, *Medicago sativa* L, in highly weathered, acid soils. III. The effects of seedling selection in an acid soil on alfalfa growth at varying levels of phosphorus and lime. *Plant and Soil* 116: 283-285
- 15- BUSHBY, H. V.; MARSHALL, K.C. 1977. Some factors affecting the survival of root nodule bacteria on desiccation. *Soil Biology Biochem.* 9: 143-147.
- 16- CARÁMBULA, M. 1977. Producción y manejo de pasturas sembradas. Uruguay, Hemisferio Sur. 464p.
- 17- CARRILHO NETO, A.; LEMOS, E. G. M. 1996. Evaluación de la Eficiencia, en campo, de las variantes JABv25 y JABv26 de la cepa SEMIA 5079. In Reunión Latinoamericana de Rhizobiología, (18a., 1996, Santa Cruz de la Sierra) Memorias. Santa Cruz de la Sierra, ALAR, pp 53-55.
- 18- CLARKE, L. M.; DILWORTH, M. J.; GLENN, A.R. 1993. Survival of *Rhizobium meliloti* WSM419 in Laboratory culture effect of combined pH shock and carbon substrate stress. *Soil Biology Biochem.* 25 :1289-1291
- 19- COVENTRY, D. R.; EVANS, J. 1989. Symbiotic Nitrogen Fixation and Soil Acidity. *Soil Acidity and Plant Growth* Academic Press. Australia. 103-137
- 20- DATE, R. A. Selección de cepas de *Rhizobium*. Informe al gobierno uruguayo. FAO N° 2012. Sobre inoculación de leguminosas y producción de inoculantes para leguminosas. Roma 1965.
- 21- DIATLOFF, A. 1970. Effects of some pesticides in the root nodules bacteria and on the nodulation. *Australian Journal Experimental Agriculture and Animal Husbandry* 15(2) 46: 562-567
- 22- _____; HUTTON, D.G. 1974. Charcoal additive to Leonard jars to improve growth of *Phaseolus vulgaris*. *Rhizobium Newsletter* L 19 (1): 32-33

- 23- _____; BROCKWELL, J. 1976. Ecological studies into field environment of root nodule bacteria. *Australia Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry*. 16.páginas
- 24- DÍAZ LAGO, J. E.; GARCÍA, J. A.; REBUFFO, M. 1996. Crecimiento de leguminosas en La Estanzuela. Serie Técnica INIA N° 71.12p
- 25- DÖBEREINER, J. 1965. Evaluation of N fixation in legumes by the regression of total plant Nitrogen with nodule weight. *Rhizobium Newsletter* 10 (2):139-146
- 26- FRANCO, A; DÖBEREINER, J. 1967. Host plant specificity in the symbiosis of beans, and the interference of several nutrients. *Rhizobium Newsletter* 12 (2).
- 27- _____. 1996. Importancia de la Fijación Biológica del Nitrógeno en la recuperación de la fertilidad y en la sustentabilidad de los sistemas agrícolas. In Reunión Latinoamericana de Rhizobiología , (18a., 1996, Santa Cruz de la Sierra) Memorias. Santa Cruz de la Sierra, ALAR, pp 1-19
- 28- FRIONI, L. 1990. Ecología microbiana del suelo. Montevideo, Dep. Publicaciones de la Universidad de la República. 519 p.
- 29- FRONTERA, G.; GRILLO, M.; IRIBARNE, M. 1992. Respuestas de algunas variedades de alfalfa a la inoculación con cepas de *Rhizobium meliloti* . In Reunión Latinoamericana de Rhizobiología ,(16a., 1992, Santa Rosa, La Pampa) Anales. Santa Rosa, La Pampa, ALAR, pp 55-62
- 30- GILI, P.; MARANDO, G.; SAGARDOY, M. 1992. Algunas características biológicas de cepas de *Rhizobium meliloti* aisladas de suelos de Alto Valle del Río Negro y Neuquén, Argentina. In Reunión Latinoamericana de Rhizobiología, (16a., 1992, Santa Rosa, La Pampa) Anales. Santa Rosa, La Pampa, ALAR, p 229
- 31- _____; MARANDO, G.; SAGARDOY, M. 1996. Comportamiento de inoculantes múltiples fabricados con cepas naturalizadas de *Rhizobium meliloti* en suelos del Alto Valle de Río Negro y Neuquén, Argentina. In Reunión Latinoamericana de Rhizobiología , (18a., 1996, Santa Cruz de la Sierra) Memorias. Santa Cruz de la Sierra, ALAR, pp 63-65
- 32- GLENN, A. ; TIWARI, R. ; REEVE, W. ; DILWORTH, M. 1997. The response of root nodule bacteria to acid stress. In : Plant-Soil Interactions at Low pH : Sustainable Agriculture and Forestry Production ; Proceedings of the International Symposium on Plant-Soil Interactions at Low pH, 4 ; Belo Horizonte, MG (Brazil) ; 17-24 Mar 1996. Moniz, A.C. ; Furlani, A. M. C. ; Schaffert, R. E. ; Ezzell, B. ; Rosolem, C.A. ; Cantarella, H. ; (eds.). Campinas, SP (Brazil) : Brazilian Soil Science Society. pp.123-138

- 33- HARDARSON, G.; GARETH JONES, D. 1979. Variation within and between white clover varieties in their preference for strains of *Rhizobium trifoli*. *Ann. Appl. Biology*. 92: 221-228
- 34- HARTEL, P. G., BOUTON, J. H. 1989. *Rhizobium meliloti* inoculation of alfalfa selected for tolerance to acid, aluminum-rich soils. *Plant and soil* 116: 283-285
- 35- HELY, F.W. 1963. Relationship between effective nodulation and time to initial nodulation in a diploid line of *Trifolium Ambigum*. *Australian Journal Biology of Science* 16: 43-54
- 36- HERVAS, H.; LLUCH, C. 1991. Ecología del *Rhizobium* en el suelo. In *Aportaciones a la Biología de la Fijación del Nitrógeno Atmosférico*. Eds. M. Megías Guijo, A. J. Palomares Díaz, F. Ruiz Berraquero. España, Universidad de Sevilla .pp 357-365.
- 37- INDARTE, J. 1969. Contribución al estudio en Trébol subterráneo y en Trébol polimorfo de la relación *Rhizobium-Rhizobium* y *Rhizobium-planta*. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay, Facultad de Agronomía .41p
- 38- KOCH, B.; EVANS, H. J. 1967. Reduction of acetylene and N gas by breis and cell free extracts of soybean root-nodules .*Plant Physiology* 42: 466-468
- 39- LABANDERA, C.A.; VINCENT, J.M. 1975. Competition between an introduced strain and native strains of *Rhizobium trifoli*. *Plant and Soil* 42: 327-347
- 40- LABANDERA, M. 1999. Resultados experimentales de evaluación de cultivares. *Especies forrajeras Parte II*. INIA. p-p 6-17
- 41- LIE, T. A. 1968. The effect of low pH on different stages of nodule formation in pea plants. *Plant and soil* 31: 391-406
- 42- LINDSTROM, K.; MYLLYNIEMI, H. 1987. Sensitivity of red clover rhizobia to soil acidity factors in pure culture and in symbiosis. *Plant and Soil* 98: 353-362
- 43- LOWENDORF, H. S.; BAYA, A.M.; ALEXANDER, M. 1981. Survival of *Rhizobium* in Acid soils *Applied and environmental Microbiology*. 42(6): 951-957
- 44- NACKIE MARTINEZ, F. 1974. Efectividad y adaptabilidad de *Rhizobium trifoli* aisladas de Alpachaka en arena estéril, especie indicadora: Trébol rojo. VII RELAR. Argentina.

- 45- MARQUES PINTO, C.; PHAILKY, XAÔ; VINCENT, J. 1974. Nodulating competitiveness among strains of *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium trifoli*. Australian Journal Agriculture Research 25: 317-329
- 46- MORÓN, A. 1996. Producción y manejo de pasturas . Serie Técnica INIA N°80 p-p 21-32
- 47- PAGLIANO, D. 1985. Caracterización y evaluación simbiótica de cepas de *Rhizobium trifoli* aisladas de mejoramientos forrajeros con características de persistencia. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay, Facultad de Agronomía. 292p
- 48- PATE, J. S.; DART, P. J. 1961. Nodulation studies in legumes.IV: the influence of inoculum strains and time of application of ammonium nitrate on symbiotic response. Plant and Soil 15: 329-346
- 49- PHILPOTTS, N. 1977. Effect of inoculation method on survival and plant nodulation under adverse conditions. Australian Journal Experimental Agriculture and Animal Husbandry 7: 308-315
- 50- PONS, A.L.; GOEDFERT, C.F.; OLIVEIRA, F.C. 1976. Efeito da adubação nitrogenada em feijoeiro. Agriculture Journal 12: 201-206
- 51- REBUFFO, M. 1998. Jornada de alfalfa. INIA. p-p 1-5
- 52- RICE, W. A. 1975. Effects of CaCO₃ and inoculum level on nodulation and growth of alfalfa in acid soil. Can. Journal Soil Science 55:245-250
- 53- _____; PENNEY, D. C.; NYBORG, M. 1977. Effects of soil acidity on rhizobia numbers, nodulation and nitrogen fixation by alfalfa and red clover. Can. Journal Soil Science 57: 197-203
- 54- _____. 1982. Performance of *Rhizobium meliloti* strains selected for low-pH tolerance. Can. Journal Plant Science 62:941-948
- 55- ROBINSON, A.C. 1969 . Competition between effective and ineffective strains of *Rhizobium trifoli* in the nodulation of Trébol Subterráneo. Australian Journal Agriculture Research 20:827-842
- 56- _____. 1969. Host selection for effective *Rhizobium* by red clover and subterranean clover in the field. Australian Journal of Agricultural Research. 20:1053-1060
- 57- ROUGHLEY, R. J.; DART, P. J. 1970. Root temperature and root hair infection of *Trifolium Subterráneo*. Plant and Soil 32: 518-520

- 58- _____; DART, P. J. 1970. Growth of *Trifolium subterranean* selected for sparse and abundant nodule as affected by root, temperature and *Rhizobium* strain. *Journal Experimental Bot.* 21(68): 776-786
- 59- SHROEDER, E. C. 1970. Métodos de selección de cepas de *Rhizobium trifoli* para trébol subterráneo. *Ensayos de Laboratorio. V RELAR. Brasil.*
- 60- SPARROW, S. D. ; COCHRAN, V. L. ; SPARROW, E. B. 1993. Herbage yield and nitrogen accumulation by seven legume crops on acid and neutral soils in a subarctic environment. *Can. Journal Plant Science* 73 :1037-1045
- 61- STOUT, D. ; BROERSMA, K. ; ACHARYA, S. 1997. Seed preinoculation and soil liming for growth of forage legumes on acidic clay soils. *Journal of Agricultural Science. Cambridge* 128 : 51-57
- 62- VAN SHREVEN, D. A. 1974. Some factors affecting growth and survival of *Rhizobium* specie in soil peat culture. *Plant and soil* 32:113-130
- 63- VINCENT, J. M.; WATERS, 1953. The influence of the host on competition amongst clover root-nodule bacteria. *Journal Gen. Microbiology* 9: 357-370
- 64- _____. 1964. Principios de selección de cepas. *Rhizobium Newsletter* 9: 1
- 65- _____. 1965. Environmental factors in the fixation of N by legumes. *In Soil Nitrogen*. Eds. W.V. Bartholomew y F.E. Clark. American soc. of Agronomy, Madison, Wisconsin. Pp 384-439
- 66- _____. 1967. Symbiotic specificity. *Australian Journal Science* 29(7): 192-197
- 67- _____. 1975. *Manual Práctico de Rizobiología*. Buenos Aires, Hemisferio Sur. 200 p.
- 68- WHITE, J. G. H. 1986. Nodulación y fijación de nitrógeno en alfalfa. *In Investigación, Tecnología y Producción de alfalfa. Colección científica INTA tomo 22*. Eds. C. Bariggi; C. Itria; L. Marble; J. Brun. Buenos Aires, Argentina. pp 59-79.
- 69- WILSON, K. J.; SESSITSCH, A.; BECK, D. 1996. Biología molecular en el campo: genes marcadores para la visualización rápida y precisa de la competición entre cepas rizobianas y la colonización por bacterias de raíces de plantas. *In Reunión Latinoamericana de Rizobiología*, (18a., 1996, Santa Cruz de la Sierra) *Memorias. Santa Cruz de la Sierra, ALAR*, pp 147-163

9. APÉNDICES

APÉNDICE 1:

MEDIO EXTRACTO DE LEVADURA MANITOL AGAR (Vincent, 1970)

K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
Manitol	10,0 g
Extracto de levadura	0,4 g
Agar	15,0 g
Agua destilada	1000,0 mL
pH	6,8-7,0
(Rojó Congo : 10 mL/L de una solución 1/400)	

MEDIO JENSEN PARA PLÁNTULAS (Vincent, 1970)

CaHPO ₄	1,0 g
K ₂ HPO ₄	0,2 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,2 g
FeCl ₃	0,1 g
Agar	8,0 g
Agua destilada	1000,0 mL
pH	6,5-7,0

MÉTODOS

A- ESTERILIZACIÓN DE NÓDULOS

Los nódulos se sumergen en las siguientes soluciones de :

- 1) Etanol 95% durante 1 minuto.
- 2) Hipoclorito al 1% durante 2-3 minutos.
- 3) Agua destilada estéril durante 1 minuto
(se repite de 6 a 7 veces).

B-SIEMBRA DE SEMILLAS DE ALFALFA

En un Erlenmeyer con tapón roscado, se lleva a cabo el mismo proceso de esterilización de nódulos. Las semillas se dejan en agua estéril 20 minutos en baño maria a 42°C ; después son llevadas a heladera por un lapso de 24 horas a 4°C ,luego se saca el agua y se adhieren a las paredes con un movimiento rotatorio. Se colocan en estufa a 28°C, germinando a las 24 horas. Se siembran en tubos con medio Jensen en condiciones estériles.

C-MEDIDAS DE pH

Se mide el pH de los distintos experimentos como respaldo luego de autoclavados, en un erlenmeyer, a temperatura normal (15°C), se rompe físicamente el medio Jensen mediante el uso de una varilla estéril y se agrega agua destilada para mejorar el contacto con el electrodo del medidor de pH (Castiglioni com.pers., 1999).

APÉNDICE 2: Especificaciones del origen de las 13 cepas seleccionadas para la prueba final a pH 5,2 y pH 7,0.

Cuadro 1: Cepa 76 PC

Nombre del recolector	Juan Parra
Fecha de recolección	18/08/98
Nombre de la planta hospedera	Alfalfa
Nombre de la localidad	Fray Marcos
Dirección	Ruta 94 Km. 102
Nombre del productor	Ramón Marichal
Historial del potrero	Alfalfa de 7° año
Análisis de suelo	pH: 5.7 P: 14 ppm Ca: 12.4 meq/100 g de suelo
Especificaciones del aislamiento	se siembran semillas de alfalfa (desinfectadas superficialmente) en esa tierra y se aíslan nódulos

Cuadro 2: Cepa 18 PC

Nombre del recolector	Juan Parra
Fecha de recolección	18/08/98
Nombre de la planta hospedera	Alfalfa
Nombre de la localidad	Colonia Treinta y Tres Orientales
Dirección	Ruta 6
Nombre del productor	Gonzalo Urioste
Historial del potrero	-----
Análisis de suelo	pH: 6.0 P: 5 ppm Ca: 11.8 meq/100 g de suelo
Especificaciones del aislamiento	se siembran semillas de alfalfa (desinfectadas superficialmente) en esa tierra y se aíslan nódulos

Cuadro 3: Cepa 8 PC

Nombre del recolector	Juan Parra
Fecha de recolección	18/08/98
Nombre de la planta hospedera	Alfalfa
Nombre de la localidad	Rincón de Conde - San Ramón
Dirección	Ruta 63 Km. 9 Camino a la costa
Nombre del productor	Luis Moreira
Historial del potrero	Alfalfa de 2° año
Análisis de suelo	pH: 5.7 P: 29 ppm Ca: 12.4 meq/100 g de suelo
Especificaciones del aislamiento	se siembran semillas de alfalfa (desinfectadas superficialmente) en esa tierra y se aíslan nódulos

Cuadro 4: Cepa 17 PC

Nombre del recolector	Juan Parra
Fecha de recolección	18/08/98
Nombre de la planta hospedera	Alfalfa
Nombre de la localidad	Colonia los Treinta y Tres
Dirección	Ruta 6
Nombre del productor	M. Salas
Historial del potrero	Alfalfa de 5° año
Análisis de suelo	pH: 5.4 P: 7 ppm Ca: 7.3 meq/100 g de suelo
Especificaciones del aislamiento	se siembran semillas de alfalfa (desinfectadas superficialmente) en esa tierra y se aíslan nódulos

Cuadro 5: Cepa 3 PC

Nombre del recolector	Juan Parra
Fecha de recolección	18/08/98
Nombre de la planta hospedera	Alfalfa
Nombre de la localidad	Rincón de Conde - San Ramón
Dirección	Ruta 63 Km.13
Nombre del productor	Luis Piroto
Historial del potrero	Alfalfa de 5° año
Análisis de suelo	pH: 7.6 P: 28 ppm Ca: 40.8 meq/100 g de suelo
Especificaciones del aislamiento	se siembran semillas de alfalfa (desinfectadas superficialmente) en esa tierra y se aíslan nódulos

Cuadro 6: Cepa 12 PC

Nombre del recolector	Juan Parra
Fecha de recolección	18/08/98
Nombre de la planta hospedera	Alfalfa
Nombre de la localidad	Rincón de Conde - San Ramón
Dirección	Ruta 63 Km.4
Nombre del productor	Nelson Ravello
Historial del potrero	Alfalfa de 2° año
Análisis de suelo	pH: 5.5 P: 21 ppm Ca: 9.7 meq/100 g de suelo
Especificaciones del aislamiento	se siembran semillas de alfalfa (desinfectadas superficialmente) en esa tierra y se aíslan nódulos

Cuadro 7: Cepa 81 PC

Nombre del recolector	Juan Parra
Fecha de recolección	18/08/98
Nombre de la planta hospedera	Alfalfa
Nombre de la localidad	Fray Marcos
Dirección	Ruta 94 Km.102
Nombre del productor	Lino Marichal
Historial del potrero	Alfalfa de 1991 a 1998 actualmente trigo
Análisis de suelo	pH: 7.2 P: 15 ppm Ca: 27.3 meq/100 g de suelo
Especificaciones del aislamiento	se siembran semillas de alfalfa (desinfectadas superficialmente) en esa tierra y se aíslan nódulos

Cuadro 8: Cepa 1 PC

Nombre del recolector	Juan Parra
Fecha de recolección	18/08/98
Nombre de la planta hospedera	Alfalfa
Nombre de la localidad	Rincón de Conde - San Ramón
Dirección	Ruta 63 Km.4
Nombre del productor	Nelson Ravello
Historial del potrero	Alfalfa de 6° año
Análisis de suelo	pH: 6.0 P: 6.0 ppm Ca: 8.3 meq/100 g de suelo
Especificaciones del aislamiento	se siembran semillas de alfalfa (desinfectadas superficialmente) en esa tierra y se aíslan nódulos

Cuadro 9: Cepa 27 PC

Nombre del recolector	Juan Parra
Fecha de recolección	18/08/98
Nombre de la planta hospedera	Alfalfa
Nombre de la localidad	Fray Marcos
Dirección	Ruta 94 Km.102
Nombre del productor	Ramón Marichal
Historial del potrero	Historia de 40 años de alfalfa
Análisis de suelo	pH: 5.6 P: 43 ppm Ca: 12.2 meq/100 g de suelo
Especificaciones del aislamiento	se siembran semillas de alfalfa (desinfectadas superficialmente) en esa tierra y se aíslan nódulos

Cuadro 10: Cepa 84 PC

Nombre del recolector	Juan Parra y Gabriel Castiglioni
Fecha de recolección	05/11/98
Nombre de la planta hospedera	Alfalfa
Nombre de la localidad	-----
Dirección	-----
Nombre del productor	-----
Historial del potrero	-----
Análisis de suelo	-----
Especificaciones del aislamiento	Reaislamiento de un nódulo de la cepa U137 a pH 5.0

Cuadro 11: Cepa 90 PC

Nombre del recolector	Gabriel Castiglioni
Fecha de recolección	26/08/98
Nombre de la planta hospedera	Alfalfa
Nombre de la localidad	Sarandí Grande
Dirección	Ruta 57
Nombre del productor	Francisco Acerenza
Historial del potrero	Tuvo alfalfa hace 15 años actualmente es campo natural
Análisis de suelo	pH : 6.7 P : 9 ppm Ca : 20.8 meq/100 g de suelo
Especificaciones del aislamiento	se siembran semillas de alfalfa (desinfectadas superficialmente) en esa tierra y se aíslan nódulos

Cuadro 12: Cepa 16 PC

Nombre del recolector	Pablo Dutto
Fecha de recolección	26/08/98
Nombre de la planta hospedera	Melilotus
Nombre de la localidad	Solis
Dirección	-----
Nombre del productor	-----
Historial del potrero	-----
Análisis de suelo	pH : 7.4 P : 7.0 ppm Ca : 21.0 meq/100 g de suelo
Especificaciones del aislamiento	Se aíslan nódulos de la planta directamente

Cuadro 13: Cepa 88 PC

Nombre del recolector	Pablo Dutto
Fecha de recolección	26/08/98
Nombre de la planta hospedera	Alfalfa
Nombre de la localidad	Valizas
Dirección	-----
Nombre del productor	-----
Historial del potrero	Tierra con melilotus
Análisis de suelo	pH : 7.3 P : 26.0 ppm Ca : 4.7 meq/100 g de suelo
Especificaciones del aislamiento	se siembran semillas de alfalfa (desinfectadas superficialmente) en esa tierra y se aíslan nódulos

APÉNDICE 3 :

Cuadro 14 : PRODUCCIÓN MEDIA DE MATERIA SECA EN mg/tubo Y DESVÍO ESTÁNDAR DE ALFALFA cv “Chaná” INOCULADA CON LAS 57 CEPAS PROBADAS A pH 5,2 y 7,0.

BANDEJA	CEPA	pH	MEDIA	DESVÍO
1	1	5,2	138.25	41.6043
1	1	7	212.50	38.8887
1	2	5,2	104.25	32.7554
1	2	7	186.25	64.0488
1	3	5,2	71.00	17.5309
1	3	7	241.25	36.2893
1	4	5,2	94.75	9.0323
1	4	7	144.00	40.5545
1	5	5,2	69.75	13.0224
1	5	7	151.75	56.1449
1	6	5,2	72.00	6.9282
1	6	7	180.50	38.9572
1	TESTCN	5,2	342.25	29.2276
1	TESTCN	7	304.75	6.2915
1	TESTSN	5,2	79.25	24.5136
1	TESTSN	7	92.25	15.3704
1	U137	5,2	96.50	30.5560
1	U137	7	229.50	32.9090
1	U143	5,2	90.75	10.0125
1	U143	7	182.00	28.1306
2	10	5,2	80.50	13.3041
2	10	7	149.00	50.2726
2	11	5,2	87.75	24.2539
2	11	7	180.75	38.4827
2	12	5,2	106.00	36.4509
2	12	7	238.75	19.1551
2	13	5,2	83.75	10.2429
2	13	7	144.50	13.4040
2	14	5,2	89.50	21.6102
2	14	7	133.75	13.9613
2	15	5,2	78.25	9.1059
2	15	7	174.00	45.2475
2	16	5,2	87.25	18.8746
2	16	7	259.50	23.7276
2	17	5,2	94.50	6.8557
2	17	7	206.50	18.1567
2	18	5,2	121.25	18.5719
2	18	7	174.00	17.8139
2	19	5,2	84.00	15.3840
2	19	7	148.00	48.5249
2	20	5,2	86.00	15.2096

2	20	7	182.75	55.8831
2	7	5,2	78.50	15.8850
2	7	7	130.00	22.1961
2	8	5,2	104.50	25.5930
2	8	7	177.50	21.5639
2	9	5,2	88.25	17.1148
2	9	7	160.50	22.7230
2	TESTCN	5,2	325.75	28.1943
2	TESTCN	7	342.50	23.0579
2	TESTSN	5,2	103.75	8.2209
2	TESTSN	7	118.00	17.1075
2	U137	5,2	78.25	6.7020
2	U137	7	188.75	30.0153
2	U143	5,2	94.75	6.0208
2	U143	7	174.25	32.2219
3	21	5,2	96.00	31.9061
3	21	7	115.25	31.1916
3	22	5,2	85.50	16.9804
3	22	7	118.25	6.1305
3	23	5,2	98.75	35.1414
3	23	7	103.50	17.0783
3	24	5,2	82.75	22.0662
3	24	7	130.00	21.9241
3	25	5,2	111.00	20.1660
3	25	7	123.50	8.9629
3	26	5,2	102.50	17.7106
3	26	7	95.50	15.0665
3	27	5,2	85.00	27.4469
3	27	7	157.25	24.5136
3	28	5,2	69.00	41.2068
3	28	7	120.50	14.7083
3	29	5,2	94.25	44.0407
3	29	7	118.00	15.7480
3	30	5,2	97.00	29.2347
3	30	7	133.25	14.2215
3	31	5,2	83.00	5.2281
3	31	7	129.00	17.8326
3	32	5,2	69.25	32.2942
3	32	7	83.75	2.7538
3	33	5,2	84.75	22.7505
3	33	7	120.00	32.3831
3	34	5,2	87.75	11.8989
3	34	7	103.25	11.6726
3	35	5,2	89.00	21.5561
3	35	7	137.00	40.6858
3	36	5,2	85.25	9.2871
3	36	7	130.50	22.2935
3	TESTCN	5,2	371.75	38.4913
3	TESTCN	7	314.50	93.7177

3	TESTSN	5,2	73.75	32.4384
3	TESTSN	7	111.75	12.7115
3	U137	5,2	88.00	12.5167
3	U137	7	98.75	33.2403
3	U143	5,2	119.50	16.8424
3	U143	7	157.75	27.6933
4	73	5,2	103.25	5.3151
4	73	7	100.25	12.2848
4	74	5,2	103.75	20.9821
4	74	7	143.50	28.3137
4	75	5,2	86.00	14.9889
4	75	7	119.00	25.0732
4	76	5,2	110.25	13.4505
4	76	7	100.00	26.5832
4	77	5,2	106.50	17.2337
4	77	7	110.00	11.5470
4	78	5,2	93.00	8.0416
4	78	7	103.50	16.8226
4	79	5,2	97.00	4.2426
4	79	7	95.00	6.6833
4	80	5,2	99.75	10.3401
4	80	7	160.75	28.7909
4	81	5,2	116.75	24.9182
4	81	7	110.00	30.2324
4	82	5,2	89.50	13.7720
4	82	7	98.75	11.7863
4	83	5,2	85.50	18.1567
4	83	7	110.00	34.7851
4	84	5,2	93.25	26.0560
4	84	7	186.00	17.8326
4	85	5,2	101.25	19.1725
4	85	7	100.75	21.5928
4	86	5,2	97.75	17.4619
4	86	7	109.75	15.5215
4	87	5,2	91.50	17.7106
4	87	7	93.25	11.8708
4	88	5,2	109.00	11.3431
4	88	7	91.75	8.6554
4	89	5,2	96.25	14.5230
4	89	7	116.75	24.2539
4	90	5,2	86.25	27.6089
4	90	7	179.00	20.6720
4	TESTCN	5,2	384.00	13.1909
4	TESTCN	7	360.25	47.0841
4	TESTSN	5,2	109.25	8.8459
4	TESTSN	7	88.25	6.0208
4	U137	5,2	94.50	12.3962
4	U137	7	143.50	14.4799
4	U143	5,2	105.50	23.7557

4	U143	7	187.75	42.3192
5	91	5,2	89.50	17.7106
5	91	7	107.75	13.9374
5	92	5,2	86.50	9.2916
5	92	7	99.50	8.5829
5	93	5,2	81.00	15.8114
5	93	7	93.50	3.8730
5	TESTCN	5,2	438.00	51.2315
5	TESTCN	7	392.00	39.6485
5	TESTSN	5,2	92.75	7.9320
5	TESTSN	7	118.00	8.8318
5	U137	5,2	99.75	4.5735
5	U137	7	155.50	26.2107
5	U143	5,2	85.75	22.6329
5	U143	7	140.75	32.7452

APÉNDICE 4: PRUEBAS DE pH.

Cuadro 15 : Índice subjetivo de acuerdo al crecimiento visual de las colonias (1 a 5 en orden creciente de crecimiento)

CEPAS	pH5,1	pH5,1	pH5,2	pH5,2	pH5,5	pH5,5	pH5,6	pH5,6	pH5,7	pH5,7
U 143	1	1	2	1	3	3	2	4	5	5
U 143	1	1	2	2	4	4	4	2	5	5
U 143	1	1	2	1	5	4	5	3	5	5
U 137	1	1	1	4	3	5	4	4	5	5
U 137	1	1	1	4	3	4	5	4	5	5
U 137	1	1	2	3	5	3	5	4	5	5

APÉNDICE 5: PRUEBAS DE CALCIO.

Cuadro 16: Peso seco por planta (mg/tubo) de alfalfa cv. "Chaná", inoculada con cepas de *Sinorhizobium meliloti* a pH 5,2 y distintos niveles de cloruro de calcio en el medio.

CEPAS	CALCIO		
	0,0 g/L	0,025 g/L	0,25 g/L
Cepa U 143	100	077	104
Cepa U 143	110	096	094
Cepa U 143	114	099	106
Cepa U 143	121	075	117
Cepa U 143	089	106	107
Cepa U 137	107	166	124
Cepa U 137	099	105	085
Cepa U 137	088	090	085
Cepa U 137	079	087	102
Cepa U 137	081	093	113
Testigo con N	190	216	222
Testigo con N	213	231	210
Testigo con N	174	210	218
Testigo con N	228	196	251
Testigo con N	217	220	229

APÉNDICE 6: ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Cuadro 17 :Análisis de varianza en la materia seca (mg/tubo) de las variedades comerciales de alfalfa a pH 5,2 y 7,0.

	G.L	CM	F	PR>F
Variedad	9	28535.467	14.93	0.0001
pH	1	72.00	0.04	0.8463
Variedad * pH	9	3350.578	1.75	0.0803
Error	180	1911.920		

G.L : grados de libertad

CM : cuadrado medio

Cuadro 18 : Análisis de varianza en la materia seca (mg/tubo) de alfalfa cv. Chaná inoculada con las cepas seleccionadas.

	G.L	CM	F	PR>F
Cepa	16	58633.465	57.00	0.0001
pH	1	117376.994	114.1	0.0001
Cepa * pH	16	4696.757	4.57	0.0001
Error	136	1028.73		

G.L : grados de libertad

CM : cuadrado medio

Cuadro 19: Análisis de varianza del índice de crecimiento visual de las colonias de las cepas comerciales de alfalfa para distintos pH.

	G.L	CM	F	PR>F
Cepa	1	0.016667	0.03	0.8657
pH	4	30.35	52.63	0.0001
Cepa * pH	4	0.85	1.47	0.2241
Error	50	0.576667		

G.L : grados de libertad

CM : cuadrado medio

Cuadro 20 : Análisis de varianza en la materia seca (mg/tubo) de alfalfa cv. Chaná inoculada con las cepas comerciales y distintos niveles de calcio soluble en el medio de cultivo a pH 5,2.

	G.L	CM	F	PR>F
Cepa	2	65400.689	207.660	0.0001
Calcio	2	421.089	1.340	0.2754
Cepa * Calcio	4	478.689	1.552	0.2170
Error	36	314.944		

G.L : grados de libertad

CM : cuadrado medio

Cuadro 21: Análisis de varianza en la materia seca (mg/tubo) de alfalfa cv “chaná” inoculada con las 13 cepas seleccionadas.

pH	Nº	MEDIA	DS
5,2	85	122.541	83.14
7,0	85	175.094	82.56

Cuadro 22: Análisis de varianza en la materia seca (mg/tubo) de las 10 variedades comerciales de alfalfa probadas.

pH	Nº	MEDIA	DS
5,2	100	312.5	55.1
7,0	100	311.3	57.7

Cuadro 23: Análisis de varianza del crecimiento subjetivo de las colonias de las cepas U137 y U143 a distintos niveles de pH en el medio de cultivo.

CEPA	Nº	MEDIA	DS
U 137	30	3.167	1.55
U 143	30	3.133	1.69

Cuadro 24: Análisis de varianza en la materia seca (mg/tubo) de alfalfa cv “chaná” inoculadas con las cepas U137 , U143 y el agregado de N combinado a pH 5,2 para distintos niveles de calcio soluble en el medio.

CALCIO	Nº	MEDIA	DS
0,0 g/L	15	134.000	54.07
0,025 g/L	15	137.800	60.24
0,25 g/L	15	144.467	61.13