

NÚMERO Y EFICIENCIA DE CEPAS NATURALIZADAS DE *Rhizobium meliloti* AISLADAS DE SUELOS DEL ALTO VALLE DE RÍO NEGRO Y NEUQUÉN (ARGENTINA)¹

Number and effectiveness of native strains of *Rhizobium meliloti* isolates of soils from the High Valley of Río Negro and Neuquén (Argentina)

Perla Gili S.², Graciela Marando I.² y Marcelo Sagardoy R.³

S U M M A R Y

The numbers of naturalized *R. meliloti* in 86 cultivated soils from the zone of the High Valley of Río Negro and Neuquén were determined. The *R. meliloti* densities varied between <1 and 2×10^6 bacteria/g of dry soil. Sixty-four per cent of the soil samples contained more than 1000 *R. meliloti* g. No significant correlation was found between the numbers and either the pH or the organic matter content of the soils. Symbiotic nitrogen fixation with 83 isolates of *R. meliloti* was studied under controlled environment with alfalfa cv. Bordenave INTA; plant yield (dry weight) was used as an indirect measurement of nitrogen fixation, and as a criterion for selecting efficient strains of *R. meliloti*. Eight very stable and efficient strains were selected after 30 months. The effects of three strains of *R. meliloti* in match inoculants for alfalfa was studied in relationship to its yield. Fifty-six combinations of three strains were used as inoculants. Twelve combinations of those biofertilizers resulted in the highest yields, indicating synergistic effects.

Key words: Symbiotic nitrogen fixation, inoculants, *Medicago sativa*, *Rhizobium meliloti*.

INTRODUCCIÓN

Uno de los atributos más importantes de las leguminosas es su propiedad de fijar nitrógeno atmosférico cuando viven en simbiosis con bacterias específicas del género *Rhizobium* y/o *Bradyrhizobium*. En Argentina, el área sembrada con alfalfa (*Medicago sativa* L.) es aproximadamente de 5,3 millones de hectáreas y en la actualidad se acepta que la inoculación de semillas de esa leguminosa, con *R. meliloti*, no supera el 20% del área sembrada.

En diferentes estudios se demostró la presencia de *R. meliloti* en suelos donde se cultivó alfalfa (Hely y Brockwell, 1962; Nutman y Ross, 1970), así como la importancia de las cepas naturalizadas de *Rhizobium* sp. en el éxito o fracaso de una inoculación de semillas de leguminosas (Roughley *et al.*, 1976; Labandera y Vincent, 1975).

En el sur del país, el Alto Valle de Río Negro y Neuquén, es la principal zona productora de manza-

nas y peras con destino a la exportación, ocupando estos cultivos un área aproximada de 40.000 hectáreas. Los suelos de esta zona son deficitarios en nitrógeno, siendo necesaria la aplicación de fertilizantes nitrogenados. La urea es el compuesto más usado, con una incidencia en los costos de producción anual de aproximadamente cuatro millones de dólares. Una vía para la optimización económica, en este sistema de producción, es el uso de la fertilización biológica, que se constituye en una alternativa para la práctica de una agricultura sostenible, que permite armonizar la producción agrícola, la ecología y la rentabilidad.

En el Alto Valle, antes de 1930, la alfalfa era sembrada con destino a la exportación y debido a estos antecedentes es común encontrarla entre las hileras de los frutales.

Los objetivos del presente trabajo fueron: a) determinar la presencia y densidad de *Rhizobium meliloti* en suelos cultivados con manzanos y perales y su relación con el pH y la materia orgánica de los suelos estudiados y b) estudiar el efecto de cepas naturalizadas del microsimbionte sobre los rendimientos de alfalfa, dentro de un programa de mejoramiento de la inoculación de esa leguminosa.

¹Recepción de originales: 20 de enero de 1997.

²Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Comahue (UNC), CC 8303, Cinco Saltos, Río Negro, Argentina.

³Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur (UNS), Bahía Blanca, Argentina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Determinación del número de *R. meliloti* en suelos y aislamiento de las cepas del microsimbionte

El área muestreada corresponde al sector centro-este del Alto Valle de Río Negro y Neuquén, ubicado a lo largo del paralelo 39°, entre los meridianos 67° 40' S y 68° 10' O.

Los suelos estudiados correspondieron a Entisoles y Aridisoles, con predominio de Torrifuvents Haplocambids y Aquicambids.

Se tomaron 86 muestras de suelos entre las hileras de los frutales (manzanos y perales). Cada superficie muestreada comprendió aproximadamente 2.500 m² y en cada una de ellas se tomaron 50 submuestras de suelo a una profundidad de 0-15 cm. Las muestras antes de ser estudiadas, fueron mezcladas entre sí y pasadas por tamiz estéril de 2 mm (Weaver *et al.*, 1972).

El número de *R. meliloti* se determinó según la técnica de Vincent (1975), utilizando alfalfa (*Medicago sativa* L.) Bordenave INTA como planta hospedera y el medio de Jensen agarificado al 8% para el desarrollo de las plántulas. Se trabajó con 10 diluciones decimales de suelo y a razón de dos tubos por dilución, utilizando como dilución 1/10 a la suspensión de 1 g de suelo en 9,5 ml de agua destilada estéril. Los datos se obtuvieron por duplicado, y se expresaron como log del número de *R. meliloti*/g de suelo seco. A continuación de la lectura de los tubos se aislaron las cepas de *R. meliloti*, utilizando las plantas mejor noduladas, de acuerdo con la técnica propuesta por Vincent (1975). Las 83 cepas aisladas se mantuvieron a 4 °C en el medio agar manitol extracto de levadura (AMEL) hasta el momento de evaluar su eficiencia. Las determinaciones de pH y materia orgánica de los suelos fueron realizados según Jackson (1970).

Prueba de eficiencia de las cepas

La capacidad para fijar nitrógeno de cada una de las 83 cepas aisladas se realizó en tubo cerrado y de acuerdo con la técnica de Vincent (1975), utilizando una planta de alfalfa por tubo e inoculada con 0,2 ml de una suspensión de 3 x 10⁸ bacterias/ml. También se incluyeron como testigos tubos con plantas sin inocular (T₀) y plantas a las que se le agregó nitrógeno en forma de KNO₃ (0,05%) (T_N). Los tubos inoculados se dispusieron en cámara de cultivo, donde se mantuvieron durante 50 días. Se usó un fotoperíodo de 16 h diarias, manteniéndose la temperatura entre 24 y 26 °C.

El diseño del ensayo fue completamente al azar, utilizando tres repeticiones por tratamiento.

La evaluación de la efectividad, de las cepas de *R. meliloti*, se realizó midiendo la producción de materia seca de la parte aérea de la alfalfa inoculada con cada una de las cepas estudiadas y de acuerdo con la propuesta de Bordeleau *et al.* (1977). Las bacterias que demostraron mayor eficiencia en la fijación de nitrógeno, con producción de materia seca igual o superior a los testigos nitrogenados fueron evaluadas nuevamente con las mismas técnicas para determinar su estabilidad. En este estudio se incluyeron cepas procedentes de otras colecciones, caracterizadas por su buena capacidad para fijar nitrógeno (cepas del INTA Castelar, *R. meliloti* 399 y *R. meliloti* 401) y aconsejadas para ser usadas en la producción de inoculantes.

Preparación de inoculantes con varias cepas de *R. meliloti*

Las cepas que mantuvieron su capacidad para fijar nitrógeno, luego de 12 meses refrigeradas a 4 °C, fueron utilizadas en la obtención de inoculantes mixtos, mediante la combinación en grupos de tres cepas, de acuerdo a un arreglo factorial. Para ello se inocularon plantas de alfalfa con una suspensión de *R. meliloti* de 3 x 10⁸ bacterias/ml por cada inoculante estudiado, incluyendo testigos y cepas de colección, y se determinó luego de 50 días en cámara de crecimiento, la producción de materia seca de la parte aérea de alfalfa. En el caso de inoculantes mixtos, cada cepa tenía una concentración igual a 1 x 10⁸ bacterias/ml o sea un total de 3 x 10⁸ bacterias/ml por inoculante mixto ensayado. Cada planta fue inoculada con 0,2 ml de la suspensión del inoculante estudiado. Los datos de peso seco se analizaron mediante análisis de varianza y la prueba de rangos múltiples de Duncan (P ≤ 0,05). Cada valor es la media de tres repeticiones por tratamiento.

Con el objeto de agrupar las cepas que tenían una eficiencia similar de fijación de nitrógeno, se calculó el "índice de efectividad relativa" (Longeri, 1989), asignando a cada letra de la prueba de Duncan los siguientes valores numéricos: a = 1, b = 2, c = 3, etc. A continuación se procedió a promediar los valores numéricos correspondientes a cada cepa investigada.

Las cepas de *R. meliloti* conservadas a 4 °C, fueron repicadas cada seis meses durante 2,5 años. Los análisis estadísticos se realizaron según Montgomery (1991).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el 97% de las 86 muestra de suelos analizadas, se demostró la presencia de *R. meliloti* naturalizado, con densidades que oscilaron entre <1 y 2×10^6 bacterias/g (Cuadro 1). Esta amplitud, con valores superiores a seis unidades log, fue superior a la determinada por Mahler y Wollum (1982), en suelos sembrados con alfalfa de Carolina del Norte, donde estos autores determinaron que la diferencia en el número de *R. meliloti*/g entre los suelos, era superior a tres unidades log. Las mayores densidades microbianas (10^6 - 10^7 *R. meliloti*/g suelo), sólo ocuparon un 6% de los suelos estudiados, mientras que un 64% de los mismos tenían 1.000 o más rizobios/g. El contenido de materia orgánica de los suelos osciló entre 1,7-6,5% y el pH varió entre 6-8. No se determinó una regresión lineal significativa entre el número de *R. meliloti*/g y esas dos variables abióticas. Estos resultados demostraron que existen otros factores, no considerados en este estudio, que contribuyeron a mantener las densidades de *R. meliloti* en los suelos investigados.

CUADRO 1. Distribución de *Rhizobium meliloti* en suelos del Alto Valle de Río Negro y Neuquén cultivados con perales y manzanos

TABLE 1. Distribution of *Rhizobium meliloti* in soils of the High Valley of Río Negro and Neuquén cultivated with pears and apples

Log del número de <i>R. meliloti</i> / g de suelo seco	Número de suelos estudiados	Porcentaje del total de suelos estudiados
0 - 1	3	3,5
1 - 2	3	3,5
2 - 3	25	29,0
3 - 4	27	31,4
4 - 5	22	25,6
5 - 6	1	1,2
6 - 7	5	5,8
Total	86	100,0

De las 83 bacterias aisladas de los nódulos de alfalfa solo 44 cepas tuvieron capacidad para infectar a alfalfa, luego de 12 meses de conservación a 4 °C, resultados que coinciden con los expresados por Vincent (1975). En el Cuadro 2, se muestran los valores de producción de materia seca y la efectividad relativa de las 44 cepas infectivas de *R. meliloti* junto a la de las dos cepas que son utilizadas para producir inoculantes comerciales en Argentina. El rango de producción de materia seca en las cepas, osciló entre 23,1 y 4,9 mg/planta de alfalfa. El testigo no inoculado y no fertilizado produjo 4,6 mg/planta (T_0).

La técnica de efectividad relativa y la separación de estos valores en cuartiles permitió detectar cuatro grupos de cepas infectivas de *R. meliloti*. El grupo 1 estaba formado por nueve cepas donde el *R. meliloti* 68, aislado de un suelo de la localidad de Senillosa con pH 8, presentó la mayor producción de materia seca/planta (5,7 veces superior a T_0). Sin embargo, después de mantener durante 30 meses en refrigerador a 4 °C a las 44 cepas de *R. meliloti* infectivas y efectivas, y realizando repiques sucesivos cada seis meses en el medio AMEL, sólo ocho cepas del microsimbionte (83, 79, 18, 72, 73, 31, 81 y 75) mantuvieron su capacidad para producir materia seca en alfalfa en forma significativamente diferente respecto al testigo T_0 ($P < 0,05$). El comportamiento individual de esos microsimbiontes, en lo que respecta a producción de materia seca, fue similar al de las cepas *R. meliloti* 399 y 401. Estos resultados demostraron que las cepas indígenas constituyen la fuente primaria de todos los inoculantes (Date, 1976) y que es posible obtener del suelo, cepas que fijen más N que las que se usan regularmente para fabricar inoculantes para alfalfa. Además, esos datos mostraron que de las cepas aisladas de los suelos, solamente una de cada cinco tenían una capacidad infectiva y efectiva estable genéticamente. La diferencia en el potencial para fijar nitrógeno que poseen las cepas nativas de *R. meliloti* también ha sido encontrada en estudios con *Medicago polymorpha* (Herrera *et al.*, 1996).

Kucey (1989), trabajando con suelos de Canadá, que contenían valores superiores a 8×10^3 *R. leguminosarum* bv *phaseolii*/g suelo, no observó aumentos en el tenor de N en plantas de *Phaseolus vulgaris* L. inoculadas con rizobios específicos. Turk *et al.* (1993), demostraron que la respuesta a la inoculación de leguminosas, en suelos de Hawaii, disminuía rápidamente cuando la densidad de los rizobios aumentaba de 0 a 50 microsimbiontes/g suelo. En este estudio es posible que las condiciones detectadas, alto número de suelos con valores mayores a 10^3 *R. meliloti*/g unido a la eficiencia, infectividad y estabilidad genética de un 18% de las cepas naturalizadas investigadas, influyan decididamente sobre el éxito de la inoculación comercial de semillas de alfalfa.

La eficiencia y la efectividad en alfalfa inoculada con 56 inoculantes líquidos mixtos, fabricados con las ocho cepas de *R. meliloti* agrupadas de a tres, fue estudiada. En el Cuadro 3 se presentan los 12 mejores inoculantes mixtos que permitieron una producción de materia seca igual o superior a la que producían los inoculantes fabricados con las ocho cepas individuales. Los inoculantes mixtos produjeron cambios significativos en la producción de materia seca y en el número de nódulos/planta entre

CUADRO 2. Lugares de muestreo, propiedades de los suelos y producción de materia seca en alfalfa inoculada con 44 cepas de *Rhizobium meliloti* aisladas de suelos del Alto Valle de Río Negro y Neuquén

TABLE 2. Sampling sites, soils properties and dry weight of alfalfa inoculated with 44 strains of *R. meliloti* isolated from the High Valley of Río Negro and Neuquén

Cepas	Sitio de muestreo	M.O. %	pH	Peso seco (mg/planta)	Eficiencia relativa	Grupo
68	Senillosa	2,13	8,0	23,1 a*	1,0	1
32	Barda del Medio	5,06	7,4	17,7 b	2,0	
82	Allen	1,76	7,7	15,7 bc	2,5	
72	Senillosa	2,18	6,9	15,6 bc	2,5	
11	Cinco Saltos	5,28	7,7	14,8 bcd	3,0	
78	Villa Manzano	5,34	7,3	14,6 bcde	3,5	
75	Villa Manzano	7,58	6,7	14,3 bcdef	4,0	
57	Cipolletti	3,27	7,3	14,2 bcdefg	4,5	
18	Cipolletti	5,21	7,1	13,8 bcdefgh	5,0	
71	Senillosa	3,99	6,8	13,1 bcdefghi	5,5	2
79	Villa Manzano	5,19	7,4	12,9 bcdefghi	5,5	
84	Allen	2,77	8,0	12,9 bcdefghi	5,5	
81	Allen	2,37	7,7	12,4 cdefghij	6,5	
44	Sargento Vidal	7,65	7,4	12,4 cdefghij	6,5	
399**	-	-	-	12,3 cdefghij	6,5	
5	Cinco Saltos	6,26	7,4	12,1 cdefghij	6,5	
85	Guerrico	4,55	7,7	12,1 cdefghij	6,5	
83	Allen	4,37	7,2	12,1 cdefghij	6,5	
401**	-	-	-	12,0 cdefghij	6,5	
31	Ferri	5,70	7,1	11,9 cdefghijk	7,0	
19	Cipolletti	3,59	7,3	11,7 cdefghijk	7,0	
13	Cinco Saltos	5,07	7,5	11,3 cdefghijkl	7,5	
27	Cipolletti	4,29	7,2	11,2 cdefghijkl	7,5	
14	Cinco Saltos	5,71	7,0	11,1 cdefghijkl	7,5	
77	Villa Manzano	3,52	6,9	11,0 cdefghijkl	7,5	
40	Cte. Cordero	3,67	7,4	10,8 cdefghijkl	7,5	
46	Sargento Vidal	3,94	7,5	10,6 cdefghijklm	8,0	
65	Ferri	5,16	7,3	10,2 defghijklmn	9,0	
73	Senillosa	2,06	6,7	10,0 defghijklmno	9,5	3
53	Plottier	5,34	7,5	9,9 defghijklmno	9,5	
21	Cinco Saltos	1,78	7,9	9,5 efghijklmnop	10,5	
76	Sargento Vidal	5,00	7,0	9,4 efghijklmnop	10,5	
67	Neuquén	4,29	7,6	9,2 fghijklmnop	11,0	
35	Barda del Medio	3,21	7,7	9,0 ghijklmnop	11,5	
80	Neuquén	4,42	7,5	8,8 hijklmnop	12,0	
45	Sargento Vidal	5,48	7,6	8,8 hijklmnop	12,0	
-	Testigo con N	-	-	8,7 hijklmnop	12,0	
54	Plottier	3,84	7,7	7,8 ijklmnop	12,5	
55	Plottier	1,66	7,9	7,8 ijklmnop	12,5	
52	Plottier	1,53	7,7	7,6 jklmnop	13,0	
29	Cipolletti	3,73	7,4	6,8 klmnop	13,5	
87	Roca	3,03	7,0	6,4 lmnop	14,0	4
86	Roca	4,38	7,7	6,2 lmnop	14,0	
47	Centenario	3,76	7,0	5,6 mnop	14,5	
24	Cipolletti	4,77	7,6	5,3 nop	15,0	
33	Ferri	4,82	7,5	5,3 nop	15,0	
69	Senillosa	3,63	7,1	4,9 op	15,5	
-	Testigo (To)	-	-	4,6 p	16,0	

*Valores con una letra distinta son estadísticamente diferentes según la Prueba de Duncan ($P < 0,05$).

**Cepas recomendadas para producir inoculantes comerciales para alfalfa.

CUADRO 3. Efecto de diferentes inoculantes mixtos de *Rhizobium meliloti* sobre la infectividad y efectividad en *Medicago sativa**

TABLE 3. Effect of different multiple strains of *Rhizobium meliloti* on the infectiveness and effectiveness of the N fixation in *Medicago sativa**

Inoculante mixto	Peso seco mg /planta	Nódulos/planta
ABF**	26,1 a***	21,3
BGH	21,4 ab	26,0
CFH	20,7 ab	7,0
EGH	20,7 ab	12,2
CFG	19,8 ab	6,0
AFH	19,2 ab	9,0
BEH	18,5 b	10,0
ADE	18,5 b	18,1
ADF	18,3 b	13,2
CEF	18,1 b	4,8
BDE	17,7 b	21,4
ABH	17,7 b	7,5
T ₀	4,6 c	0,0

*Cada valor es la media de 10 plantas.

**Las letras indican el número de cepa de *R. meliloti* utilizada: A = 83, B = 79, C = 18, D = 72, E = 73, F = 31, G = 81, H = 75. T₀ = testigo no inoculado.

***Valores con una letra distinta son estadísticamente diferentes según la Prueba de Duncan (P ≤ 0,05).

los tratamientos, pero no se detectó una correlación significativa entre esas dos variables. Las cepas seleccionadas produjeron, cuando formaban parte de un inoculante mixto, valores muy diferentes de eficiencia (rango = 26,1 - 17,7 mg/planta) y de nodulación (rango = 21,3 - 7,5 nódulos/planta) en un mismo cultivar de alfalfa. Además, esos 12 inoculantes mixtos produjeron un incremento medio del

39% (18 mg/planta) en la producción de materia seca, respecto a los valores medios obtenidos con las cepas individuales utilizadas como inoculantes para alfalfa Bordenave INTA (13 mg/planta), bajo las condiciones en que se realizó este trabajo. Bordenave y Antoun (1977), demostraron un sinergismo en cepas de *R. meliloti* utilizadas de a pares, con un aumento del 10% en los rendimientos de materia seca respecto a lo que producían las cepas del microsimbionte en forma individual. Hasta lo que nosotros conocemos, es la primera vez que se detecta un sinergismo con inoculantes mixtos triples en alfalfa, desconociéndose las causas principales de estos resultados. Finalmente, recomendamos que antes de utilizar la mezcla de estas cepas en un inoculante comercial es necesario estudiar su comportamiento bajo condiciones de campo y sus efectos sobre diferentes cultivares de alfalfa.

CONCLUSIONES

En el Alto Valle de Río Negro y Neuquén la mayoría de los suelos estudiados estaban colonizados con cepas naturalizadas de *R. meliloti* infectivas y efectivas. El 82% de esas bacterias eran inestables desde el punto de vista genético y no conservaron, en el tiempo, su capacidad para producir materia seca, es decir, para fijar N en alfalfa. Sin embargo, el aislamiento de ocho cepas de *R. meliloti* con estabilidad genética y capacidad para formar parte de inoculantes mixtos triples, que tenían un efecto sinérgico en los rendimientos de *M. sativa*, fue demostrado bajo condiciones controladas. Estos resultados aconsejan continuar con estudios sobre las posibles aplicaciones biotecnológicas de esos microsimbiontes.

RESUMEN

En este estudio se determinó la densidad de *R. meliloti* naturalizado en 86 muestras de suelos del Alto Valle de Río Negro y Neuquén, cultivados con manzanos y perales. El número del microsimbionte, osciló entre <1 y 2 x 10⁶ bacterias/g de suelo. Un 64% de los suelos contenían 1.000 ó más *R. meliloti*/g. Estos valores no se relacionaron significativamente con los contenidos de materia orgánica ni con el pH de los suelos. Se aislaron 83 cepas de *R. meliloti*, y ocho biotipos fueron seleccionados por su eficiencia en la producción de materia seca y por su estabilidad

genética. Se produjeron inoculantes con cultivos mixtos, con los ocho biotipos seleccionados, utilizando tres cepas por biofertilizante. De los 56 inoculantes investigados, el 93% tuvo una producción de materia seca superior al testigo nitrogenado no inoculado; además, el 22% de los inoculantes ensayados superó a la actividad fijadora que provocaron las ocho cepas individuales seleccionadas.

Palabras claves: Fijación biológica de nitrógeno, inoculante, *Medicago sativa*, *Rhizobium meliloti*.

LITERATURA CITADA

- BORDELEAU, L.M., ANTOUN, H. et LACHANCE, R.A. 1977. Effets des souches de *Rhizobium meliloti* et des coupes successives de la luzerne (*Medicago sativa*) sur la fixation symbiotique d'azote. Can. J. Plant Sci., 57: 433-439.
- BORDELEAU, L.M. et ANTOUN, H. 1977. Effets de l'inoculation mixte avec des souches de *Rhizobium meliloti* sur le rendement de la luzerne, cultivar Saranac. Can J. Plant Sci., 57: 1071-1075.
- DATE, R.A. 1976. Principles of *Rhizobium* strain selection. In: Symbiotic nitrogen fixation in plants. Nutman, P.S. (Ed.), Cambridge University Press, London.
- HELY, F.W. and BROCKWELL, J. 1962. An exploratory survey of the ecology of *Rhizobium meliloti* in inland New South Wales and Queensland. Aust. J. Agric. Res. 13: 864-879.
- HERRERA, A., LONGERI, L. y OVALLE, C. 1996. Estudio de la efectividad de cepas chilenas de *Rhizobium meliloti* en simbiosis con *Medicago polymorpha*. Agricultura Técnica (Chile) 56: 36-41.
- JACKSON, M. 1970. Análisis químicos de suelos. Ed. Omega. Barcelona.
- KUCEY, R.M.N. 1989. Responses of field bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to level of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Phaseoli* inoculation in soils containing effective *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* populations. Can. J. Plant Sci. 69: 419-426.
- LABANDERA, C.A. and VINCENT, J.M. 1975. Competition between an introduced strain and native Uruguayan strains of *Rhizobium trifolii*. Plant and Soil, 42: 327-347.
- LONGERI, L. 1989. Factores que influyen en la fijación de nitrógeno y en la producción de fréjol. Informe Proyecto FIA 57/58, Tercera etapa. 32 p.
- MAHLER, R.L. and WOLLUM, A.G. 1982. Seasonal variation of *Rhizobium meliloti* in alfalfa and cultivated fields in North Carolina. Agron. J., 74: 428-431.
- MONTGOMERY, D. 1991. Diseño y Análisis de experimentos. Ed. Iberoamérica. 589 p.
- NUTMAN, P.S. and ROSS, G.J.S. 1970. *Rhizobium* in the soils of Rothamsted and Woburn farm. Rothamsted report for 1969, part 2, 148-152.
- ROUGHLEY, R.J., BLOWES, W.M. and HERRIDGE, D.F. 1976. Nodulation of *Trifolium subterraneum* by introduced rhizobia in competition with naturalized strains. Soil Biol. Biochem. 8: 403-407.
- TURK, D., KEYSER, H.H. and SINGLETON, P.W. 1993. Response of tree legumes to rhizobial inoculation in relation to the population density of indigenous rhizobia. Soil Biol. Biochem., 25: 75-81.
- VINCENT, J.M. 1975. Manual práctico de rizobiología. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires. 200 p.
- WEAVER, R.W., FREDERICK, L.R. and DUMENIL, L.C. 1972. Effect of soybean cropping and soil properties on numbers of *Rhizobium japonicum* in Iowa soils. Soil Sci., 114: 137-141.