

# NOTA

## SOBREVIVENCIA DE CEPAS DE *Rhizobium meliloti* EN SEMILLAS DE ALFALFA Y EN SUELOS DEL ALTO VALLE DE RÍO NEGRO Y NEUQUÉN, ARGENTINA<sup>1</sup>

Survival of *Rhizobium meliloti* strains in alfalfa seeds and in soil isolates from the Upper Río Negro Valley and Neuquén, Argentina

Perla Gili S.<sup>2</sup>, Graciela Marando I.<sup>2</sup> y Marcelo Sagardoy R.<sup>3</sup>

### ABSTRACT

Nitrogen fixation in alfalfa (*Medicago sativa* L.) cv. Cuf 101 inoculated with 40 strains of *R. meliloti* isolated from soils of the Upper Río Negro Valley and Neuquén, Argentina, was studied in growth chamber experiments. Eight strains were selected based on their relative infectiousness and capacity to produce biomass under controlled conditions. On evaluating the survival of different *R. meliloti* strains in inoculated seeds, with inoculants in sterile peat, it was found that the survival rate varied with the strain type in the bio-fertilizer. The results showed that it was possible to obtain, using irrigated soils and studying the saprophytic properties of the infective microsymbionts, infective and effective strains with high capacity for nitrogen fixation in alfalfa Cuf 101. Natural strains of *R. meliloti* were found with sufficient capacity to live for ten years in soils under environmental conditions.

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

### INTRODUCCIÓN

En el Alto Valle de Río Negro y Neuquén, Argentina, en 1928, la superficie cultivada con alfalfa (*Medicago sativa* L.) era de 29.000 ha, destinadas a la producción de semillas y al pastoreo. En la actualidad en zonas recién colonizadas, la alfalfa sigue siendo el cultivo inicial típico antes de ser utilizadas para la producción hortícola o frutícola. En un estudio previo realizado con suelos de esta región señalamos que *R. meliloti* se encontraría en número suficiente

para realizar su actividad fijadora en alfalfa (Gili *et al.*, 1997).

Las cepas de *Rhizobium* de inoculantes comerciales pueden competir con rizobios naturalizados del suelo, los cuales pueden tener menor infectividad o efectividad comparadas con las cepas rizobiales inoculadas (Ames-Gottfred y Christie, 1989; Bottomley, 1992; Brockwell *et al.*, 1995).

Para lograr una combinación leguminosa-*Rhizobium* efectiva es posible intervenir modificando la población de cepas nativas de un suelo, mediante la inoculación de semillas con cepas seleccionadas. Es reconocido que los inoculantes múltiples, dentro de un grupo de inoculación, dan una seguridad parcial contra la pérdida de efectividad en la fijación de nitrógeno (Vincent, 1970).

<sup>1</sup>Recepción de originales: 23 de junio de 1998.

<sup>2</sup>Universidad Nacional del Comahue (UNC), Facultad de Ciencias Agrarias, CP 8303, Cinco Saltos, Río Negro, Argentina.

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

El número de microorganismos por semilla inoculada es, según Date (1970), uno de los factores más importantes que influye positivamente en la inoculación de las leguminosas. En la práctica una cepa debe seleccionarse por su capacidad infectiva y efectiva, para ser utilizada en la fabricación de inoculantes. Además es necesario que las cepas seleccionadas sean capaces de crecer con facilidad en un medio de cultivo y sobrevivir en el inoculante y en la semilla inoculada. El *Rhizobium* es una bacteria que muere rápidamente por desecación. El mayor porcentaje de muerte se produce durante los estadios iniciales de almacenaje de las semillas. Estudios realizados por Vincent (1959) y Salema *et al.* (1982), demostraron que la muerte es extremadamente rápida en estadios tempranos, en los cuales el número disminuye 1000 veces en 24 horas. Brockwell *et al.* (1968) y Howieson (1995), propusieron como cualidad del inoculante para leguminosas la habilidad de una cepa para formar nódulos tempranamente y la capacidad de competir saprofiticamente en el suelo en ausencia de su huésped.

Los objetivos del presente trabajo fueron estudiar las propiedades simbióticas de cepas de *R. meliloti* naturalizadas aisladas de 40 sitios del Alto Valle de Río Negro y Neuquén, Argentina, y establecer la sobrevivencia de distintas cepas de *Rhizobium meliloti* sobre semillas de alfalfa conservadas a dos temperaturas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Evaluación de cepas en tubos de ensayo

Se evaluaron de acuerdo a las características de los nódulos y eficiencia de fijación simbiótica de nitrógeno, cuarenta cepas de *R. meliloti* aisladas en estudios previos de suelos del sector centro-oeste del Alto Valle de Río Negro y Neuquén, Argentina. Los suelos correspondieron a Entisoles y Aridisoles, con predominio de Torrifluents, Haplocambids y Aquicambids, ubicados a lo largo del paralelo 39°, entre los meridianos 67°40'S y 68°10'O. Los ensayos de nodulación

se realizaron en tubos cerrados de acuerdo con la metodología propuesta por Vincent (1970), utilizando una planta de alfalfa (*Medicago sativa* L.) cv. Cuf 101 por tubo. Se efectuó una desinfección superficial de las semillas, sumergiéndolas en un baño de alcohol etílico al 70% por 1 min y en un baño de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 6% durante 20 min y cinco lavados con agua destilada estéril. Cinco días posteriores a la siembra, 10 repeticiones para cada una de las cepas fueron inoculadas con 0,2 mL de una suspensión de  $3 \times 10^8$  *R. meliloti* mL<sup>-1</sup>. Las plantas crecieron durante 50 días con un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad.

En cada tratamiento se determinó el tamaño, color y número de nódulos por planta. La clasificación de las cepas se realizó de acuerdo con Rice *et al.* (1977). La media del peso seco de la parte aérea de plantas de alfalfa fue usada para calcular la producción relativa (PR), definida como  $PR = I/N$ , donde I es la producción de materia seca en las plantas inoculadas, y N es la producción de materia seca en las plantas no inoculadas y tratadas con KNO<sub>3</sub> al 5%. Una producción relativa < 1 indica que la fijación de nitrógeno no fue suficiente para cubrir los requerimientos de nitrógeno de la planta.

### Persistencia de *R. meliloti* en el suelo

La capacidad saprofitica de cepas de rizobios fue evaluada por la persistencia en el suelo en ausencia de su planta huésped. Las determinaciones se realizaron sobre ocho muestras de suelo que fueron seleccionadas en base a la efectividad de sus respectivas poblaciones rizobiales, almacenadas durante 10 años en envases de plástico en un ambiente con temperaturas de  $20 \pm 2^\circ$  C. Se utilizó la técnica del Número Más Probable (NMP) (Vincent, 1970) para determinar la densidad de población de *R. meliloti* en el suelo. Estos resultados fueron comparados con los datos obtenidos en las mismas muestras de suelo en el año 1987. Las características químicas determinadas en los suelos fueron: porcentaje de materia orgánica (MO),

Conductividad Eléctrica (CE)  $\text{mS cm}^{-1}$ , pH y  $\text{meq L}^{-1}$  de  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{++}$   $\text{Mg}^{++}$ , según Tan, 1996.

### Evaluación de la sobrevivencia en semillas

La sobrevivencia de los rizobios sobre la semilla se determinó utilizando el método de recuento en placa y el método del número más probable (NMP). Las semillas de alfalfa se inocularon con inoculantes a base de turba estéril fabricados con las siguientes cepas de *Rhizobium meliloti*: Cepa INTA 401; Cepa INTA 399 ; Cepas de *R. meliloti* 81, 75 y 73. Las cepas de colección 401 y 399 fueron cedidas por el Laboratorio de Rizobiología del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Castelar. Las semillas se inocularon a razón de 10 g de inoculante en turba por kg de semilla, más el agregado de goma arábica al 40% como adhesivo. La turba procedente de El Bolsón, Provincia de Río Negro, fue esterilizada en autoclave a  $121^\circ\text{C}$  y una atmósfera de presión, a razón de 50 g de turba, durante una hora, por dos días consecutivos. Entre una esterilización y otra, existió un intervalo de 24 h. La turba se neutralizó con  $\text{CaCO}_3$  en polvo hasta valores de pH 6,8.

Los inóculos de las cepas se desarrollaron en agitadores rotatorios a  $27^\circ\text{C}$  hasta alcanzar una concentración celular del orden de  $10^6$  bacterias  $\text{mL}^{-1}$  y se emplearon para impregnar la turba estéril ajustando el nivel de humedad al 60%. La maduración se realizó a una temperatura de  $25^\circ\text{C}$  durante 15 días, con el objeto de obtener un crecimiento suplementario de rizobios sobre la turba, de modo que al iniciarse el estudio la concentración de *R. meliloti* fue del orden de  $10^9$  bacterias por g de turba húmeda. En el caso del inoculante con tres cepas de *Rhizobium*, éstas se multiplicaron e impregnaron por separado. En el momento de la inoculación, las turbas maduras se mezclaron en igual proporción. Las semillas inoculadas se conservaron a 5 y  $28^\circ\text{C}$  hasta el momento de realizar las determinaciones (Roughley and Pulsford, 1982).

La sobrevivencia de *R. meliloti* se estudió a 0, 24, 48 y 72 h de realizada la inoculación de las semillas, teniendo en cuenta que el mayor porcentaje de mortandad se produce en las primeras horas. Se tomaron asépticamente 10 semillas de alfalfa de cada uno de los tratamientos y se colocaron en un erlenmeyer con 10 mL de medio YEM (caldo manitol-extracto de levadura) y se agitaron en un agitador rotatorio durante 15 min. A partir de esa suspensión se realizaron diluciones decimales que se utilizaron en los siguientes métodos:

**Recuento en placa:** se sembró 0,1 mL de cada una de las diluciones en medio agar-extracto de levadura-manitol con Rojo Congo (10 mL por litro de una solución acuosa 1/400). Se incubaron a  $27^\circ\text{C}$  durante 5 días. Se contaron las cajas que tenían entre 30 y 300 colonias. Las siembras se realizaron por triplicado.

**Determinación del NMP:** Dos semillas de alfalfa esterilizadas superficialmente se sembraron en cada tubo en medio Jensen agarificado al 8%. Luego, se incubaron en cámara a  $24^\circ\text{C}$  y 16 h de luz. La inoculación se efectuó 5 días después de la siembra. Las plantas se inocularon con 0,2 mL de las diluciones. La determinación del número de rizobios se realizó por duplicado y 21 días posteriores a la inoculación de acuerdo a Vincent (1970).

El diseño fue completamente aleatorizado. El análisis estadístico comprendió análisis de la varianza y prueba de comparación de medias según Tukey (Montgomery, 1991).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La totalidad de las plantas inoculadas con las 40 cepas de *R. meliloti* formaron nódulos. La efectividad simbiótica medida por la producción de materia seca por planta, varió desde cepas inefectivas hasta cepas altamente efectivas (Cuadro 1). Un 75% de las cepas tenían una eficiencia de nivel medio, expresada en materia seca planta<sup>-1</sup>. La mayoría de las cepas produjeron numerosos

nódulos inefectivos, de color blanquecino, de tamaño inferior a 3 mm y distribuidos a lo largo de toda la raíz.

Mediante el ensayo de efectividad relativa fueron seleccionadas ocho cepas (Cuadro 2). La cepa más eficiente (*R. meliloti* 72) presentó un 71,4% de nódulos rosados y un 47,6% tenía un tamaño entre 3-10 mm. No existió una correlación significativa entre el número de nódulos y la producción de materia seca ( $r = 0,15$ ).

**Cuadro 1. Categorías utilizadas para clasificar la nodulación y la fijación simbiótica de N (FSN) en alfalfa cv. Cuf 101 y resultados obtenidos con 40 cepas de *R. meliloti* aisladas de suelos del Alto Valle de Río Negro y Neuquén, Argentina**

**Table 1. Criteria used for assessing nodulation and symbiotic nitrogen fixation in alfalfa cv. Cuf 101 and results obtained for 40 strains of *R. meliloti* isolates from soils of the Upper Río Negro Valley and Neuquén, Argentina**

Características de los nódulos y eficiencia de la FSN	Categorías	Cepas o nódulos	
		Nº	% <sup>1</sup>
Color rojo	0-29%	32	80,0
	30-49%	5	12,5
	50-69%	1	2,5
	70-89%	2	5,0
	90-100%	0	0,0
Número planta <sup>-1</sup>	1-4	15	37,5
	5-20	25	62,5
Tamaño <sup>2</sup> (mm)	< 3	1.724	84,6
	3-10	314	15,4
	> 10	0	0,0
Producción de materia seca (mg pl <sup>-1</sup> )	alta ≥ 14,5	5	12,5
	media 7,2-14,4	30	75,0
	baja ≤ 7,1	5	12,5

<sup>1</sup>Los valores indican el porcentaje del total de las cepas o nódulos determinados.

<sup>2</sup>Se evaluaron 2.038 nódulos pertenecientes a 372 plantas de alfalfa cv. Cuf 101.

**Cuadro 2. Propiedades simbióticas de 8 cepas de *R. meliloti* aisladas de suelos del Alto Valle de Río Negro y Neuquén, Argentina**

**Table 2. Symbiotic properties of 8 strains of *R. meliloti* isolated from soils of the Upper Río Negro Valley and Neuquén, Argentina**

Cepas de <i>R. meliloti</i>	Materia seca planta <sup>-1</sup> (mg)*	Producción relativa <sup>1</sup>	Nódulos planta <sup>-1</sup>
83	12,1ab	1,39	5,8a
31	11,9ab	1,37	5,9a
73	10,0abc	1,15	6,1a
72	15,6a	1,79	4,2a
18	13,8ab	1,59	8,9a
81	12,4ab	1,43	12,6a
79	12,9ab	1,48	10,5a
75	14,3ab	1,64	4,1a
Testigo (con N)	8,7c	—	NN <sup>2</sup>
Testigo (sin N)	4,6cd	—	NN

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

<sup>1</sup>Calculada según el cociente: Materia seca producida plantas inoculadas con *R. meliloti*/Materia seca producida en plantas no inoculadas fertilizadas con KNO<sub>3</sub> (5 mg N/tubo).

<sup>2</sup>NN = No nodulada.

Las plantas de alfalfa fueron noduladas como resultado de la inoculación con suspensiones de suelo de los sitios seleccionados. El número de esa bacteria varió en los sitios como muestra el Cuadro 3. Si consideramos que cinco de las ocho muestras de suelo presentaban, después de 10 años, un número superior a 10<sup>3</sup> rizobios por gramo de suelo, es posible que en esos suelos la eficiencia de los inoculantes comerciales podría verse afectada por las cepas que sobreviven libremente en los mismos, tal como fue demostrado por otros investigadores (Roughley *et al.*, 1976; Dowling y Broughton, 1986).

En el experimento de sobrevivencia de cepas de *Rhizobium* en semillas de alfalfa, el número de

bacterias por gramo de inoculante, alcanzado después de 15 días desde la impregnación de la turba, fue inferior en la cepa INTA 401, que en los otros dos inoculantes (Cuadro 4). El índice

de correlación entre ambos métodos (recuento en placa y NMP), y para cada uno de los inoculantes fue el siguiente: Inoculante 1 (cepa INTA 401) ( $r=0,86^*$ ), Inoculante 2 (cepa INTA

**Cuadro 3. Características de 8 suelos del Alto Valle de Río Negro y Neuquén y sobrevivencia en los mismos de *R. meliloti* naturalizado después de 10 años<sup>1</sup>**

**Table 3. Characteristics of 8 soils from the Upper Río Negro Valley and Neuquén and survival of naturalized *R. meliloti* after ten years**

Suelo N°	MO <sup>2</sup> (%)	CE <sup>3</sup> mS cm <sup>-1</sup>	pH	K <sup>+</sup> (meq L <sup>-1</sup> )	Na <sup>+</sup> (meq L <sup>-1</sup> )	Ca <sup>++</sup> (meq L <sup>-1</sup> )	Ca + Mg (meq L <sup>-1</sup> )	Log <sub>10</sub> N° <i>R. meliloti</i> g <sup>-1</sup> suelo <sup>-1</sup>	
								1987	1997
83	4,37	1,02	7,23	0,53	0,90	1,91	3	3,39	3,30
31	5,70	1,89	7,16	0,70	0,80	4,89	5,6	2,95	2,45
73	2,06	0,35	6,77	0,23	0,35	1,27	2	4,42	4,40
72	2,18	0,35	6,99	0,36	0,38	0,64	1,4	2,96	2,00
18	5,21	0,51	7,13	0,31	0,49	1,27	2,6	2,42	2,00
81	2,37	0,98	7,75	0,80	0,75	1,27	2,2	3,40	3,45
79	5,19	1,30	7,47	0,37	0,85	2,76	4	4,39	4,12
75	7,58	6,38	6,77	2,80	5,25	0,15	13	3,40	3,34

<sup>1</sup>Suelos mantenidos en envases plásticos a 20 ± 2 °C.

<sup>2</sup>MO = Materia Orgánica.

<sup>3</sup>CE = Conductividad Eléctrica.

**Cuadro 4. Sobrevivencia de *R. meliloti* en semillas de alfalfa cv. Cuf 101 bajo dos temperaturas de conservación**

**Table 4. Survival of *R. meliloti* on alfalfa seeds cv. Cuf 101 under two storage temperatures**

Cepa	Método de recuento	Log <i>R. meliloti</i> /g inoculante	Log <sub>10</sub> de <i>R. meliloti</i> semilla <sup>-1**</sup>							
			0 horas		24 horas		48 horas		72 horas	
			5 °C	28 °C	5 °C	28 °C	5 °C	28 °C	5 °C	28 °C
INTA 401	Placa	7,69	4,84a	4,54a	3,50b	3,54c	3,44b	3,36c	1,50c	
	NMP <sup>1</sup>	(110)	(87)	(76)	(63)	(69)	(49)	(87)	(113)	
INTA 399	Placa	9,02	5,82a	5,75a	5,73a	5,74a	5,73a	5,74a	5,72a	
	NMP	(96)	(85)	(68)	(86)	(82)	(77)	(64)	(82)	
Mezcla (81, 75, 73)	Placa	9,51	6,39a	5,46a	5,59a	5,46a	5,38a	5,43a	5,34a	
	NMP	(101)	(78)	(108)	(75)	(95)	(87)	(100)	(54)	

<sup>1</sup>NMP: Número más probable, N° de *R. meliloti* semilla<sup>-1</sup>, determinado con la técnica de infección de plantas, expresado como por ciento del valor obtenido con la técnica de recuento en placa.

\*\*Valores en una misma fila, para una determinada temperatura, con letra o letras iguales no son significativamente diferentes, según el test de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

399) ( $r = 0,64^{NS}$ ) y con el Inoculante 3 (cepas 81, 73, 75) ( $r = 0,45^{NS}$ ). Estos resultados estarían indicando que los ensayos del NMP tienen una tendencia a subestimar el recuento en placa. Resultados similares fueron obtenidos trabajando con soja (Weaver y Frederick, 1972).

La muerte del microsimbionte en semillas inoculadas es rápida en los estadios iniciales de almacenamiento de las mismas (Vincent, 1959; Vincent *et al.*, 1962; Burton, 1967). Sin embargo, en la cepa INTA 399 la sobrevivencia, luego de 72 h, fue prácticamente idéntica que al inicio del estudio (Cuadro 4). La cepa INTA 401 presentó la más baja sobrevivencia sobre la semilla, perdiendo aproximadamente tres unidades logarítmicas en tres días, lo que corresponde al 31% del número inicial. Finalmente, la mezcla de cepas (*R. meliloti* 81, 75 y 73) aisladas de los suelos de Río Negro y Neuquén, presentó un estado intermedio, es decir, disminuyó aproximadamente una unidad logarítmica.

Estos resultados indican que el número de bacterias por semilla no es el factor que determina la sobrevivencia del *R. meliloti* sobre la simiente; la sobrevivencia depende de la adaptación que tengan las cepas a las condiciones de inoculación.

Respecto a la temperatura de almacenamiento sobre la sobrevivencia de *R. meliloti* por semilla, no se observaron cambios significativos entre almacenar a 5 °C ó a 28 °C durante 72 h. Si calculamos el tiempo necesario para que el número de bacterias por semilla disminuya 10 veces

a 28 °C, vemos que la cepa INTA 401 necesitaba 18,1 h y la mezcla 30,3 h. La cepa INTA 399, en las primeras 24 h prácticamente no cambió su número por semilla, en consecuencia no fue determinado el tiempo de disminución.

### CONCLUSIONES

El estudio con 40 cepas de *R. meliloti* aisladas de suelos bajo riego del Alto Valle de Río Negro y Neuquén demostró que sólo un 20% de las mismas tenían una alta efectividad relativa para fijar N atmosférico. Además, se detectó que el efecto del ambiente sobre semillas de alfalfa cv. Cuf 101 inoculadas con tres inoculantes, fabricados en base a turba estéril, fue diferente según la cepa o cepas de *R. meliloti* que formaban los mismos. Los estudios mostraron, además, que la temperatura de almacenaje, 5 °C y 28 °C durante 72 h, no actuó como un factor primario en la sobrevivencia de las cepas de *R. meliloti* incorporadas a las semillas de alfalfa. Simultáneamente, se encontró que el número de las poblaciones del microsimbionte por gramo de suelo se mantuvo sin grandes cambios en suelos que fueron mantenidos a temperatura ambiente durante diez años. Finalmente, como el número del microsimbionte por semilla es decisivo en los resultados que se obtienen con la fijación simbiótica de nitrógeno, sería importante desde un punto de vista práctico, poder incorporar como un patrón de calidad de un biofertilizante, junto a otros factores, la velocidad de muerte del microsimbionte sobre la semilla de alfalfa para un determinado tipo de inoculante comercial.

### RESUMEN

Se estudió la fijación de nitrógeno en alfalfa (*Medicago sativa* L.) cv. Cuf 101 inoculada con 40 cepas de *R. meliloti* aisladas de suelos del Alto Valle de Río Negro y Neuquén, Argentina. Ocho cepas fueron seleccionadas en base a su infectividad y capacidad relativa para producir biomasa bajo condiciones controladas. Al evaluar la sobrevivencia de *R. meliloti* sobre semillas

inoculadas, con inoculantes en base a turba estéril, se encontró que ésta variaba con la cepa o cepas que constituían el biofertilizante. Los datos obtenidos mostraron que era posible obtener, a partir de los suelos irrigados y estudiando las propiedades saprofiticas de los microsimbiontes, cepas infectivas y efectivas con alta capacidad para fijar nitrógeno en alfalfa Cuf 101. Se en-

contró una buena capacidad de las cepas naturalizadas de *R. meliloti* para vivir durante diez años en suelos a temperatura ambiente.

**Palabras claves:** Fijación simbiótica de nitrógeno, inoculantes, sobrevivencia, *Medicago sativa*.

### LITERATURA CITADA

- AMES-GOTTFRED, N. P. AND CHRISTIE, B. R. 1989. Competition among strains of *Rhizobium leguminosa* biovar *trifolii* and use of a diallel analysis in assessing competition. Appl. Environ. Microbiol. 55: 1599-1604.
- BOTTOMLEY, P. J. 1992. Ecology of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium*. In: Stacey, G.; Burris, R.H. and Evans, J.H. (Eds.). Biological Nitrogen Fixation. Chapman and Hall. New York, USA. p. 293-348.
- BURTON, J. C. 1967. *Rhizobium* culture and use. In: Pepler, H. J. (Ed.). Microbial Technology. Van Nostrand-Reinhold. New York, USA. p. 1-33.
- BROCKWELL, J.; BOTTOMLEY, P. J. AND THIES, J. E. 1995. Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility: A critical assessment. Plant and Soil 174: 147-180.
- BROCKWELL, J.; DUDMAN, W. F.; GIBSON, A. H.; HELY, F. W. AND ROBINSON, A. C. 1968. An integrated programme for the improvement of legume inoculant strains. Transactions of the Ninth International Congress Soil Science. Adelaide, Australia. 2: 103-114.
- DATE, R. A. 1970. Microbiological problems in the inoculation and nodulation of legumes. Plant and Soil 32: 703-725.
- DOWLING, D. N. AND BROUGHTON, W. J. 1986. Competition of nodulation of legumes. Ann. Rev. Microbiol. 40: 131-157.
- GILI, P.; MARANDO, G. Y SAGARDOY, M. 1997. Número y eficiencia de cepas naturalizadas de *Rhizobium meliloti* aisladas de suelos del Alto Valle de Río Negro y Neuquén, Argentina. Agricultura Técnica (Chile) 57: 200-205.
- HOWIESON, J. G. 1995. Rhizobial persistence and its role in the development of sustainable agricultural systems in mediterranean environments. Soil Biol. Biochem. 27: 603-610.
- MONTGOMERY, D. 1991. Diseño y análisis de experimentos. México. Ed. Iberoamérica. 589 p.
- RICE, W. A.; PENNEY, D. C. AND NYBORG, M. 1977. Effects of soils acidity on rhizobia numbers, nodulation and nitrogen fixation by alfalfa and red clover. Can. J. Soil Sci. 57: 197-203.
- ROUGHLEY, R. J. AND PULSFORD, D. J. 1982. Production and control of legume inoculants. In: Vicent, J. M. (Ed.) Nitrogen Fixation in Legumes. Academic Press. New York, USA. p. 193-209.
- 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.
- SALEMA, M. P.; PARKER, C. A.; KIDBY, D. K. AND CHATEL, D.L. 1982. Death of Rhizobia on inoculated seed. Soil Biol. Biochem. 14: 13-14.
- TAN, K. H. 1996. Soil Sampling, Preparation, and Analysis. Marcel Dekker, Inc. New York, USA. 392 p.

VINCENT, J. M. 1959. Survival of the root-nodule bacteria. *In*: Hallsworth, E. G. (Ed). Nutrition of the Legumes. Academic Press. New York, USA. p. 108-123.

VINCENT, J. M. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. Blackwell Scientific Publications. International Biological Program. Handbook Nº 15. Oxford, England. 164 p.

VINCENT, J. M.; THOMPSON, J. A. AND DONOVAN, K. O. 1962. Death of root nodule bacteria on drying. *Aust. J. Agric. Res.* 13: 258-270.

WEAVER, R. W. AND FREDERICK, I. R. 1972. A new technique for most-probable-number counts of Rhizobia. *Plant and Soil* 36: 219-222.