

ESTUDIO DE LA EFECTIVIDAD DE CEPAS CHILENAS DE *Rhizobium meliloti* EN SIMBIOSIS CON *Medicago polymorpha*¹

Effectiveness of native Chilean strains of *Rhizobium meliloti* in symbiosis with *Medicago polymorpha*

Alfonso Herrera O.², Luis Longeri S.² y Carlos Ovalle M.³

SUMMARY

Fifty strains of *Rhizobium meliloti* were field collected in the Mediterranean zone of central Chile, between the IVth and IXth Regions (30° 07' - 38° 47' S). These strains were then tested for relative nitrogen fixation efficiency with a local ecotype ("Cauquenes") of *Medicago polymorpha*. Emerging seedlings were inoculated with one of the 50 strains (n = 3) and then planted individually in test tubes containing an N-free nutrient solution in agar, and randomly distributed in a heated growth chamber.

Statistically significant differences were found in phytomass production, a clear indication of varying N₂-fixation potential. However, the range of differences occurs in large groups of similarly performing strains. This makes agricultural selection more difficult.

The range of pH (water) in soils of the collecting sites ranged from 5.2 to 7.5, with 54% of strains coming from soils ranging from 6.0 to 6.4 pH. Moreover, a significant correlation (P ≤ 0.05) occurred between soil pH and nitrogen fixation efficiency of the rhizobial strains collected. The 10 most efficient strains were found in soils with pH over 6.0; 60% of these strains comes from soils with over 6.5 pH. The most efficient strain (H7, Combarbalá) was found in a 7.3 pH soil, and the least efficient one (11a, Arauco) was found in a highly acidic soil (pH 5.2).

The agricultural implications of the relation between strain fixation efficiency and a high soil pH are briefly discussed.

Key words: *Rhizobium meliloti*, rhizobial strains, *Medicago polymorpha*, annual medic, nitrogen fixation efficiency.

INTRODUCCIÓN

Existen fundadas expectativas de que la introducción de praderas de *Medicago polymorpha* (hualputra), en el secano interior, pueda constituir un factor clave para el mejoramiento de los sistemas de producción de cultivos y ganado, lo que, a su vez, permitiría revitalizar la agricultura de esta área.

Junto con semillas seleccionadas, se necesitan cepas de rizobios que aseguren una nodulación eficaz en la fijación de nitrógeno, factor que, según estudios nacionales y extranjeros, limita el establecimiento exitoso de las praderas, dado

que la posibilidad de prosperar de los medicagos depende de la adaptabilidad de las cepas de rizobios a suelos moderadamente ácidos o ácidos, como los que existen en la zona (Howieson y Ewing, 1986; Howieson, Ewing y D'Antuono, 1988; Del Pozo *et al.*, 1989b; Letelier, 1989).

Medicago polymorpha, se encuentra naturalizada en Chile, abarcando prácticamente toda el área Mediterránea desde la región árida a la perhúmeda (Del Pozo *et al.*, 1989a, 1989b; Ovalle *et al.*, 1990; Ovalle *et al.*, 1994). Su extensa área de repartición es un indicador de la plasticidad de la especie y permite suponer la existencia de una alta variabilidad genética tanto del material vegetal como de los rizobios asociados. La alta productividad que presenta en el secano interior, hasta 8 t m.s. ha⁻¹ año⁻¹ (Del Pozo *et al.*, 1989c), posiblemente es el resultado de una efectiva simbiosis con los rizobios del suelo.

¹Recepción de originales: 7 de diciembre de 1993.

²Universidad de Concepción, Facultad de Agronomía, Casilla 537, Chillán, Chile.

³Centro Regional de Investigación Quilamapu (INIA), Casilla 426, Chillán, Chile.

La interacción *Medicago-Rhizobium meliloti* depende tanto de factores ambientales como de las características genéticas de ambos (Brockwell, 1985). Esto a llevado, en áreas en donde se cultivan especies de este género, a realizar numerosos trabajos de recolección y selección de cepas para diferentes ambientes (Brockwell, 1985; ICARDA, 1986; Howieson y Ewing, 1986). En leguminosas anuales forrajeras, en Chile, sólo existen antecedentes de pruebas de efectividad de cepas nativas en trébol subterráneo (Uslar, 1972), no así en *M. polymorpha*.

El objetivo del presente estudio ha sido evaluar la efectividad fijadora de nitrógeno de cepas nativas de *R. meliloti* colectadas en la zona mediterránea de Chile, entre la IV y la IX regiones (30° 07' S a 38° 47' S).

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de cepas de *R. meliloti*

Para el aislamiento fueron utilizadas dos modalidades: a) directa, colectando en terreno nódulos de hualputra, los que fueron conservados en tubos "venoject" con desecante (FAO, 1983) y posteriormente llevados al laboratorio para la aislación y conservación de las cepas; b) indirecta, sembrando *M. polymorpha* en macetas, sobre suelos provenientes de sitios de colecta de germplasma. De los nódulos, así producidos, se procedió al aislamiento de las cepas. En el Cuadro 1 se indica la ubicación de los sitios de colecta del material, como asimismo el pH (agua) de los suelos.

Prueba de eficiencia de las cepas

El estudio se realizó entre junio y diciembre de 1989, en una cámara de cultivo de plantas con ambiente controlado. Semillas de *M. polymorpha*, esterilizadas superficialmente (alcohol 95% por 1 min, agua oxigenada 30 vol por 2 min, lavado con agua estéril por 5 min) se pregerminaron en placas de Petri sobre agar semilla (sacarosa 5 g, agar 12 g, agua 1 L). La siembra se realizó en frascos de vidrio (20 cm altura x 6 cm de diámetro basal, capacidad 600 ml). Se colocaron tres plántulas por frasco. Cada frasco contenía 100 ml de solución nutritiva "agarizada", exenta de nitrógeno (200 mg de K_2HPO_4 , 200 mg de $CaSO_4 \cdot 2H_2O$, 196 mg de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 184 mg de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 10 mg de Fe-EDTA, 1,81 mg de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0,22 mg de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,145 mg de $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$, 0,08 mg de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0,002 mg de $CoCl_2 \cdot 5H_2O$, 10 g de agar, 1 L de agua destilada

CUADRO 1. Sitios de colecta de germoplasma de *Medicago polymorpha* y de los suelos a partir de los cuales se aislaron las cepas de *Rhizobium meliloti*

TABLE 1. Collecting sites of *Medicago polymorpha* germplasm and soils from which *Rhizobium meliloti* strains were isolated

Cepa rizobio	Sitio colecta	Latitud	Longitud	pH suelo
H10	Vicuña	30° 07'	70° 41'	7,1
H12	Alcones	30° 17'	71° 34'	6,8
H 9	Ovalle	30° 33'	71° 07'	7,3
H 8	Chañaral Alto	30° 58'	71° 01'	7,1
H 7	Combarbalá	31° 09'	71° 00'	7,3
H13	Totoral	31° 13'	71° 36'	6,8
H 6	Llahuín	31° 23'	71° 05'	7,5
H 5	Illapel	31° 40'	71° 16'	7,1
H 4	Los Vilos	31° 53'	71° 28'	7,5
H 3	Pichicuy	32° 16'	71° 27'	6,7
H14	Papudo	32° 28'	71° 20'	6,1
H15	Zapallar	32° 32'	71° 26'	6,4
H16	Maitencillo	32° 40'	71° 26'	6,1
H17	Casablanca	33° 21'	71° 24'	6,6
H18	Los Maitenes	33° 29'	71° 19'	6,7
H19	Rapel	33° 57'	71° 32'	6,2
15a	Calleuque I	34° 26'	71° 27'	6,3
16a	Calleuque II	34° 26'	71° 27'	6,3
18b	Calleuque III	34° 26'	71° 27'	6,3
H22	Peralillo	34° 29'	71° 31'	5,3
H23	Los Mayos	34° 47'	71° 40'	6,3
H24	Hualañé	34° 58'	71° 41'	6,4
H25	Licantén	35° 01'	72° 01'	6,5
H27	Quivolgo	35° 19'	72° 20'	6,0
H28	Faro Carranza	35° 35'	72° 31'	6,2
3a	Cauquenes	35° 38'	72° 19'	6,2
6a	La Estrella I	35° 40'	72° 11'	6,1
7a	La Estrella II	35° 40'	72° 11'	6,2
8a	La Estrella III	35° 40'	72° 11'	- ¹
H29	Chanco	35° 41'	72° 29'	6,1
5a	Santa Dolores I	35° 52'	72° 11'	6,4
4a	Santa Dolores II	35° 52'	72° 11'	6,2
9a	Fundo Roma	35° 54'	72° 10'	6,0
E.E.	Cauquenes	35° 58'	72° 19'	6,4
10a	Campos	35° 58'	72° 05'	6,1
1a	El Boldo I	35° 58'	72° 11'	6,0
2a	El Boldo II	35° 58'	72° 11'	6,1
19a	Fundo El Ala	36° 32'	72° 10'	-
H41	Rucapequén	36° 42'	72° 13'	7,7
14b	Bulnes	36° 44'	72° 20'	5,9
13b	Concepción	36° 51'	73° 03'	6,2
H32	Coronel	37° 03'	73° 09'	6,3
11a	Arauco	37° 16'	73° 20'	5,2
H33	Cañete	37° 48'	73° 23'	6,3
H34	Los Sauces	37° 58'	72° 44'	6,6
H35	Traiguén	38° 09'	72° 41'	5,8
H36	Galvarino	38° 14'	72° 41'	6,4
H40	Victoria	38° 14'	72° 23'	6,8
H37	Galvarino II	38° 18'	72° 42'	-
H39	Temuco II	38° 47'	72° 37'	6,4

¹Dato no determinado.

y pH 6,5). Previo a la siembra, los frascos fueron tapados con una capa doble de género y esterilizados en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Los cultivos de rizobios se prepararon sembrando una asada de cada cepa en tubos de ensayo conteniendo 12 ml de medio manitol-extracto de levadura, líquido (Medio 79) (Fred y Waksman, 1928) e incubándolos a 25 °C durante 7 días. La inoculación se efectuó agregando, asépticamente, 1 ml de cultivo de una cepa de rizobio a cada frasco. Como testigos se incluyeron frascos con plántulas sin inocular. El diseño estadístico correspondió al de uno completamente al azar con tres repeticiones.

Los frascos así sembrados e inoculados se dispusieron en la cámara de cultivo, en donde se mantuvieron por 45 días. Se efectuaron aplicaciones de agua cada 15 días para reponer el agua perdida del medio "agarizado". El riego se efectuó inyectando agua destilada esterilizada a través de la tapa de género mediante una jeringa "pipeteadora" estéril. Se usó un fotoperíodo de 14 horas diarias, manteniéndose la temperatura entre 24 y 26 °C.

Dado el alto número de cepas a probar y a la limitación en superficie de cámara de cultivo, se efectuaron dos ensayos (Ensayo I y Ensayo II). En el primero de ellos se probaron 33 cepas y en el segundo 18 (17 nuevas cepas y la mejor cepa del primer ensayo).

Evaluaciones

Se extrajeron cuidadosamente las plantas de los frascos, evitando perder raicillas y nódulos. Las plantas completas se secaron en horno a 60 °C hasta peso constante. Los datos de peso seco se analizaron mediante análisis de varianza y la prueba de rangos múltiples de Duncan. Con el objeto de agrupar las cepas con 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. Luego, se procedió a promediar los valores numéricos correspondientes a cada cepa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Dado que las plantas fueron cultivadas en solución nutritiva exenta de nitrógeno, se consideró a la acumulación de fitomasa como un criterio adecuado de selección de la efectividad de las

diferentes cepas de rizobios en estudio, debido a su estrecha relación con el contenido total de nitrógeno de las plantas (Vincent, 1962; Vincent, 1970; Gibson *et al.*, 1975; Kremer y Peterson, 1982).

Los dos ensayos revelaron un amplio rango de variación en la producción de fitomasa (peso seco), lo cual indica la diferencia en el potencial para fijar nitrógeno que poseen las cepas nativas de *R. meliloti* en simbiosis con *M. polymorpha*.

La prueba de comparación múltiple de Duncan ($P \leq 0,05$) mostró diferencias significativas entre los valores medios de fitomasa, llegando a separar hasta 7 y 4 grupos de cepas en los ensayos I y II, respectivamente, con un fuerte traslapeo entre ellos. Estas categorías se indican en los cuadros 2 y 3, siendo las cepas con letra "a" las más eficientes en fijación de nitrógeno al provocar mayores valores de acumulación de materia seca. El amplio rango de efectividad que presentan las cepas nativas de rizobios también se ha encontrado en otros estudios de poblaciones de *R. meliloti* (Purchase *et al.*, 1951) *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Uslar, 1972) *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Kremer y Peterson, 1982) y *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (Kremer y Peterson, 1982; Longeri, 1989), y refleja la heterogeneidad genética de las poblaciones naturales de rizobios de los suelos.

A objeto de poder visualizar mejor las posibles diferencias entre cepas, se calculó el índice de "efectividad relativa" (Longeri, 1989). La separación de estos valores en cuartiles permite catalogar a 10 de las 50 cepas (20% de la población) como eficientes. El bajo porcentaje de cepas eficientes en las poblaciones nativas de rizobios también ha sido encontrado en numerosos estudios de esta naturaleza (Purchase *et al.*, 1951; Vincent, 1962; Holding y King, 1963; Jones, 1966; Uslar, 1972; Hagedorn, 1978; Kremer y Peterson, 1982).

Este hecho señala que la práctica de inoculación de las semillas con cepas de *R. meliloti* eficientes es un requisito fundamental para el buen establecimiento de praderas de *M. polymorpha* en el secano interior, dada la alta probabilidad de la nodulación de las siembras con cepas poco eficientes o ineficientes.

El rango de pH de los suelos de los lugares donde se aisló las cepas nativas fluctuó entre 5,2 y 7,5 (Cuadro 1), con una acidificación progresiva de norte a sur. El 91% de los suelos tenía un pH 6,0 y el 54% un pH entre 6,0 y 6,4 (Figura 1); sólo

CUADRO 2. Peso seco de *Medicago polymorpha* inoculada con cepas de *Rhizobium meliloti* aisladas de sitios de la zona mediterránea de Chile. Ensayo 1TABLE 2. Dry weight of *Medicago polymorpha* inoculated with *Rhizobium meliloti* strains isolated from Chilean mediterranean zone locations. Trial 1

Cepa rizobio	Sitio colecta	Peso seco ¹ (g frasco ⁻¹)	Eficiencia relativa	
H7	Combarbalá	0,237 a ²	1,0	Grupo A
4a	Santa Dolores II	0,237 a	1,0	
H 8	Chañaral Alto	0,227 ab	1,5	
H13	Totalal	0,223 abc	2,0	
13b	Concepción	0,223 abc	2,0	
2a	El Bordo II	0,220 abcd	2,5	Grupo B
H 9	Ovalle	0,220 abcd	2,5	
H 5	Illapel	0,217 abcd	2,5	
3a	Cauquenes	0,210 abcde	3,0	
H12	Alcones	0,210 abcde	3,0	
14b	Bulnes	0,207 abcde	3,0	
H 3	Pichicuy	0,203 abcde	3,0	
E.E.	Cauquenes	0,200 abcde	3,0	
18b	Calleuque III	0,200 abcde	3,0	
5a	Santa Dolores I	0,197 abcde	3,0	
1a	El Bordo I	0,197 abcde	3,0	
15a	Calleuque I	0,193 abcde	3,0	
9a	Fundo Roma	0,190 abcde	3,0	
H17	Casablanca	0,197 abcde	3,0	
16a	Calleuque II	0,183 abcde	3,0	
H 6	Llahuín	0,183 abcde	3,0	
7a	La Estrella II	0,177 abcdef	3,5	
19a	Fundo El Ala	0,173 abcdef	3,5	
H16	Maitencillo	0,167 abcdef	3,5	
10a	Campos	0,157 abcdefg	4,0	
H 4	Los Vilos	0,157 abcdefg	4,0	
8a	La Estrella III	0,143 abcdefg	4,0	
H10	Vicuña	0,137 bcdefg	4,5	
H15	Zapallar	0,130 cdefg	5,0	Grupo C
6a	La Estrella I	0,130 cdefg	5,0	
H14	Papudo	0,127 defg	5,5	
H18	Los Maitenes	0,120 efg	6,0	
11a	Arauco	0,087 fg	6,5	
-	Testigo no inoculado	0,070 g	7,0	Grupo D

¹Tres plantas por frasco.²Cifras con distinta letra son estadísticamente diferentes ($P \leq 0,05$).

una localidad presentó un pH inferior (5,2), aunque muy cercano al límite 5,3 a 5,5, señalado como inhibitorio para el crecimiento de *R. meliloti* y al límite 5,3 a 5,4 para la nodulación de *M. polymorpha* (Jensen, 1942, 1943). Por lo tanto, el pH de los suelos de la zona en estudio no parece ser un factor que impida la nodulación de la planta y la sobrevivencia de los rizobios.

Otros estudios han indicado un efecto de las propiedades del suelo sobre la efectividad simbiótica de las poblaciones nativas de rizobios. Holding y King (1963), en Escocia, y Hagedorn (1978), en Oregon, encontraron que la efectividad

de cepas de *R. trifolii* en simbiosis con *T. repens* correlacionó ($P \leq 0,001$) negativamente con el pH, y positivamente con el porcentaje de saturación de bases; Jones (1966), en Escocia, también encontró una mayor proporción de cepas de *R. trifolii* inefectivas en los suelos más ácidos y que el encalado aumentó la proporción de cepas efectivas en la población nativa. Holding y King (1963) estiman que las condiciones de los suelos ácidos (toxicidad de Mn y Al) afectan menos la multiplicación e infectividad de las cepas menos eficientes y que la corrección del pH crea condiciones más favorables para la mantención de una población de rizobios eficientes.

CUADRO 3. Peso seco de *Medicago polymorpha* inoculada con cepas de *Rhizobium meliloti* aisladas de sitios de la zona mediterránea de Chile. Ensayo 2

TABLE 3. Dry weight of *Medicago polymorpha* inoculated with *Rhizobium meliloti* strains isolated from Chilean mediterranean zone locations. Trial 2

Cepa rizobio	Sitio colecta	Peso seco ¹ (g frasco ⁻¹)	Eficiencia relativa		
H41	Rucapequén	0,151 a ²	1,0	Grupo A	
H7	Combarbalá	0,237 a	1,0		
H29	Chanco	0,142 a	1,0		
H25	Licantén	0,138 ab	1,5	Grupo B	
H34	Los Sauces	0,137 ab	1,5		
H27	Quivolgo	0,136 ab	1,5		
H36	Galvarino I	0,133 ab	1,5		
H40	Victoria	0,131 ab	1,5		
H35	Traiguén	0,125 ab	1,5		
H23	Los Mayos	0,121 ab	1,5		
H24	Hualañé	0,119 ab	1,5		
H37	Galvarino II	0,117 ab	1,5		
H19	Rapel	0,108 ab	1,5		
H33	Cañete	0,101 ab	1,5		
H28	Faro Carranza	0,100 ab	1,5		
H39	Temuco II	0,097 ab	1,5		
H32	Coronel	0,092 ab	1,5		
H22	Peralillo	0,090 ab	1,5		
-	Testigo no inoculado	0,059 b	2,0		Grupo C

¹Tres plantas por frasco.

²Cifras con distinta letra son estadísticamente diferentes ($P \leq 0,05$).

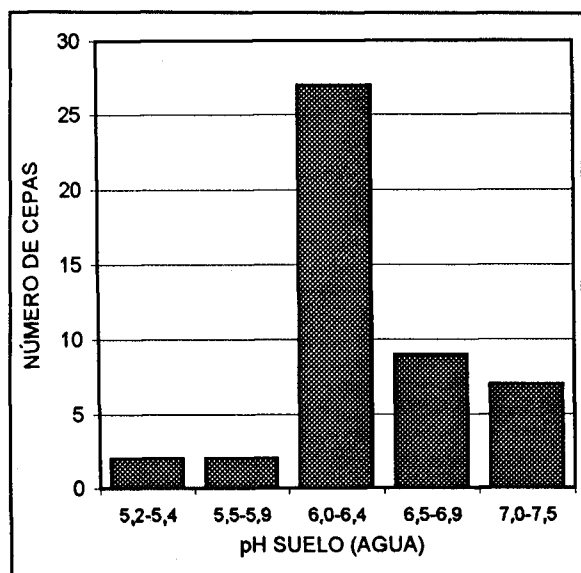


FIGURA 1. Frecuencia de las cepas de *R. meliloti* en relación al pH del suelo del sitio de colecta.

FIGURE 1. Frequency of *R. meliloti* strains in relation to pH of the collecting site.

En el estudio, también se encontró una relación entre el pH de los suelos y la efectividad de las cepas de *R. meliloti* en simbiosis con *M. polymorpha*. Así, tanto la correlación entre el pH del sitio de colecta y el peso seco de las plantas inoculadas como la correlación entre el pH y el peso relativo de las plantas inoculadas [(peso planta inoculada - peso planta no inoculada) / peso planta inoculada - peso planta no inoculada] x 100] fueron significativas ($P \leq 0,01$). Además, las 10 cepas más eficientes seleccionadas (cuadros 1 y 2) provienen de suelos con pH mayor a 6,0; el 60% de estas cepas provienen de suelos con pH mayor a 6,5; la cepa más eficiente (H7, Combarbalá) fue aislada de un suelo con pH 7,3 y la cepa menos eficiente (11a, Arauco) del suelo más ácido (pH 5,2).

Por lo tanto, estos resultados llevan a concluir que desde un punto de vista aplicado, aparte de la necesidad de la inoculación con cepas eficientes, debe prestarse especial atención en mantener mediante encalado, niveles apropiados de pH en el suelo, ya que éstos favorecen la ocurrencia y la mantención de las cepas de mayor eficiencia.

Por otra parte, el gradiente de precipitaciones existente en el país, entre estas latitudes, determina que la mayoría de los suelos con pH alto se encuentren mayoritariamente en el norte, que

es, a la vez, la zona de mayor aridez. La posible relación entre el estrés relativo a la aridez y la eficiencia de las cepas de rizobio es un tema que merece a futuro mayores investigaciones.

RESUMEN

Un total de cincuenta cepas de *Rhizobium meliloti* fueron colectadas en la zona mediterránea de Chile entre la IV y la IX Regiones (30° 07' S a 38° 47' S).

Las cepas fueron sometidas a pruebas de eficiencia de fijación de nitrógeno en cámara de cultivo. Las 50 cepas se probaron con un ecotipo de *Medicago polymorpha* (ecotipo Cauquenes), sembrando e inoculando las plantas dispuestas en frascos con solución nutritiva "agarizada", exenta de nitrógeno. El diseño estadístico fue completamente al azar con tres repeticiones. Se encontraron diferencias significativas en la producción de fitomasa, lo cual indica el diferencial de potencial para fijar nitrógeno que poseen los materiales ensayados. Sin embargo, esta diferenciación se da en grupos amplios de cepas que comparten similar eficiencia de fijación, lo cual hace difícil la selección.

El rango de pH (agua) de los suelos de los sitios de colecta osciló entre 5,2 y 7,5. Sin embargo, un 54% de ellas provenía de suelos con pH entre 6,0 y 6,4. Se encontró una correlación significativa ($P \leq 0,01$) entre el pH de los suelos y la efectividad de las cepas. Las 10 cepas más eficientes provienen de suelos con pH mayor a 6,0; el 60% de estas cepas provienen de suelos con pH mayor a 6,5; la cepa más eficiente (H7, Combarbalá) fue aislada de un suelo con pH 7,3 y la cepa menos eficiente (11a, Arauco) del suelo más ácido (pH 5,2).

Las implicancias agronómicas de la relación eficiencia de fijación de las cepas con un pH de suelo alto, son brevemente discutidas.

Palabras claves: *Rhizobium meliloti*, cepas de rizobios, *Medicago polymorpha*, medicagos anuales, eficiencia de fijación de nitrógeno.

LITERATURA CITADA

- BROCKWELL, J. 1985. The role of *Rhizobium meliloti* in annual medic ley pasture in central-western New South Wales: a pragmatic appraisal. En: The ecology and agronomy of Annual Medics.: Proceeding Workshop Department of Agriculture, Tech. Bull. N° 34. p.: 37-42.
- DEL POZOL, A., OVALLE M., C. y AVENDAÑO R., J. 1989a. Los medicagos anuales en Chile. I. Comparación con Australia. Agricultura Técnica (Chile) 49: 260-267.
- DEL POZOL, A., OVALLE M., C. y AVENDAÑO R., J. 1989b. Los medicagos en Chile II. Ecofisiología. Agricultura Técnica (Chile) 49: 268-274.
- DEL POZO L., A., OVALLE M., C., AVENDAÑO R., J. y DEL CANTO S., P. 1989c. Los medicagos anuales en Chile III. Perspectivas de la rotación medicago-trigo en el secano interior de la zona mediterránea. Agricultura Técnica (Chile) 49: 275-280.
- FAO. 1983. Technical handbook on symbiotic nitrogen fixation. Legume/*Rhizobium*. Rome, Italy.
- FRED, E.B. and WAKSMAN, S.A. 1928. Laboratory manual of general microbiology. McGraw-Hill Book Co., N.Y.
- GIBSON, A.H., CURNOW, B.C., BERGERSEN, F.J., BROCKWELL, J., and ROBINSON, A.C. 1975. Studies of field populations of *Rhizobium*: effectiveness of strains of *Rhizobium trifolii* associated with *Trifolium subterraneum* L. pastures in South-Eastern Australia. Soil Biology and Biochemistry 7: 95-102.
- HAGEDORN, C. 1978. Effectiveness of *Rhizobium trifolii* populations associated with *Trifolium subterraneum* L. in Southwest Oregon soils. Soil Science Society American Journal 42: 447-451.
- HOLDING, A.J. and KING, J. 1963. The effectiveness of indigenous populations of *Rhizobium trifolii* in relation to soil factors. Plant and Soil 18:191-198.
- HOWIESON, J. G. and EWING, M. A. 1986. Acid tolerance in the *Rhizobium meliloti*-*Medicago* symbiosis. Australian Journal Agricultural Research 37: 55-64.
- HOWIESON, J.G., EWING, M.A. and D'ANTUONO, M.F. 1988. Selection for acid tolerance in *Rhizobium meliloti*. Plant and Soil 105: 179-188.
- ICARDA, INTERNACIONAL CENTER FOR AGRICULTURAL RESEARCH IN THE DRY AREAS. 1986. Pasture, forage and livestock. Annual report, 221 p.

- JENSEN, H.L. 1942. Nitrogen fixation in leguminous plants. I. General characters of root-nodule bacteria isolated from species of *Medicago* and *Trifolium* in Australia. Proceeding of the Linneal Society N.S.W. 67: 98-108.
- JENSEN, H.L. 1943. Nitrogen fixation in leguminous plants. IV. The influence of reaction on the formation of root nodules in *Medicago* and *Trifolium*. Proceeding of the Linneal Society N.S.W. 68: 207-220.
- JONES, D.G. 1966. The contribution of white clover to a mixed upland sward. II. Factors affecting the density and effectiveness of *Rhizobium trifolii*. Plant and Soil 24: 250-260.
- KREMER, R.J. and PETERSON, H.L. 1982. Isolation, selection and evaluation of *Rhizobium* under controlled conditions. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 13: 749-774.
- LETELIER A., F. 1989. Diagnóstico de un problema de establecimiento de medicagos de origen Australiano, en el secano litoral de la VI Región de Chile. Agricultura Técnica (Chile) 49: 186-192.
- LONGERI, L. 1989. Factores que influyen en la fijación de nitrógeno y en la producción del fréjol. Informe Proyecto FIA 57/58, Tercera etapa 32 p.
- OVALLE M., C., ARONSON, J.; DEL POZO L., A. and AVENDAÑO R., J. 1990. The espinal: agroforestry system of the mediterranean-type climate region of Chile. Agroforestry Systems 10: 213-239.
- OVALLE, C., ARONSON, J., AVENDAÑO, J., DEL POZO, A. and CRESPO, D. 1994. Germplasm collection, description and selection of naturalized *Medicago polymorpha* in the mediterranean zone of Chile. Proc. 17th Grassland Congress, Palmeston North-Brisbane, New Zealand-Australia. p.: 222-223.
- PURCHASE, H.F., VINCENT, J.M. and WARD, L.M. 1951. The field distribution of strains of nodule bacteria from species of *Medicago*. Austr. J. Agr. Res. 2: 261-272.
- USLAR, R.S. 1972. Estudio de la efectividad de algunas cepas nativas de *Rhizobium trifolii* en simbiosis con *Trifolium subterraneum* L. Universidad de Concepción, Escuela de Agronomía, Chillán, Chile. 81 p. (Tesis para optar al título de Ing. Agr.).
- VINCENT, J.M. 1962. Australian studies of the root-nodule bacteria. Proceeding of the Linneal Society N.S.W. 87: 8-38.
- VINCENT, J.M. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. IBP Handbook Nº 15. Blackwell Scientific Publications, Oxford.