

Evaluación de la interacción genotipo-ambiente en el establecimiento de *Lotus uliginosus* (Schkuhr) mediante cilindros de suelo

SEBASTIÁN HERNÁNDEZ¹, [MÓNICA REBUFFO](#)^{1*}, SEBASTIÁN ARRIVILLAGA¹, MARTÍN JAURENA², CARLOS LABANDERA², DIEGO RISSO³ and JAVIER CILIUTI¹

¹ Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay.

² Laboratorio de Microbiología de Suelos (MGAP), Montevideo, Uruguay.

³ Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, INIA Tacuarembó, Tacuarembó, Uruguay.

*Corresponding author

Introducción

Lotus uliginosus Schkuhr es una leguminosa perenne altamente adaptada a los suelos de Uruguay. Su extenso sistema subterráneo formado por la corona y el raíz pivotante central da origen a una red de rizomas, estolones y raíces fibrosas que colonizan exitosamente el tapiz natural (Carámbula *et al.*, 1994). El cultivar tetraploide Grasslands Maku (Maku) es el más utilizado en el país, aun cuando se han evaluado otros cultivares diploides (Castaño y Menéndez, 1998). Maku, liberado en 1975 en Nueva Zelanda, se generó a partir de ecotipos locales e introducciones de Portugal con excelente crecimiento invernal (Charlton, 1983). La duplicación cromosómica aumentó su tamaño de semilla y vigor de plántula. La persistencia y alta producción de forraje son las principales características para mejorar el campo natural en las áreas extensivas de ganado de cría, particularmente en el Este del país (Risso *et al.*, 1990; Carámbula *et al.*, 1994; Carámbula *et al.*, 1996; Castaño y Menéndez, 1998). En estas condiciones, Maku muestra una mejora en el comportamiento comparado con otras leguminosas de reconocida capacidad productiva, como *Lotus corniculatus* (Risso y Berretta, 1996; Castaño y Menéndez, 1998).

El crecimiento vegetativo de Maku se contrapone a la baja producción de semilla en las condiciones ambientales de Uruguay. Por este motivo el programa de mejoramiento genético de INIA estuvo dirigido a obtener un Lotus adaptado con alta producción de semilla. La línea experimental LE 627 es un material diploide de floración temprana, con buen crecimiento inicial y alto potencial de semilla. La evaluación regional de LE 627 produjo resultados inconsistentes; su lento establecimiento y corta persistencia han sido verificados en los suelos de basalto, en oposición a los resultados en el Este del país, donde los experimentos se establecieron exitosamente (Risso D. *Com. Pers*; Iglesias y Ramos, 2003; INASE, 2005; Castaño y Menéndez, 1998). Este comportamiento diferencial es probablemente debido a una interacción genotipo-ambiente, o a una adaptación específica de este genotipo a los diferentes suelos, a condiciones ambientales o una interacción en la relación simbiótica.

Un claro ejemplo de interacciones simbióticas ocurre con la introducción de especies del

género *Lotus* y razas del rizobio que pueden ser efectivas o parásitas de acuerdo con la combinación del huésped (Pérez y Labandera, 1998; Irrisarri *et al.*, 1996). Las razas de rizobio capaces de producir nódulos en *Lotus* spp. pertenecen a *Rhizobium loti* y *Bradyrhizobium* spp., con una relativa especificidad entre las especies y sus simbiontes. *L. corniculatus* y *L. glaber* forman un grupo simbiótico efectivo con las cepas de crecimiento rápido (*R. loti*) mientras que *Lotus subbiflorus* y *L. uliginosus* forman otro grupo efectivo con cepas de crecimiento lento (*Bradyrhizobium* sp.; Brockwell *et al.*, 1994; Baraibar *et al.*, 1999). Estos grupos simbióticos tienen relaciones de incompatibilidad entre ellos: la bacteria de un grupo simbiótico produce nódulos en el otro grupo huésped pero las relaciones son inefectivas o parasitarias. Bajo estas condiciones no hay fijación de nitrógeno porque la simbiosis funcional no ocurre, y por lo tanto podrían ocurrir dificultades en el establecimiento. Lieven-Antoniou y Whittam (1997) determinaron los mecanismos que llevan al reconocimiento diferencial de genotipos del huésped (*L. corniculatus*) y su simbionte (*R. loti*). Sin embargo, hay cepas de crecimiento rápido (NZP2037) que forman nódulos efectivos en ambos grupos simbióticos, aunque su efectividad no es tan alta como los grupos específicos (Labandera *C. Com.Pers.*; Pankhurst, 1981; Scott *et al.*, 1987; Barrientos *et al.*, 2002). Los programas de selección de cepas de rizobio para *L. subbiflorus* y *L. uliginosus* han mostrado mucho mayor eficiencia con cepas de crecimiento lento (Mayans 2003). La colección de cepas de rizobio del Departamento de Microbiología de Suelos (RENARE-MGAP, Uruguay) tiene varias cepas y aislamientos para las especies del género *Lotus*. La cepa U526 (NZP 2309, Nueva Zelanda) se recomienda para *L. uliginosus* en Uruguay, mientras que la cepa 531 (NC3, Uruguay) se recomienda para *L. subbiflorus*, aunque ambas cepas son efectivas en cualquier huésped (<http://fp.chasque.apc.org:8081/microlab/LMSCI/catalogo/marco.htm>).

Los rizobios nativos o naturalizados que nodulan efectivamente las cuatro especies de *Lotus* de importancia agronómica están generalmente presentes en los suelos de Uruguay. *L. corniculatus* se ha utilizado desde los 60 en las rotaciones con cultivos en el área agrícola. Por consiguiente, estos suelos tienen una concentración importante de cepas efectivas para este huésped. Sin embargo, sin esta historia previa de cultivo, las pasturas naturales generalmente tienen *Mesorhizobium loti* nativo, con alta variabilidad en la eficiencia simbiótica (Baraibar *et al.*, 1999). Rizobios nativos efectivos que nodulan *L. uliginosus* y *L. subbiflorus* están en muy bajas concentraciones y por lo tanto, no compiten con las cepas introducidas. No obstante, con la introducción de leguminosas inoculadas del mismo género, importantes concentraciones de rizobio permanecen en el suelo. Si las especies de *Lotus* a ser introducidas no pertenecen al mismo grupo simbiótico que la población de rizobio predominante en el suelo, podría provocar establecimiento defectuoso o pérdidas de rendimiento (Gwynne *et al.*, 1980). Las dificultades de establecimiento pueden atribuirse en estos casos a interacciones huésped-cepa con menor eficiencia en fijación de nitrógeno, lo cual podría restringir el potencial simbiótico del huésped. En conclusión, el establecimiento exitoso de especies del género *Lotus* depende de la efectividad de las poblaciones del rizobio presentes en el suelo y el manejo adecuado de la técnica de la inoculación (Skerman *et al.*, 1991; Labandera *et al.*, 2005).

LE 627 ha tenido un comportamiento inconsistente en los ensayos regionales, con pobre establecimiento en los suelos de basalto, cuestionando el papel de los tipos de suelo y la

población de rizobios nativos en el establecimiento de este genotipo. El objetivo de esta investigación fué analizar la interacción huésped-rizobio-suelo en el establecimiento de la simbiosis y desarrollo inicial de *L. uliginosus*, usando cilindros de suelo bajo condiciones ambientales uniformes.

Materiales y Métodos

Los tratamientos consistieron en 2 genotipos, con y sin inoculación y 4 tipos de suelo en un diseño factorial completo con 6 repeticiones. Los genotipos fueron el cultivar G. Maku y la línea experimental LE 627. Cada genotipo fue sembrado con (WI) y sin (NI) la cepa de rizobio U-526. La inoculación se hizo regando el doble de la dosis comercial recomendada.

Los cuatro suelos son representativos de las principales áreas de producción extensiva y tienen características físico-químicas diferentes (Cuadro 1). Éstos corresponden a: (1) los suelos bajos del Este (Lowl) sobre rastrojo de arroz de Paso La Laguna (Treinta y Tres), representativo de los niveles topográficos más bajos en las llanuras del Este. Estos suelos pesados, húmedos, tienen una napa freática poco profunda durante la mayoría del año. (2) suelos de basalto (Bas) con campo natural de Glencoe (Paysandu), representativo de suelos medios de la región basáltica dónde el paisaje corresponde a colinas y valles escarpados. Estos suelos tienen frecuentemente fragmentos gruesos abundantes tales como arenas gruesas y piedras y la arcilla predominante es la montmorillonita. (3) los suelos de lomadas (Rol) con campo natural de Palo a Pique (Treinta y Tres), representativo de los niveles más altos en el paisaje del Este conocido como “Lomadas del Este.” El suelo presenta alternancia de áreas altas y deprimidas formando dos perfiles: la fase superficial con un espesor del horizonte A de 10 - 30 centímetros y la fase profunda dónde el espesor del horizonte A es de 30 - 90 cm. (4) los suelos graníticos medios (Gra) con campo natural de La Carolina (Flores), representativo de la región granítica Central. Este área tiene suelos poco profundos asociados con suelos profundos y más fértiles desarrollados sobre sedimentos limo-arcillosos que cubren la base granítica.

Cuadro 1. Característica química de los perfiles modales del suelo (Fuente: Ministerio de Agricultura y Pesca, 1979)

Localidad	Unidad de Suelo	Suelo Predominante	Horizonte cm	pH (agua) 1:2.5	CIC _{pH 7} *	V(%) _{pH 7}
Lowl	La Charqueda	Solod Melánico	A ₁ , 0-17	5.5	13.0	52
Bas	Chico	Litosol Eutrico Melánico	A ₁ , 0-12	5.9	42.6	79.1
Rol	José Pedro Várela	Argisol Subéutrico	A ₁ , 0-21	5.5	18.5	55
Gra	La Carolina	Brunosol Eutrico	A ₁ , 0-26	6.1	27.1	80.8

CIC_{pH 7} = capacidad de intercambio de cationes a pH 7

V(%)_{pH 7} = (base total / CIC_{pH 7})100

Las muestras de suelo se tomaron con un calador de suelo de 8 centímetros de diámetro y 15 centímetros de profundidad, manteniendo intacta la estructura del suelo y el tapiz natural. Los cilindros de suelo se pusieron en las bolsas de plástico para contener el riego y fueron sembrados el 15 de julio 2003 con aproximadamente 20 semillas viables por cilindro. El experimento se repitió en dos ambientes contrastantes para analizar el efecto de la temperatura en las variables bajo estudio durante el período de establecimiento. Los experimentos se localizaron en invernáculos: uno a 18-25°C y otro a 8-20°C.

Se hizo el seguimiento semanal del vigor y desarrollo inicial. En septiembre 2003, 10 semanas después de la siembra, se hizo la evaluación destructiva de los cilindros de suelo mediante inmersión en agua. La masa aérea y radicular fresca se pesó separadamente. El tamaño, cantidad y localización de los nódulos fueron evaluados por estimación visual con una escala de 10 valores adaptada Master Class (2000; Cuadro 2).

Cuadro 2. Escala de nodulación

Escala	Descripción	Escala	Descripción
1	Sin nódulos efectivos	6	Pocos nódulos efectivos en la raíz principal y muchos nódulos en raíces secundarias
2	Muy pocos nódulos en raíces secundarias	7	Pocos nódulos efectivos solo en la raíz principal
3	Pocos nódulos efectivos en raíces secundarias	8	Corona con pocos nódulos efectivos
4	Muchos nódulos efectivos en raíces secundarias	9	Corona semi-cubierta con nódulos efectivos
5	Pocos nódulos efectivos en la raíz principal y pocos en raíces secundarias	10	Corona completamente cubierta con nódulos efectivos

Resultados y discusión

La temperatura tuvo una gran incidencia en el establecimiento de *L. uliginosus*, con mayor crecimiento y diferencias más grandes entre tratamientos en el ambiente cálido (18-25°C; Cuadros 3 y 4). Había una interacción triple entre genotipos, suelos e inoculación en ambas temperaturas en el crecimiento foliar de las plántulas (Cuadro 3), indicando la respuesta simbiótica diferencial de los genotipos en diferentes suelos. Maku respondió a la inoculación con U-526 en Lowl en ambas temperaturas (Figura 1a) y en Rol a 18-25°C (Figura 2a), mientras no hubo efecto de la inoculación en Gra y Bas (Figura 3a y 4a) en ambas temperaturas y en Rol a 8-20°C. En contraposición, LE 627 respondió a la inoculación sólo en Bas a 18-25°C (Figura 4b), aunque el peso aéreo de las plántulas fue menor que el mejor crecimiento obtenido en Rol con o sin inoculación (Figura 2b). El mejor crecimiento de plántulas de ambos genotipos se obtuvo siempre en Rol, posiblemente indicando un suelo favorable para el establecimiento de *L. uliginosus* y/o la presencia de cepas efectivas (Figura

5c). No hubo ninguna respuesta a la inoculación de rizobio en Gra, probablemente un indicio de cepas naturalizadas de antecedentes de cultivo de *L. subbiflorus* que enmascaran el impacto de la inoculación.

Los datos de masa foliar demostraron la gran influencia de las poblaciones de rizobios nativos o naturalizados del suelo en el desarrollo de las plántulas de ambos genotipos. Además, podrían indicar cierta especificidad cepa-huésped, dado que sólo Maku respondió a la inoculación en Lowl, mientras LE 627 tuvo una baja respuesta a la inoculación en Bas que no alcanza los valores obtenidos en Rol. Estos resultados corroboraron el buen comportamiento de la cepa U-526 para Maku y la necesidad de seleccionar cepas en condiciones de campo para la línea diploide LE 627, dado que la interacción genotipo-cepa para *L. uliginosus* diploid y tetraploid ya ha sido reportada (Barrientos *et al.*, 2001).

Cuadro 3. Peso fresco de parte aérea (g/ cilindro) para diferentes temperaturas, genotipos, suelos y tratamientos de inoculación.

		Temperatura			
		18-25°C		8-20°C	
Genotipos <i>L. uliginosus</i>		LE 627	Maku	LE 627	Maku
Suelo	Inoculación				
Basalto (Bas)	NI	0.54	1.17	0.47	0.79
	WI	1.61	1.32	0.30	0.47
Granítico (Gran)	NI	1.96	1.94	1.00	0.89
	WI	1.57	2.26	0.99	0.52
Lomadas (Rol)	NI	2.51	2.47	1.88	1.77
	WI	2.74	3.27	1.42	1.44
Bajos (Lowl)	NI	1.34	1.09	1.00	0.52
	WI	1.74	3.35	1.07	2.59
MDS (5%)		0.78		0.71	
Significancia		0.008		0.024	

Cuadro 4. Peso fresco de raíz (g/ cilindro) y escala de nodulación para diferentes suelos y tratamientos de inoculación.

Temperaturas		Peso radicular		Escala de nodulación	
		18-25°C	8-20°C	18-25°C	8-20°C
Suelos	Inoculación				
Basalto (Bas)	NI	0.25	0.18	3.29	3.38
	WI	0.34	0.15	8.21	6.10
Granitic (Gra)	NI	0.56	0.31	7.44	6.59
	WI	0.47	0.39	7.70	6.69
Rolling Hills (Rol)	NI	0.60	0.73	7.93	6.81
	WI	0.71	0.53	8.47	7.14
Lowlands (Lowl)	NI	0.34	0.24	5.56	5.65
	WI	0.62	0.39	9.06	8.72
MDS (5%)		0.15	0.15	1.17	1.50
Significancia		0.015	0.01	<0.001	0.008

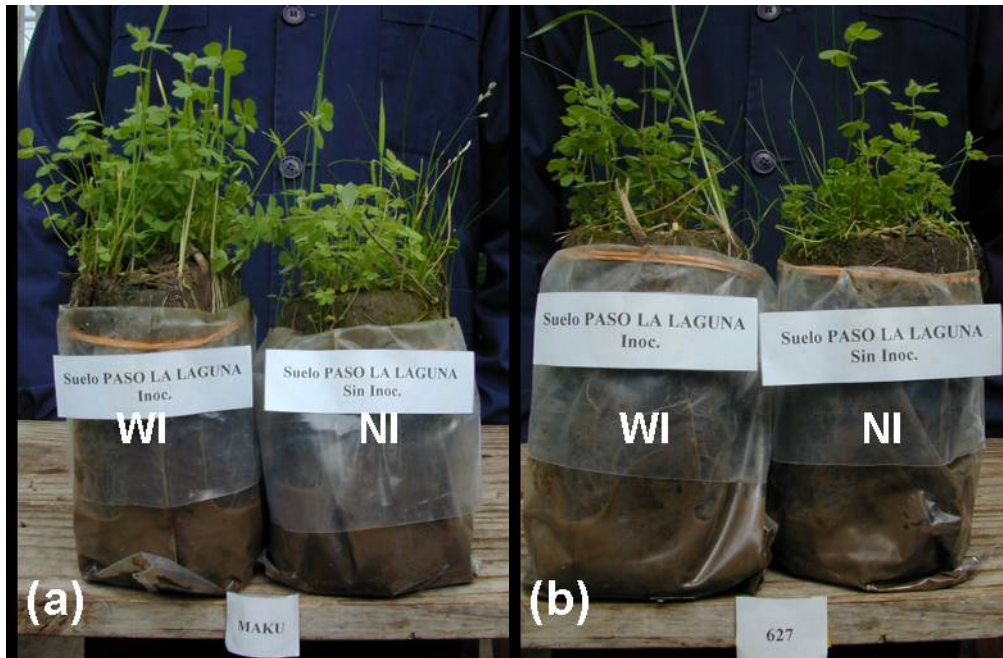


Figura 1. Cilindros de los bajos del Este (Low1) creciendo a 18-25°C sembrados con Maku (a) y LE 627 (b). WI inoculado con U-526 y NI sin inoculación.

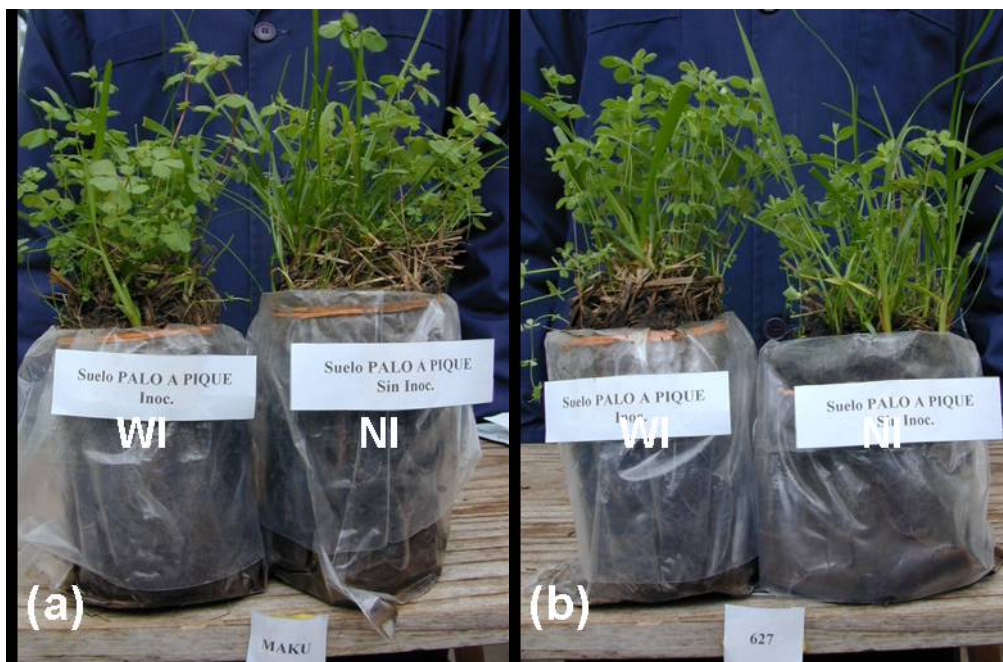


Figura 2. Cilindros de las lomadas del Este (Rol) creciendo a 18-25°C sembrados con Maku (a) y LE 627 (b). WI inoculado con U-526 y NI sin inoculación.

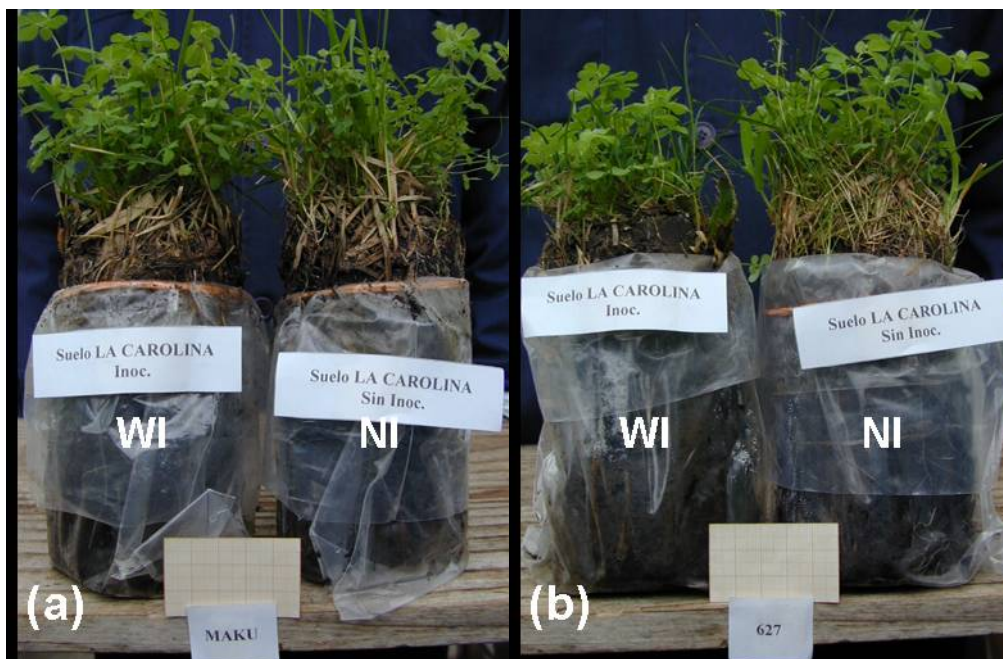


Figura 3. Cilindros de suelo granítico (Gra) creciendo a 18-25°C sembrados con Maku (a) y LE 627 (b). WI inoculado con U-526 y NI sin inoculación.

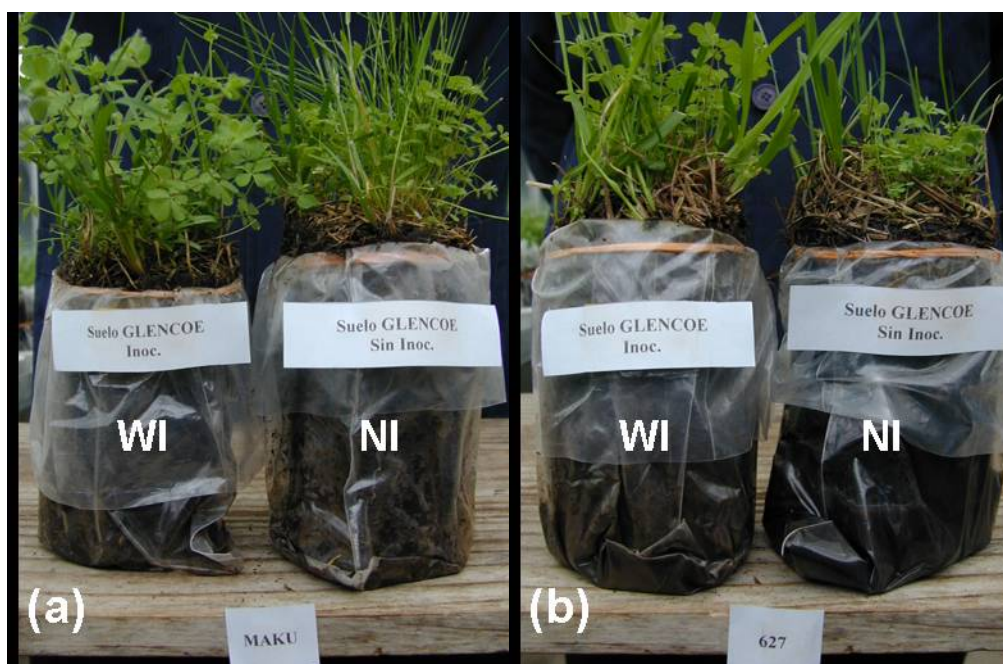


Figura 4. Cilindros de suelo de basalto (Bas) creciendo a 18-25°C sembrados con Maku (a) y LE 627 (b). WI inoculado con U-526 y NI sin inoculación.

Los tipos de suelo tuvieron un gran efecto en el establecimiento de *L. uliginosus* (Figura 5). El efecto principal de suelo demostró que ambos genotipos tenían mejor comportamiento en Rol que en Bas, en concordancia con las observaciones del campo (Risso, D., Com. Pers; Iglesias y Ramos, 2003; Carámbula *et al.*, 1996; Castaño y Menéndez, 1998), mientras el crecimiento fué intermedio en los suelos Lowl y Gra. La incidencia del suelo en el crecimiento de *L. uliginosus* también se observó en el desarrollo radicular (Cuadro 4). El crecimiento radicular fue menor en Bas a 18-25°C comparado con Rol y Gra, mientras que sólo hubo diferencias significativas entre Bas y Rol a 8-20°C. Estos datos confirmaron los resultados de anteriores experimentos de campo (Iglesias y Ramos, 2003; Castaño y Menéndez, 1998), y descartaron la temperatura como factor determinante del comportamiento diferencial de *L. uliginosus* entre regiones.

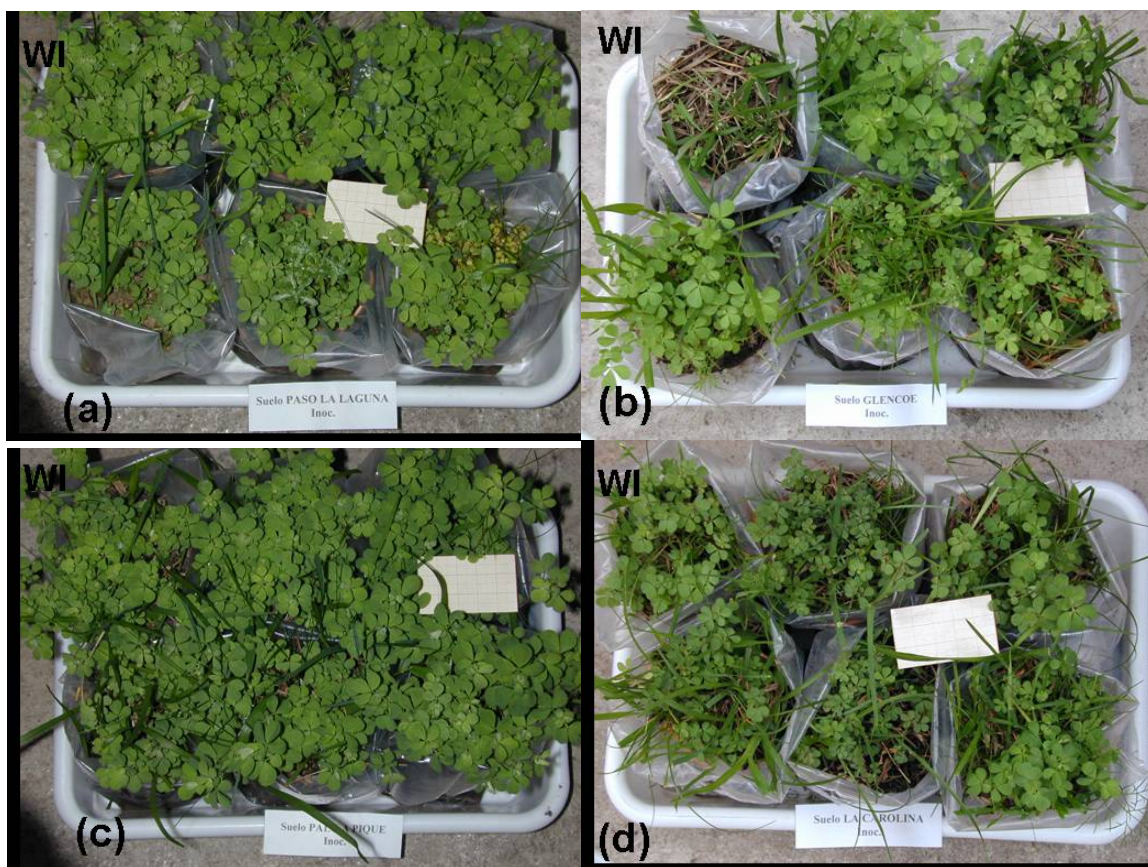


Figura 5. Cilindros de suelo inoculados creciendo a 18-25°C: (a) suelos bajos del Este con rastrojo de arroz (Lowl); (b) suelos de basalto con campo natural (Bas); (3) lomadas del Este con campo natural (Rol); (d) suelos graníticos con campo natural (Gra).

La inoculación de rizobio tuvo una fuerte interacción con los suelos en el desarrollo radicular en ambas temperaturas, dado que WI produjo raíces más grandes sólo en Lowl (Cuadro 4). Por otro lado, los valores de la escala de nodulación en Lowl y Bas fueron significativamente superiores en WI que en NI. La respuesta de la inoculación en Bas sólo se registró en la escala de nodulación, dado que no hubo mejora significativa ($P < 0.05$) en

crecimiento aéreo o radicular (Cuadros 3 y 4). Estos resultados podrían indicar la presencia de otras restricciones de crecimiento asociadas a los suelos de la región basáltica.

La alta respuesta a la inoculación en Bas y Lowl podría explicarse por la ausencia o baja concentración de cepas efectivas de rizobio en estos suelos, confirmando el impacto de la inoculación en estos suelos en el establecimiento y crecimiento inicial de *L. uliginosus* (Vance *et al.*, 1987). A pesar de las observaciones de campo que muestran las dificultades para lograr buenas poblaciones de LE 627 en suelos de basalto (D.Risso, *Com.Pers.*; Iglesias y Ramos, 2003), su peso de plántula fue similar (el $P < 0.05$) a Maku en este experimento, evidenciando restricciones en el establecimiento de ambos genotipos

La evaluación de cilindros de suelo con campo natural permitió un primer acercamiento al estudio del problema de establecimiento de *L. uliginosus* y su respuesta a la inoculación en diferentes suelos de Uruguay, descartando las diferencias climáticas entre áreas mediante la estandarización del ambiente. Esta investigación ha mostrado una interacción entre los genotipos del huésped e inoculación con U-526 vinculados con la presencia / ausencia de cepas efectivas de rizobio en diferentes suelos. De forma similar, las dificultades de establecimiento de *L. uliginosus* en suelos de basalto están asociadas a características físicas del suelo. La comprensión de los factores involucrados en estas interacciones genotipo-suelo requiere una investigación más precisa y de mayor duración para identificar las características de suelo que restringen el establecimiento y conocer las relaciones entre los genotipos del huésped y del rizobio, así como las poblaciones nativas de rizobio. Finalmente, sería necesario realizar un mayor esfuerzo en la selección de cepas específicas de rizobio para el genotipo diploide LE 627.

Agradecimientos

Gracias a nuestros colegas Raúl Bermúdez, Robin Cuadro y Rafael Reyno por la colecta de muestras de suelo. También extendemos el agradecimiento al personal permanente del departamento de Plantas Forrajeras. Nos gustaría particularmente agradecer a Dinorah Rey, Digno Mirabal y Omar Barolin por el mantenimiento del experimento, y a José Rivoir por la evaluación del mismo.

Bibliografía

- ALLEN O.N. 1962. The inoculation of legumes. In HUGHES H.D., HEATH M.E. and METCALFE D.S. (eds). Forages: the science of grassland agriculture. 2. ed. Ames, Iowa State University Press. p. 119-126.
- BARAIBAR A., FRIONI L., GUEDES M. E and LJUNGGREN H. 1999. Symbiotic effectiveness and ecological characterization of indigenous *Rhizobium loti* population in Uruguay. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, **34**, 1001-1017.
- BARRIENTOS L., HIGUERA M., ACUÑA H., GUERRERO J., ORTEGA F. and SEGUEL I. 2002. Efectividad simbiótica de cepas naturalizadas de *Mesorhizobium loti* y

- Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) en plantas de tres especies del género *Lotus*. [Symbiotic effectiveness of indigenous strains of *Mesorhizobium loti* and *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) in plants of three *Lotus* plant species.] *Agricultura Técnica* (Chile), **62**, 226-236. [In Spanish]
- BROCKWELL J., HEBB D.M. and KELMAN W.M. 1994. Symbiotaxonomy of *Lotus* species and symbiotically related plants and of their root-nodule bacteria. The First International *Lotus* symposium, 22-24 March 1994 Missouri USA.
- CARÁMBULA M., AYALA W. and CARRIQUIRRY E. 1994. *Lotus pedunculatus*. Adelanto sobre una forrajera que promete. [*Lotus pedunculatus*. Advances about a forage species that promise]. INIA Treinta y Tres, Uruguay. *Serie Técnica*, 45, 13 p. [In Spanish]
- CARÁMBULA M., BERMUDEZ R. and CARRIQUIRRY E. 1996. Características relevantes de *Lotus Maku*. [Relevant characteristics of *Lotus Maku*.] *In* Producción animal. Unidad experimental Palo a Pique. INIA Treinta y Tres, Uruguay. *Serie de Actividad y Difusión*, **110**, 7-16 p. [In Spanish]
- CASTAÑO J. and MENÉNDEZ F. 1998. Caracterización vegetativa y producción de semillas de *Lotus*. [Vegetative characterization and seed production of *Lotus*]. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay, Facultad de Agronomía. 67p. [In Spanish]
- CHARLTON J.F.L. 1983. *Lotus* and other legumes. In WRATT G.S. and SMITH H.C. (eds). *Plant Breeding in New Zealand*. Butterworths of New Zealand, pp.253-262.
- GWYNNE D.C. and BECKETT R.E. 1980. The response of *Lotus uliginosus* L. grown on hill soils to inoculation with *Rhizobium*. *Grass and Forage*, **35**, 213-217.
- IGLESIAS M.P. and RAMOS N. 2003. Efecto de los taninos condensados y la carga sobre la producción y calidad de carne y lana de corderos pesados Corriedale en cuatro especies de leguminosas (*Lotus corniculatus*, *Lotus pedunculatus*, *Lotus subbiflorus* y *Trifolium repens*). [The effect of condensed tannins and the stocking rates on the meat and wool production and quality of Corriedale heavy lambs in four species of legumes (*Lotus corniculatus*, *Lotus pedunculatus*, *Lotus subbiflorus* and *Trifolium repens*)]. Tesis de grado, Montevideo, Facultad de Agronomía, Uruguay. 213 p. [In Spanish]
- INASE, 2005. Resultados experimentales de evaluación de especies forrajeras para el registro nacional de cultivares: Anuales, bianuales y perennes. Periodo 2004. [Experimental results of evaluation of forage species for the nacional list os cultivars: Annuals, biannuals and perennials. Period 2004]. INIA La Estanzuela, Uruguay. 73 p. [In Spanish]
- IRISARRI P., MILNITSKY F., MONZA J. and BEDMAR E.J. 1996. Characterization of rhizobia nodulating *Lotus subbiflorus* from Uruguayan soils. *Plant and Soil*, **180**, 39-47.

- LABANDERA C., JAURENA M., BIASSINI G. and DE MAIO V. 2005. Inoculación de Lotus Makú. [Inoculation of Lotus Maku]. Revista Plan Agropecuario N° 113, Montevideo, Uruguay, 44-46. [In Spanish]
- LIEVEN-ANTONIOU C.A. and WHITTAM T.S. 1997. Specificity in the symbiotic association of *Lotus corniculatus* and *Rhizobium loti* from natural populations. *Molecular Ecology*, **6**, 629-639.
- MAYANS M.C. 2003. Técnicas utilizadas en la identificación y caracterización de cepas de *Rhizobium* sp. y *Bradyrhizobium* sp. [Methods used in the identification and characterization of strains of *Rhizobium* sp. and *Bradyrhizobium* sp.] Tesis de grado, Facultad de Ciencias, Uruguay. [In Spanish]
- PANKHRUST C.E. 1981. Effect of plant nutrient supply on nodule effectiveness and *Rhizobium* strain competition for nodulation of *Lotus pedunculatus*. *Plant and Soil*, **60**, 325-339.
- PÉREZ E. and LABANDERA C. 1998. Especificidad simbiótica dentro del genero *Lotus*. [Symbiotic specificity in the genus *Lotus*]. [In Spanish] <http://fp.chasque.apc.org:8081/microlab/LMSCI/TraTe/espsim.htm>
- RENGEL Z. 2002. Breeding for better symbiosis. *Plant and Soil*, **245**, 147–162
- RISSO D.F. and BERRETA E.J. 1996. Mejoramiento de campos en suelos sobre Cristalino. [Natural grasslands improvement in Granytic soils] In RISSO D.F., BERRETTA E.J. and MORÓN A. (Eds.) Producción y manejo de pasturas. INIA. Montevideo (Uruguay). Serie Técnica, **80**, 193-211. [In Spanish]
- RISSO D.F., COLL J. and ZARZA A. 1990. Evaluación de leguminosas para mejoramientos extensivos en suelos sobre Cristalino (I). [Legume evaluation for extensive pasture improvement in cristaline soils (I)]. In: INIA, SUP, facultad de Agronomía, CHPA. (Ed.) II Seminario Nacional de Campo Natural. Hemisferio Sur, Uruguay, pp. 231-241. [In Spanish]
- SCOTT D.B., WILSON R., SHAW G.J., PETIT A. and TEMPE J. 1987. Biosynthesis and degradation of nodule-specific *Rhizobium loti* compounds in *Lotus* nodules. *Journal of Bacteriology*, **169**, 278–282.
- SKERMAN P.J., CAMERON D.G. and RIVEROS F. 1991. Relaciones entre los rizobios y las leguminosas. [Relationships between the rhizobia and the legumes.] Roma, FAO. P. 125-141. (Colección FAO Producción y Protección Vegetal No. 2). [In Spanish]
- VANCE P.C., REIBACH P.H. and PANKHRUST C.E. 1987. Symbiotic properties of *Lotus Pedunculatus* root nodules induced by *Rhizobium loti* and *Bradyrhizobium spp.* *Physiologia Plantarum*, **69**, 3, 435-442.