

Capacidad de fijación de nitrógeno de estirpes autóctonas de *Mesorhizobium* spp. en simbiosis con dos poblaciones mejoradas de *Lotus glaber* (Miller)

M. I. IRIBARNE¹, L. J. BALAGUÉ¹, G. DIOSMA¹ & P. A. BALATTI^{1,2}

¹ Cátedra de Microbiología Agrícola. ² Instituto de Fisiología Vegetal. CICBA. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata- CC 31 1900 La Plata.

IRIBARNE, M.I., BALAGUÉ, L.J., DIOSMA, G. & P. A. BALATTI. Capacidad de fijación de nitrógeno de estirpes autóctonas de *Mesorhizobium* spp. en simbiosis con dos poblaciones mejoradas de *Lotus glaber* (Miller). Rev. Fac. Agron., La Plata 103 (2): 157-164.

Se evaluó la capacidad de nodulación y fijación de nitrógeno de tres estirpes de *Mesorhizobium* sp. que fueron aislados de los suelos de la depresión del río Salado, Provincia de Buenos Aires. Estas cepas se inocularon en dos poblaciones mejoradas de *Lotus glaber* FA2 y FA7. Las cepas autóctonas en simbiosis con las dos poblaciones de *Lotus* nodularon y fijaron mas nitrógeno que las plantas testigo no inoculadas y que los testigos inoculados con la cepa control USDA3471. Las poblaciones de *Lotus glaber* difirieron en su habilidad para desarrollar en presencia de cantidades limitantes de nitrógeno. Se concluyó que las bacterias autóctonas, tienen una alta capacidad de fijación de nitrógeno y por lo tanto constituyen una fuente para la selección de cepas en la formulación de inoculantes comerciales.

Palabras clave: Lotus- Nodulación- Fijación simbiótica- Nitrógeno- *Mesorhizobium*

IRIBARNE, M.I., BALAGUÉ, L.J., DIOSMA, G. & P. A. BALATTI. Nitrogen fixing ability of autoctonous *Mesorhizobium* strains in symbiosis with two populations of *Lotus glaber* (Miller). Rev. Fac. Agron., La Plata 103 (2): 157-164.

We evaluated the ability of *Mesorhizobium* strains that were isolated from the soils of the Salado River Basin in the province of Buenos Aires. Two populations of *Lotus glaber*, FA2 and FA7, were inoculated with three rizobia isolates L10, L15 and L22. The autoctonous strains nodulated and fixed more nitrogen than uninoculated (negative) and USDA3471 inoculated (positive) control plants. The populations of *Lotus glaber* differed in their ability to grow in the presence of low levels of available nitrogen. We concluded that the soils of the Salado river basin host bacteria with high nitrogen fixing potential that may be used in inoculant production.

Keywords: Lotus -nodulation- symbiotic fixation- nitrogen- *Mesorhizobium*

INTRODUCCIÓN

Lotus glaber Miller (ex *Lotus tenuis* Waldt et Kit) pertenece a la familia de las Leguminosas (*Fabaceae*). Esta planta se adapta a regiones con suelos de horizontes arcillosos que perjudican el drenaje de agua y por lo tanto son inundables (Mac Donald, 1946). Probablemente esto contribuyó a la naturalización

de la especie en las condiciones ambientales de la Depresión del Río Salado, constituyéndose así en una de las pocas alternativas para incrementar la producción de forraje.

Lotus, al igual que muchas otras Leguminosas, establece una asociación simbiótica con bacterias de los géneros *Rhizobium*, ahora propuesto como *Mesorhizobium* (Jarvis et al., 1997) y *Bradyrhizobium* sp. (Allen & Allen,,

1981; Jarvis *et al.*, 1982) y esto resulta en un aumento del crecimiento debido a una mayor disponibilidad de nitrógeno (N).

La asociación simbiótica es el resultado de la expresión de un grupo de genes en la planta huésped y en la bacteria, producto de su evolución conjunta, lo cual ha dado origen a la especificidad planta-bacteria. Aún entre especies compatibles, no todos los genotipos de plantas y bacterias están asociadas al azar, existe una nodulación preferencial del genotipo del huésped y las cepas de rizobios que han estado originariamente asociadas en la naturaleza (Wilkinson *et al.*, 1996; Lieven-Antoniou & Whittam, 1997). Un ejemplo de esto es la interacción entre ciertas estirpes de *Rhizobium leguminosarum* y arveja (*Pisum sativum*) cultivar Afganistán, que desarrolla nódulos sólo cuando es inoculado con rizobios aislados de su centro de origen como es la estirpe Tom (Lie, 1978). También se ha descrito la existencia de genotipos de soja que restringen la nodulación de determinados serogrupos de rizobios (Cregan *et al.*, 1989). Además, Lohrke *et al.* (1996) encontraron que la incompatibilidad en la soja hacia rizobios del serogrupo 110 está gobernada por un alelo recesivo simple.

Las estirpes de rizobios que llevan genes de incompatibilidad también pueden inhibir o reducir el desarrollo de nódulos inducidos por cepas eficientes, como se ha descrito en arveja, soja y trebol (Winarno & Lie, 1979; Lie *et al.*, 1978; Balatti & Pueppke, 1992; Lewis Henderson & Djordjevic, 1991).

Pero además, el éxito de la inoculación depende no sólo de la calidad del inoculante utilizado sino también de la presencia en el suelo de cepas nativas o naturalizadas que establezcan interacciones ineficientes y/o incompatibles con la planta huésped. A menudo estirpes eficientes incorporadas son desplazadas por las nativas presentes en los suelos, habitualmente más competitivas (Fabiano & Arias, 1991).

Las cepas nativas son una fuente muy im-

portante de selección porque pueden ser de alta eficiencia, competitivas y estar adaptadas al medio Quadrelli *et al.*, (1997).

Por ello se está estudiando la biodiversidad de rizobios existentes en la depresión del río Salado, hemos realizado un gran número de aislamientos que han sido caracterizados fisiológica y genéticamente, Iribarne *et al.*, (1998).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad de nodulación y fijación de N de tres estirpes de rizobios, aisladas de suelos de la Depresión del Río Salado, en su interacción con dos poblaciones mejoradas de *Lotus glaber*, denominadas FA2 y FA7.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento y cultivo de las cepas

Se realizó el aislamiento de los rizobios de nódulos extraídos de la raíz de plantas naturalizadas en suelos del partido de Magdalena (35° Latitud Sur - 57°15' Longitud Oeste) y Chascomús (35°15' Latitud sur - 57°15' Longitud Oeste) partidos incluidos en la depresión del río Salado. Los nódulos se desinfectaron superficialmente con etanol al 50% durante 5', seguido de 5' en hipoclorito de sodio al 50% y posteriormente fueron lavados con agua estéril hasta la desaparición de los vapores de hipoclorito. Los nódulos se trituraron en agua estéril y se sembraron en estrías, en medio de cultivo Agar extracto de Levadura Manitol (Vincent, 1970) Se confirmó el aislamiento de los rizobios reinoculando plántulas de *Lotus*. Los nódulos desarrollados permitieron reaislar las cepas por el procedimiento descrito y se las numeró secuencialmente precedidas de la letra L.

Mantenimiento de las cepas

Los aislamientos se conservaron en freezer a -70° C en 7% de glicerol. Réplicas de las cepas se mantuvieron en cultivos en estría a 5° C. Los aislamientos se desarrollaron

en medio líquido extracto de levadura manitol, en un agitador rotatorio a 150 rpm a 30 °C de temperatura. La concentración de las suspensiones bacterianas se determinó midiendo la densidad óptica a 625 nm en un espectrofotómetro UV-Visible Wyer.

Cultivo de las plantas

Las semillas se desinfectaron superficialmente sumergiéndolas en ácido sulfúrico concentrado durante 20 minutos, luego se lavaron con agua estéril y se hicieron germinar en cajas de Petri con agar-agua. A las 48 horas las plántulas se inocularon sumergiendo las radículas en una suspensión de rizobios de 10^8 cel/ml, se trasplantaron a Jarras de Leonard con vermiculita como medio de sostén y se regaron con solución nutritiva de Jensen libre de N (Vincent, 1970). Las jarras se mantuvieron en invernáculo bajo condiciones controladas de temperatura.

Capacidad de fijación de nitrógeno

Se evaluó la capacidad de fijación de N de tres de los aislamientos para conocer su interacción con dos progenies de *Lotus glaber* provenientes de una policruza al azar, cada una de ellas constituyen familias de medio-hermanos, denominadas "FA2" y "FA7" del programa de mejoramiento del Área de Genética.

Las cepas utilizadas fueron L10, L15, L22 y la actividad de éstas se comparó con un control negativo no inoculado y un control positivo utilizando la cepa USDA3471.

El cultivo de la planta y la inoculación se realizaron siguiendo los protocolos descriptos, realizándose 30 repeticiones por tratamiento. A los 60 días se retiraron las plantas y se evaluó, como parámetro de la fijación de nitrógeno, el número y peso seco de los nódulos, el peso seco de la parte aérea y la actividad de la nitrogenasa. Esta última se determinó sobre seis plantas de cada tratamiento, por medio del ensayo de la reducción del acetileno. Un ml de muestra se analizó con un cromató-

grafo de gases Konic 3000 equipado con una columna de 1/8 pulgadas por 6 pies de largo, rellena con Porapak Q y equipado con un detector de ionización de llama. Los resultados se expresaron en μ moles de etileno producido por planta y por hora. Los ensayos se repitieron una vez y los parámetros evaluados se analizaron estadísticamente por medio del Análisis de la Varianza estableciéndose la diferencia mínima significativa (DMS) al 5 y 1% (Snedecor, 1980).

RESULTADOS

La producción de materia seca de las dos poblaciones ensayadas, FA2 y FA7 fue, tal cual era de esperar, mayor en las plantas inoculadas que en los testigos no inoculados (Fig. 1A y 1B). Es interesante destacar que las plantas control no inoculadas de la población FA2, produjeron un 100% más de biomasa aérea que el control de la población FA7 (Fig. 1A y 1B). La inoculación de las diversas cepas resultó en incrementos variables de la producción de materia seca que sugiere una capacidad diferencial de los rizobios para fijar N (Fig. 1A y 1B). Las plantas que produjeron mayor cantidad de materia seca en las dos poblaciones de *Lotus* fueron aquellas inoculadas con la estirpe L22 y L10 (Fig. 1A y 1B). En la población FA2 las plantas inoculadas con estas cepas, produjeron una biomasa significativamente superior al testigo no inoculado y a las plantas inoculadas con USDA3471. Por otro lado, las plantas de *Lotus* inoculadas con la cepa L15 sintetizaron menos materia seca aunque ésta no fue significativamente diferente de la producida por las plantas inoculadas con las estirpes L22 y L10. Las plantas de la población FA7 inoculadas con las estirpes L22 y L10 también produjeron más materia seca, pero en este caso hubo diferencias significativas también con la cepa L15, aunque ésta y USDA3471 fueron superiores al testigo no inoculado.

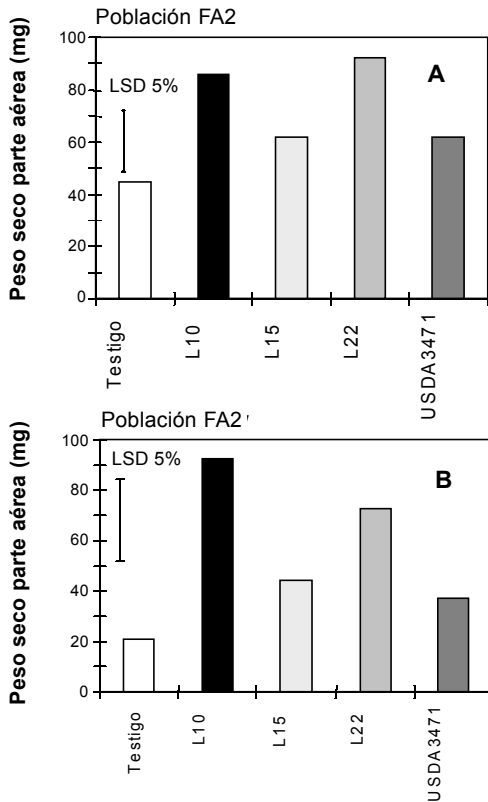


Figura 1. Peso seco de la parte aérea (en mg). Los datos son el promedio de 25 repeticiones por tratamiento. Los datos son representativos de los resultados obtenidos en los dos ensayos realizados. La barra indica diferencias significativas al nivel del 5%. A) representan los valores obtenidos para la población FA2 de *Lotus glaber*; B) representan los valores obtenidos para la población FA7 de *Lotus glaber*. L10, L15 y L22 son los aislamientos de rizobios utilizados. Se realizaron dos tratamientos control, uno no inoculado y otro inoculado con la cepa control USDA3471 de la colección de cepas del USDA, Beltsville Maryland, USA.

Shoot dry matter biomass (mg). Means resulted from the analysis of 25 replicates per treatment. Numbers are representative of the two experiments performed. A) shoot dry weight of inoculated population FA2 plants; B) shoot dry weight of inoculated Lotus population FA7 plants. Plants were inoculated with isolates L10, L15, L22 and control strain USDA3471 (USDA Beltsville, Maryland, USA). The bar represents the LSD (least significant difference) at the 5% level.

La capacidad de fijación de N está en función de la masa, número y actividad de los nódulos desarrollados en las raíces de las plantas. En la población FA2, la estirpe L22 indujo una cantidad significativamente mayor que las estirpes L10, L15 y USDA3471, lo que no se vió reflejado en el peso seco de los mismos, que si bien fue mayor en las cepas L22 y L10, solo ésta última mostró diferencias significativas con L15 (Fig.2A).

En la población FA7 el número de nódulos formados fue mayor en las plantas inoculadas con las estirpes L10 y L22, aunque sólo la cepa L10 presentó diferencias significativas respecto de las estirpes L15 y USDA3471 (Fig.2B). El peso seco de los nódulos inducidos por las estirpes L10 y L22 fue significativamente mayor que el de plantas inoculadas con las estirpes L15 y USDA3471 (Fig.2B).

En uno de los experimentos sólo dos plantas testigo no inoculadas de la población FA 7 desarrollaron nódulos en el extremo de raíces secundarias, esto sugiere que las cepas contaminantes infectaron tardíamente las plantas, ya que los que desarrollaron inducidos por la inoculación se concentraron mayoritariamente en el cuello de la raíz. Los riesgos de contaminación son altos cuando se trabaja con *Lotus*, ya que debido a su lento crecimiento, los ensayos tienen una duración de por lo menos dos meses.

El ensayo de la reducción de acetileno permitió evaluar la actividad de fijación de N de la masa nodular. En la población FA2 se encontró que los niveles de actividad de las tres estirpes aisladas son similares y que el control positivo USDA3471 mostró diferencias significativas con L10 y L15 (Fig.3A). La inoculación de la población FA7 con cualquiera de las estirpes mencionadas resultó en valores similares de actividad de la enzima (Fig. 3B). Sin embargo, es interesante destacar que la población FA7 interactuando con cualquiera de las estirpes produjo cantidades mayores que las plantas de la población FA2 inoculadas con los mismos rizobios (Fig. 3B).

Se estableció la correlación entre el peso seco de nódulos y el peso seco de la parte aérea. Se encontró que ésta fue positiva para la población FA2 ($r = 65\%$, $P < 0,05$) y para la población FA7 ($r = 91\%$, $P < 0,05$). Esto sugie-

re que el número de nódulos puede explicar sólo el 65% y el 91% de la producción de materia seca en la población FA2 y FA7, respectivamente. No se encontró correlación significativa entre el peso seco de la planta y la ac-

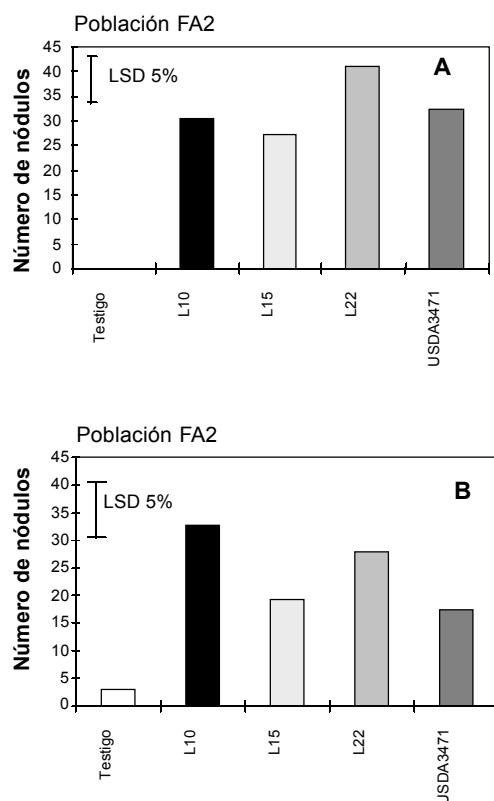


Figura 2. Número de nódulos de las poblaciones mejoradas de *Lotus glaber* FA2 y FA7 inoculadas con las estirpes L10, L15 y L22. Los valores son promedio de 25 repeticiones por tratamiento. El tratamiento control no presentó nódulos excepto en dos plantas. A) Nodulación inducida en la población FA2; B) nodulación inducida en la población FA7. Las barras indican diferencias significativas al nivel del 5%.

Nodule number of *Lotus glaber* plants inoculated with rhizobia isolates. Plants were inoculated with L10, L15, L22 and USDA 3471. The number of replicates per treatment was $n = 25$. Only two of the uninoculated control plants developed nodules due to contamination. A) Nodulation of the plants belonging to the FA2 population; B) Nodules developed on plants from the FA7 population. The bar represents the LSD at the 5% level.

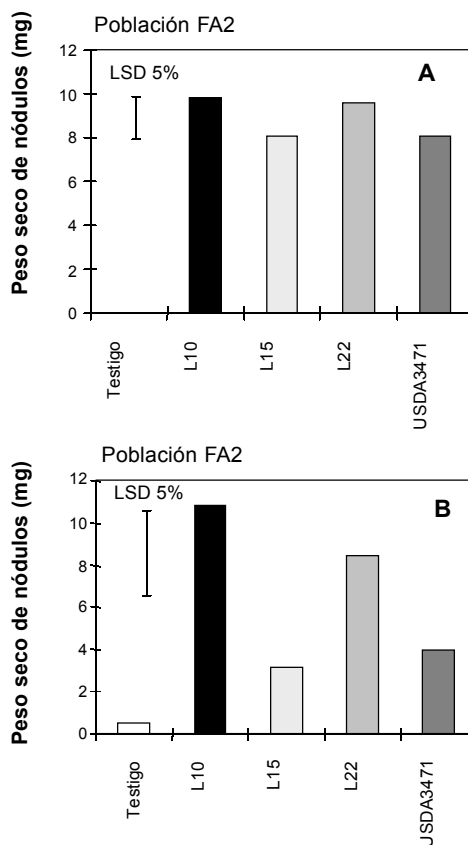


Figure 3. Peso seco de los nódulos en plantas de las poblaciones mejoradas de *Lotus glaber* FA2 y FA7, inoculadas con las estirpes L10, L15 y L22. Los valores son promedio de 25 repeticiones por tratamiento. El tratamiento control no presentó nódulos excepto en dos plantas. A) Nodulación inducida en la población FA2; B) nodulación inducida en la población FA7. Las barras indican diferencias significativas al nivel del 5%.

Nodule dry weight of *Lotus glaber* plants from the FA2 and FA7 population plants, inoculated with rhizobia isolates L10, L15, L22 and USDA3471. The number of replicates per treatment was $n = 25$. A) Nodule dry weight of plants from the FA2 population; B) Nodule dry weight of plants from population FA7. The bar represents the LSD at the 5% level.

tividad de la nitrogenasa, aunque es interesante destacar que estos valores tampoco correlacionaron significativamente con el número y el peso seco de los nódulos.

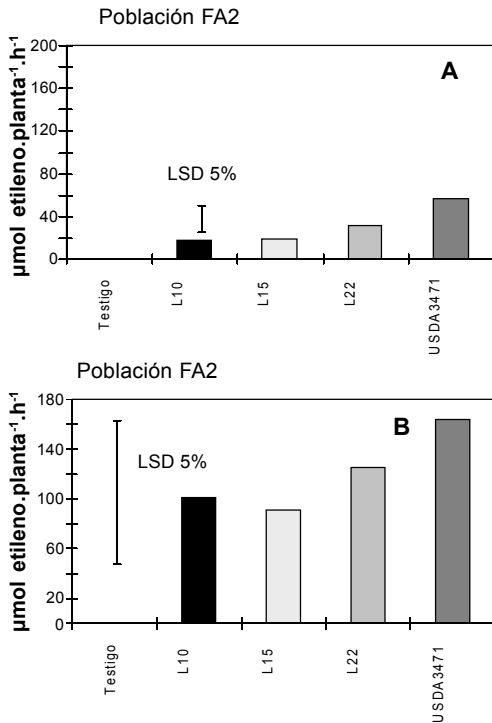


Figura 4. Actividad de fijación de nitrógeno determinada por el ensayo de la reducción del acetileno. Los valores son representativos de dos ensayos. El número de repeticiones por tratamiento fue de $n = 6$. El acetileno se expresa en $\mu\text{mol planta}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. El testigo no mostró niveles de reducción de acetileno excepto en los dos controles contaminados en los que se detectó actividad enzimática. La barra indica la diferencia mínima significativa al nivel del 5%. A) actividad enzimática de las plantas de la población FA2; B) actividad enzimática de la población FA7.

Nitrogen fixation activity measured by the acetylene reduction assay. The values are from Experiment 1 and are representative of the replicate experiment. The number of replicates was $n = 6$. Acetylene was expressed as $\mu\text{mol plant}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Except for the two contaminated controls, control plants did not have nitrogenase activity. The bar indicates the LSD at the 5% level. A) Nitrogen fixing ability of population FA2 plants; B) Nitrogen fixation of population FA7 plants.

DISCUSIÓN

Uno de los factores que condicionan la productividad de las plantas es la disponibilidad de N. Las leguminosas forrajeras fijan N atmosférico en simbiosis con los rizobios del suelo, por esto la producción de forraje depende de la eficiente interacción planta-bacteria (Pankhurst & Layzell, 1984; Kallenbach *et al.*, 1998).

La relación simbiótica que se establece entre los rizobios del suelo y el *Lotus glaber*, es el resultado de la interacción de los genomas de los dos organismos. Por ello se estudió la interacción de dos poblaciones de *Lotus*, genéticamente distintas, con estirpes de rizobios aisladas de los suelos de la depresión del río Salado.

La población de *Lotus glaber* FA2 aparece como más eficiente en el uso del N. Esto está demostrado por los valores de peso seco que alcanzaron las plantas testigo no inoculadas, que fué un 100% mayor en la población FA2 que en la FA7 (Fig.1A y 1B). Además, aunque la actividad de fijación de N determinada en los nódulos de la población FA7 fue muy superior a aquella encontrada en los nódulos inducidos en la población FA2 (Fig.3A y 3B), la biomasa aérea de las plantas pertenecientes a las dos poblaciones fue similar con cada una de las bacterias inoculadas. Por último otro índice de una mayor eficiencia en el metabolismo del N es el análisis de correlación realizado entre el peso seco de los nódulos y el peso seco de la parte aérea. Este indicó que hay una correlación positiva entre estos parámetros pero es más baja para la población FA2 (65%), que para la población FA7 (91%). Esto sugiere que en la población FA2 la producción de materia seca depende en menor medida de la masa nodular, lo que además se manifiesta en el peso seco del testigo no inoculado. Kallenbach *et al.* (1998) encontraron que ciertos cultivares de *Lotus corniculatus* se diferenciaban en la eficiencia con que utilizaban el N para su crecimiento. Esto lo atribuyeron en gran medida a las condiciones

ambientales de los lugares de origen de estos cultivares.

Las estirpes L22 y L10 fijaron una mayor cantidad de nitrógeno cuando interactuaron con las dos poblaciones de *Lotus*, lo que resultó en un mayor crecimiento de la planta, carácter muy importante por tratarse de una leguminosa forrajera. La cantidad de nitrógeno aportado por las estirpes L15 y USDA3471, no fue suficiente como para inducir en las plantas un crecimiento significativamente mayor que los controles no inoculados .

El peso seco de los nódulos fue superior en las plantas de las dos poblaciones que fueron inoculadas con los rhizobios L22 y L10, las estirpes L15 y USDA3471 nodularon pobremente las plantas (Fig.2A y Fig.2B). De la misma manera que Duhigg *et al.* (1978) en alfalfa y Kallenbach *et al.* (1998) en *Lotus corniculatus*, se encontró una correlación positiva y altamente significativa entre el peso seco de la parte aérea y el peso seco de nódulos. La producción de una mayor cantidad de biomasa es una característica deseable, que en este caso es obvio que es el resultado de una mayor disponibilidad de N. El mayor peso seco de nódulos no fue el resultado del desarrollo de un número significativamente mayor de nódulos, lo que no sólo surge del análisis de las Fig. 2A, 2B, 3A y 3B sino también por que se encontró una baja correlación de estas variables (datos no presentados).

La actividad de la nitrogenasa sugiere que la estirpe control USDA3471 fija más N que el resto de las cepas lo cual no se reflejó en aumentos del peso seco de la planta. Kallenbach *et al.* (1998) describieron una situación similar en *Lotus corniculatus* y basándose en esto sugirieron que la actividad de la enzima no es limitante. Sin embargo, es de destacar que la actividad de la nitrogenasa indica el comportamiento de la misma en un momento y condiciones ambientales determinadas, que no necesariamente reflejan su actividad durante todo el ensayo. En contraposición, la acumulación de biomasa aérea es el resultado, entre otras cosas, de la disponibilidad de

N durante el período del ensayo y por ello puede describir mejor lo ocurrido.

Si bien existen algunas diferencias entre las cepas en su interacción con cada población, el comportamiento de las parejas simbióticas fue similar. Lieven-Antoniou & Whittam (1997) consideraron que cuando el comportamiento de los rizobios no difiere en distintos genotipos de huéspedes, los patrones de nodulación estarían determinados por las cepas. Teniendo en cuenta esto podríamos sugerir que las diferencias se deben a la capacidad intrínseca de las cepas para interactuar con el hospedante. Considerando además que la concentración del inóculo fue similar en todos los tratamientos, los resultados solo podrían verse influenciados por la capacidad de las cepas para sobrevivir y por su velocidad para iniciar la nodulación.

CONCLUSIONES

Se concluye que los suelos de la depresión del río Salado albergan estirpes con capacidad de fijación de nitrógeno similares o superiores a aquellas seleccionadas y caracterizadas como es la USDA3471, por lo tanto constituyen una fuente de recursos de nuevas cepas .

Las poblaciones de *Lotus* que desarrollan mejor en presencia de cantidades limitantes de N, como FA2, probablemente cuenten con ventajas adaptativas. Ante situaciones de anegamiento, que ocurren con frecuencia en la depresión del río Salado, la fijación de N se vería limitada por falta de oxígeno, entonces las plantas con un metabolismo de N más eficiente, podrían verse menos afectadas. Más aún, la planta de *Lotus glaber* probablemente deba atravesar los primeros estadios del crecimiento en presencia de escasa cantidad de N, debido probablemente a la tardía nodulación de esta especie (Montes & Cauhépé, 1985).

Teniendo en cuenta estos resultados se están realizando nuevos aislamientos de simbiotes del *Lotus* y estudios sobre la interac-

ción de estos rizobios con otras poblaciones de *Lotus glaber*.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Ing. Agr. Mercedes Mujica, integrante del Area de Genética, por suministrarnos las semillas de *Lotus glaber* para los ensayos realizados y al CONICET, CICBA y UNLP por financiar este proyecto.

BIBLIOGRAFÍA

- Allen, O. N. & E. K. Allen.** 1981. The Leguminosae. The University of Wisconsin Press. Madison, Wisconsin . 812 pp.
- Balatti, P. A. & S. G. Pueppke.** 1992. Identification of North American soybean lines that form nitrogen fixing nodules with *Rhizobium fredii* USDA257. Canadian Journal of Plant Science 72: 49-55.
- Cregan, P. B., H. H. Keyser & M. J. Sadowsky.** 1989. Host plant effect on nodulation and competitiveness of the *Bradyrhizobium japonicum* serotype strains constituting serocluster 123. Applied and Environmental Microbiology 55: 2532-2536.
- Duhigg, P., B. Melton & A. Baltensperger.** 1978. Selection of acetylene reduction rates in Mesilla alfalfa. Crop Science 18: 813-816.
- Fabiano, E. & A. Arias.** 1991. Competition between a native isolate *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and two commercial inoculant strains for nodulation of clover. Plant and Soil 137: 2293-296.
- Iribarne, M. I., V. Martínez Alcántara, G. Diosma, L. Balagué & P. A. Balatti.** 1988. Biodiversity of rhizobia that nodulates *Lotus glaber* Miller growing in soils of the Salado River basin in Argentina. Proceedings 16th. North American Conference on symbiotic Nitrogen Fixation. Cancún. México. VII. pp.18.
- Jarvis, B. D. W., C. E. Pankhurst & J. J. Patel.** 1982. *Rhizobium loti*, a new species of legume root nodule bacteria. International Journal of Systematic Bacteriology 32: 378-380.
- Jarvis, B. D. W., P. Van Berkum, W. X. Chen, S. M. Nour, M. P. Fernandez, J. C. Cleyet-Marel & M. Gills.** 1997. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum* and *Rhizobium thianshanense* to *Mesorhizobium* ge. nov. International Journal of Systematic Bacteriology 47: 895-898.
- Kallenbach R. L., R. L. McGraw, P. R. Beuse-linck, & P. A. Balatti.** 1998. Rhizomatous birdsfoot trefoil exhibits a unique response to N-free conditions. Agronomy Journal 90: 709-713.
- Lewis-Henderson, W. R. & M. A. Djordjevic.** 1991. A cultivar specificity interaction between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and subterranean clover is controlled by nod-M, other cultivar specificity genes, and a single recessive host gene. Journal of Bacteriology 173: 2791-2799.
- Lie, T. A.** 1987. Symbiotic specialization in pea plants. The requirement of specific rhizobium strains for peas from Afganistán. Annals of Applied Biology 88: 462-465.
- Lie, T. A., R. Winarno & P. C. J. M. Timmermans.** 1978. *Rhizobium* strains form wild and cultivated legumes suppression of nodulation by a non-nodulating *Rhizobium* strains. In "Microbial Ecology". Eds. M.W. Loutit and J.A.R. Miles. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. 398-402 pp.
- Lieven-Antoniou, C. A. & T. S. Whitam.** 1997. Specificity in the symbiotic association of *Lotus corniculatus* and *Rhizobium loti* from natural populations. Molecular Ecology 6: 629-639.
- Lohrke, S. M., J. H. Orf & M. J. Sadowsky.** 1996. Inheritance of host-controlled restriction of nodulation by *Bradyrhizobium japonicum* strain USDA 110. Crop Science 36: 1271-1276.
- MacDonald.** 1946. Cornell University-Agricultural Experiment Extension Memoir. 261 pp.
- Montes, L. & M. A. Cauhépe.** 1985. Evaluación de *Lotus tenuis* mediante dos métodos de siembra. Revista Argentina de Producción Animal 5: 312-321.
- Pankhurst, C. E. & D. B. Layzell.** 1984. The effect of bacterial strain and temperature on the nitrogenase activity of *Lotus pedunculatus* root nodules. Physiología Plantarum 62: 404-409.
- Quadrelli, A. M., F. S. Laich, E. Andreoli & H. E. Echeverría.** 1997. Respuesta de *Lotus tenuis* Waldst a la inoculación con *Rhizobium loti* y a la fertilización fosfatada. Ciencia del Suelo 15: 22-27.
- Snedecor, G. W. & W. G. Cochram.** 1980. Statistical Methods. 7th ed. The Iowa State University Press, Ames, IA.
- Vincent, J. M.** 1970. A manual for the practical study of root nodule bacteria. International Biological Programme, Blackwell Scientific Publications, Oxford, England. 199 pp.
- Wilkinson, H. H., J. M. Spoerke & M. A. Parker.** 1996. Divergence in symbiotic compatibility in a Legume-*Bradyrhizobium* mutualism. Evolution 50: 1470-1477.
- Winarno, R. & T. A. Lie.** 1979. Competition between *Rhizobium* strains in nodule formation: interaction between nodulating and non-nodulating strains. Plant and Soil 51: 135-142.