

COMPORTAMIENTO SIMBIOTICO EN *Desmodium incanum* EN URUGUAY

M. Crosa¹; A. Oliveira¹; R. Goyenola² y L. Frioni¹

Recibido: 26 de mayo de 1999. Aceptado: 27 de julio de 1999.

RESUMEN

Desmodium incanum es una leguminosa herbácea nativa del Uruguay y su carácter perenne y buena adaptabilidad la convierte en un recurso forrajero de interés. Los estudios en leguminosas nativas, sobretudo en aquellas especies bien adaptadas a diversas zonas ecológicas del país, constituye un área de interés por el potencial que presentan muchas de sus especies para ser incluídas en prácticas agronómicas. El objetivo de este trabajo fue determinar el grado de nodulación que presenta en el campo y la respuesta a la inoculación de esta leguminosa con rizobios aislados de sus nódulos y otros específicos de leguminosas introducidas. Esta leguminosa se encuentra bien nodulada en el campo. Ninguna de las cepas de rizobios aisladas de otras leguminosas (nativas o exóticas) noduló *D. incanum*. En ensayos controlados de inoculación con cepas aisladas de nódulos de esta leguminosa se apreciaron diferencias entre dos ecotipos de *D. incanum*. El empleo de técnicas que incluyen ¹⁵N permitieron diferenciar la capacidad de fijación de N₂ de las cepas en estudio.

PALABRAS CLAVE: *Desmodium incanum*, fijación del nitrógeno, leguminosas nativas

SUMMARY

SYMBIOTIC RELATIONSHIPS BETWEEN NATIVE ECOTYPES OF *Desmodium incanum* AND RHIZOBIA IN URUGUAY

Desmodium incanum is a herbaceous legume native to Uruguay. Its perennial characteristics and good adaptability make this legume interesting for animal nutrition and introduction in agricultural management practices. The research on native legume species well adapted to diverse ecological conditions, is an important subject for the agronomic potential that many species show. The objective of this work was to assess the nodulation status in the field and the nitrogen-fixing capacity of rhizobial strains isolated from native *D. incanum* and to establish the nodulation specificity with these and other rhizobial strains. This legume is well nodulated in the field and its nodulation is specific. None of the rhizobial strains isolated from other legume species (native or exotic) nodulated *D. incanum*. There were differences among the ecotypes studied in their symbiotic behaviour. ¹⁵N methods permitted differentiation of the N-fixing capacity of rhizobial strains

KEY WORDS: *Desmodium incanum*; nitrogen fixation; native legumes

INTRODUCCION

Un 87% del territorio uruguayo es apto para la producción de carne, lana y leche. Desde la década de los 60 los

rendimientos se han incrementado con la introducción de leguminosas y sus rizobios simbiotes en praderas artificiales y campo natural mejorado. Sin embargo, se ha venido apreciando una disminución de la eficiencia del componente leguminosa de las pasturas, luego de dos años de establecidas, con una virtual desaparición a los 4 años, lo que ha limitado su instalación por parte de los productores (Carámbula, 1977).

Dado esta situación relacionada con la persistencia de las leguminosas, se ha fortalecido entre los investigadores la ne

¹ Microbiología, Area Biología, Facultad de Agronomía
Av. Garzón 780, Montevideo, Uruguay FAX 0598 2 3093004.

² OIEA, Ministerio de Industria, Energía y Minería, Uruguay

cesidad de analizar el potencial de leguminosas nativas, bien adaptadas a muy diversas condiciones ecológicas. El Uruguay está ubicado en la región sub-tropical con clima templado donde se encuentran ecotipos de leguminosas nativas muy promisorias (Burkart, 1952) que constituyen una importante fuente de germoplasma. La Facultad de Agronomía ha realizado estudios en numerosas especies nativas, desde el punto de vista reproductivo, taxonómico y de sus asociaciones con microorganismos promotores de su crecimiento (Millot *et al.* 1987; Izaguirre y Brescia, 1992; Coll y Zarza, 1992; Izaguirre *et al.* 1994; Davy e Izaguirre, 1996; Speroni e Izaguirre, 1994, Milnitsky *et al.* 1997).

Dentro de las especies arbóreas, se han analizado las 17 especies nativas por su capacidad de nodulación (Frioni *et al.* 1998a), por la respuesta a la inoculación en *Acacia caven* (Frioni *et al.*, 1998b) y en asociaciones con hongos micorrízicos (Frioni *et al.* 1999).

Desmodium es un género que se extiende desde Canadá al centro de la Argentina y Uruguay con más de 200 especies que se desarrollan en variedad de climas. En Uruguay y Argentina han sido descritos más de 20 especies (Burkart, 1952). El género se encuentra en áreas tropicales y sub-tropicales, las temperaturas óptimas de crecimiento son de 30°C de día y de 25°C de noche y es bastante tolerante a las heladas. Habita una amplia gama de suelos arenosos, pero se encuentra también en arcillosos, crece en suelos medianamente ácidos y persiste y se propaga en suelos muy ácidos (pH 4,5 o menores).

Dentro del género, *D. incanum* es la especie más representativa en el país, es perenne, herbácea, de tallos verticales de 30 a 60 cm de alto y tallos fibrosos rastreros. Su sistema radical es profundo, muy ramificado, las hojas de los tallos verticales son lanceoladas, trifoliadas y las inferiores a menudo pequeñas, con un folíolo. Produce flores rojizas o violáceas en los tallos verticales, es autógama y la vaina está cubierta de pelos cortos y pardos que hace que se adhiera a la vestimenta y al ganado, facilitando la rápida y distante propagación de la semilla, con forma de riñón de color pardo claro (Burkart, 1952).

Generalmente responde al encalado y al fósforo, resiste al pastoreo y es muy compatible con gramíneas del tapiz, como *Pennisetum clandestinum* (kikuyo), *Digitaria decumbens* (pasto pangola), *Cynodon dactylon* (gramilla), *Paspalum dilatatum* (pasto miel), *Paspalum notatum*, *Axonopus compressus*. (Crosa y Oliveira, 1995).

Esta especie resiste bien a la defoliación y con pastoreos intensos y de corto tiempo se vuelve rastrera y se emplea con el fin de dominar malezas y gramíneas altas y es muy tolerante a la sombra (Skerman *et al.* 1991). Estos autores señalan rendimientos entre 5.000 y 6.500 kg/ha/año en Australia con 12 a 15% de proteínas.

Izaguirre y Beyhaut (1998) señalan que ésta es sin duda una de las especies más recomendables para incluirla en ensayos tendientes al mejoramiento del campo natural en regiones del norte del país.

Las asociaciones de las leguminosas con microorganismos promotores del crecimiento de la familia *Rhizobiaceae*: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Azorhizobium*, que forman nódulos fijadores de N₂ en raíces y tallos de estas plantas, han sido muy estudiados (Martínez-Romero y Caballero-Mellado, 1996, Dommergues *et al.*, 1999; Frioni, 1999). Los aislamientos de nódulos de *Desmodium* no están relacionados a las especies descritas. Dagutay y Steyn (1995) los han vinculado con *R. etli*, pero la gran diversidad genética en estas bacterias hace que se requieran más estudios a nivel de los ácidos nucleicos, a los efectos de establecer relaciones filogenéticas y taxonómicas entre los nuevos aislamientos y los géneros reconocidos de rizobios (Martínez-Romero y Caballero-Mellado, 1996; Young, 1996).

El objetivo de este trabajo fue estudiar la capacidad de nodulación de dos ecotipos de *Desmodium incanum*, que se desarrollan en distintas zonas del país, aislar rizobios simbiotes, evaluar relaciones de especificidad y la respuesta a la inoculación en ensayos controlados en invernáculo.

MATERIALES Y METODOS

Materiales

Semillas de *D. incanum* se colectaron en dos zonas del país y se designaron como ecotipo A (departamento de Rivera) y ecotipo B (departamento de Salto). Las cepas de rizobio se aislaron a partir de nódulos de plantas bien establecidas y se conservaron en medio EMA con 40% de glicerol a -20°C (Vincent, 1975, Frioni, 1990).

Métodos

Relaciones de especificidad- Ensayo de inoculación cruzada

En ensayo de solarío (16 hluz/día, 150 E/m²/s, 25°C) se inocularon plántulas de los ecotipos A y B de *D. incanum* creciendo en medio Jensen (Frioni, 1990) con cepas aisladas de leguminosas introducidas y otras aisladas de *D. incanum*, a razón de 2mL por tubo (10⁸ células/mL). La inoculación se repitió a los 30 días y la nodulación se evaluó en los siguientes 3 meses. Paralelamente, plántulas de leguminosas nativas (*Adesmia bicolor*; *Tripholium polymorphum*) y exóticas (*Medicago sativa*, *Lotus corniculatus*, *L. pedunculatus*, *Trifolium repens*, *T. subterraneum*) se inocularon con 4 aislamientos de *D. incanum* (D1, D2, D3 y D4), a los efectos de conocer su espectro de especificidad.

Respuesta a la inoculación en D. incanum en ensayo de invernáculo

El ensayo se realizó en invernáculo, con los ecotipos A y B de *D. incanum* sembrados en macetas con 2 kg de horizonte A de un suelo Argisol, arenoso franco, con 0,8% de materia orgánica, 4 mg/kg de P y pH 6,0 que se fertilizó

con fósforo a un equivalente de 100 kg de P_2O_5 /ha. Previamente a la inoculación se evaluó en el suelo la densidad de rizobios que nodulan *D. incanum* por la técnica del número más probable (MNP) (Vincent, 1975) en cultivo de plántulas en tubos con medio mineral Jensen.

El ensayo de invernáculo constó de 8 tratamientos con 4 repeticiones en diseño completamente al azar: 2 ecotipos de la leguminosa (A y B), tratamientos inoculados (cepas D1 y D4 aisladas de la misma leguminosa) con 10 mL de un cultivo con 1.10^8 células/mL en intervalos de 30 días). Los controles fueron: T sin inocular ni fertilizar y N con un equivalente a 100 unidades de N-urea /ha. Cada maceta se raleó a 3 plantas.

Empleo de fertilizante enriquecido con ^{15}N : los tratamientos inoculados recibieron 4 mg/kg de N-urea con 50% de átomos enriquecidos con ^{15}N agregados en 50 mL de agua en el momento de la inoculación (Hardarson, 1994). Las plantas recibieron solución de Hoagland sin nitrógeno (100 mL por maceta, cada 30 días) y se regaron con agua para mantener la humedad cercana a la capacidad de campo durante el experimento.

Determinaciones: a los 60, 90, 120 y 150 días de la siembra se evaluaron:

- peso seco a 60°C de raíces y parte aérea, número y peso fresco de los nódulos,
- porcentaje de Nt por Kjeldhal y rendimiento en N (calculado a partir del N% y del peso seco de las plantas) y
- enriquecimiento de las plantas en ^{15}N determinado por espectrometría de emisión en equipo NOI-6e, como lo describe Danso *et al.* (1993).

Análisis de los resultados

Se realizó análisis de varianza al 95% de confianza y prueba de comparación de medias (T) con nivel de significancia del 0,05. El diseño fue un factorial completamente al azar, con tres factores: tratamientos, estado de crecimiento y ecotipo de *D. incanum*.

RESULTADOS Y DISCUSION

Ensayo de inoculación cruzada en solarío

Las cuatro cepas de rizobio aisladas de *D. incanum* mostraron alta especificidad, ya que sólo nodularon ambos ecotipos de la leguminosa hospedante y no nodularon con las otras leguminosas nativas e introducidas analizadas (datos no mostrados). Por otro lado, ambos ecotipos de *D. incanum* no nodularon al ser inoculados con cepas de rizobio heterólogas, aisladas de nódulos de las leguminosas señaladas en Materiales y Métodos (datos no mostrados). Skerman *et al.* (1991) encontraron que *D. incanum* es un ejemplo de leguminosa con alta especificidad.

Respuesta a la inoculación en *D. incanum* en ensayo de invernáculo

La tabla 1 presenta los resultados de la acumulación de materia seca en la parte aérea, en raíces y en el total de las plantas, como media de los tratamientos control, fertilizados e inoculados, en los 4 muestreos y en cada ecotipo.

Tabla 1. Materia seca en raíz, parte aérea y planta entera en dos ecotipos de *D. incanum* en ensayo de invernáculo, como media de tratamientos (control, nitrógeno e inoculados y 4 repeticiones).

ecotipos	Días luego de la siembra							
	60		90		120		150	
	B	A	B	A	B	A	B	A
raíz	0,41 a	0,36 a	0,95 a	0,84 b	1,79 a	1,59 b	2,36 a	1,97 b
parte aérea	0,79 a	0,65 b	1,88 a	1,49 b	3,13 a	1,83 b	4,07 a	2,00 b
total	1,20 a	1,01 a	2,83 a	2,33 b	4,92 a	3,42 b	6,43 a	3,97 b

Tratamientos (ecotipos) con la misma letra no difieren significativamente a 5%

No se observaron diferencias significativas entre tratamientos ni en la interacción tratamiento x ecotipo, en la acumulación de materia seca en las plantas. Singleton *et al.* (1992) demostraron que el impacto de la inoculación es remarcable cuando las poblaciones nativas de rizobios son escasas o nulas y que el efecto disminuye cuando la población nativa sobrepasa a los 10 rizobios por gramo. En este ensayo, la población nativa alcanzó $1,7 \times 10^4$ células viables por gramo y aunque la inoculación sobrepasó esta población nativa en 200 veces, puede haber sido necesario un nivel superior de inoculación a los efectos de sobrepasar a esta población nativa.

Las diferencias fueron significativas entre los ecotipos: el B acumuló 19% y 62% más materia seca total que el A a los 60 y 150 días de la siembra, respectivamente, lo que evidencia la importancia de analizar gran número de ecotipos a los efectos de seleccionar aquellos con mayor capacidad simbiótica.

La tabla 2 presenta el peso fresco de los nódulos en cada ecotipo. La máxima nodulación se apreció aproximadamente luego de 1 mes de la floración. Ambos ecotipos incrementaron el peso de los nódulos a razón de 3,6 mg/día entre los 60 y los 90 días desde de la siembra. Luego de 120 días, se observó apreciable caída de hojas debido a senescencia, lo que afectó el grado de nodulación. Ambos ecotipos presentaron similar peso de nódulos hasta los 4 meses de la siembra, luego, el ecotipo B incrementó significativamente su masa nodular, en concordancia con el mayor número de nódulos (datos no mostrados).

Tabla 2. Peso fresco de los nódulos (mg/planta)

	Días luego de la siembra			
	60	90	120	150
Ecotipo B	9a	118a	182a	160a
Ecotipo A	9a	118a	110b	120b

Dos o más tratamientos señalados por la misma letra no difieren.

La tabla 3 presenta los resultados en el nivel de N% en el ensayo de inoculación, como media de ambos ecotipos.

Si bien no se presentaron diferencias entre ecotipos, se apreció que la inoculación incrementó el nivel de nitrógeno en esta especie. La cepa D4 (media 1,89% N) presentó niveles superiores estadísticamente hasta los 90 días de la siembra. Skerman *et al.* (1991) informan de resultados similares por la inoculación en especies de *Desmodium* con distintas cepas homólogas.

Tabla 3. N% en plantas de *D. incanum* con distintos tratamientos.

	Días luego de la siembra			
	60	90	120	150
cepa D1	2,40a	1,80b	1,70a	1,64a
cepa D4	2,30b	1,90a	1,80a	1,58a
Nitrógeno	2,28b	1,78b	1,54c	1,52b
Testigo	2,20c	1,75b	1,62b	1,50b

Tratamientos señalados por la misma letra no difieren.

La tabla 4 presenta los rendimientos en N en ambos ecotipos como media de los tratamientos.

A 120 días de la siembra, el ecotipo B acumuló 95 mgN/planta, 73% más que el ecotipo A y con una alta tasa de acumulación de este elemento. La cepa de rhizobio D4 acumuló más nitrógeno en ambos ecotipos que la cepa D1 (datos no mostrados).

Tabla 4. Rendimiento en N (mg/planta) en los ecotipos de *D. incanum*.

	Días luego de la siembra			
	60	90	120	150
ecotipo B	25a	55a	95a	100a
ecotipo A	25a	42b	55b	62b

Dos o más tratamientos (ecotipos) señalados por la misma letra no difieren.

La acumulación de ^{15}N presentó diferencias significativas entre los tratamientos inoculados a los 120 y 150 días de desarrollo de las plantas (tabla 5).

Tabla 5. Porcentaje de átomos de ^{15}N en exceso

	Días luego de la siembra			
	60	90	120	150
cepa D1	1,94a	1,13a	0,77a	0,46a
cepa D4	2,10a	0,98a	0,50b	0,54a

Valores seguidos por la misma letra no difieren.

La dilución de ^{15}N fue superior entre los 60 y 90 días para ambos tratamientos inoculados, lo que coincide con la mayor demanda de nitrógeno por la planta. El descenso real fue: 0,81% para D1 y 1,13% para D4. Luego de este período el tratamiento con D1 diluyó el ^{15}N agregado al suelo en forma similar entre los 90 y 120 días y entre los 120 y el final de la experiencia.

La cepa D4 acumuló significativamente más nitrógeno a partir del aire a los 120 días, efecto que se mantuvo a los 150 días.

La tabla 6 resume los resultados de la inoculación a los 120 días de la siembra.

Tabla 6. Efecto de la inoculación de *D. incanum* con 2 cepas de rhizobios a los 120 días de la siembra (medias para los ecotipos A y B y 4 repeticiones)

	Peso seco (g/planta)			Nitrógeno N% mg/planta	Nodulación N°	Nodulación Peso fresco	% ^{15}N
	Raíz	parte aerea	Total				
Testigo	1,49	2,12	3,61 ^b	1,71 ^c	60 ^b	20 ^b	134 ^{ab}
Nitrógeno	1,71	2,62	4,33 ^{ab}	1,73 ^{bc}	70 ^b	17 ^b	
D1	1,67	2,32	3,98 ^{ab}	1,83 ^b	70 ^b	52 ^a	165 ^a 0,77 ^a
D4	1,89	2,88	4,77 ^a	1,97 ^a	100 ^a	51 ^a	181 ^a 0,50 ^b
Medias de cada ecotipo							
A	1,59 ^b	1,83 ^b	3,42 ^b	1,78 ^a	50 ^b	23 ^b	108 ^b 0,62 ^a
B	1,79 ^a	3,13 ^a	4,92 ^a	1,84 ^a	90 ^a	47 ^a	180 ^a 0,68 ^a

Valores con la misma letra no difieren.

Esta leguminosa nativa responde positivamente a la inoculación con rhizobios aislados de nódulos de plantas vigorosas en el campo. Se apreció una diferencia de 20% en el peso seco total de las plantas, aunque no significativo, mientras que la cepa D4 mostró su primacía en la evaluación del N% de las plantas (15% en relación al testigo, frente a un 7% de la cepa D1), rendimiento en N (67% frente al testigo y 17% en la cepa D1, con una diferencia del 43% entre ambos tratamientos inoculados). La deter-

minación de la abundancia isotópica, evidenció en este período superioridad en la fijación del N_2 con la cepa D4, efecto que se mantuvo a los 150 días. No se evidenciaron diferencias en esta determinación a los 60 y 90 días de la siembra (datos no presentados).

El empleo de isótopos de ^{15}N permite distinguir entre el N obtenido por procesos biológicos simbióticos del derivado de otras fuentes (Zapata et al., 1987, Witty, 1983). La técnica de dilución isotópica de ^{15}N ha sido ampliamente usada para evaluar la incorporación de nitrógeno a partir del aire. Como se sabe, las leguminosas captan a este elemento desde el suelo, de los fertilizantes y del aire. Un mayor enriquecimiento a partir del fertilizante enriquecido en átomos de ^{15}N evidencia menor fijación biológica. Boddey et al. (1983) emplearon esta técnica para evidenciar la fijación biológica en cereales y pasturas y en el país, Danso et al. (1988) determinaron la incorporación de nitrógeno del aire en pasturas de trébol blanco y festuca, de 2 años.

Finalmente, este ensayo evidencia también la variabilidad encontrada en la respuesta simbiótica entre distintos ecotipos de esta leguminosa nativa. Las semillas colectadas en el departamento de Salto (ecotipo B) se presentaron como más promisorias en la asociación con bacterias fijadoras de N_2 (71% de incremento en la materia seca de la parte aérea; 44% en el total de las plantas; 80% en rendimiento en N; 104% en el número de nódulos y 67% en su peso fresco), como se aprecia en la tabla 6.

CONCLUSIONES

- *D. incanum* es una leguminosa nativa de Uruguay que se presenta bien nodulada en el campo.
- En ensayos de inoculación cruzada esta leguminosa se comportó como muy específica en su nodulación ya que sólo lo hizo con rhizobios homólogos (aislados de *D. incanum*).
- Rhizobios nativos aislados de sus nódulos mostraron un efecto positivo al ser inoculados en ensayo de invernáculo en suelo pobre en nitrógeno. Las cepas presentaron diferente capacidad para fijar nitrógeno lo que evidencia la importancia de la selección de cepas.
- Se presentaron diferencias entre los ecotipos analizados. El ecotipo de Salto (B) presentó mejor comportamiento simbiótico en relación al colectado en el departamento de Rivera (A). Se requieren estudios con mayor número de ecotipos antes de poder efectuar recomendaciones sobre la introducción de una leguminosa nativa, que incluyen evaluaciones a campo, capacidad reproductiva, producción de semillas, adaptación a prácticas de manejo, además de sus características simbióticas.

AGRADECIMIENTO

A J. Burgueño por su asistencia en el análisis estadístico.

BIBLIOGRAFIA

- BODDEY, R. M., CHALK, P. M., VICTORIA, R. L., MATSUI, E. and DÖBEREINER, J. 1983. The use of the ^{15}N isotope dilution technique to estimate the contribution of associated nitrogen fixation nutrition of *Paspalum notatum* cv. batatais. Can J. Microbiol. 29:1036-1045
- BURKART, A. 1952. Las leguminosas argentinas. ACME, Buenos Aires
- CARÁMBULA, M. 1977 Producción y manejo de pasturas sembradas. Hemisferio Sur, Montevideo, 30pp
- COLL, J. y ZARZA, A. 1992 Leguminosas nativas promisorias: Trébol polimorfo y babosita. INIA, Boletín de Divulgación N° 22, 19pp
- CROSA, M. y OLIVEIRA, A. 1995 Interrelaciones simbióticas entre *Rhizobium* y *Desmodium* nativo. Trabajo Final, Ingeniero Agrónomo, Facultad de Agronomía, Montevideo, 70 pp
- DAGUTAT, H. and STEYN, P.N. 1995 Taxonomy and distribution of rhizobia indigenous to South America soils. En: Nitrogen fixation: Fundamentals and Applications. Tikhonovih I.A. et al, eds. Kluwer, Holanda: 683-684
- DANSO, S.K.A., HARDARSON, G. and ZAPATA, F. 1993 Misconceptions and practical problems in the use of ^{15}N soil enrichment techniques for estimating N_2 fixation. In: Bliss, F.A. and Hardarson, G. (eds.) Enhancement of Biological Nitrogen Fixation of Common Bean in Latin America. Kluwer Academ. Publish., London: 25-52
- DANSO, S.K.A., LABANDERA, C., PASTORINI, D. and CURBELO, S. 1988 Nitrogen fixation in a two-year old white clover-fescue pasture: influence of nitrogen fertilization. Soil Biol. & Biochem. 20: 261-262
- DAVYT, M. e IZAGUIRRE, P. 1996 Sinopsis de las especies y variedades del género *Adesmia* DC (*Fabaceae-Adesmieae*) en el Uruguay. Parodiana 9(1-2) : 89-114
- DOMMARGUES, Y., DUHOUX, E. et DIEM, H.G. 1999 Les arbres fixateurs d'azote, CIRAD, Editions Espaces 34, FAO y IRD, París, Roma
- FRIONI, L. 1990 Ecología Microbiana del Suelo. Ed. Universidad de la República, Montevideo, 517 pp
- FRIONI, L. 1999 Procesos microbianos. Tomo II Fundación de la Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina, 286pp
- FRIONI, L., DODERA, R., MALATES, D. and IRIGOYEN, I. 1998a) An assessment of nitrogen fixation capability of leguminous trees in Uruguay. Appl. Soil Ecol. 7: 271-279
- FRIONI, L., MALATES, D., IRIGOYEN, I. and DODERA, R. 1998b) Promiscuity for nodulation and effectivity in the N_2 -fixing legume tree *Acacia caven* in Uruguay. Appl. Soil Ecol. 7: 239-244
- FRIONI, L., MINASAIN, H. and VOLFOVICZ, R. 1999 Arbuscular mycorrhizae and ectomycorrhizae in native tree legume in Uruguay. Forest Ecology and Management 115: 41-47

- HARDARSON, G. 1994 International FAO/IAEA Programmes on Biological Nitrogen Fixation. En: **Symbiotic Nitrogen Fixation**. Eds. P.H. Graham, M.J. Sadowsky & C.P. Vance, Kluwer Academic Publishers: 189-202
- IZAGUIRRE, P. y BRESCIA, R. 1992 Algunas leguminosas nativas de interés. Banco de Seguros, Montevideo: 242-245
- IZAGUIRRE, P. y BEYHAUT, R. 1998 Las leguminosas en Uruguay y regiones vecinas. Parte I- Ed. Hemisferio Sur, 549 pp
- IZAGUIRRE, P., MEROLA, S. and BEYHAUT, R. 1994 Seed ontogeny in *Adesmia securigerifolia* (Fabaceae-Adesmieae). Nord. J. Bot. 14(5): 547-556
- MARTINEZ-ROMERO, E. and CABALLERO-MELLADO, J. 1996 *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity. Critical Rev. Plant Sci. 15(2): 113-140
- MILLOT, J.C., RISSO, D. y METHOL, R. 1987 Relevamiento de pasturas naturales y mejoramientos extensivos en áreas ganaderas del Uruguay, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP-CHPA), Uruguay, 199 pp
- MILNITSKY, F., FRIONI, L. and AGIUS, F. 1997 Characterization of rhizobia that nodulate native legume trees from Uruguay. Soil Biol & Biochem. 29(5-6): 989-992
- SPERONI, G. e IZAGUIRRE, P. 1994 El género *Stylosanthes* (Fabaceae, Aeschynomeneae, Stylosanthinae) en Uruguay. Bol. Soc. Argent. Bot. 30(1-2): 103-109
- SINGLETON, P.W., BOHLOOL, B.B. and NAKAO, P.L. 1992 Legume response to rhizobial inoculation in the tropics: Myths and realities. In: Myths and Science of Soils of the Tropics. SSSA, USA, Special Publication, N° 29
- SKERMAN, P.J., CAMERON, D.G. y RIVEROS, F. 1991 Leguminosas praterenses tropicales. In: Leguminosas Forrajeras Tropicales. FAO: Producción y Protección Vegetal, N° 2, Roma, 707 pp
- VINCENT, J. M. 1975 Manual práctico de rizobiología. Ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires.
- WITTY, J. F. 1983 Estimating N₂-fixation in the field using ¹⁵N-labelled fertilizer: some problems and solutions. Soil Biol & Biochem. 15(6): 631-639
- YOUNG, J. P.W. 1996 Phylogeny and taxonomy of rhizobia. Plant and Soil 186: 45-52
- ZAPATA, F., DANSO, S.K.A., HARDARSON, G. and FRIED, M. 1987 Nitrogen fixation and translocation in field-grown fabacean. Agron. J. 79 (3):505-509.