

RESPUESTA DE *Lotus tenuis* Waldst A LA INOCULACION CON *Rhizobium loti* Y A LA FERTILIZACION FOSFATADA

A M QUADRELLI, F S LAICH, E ANDREOLI, H E ECHEVERRIA

Unidad Integrada EEA INTA Balcarce-FCA UNMP cc 276, (7620) Balcarce, Argentina

RESPONSE OF *LOTUS TENUIS* WALDST TO INOCULATION WITH *RHIZOBIUM LOTI* AND PHOSPHATE FERTILIZATION

Lotus tenuis is found in the Argentine Flooding Pampa as a naturalised species spontaneously nodulated and mycorrhized. However, when it is artificially sown its developmental rate is slow and its competitive aggressiveness is poor, all of which hinder its potencial productivity. To improve lotus production on sown/artificial pastures it was hypothesised that the symbiotic associations could be improved getting by an earlier and more effective *Rhizobium* infection by the inoculation of lotus with a selected strain of *Rhizobium loti* and the addition of low doses of phosphate to promote absorption of phosphorus that would not affect spontaneous mycorrhizae symbiosis. To test this hypothesis a field trial in a Natracuoll soil was implanted. *Lotus* was inoculated with the selected strain 733 of *R. loti* and was fertilised at sowing with 0, 11 and 22 kg P ha⁻¹. There was no interaction between levels of phosphate and inoculation. Significant increases in lotus dry matter and total nitrogen due to the *Rhizobium* inoculation were found. The selected strain of *Rhizobium* promoted an earlier nodulation and the strain showed a good saprophytic performance. There was no response on dry matter production of lotus to the added phosphate. However, phosphate fertilisation promoted weed growth and may have determined lotus lack of response to phosphorus. The activity of mycorrhizae was depressed by the *Rhizobium* inoculation treatment and the higher level of phosphate.

Key words : *Lotus tenuis* - *Rhizobium loti* - Flooding Pampa - Phosphate fertilisation

INTRODUCCION

Lotus tenuis Waldst es una leguminosa naturalizada (Miñón *et al.* 1990) en los suelos sódicos y anegadizos de la Pampa Deprimida (Montes, Argentina 1988), donde para la región es considerada una especie de importante valor forrajero. En estas condiciones forma espontáneamente, asociaciones simbióticas con poblaciones naturalizadas de rizobios (Picón *et al.* 1991) y hongos micorríticos (Picón 1984). Es conocido que estas simbiosis suministran a la planta nitrógeno y fósforo, mejorando su nutrición y favoreciendo así su crecimiento. Sin embargo cuando se siembra *Lotus tenuis* en forma convencional o en interseembra, se comporta como una leguminosa de implantación lenta y nodulación tardía (Montes, Cahuépé, 1985). Estos aspectos afectan el potencial productivo del lotus frente a especies de mayor agresividad (Sevilla, Fernández, 1991). Se planteó la posibilidad de favorecer el establecimiento y la producción del lotus por una temprana y más eficiente simbiosis con *Rhizobium loti*. Por otra parte, teniendo en cuenta que los suelos de la región poseen bajos niveles de fósforo disponible (Darwich 1985) y que éste es un elemento de reconocida demanda por parte de las leguminosas dependientes de la fijación de nitrógeno atmosférico (Israel 1987, Robson, Bottomley 1991), se estimó necesario, estudiar la respuesta del lotus al agre-

gado de bajas dosis de fósforo, sin que este elemento afecte los sistemas micorríticos naturales.

MATERIALES Y METODOS

Para obtener una nodulación más temprana y una mayor eficiencia de la asociación simbiótica *Rhizobium*-leguminosa, se inoculó el lotus con la cepa 733 de *Rhizobium loti* seleccionada y ecológicamente adaptada. Esta cepa de *R. loti*, obtenida de un conjunto de aislamientos de rizobios provenientes de plantas vigorosas de lotus tomadas de distintos sitios de la Pampa Deprimida, fue previamente seleccionada en condiciones de invernáculo, por su mayor producción de materia seca y nitrógeno (Picón *et al.* 1991). Fueron incorporadas además, bajas dosis de fósforo, 0, 11 y 22 kg ha⁻¹, de manera tal de evaluar aquellas que favorecieran al lotus sin inhibir la asociación micorrítica espontánea (Barea *et al.* 1983). Se evaluó la fertilización fosfatada y la cepa introducida, por la producción de materia seca, nitrógeno y fósforo absorbido del lotus. Para una mejor comprensión de las asociaciones, se realizó el seguimiento de la nodulación y mediante serología, el de la cepa introducida, así como, la cuantificación en raíces de lotus de las estructuras micorríticas (arbusculos y vesículas). Se consideró que estos parámetros permitirían definir mejor los tratamientos a evaluar y la eficiencia de los sistemas asociativos.

Diseño Experimental

En el Partido de Balcarce, Provincia de Buenos Aires, en un suelo Natracuol típico, de pH 8,6, materia orgánica 74,5 g kg⁻¹ y fósforo 7,5 mg kg⁻¹ (Bray 1), se instaló un experimento con *L. tenuis* puro, sembrado al voleo, a razón de 6 kg ha⁻¹, en un diseño en bloques completos al azar con un arreglo factorial 2 x 3 (sin y con inoculación; y 0, 11 y 22 kg ha⁻¹ de fósforo) con cuatro

repeticiones por tratamiento. El tamaño de las parcelas fue de 2 x 6 m, con un área de 2 m² destinada a muestreo destructivo y un área de evaluación de forraje de 3 m². Las parcelas fueron separadas entre sí por caminos de 1 m de ancho sembrados con raigrás. La inoculación de las semillas de lotus se realizó por el método convencional, utilizando turba estéril impregnada con la cepa 733 de *R. loti* a una concentración de 10⁹ bacterias por gramo de turba húmeda. Con el fin de proteger a la bacteria, luego de la inoculación se realizó el peleteado de las semillas con CO₂/Ca. Previo a la siembra del lotus, se determinó el número más probable (NMP) de rizobios nativos por gramo de suelo seco (Vincent 1970), en plantas creciendo en condiciones asépticas,

Dinámica de la nodulación, producción de materia seca y nitrógeno por planta

Se realizaron tres muestreos de plantas enteras, a los 2, 6 y 8 meses después de la emergencia (MDE) del lotus. Se tomaron del área de muestreo destructivo seis plantas al azar, cuidando de retirar el sistema radicular lo más intacto posible. A los 2 MDE del lotus, debido al pequeño tamaño de las plantas y de los nódulos, se registró solamente número de nódulos. En los otros dos muestreos, realizados a los 6 y 8 MDE del lotus se determinó, el peso seco de los nódulos, materia seca y el nitrógeno de la parte aérea. Para las dos primeras variables se secó el material en estufa a 60°C durante 48 horas, mientras que el nitrógeno de la parte aérea se determinó por el método de Kjeldhal.

Identificación de la cepa introducida

La identificación antigénica de la cepa introducida se realizó mediante la técnica de inmunodifusión en gel de agar, basada en el reconocimiento de la banda principal (Dadman 1971). La obtención del antisuero se realizó siguiendo la técnica de Vincent (1970), descripta para *Rhizobium*. La lectura de las reacciones serológicas fue clasificada como homóloga, parcial y ausente. El seguimiento de la cepa se llevó a cabo en dos oportunidades: a los 8 MDE del lotus (primavera) y al año de la implantación (otoño). A los 8 MDE se eligieron, por parcela, diez nódulos extraídos de seis plantas. El conjunto de los diez nódulos fue machacado y el extracto, utilizado en las reacciones serológicas. En el segundo muestreo, de cuatro plantas por parcela, se tomaron diez nódulos y de éstos se realizaron aislamientos de *Rhizobium* en medio agar levadura manitol (Vincent 1970). Se utilizó en la reacción serológica, el cultivo puro obtenido de cada nódulo (240 aislamientos en total). Para los casos de aquellos aislamientos puros que no presentaron reacción serológica, se verificó si eran aislamientos de *Rhizobium*, infectando plantas de *Lotus tenuis* creciendo en condiciones asépticas.

Asociaciones micorríticas

A los 6 y 8 MDE del lotus, de seis plantas por parcela se tomaron muestras del sistema radicular. Las raíces fueron lavadas y los extremos más nuevos fueron cortados en trozos de aproximadamente 1 cm, para luego ser tratados siguiendo la técnica de tinción descripta por Phillips y Hayman (1970). Se cuantificaron las estructuras micorríticas (porcentaje de arbusculos y vesículas), mediante el método de la cuadrícula de Giovannetti y Mosse (1980) realizando aproximadamente 300 lecturas por cuadrícula y por parcela.

Cortes de evaluación de la producción

Se realizaron dos cortes de evaluación, a los 10 MDE del lotus (en formación de vainas) y a los 18 MDE (en inicio de floración). Al momento de los cortes, la presencia de especies indeseadas era abundante, por lo que para cada corte se realizó composición

botánica, identificando lotus, malezas de hoja ancha y raigrás. Para la determinación de materia seca cada componente fue secado durante 48 horas a 60°C. Las distintas fracciones fueron molidas y determinada la concentración de nitrógeno (Nelson, Sommers, 1973). Para los tratamientos con las dosis de 0 y 22 kg P ha⁻¹, se determinó fósforo absorbido (Blanchard et al., 1965). Para cada variable se efectuó el análisis de varianza con el Proc Anova (SAS Institute Inc., 1985).

RESULTADOS Y DISCUSION

Dinámica de la nodulación, producción de materia seca y nitrógeno por planta

El análisis de varianza para las variables estudiadas, no demostró efecto de interacción fósforo x inoculación ($P > 0,05$), en ninguno de los tres muestreos realizados.

En el primer muestreo de plantas, a los 2 MDE del lotus, se observó para el factor inoculación, que la variable número de nódulos presentaba diferencias altamente significativas ($P < 0,01$) (Tabla 1). Este muestreo puso en evidencia la ausencia de nodulación en el tratamiento sin inoculación, concordando con el hecho de que el recuento del NMP de *Rhizobium loti* en suelo, previo a la siembra, no detectó la presencia de poblaciones naturales. En estas condiciones experimentales se demostró que la práctica de la inoculación del *Lotus tenuis* con una cepa seleccionada, permitió el establecimiento temprano de la simbiosis.

A los 6 MDE, no existieron para la variable peso seco de nódulos, diferencias significativas ($P > 0,05$) entre niveles de inoculación (Tabla 1). En este muestreo el tratamiento sin inoculación presentó nodulación, estrechando las diferencias entre niveles. Aún así, cabe destacar, que el tratamiento con inoculación presentó al nivel $P < 0,09$ un mayor peso seco de nódulos. El alto coeficiente de variación registrado para esta variable (43 %), probablemente impidió detectar diferencias significativas. A los 8 MDE, no existió entre niveles de inoculación diferencias en el peso seco de los nódulos.

En cuanto a la variable producción de materia seca por planta, a los 6 y 8 MDE, no existieron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre los tratamientos inoculados y sin inoculación (Tabla 1). No obstante, en ambos muestreos el tratamiento con inoculación presentó un mayor peso seco. A los 8 MDE se observaron para el tratamiento con inoculación diferencias al nivel $P < 0,09$, siendo probablemente el alto coeficiente de variación registrado (57 %) el que afectó la expresión del tratamiento. El hecho que se observaran valores más altos para el peso seco aéreo del lotus con inoculación, concuerda con la presencia de nódulos desde temprana edad de la planta, indicando además una simbiosis efectiva, con un aporte de nitrógeno que permitió un mayor desarrollo del lotus. Esta apreciación se respalda en los valores de nitrógeno por planta registrados a los

Tabla 1. Valores de las variables nodulación, materia seca aérea (MS) y nitrógeno acumulado (N) por planta determinados en tres muestreos.

Tratamiento Inoculación	Dosis de fósforo	2 MDE	Peso seco nódulos	6 MDE		Peso seco nódulos	8 MDE		
		Nódulos por planta (Nro.)		Parte aérea MS	N		Parte aérea MS	N	
				(mg planta ⁻¹)				(mg planta ⁻¹)	
Con		2.15 a	7.50 a	74.2 a	2.27 a	32.8 a	1430 a	33.1 a	
Sin		0.00 b	5.40 a	62.6 a	1.67 b	31.9 a	920 a	22.2 a	
	0	1.06 a	6.00 a	64.4 a	1.85 a	26.5 a	893 a	22.1 a	
	11	n.d.	5.87 a	63.1 a	1.72 a	30.6 a	1230 a	27.1 a	
	22	1.08 a	7.56 a	77.7 a	2.34 a	40.0 a	1400 a	34.3 a	

Dentro de una columna, valores seguidos por una misma letra no difieren significativamente a $P > 0,05$. n.d. no determinado MDE meses después de la emergencia

6 MDE, donde se obtuvieron diferencias significativas ($P < 0,05$) a favor de la inoculación (Tabla 1), mientras que a los 8 MDE, esta diferencia fue al nivel $P < 0,08$. En este último caso nuevamente los coeficientes de variación elevados (50 %), afectaron la expresión de los tratamientos a un nivel de significancia más estricto.

En cuanto al factor fósforo, no se observaron para las tres variables estudiadas, diferencias significativas ($P > 0,05$) entre niveles de fósforo. No obstante, cabe señalar que a los 6 y 8 MDE, los valores más altos observados para estas variables, se registraron con la dosis 22 kg P ha⁻¹ (Tabla 1).

Resumiendo, a través de los muestreos de plantas pudo observarse que cuando *Lotus tenuis* fue inoculado con una cepa seleccionada de *Rhizobium loti* presentó un establecimiento temprano de la simbiosis, reflejado en un mayor número y peso seco de nódulos, que se manifestó en una mayor producción de materia seca y contenido de nitrógeno de la parte aérea del lotus.

Identificación de la cepa introducida

Los análisis de varianza realizados para la variable identificación de la cepa introducida, no detectaron interacción en ninguno de los dos muestreos, así como tampoco diferencias entre niveles de fósforo. En cuanto a los niveles de inoculación, el primer muestreo realizado en la primavera (8 MDE), no demostró diferencias significativas. Sin embargo, la cepa 733 de *R. loti*, fue recuperada en el 100% de los nódulos provenientes de plantas inoculadas (Tabla 2). Estos resultados demostraron que la cepa introducida ocupó todos los sitios de infección disponibles, de los tratamientos con inoculación, corroborado por la presencia de nódulos. En los tratamientos sin inoculación, la cepa 733 fue recuperada en un 78% de los nódulos analizados. El hecho de que al inicio de la experiencia no se detectaron en suelo poblaciones de *R. loti*, y que en el primer muestreo no se registró

nodulación en el tratamiento sin inoculación (Tabla 1), permite afirmar que el alto porcentaje de recuperación de la cepa introducida, se debió a contaminación entre parcelas. La misma se atribuye a que el período transcurrido entre los dos primeros muestreos comprendió fines de invierno comienzo de primavera, donde debido a las condiciones climáticas, el área experimental estuvo bajo anegamiento. El agua habría sido el medio de transporte de los rizobios entre parcelas.

En el segundo muestreo realizado en el otoño (12 MDE), luego de un ciclo reproductivo, la cepa introducida fue recuperada en un 78% de los nódulos provenientes del lotus con inoculación y en un 70% de los nódulos provenientes del lotus sin inoculación (Tabla 3). Los altos porcentajes de recuperación obtenidos, a un año de la implantación, cuando probablemente existió decadencia de nódulos y reinfección, evidenciaron la capacidad de sobrevivencia saprofítica de la cepa 733. Por otra parte, en este segundo muestreo se observaron reacciones de identidad parcial y ausencia de reacción. Las reacciones parciales (Dudman 1971) se observaron en un 17% y 13% de los nódulos provenientes de los tratamientos con y sin inoculación respectivamente. Estas reacciones parciales, demostraron la existencia de cepas con parentesco, ya que comparten algunos deter-

Tabla 2. Reacciones serológicas observadas en el primer muestreo (8 MDE).

Tratamiento	Número de observaciones	Tipo de reacción		
		Identidad	Parcial	Ausencia
		(%)		
Con inoculación	11	100 a	0	0 a
Sin inoculación	9	78 a	0	22 a

Para una misma reacción los valores con letras iguales no difieren significativamente entre sí a $P > 0,05$.

Tabla 3. Reacciones serológicas observadas en el segundo muestreo (12 MDE)

Tratamiento	Número de Observaciones	Tipo de reacción		
		Identidad	Parcial	Ausencia
		(%)		
Con inoculación	115	78 a	17 a	5 a
Sin inoculación	107	70 a	13 a	17 b

Para una misma reacción los valores con letras iguales no difieren significativamente entre sí a $P > 0.05$.

minantes antigénicos con la cepa 733. Los aislamientos que no presentaron reacción antigénica (ausencia de reacción), indicaron que *L. tenuis* fue infectado por otras cepas de *R. loti* naturales del suelo, no emparentadas con la cepa 733. La presencia de estos rizobios fue observada en un 5% de los nódulos provenientes de los tratamientos con inoculación y en un 17% de los nódulos provenientes de los tratamientos sin inoculación, siendo esta diferencia significativa ($P < 0.05$). Tanto las reacciones serológicas parciales como la presencia de rizobios sin parentesco demostraron la existencia de poblaciones de *R. loti* que a la siembra no fueron detectadas, tal vez por encontrarse en muy bajo número. Estas poblaciones, aumentaron ante la presencia y estímulo de la planta y al año de la implantación pudieron reinfectar el lotus. El hecho de que estos rizobios fueron identificados en los tratamientos con inoculación, en un porcentaje de nódulos significativamente menor, estaría indicando que la cepa 733 además de su buena adaptación y persistencia, posee capacidad competitiva.

Asociaciones micorríticas

El análisis de varianza para las estructuras arbusculares y vesiculares se realizó transformando los valores de porcentajes, a raíz cuadrada del arco-seno. No se observó efecto de interacción inoculación x fósforo. A los 6 MDE

del lotus, no se observó influencia del fósforo agregado sobre el porcentaje de arbusculos y vesículas. Sin embargo existió para esta misma variable, diferencias significativas ($P < 0.05$) entre niveles de inoculación (Tabla 4). El tratamiento sin inoculación, mostró un porcentaje de arbusculos significativamente mayor y un porcentaje de vesículas significativamente menor que el tratamiento con inoculación. Esta observación sugiere que en las plantas del tratamiento sin inoculación, existió una menor competencia entre los microorganismos simbioses (micorrizas, *Rhizobium*). A los 8 MDE ésta relación se mantiene, aunque el porcentaje total de arbusculos para ambos tratamientos es menor. Esto podría ser interpretado como que, en dicho momento la planta destina más fotosintatos a la floración, en detrimento de la actividad micorrítica. En cuanto a los niveles de fósforo agregados, a los 6 MDE no existieron diferencias significativas entre niveles. A los 8 MDE, el nivel 0 de fósforo mostró una cantidad significativamente mayor de arbusculos ($P < 0.05$) que la dosis 22 de fósforo, demostrando que este nivel de fósforo afectó la actividad micorrítica (Barea *et al.* 1983).

Cortes de evaluación de la producción

Aún cuando es conocido el sinergismo entre fósforo y fijación simbiótica de nitrógeno (Singleton *et al.* 1985), los análisis de varianza de los cortes de evaluación realizados a los 10 y 18 MDE, no detectaron interacción fósforo x inoculación, para las variables materia seca y nitrógeno de la parte aérea. Es posible que los altos porcentajes de variación observados ($> 50\%$), no hayan permitido detectar interacción entre los factores.

El análisis de varianza del primer corte de evaluación de forraje (10 MDE), demostró que en el año de la implantación del lotus el tratamiento con inoculación incrementó significativamente ($P < 0.05$) la producción de materia seca y nitrógeno de la parte aérea, duplicando los valores con respecto al tratamiento sin inoculación

Tabla 4. Estructuras micorríticas determinadas en dos muestreos.

Tratamiento	Dosis de fósforo	6 MDE		8 MDE	
		Arbusculos	Vesículas	Arbusculos	Vesículas
Inoculación	kg ha ⁻¹	(%)			
Con		55.50 b	16.62 a	36.87 b	9.2 a
		76.14 a	3.65 b	46.76 a	7.4 a
Sin	0	66.7 a	11.9 a	49.2 a	6.7 a
	11	64.5 a	11.1 a	38.5 ab	12.5 a
		66.3 a	7.5 a	37.7 b	5.8 a
	20				

Dentro de una columna, valores seguidos por una misma letra no difieren significativamente a $P > 0.05$.

Tabla 5. Producción de materia seca (MS) y acumulación de nitrógeno (N) y fósforo (P) en lotus, raigrás y malezas de hoja ancha, en el primer corte de evaluación.

Inoculación	Tratamiento Dosis de fósforo	Lotus tenuis			Raigrás			Malezas de hoja ancha		
		MS	N acumulado	P acumulado	MS	N acumulado	P acumulado	MS	N acumulado	P acumulado
		(kg ha ⁻¹)								
Sin	0	2796	51,1	2,96	1750	11,1	0,90	559	11,5	0,74
	11	2614	50,6	n.d.	2044	20,4	n.d.	956	22,0	n.d.
	22	2089	45,4	3,15	2056	25,6	2,05	1187	25,7	1,96
Con	0	5522	100,5	4,90	2548	19,1	2,17	577	11,2	0,81
	11	5648	96,9	n.d.	2491	23,7	n.d.	520	11,2	n.d.
	22	6040	112,7	6,84	2680	30,4	3,97	1184	27,8	1,89
Promedio	Sin	2500 b	47,1 b	3,06 a	1950 a	19,0 a	1,48 b	901 a	19,8 a	1,36 a
	Con	5736 a	103,4 a	5,87 a	2573 a	24,5 a	3,07 a	761 a	16,8 a	1,35 a
Promedio	0	4159 a	75,9 a	3,94 a	2149 a	15,1 b	1,54 b	568 b	11,4 b	0,78 b
	11	4131 a	73,8 a	n.d.	2268 a	22,1 ab	n.d.	738 ab	16,6 b	n.d.
	22	4064 a	79,1 a	5,00 a	2368 a	28,0 a	3,01 a	1186 a	26,8 a	1,93 a

Valores en columnas seguidos por letras iguales no difieren significativamente a $P > 0,05$. n.d.: no determinado.

(Tabla 5). En el segundo corte (18 MDE), para estas mismas variables, no existieron diferencias significativas entre los tratamientos. Sin embargo cabe destacar, que el lotus del tratamiento con inoculación tuvo un aumento de producción de 587 kg ha⁻¹ (Tabla 6) con respecto al del tratamiento sin inoculación.

En cuanto al contenido de fósforo total en planta, en el primer corte, el lotus del tratamiento con inoculación, mostró aunque no significativamente, una cantidad de fósforo absorbido mayor, que la del tratamiento sin inoculación (Tabla 5). Esta diferencia en el contenido de fósforo en planta, para un elemento que desempeña un importante rol en todas las fases del proceso simbiótico de las leguminosas (Israel 1987), probablemente no fue detectable, como consecuencia de los elevados coeficientes de variación (64,5%).

Los valores de materia seca obtenidos en el primer corte (10 MDE) demostraron que las distintas dosis de fósforo agregadas no afectaron la producción de forraje así como tampoco el contenido de nitrógeno y fósforo del lotus (Tabla 5). Aunque no significativa, la cantidad de fósforo absorbido por el lotus, fue mayor para la dosis de 22 kg P ha⁻¹. Por otra parte, la mayor dosis de fósforo agregado favoreció la aparición de especies indeseadas, aumentando significativamente ($P < 0,05$) la producción de materia seca de malezas de hoja ancha, así como el contenido de nitrógeno y fósforo de las mismas (Tabla 5). En el segundo corte (Tabla 6), la producción del raigrás y la de malezas de hoja ancha, se vio favorecida significativamente ($P < 0,05$), por el agregado de fósforo, mientras que existió para el lotus una disminución, tam-

bién significativa ($P < 0,05$), en la producción de materia seca y nitrógeno de la parte aérea. La menor producción de materia seca del lotus en respuesta al agregado de fósforo, mostró que en las condiciones estudiadas, la fertilización fosfatada no favoreció el crecimiento de esta especie. Esto fue interpretado para las condiciones del experimento, que las malezas utilizaron más eficientemente el fósforo adicionado al suelo y como consecuencia de ello otros recursos ambientales, como pudo haber sido la radiación (Mitidieri *et al.* 1975), compitiendo activamente con el lotus, el cual ha sido descrito como una especie de escasa agresividad (Sevilla, Fernández 1991).

Para finalizar, la información aportada por esta experiencia a campo con *Lotus tenuis*, permite concluir que la inoculación con la cepa 733 de *R. loti*, promovió una temprana nodulación que favoreció la fijación simbiótica de nitrógeno atmosférico, incrementando la producción de materia seca y nitrógeno. Esta afirmación se vio corroborada por el alto porcentaje de recuperación de la cepa introducida, la cual demostró ser persistente y competitiva. Las evaluaciones micorríticas realizadas durante el desarrollo vegetativo del lotus, demostraron diferencias entre niveles de inoculación, existiendo una mayor actividad micorrítica, demostrada por el porcentaje de arbusculos, en los tratamientos sin inoculación, mientras que en el estadio inicio de floración, el nivel 22 kg P ha⁻¹ redujo la actividad micorrítica. Los valores obtenidos en producción de materia seca, para lotus, raigrás y malezas de hoja ancha, por el agregado de fósforo, sugieren la necesidad de garantizar un estricto control de la vegetación indeseada a fin de no

Tabla 6: Producción de materia seca (MS) y acumulación de nitrógeno (N) en lotus, raigrás y malezas de hoja ancha, en el segundo corte de evaluación.

Tratamiento	Inoculación	Dosis de fósforo	Lotus tenuis		Raigrás		Malezas de hoja ancha	
			MS	N acumulado	MS	N acumulado	MS	N acumulado
(kg ha ⁻¹)								
Sin	0	2261	72,1	2876	31,5	1553	27,9	
	11	537	11,5	3828	35,3	1994	33,3	
	22	334	7,1	4725	42,3	2192	36,2	
Con	0	3048	55,5	2793	27,9	832	14,6	
	11	1596	35,2	4886	51,5	1354	24,3	
	22	249	5,8	5468	52,3	1903	32,8	
Promedio	Sin	1044 a	26,4 a	3810 a	36,4 a	1913 a	32,5 a	
	Con	1631 a	32,2 a	4382 a	43,9 a	1363 a	23,9 a	
Promedio	0	2654 a	63,8 a	2835 b	29,7 b	1193 b	21,2 a	
	11	1067 b	23,4 b	4357 a	43,4 a	1674 ab	28,8 a	
	22	292 b	6,4 b	5096 a	47,3 a	2048 a	34,5 a	

Valores en columnas seguidos por letras iguales no difieren significativamente a $P > 0,05$.

incrementar la competencia de ésta última sobre las plantas de lotus.

AGRADECIMIENTOS

Trabajo financiado por la EEA INTA de Balcarce y la FCA de la UNMdP.

REFERENCIAS

- Barea J, Azcon-Aguilar C, Azcon R, 1983. Efecto de la interacción de fertilizantes solubles de P y micorrizas sobre la nodulación, micorrización, crecimiento y nodulación de la alfalfa (*Medicago sativa* L.). Ciencia del Suelo 1:39-42
- Blanchar R W, Rhem G, Caldwell A C, 1965. Sulfur in plant materials with digestion with nitric and perchloric acid. Soil Sci. Soc. Am. 29:71
- Darwich N, 1985. Niveles de fósforo asimilable en los suelos pampeanos. IDIA, 1-5: 409-412
- Dudman W F, 1971. Antigenic analysis of *Rhizobium japonicum* by immunodiffusion. Applied Microbiology pag 973-985
- Giovannetti M, Mosse B, 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. New Phytologist 84:489-500
- Israel D W, 1987. Investigation of the role of phosphorus in symbiotic dinitrogen fixation. Plant Physiol. 84: 835-840
- Miñón D, Sevilla G, Montes L, Fernández O, 1990. *Lotus tenuis*: leguminosa forrajera para la Pampa Deprimida. Boletín Técnico Nro. 98 Unidad Integrada Balcarce FCA, UNMdP-INTA, EEA Balcarce, ISSN 0522-0548, pp 16
- Mitidieri A, Ghelfi R A, Kramarovsky E, 1975. Determinación de los factores de competencia del nabo (*Brassica campestris* L.) en el cultivo fertilizado de arveja (*Pisium sativum* L.) con el uso de superfosfato 32 P. VII Reunión Argentina de la Ciencia del Suelo: 46
- Montes L, 1988. *Lotus tenuis*: Rev. Arg. Prod. Anim. 8:367-376
- Montes L, Cauhépé M A, 1985. Evaluación de *Lotus tenuis* mediante dos métodos de siembra. Rev. Arg. Prod. Anim. 5:313-321
- Nelson D W, Sommers L E, 1973. Determination of total nitrogen in plants. Agron. J. 65:109-112
- Picón M G, 1984. Relevamiento de micorrizas vesículo arbusculares en especies silvestres del Partido de Balcarce. Efecto del agregado de fósforo sobre el grado de micorrización espontánea de *Lolium perenne*. Tesis Lic. CS. Biológicas, Fac. Cs. Ex. y Nat. Biblioteca UNMdP 45 pp
- Picón M G, Navarro C A, González N S, Andreoli Y E, 1991. Selección de cepas de *Rhizobium* para *Lotus tenuis* adaptadas a suelos alcalino-hidromórficos de la Pampa Deprimida. 1er. Simposio Argentino del Género *Lotus*. Chascomús, Pág. 8
- Phillips J M, Hayman D S, 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Trans. Br. Mycol. Soc. 55:158-161
- Robson A D, Bottomley P J, 1991. Limitations in the use of legumes in agriculture and forestry. Ed. Dilworth, M J and Glenn, A R En: Biology and Biochemistry of Nitrogen Fixation. Editorial Elsevier, Amsterdam, pp 320-349
- SAS Institute Inc. 1985. SAS User's Guide, Statistics Version 5th edition. SAS Inst. Inc., Cary, North Caroline
- Sevilla G H, Fernández O N, 1991. Leguminosas forrajeras herbáceas. Emergencia y establecimiento de plántulas. Rev. Arg. Prod. Anim. 11: 4: 419-429
- Singleton P W, Abdel Magid H M, Tavares J W, 1985. Effect of phosphorus on the effectiveness of strains of *Rhizobium japonicum*. Soil Sci. Soc. Am. J. 49:613-616
- Vincent J M, 1970. In: A Manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacteria IBP Handbook No 15. Blackwell, Oxford, 164 pp.