

## PERSISTENCIA EN EL SUELO DE CEPAS DE *Sinorhizobium meliloti*

CC CASTELLARI, AM QUADRELLI

FCA-UNMdP, EEA INTA Balcarce. cc 276, CP 7620 Balcarce, BsAs, Argentina.

E-mail: aquadrelli@balcarce.inta.gov.ar

Recibido 4 de noviembre de 2003, aceptado 23 de abril de 2004

### PERSISTENCE OF *Sinorhizobium meliloti* IN SOILS

In order to evaluate the persistence of *Sinorhizobium meliloti* B399, B58 and B401 strains in the soil, this bacteria population was quantified in seven sites by the NMP method. Conventional microbiological protocols and molecular techniques were used for the characterization of *S. meliloti* isolates. The measured population was  $10^2$  in inoculated sites and  $10^3$  in a fallow and an undisturbed site. A homology of B401 strain was detected by molecular techniques in one of the studied sites, where a Lucerne crop, implanted three years ago, was present. Moreover, the molecular techniques allowed to detect the presence of a tolerant acid strain type sp.Or 191. Isolates of sites where the strains were introduced six to nine years before the soil tests start and with no Lucerne did not present an homology with the inoculated strain patrons.

**Key words:** *S. meliloti*, persistence, fingerprinting.

### INTRODUCCION

La inoculación de semillas de leguminosas con cepas seleccionadas de *Rhizobium* o *Bradirhizobium* constituye una práctica agronómica con más de 30 años de aplicación. El objetivo de la inoculación es lograr una nodulación temprana y una efectiva fijación de  $N_2$ . Las cepas a introducir deben cumplir con dos características: capacidad competitiva frente a los rizobios nativos presentes en el suelo y la persistencia en su nuevo ambiente. Este último aspecto es importante cuando las cepas son inoculadas a especies de leguminosas bianuales o perennes que deben satisfacer las necesidades de nitrógeno del cultivo durante un ciclo de vida más prolongado (Rice, Olsen 1992). En muchos casos las semillas de leguminosas inoculadas establecen poblaciones de *Rhizobium* que inducen la formación de nódulos en el primer año del ciclo de la planta para posteriormente y a través del tiempo la población de rizobios inoculados sea reemplazada progresivamente por rizobios nativos (Jenkins, Bottomley 1985) que son capaces de colonizar las raíces a tasas mayores que las cepas introducidas (Triplett, Sadowsky 1992). Numerosos autores coinciden en que la persistencia de cepas de *Rhizobium* introducidas constituye un problema importante en la ecología microbiana del suelo. Dowling y Broughton (1986) indicaron que,

aunque *Rhizobium* constituye uno de los principales géneros en la rizósfera, cuando una semilla de leguminosa es inoculada los rizobios deben sobrevivir en nichos donde las condiciones son atípicas hasta el establecimiento de la planta. El seguimiento de la supervivencia de cepas introducidas nos permite estimar la persistencia de las mismas (Broughton *et al.* 1987). En los últimos años, la aplicación de técnicas moleculares como la del fingerprinting del ADN (De Bruijn 1992) han sido utilizadas con éxito para realizar estudios de caracterización, identificación y seguimiento de comunidades microbianas.

En el marco de estudio de la disminución de la perdurabilidad de los alfalfares en el sudeste de la Provincia de Buenos Aires, se hipotetizó que las cepas introducidas no persistían luego del primer año de su inoculación y en consecuencia, los rizobios introducidos no contribuirían a lograr una nodulación adecuada y eficiente para el cultivo de alfalfa a través del tiempo. Los objetivos del presente trabajo fueron: 1) determinar en el suelo la persistencia de cepas de *Sinorhizobium meliloti* introducidas por la inoculación de semillas de alfalfa a través del tiempo; 2) determinar la magnitud de las poblaciones de *S. meliloti* a distintas profundidades del suelo con el fin de inferir la posible competencia de estas poblaciones

**Tabla 1.** Estimación del NMP de *S. meliloti* y características del suelo de los siete sitios estudiados.**Table 1.** MPN of *S. meliloti* and soil characteristics of each sampling site

Sitio	Año Implantación de alfalfa	Plantas de <i>M. sativa</i> durante el muestreo	Prof. (cm)	pH (1:2,5)	Fósforo (ppm)	Calcio (cmol/kg)	NMP / g suelo
1	1994	Escasas	0-30	5,5	16,3	13,2	ND
			30-50	5,6	9,5	13,4	ND
			50-70	5,9	6,8	9,8	107
2	1991	Ausentes	0-30	6,4	3,5	14,4	147
			30-50	6,2	2,8	10,6	80
			50-70	6,5	9,2	15,5	ND
3	1997	Abundantes	0-30	6,8	20,4	8	292
			30-50	7,2	10,2	21,3	71
			50-70	7,5	10,6	19,8	670
4	1991	Ausentes	0-30	6,5	29,6	14,9	ND
			30-50	6,8	12,3	11,4	ND
			50-70	7,5	19,2	11,5	14
5	Campo natural	Ausentes	0-30	6	8,2	15,8	ND
			30-50	6,2	3,1	8,4	ND
			50-70	6,7	3,8	16,4	ND
6	Campo natural	Ausentes	0-30	7,6	9,5	39,5	93
			30-50	7,7	3,8	45,5	104
			50-70	7,7	3	47,9	8819
7	Rotación de cultivos con pastura	Ausentes (abundante presencia de <i>M. lupulina</i> )	0-30	6,9	27,3	22,4	3556
			30-50	6,9	11,8	13,6	ND
			50-70	7,3	4,7	25,6	57

ND: no detectado por la técnica NMP.

naturalizadas con las cepas introducidas.

## MATERIALES Y METODOS

El estudio se realizó en la Unidad Integrada EEA INTA Balcarce-Facultad de Ciencias Agrarias-UNMdP, Provincia de Buenos Aires (37° 45' S y 58° 18' O). Allí se seleccionaron siete sitios (Tabla 1): cuatro sembrados con alfalfa (*Medicago sativa*) inoculada; dos no cultivados (campo natural) que fueron considerados como controles y uno con rotación de cultivo con pastura. El suelo analizado fue un Argiudol Típico con un horizonte A de textura franca y con horizontes subsuperficiales (B y C) de textura franco-arcillosa. El contenido de materia orgánica del horizonte A fue de 6,3% y de los horizontes B y C de 4,2% y 2,52% respectivamente. Los inoculantes utilizados en la inoculación de la alfalfa fueron elaborados en el Laboratorio de la Unidad Integrada de Balcarce con una de las siguientes cepas: B58, B399 y B401 provistas por el IMIZA del INTA Castelar. Los muestreos fueron realizados en el ciclo estival 1999.

De cada uno de los siete sitios seleccionados y a las profundidades de 0-30 cm, 30-50 cm y 50-70 cm se tomaron 5 muestras de suelo, constituyendo una muestra compuesta. De cada una de las muestras compuestas, se determinó el tamaño de las poblaciones de *S. meliloti* a través de la técnica del número más probable (NMP) por infección en plantas (Brockwell 1980); el pH del suelo en agua

(1:2,5); fósforo disponible (Bray 1) y calcio (cmol/kg) (Tabla1).

Se extrajeron todos los nódulos de las plantas utilizadas en la estimación del NMP de *S. meliloti*. Estos fueron tratados en superficie durante 1 minuto con alcohol 70°; durante 3 minutos con hipoclorito al 3 % (55g Cl<sup>1</sup>) y lavados con agua destilada estéril 6 veces. Posteriormente cada nódulo fue machacado con una varilla de vidrio. El aislamiento y la purificación se realizó en agar extracto de levadura-manitol-rojo congo (Vincent 1970). Cuando los nódulos fueron de tamaño muy pequeño (menor a 1 mm) se realizó el aislamiento mediante una punción del mismo con una aguja de jeringa hipodérmica.

Con el objeto de verificar si los aislamientos obtenidos a partir de los nódulos pertenecían a la especie *S. meliloti*, se inocularon por cuadruplicado en plántulas de alfalfa creciendo en medio de cultivo Jensen (Vincent 1970) e incubados en cámara de cultivo con luz artificial a 21°C durante 5 semanas. Se registró la presencia de nódulos y la coloración de los mismos como indicador de efectividad. Posteriormente los aislamientos se repicaron en los medios TY (Beringer 1974) y LB (Luria Bertani) (Miller 1971) y fueron incubados a 37°C y 28°C respectivamente durante 48 h, registrándose posteriormente la aparición de colonias. La presencia de colonias en ambos medios y en ambas temperaturas permitió identificar los

aislamientos como *S. meliloti*. Paralelamente, los aislamientos fueron repicados en medio levadura manitol con rojo congo y se realizó la caracterización morfológica de las colonias, utilizando como patrones de referencia las cepas de *S. meliloti* empleadas en la inoculación de las semillas de alfalfa.

Los aislamientos se cultivaron en medio TY líquido y se incubaron durante 48 h a 28°C con agitación (180 rpm). La extracción de ADN total se realizó por la técnica de la resina (Aguilar *et al.* 2001). A partir de cada cultivo en medio líquido, se tomaron 500 µl y se centrifugaron durante 4 min a 21000 g. Los sedimentos obtenidos se lavaron con 300 µl de agua bidestilada estéril y se resuspendieron en 150 µl de una suspensión acuosa de resina (6% p/v) en agitación (Chelex 100, BIO-RAD). Las suspensiones fueron incubadas durante 20 min a 56°C y posteriormente durante 8 min a 99°C. La conservación de las mismas se realizó a -20°C.

Con el objeto de identificar los aislamientos, se estudió la presencia de secuencias génicas específicas de *S. meliloti*. Todas las amplificaciones se realizaron por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tubos capilares en un termociclador Idaho 1605. Los componentes de las mezclas de reacción para las amplificaciones fueron expresados en concentración final: sero albumina bovina (BSA) (500 µg/ml), buffer Tris HCl (pH 8.3) (50 mM), MgCl<sub>2</sub> (3 mM), deoxirribonucleósidos (DNTPs) (200 µM), primers (0.5 µM), enzima *Taq* polimerasa (Promega) (1U por reacción). Luego de la reacción, 10 µl de cada producto fue separado por electroforesis en gel de agarosa (Sigma) al 0,8 % (p/v) conteniendo 1 µg ml<sup>-1</sup> de bromuro de etidio (Bret). La observación de bandas amplificadas y la fotografía de las mismas se realizó bajo luz ultravioleta utilizando una cámara Polaroid tipo 667 film. Se realizaron las siguientes amplificaciones: a)-amplificación de la secuencia *nodA* (Edelhoff, Long 1985), característica de todas las especies del género *Rhizobium*. Se utilizaron los primers *nodA1* y *nodA2* y 3.0 µl del ADN del aislamiento. El programa de amplificación fue: 94°C, 1 min - 35 ciclos de 94°C, 15 seg; 50°C, 10 seg; 72°C, 25 seg; finalizando con 72°C, 30 seg; b)-amplificación de la secuencia *nodH* (Horvath *et al.* 1986) específica de la especie *S. meliloti*. Se utilizaron los primers *NodH Rsp-s* y *NodH Rsp-f* y 10 µl del DNA del aislamiento. El programa de amplificación fue: 94°C, 15 seg; - 35 ciclos de 94°C, 10 seg; 55°C, 10 seg; y 72°C, 30 seg; finalizando con 72°C, 30 seg y c)-se determinó la presencia de la secuencia *nifH* (Eardly *et al.* 1985) que identifica cepas ácido tolerantes en aquellos aislamientos que no desarrollaron en los medios TY y LB. Para la amplificación de la secuencia *nifH* se utilizaron los iniciadores NIFH $\alpha$  y NIFH $\beta$ 2. Los componentes de la mezcla de reacción y condiciones de los ciclos fueron descriptos por Del

Papa *et al.* (1999).

Con el objeto de identificar cepas introducidas por la inoculación de semillas, se realizó la amplificación por fingerprinting del ADN total de cada aislamiento obtenido de los sitios inoculados (1, 2 y 3) y de las cepas de referencia. De cada aislamiento y de las cepas de referencia cultivados en medio TY, se tomó un volumen de 500 µl en fase exponencial (0,4 de DO260 nm).

Los componentes utilizados en las mezclas de reacción de la PCR fueron descriptos anteriormente. Se utilizaron los primers BOXA1 (Versalovic *et al.* 1994) y la combinación de ERIC1-ERIC2 (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus, de 124-127 pb, Versalovic *et al.* 1991), de concentración final: 10 µM. En el primer caso se utilizó 3 µl del primer y 6.3 µl del como DNA molde de cada aislamiento. El programa de amplificación fue: 94° C, 2 min; - 35 ciclos de 94°C, 10 seg; 52°C, 60 seg y 65°C, 8 min, finalizando con 65°C, 16 seg. En el segundo caso se utilizaron 1.25 µl del primer ERIC1, 2,5 µl del primer ERIC2 y 6.0 µl del DNA del aislamiento. El programa de amplificación fue: 94° C, 2 min; 35 ciclos de 94°C, 10 seg; 50°C, 60 seg y 65°C, 8 min, finalizando con 65°C, 16 seg. Luego de cada una de las reacciones 10 µl de cada producto fue separado en geles de agarosa (Sigma) al 1,5% conteniendo 1 µg ml<sup>-1</sup> de bromuro de etidio.

## RESULTADOS Y DISCUSION

El NMP de *S. meliloti* obtenidos en los perfiles de suelo de los siete sitios estudiados se presentan en la Tabla 1. En 6 de los 7 sitios estudiados se observaron poblaciones de *S. meliloti*. Se detectaron valores de *S. meliloti* a lo largo de todo el perfil solamente en el sitio 3 donde se encontraba presente un cultivo de alfalfa. En los sitios 1 y 4 no se detectaron poblaciones entre los 0 y 50 cm de profundidad. En el sitio 5 no fueron detectadas poblaciones de rizobios por la técnica del NMP. En este sitio no fue observada la presencia de plantas del género *Medicago*. Recuentos de *S. meliloti* del orden de 10<sup>3</sup> fueron estimados en los sitios 6 y 7 (suelo no cultivado y en rotación con pastura). En el caso del sitio 7 los valores de las poblaciones de rizobios detectados en este suelo sin historia de cultivo de alfalfa fue atribuido a la presencia de abundantes plantas de *M. lupulina* de aparición espontánea, coincidiendo con lo observado por Bromfield *et al.* (1986).

Se obtuvieron un total de cuarenta y dos aislamientos de los sitios 1, 2, 3, 6 y 7. Las plantas del sitio 4 presentaron nódulos con

**Tabla 2.** Características de los 42 aislamientos obtenidos, utilizando técnicas de microbiología convencional y moleculares.

**Table 2.** Isolates characteristics obtained with conventional and molecular techniques

Sitio	Aislamientos obtenidos	Aislamientos que presentaron nódulos	Crecimiento positivo en TY y LB	Colonias		Secuencia <i>nodA</i>	Secuencia <i>nodH</i>	Secuencia <i>nifH</i>
		de color rosa		(1)	(2)			
1	2	1	2	-	2	2	2	-
2	2	0	1	-	2	2	2	1
3	14	6	14	8	-	14	14	-
6	5	0	5	-	5	5	5	-
7	19	12	18	5	14	19	19	-

(1) con borde definido y superficie opaca; (2) sin borde definido y con aspecto mucoso.

tamaño muy pequeño, de aspecto ineficiente de los que no fue posible obtener aislamientos. Este sitio fue inoculado con las cepas de referencia 9 años antes de ser efectuado el muestreo, por lo que podríamos inferir que las poblaciones introducidas fueron desplazadas por las naturalizadas coincidiendo con lo observado por Thies *et al.* (1991) quienes determinaron que en ausencia del hospedante poblaciones  $10^2$ .g de suelo seco de rizobios naturalizados pueden interferir en la nodulación y persistencia de las cepas introducidas.

Los 42 aislamientos obtenidos nodularon plántulas de alfalfa creciendo en medio artificial carente de nitrógeno, confirmando su identificación como *S. meliloti* (Tabla 2). Cuarenta de ellos desarrollaron colonias en los medios TY y LB, y todos los aislamientos presentaron la secuencia génica de nodulación *nodA* que identifica el género *Sinorhizobium* y *nodH* que identifica la especie *S. meliloti*.

El aislamiento 713 (sitio 7) desarrolló colonias solamente en el medio TY (fue negativo en LB) pero la caracterización genética permitió identificarlo como *S. meliloti*. El aislamiento obtenido del horizonte superficial del sitio 2 identificado como 22, formó nódulos de color blanco en plántulas de *M. sativa* y no desarrolló colonias en los medios TY y LB. Este aislamiento presentó las secuencias *nodA* y *nodH* además la secuencia génica *nifH*. Esta última secuencia permitió su identificación como *Rhizobium* sp. Or 191 (Eardly *et al.* 1992). La cepa *Rhizobium* sp. Or 191 está descripta como ineficiente para la fijación de nitrógeno y fue identificada en suelos de Argentina y Uruguay (Del Papa *et al.* 1999). Esta cepa en suelo ácido es altamente competitiva con *S. meliloti*.

La comparación de los patrones genéticos por fingerprinting de ADN total (Niemann *et al.* 1997; Hartmann *et al.* 1998) de los aislamientos de *S. meliloti* obtenidos de los sitios inoculados con las cepas de referencia B58, B399 y B401 permitió obtener información sobre la persistencia de las cepas introducidas. De los 18 aislamientos obtenidos en los sitios inoculados, nueve presentaron un patrón de bandas similar a la cepa de referencia B401. Estos aislamientos que presentaron mayoritariamente nódulos de color rosa correspondieron al sitio 3, donde la cepa había sido introducida 3 años antes y se encontraba presente el cultivo de alfalfa al momento del muestreo. En este sitio el 70 % de los aislamientos obtenidos correspondieron a la cepa introducida (Tabla 3). Con respecto a su ubicación en el perfil (Tabla 3) se observó que la cepa pudo recuperarse en profundidad, confirmando las determinaciones realizadas por Madsen y Alexander (1982) quienes encontraron que *Rhizobium* se moviliza en el suelo por percolación de agua a través de los canales creados por las raíces de las plantas. El resto de los aislamientos presentaron patrones de bandas disímiles a las 3 cepas de referencia utilizadas, pudiendo observarse la existencia de un alto grado de polimorfismo entre las mismas. La no detección de cepas introducidas en los sitios 1, 2 y 4 confirmó lo expresado por Dowling y Broughton (1986), quienes indicaron que en ausencia de su hospedante las cepas introducidas tienen menor posibilidad de sobrevivir frente a las poblaciones naturales. Otros autores indicaron que las cepas introducidas producen un número importante de nódulos en el primer año y luego disminuyen para ser reemplazadas por poblaciones naturales (Gaur, Lowther 1982;

**Tabla 3.** Aislamientos de *S. meliloti* obtenidos en los sitios inoculados y su ubicación en el perfil del suelo.  
**Table 3.** *S. meliloti* isolates from inoculated sites and their placement within the soil profile.

Sitio	Aislamiento	Profundidad en el perfil (cm)	Coloración de los nódulos	Patrón de bandas similar a cepa de referencia
Inoculado				
1	11	50-70	blanco	NO
(año 1991)	12	50-70	rosa	NO
2	21	30-50	blanco	NO
(año 1994)	22	0-30	blanco	NO
3	31	0-30	blanco	NO
	32	0-30	rosa	SI
(año 1997)	33	0-30	rosa	SI
	34	0-30	rosa	SI
	35	30-50	rosa	SI
	37	30-50	blanco	NO
	38	30-50	blanco	SI
	39	50-70	rosa	SI
	311	50-70	blanco	SI
	312	50-70	blanco	NO
	313	50-70	blanco	NO
	314	50-70	blanco	NO
	315	50-70	blanco	SI
	316	50-70	rosa	SI

Jenkins, Bottomley 1985).

Los aislamientos cuyos patrones genéticos de bandas fueron similares a los de la cepa patrón B401 presentaron también las mismas características macroscópicas cuando fueron cultivados en medio levadura-manitol con rojo congo. Se observó un crecimiento definido, opaco y no gomoso. En cambio, aquellos aislamientos cuyos patrones de bandas diferían completamente de las cepas de referencia, presentaron un crecimiento traslúcido, lluvioso en apariencia y acompañado por una gran formación de goma, descripción que coincide con la efectuada por Bromfield *et al.* (1986) para aislamientos nativos de *S. meliloti*. Esta última descripción del crecimiento de los aislamientos en medios de cultivo coincidió con la realizada en todos los aislamientos obtenidos de los sitios no inoculados (6 y 7).

A partir de los datos obtenidos en este estudio se pudo conocer la persistencia y la ubicación en el perfil de cepas introducidas en un suelo de Balcarce. El sitio donde se recuperó una de las cepas de referencia se encontraba cultivado con alfalfa al momento del muestreo.

Luego de 6 años de introducidas las cepas de referencia y en ausencia de su hospedante, no fue posible encontrar con la técnica utilizada, aislamientos homólogos a las cepas inoculadas. La utilización de técnicas de Microbiología convencional para la identificación de aislamientos de *S. meliloti*, tuvo una alta coincidencia con las determinadas por las técnicas de biología molecular. Sin embargo, es necesario destacar que las técnicas moleculares fueron las que permitieron identificar las cepas introducidas mediante la inoculación, así como la presencia de cepas ácido tolerantes que nodulan *M. sativa*.

#### AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Lagares, IBBM-Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP donde se realizaron los estudios de caracterización de los aislamientos de *S. meliloti* por protocolos moleculares y especialmente a la Lic. Balague por el asesoramiento brindado en las técnicas moleculares utilizadas. Al Dr. Laich, Facultad de Ciencias Agrarias-UNMdP, por sus aportes en la temática biomolecular.

## REFERENCIAS

- Aguilar MO, López VM, Riccillo PM. 2001. The diversity of rhizobia nodulating beans in North-west Argentina as a source of more efficient inoculant strains. *J Biotechnol*, 91: 181-188.
- Beringer J. 1974. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol*, 84: 188-189.
- Brockwell J. 1980. *In: Methods for evaluating Biological Nitrogen Fixation*. Ed. FJ Bergersen. Section III. Chap. I Wiley & Sons. New York, Brisbane, Toronto.
- Bromfield ESP, Sinha IB, Wolynetz MS. 1986. Influence of location, host cultivar and inoculation on the composition of naturalized population of *Rhizobium meliloti* in *Medicago sativa* nodules. *Appl Environ Microbiol*, 51: 1077-1084.
- Broughton WJ, Heycke N, Priefer U, Schneider GM, Stanley J. 1987. Ecological genetics of *Rhizobium meliloti*: diversity and competitive dominance. *FEMS Microbiology Letters*, 40:245-249.
- DE Bruijn FJ. 1992. Use of repetitive (Repetitive Extragenic Palindromic and Enterobacterial Repetitive Intergeneric Consensus) Sequences and the Polymerase Chain Reaction to Fingerprinting the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 58: 2180-2187.
- Del Papa MF, Balague LJ, Castro Sowinski S, Wegener C, Segundo E, Martínez Abarca F, Toro N, Niehaus K, Puhler A, Aguilar OM, Martínez Drets G, Lagares A. 1999. Isolation and characterization of alfalfa-nodulating Rhizobia present in acidic soils of Central Argentina and Uruguay. *Appl Environ Microbiol*, 65:1420-1427.
- Dowling DN, Broughton WJ. 1986. Competition for nodulation of legumes. *Ann Rev Microbiol*, 40:131-157.
- Eardly BD, Young JPW, Selander RK. 1992. Phylogenetic Position of *Rhizobium* sp. Strain Or191, a Symbiont of Both *Medicago sativa* and *Phaseolus vulgaris*. Based on Partial Sequences of the 16S rRNA and *nifH* Genes. *Appl Environ Microbiol*, 58:1809-1815.
- Edelhoff TT, Long SR. 1985. *Rhizobium meliloti* nodulation genes: identification of *nodDABC* gene products purification of *nodA* protein and expression of *nodA* in *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol*, 164: 591-599.
- Gaur YD, Lowther WL. 1982. Competitiveness and persistence of introduced rhizobia on oversown clover: influence of strain, inoculation rate and lime pelleting. *Soil Biol Biochem*, 14: 99-102.
- Hartmann A, Giraud JJ, Catroux G. 1998. Genotypic diversity of *Sinorhizobium* (formerly *Rhizobium meliloti*) strains isolated directly from a soil and from nodules of alfalfa (*Medicago sativa*) grown in the same soil. *FEMS Microbiol Ecol*, 25:107-116.
- Horvath B, Kondorosi E, John M, Schmidt J, Torok I. 1986. Organization, structure and symbiotic function of *Rhizobium meliloti* nodulation genes determining host specificity for alfalfa. *Cell*, 46: 335-343.
- Jenkins MB, Bottomley PJ. 1985. Evidence for a strain of *Rhizobium meliloti* dominating the nodules of alfalfa. *Soil Sci Soc Am J*, 49:326-328.
- Madsen EL, Alexander M. 1982. Transport of *Rhizobium meliloti* and *Pseudomonas* through soil. *Soil Sci Soc Am J*, 47: 557-600.
- Miller JH. 1971. *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Niemann S, Puhler H, Tichy V, Simon R, Selbitschka W. 1997. Evaluation of the resolving power of three different DNA fingerprinting methods to discriminate among isolates of a natural *Rhizobium meliloti* population. *J Appl Microbiol*, 82:477-484.
- Rice WA, Olsen PE. 1992. Effects of inoculation method and size of *Rhizobium meliloti* population in the soil on nodulation of alfalfa. *Can J Soil Sci*, 72:57-67.
- Thies JE, Singleton PW, Ben Bohlool B. 1991. Influence of the size of Indigenous Rhizobial Population on establishment and symbiotic performance of introduced Rhizobia on field-grown legumes. *Appl Environ Microbiol*, 57: 19-28.
- Triplet EW, Sadowsky MJ. 1992. Genetics of competition for nodulation of legumes. *Ann Rev Microbiol*, 46: 399-428.
- Versalovic J, Koeuth T, Lupski J S. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res*, 24: 6823-6831.
- Versalovic J, Scheneider M, De Bruijn FJ, Lupski JR. 1994. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, 5: 24-40.
- Vincent JM. 1970. *A Manual for Practical Study of root nodule bacteria*. IBP Hand book 15. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 164 pp.