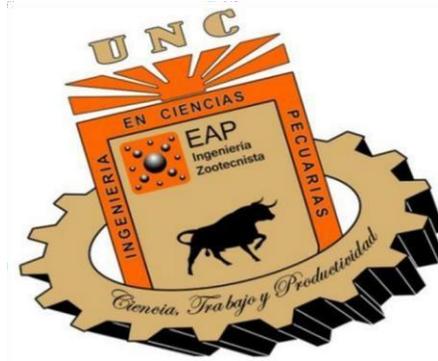


UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS PECUARIAS
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA
ZOOTECNISTA



TESIS

**EVALUACIÓN DE LA NODULACIÓN EN EL CULTIVO DE
ALFALFA (*Medicago sativa L.*) EN CONDICIONES
EDAFOCLIMÁTICAS LIMITANTES, AL OESTE DEL
DEPARTAMENTO ATAMISQUI, SANTIAGO DEL ESTERO
(ARGENTINA)**

Para optar el Título Profesional de
INGENIERO ZOOTECNISTA

PRESENTADA POR EL BACHILLER:
NILSER YOSBANY TERRONES VARGAS

ASESORA:
Ing. Agr. M.Sc. Celia Carlota González

CAJAMARCA – PERÚ

2019



Trabajo final de intensificación para acceder al título de
Ingeniero Zootecnista

**EVALUACIÓN DE LA NODULACIÓN EN EL CULTIVO DE
ALFALFA (*Medicago sativa* L.) EN CONDICIONES
EDAFOCLIMÁTICAS LIMITANTES, AL OESTE DEL
DEPARTAMENTO ATAMISQUI, SANTIAGO DEL ESTERO
(ARGENTINA)**



Estudiante:

Nilser Yosbany Terrones Vargas

Directora:

Ing. Agr. M.Sc. Celia C. González

Santiago del Estero, Argentina
Diciembre - 2019

"2019 – Año de la Exportación"

ACTA TRABAJO FINAL

----- En el Aula 7 de la Facultad de Agronomía y Agroindustrias de la Universidad Nacional de Santiago del Estero, sita en la ciudad de Santiago del Estero, Argentina, a los nueve días del mes de diciembre de dos mil diecinueve, se reúne el Tribunal de Seguimiento y Evaluación integrado por: **MSc. Ing. Agr. Fernando Galizzi, Ing. Agr. Ariel Suárez e Ing. Agr. Soledad Barrio**, designados mediante Resolución FAA N° 690/2019, para evaluar el Trabajo Final presentado por el **Sr. Nilser Yosbany TERRONES VARGAS, DNI N° 73349942, Pasaporte: 118627281**, alumno Becario del Programa de Intercambio y Movilidad Académica (PIMA) proveniente de la Universidad Nacional de Cajamarca – Perú, y Titulado: **"Evaluación de la nodulación en el cultivo de alfalfa (*Medicago sativa* L.) en condiciones edafoclimáticas limitantes, al oeste del Departamento Atamisqui, Santiago del Estero (Argentina)"**, realizado bajo la dirección de la MSc. Ing. Agr. Celia González. El Jurado expresa que ha realizado la lectura del trabajo escrito y que el mismo fue efectuado con solvencia y calidad, dando muestra de un acabado conocimiento del tema.-----

----- En consecuencia resuelve aprobar dicho Trabajo Final, otorgándole la calificación de muy bueno-----

MSc. Ing. Agr. **Fernando Ángel Galizzi**

Ing. Agr. **Ariel Suárez**

Ing. Agr. **Soledad Barrio**

----- A los fines académicos que pudieran corresponder se expide la presente a los nueve días del mes de diciembre del año dos mil diecinueve.-----

CERTIFICADO DE ESTUDIOS

----- La autoridad que suscribe **CERTIFICA** que el **Sr. Nilser Yosbany TERRONES VARGAS, DNI N° 73349942, Pasaporte 118627281**, alumno Becario del Programa de Intercambio y Movilidad Académica (PIMA), por Resolución FAA N° 529/2019, ha aprobado el trabajo final titulado: **Evaluación de la nodulación en el cultivo de alfalfa (*Medicago sativa* L.) en condiciones edafoclimáticas limitantes, al oeste del Departamento Atamisqui, Santiago del Estero (Argentina)"**, realizado bajo la dirección de la MSc. Ing. Agr. Celia González; recibiendo la calificación muy bueno-----, según el Acta correspondiente.-----

Ing. Agr. **Luis E. Luque**
Secretario Académico
FAYA - UNSE



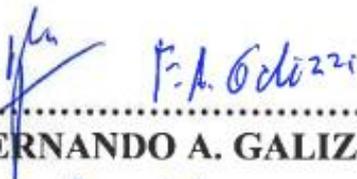
Lopez Abogoray, M.S.
A cargo de Decanato
Res. FAA N° 970/19

CERTIFICO que es copia fiel del original que tengo a la vista
Santiago del Estero 17/12/19
FAYA - UNSE
Departamento Académico
Galizzi Corneal

**EVALUACIÓN DE LA NODULACIÓN EN EL CULTIVO
DE ALFALFA (*Medicago sativa* L.) EN CONDICIONES
EDAFOCLIMÁTICAS LIMITANTES, AL OESTE DEL
DEPARTAMENTO ATAMISQUI, SANTIAGO DEL
ESTERO (ARGENTINA)**

Nilser Yosbany Terrones Vargas

Tribunal de Evaluación:


.....
Ing. Agr. FERNANDO A. GALIZZI


.....
Ing. Agr. ARIEL SUAREZ

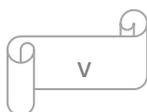

.....
Ing. Agr. SOLEDAD BARRIO

Evaluación:

Fecha de Defensa de Tesis: 09/12/2019

DEDICATORIA

- ✓ A mis Angelitos; Juana y Epifanio que siempre cuidan y guían mi camino.
- ✓ A mis padres (Luzmila y Juan Homero), hermanos (Jon Hames y Imer Edwin), gracias por su apoyo, esfuerzo, comprensión, consejos y sus enseñanzas.
- ✓ A Neli Rocío, porque siempre está conmigo en las buenas y malas, simplemente agradecido, bendecido y dichoso de compartir la vida junto a ti.
- ✓ A mis familias, Terrones Vargas y Vargas Sifuentes, en general tías(os), primos(as), sobrinos(as), gracias por su admiración, cariño, respeto y solidaridad.
- ✓ A mis amigos(as) que compartimos aulas desde colegio, en la universidad, a los amigos de barrio, a los amigos del futbol, cuantas experiencias, y pensar cuanto tiempo paso.
- ✓ A mi universidad Nacional de Cajamarca, por albergarme en toda mi formación profesional.
- ✓ A la Universidad Nacional Santiago del Estero, por acompañarme y guiarme en mi estancia para realizar mi TFG por intermedio del convenio de la Beca PIMA,
- ✓ A todos los que me desearon el bien y para los que creyeron que no lograría todo que vengo realizando hasta hoy. La vida es del color que uno quiere que fuese.



AGRADECIMIENTOS

- ✓ A Dios por darme la vida, salud y brindarme esta hermosa oportunidad de una nueva experiencia y nuevos conocimientos.
- ✓ A mis padres por su apoyo incondicional y consejos de perseverancia hacia el éxito.
- ✓ A las autoridades de la Universidad Nacional de Cajamarca y la Universidad Nacional de Santiago del estero, quienes me dieron la posibilidad de realizar mi trabajo final de grado, por el programa de intercambio y movilidad académica (PIMA).
- ✓ Al coordinador de la Beca PIMA en mi universidad de origen, Dr. Luis H. Aceijas Pajares, gracias por sus consejos y su formación profesional.
- ✓ Al Dr. Ángel F. Dávila, Ing. Alberto Tapia y Dr. Jorge Piedra, por su preocupación, su tiempo y apoyo en la realización de los trámites para la Beca PIMA.
- ✓ A la Universidad Nacional de Santiago del Estero, por abrirme las puertas y compartir sus conocimientos en su casa de formación profesional.
- ✓ En especial a la Ing. Alejandra Cenice, Ing. Fernando Galizzi y al Dr. José Luis Tiedemann, por su asesoramiento y apoyo incondicional de mi estancia en esta hermosa provincia de Santiago del Estero - Argentina.
- ✓ A mi Directora Ing. Celia González, por su tiempo, apoyo, acompañamiento, asesoramiento y comprensión en dicho trabajo de investigación.
- ✓ A los que estuvieron involucrados junto a mí en toda esta experiencia, Ing. Juana Barrientos, Ing. María C. Sánchez, Ing. Ariel Suarez, Ing. Soledad Barrio, Ing. Luis Luque, Dr. Judith Ochoa, Lic. Héctor Cáceres, etc.
- ✓ A Juan Pablo, Daniela, Héctor, Lourdes, Juampy, Tadeo, Daniel, Sergio, Nahuel F., Nahuel C., Flor, Tatiana, Micaela, Natalia y Iván. los amigos(as) de la residencia universitaria - UNSE, gracias por compartir gratos momentos en mi estancia y considerarme uno más de su sociedad.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y METODOS.....	6
2.1. Descripción del lugar de estudio.....	6
2.1.1. Localización.....	6
2.1.2. Clima.....	7
2.1.3. Vegetación natural.....	8
2.1.4. Suelo, geología y geomorfología.....	9
2.1.5. Sistema de canales Menores.....	10
2.2. Geo referenciación del lugar y puntos de muestreo.....	11
2.3. Descripción de la nodulación de alfalfa.....	12
2.3.1. Muestreo de plantas de alfalfa para determinar presencia de nódulos.....	12
2.3.2. Recolección de nódulos radiculares.....	12
2.3.3. Procesamiento de las muestras.....	13
2.3.4. Evaluación de la nodulación.....	13
2.4. Aislamientos de bacterias Nativas y/o Naturalizadas del género <i>Sinorhizobium</i>.....	13
2.4.1. Aislamiento.....	13
2.4.2. Observación de colonias de rhizobios.....	15
2.4.3. Conservación de cepas nativas del género <i>Sinorhizobium</i>	16
2.5. Muestreo de Suelo.....	16
2.6. Determinaciones de suelo, en laboratorio.....	16
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
3.1. Relevamiento de alfalfares en los sitios de muestreo.....	20
3.2. Evaluación de la nodulación.....	22
3.3. Observación de colonias de rhizobios.....	26
3.3.1. Observación macroscópica.....	26
3.3.2. Observación microscópica.....	28
3.4. Análisis de suelo.....	29
4. CONCLUSIONES.....	33
5. BIBLIOGRAFIA.....	35

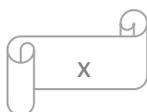
Figura	Descripción	Pág.
1	Mapa político de la provincia de Santiago del Estero, Departamento Atamisqui y la localidad Puesto de Díaz. Fuente. Google Earth.....	7
2	Distribución de la precipitación media anual (mm) para la Provincia de Santiago del Estero. Fuente. INTA – Santiago del Estero.....	8
3	Ubicación espacial de la localidad y sitios de muestreo (viñetas enumeradas). Fuente. Google Earth.....	11
4	Planta de alfalfa con suelo más la raíz (suelo rizosférico), muestreo a campo.....	12
5	Medio de cultivo (ALM), preparado para su posterior esterilización.....	15
6	Muestras de suelo secado al aire de los seis sitios de la localidad Puesto de Díaz, Depto. Atamisqui, Santiago del Estero (Argentina) a tres profundidades: a) 0-30 cm, b) 30-60 cm, c) 60-90 cm.....	17
7	Foto mostrando nódulos arracimados en la raíz de la alfalfa, Lote del sitio 3. [Localidad Puesto de Díaz, Departamento Atamisqui].....	24
8	Foto mostrando nódulos en forma de dedos en la raíz de la alfalfa. Lote del sitio 6. [Localidad Puesto de Díaz, Departamento Atamisqui].....	25
9	Foto mostrando nódulos ubicados en raíz principal de la alfalfa. Lote del sitio 1. [Localidad Puesto de Díaz, Departamento Atamisqui].....	25
10	Cajas de Petri con cultivo de <i>Sinorhizobium</i> . Se muestran colonias traslucidas mucosas, del Sitio 6.....	28
11	Bacteroides de <i>Sinorhizobium</i> del nódulo de la alfalfa.....	28
12	Preparado microscópico de bacterias aisladas de nódulos de la alfalfa.....	29

Tabla	Descripción	Pág.
1	Coordenadas Geográficas, de los cercos de la alfalfa.....	11
2	Medio de cultivo ALM (Agar – Levadura – Manitol).....	14
3	Relevamiento de lotes de alfalfa, ubicados en la localidad Puesto de Díaz, Departamento Atamisqui, en seis sitios muestreados.....	21
4	Evaluación de la nodulación en cultivos de alfalfa de seis sitios, ubicados en la localidad Puesto de Díaz, Departamento Atamisqui. Profundidad de 0-30 cm.....	23
5	Descripción de las características morfológicas de colonias de rizobios de cuatro aislados en sitios diferentes. [Localidad Puesto de Díaz, Departamento Atamisqui].....	27
6	Propiedades físicas y químicas de los suelos de seis sitios, en diferentes profundidades (0-30, 30-60 y 60-90 cm).....	30
7	Materia orgánica y respiración edáfica en los diferentes sitios a la profundidad de 0-30 cm.....	31

RESUMEN

Se obtuvo información básica en relación a la asociación simbiótica entre bacterias fijadoras de Nitrógeno del género *Sinorhizobium* y el cultivo alfalfa (*Medicago sativa* L.). En esta línea de investigación los objetivos fueron: observar nodulación por poblaciones nativas y/o naturalizadas de rizobios, evaluar si son nódulos funcionales para la planta de alfalfa, aislar cepas locales adaptadas a estas condiciones edafoclimáticas desfavorables. El área de estudio se ubicó en localidad Puesto de Díaz, al Oeste del Departamento Atamisqui, provincia de Santiago del Estero (Argentina), en la misma se localizaron y relevaron seis sitios con alfalfa mediante una encuesta realizada a campo y posterior localización mediante los satélites (Google Earth). Se evaluó la nodulación de muestras obtenidas a una profundidad de 0-30 cm de suelo. Se realizaron aislamientos en medios BYMA de cepas provenientes de los nódulos colectados, la caracterización de cultivos, obtención y conservación de cepas puras. Las determinaciones en muestras de suelo no rizosférico y rizosférico fueron: físicas (textura, color y contenido de agua), químicas (pH, CE, COS) y biológicas (respiración edáfica). En los sitios (1, 3 y 6) estudiados, se encontraron nódulos activos, abundantes, ubicados en raíz principal y secundaria, lo que son coincidentes con las buenas condiciones de suelo: pH neutro a ligeramente básico, todos los suelos tienen sal o levemente salino, suelo húmedo, plantas de buen aspecto; estos sitios son regados. Sin embargo, en situaciones de los sitios (4 y 5), que no se pueden regar, el agua de lluvia es escasa y las altas temperaturas salinizan el suelo hasta niveles donde no germina la semilla (sitio 5) o se detiene el crecimiento de la planta (sitio 4) y en consecuencia no se pudo evaluar nodulación. El cultivo de alfalfa sembrado en el (sitio 2) proviene de un desmonte, presentó escasa nodulación y nódulos verdes, con plantas sin síntomas de deficiencia de nitrógeno, elemento que podría ser aportado por la mineralización de la materia orgánica del suelo. La materia orgánica del suelo en todos los sitios, son bajos (0,9-1,6%) pero son valores esperados en estos tipos de suelo (*Entisoles*). Se observó alta actividad biológica en todos los sitios, de las muestras del suelo de la rizosfera, mostrando mayor actividad aquellos sitios con alfalfas en buenas condiciones. Se aislaron cepas nativas y/o naturalizadas de los sitios con alfalfa, destacándose el obtenido del sitio 6, por el crecimiento muy abundante, en la producción de mucus y elevación de las colonias. Todas las cepas aisladas fueron del grupo de crecimiento rápido, aunque para asegurar que las mismas correspondan al género *Sinorhizobium* específica para alfalfa se recomienda continuar el estudio de selección de cepas nativas eficientes en estos ambientes, así como la clasificación más precisa de los aislados con el empleo de otras técnicas de la taxonomía convencional y molecular. Se concluye que, si hay nódulos funcionales en condiciones limitantes, ubicados en la raíz principal y secundaria, de color rojo, en forma de arracimados y tubulares, aislando nódulos de sitios no salinos y presentan rápido crecimiento.

Palabras claves: *Simbiosis, Sinorhizobium, semiárido, cepas nativas.*



ABSTRACT

Basic information was obtained regarding the symbiotic association between Nitrogen-fixing bacteria of the genus *Sinorhizobium* and the alfalfa crop (*Medicago sativa* L.). In this line of research, the objectives were: to observe nodulation by native and/or naturalized populations of rhizobia, to evaluate whether they are functional nodules for the alfalfa plant, to isolate local strains adapted to these unfavorable soil and climatic conditions. The study area was located in the locality Puesto de Díaz, west of the Atamisqui Department, province of Santiago del Estero (Argentina), in which six sites with alfalfa were located and surveyed through a field survey and subsequent location using satellites. (Google Earth). The nodulation of samples obtained at a depth of 0-30 cm of soil was evaluated. Isolations were made in BYMA media of strains from the collected nodules, the characterization of cultures, obtaining and conservation of pure strains. The determinations in non-rhizospheric and rhizospheric soil samples were: physical (texture, color and water content), chemical (pH, EC, COS) and biological (edaphic respiration). In the sites (1, 3 and 6) studied, abundant active nodules were found, located in the main and secondary roots, which coincide with good soil conditions: neutral to slightly basic pH, all soils have salt or slightly saline, moist soil, good-looking plants; these sites are irrigated. However, in situations of sites (4 and 5), which cannot be irrigated, rainwater is scarce and high temperatures salinize the soil to levels where the seed does not germinate (site 5) or the growth of plants stops. the plant (site 4) and consequently nodulation could not be evaluated. The alfalfa crop planted in (site 2) comes from a clearing, it presented little nodulation and green nodules, with plants without symptoms of nitrogen deficiency, an element that could be contributed by the mineralization of soil organic matter. Soil organic matter at all sites is low (0.9-1.6%) but is expected in these soil types (Entisols). High biological activity was observed in all the sites, from the soil samples of the rhizosphere, showing greater activity those sites with alfalfas in good conditions. Native and/or naturalized strains were isolated from the sites with alfalfa, standing out the one obtained from site 6, due to the very abundant growth, in the production of mucus and elevation of the colonies. All the isolated strains were from the fast-growing group, although to ensure that they correspond to the genus *Sinorhizobium*, specific for alfalfa, it is recommended to continue the study of selection of efficient native strains in these environments, as well as the more precise classification of the isolates with the use of other techniques of conventional and molecular taxonomy. It is concluded that, if there are functional nodules in limiting conditions, located in the main and secondary roots, red, clustered and tubular, isolating nodules from non-saline sites and presenting rapid growth.

Keywords: Symbiosis - *Sinorhizobium* – semi-arid - native strains

1. INTRODUCCIÓN

La alfalfa (*Medicago sativa L.*) es una importante leguminosa en la historia del mundo, siendo originaria en Asia menor y sur del Cáucaso. La llegada al nuevo mundo se produjo en el año 1519 a México. Posteriormente, por la ruta del Pacífico, fue introducida a América por los colonizadores alrededor del siglo XVI. De Perú paso a Chile y luego a Argentina, siendo la principal especie forrajera del país (Zirino, 2008).

Se la cultiva en diferentes partes del mundo por ser una especie de gran plasticidad que puede prosperar en regiones semiáridas, subhúmedas y húmedas, está morfológica y fisiológicamente adaptada para resistir deficiencias hídricas prolongadas y además está dotada de una raíz que le permite penetrar en profundidad en el perfil del suelo (Basigalup y Rossanigo, 2007). Sin embargo, no desarrolla bien en suelos de textura fina y tampoco le son favorables los salinos que poseen conductividades eléctricas superiores a los 8 dS/m, que reducen la producción (Duarte, 2002).

En la Argentina se cultivan más de 6 millones de hectáreas siendo el área núcleo la región pampeana donde se hace alfalfa en condiciones de secano (sin riego) dado por la buena calidad de los suelos y las condiciones climáticas favorables con precipitaciones superiores a los 700 mm anuales, permitiendo buena producción de alfalfa en mejores condiciones, con un rendimiento entre 8 y 22 Tn MS ha⁻¹ año⁻¹, dependiendo de la disponibilidad hídrica del ciclo agrícola (Basigalup, 2007).

La provincia de Santiago del Estero mantiene una gran superficie de alfalfa. La misma se localiza tanto en zonas de riego como en secano, con diferentes destinos como son la producción de fardos, semillas y pastoreo directo. Es un cultivo tradicional que se cultiva a diferentes escalas de producción: medianos y pequeños productores, en menor cantidad son las grandes superficies sembradas. La principal zona productora es la zona de riego (Río Dulce y Río Salado) siendo menor la participación de la zona donde se

desarrolla sin riego y con fuertes limitaciones edafo-climáticas (salinidad, sequedad y altas temperaturas), como es en el Departamento Atamisqui (Ochoa, 2002).

La alfalfa (*Medicago sativa L.*) es una forrajera perenne, pertenece a la familia de las Leguminosas y en consecuencia tiene la capacidad de formar nódulos con bacterias del genero *Sinorhizobium* y a través de ellos fijar nitrógeno atmosférico. En un proceso de simbiosis mutualista, ambos organismos (Leguminosa - bacteria), se benefician: la planta debe facilitar elementos azucarados a las bacterias para ayudar a transformar nitrógeno atmosférico (N₂) en amonio, es decir en una forma de N asimilable que es transportado rápidamente por los sistemas de conducción al resto de la planta.

Sinorhizobium meliloti es una bacteria Gram negativa, capaz de habitar en el suelo bajo una forma de vida libre saprofítica, establecer una relación simbiótica con plantas leguminosas de los géneros *Medicago*, *Melilotus* y *Trigonella*. Sin duda, la relevancia que posee el estudio de la bacteria *S. meliloti* está fundada en su capacidad para establecer interacciones simbióticas con leguminosas y llevar a cabo la fijación biológica de nitrógeno (Turati, 2009).

La inoculación de plantas de alfalfa con *Sinorhizobium*, es una de las formas eficaces de introducir cepas efectivas, pero para que sea una práctica útil, es necesario optimizar la eficiencia en la fijación del nitrógeno. Una de las mejores opciones es el aislamiento y selección de cepas naturalizadas de las zonas agroecológicas donde se cultiva alfalfa (Peticari, 2006). La eficiencia de la fijación depende tanto del hospedante como de la cepa de *Sinorhizobium* asociada. Los factores que influyen en la simbiosis son numerosos, entre ellos están pH, salinidad del suelo, temperatura, humedad, oligoelementos, nitrógeno en el suelo, carencia de fósforo y otros que inciden en el metabolismo de la leguminosa (Rotondaro, 2006).

Las cepas más eficientes son aquellas que tienen mayor cantidad de nódulos grandes y medianos, arracimados y/o palmados siendo de color rojo en su interior (debido a la presencia de la leghemoglobina), se ubican en la raíz primaria, diferenciada por una mayor producción de materia seca y de peso total de N. En cambio, las cepas menos eficientes tienen nódulos más pequeños, ubicados en raíces secundarias y tienden a paralizar la fijación biológica del nitrógeno (FBN) en etapas más tempranas presentando en esos casos nódulos de coloración verde. Los biotipos ineficientes tienen nódulos pequeños y son blancos en su interior desde etapas muy tempranas. Estos no realizan la FBN y son consideradas cepas parásitas (Puente *et al.*, 2011).

Es muy importante que exista la asociación simbiótica alfalfa-rhizobio y el mantenimiento de una apropiada cantidad y funcionalidad de nódulos a lo largo de la vida de la planta. Según Racca *et al.*, (2001), la alfalfa presenta nódulos al menos hasta 1,2 m de profundidad. En el estrato superior del perfil del suelo, su cantidad fluctúa a lo largo de los ciclos de crecimiento particularmente influenciada por la humedad edáfica y ligada a la pérdida y neoformación de raíces laterales. Aunque es necesario distinguir entre los factores que afectan directamente la fijación biológica de nitrógeno y los que tengan un efecto indirecto, que afectarían el crecimiento de la planta, que entonces está en mejores o peores condiciones para proporcionar energía o hidratos carbono a la bacteria.

La salinidad y la falta de aireación en el suelo también influyen en forma negativa sobre la simbiosis y formación de nódulos (Cornacchione, 2003). Los excesos de salinidad pueden ser por déficit de las precipitaciones, situación topográfica y condiciones edáficas desfavorables, esto provoca que no genere un desarrollo en el cultivo, por lo cual no habrá simbiosis, sin presencia de nódulos en las plantas de alfalfa (Cornacchione, 2015).

La temperatura alta también afecta las etapas de la FBN, supervivencia del rhizobio en el suelo, infección, formación de los nódulos y su funcionamiento. Las cepas de rhizobio varían en su capacidad de sobrevivir en suelos calientes, normalmente mueren por temperatura superiores a 40 ° C (Rice, 1971). Otro factor que afecta es la falta de agua que puede inhibir la infección de raíces por rhizobio, respiración del nódulo, transporte de nitrógeno desde los nódulos hasta otras partes de la planta, y disponibilidad de energía para mantener la actividad de los nódulos.

La inoculación con cepas seleccionadas en leguminosas forrajeras como es el cultivo de alfalfa, aumenta la eficiencia de la fijación biológica del nitrógeno FBN, la calidad de la producción del cultivo y en muchos casos los rendimientos y los niveles de proteína del forraje. La fijación biológica de nitrógeno (FBN) en alfalfa en la región de la pampa húmeda (Argentina) funciona adecuadamente, aportando un porcentaje muy significativo del total de nitrógeno requerido por el cultivo a lo largo de su ciclo, favoreciendo la sustentabilidad. Racca y González (2007) han comprobado que habitualmente en los suelos alfalferos de la región pampeada existen poblaciones naturalizadas de *S. meliloti* capaces de nodular las especies de otros géneros además de *Medicago* como son *Melilotus* y *Trigonella*.

La práctica de inoculación no es frecuente en Santiago del Estero, dado el supuesto de la existencia de cepas naturalizadas y/o nativas de *Sinorhizobium*. Es poco probable que se realice una evaluación de la nodulación luego de la implantación del cultivo y no ha sido investigado hace más de 100 años y por esos antecedentes sería posible encontrar nodulación natural (Ochoa, 2002) y además es importante disponer de información sobre la nodulación en alfalfares de zonas productivas adaptadas a condiciones edafoclimáticas desfavorables. Y en caso de existir nodulación, evaluar si son nódulos funcionales para la planta de alfalfa y a partir de ellos aislar cepas locales adaptadas a esta condición.

Es por ello que se planteó la siguiente **hipótesis**:

En ambientes edafoclimáticos limitantes hay cepas nativas y/o naturalizadas de *Sinorhizobium* que forman nódulos funcionales en plantas de alfalfa.

Para probar la hipótesis planteada se formularon los siguientes **objetivos**:

General

- Evaluar la nodulación de la alfalfa (*Medicago sativa*), en zonas productivas marginales en condiciones edafoclimáticas desfavorables, en la localidad Puesto de Díaz, Departamento Atamisqui, provincia de Santiago del Estero.

Específicos

- Caracterizar la presencia de nódulos de alfalfa, en laboratorio, en diferentes suelos a una sola profundidad.
- Evaluar las colonias de *Sinorhizobium*, para identificar caracteres deseables.
- Obtener cultivos puros de cepas locales adaptadas a estas condiciones edafoclimáticas adversas.
- Relacionar las características edafológicas con la nodulación de alfalfa, de acuerdo a los sitios muestreados con presencia de nódulos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente Investigación se desarrolló en el marco del proyecto de investigación aprobado y financiado por CICYT - UNSE: “*Contribución a una producción sostenible de la Alfalfa (Medicago sativa L.) mediante el manejo de la inoculación con Sinorhizobium y fertilización en la provincia de Santiago del Estero*”.

2.1. Descripción del lugar de estudio

2.1.1. Localización

El área de estudio se ubicó en la localidad Puesto de Díaz, Departamento Atamisqui, provincia de Santiago del Estero, ubicado sobre la ruta provincial 159, entre El Hoyon y San Dionisio. Aproximadamente a unos 105 km al Sur de la ciudad capital de la provincia Santiago del Estero (Fig. 1). La localidad Puesto de Díaz se encuentra al Oeste de la Dorsal (pendiente en dirección Atamisqui - Sumampa), la dorsal es un levantamiento geológico que es próximo al límite este del Departamento Atamisqui, la cual origina un sector elevado tipo lomada con suelos no salinos y con mayores pendientes tanto en dirección E-O y O – E hacia ambos lados de la dorsal.

El Departamento de Atamisqui, se encuentra ubicado en el centro sur de la Provincia de Santiago del Estero. Al norte limita con el Departamento San Martín, al oeste con el departamento Loreto, al Sur con el Departamento Ojo de Agua y al este con los Departamentos Avellaneda y Salavina. Un límite importante es el Río Dulce que separa el Departamento Atamisqui de Avellaneda. La Localidad Cabecera del Departamento es Villa Atamisqui. Otras localidades importantes de este Departamento son: Estación Atamisqui, Medellín, Chilca la Loma y El Hoyon. La superficie total del Departamento es de 2259 Km², con una población total 10.923 habitantes de los cuales 2.683 habitantes están en la zona urbana [Censo de población, 2010].



Figura 1. Mapa político de la provincia de Santiago del Estero, Departamento Atamisqui y la localidad Puesto de Díaz. Fuente. Google Earth

El mismo forma parte de la unidad fitogeográfica Gran Chaco subunidad Chaco Semiárido y se encuentra geomorfológicamente en una planicie deprimida caracterizada por su semiaridez y salinidad de sus suelos. El gradiente topográfico es suave ($<0,5\%$), y el relieve monótono es solamente alterado por desviaciones de la pendiente regional.

2.1.2. Clima

El clima es típicamente semiárido, la temperatura media anual es de $21\text{ }^{\circ}\text{C}$, máximas absolutas que superan los $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ y las mínimas los $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$. La precipitación media anual es de 450 mm , concentrada en la estación cálida, y esta abarca la menor isohieta en el Departamento Atamisqui, dentro de la provincia de Santiago del Estero (Figura 2). Se destaca la alta evapotranspiración, con un promedio de 1054 mm anuales sobrepasando en todos los meses a la precipitación por lo que el balance hídrico es negativo todo el año (Boletta, 1998).

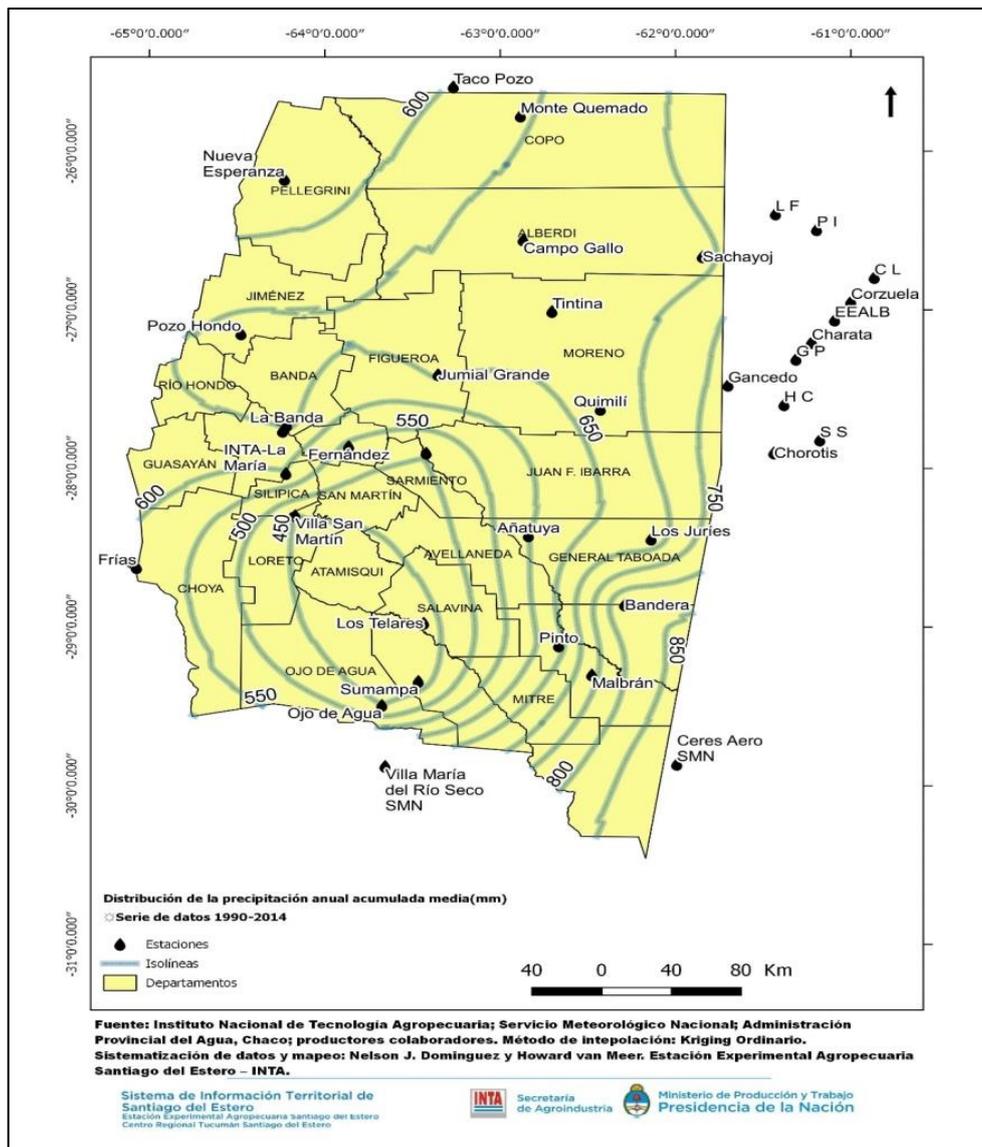


Figura 2. Distribución de la precipitación media anual (mm) para la Provincia de Santiago del Estero. Fuente. INTA – Santiago del Estero.

2.1.3. Vegetación natural

En este departamento hay dos tipos de vegetación bien contrastantes. En los ambientes salinizados hay una vegetación adaptada a este tipo de suelo es decir que predominan especies halófitas o halófilas mientras que en los sectores no salinos existió el monte chaqueño seco que predomina en esta región (Boletta *et al.*, 2006).

En la zona del Hoyon y de Puesto de Díaz, la vegetación dominante está compuesta por especies halofíticas, hay grandes áreas de suelo desnudo y costras salinas en la superficie del suelo. Las especies más representativas son:

- Algarrobo blanco de porte bajo (*Prosopis alba*)
- Algarrobo negro (*Prosopis nigra*)
- Vinal (*Prosopis ruscifolia*)
- Quebracho blanco (*Schinopsis quebracho blanco*)
- Chañar (*Geofrea decorticans*)
- Cardón (*Pachycereus pringlei*)
- Espinillo (*Acacia caven*)
- Jume negro (*Allenrolfea*)
- Jume blanco (*Suaeda*)
- Mistol (*Zizipus mistol*)
- Cachi yuyo (*Atriplex sp*)
- Quimil (*Opuntia sp*)
- Palo azul (*Cyclolepis genistoides*)
- Tusca (*Acacia aroma*)

2.1.4. Suelo, geología y geomorfología

Los suelos del Departamento son mayormente de origen aluvional es decir material depositado por el Río Dulce y el Río Ñambí. Integran la subzona en una diversidad de ambientes naturales, tales como la llanura aluvial del Río Dulce en el tramo Loreto - Villa Atamisqui y el área de bañado tramo Villa Atamisqui - Laguna Mar Chiquita; antigua llanura aluvial del Río Ñambí.

En cuanto a la geología y a la geomorfología del Departamento Atamisqui se puede destacar la dorsal (Levantamiento geológico) que se ubica en el límite Este del departamento, el cual genera un desvío del curso del Río Dulce con mayores pendientes tanto en dirección E-O y O – E hacia ambos lados de la dorsal. Al este de la dorsal se ubica la zona que corresponde a la llanura de inundación activa del Río Dulce.

Los suelos dominantes se clasifican dentro de los órdenes *Alfisoles* y *Entisoles*. Los primeros ocupan posiciones topográficas deprimidas, mal drenado e inundable que se han formado a partir de materiales acarreados por los desbordes del Río Dulce. Estos generalmente poseen horizontes A – B – C que asientan sobre capas de clases texturales diferentes. Otros *Alfisoles* han desarrollado un delgado horizonte A sobre capas de constitución litológica y granulometría variada. Ambos suelos poseen elevadas concentraciones de sales y sodio. Los *Entisoles* ocupan los sectores altos, sobre albardones y planos interfluviales. Esta condición determina que posean mejor drenaje y que la capa de agua se sitúe a mayor profundidad. Su morfología responde a una secuencia de horizontes A – C de texturas francas a franca arenosas con las sales localizadas a mayor profundidad.¹

2.1.5. Sistema de canales Menores

A fines de la década de los años 1970 se construyó el *Canal del Alto*, derivado del Río Dulce con toma libre desde la ribera derecha en las proximidades de Loreto y cuya traza corre paralela a la ruta 1, abasteciendo agua para consumo doméstico y pecuario a las localidades de estación *Atamisqui*, *Medellín*, *Chilca Juliana* y *los Telares*. El canal Del Alto junto con otros canales que derivan del Río Dulce se conoce como “*Sistema de Canales Menores*”, y son manejados por la administración provincial de Recursos Hídricos. El servicio de suministro de agua, a las poblaciones mencionadas y a los parajes rurales intermedios, a lo largo de un recorrido de conducción de más de 100 Km, es muy importante para toda esta región de los Departamentos: Loreto, Salavina y Atamisqui.

Del canal Del Alto se deriva agua por el canal *El Hoyon* que lleva agua a los (sitios) de la zona en estudio (Localidad Puesto de Díaz), pero esta agua solamente está destinada para los animales y llenado de represas.

¹ Ing. Ariel Suárez, comunicación personal

2.2. Geo referenciación del lugar y puntos de muestreo

Mediante Imágenes Satelitales de Google Earth (con fecha 21/08/2019), fueron ubicados los sitios de muestreo (Lotes de alfalfa) dentro de la localidad Puesto de Díaz y analizar la ubicación con el entorno. Los puntos de muestreo fueron marcados con GPS (Tabla 1) y posteriormente con el uso de satélites, se referenciaron con las coordenadas geográficas en el Google Earth (Figura 3).

Los datos del relevamiento del cultivo, fueron tomados con un GPS, marca Garmin, se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Coordenadas Geográficas, de los cercos de la alfalfa (*)

<i>Sitios (alfalfa)</i>	<i>Latitud (Sur)</i>	<i>Longitud (Oeste)</i>	<i>Altitud</i>
1	28° 40' 04,4''	63° 56' 50,0''	117 m
2	28° 40' 11,8''	63° 56' 29,9''	115 m
3	28° 39' 59,7''	63° 56' 34,6''	115 m
4	28° 41' 34,3''	63° 56' 00,9''	115 m
5	28° 41' 48,2''	63° 55' 32,5''	116 m
6	28° 38' 40,4''	63° 57' 11,0''	122 m

(*) Datos tomados con un GPS, marca Garmin

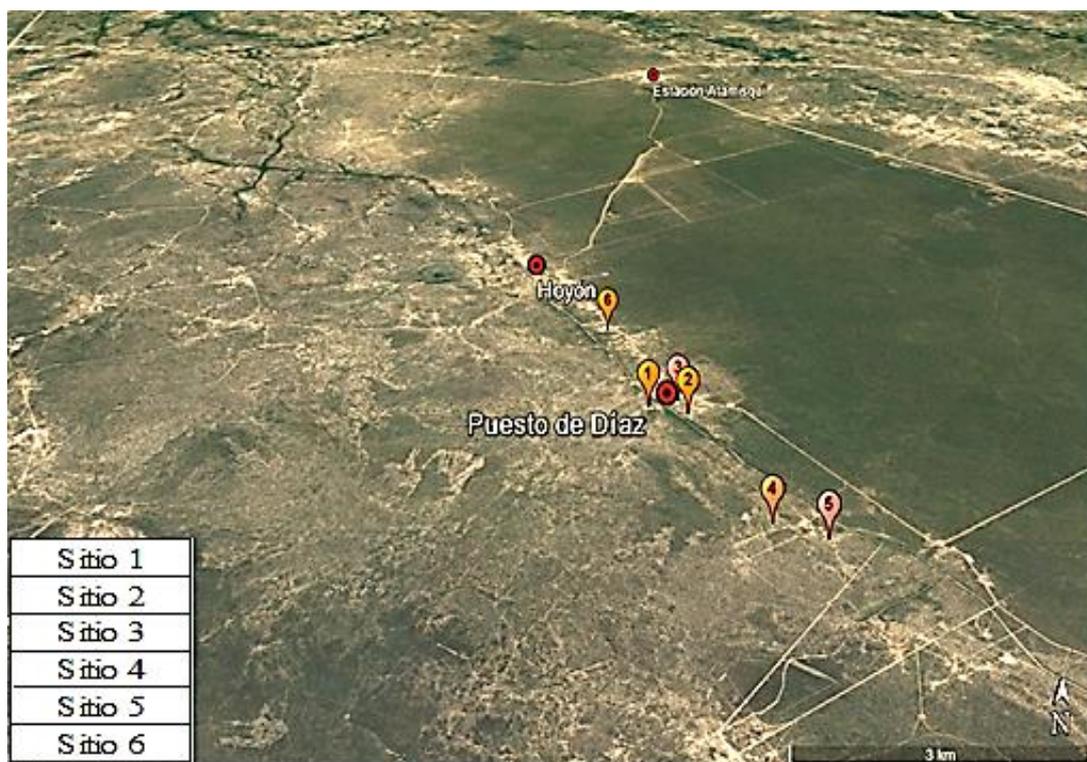


Figura 3. Ubicación espacial de la localidad y sitios de muestreo (viñetas enumeradas). Fuente: *Google Earth*

2.3. Descripción de la nodulación de alfalfa

2.3.1. Muestreo de plantas de alfalfa para determinar presencia de nódulos

Los muestreos se realizaron en época de invierno, plena estación seca (agosto), a una profundidad de 0-30 cm en cinco sitios de la localidad Puesto de Díaz.

2.3.2. Recolección de nódulos radiculares

La toma de muestras se hizo al azar con el método del cuadrado de 50 cm de lado que genera una superficie de 0,25 m². En cada uno de los sitios muestreados, se hizo un pozo de 40x40 cm y unos 30 cm de profundidad, se descalzo una planta de alfalfa con la mayor parte de las raíces junto con suelo (Figura 4). La planta de alfalfa más la raíz y el suelo (suelo rizosférico), se colocó en una bolsa, se acondicionó y rotuló según el código asignado y fue trasladada al laboratorio para su posterior procesamiento.



Figura 4. Planta de alfalfa con suelo más la raíz (suelo rizosférico), muestreo.

2.3.3. Procesamiento de las muestras

Las raíces se procesaron en primer lugar, haciendo una evaluación de la nodulación: Se estudió la presencia de nódulos infectivos en el sistema radicular tanto en raíces principales como en raíces secundarias a un nivel de profundidad (0-30 cm). Las mediciones fueron: presencia de nódulos, tamaño de nódulos, ubicación de los nódulos: raíz y nódulos infectivos y no infectivos (color).

Luego se seleccionaron los nódulos viables en base a sus características morfológicas. Los nódulos viables fueron acondicionados en frascos de vidrio con algodón y CaCl₂, y conservados en heladera hasta su posterior tratamiento.

2.3.4. Evaluación de la nodulación

Se realizó según metodología de la Guía Metodológica del CIAT (1985) y según el Manual Práctico de rizobiología (Vincent, 1975).

2.4. Aislamientos de bacterias Nativas y/o Naturalizadas del género *Sinorhizobium*

Las bacterias nativas del genero *Sinorhizobium* en asociación simbiótica con alfalfas (*Medicago sativa*). Esta etapa se realizó en el laboratorio de microbiología general del CEDIA (Sede central de la UNSE). Para la Obtención de Diazotrofos del género *Sinorhizobium* para alfalfa se siguió la Guía Metodológica del CIAT (1985) y según el Manual Práctico de rizobiología (Vincent, 1975).

2.4.1. Aislamiento

Se realizaron los aislamientos de *Sinorhizobium meliloti* provenientes de los nódulos colectados en el muestreo a campo. Preparación de medios de cultivos - Fraccionarlos y acondicionarlos para esterilizar en autoclave. Siembra en medio sólido BYMA en cajas de Petri con el fin de obtener un cultivo puro. Preparar tubos de ensayo con medio de cultivo en pico de flauta para conservar el cultivo puro.

a. Desinfección

Los nódulos se lavaron con abundante agua, y se esterilizaron superficialmente por inmersión 1 min en etanol 70 % en agua (v/v), se enjuagaron con agua estéril, se trataron durante 3 minutos con solución de hipoclorito de sodio al 2 % en agua (v/v) y posteriormente, se enjuagaron con agua destilada estéril hasta que no se perciba el olor a lavandina.

b. Siembra

Luego los nódulos desinfectados fueron colocados individualmente en un portaobjeto, previamente esterilizado por flameado y con otro estéril se aplastó para que salga el contenido al exterior, se adicionó una gota de agua estéril. A partir de este líquido que contiene la suspensión de bacterias (el macerado) se sembró con ansa, en estrías en placas de Petri con medio YEM (Yeast-Extract-Manitol) (Figura 5), (Vincent, 1975), solidificado con agar 1,5 % (p/v). La composición se detalla en la Tabla 2. La temperatura de crecimiento fue 30°C. Se incubaron a 28°C por 2 – 5 días. Se observó diariamente el crecimiento de las colonias características de rhizobios de acuerdo al manual del CIAT (CIAT, 1985).

Tabla 2. Medio de cultivo ALM (Agar – Levadura – Manitol).

COMPONENTE	CANTIDAD
Agua destilada	1000 ml
Manitol	10 g
Extracto de levadura	0,5 g (en lo posible Merck)
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
FeCl ₃ .6H ₂ O	1 gota de una solución a 10 %
SO ₄ Mn	1 gota de una solución al 10 %
Agar-Agar	15 g (en lo posible Merck)
Rojo Congo	5 ml (sc. Stock)



Figura 5. Medio de cultivo (ALM), preparado para su posterior esterilización.

c. Obtención de cultivos puros

Se hicieron 2-3 pasajes en el mismo medio hasta obtener un cultivo puro. Las colonias típicas de rhizobios fueron re-sembradas y se verificó la pureza de los cultivos. Los cultivos fueron aislados en tubos conteniendo medio YEM e incubados a 30°C.

2.4.2. Observación de colonias de rhizobios

a. Observación macroscópica

Los cultivos de bacterias seleccionados fueron analizados por sus características macroscópicas. Se evaluaron el color, el diámetro, la apariencia (borde y elevación), la forma de las colonias, producción de mucus y la textura.

b. Observación microscópica

Se utilizó microscopio de alta resolución y con cámara fotográfica incorporada.

Las colonias provenientes del medio de cultivo se observaron en preparados frescos (células vivas) y con coloraciones de Gram.

Las bacterias obtenidas del nódulo se examinaron al microscopio a partir de un frotis de la suspensión o macerado que se realizó al aplastar el nódulo en el paso previo del aislamiento. El frotis se coloreó con fucsina fenicada durante 30 segundos (coloración simple).

2.4.3. Conservación de cepas nativas del género *Sinorhizobium*

Las cepas nativas aisladas fueron, selladas, rotuladas y conservadas en agar manitol (BYMA) en condiciones asépticas de refrigeración, para su posterior identificación.

2.5. Muestreo de Suelo

a) Suelo No rizosférico

Se hizo un muestreo puntual (muestras simples) con barreno helicoidal, extrayéndose muestras de las profundidades de 0-30, 30-60 y 60-90 cm (Figura 6), en cada sitio de estudio para determinar algunas propiedades físicas (textura, color y contenido de agua) y propiedades químicas (pH, CE, COS y respiración edáfica), y tener la caracterización general. Algunas propiedades, de los primeros 30 cm de suelo No rizosférico se comparan con el suelo adherido a las raíces (suelo rizosférico) de alfalfa muestreadas a esta profundidad.

b) Suelo rizosférico.

Suelo adherido a las raíces del muestreo de plantas de alfalfa para determinar presencia de nódulos, descrito anteriormente (Figura 4).

2.6. Determinaciones de suelo, en laboratorio

Las muestras de suelo fueron secadas al aire durante 72hs y luego tamizadas por tamiz de malla de 2 mm (Figura 6).

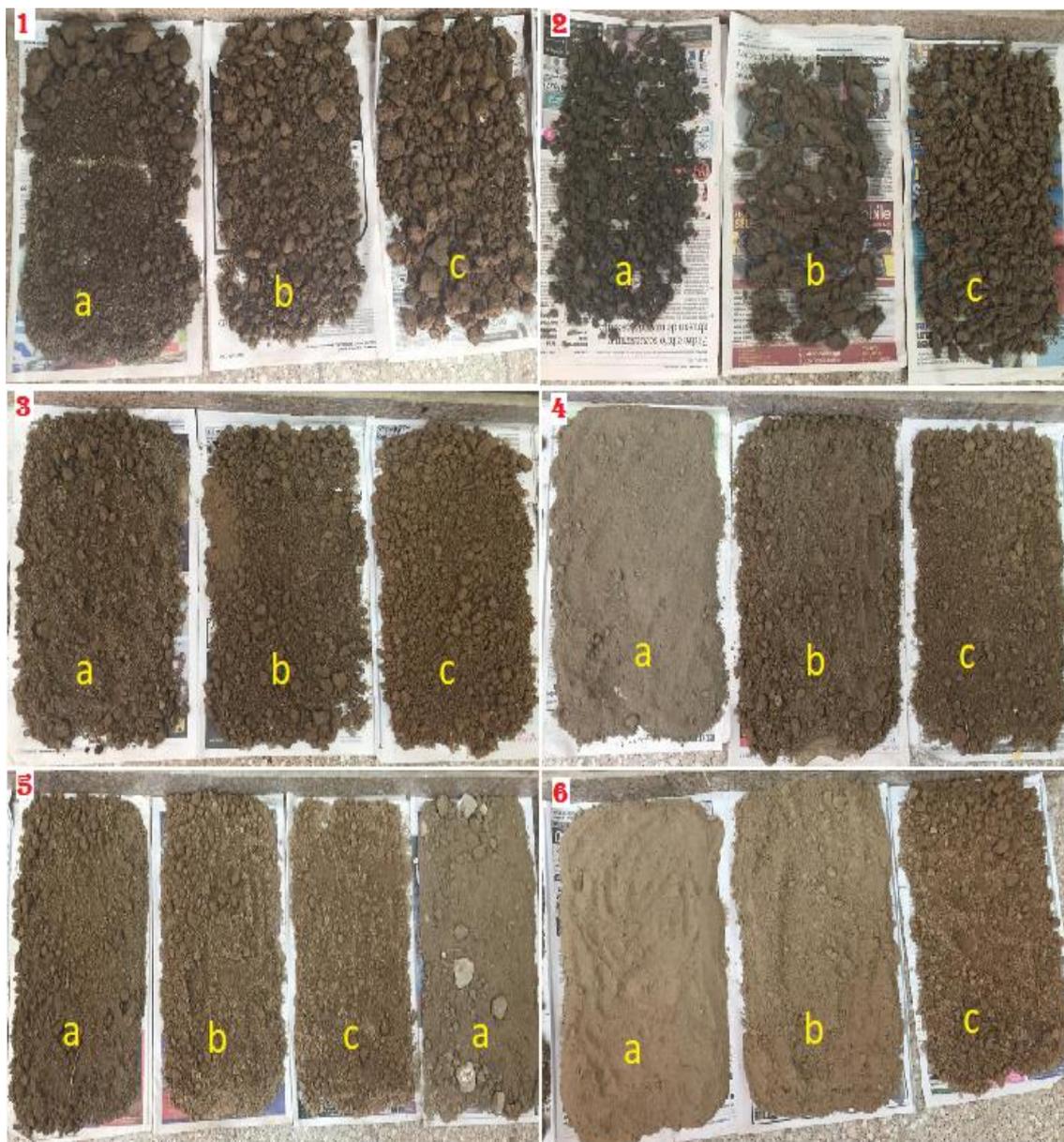


Figura 6. Muestras de suelo secado al aire de los seis sitios de la localidad Puesto de Díaz, Depto. Atamisqui, Santiago del Estero (Argentina) a tres profundidades: a) 0-30 cm, b) 30-60 cm, c) 60-90 cm.

a) **Propiedades físicas**

Se describieron las propiedades físicas del suelo, tales como: Textura y color, y se determinó contenido de agua.

Contenido de agua del suelo

Se determinó el contenido de agua en todos los sitios muestreados por el método gravimétrico. Para ello se pesó una alícuota de las muestras de suelo frescas e

inmediatamente se pusieron a secar en estufa a 105 °C hasta peso constante (72 h). El contenido de agua se expresó en porcentaje del suelo seco. Para obtener el porcentaje de humedad se efectuó un cálculo, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Humedad} = (\text{m Agua} / \text{m Suelo}) * 100$$

Donde:

m agua: peso del suelo húmedo (menos peso del frasco)

m suelo: peso del suelo seco, después de sacarlo de la estufa (menos peso del frasco)

b) Propiedades químicas

Se determinaron algunas propiedades químicas, tales como: pH del suelo, CE del suelo, COS.

pH del suelo

La determinación del pH se realizó en una suspensión agua: suelo 1:2,5(20ml:8g) (Mc Lean, 1982), usando un potenciómetro eléctrico.

Se realizó en las profundidades 0-30, 30-60 y 60-90 cm, para cada sitio en estudio.

Carbono orgánico del suelo (COS)

El COS se determinó sólo en muestras extraídas. Se empleó el método de Walkley y Black (Nelson y Sommers, 1982). Para ello se pesó 1 g de suelo libre de material vegetal visible en un Erlenmeyer de 500 mL y se agregaron 10 mL de $K_2Cr_2O_7$ 1 N y 20 mL de H_2SO_4 concentrado. La suspensión se agitó manualmente durante 1 min, se dejó reposar 1 h y luego se agregaron 250 ml de agua destilada. Las muestras fueron tituladas con una solución de $Fe(NH_4)(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ (sal de Mohr). En forma paralela se realizó el blanco sin el agregado de suelo.

Se calculó la MOS multiplicando el contenido de COS por un factor = 1,72

CE del suelo

En extracto de saturación para conductividad eléctrica, para la lectura se usó un Conductivímetro eléctrico. El resultado expresado en dS/m.

c) Propiedades Biológicas

Se determinó la propiedad biológica de respiración edáfica, en la profundidad 0-30 cm, en los suelos de la rizosfera.

Respiración edáfica del suelo (RE)

La respiración edáfica en laboratorio, evaluando desprendimiento de CO₂, se determinó como índice de actividad de la microflora heterótrofa (Jenkinson y Powlson, 1981; Anderson, 1982). Se determinó en todos los sitios de muestreo a una sola profundidad (0-30 cm). Para ello se pesaron por triplicado 20 g de suelo fresco y homogeneizado de cada muestra en envases de rollo de película, se rehumedecieron hasta llevarlos al 60 % de su capacidad de retención de agua (capacidad de campo para estos suelos) y se incubaron a 30-32 ° C por 10 días en frascos de 380 mL de capacidad con rosca hermética conteniendo 30 mL de una solución de NaOH 0,1N. Cumplido el tiempo de incubación una alícuota del álcali fue titulada con una solución de HCl 0,1N con fenolftaleína como indicador. Se realizaron tres blancos en paralelo. El C-CO₂ respirado y liberado se expresó en mg C kg⁻¹ de suelo seco y se calculó mediante la fórmula:

$$C-CO_2 = (B - T) * (N * E) / ps$$

Donde (B) son los mL de ácido gastados en la titulación del blanco, (T) son los mL de ácido gastados en la titulación de la muestra, (N) es la normalidad del ácido en miliequivalentes mL⁻¹, (E) es el peso equivalente del C en CO₂ en mg, (ps) es el peso de suelo seco en g.

3. RESULTADOS y DISCUSIÓN

3.1. Relevamiento de alfalfares en los sitios de muestreo

En la Figuras 3 de la imagen satelital se visualizó (pág. 12) el ambiente salino donde se encuentra el área de estudio. En el mismo están identificados los seis sitios de muestreo, presentando uno ellos suelo salino lo que se verifica con la imagen satelital (Sitio 5 de la figura 3) y se observa una variación de colores en las muestras del suelo (Figura 6).

Debido a que antiguamente pasaba un brazo del río Dulce por la localidad (actualmente llamada “*Antigua llanura aluvial*”), esto ocasionó bajos y altos en la superficie. Aprovechando los bajos de la zona, se utiliza para sembrar alfalfa asumiendo que este suelo se encuentra con menor presencia de salinidad debido al lavado del mismo.

Los suelos salinos están influenciados directamente por la falta de agua. La presencia de lluvias o riego mediante los canales va a influenciar en el descenso de las sales, permitiendo al cultivo absorber humedad de la profundidad no salina, así manteniendo una producción activa. Puede ser también por el ascenso de la capa freática a la superficie del suelo, esto debido a la falta de cobertura o suelo desnudo. La producción de alfalfa se hace con riego a partir del canal el Hoyon. Cuando no hay disponibilidad de agua de lluvia o de riego, se complica sembrar la alfalfa y el mantenimiento del cultivo por problemas de estrés hídrico por falta de humedad edáfica.

A la falta de agua se suman temperaturas elevadas. Esta limitante edafoclimática de la localidad de Puesto de Díaz solo permite hacer una agricultura a pequeña escala (promedio de media hectárea por sitio), para autoabastecimiento. Si bien no es un área de riego, en sectores bajos pueden ser regados con aguas del Río Dulce, la cual se distribuye desde el canal El Hoyon. Aunque la realidad es que el canal lleva agua para consumo humano y animal, más no para realizar el riego del cultivo.

El agua es el recurso fundamental para el desarrollo del alfalfar, ya que sin esta sería imposible la producción del cultivo en esta zona del Departamento Atamisqui.

En la Tabla 3 se muestra datos sobre relevamiento de alfalfares de la zona, tomados de una encuesta² realizada en agosto de 2019, observándose en la misma que los sitios 1,2,3,6 de alfalfares sin inocular y sin aplicación de agroquímicos pero con riego, tienen buen desarrollo, buena sanidad y persistencia.

Tabla 3. Relevamiento de alfalfares, ubicados en la localidad Puesto de Díaz, Departamento Atamisqui, en seis sitios muestreados.

Datos	Sitios de alfalfa					
	Sitio 1	Sitio 2	Sitio 3	Sitio 4	Sitio 5 (*)	Sitio 6
Variedad	Salinera	Monarca	Salinera y Monarca	Monarca	Monarca	Salinera y Monarca
Edad del cultivo	5 años	8 meses	1,5 años	1 mes	No hay cultivo	1 año
Superficie	1/4 ha	0,5 ha	0,5 ha	3/4 ha	1/4 ha	2 ha
Condición del cultivo	Vigorosas-sananas	buen aspecto	Desarrollada, verde uniforme	Alfalfa pequeña y escasa. sin riego	Siembra fallida	Vigorosas-sananas
Historia del lote	Desmante de 20 años (Paleocauce)	1 año del desmante. hay <i>Melilotus albus</i>	Desmante de 20 años .	Mostraba un suelo seco. Se trata de un bajo natural salino	Ambiente muy salino, sin riego	30 años había alfalfa
Vegetación natural		Cardón, jume y el palo Azul		presencia de sales sobre el suelo	Presencia de sales sobre el suelo	

(*) Sitio 5, el cerco sembrado con alfalfa fallo o fracaso pues no se observó ninguna planta viva.

En el sitio 4 (Tabla 3) la alfalfa se encontraba en una mala condición (alfalfa rala con pocas plantas por unidad de superficie y de baja altura), debido a que no llovía hace 4 meses, y este lote no se puede regar. Se trata de un bajo natural salino, el cual fue sembrado sin riego, por ello tenía plantas de alfalfas muy pequeñas y escasas. A igual, en

² Trabajo de la práctica profesional supervisada, comunicación verbal

el sitio 5, no se observó cultivo de alfalfa, por siembra fallida, había detenido su crecimiento debido a la alta salinidad del suelo que se hacía evidente por las costras salinas en superficie del suelo (Figura 3 y Figura 6). Este comportamiento de la alfalfa en los sitios 4 y 5 se vio influenciado principalmente por la no disponibilidad de agua, tanto de precipitaciones como el no acceso al agua por el canal de riego. En los casos de salinidad moderada pueden sembrarse cultivares con cierto grado de tolerancia, sin embargo, en las situaciones de salinidad excesiva o presencia de alcalinidad por alto contenido de sodio, es muy probable que la alfalfa no prospere y que su siembra se torne antieconómica (Basigalup, 2007).

La situación en el sitio 2, es una alfalfa de ocho meses que ha sido sembrada luego de un desmonte. Antes del cultivo había especies naturales como: cardón, jume, y palo Azul. Se observó la presencia de una leguminosa denominada *Melilotus albus* (trébol de olor blanco).

3.2. Evaluación de la nodulación

En la Tabla 4, se presenta los resultados de la evaluación de la nodulación de plantas de alfalfa extraídas de los diferentes sitios muestreados a la profundidad de 0-30 cm, con diferentes condiciones edafoclimáticas limitantes.

Claramente se aprecia que las mayores cantidades de nódulos activos, ubicados en la raíz principal y secundaria correspondieron a alfalfares cultivados en los sitios 1, 3 y 6; con riego y con suelos libres de sales y en consecuencia un buen aspecto del cultivo. Esta buena nodulación se explica porque las plantas presentan un buen desarrollo, están en mejores condiciones para proporcionar energía o hidratos carbono a la bacteria. La nodulación es un aspecto fundamental para la sobrevivencia de estos alfalfares ya que es la principal fuente de nitrógeno en estos suelos (*Entisoles*), dado que las semillas no se

inoculan, los nódulos encontrados son originados de una población de rhizobios nativos y/o naturalizados.

Por otra parte, es interesante resaltar que en el alfalfar del (Sitio 2), tiene ocho meses de implantación, que proviene de un suelo desmontado, también tuvieron raíces con nódulos, pero muy escasos, pequeños, de color verde y ubicados en raíces secundarias, todas estas características hacen suponer que se tratan de nódulos ineficientes es decir no fijan nitrógeno. Racca y González (2007) expresaron que la aparición de nódulos espontáneos son consecuencia de la estimulación que ejercen las plantas sobre poblaciones de bacterias nativas que se encuentran en muy bajo número en suelos aparentemente libres de rhizobios específico para alfalfa. En el caso de este alfalfar en el sitio 2, la nodulación es por cepas nativas y/o naturalizadas, las mismas podrían encontrarse asociada plantas de crecimiento natural como el trébol de olor blanco (*Melilotus albus*), leguminosa encontrada durante el muestreo de este sitio o bien por la simple persistencia de estas bacterias en el suelo.

Tabla 4. Evaluación de la nodulación en cultivos de alfalfa de seis sitios, ubicados en la localidad Puesto de Díaz, Departamento Atamisqui. Profundidad de 0-30 cm.

Sitios	Variedad de alfalfa	Abundancia (*)	Tamaño	Ubicación (**)	Color	Forma
1	Salinera	++	Grandes y pequeños	RP y RS	Mayoría rojos y pocos verdes	Dedos - tubular
2	Monarca	+	pequeño	RS	Verde	
3	Salinera y Monarca	+++	Grandes y pequeños	RP y RS	Rojos	Arracimado
4	Monarca	+	Pequeños	RS	Marrón rojizo	
5	Monarca	-				
6	Salinera y Monarca	++	Grandes y pequeños	RP y RS	Mayoría rojos y pocos verdes	Dedos - tubular

(*) - Abundancia (escala); (Escasos: +), (Regular: ++), (Abundantes: +++)

(**) – Ubicación; (RP) Raíz principal y (RS) Raíz secundaria

Otro aspecto interesante de destacar es en cuanto a la forma de los nódulos: En el sitio 3, los nódulos son de forma arracimados (Figura 7) se observaron en cultivos de alfalfa de 5 años y en cantidad fueron abundantes nódulos (Tabla 4), mientras las formas unilobuladas o alargadas se asociaron con cultivos más jóvenes, menos de 2 años de edad (Figura 8 y 9). Los nódulos de alfalfa son de tipo meristemático y de crecimiento indeterminado. Estas características, frente a situaciones de estrés moderado (estrés hídrico, temperaturas del suelo elevada) hacen que el meristema nodular persista y sea capaz de regenerar el crecimiento cuando la situación de estrés se revierta (Stougaard, 2000).



Figura 7. Foto mostrando nódulos arracimados en la raíz de la alfalfa, Lote del sitio 3. [Localidad Puesto de Díaz, Departamento Atamisqui].



Figura 8. Foto mostrando nódulos en forma de dedos en la raíz de la alfalfa. Lote del sitio 6. [Localidad Puesto de Díaz, Departamento Atamisqui].

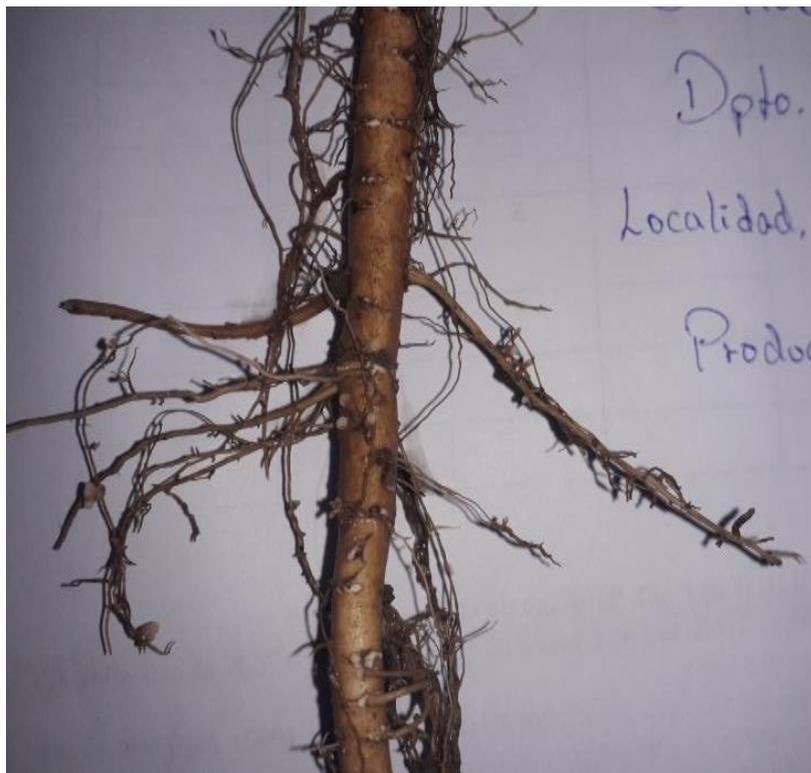


Figura 9. Foto mostrando nódulos ubicados en raíz principal de la alfalfa. Lote del sitio 1. [Localidad Puesto de Díaz, Departamento Atamisqui].

El sistema simbiótico funciona bien cuando no hay condicionantes por exceso o por defecto para el desarrollo normal del cultivo. En consecuencia, en los sitios 4 y 5 la falta de agua disponible en la porción de suelo explorado por las raíces de alfalfa es el factor que regula directamente la germinación y desarrollo del cultivo e indirectamente la fijación biológica del nitrógeno. Ausencia de nodulación, o nódulos inactivos que asocian a suelos con bajo contenido de agua, y sales en superficie en el caso del sitio 5 (Tabla 4).

3.3. Observación de colonias de rhizobios

3.3.1. Observación macroscópica

En la Tabla 5, se observan las características morfológicas de las colonias aisladas, obtenidos posteriores a la purificación. Se aprecia que no existe una alta variabilidad entre estos según los parámetros evaluados (Crecimiento, color, mucus, bordes superiores, elevación, tamaño y Gram). Sin embargo, respecto al crecimiento, la producción de *mucus* (*polisacáridos extracelulares*) y elevación de las colonias (Figura 10), se evidencian las diferencias entre aislados de diferentes sitios de la misma localidad.

El aislado obtenido del sitio 6, se destaca el crecimiento como muy abundante, mientras que en el sitio 3, es de crecimiento moderado, y del sitio 1, es ligero. Similares resultados se obtuvieron en la producción de mucus y elevación de las colonias.

Estos resultados ponen de manifiesto que no todos los aislados microbianos de la misma localidad y el mismo hospedero presentan idénticas características morfológicas. En este sentido, Racca y Gonzales (2007) coincidiendo reportan la variabilidad de características morfológicas de aislados de rhizobium del cultivo de alfalfa. Sin embargo, todos tuvieron un crecimiento rápido, entre las 24 y 48 horas coincidiendo los resultados con los de otros trabajos, los cuales aislaron rhizobios de crecimiento rápido a partir de Alfalfa (Vance, 1978).

Tabla 5. Descripción de las características morfológicas de colonias de rhizobios de cuatro aislados en sitios diferentes. [Localidad Puesto de Díaz, Departamento Atamisqui].

Sitios aislados	Crec. ³ (*)	Color	Mucus	Bordes - sup. ⁴	Elevación	Tamaño	Gram
1	++	incolora	++	liso	Levantado , gomoso	Grandes, 4 o 5mm	-
3	+++	Ligeramente opaca	+++	Liso-brillante	Levantado , gomoso	Grandes, 4 o 5mm	-
4	++	incolora	++	liso	Suave, acuosa	medianas	-
6	+++	Ligeramente opaca	+++	Liso-brillante	Levantado , gomoso	Grandes	-

(*) – Crecimiento; (+ ligero), (++) moderado), (+++ abundante)

Es importante advertir que, si bien los contaminantes se distinguieron, entre otros aspectos, porque se colorearon con rojo Congo, estas características son comunes en las especies de los géneros de crecimiento rápido *Rhizobium* y *Sinorhizobium*, que forman la familia *Rhizobiaceae* y se caracterizan por presentar colonias grandes de 2-5 mm, circulares, blancas o de color beige, convexas, semitraslúcidas y mucilaginosas (Anon, 1994).

Pero con las características estudiadas en este trabajo no fue posible diferenciar estos dos géneros, ya que no existían diferencias fenotípicas entre ellos debido a su cercanía filogenética (Lloret y Martínez, 2005). Para identificar cada uno de ellos es necesario un estudio más profundo que incluya técnicas genéticas y moleculares.

³ Palabra abreviada, (Crec.) - Crecimiento

⁴ Palabra abreviada, (Sup.) - Superiores

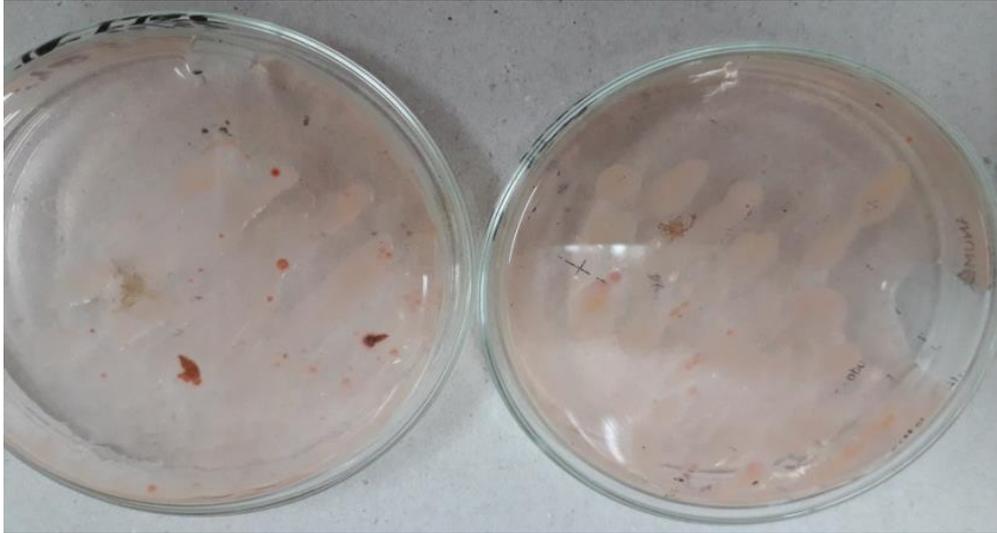


Figura 10. Cajas de Petri con cultivo de *Sinorhizobium*. Se muestran colonias translucidas mucosas, del Sitio 6.

3.3.2. Observación microscópica

Bacteroides

Las bacterias obtenidas del nódulo se examinaron al microscopio a partir de un frotis de la suspensión o macerado que se realizó al aplastar el nódulo en el paso previo del aislamiento.

Se observaron los denominados “*bacteroides*” más grandes que la bacteria saprófita y con formas en X, Y, o amorfas. El frotis se coloreó con fucsina fenicada durante 30 segundos (Figura 11).

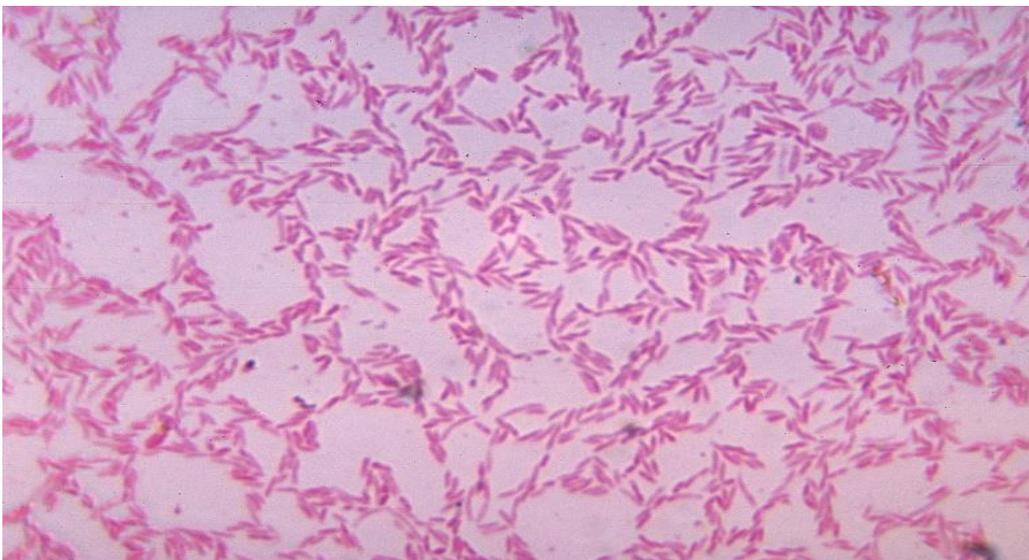


Figura 11. Bacteroides de *Sinorhizobium* del nódulo de la alfalfa

La observación de preparados microscópicos mediante la tinción de Gram de cultivos puros obtenidos, mostró que la morfología de las células y sus características tintoriales se correspondían con las descritas para este grupo de bacterias: las células eran bacilos Gram negativos, de pequeño tamaño, y no formaban endoesporas (Figura 11 y 12). Así como resultado de la selección, se lograron cinco cepas del género *Sinorhizobium* en los diferentes sitios, basado en el estudio de las características culturales, tintoriales. Las cepas aisladas fueron las del grupo de crecimiento rápido, para asegurar que las mismas correspondan al género *Sinorhizobium* se recomienda continuar el estudio de selección de cepas nativas eficientes para alfalfa para estos ambientes, así como la clasificación más precisa de los aislados con el empleo de otras técnicas de la taxonomía convencional y molecular.

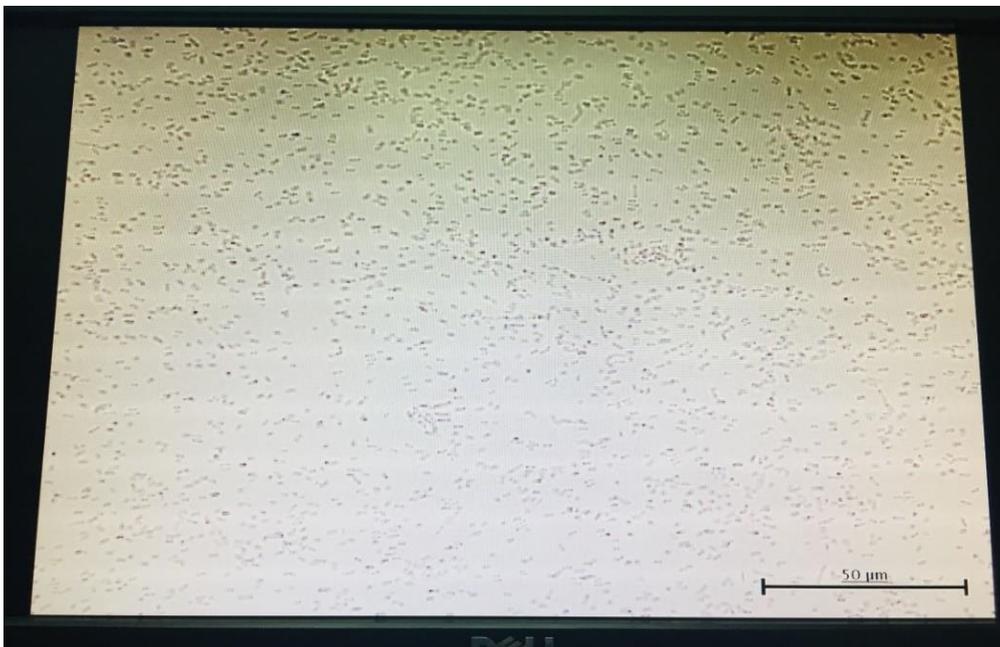


Figura 12. Preparado microscópico de bacterias aisladas de nódulos de la alfalfa

3.4. Análisis del suelo

En la tabla 6. Se describen las determinaciones del análisis de las propiedades físicas y químicas del suelo, en seis sitios alfalferos y su variación en diferentes profundidades.

Tabla 6. Propiedades físicas y químicas de los suelos de seis sitios, en diferentes profundidades (0-30, 30-60 y 60-90 cm).

Sitios	Prof. (cm)	Propiedades físicas			Propiedades químicas		
		Textura (tacto)	Color (seco)	Humedad (%)	pH (1:2,5)	CE es (dS/m)	MOS (%)
1	0 – 30	Arenoso	10 YR 6/2	20	6,93	1,05	0,93
	30- 60	Muy arenoso	10 YR 6/3	21	7,16	0,90	
	60 – 90	Arenoso	10 YR 6/4	23	8,22	1,15	
2	0 – 30	Arenoso	10 YR 6/2	24	7,26	1,45	1,03
	30- 60	Arcilloso	10 YR 6/3	27	7,66	1,70	
	60 – 90	Muy arenoso	10 YR 6/4	24	7,76	1,95	
3	0 – 30	Arenoso	10 YR 6/2	18	7,20	2,05	1,44
	30- 60	Muy arenoso	10 YR 6/3	23	7,73	2,10	
	60 – 90	Muy arenoso	10 YR 7/3	24	7,63	10,75	
4	0 – 30	Muy arenoso	10 YR 6/2	7	7,14	8,25	1,14
	30- 60	Arenoso	10 YR 6/3	12	7,33	16,75	
	60 – 90	Muy arenoso	10 YR 7/3	17	8,07	27,55	
5	0 – 30	Arcilloso	10 YR 6/3	18	7,51	25,83	1,60
	30- 60	Arenoso	10 YR 7/3	21	8,61	27,05	
	60 – 90	Media	10 YR 7/3	22	8,71	28,45	
6	0 – 30	Muy arenoso	10 YR 6/3	2	8,25	1,25	1,55
	30- 60	Muy arenoso	10 YR 6/3	10	8,83	2,45	
	60-90	Arenoso	10YR 6/4	19	9,16	8,15	

En general son suelos de textura arenosa, solo en la segunda profundidad del sitio 2 y la primera de la profundidad del sitio 5 se observa un horizonte arcilloso (Tabla 6). La textura arenosa tiene menos beneficios al retener poca agua y con mayor facilidad de drenaje del agua, pero las raíces no tienen dificultad para crecer en profundidad y en consecuencia para nodular.

Los sitios 1, 2 y 3 son suelos No salinos de pH neutro a ligeramente básico siendo coincidente con los mejores alfalfares y mejor evaluación de nodulación antes descripto. El sitio 6 es alcalino y con una acumulación de sales en profundidad, sin embargo, esta condición no afectó el normal desarrollo del cultivo. A diferencia, el sitio 4 corresponde a un bajo natural muy salino, el cual fue sembrado sin riego, tenía plantas de alfalfas muy

pequeñas y escasas y el sitio 5 de extrema salinidad, con eflorescencia salina en la superficie, por lo cual se explica el fracaso de la siembra de alfalfa en este lote.

En cuanto a los contenidos de humedad en los lotes se puede ver que los sitios 1, 2 y 3 tenían buenos contenidos de humedad en las tres profundidades estudiadas, los tres tienen posibilidad de ser regados, en el caso del sitio 6 se observa bajo porcentaje de humedad dado que al momento de tomar la muestra recién se estaba iniciando el riego.

El contenido de Materia Orgánica varió en un rango de 0,96 a 1,60 %, considerados como valores bajos, pero esperados para este tipo de ambiente relacionado con los valores originales del suelo y con la historia de cada sitio, información que no fue relevada y por lo tanto no se puede explicar en detalle. Con los valores obtenidos de MOS (%), es necesario para proveer de nitrógeno al cultivo por aporte de fijación biológica de nitrógeno.

En la Tabla 7, se observa que el suelo rizosférico en los sitios 2,3, y 6 presentó mayores contenidos de materia orgánica que el suelo no rizosférico. Estos resultados son los esperados y se explica por los mayores aportes de carbono que recibe el suelo proveniente de las raíces y sus exudados.

Tabla 7. Materia orgánica y respiración edáfica en los diferentes sitios a la profundidad de 0-30 cm

Sitios	No Rizosférico		Rizosférico	
	Materia Orgánica (%)	Respiración edáfica ($\mu\text{g C-CO}_2$)	Materia Orgánica (%)	Respiración edáfica ($\mu\text{g C-CO}_2$)
1	0,93	54	0,88	138
2	1,03	75	1,34	223
3	1,44	130	1,96	266
4	1,14	65	1,03	109
5	1,60	79	--	--
6	1,55	134	2,17	232

Asimismo, la microflora heterótrofa aerobia está marcadamente influenciada por las secreciones de las raíces (Alexander, 1980; Abril *et al.*, 1990), de allí también el incremento del COS y del Carbono respirado. Al incrementarse la densidad de raíces en el suelo, se incrementan los exudados y otros sustratos carbonadas que se ponen a disposición de la microflora (Abril *et al.*, 1990).

La restricción en el crecimiento del cultivo de alfalfa en los sitios (4 y 5), está asociado con problemas de salinidad y por la escasa humedad del suelo, pudo haber reducido la disponibilidad de fuentes carbonadas de alta labilidad asociada al crecimiento de las raíces, influenciado en la no presencia de nodulación, por lo tanto, se ven afectados en la actividad de la microflora al incubar el suelo.

4. CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio muestran que en ambientes edafoclimáticos limitantes hay cepas nativas y/o naturalizadas de *Sinorhizobium* que forman nódulos funcionales en aquellas plantas de alfalfa (*Medicago sativa L.*) que tienen condiciones para proporcionar energía o hidratos de carbono a la bacteria.

La presencia de nodulación fue abundante en los sitios que no presentaron salinidad, mostrando nódulos de color rojo en la raíz principal; los nódulos escasos, pequeños, de color verde y ubicados en raíces secundarias provinieron de un sitio de alfalfa sembrado luego de un desmonte. En cuanto a las formas de nódulos se observó, forma arracimada en cultivos de más de 2 años y forma de dedo o tubular a cultivos más jóvenes.

Las características morfológicas de las colonias aisladas no presentaron alta variabilidad en cuanto a los parámetros evaluados (Crecimiento, color, mucus, bordes superiores, elevación, tamaño y Gram). En el sitio seis se destaca un crecimiento muy abundante en la producción de mucus y elevación de las colonias de *Sinorhizobium* asociado a buen aspecto del cultivo.

En general, los alfalfares que crecieron en los sitios de suelos arenosos, con buen contenido de humedad, pH neutros a ligeramente básicos, conductividades eléctricas, menores a 10, alta actividad biológica en área rizosférica, se relacionaron con plantas con abundante nódulos funcionales y buen aspecto del cultivo de alfalfa.

Las cepas aisladas fueron las del grupo de crecimiento rápido, para asegurar que las mismas correspondan al género *Sinorhizobium meliloti*, se recomienda continuar el estudio de selección de cepas nativas eficientes, así como la clasificación más precisa de los aislados con el empleo de otras técnicas de la taxonomía convencional y molecular.

Comentarios:

La disponibilidad de agua de riego podría explicar mayormente las variaciones en la capacidad de nodular de la alfalfa entre los sitios estudiados. El agua disponible elimina las sales de la porción de suelo explorado por las raíces de la alfalfa lo que permite el desarrollo de la misma e indirectamente de la fijación biológica del nitrógeno por cepas nativas y/o naturalizadas.

La nodulación es un aspecto fundamental para la sobrevivencia y el mantenimiento de los alfalfares de esta zona del oeste del Depto. Atamisqui, Santiago del Estero (Argentina), ya que en estos suelos de baja fertilidad es la principal fuente de nitrógeno. Como es de esperar son suelos de bajo contenido de materia orgánica por el origen de los mismos y las condiciones de semiaridez mejorando esta condición por el aporte de carbono que hacen las raíces y el cultivo de alfalfa en general (suelo rizosférico) e incrementan la actividad biológica del suelo.

Sobre perspectivas futuras puedo decir que el tema “Fijación Biológica del Nitrógeno en Alfalfa (*Medicago sativa*), leguminosa Forrajeras de la Provincia de Santiago del Estero” es amplio, y da lugar a investigaciones que pueden durar mucho tiempo y requiere la consecución de estudios más profundos con la posibilidad de incursionar nuevos campos de la investigación. Por otra parte, es una línea de investigación que busca generar conocimientos prácticos que habrá después de incorporarse a los procesos productivos menos contaminantes y más sustentables.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Abril, A., Acosta, M., Oliva, L. y Bachmeier, O. (1990). Dinámica estacional de la microflora en un Haplustol típico de la región semiárida bajo diferentes manejos agrícolas. *Ciencia del Suelo*. 8:31-39.
- Anderson, J.E. (1982). Soil Respiration. En: A.L. PAGE (ED.). *Methods of soil analysis. Part 2*, 2nd ed. Agron. Monogr. 9. Am. Soc. Agron. and Soil Sci. Soc. Am. Madison, Wisconsin, EEUU. p. 837-87.
- Alexander, M. (1980). *Introducción a la microbiología del suelo*. AGT Editor S.A., México.
- Anon, B. (1994). *Manual of determinative bacteriology*. 1994. 9th edition. The William and Wilkins Co., Baltimore, USA. p. 78.
- Basigalup, D.H. (2007). *El cultivo de alfalfa en argentina, primera edicion*. Ediciones inta, isbn 978-987-521-242-8, 479 paginas.
- Basigalup, D.H. y Rossanigo, R. (2007). *Panorama actual de la alfalfa en la Argentina*. EEA Manfredi-INTA. Disponible en <https://inta.gob.ar/sites/default/files/pdf>.
- Boletta, P. (1988). Clima. En: R.R. Casas (Ed.) *Desmonte y habilitación de tierras en la región chaqueña semiárida*. Informe Curso-Taller Internacional, F.A.O. Santiago de Chile, Chile. p. 7-21.
- Boletta, P., Ravelo, C.A., Planchuelo, A.M. y Grilli, M. (2006). Assessing deforestation in the Argentine Chaco. *Forest Ecology and Management* 228:108–114.
- Bremner, J.M. y D.R. Keeney. (1982). *Methods of soil analysis*. Agronomy 9 ASA, SSSA, P. 643-693.
- Bray, R.H. y Kurtz, L. (1945). Determination of total, organic, and available forms of phosphorus in soil. *Soil Science*.59:39-45.
- Censo poblacional, (2010). Obtenido de:
https://www.indec.gob.ar/indec/Censo_Nacional_de_Población,_Hogares_y_Viviendas_en_la_Argentina
- Cornacchione, M. (2003). Alfalfa , crecimiento y manejo para un uso eficiente como integrante de la cadena, 1–7. Obtenido del sitio: www.produccion-animal.com.ar.

- Cornacchione, M. (2015). Alfalfa en Santiago del Estero : ¿ Cuánto hay y dónde está ?. Disponible en: <https://inta.gob.ar/documentos/alfalfa-en-santiago-del-estero-%C2%BFcuanta-superficie-hay-y-donde-esta>.
- CIAT (centro internacional de Agricultura). (1985). Investigaciones de apoyo para la evaluación de pasturas; memorias de la tercera reunión de trabajo del comité asesor de la RIEPT, 15-18 de octubre de 1985. Cali. Colombia.
- Duarte, G. (2002). Cómo implantar bien una pastura con alfalfa: pasturas cultivadas.35,p.40–46. Obtenido del sitio: www.produccion-animal.com.ar.
- Jenkinson, D.S. y Powlson, N. (1981). Microbial biomass in soil: measurement and turnover. *Soil Biology and Biochemistry*. 5:415-471.
- Lloret, L. y Martinez, R.E. (2005). Evolución y filogenia del Rhizobium. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 47 (1-2):43.
- Mc Lean, E.O. (1982). Soil pH and lime requeriment. En: A.L. PAGE (ED.) *Methods of soil analysis*. Part 2, 2nd ed. Agron. Monogr. 9. Am. Soc. Agron. and Soil Sci. Soc. Am., Madison, Wisconsin, EEUU. p. 199-224.
- Nelson, D.W. y Sommers, L.E. (1982). Total carbon, organic carbon and organic matter En: A.L. Page (Ed.) *Methods of soil analysis*. Part 2, 2nd ed. Agron. Monogr. 9. Am. Soc. Agron. and Soil Sci. Soc. Am., Madison, Wisconsin, EEUU. p. 539-579.
- Puente, M., García, J., y Peticari, A. (2011). Inoculación de leguminosas forrajeras con rhizobios eficientes, 5–9. Obtenido del sitio: www.produccion-animal.com.ar.
- Racca, R. y González, N. (2007). Nutrición nitrogenada de la alfalfa e impacto de la fijación simbiótica del nitrógeno. Páginas 69 – 82. Capítulo 4. En D. H. Basigalup (Ed.). *El cultivo de la alfalfa en la Argentina*. Primera edición. Ediciones INTA. ISBN 978-987-521-242-8. 479 paginas.
- Racca, R., Pollino, D., Dardanelli, J., Basigalup, D., González, N., Brensoni, E., Hein, N., Balsarini, M. (2001). Contribución de la fijación biológica de nitrógeno a la nutrición nitrogenada de la alfalfa en la región pampeana, (Ediciones INTA), 56.
- Rice, (1971). Inhibition of nodulation of inoculated legumes. *Am J. Bot.* 58,368-371.

- Rotondaro, R. (2006). Manejo y nutrición de la alfalfa, 1-4. Disponible en: [http://portal.acabase.com.ar/suelofertil/articulos de Inters/varios/alfalfa - manejo y nutrici3n 1era parte.pdf](http://portal.acabase.com.ar/suelofertil/articulos%20de%20Inters/varios/alfalfa%20-%20manejo%20y%20nutrici3n%201era%20parte.pdf).
- Rosemary S., Bradley, F., Campuzano, R., y Arelis, G. (1985). Gu3a metodol3gica del CIAT. "aislamiento, caracterizaci3n y evaluaci3n de rizobios para leguminosas forrajeras" p. 11-16.
- Stougaard, J. (2000). Regulators and regulation of legume root nodule development. *Plant phsiol.* 124.531-540.
- Turati, R. (2009). Un alfalfar sin nodulaci3n efectiva no tiene presente ni futuro. Vol.17, 1-5. Obtenido del sitio: www.produccion-animal.com.ar.
- Vance, C.P., G.G. Heichel, and D. Phillips. (1988). Nodulation and symbiotic dinitrogen fixation.in A.A. Hanson, D. K. Barnes and R.R. Hill, JR. Eds alfalfa and anfalfa Improvement.Agronomy serie 29, cap. 7. Asa- CSSA-SSSA, madison, wi, usa, pp.229-257.
- Vincent, J.M. (1975). Manual for the practical study of root nodule bacteria. IBP Handbook N°15. Blackwell scientific publications Ed. Oxford. U. k.
- Zirino, C.R. (2008). Caracter3sticas de la estructura agraria en Santiago del Estero durante la d3cada de 1940. Tesis presentada con el fin de cumplimentar con los requisitos finales para la obtenci3n del t3tulo en Licenciatura en Historia. Facultad de Filosof3a y Letras. Universidad de Buenos Aires. P3ginas 142

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SANTIAGO DEL ESTERO

Autor: Nilser Yosbany Terrones Vargas

Directora: Ing. Agr. M.Sc. Celia C. Gonzáles

Título: EVALUACIÓN DE LA NODULACIÓN EN EL
CULTIVO DE ALFALFA (*Medicago sativa* L.) EN
CONDICIONES EDAFOCLIMÁTICAS LIMITANTES, AL
OESTE DEL DEPARTAMENTO ATAMISQUI, SANTIAGO
DEL ESTERO (ARGENTINA)

