

Sulas, Leonardo; Re, Giovanni Antonio; Muresu, Rosella (2003)  
*Quantificazione dell'azotofissazione della sulla in Sardegna: azoto fissato nella fitomassa epigea ed effetto dell'inoculazione.* Rivista di agronomia, Vol. 37 (1), p. 103-107. ISSN 0035-6034.

<http://eprints.uniss.it/2661/>

# Quantificazione dell'azotofissazione della sulla in Sardegna: azoto fissato nella fitomassa epigea ed effetto dell'inoculazione

Leonardo Sulas, Gianni A. Re, Rossella Muresu

## Riassunto

L'azotofissazione simbiotica rappresenta una fonte importante ed economica di azoto nei sistemi colturali e foraggeri estensivi mediterranei, contribuendo anche ad una maggiore tutela e sostenibilità ambientale.

Nel presente lavoro è stato quantificato il potenziale di azotofissazione della sulla, attraverso i metodi della diluizione isotopica  $^{15}\text{N}$  e del confronto con specie non azotofissatrici. Inoltre, è stato valutato l'effetto della inoculazione col microsimbionte specifico *Rhizobium sullae*, rispetto ad un testimone non inoculato.

Il potenziale di azotofissazione, stimato attraverso il metodo della diluizione isotopica, è risultato elevato nella leguminosa con circa  $180 \text{ kg ha}^{-1}$  di azoto fissato nel biennio. Il secondo metodo, non ha dato risultati attendibili, a causa dell'elevata sottostima dell'azotofissazione rispetto al primo.

Le lievi differenze riscontrate tra le tesi di sulla, inocolata e non, dovute alla presenza di una popolazione indigena del simbiote nel sito della prova, evidenziano l'importanza di valutare l'esigenza o meno dell'inoculazione.

*Parole chiave:* azotofissazione, inoculazione, *Rhizobium*, simbiosi, sulla.

## Summary

### QUANTIFICATION OF NITROGEN FIXATION OF SWEETVETCH AND EFFECT OF ITS INOCULATION IN SARDINIA

An important and economic source of nitrogen for Mediterranean crop and forage systems arises from symbiotic nitrogen fixation, which contributes also to a high environmental protection and sustainability.

This paper refers on the quantification of nitrogen fixation in sweetvetch, by the isotopic dilution and nitrogen balance methods. In addition, the effect of sweetvetch inoculation with a Sardinian strain of *Rhizobium sullae* was evaluated against an uninoculated treatment.

The potential of nitrogen fixation in sweetvetch, estimated by the isotopic dilution method, resulted high, reaching  $180 \text{ kg ha}^{-1}$  of nitrogen fixed in the biennium. The nitrogen balance method underestimated the nitrogen fixation compared to the isotopic dilution.

Very low differences between inoculated and uninoculated sweetvetch were due to a presence of resident rhizobia in the soil. This result outlines the need of evaluating where inoculation is necessary or useless.

*Key words:* inoculation, nitrogen fixation, *Rhizobium*, symbiosis, sweetvetch.

## Introduzione

La sulla (*Hedysarum coronarium* L.), importante leguminosa foraggera prativa degli ambienti meridionali asciutti, è oggetto di rinnovato interesse per alcune sue peculiari caratteristiche, che la rendono idonea al pascolamento e alla conservazione, per i possibili usi multipli

e per il potenziale di azotofissazione (Stringi et al., 1997; Talamucci, 1998).

La sulla può essere valorizzata convenientemente in sistemi colturali e foraggeri sia tradizionali che biologici. Questi ultimi hanno avuto notevole diffusione negli ambienti meridionali (Biobank, 2000) ed il divieto d'impiego di fertilizzanti chimici di sintesi ha rivalutato

Sulas L., Muresu R., CNR – Istituto per il Sistema Produzione Animale in Ambiente Mediterraneo, via E. De Nicola – 07100 Sassari.

Re G.A., Dipartimento di Scienze agronomiche e Genetica vegetale agraria, via E. De Nicola – 07100 Sassari.

Autore corrispondente: Sulas L., tel. 079 229332, fax 079 229354; e-mail: sulas@cspm.ss.cnr.it

La ricerca è stata svolta nell'ambito del programma MIUR COFIN "Ruolo dell'azotofissazione delle leguminose in sistemi colturali ecocompatibili". Coordinatore Scientifico Prof. Carlo Grignani; Responsabile Scientifico u.o. di Sassari Prof. Pietro Bullitta.

Il lavoro è da attribuirsi agli Autori in parti uguali.

fortemente il ruolo dell'azotofissazione simbiotica delle leguminose.

La sulla instaura una simbiosi altamente specifica con *Rhizobium sullae* (Squartini et al., 2002) che, se assente nel sito di coltivazione, deve essere introdotto all'impianto della coltura. Infatti, l'inoculazione delle leguminose consiste nell'introdurre in campo ceppi di azotofissatori selezionati e moltiplicati in laboratorio (Date, 2001), mediante appositi formulati contenenti il rizobio da distribuire direttamente sul suolo oppure sulla semente prima dell'impianto. Nel passato, per introdurre il rizobio nell'areale di nuova coltivazione della sulla veniva prelevato del terreno dal campo dove la leguminosa era già stata coltivata e quindi contenente il batterio; il terreno veniva mescolato con la semente oppure distribuito in campo (Sarno e Stringi, 1982). Sfortunatamente, gli elementi da prendere in considerazione per valutare la necessità o meno dell'inoculazione di una leguminosa non sono sempre desumibili a priori, e talvolta l'importanza dell'inoculazione viene sottostimata (Brockwell et al., 1995).

Inoltre, anche per la sulla è stato riscontrato che possono esistere sostanziali differenze in termini di efficienza azotofissatrice, in funzione del ceppo di rizobio impiegato (Gurfel et al., 1982; Yates et al., 1996; Sulas et al., 1998).

Per poter ridefinire il ruolo di questa leguminosa all'interno degli attuali sistemi colturali è importante determinare, nei diversi ambienti, la sua capacità azotofissatrice. Scopo della presente ricerca è stato quello di quantificare l'azotofissazione della sulla in campo attraverso i metodi della diluizione isotopica e del confronto con specie non azotofissatrici e di sperimentare la validità relativa tra i due metodi.

Inoltre, è stato valutato l'effetto derivante dalla inoculazione della sulla con un ceppo sardo di *R. sullae*, rispetto ad un testimone non inoculato, e vengono discusse le implicazioni agronomiche e la necessità di individuare metodiche idonee allo studio dei simbiotici in campo.

## Materiali e Metodi

La prova è stata condotta nel biennio 1998-2000, presso l'azienda sperimentale della Facoltà di Agraria sita ad Ottava (Sassari), quota 80 m s.l.m., precipitazioni medie annue 547 mm, temperatura media annua 16,2 °C, su suolo sabbioso-limoso, di origine calcarea (Tab. 1). Sono state impiegate la sulla cv. Grimaldi, sia inoculata con un ceppo sardo di *Rhizobium sullae*, isolato dal DISAABA di Sassari, sia non inoculata, e due specie di controllo non azotofissatrici (nfs): la cicoria (*Cichorium intybus*) cv. Spadona ed il loglio ibrido (*Lolium hybridum*) cv. Taxy.

L'inoculazione è stata effettuata sulla semente con l'impiego di una sospensione liquida, contenente 10<sup>9</sup> cellule vitali di rizobio per ml di prodotto.

È stato adottato un disegno sperimentale a blocchi randomizzati con 6 replicazioni. Le parcelle, ciascuna di 10 m<sup>2</sup>, sono state seminate nel 1998 ad ottobre, previa concimazione d'impianto effettuata con 100 kg ha<sup>-1</sup> di P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

Su tutte le specie sono stati effettuati tre sfalci nel biennio: un taglio primaverile nell'anno d'impianto, un taglio a fine autunno ed uno primaverile nell'annata successiva. Contestualmente, sono stati effettuati i rilievi sulle colture per determinare la fitomassa epigea e la sua ripartizione nelle diverse componenti (foglie, steli,

culmi, guaine, infiorescenze). Un mese prima di ciascun taglio, su una sub-area di 3 m<sup>2</sup> all'interno di ogni parcella, sono stati somministrati 4 kg ha<sup>-1</sup> di azoto, da solfato ammonico marcato al 10% di eccesso isotopico, disciolto in acqua.

Sui campioni di foraggio di tutte le specie sono stati determinati, presso i laboratori INRA di Caen, il contenuto di N totale e la proporzione di <sup>15</sup>N.

A partire dai dati produttivi delle colture e dai risultati analitici la quantificazione dell'azotofissazione è stata effettuata con i seguenti due metodi.

### 1) Metodo della diluizione isotopica

Gli isotopi stabili dell'azoto, <sup>14</sup>N e <sup>15</sup>N, si trovano nell'atmosfera in rapporto di 272:1, corrispondente a un contenuto di <sup>15</sup>N espresso in atomi di 0,3663%, molto stabile; l'azoto nel suolo è normalmente più ricco di <sup>15</sup>N. L'eccesso isotopico di <sup>15</sup>N si esprime secondo la formula: *eccesso isotopico* = <sup>15</sup>N% atomi del campione - <sup>15</sup>N atmosferico (pari a 0,3663).

Il metodo della diluizione isotopica (Warembourg, 1993), si basa proprio sul differente contenuto di <sup>15</sup>N del suolo e dell'atmosfera e sul confronto tra una leguminosa e una specie di controllo non azotofissatrice (nfs) coltivate nello stesso terreno. Il contenuto di <sup>15</sup>N della specie nfs riflette quello del suolo, mentre nella leguminosa sarà diluito dall'azoto atmosferico. Il metodo prevede, inoltre, l'impiego di modesti quantitativi di azoto marcato per arricchire il terreno con <sup>15</sup>N e per rendere, quindi, l'azoto assorbito dal terreno nettamente distinguibile da quello fissato dall'atmosfera.

In accordo con Warembourg (1993), la percentuale di azoto derivante dall'atmosfera (Nd<sub>fa</sub>) è stata ottenuta con la formula:

$$\%Nd_{fa} = [1 - (\% \text{ eccesso isotopico leguminosa}) / (\% \text{ eccesso isotopico specie nfs})] \times 100$$

Poiché la percentuale di azoto così ottenuta è indipendente dalla produzione di sostanza secca e dalla dose di fertilizzante apportato, è possibile, con questo metodo, valutare anche l'efficienza della simbiosi e/o del ceppo impiegato.

Infine, nota la %Nd<sub>fa</sub>, è stata calcolata la quantità di azoto fissato secondo la formula:

$$N_2 \text{ fissato (kg ha}^{-1}\text{)} = (\%Nd_{fa} \times N_{tot} \text{ leguminosa kg ha}^{-1}) / 100$$

### 2) Metodo del confronto tra leguminosa e specie non azotofissatrice

Il metodo del confronto (o del bilancio azotato), il più semplice e utilizzato da tempo, è basato invece sulla differenza tra il contenuto di azoto incorporato nella fitomassa della leguminosa e quello della specie di controllo.

Tabella 1 - Principali caratteristiche pedologiche.

Table 1 - Main soil characteristics.

Caratteristiche	u.m.	valore
Scheletro	%	16
Sabbia	%	58
Limo	%	27
Argilla	%	15
pH		7,4
N totale	%	0,14

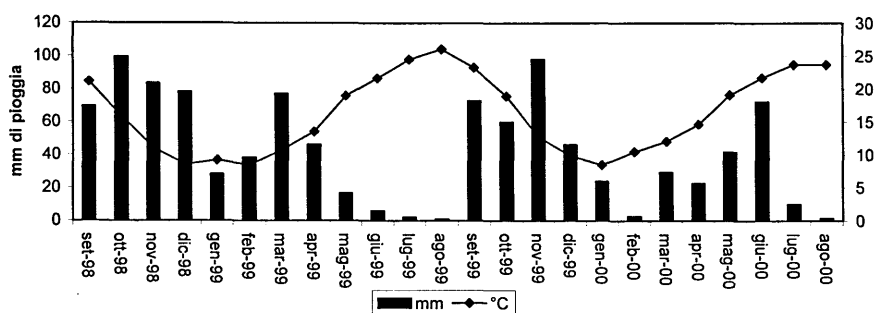


Figura 1 - Andamento termopluviometrico.

Figure 1 - Rainfall and temperature trend.

lo non fissatrice, assumendo che l'eventuale differenza a favore della leguminosa sia dovuto all'azotofissazione. La quantità di azoto fissato ( $N_{fiss}$ ,  $Kg\ ha^{-1}$ ) da una leguminosa è stato calcolato come:

$$N_{fiss} = N_{leg} - N_{nfs}$$

dove  $N_{leg}$  è l'azoto asportato dalla leguminosa;  $N_{nfs}$  è l'azoto asportato dalla coltura di controllo non fissatrice ( $nfs$ ), in analoghe condizioni pedo-climatiche.

Pertanto, occorre determinare la produzione di sostanza secca totale ed il tenore di azoto di entrambe le specie. La quantità di azoto asportata dalle due specie viene ottenuta moltiplicando la fitomassa totale per il contenuto percentuale di azoto. A questo punto, si può stimare la quantità di azoto derivante dall'azotofissazione sottraendo all'asportazione unitaria di azoto della leguminosa, quella della specie di controllo. Per determinare la quantità percentuale di azoto fissato dalla leguminosa ( $\%N_{dfa}$ ) si fa il rapporto tra la quantità di azoto fissato e la quantità di azoto totale incorporato dalla leguminosa.

I dati relativi a produzione di sostanza secca, tenore in azoto ed eccesso isotopico della fitomassa, asportazioni di azoto ed azoto fissato sono stati elaborati mediante ANOVA con procedura GLM. I confronti tra medie sono stati effettuati col test di Duncan.

## Risultati e Discussione

Nell'annata 1998-99 la pluviometria da settembre ad agosto è stata simile alla media pluriennale, con circa 400 mm tra la semina e lo sfalcio (Fig. 1). La pluviometria dell'annata 1999-2000 è stata di circa 480 mm, di cui 350 mm tra settembre ed i primi di maggio, concentrati nei mesi autunnali e con eventi invernali e primaverili poco numerosi e di scarsa entità. Da gennaio ad aprile sono stati registrati solo 79 mm, corrispondenti al 40% dei valori medi pluriennali.

Tabella 3 - Contenuto in azoto della fitomassa epigea ed eccesso isotopico.

Table 3 - Nitrogen content of aerial phytomass and isotopic excess.

Specie	N (% s.s.)			*Eccesso isotopico (% $^{15}N$ )		
	7/05/99	20/12/99	08/05/00	07/05/99	20/12/99	08/05/00
Cicoria	2,04 a	3,08 a	1,49 c	0,140 b	0,222 a	0,328 a
Loglio	1,38 b	n.r.	1,85 b	0,274 a	n.r.	0,294 a
Sulla non inoculata	1,98 a	3,99 b	2,57 a	0,039 c	0,110 b	0,102 b
Sulla inoculata	1,95 a	3,90 b	2,63 a	0,046 c	0,103 b	0,095 b

n.r. = non rilevabile. \*  $\%^{15}N$  campione -  $^{15}N$  atmosferico (0,3663%).  
Le medie seguite dalla stessa lettera non differiscono per  $p \leq 0,05$ .

Tabella 2 - Produzione di sostanza secca per sfalcio e nel biennio ( $t\ ha^{-1}$ ).

Table 2 - Dry matter yield per cutting and in the biennium ( $t\ ha^{-1}$ ).

Specie	07/05/99	20/12/99	08/05/00	Biennio
Cicoria	4,0 a	1,8 a	6,6 a	12,4 a
Loglio	5,0 b	n.r.	0,3 c	5,3 b
Sulla non inoculata	5,8 b	1,3 b	3,5 b	10,7 a
Sulla inoculata	5,7 b	1,6 ab	4,0 b	11,3 a

n.r. = non rilevabile. Le medie seguite dalla stessa lettera non differiscono per  $p \leq 0,05$ .

### Azoto fissato secondo il metodo della diluizione isotopica

La produzione di sostanza secca (Tab. 2) in tutte le specie è stata influenzata marcatamente dallo sfavorevole decorso pluviometrico della seconda annata, che ha limitato, di conseguenza, le rese complessive del biennio, con effetti meno marcati nella cicoria. Nell'autunno 1999, a causa del reinsediamento stentato del loglio ibrido è stata necessaria la sua risemina; ciò non ha consentito di effettuare lo sfalcio di fine autunno, come per gli altri trattamenti.

Al taglio primaverile della prima annata, il contenuto in azoto (Tab. 3) della cicoria è risultato simile a quello della sulla, mentre è risultato significativamente inferiore a quello della leguminosa nei rimanenti tagli; i valori più elevati del biennio sono stati registrati nel taglio di fine autunno.

Nelle tre utilizzazioni del biennio, i valori di eccesso isotopico (Tab. 3) sono risultati significativamente superiori nelle specie di controllo rispetto alla leguminosa, nella quale, per effetto dell'azotofissazione, il contenuto di  $^{15}N$  è stato "diluato" da azoto atmosferico. Inoltre, differenze minime nel contenuto di  $^{15}N$  sono state riscontrate tra la sulla inoculata e non inoculata.

Nella media delle due tesi della sulla, la percentuale di azoto derivante dall'atmosfera (Fig. 2), determinata con metodo della diluizione isotopica ed usando come specie di riferimento la cicoria, è risultata compresa tra

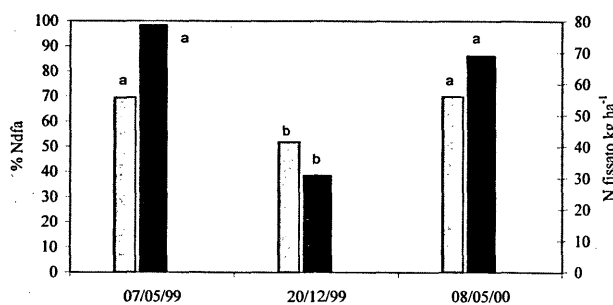


Figura 2 - Percentuale di azoto derivante da fissazione atmosferica (■) ed azoto fissato (■) nella fitomassa epigea della sulla, nella media dei due trattamenti (inoculato e non inoculato) ed in corrispondenza delle tre utilizzazioni durante un ciclo biennale.

Figure 2 - Percentage of nitrogen derived from atmospheric fixation (■) and nitrogen fixed (■) in the aerial phytomass of sulla (average of inoculated and uninoculated sulla) during a biennium cycle.

52 e 70, in funzione dell'epoca di taglio. I minori valori autunnali sembrerebbero indicare un rallentamento stagionale dell'attività azotofissatrice. Considerando come specie di riferimento il loglio ibrido, sono stati ottenuti, limitatamente al taglio primaverile del 1999, valori superiori: 84 vs 70% di Ndfa, sempre nella media delle due tesi (non inoculata ed inoculata). Ciò può essere spiegato da un maggiore utilizzo di azoto da parte del loglio ibrido, conseguente a ritmi di crescita più elevati rispetto alla cicoria. Nella seconda annata, i valori percentuali di Ndfa ottenuti rispetto al loglio ibrido hanno confermato quelli calcolati rispetto alla cicoria.

L'andamento dell'azoto fissato (Fig. 2) è stato del tutto simile a quello della percentuale di Ndfa con valori medi di azoto fissato compresi tra circa 30 kg ha<sup>-1</sup> nel taglio di fine autunno e quasi 80 kg ha<sup>-1</sup> nel taglio primaverile del 1999. Nell'intero ciclo biennale, l'azoto fissato nella fitomassa epigea della sulla, nella media dei trattamenti inoculato e non inoculato, è stato pari a circa 180 kg ha<sup>-1</sup>. Non avendo considerato gli apparati radicali, i valori ottenuti rappresentano una sottostima dell'azoto fissato complessivamente dalla coltura.

#### Azoto fissato secondo il metodo del confronto

Lo sfalcio di fine autunno ha presentato i valori più bassi di azoto asportato (Tab. 4) mentre non sono state riscontrate differenze significative tra la sulla, nella media dei due trattamenti inoculato e non inoculato, e la cicoria nelle tre utilizzazioni. La determinazione dell'azotofissazione, effettuata secondo il metodo del confronto con la cicoria, ha evidenziato quantitativi di azoto fissato di 30 kg ha<sup>-1</sup> in corrispondenza del taglio della prima annata, e valori ridottissimi nei tagli successivi. Ciò deriva dal fatto che l'azoto asportato dalla fitomassa della cicoria è risultato, eccetto al primo taglio, del tutto simile a quello asportato dalla sulla.

#### Comparazione tra i due metodi

Nelle stesse condizioni in cui è stato impiegato il metodo della diluizione isotopica, il metodo del confronto con specie nfs ha evidenziato valori inferiori sino al 60% al primo taglio e trascurabili nei rimanenti, non consentendo di determinare in modo attendibile l'azotofissazione e la percentuale di Ndfa della sulla. In pratica, la cicoria è risultata non idonea come specie di riferimento nfs col metodo del bilancio azotato, nonostante alcune analogie con la sulla per il ciclo di crescita e la

tipologia dell'apparato radicale. Tuttavia, differenze nella capacità di utilizzo di azoto dal suolo e nei ritmi di crescita tra la specie di confronto nfs e la sulla hanno reso problematico l'impiego di questo metodo. Comunque, la sottostima dell'azotofissazione col metodo del confronto rispetto alla diluizione isotopica è piuttosto frequente (Rennie, 1984; Mc Neill et al., 1996).

#### Effetto dell'inoculazione

Le differenze trascurabili e non significative nel contenuto di <sup>15</sup>N riscontrate tra la sulla inoculata e non inoculata mettono in evidenza, in quest'ultima, un'attività azotofissatrice del tutto simile a quella della tesi inoculata. Questo risultato può essere spiegato dalla presenza di una popolazione rizobica indigena simbiote della sulla, nel sito sperimentale, e mette in evidenza la necessità di valutare preventivamente l'esigenza o meno dell'inoculazione. Infatti, mentre è indiscutibile che nella tesi non inoculata l'attività azotofissatrice appare dovuta a rizobi già presenti nel terreno, la spiegazione possibile per la *performance* della tesi inoculata non è univoca e sicura, in quanto, presumibilmente, possono essersi verificate una o più situazioni, di seguito sintetizzate:

- Maggiore competizione del ceppo impiegato, ma scarsa efficienza nella fissazione dell'azoto rispetto ai rizobi indigeni.
- Maggiore efficienza del ceppo introdotto nella fissazione dell'azoto ma minore competitività nei confronti dei rizobi indigeni.
- Incapacità del ceppo impiegato a mantenere un genotipo funzionale stabile.

In tutti i casi, l'inoculazione si tradurrebbe in una perdita di tempo e denaro. Inoltre, il ceppo introdotto potrebbe diventare nel tempo un componente permanente del suolo e costituire, a lungo termine, una barriera alla successiva introduzione di ceppi più efficienti.

Fondamentale è perciò la possibilità di monitorare la coltura dell'inoculante in fase di sperimentazione in campo, allo scopo di controllare eventuali alterazioni delle proprietà simbiotiche (Sullivan et al., 1995). La caratterizzazione molecolare della coltura madre dell'inoculante, con l'identificazione di marcatori del DNA, consentirebbe di attribuire con sicurezza il risultato della simbiosi al ceppo che si intende inoculare (Thies et al., 2001).

- Perdita di vitalità del ceppo introdotto a seguito dell'inoculazione, probabile col formulato liquido impiegato.

Ripropone l'esigenza di formulati che assicurino una maggiore protezione del rizobio sul seme inoculato,

Tabella 4 - Contenuto di azoto (kg ha<sup>-1</sup>) asportato della fitomassa epigea e stima dell'azotofissazione col metodo del confronto rispetto alla cicoria.

Table 4 - Aerial phytomass nitrogen (kg ha<sup>-1</sup>) and estimation of nitrogen fixation by the nitrogen balance method using chicory as reference plant.

Sfalci	N Asportato		N fissato	
	Sulla <sup>†</sup>	Cicoria	media	Sulla
07/05/99	112	82	97a	30
20/12/99	58	56	57b	2
08/05/00	97	95	96a	2

<sup>†</sup> Media della tesi inoculata e non inoculata. Le medie seguite dalla stessa lettera non differiscono per  $p \leq 0,05$ .

oltre a presentare maggiore facilità d'impiego per gli operatori (es. inoculanti in polvere o granulari preparati con substrati a base di torba, attualmente non disponibili per la sulla).

## Conclusioni

Per quanto riguarda i metodi impiegati, la diluizione isotopica ha consentito una determinazione semplice di Ndfa, pur con lievi differenze tra specie nfe impiegate (cicoria, loglio), mentre il metodo del confronto è risultato sottostimare marcatamente l'azotofissazione rispetto al precedente.

Le percentuali ed i quantitativi di azoto fissati dalla sulla sono risultati elevati e molto interessanti, tenuto conto anche delle limitazioni pluviometriche della seconda annata, e rappresentano un importante riferimento a livello regionale per quanto riguarda la capacità di azotofissazione della specie in campo, al fine di contribuire alla completa valorizzazione di questa leguminosa in sistemi colturali e foraggeri mediterranei.

Alcuni risultati ottenuti nella presente prova evidenziano la necessità di una maggiore conoscenza sull'ecologia dei rizobi per valorizzare più efficacemente gli effetti della simbiosi, attraverso l'inoculazione con ceppi selezionati. Pertanto, sarebbe opportuno identificare marcatori molecolari, specie e/o ceppo specifici, che possano consentire di caratterizzare e monitorare il microrganismo introdotto nella pianta e nel terreno e attribuirgli con sicurezza il risultato ottenuto.

## Ringraziamenti

Si ringraziano i pp.aa. Salvatore Nieddu e Anton Pietro Stangoni ed il sig. Piero Saba, del CNR ISPAAM sezione di Sassari, che hanno effettuato le operazioni colturali ed i rilievi in campo.

## Bibliografia

Brockwell J., Bottomley P.J., Thies J.E. 1995. Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility: a critical assessment. *Plant Soil*, 174:145-180.  
Biobank 2000. Disponibile su <http://www.biobank.it>.

- Date R.A. 2001. Advances in inoculant technology: a brief review. *Aust. J. Exp. Agric.*, 41:321-325.
- Gurfel D., Lobel R., Schiffman J. 1982. Symbiotic Nitrogen-Fixing activity and yield potential of inoculated *Hedysarum coronarium* in Israel. *J. Botany*, 296-304.
- Mc Neill A.M., Pilbeam C.J., Harris H.C., Swift R.S. 1996. Seasonal variation in the suitability of different methods for estimating biological nitrogen fixation by grain legumes under rainfed conditions. *Aust. J. Agric. Res.*, 47:821-828.
- Rennie R.J. 1984. Comparison of N Balance and <sup>15</sup>N Isotope Dilution to Quantify N<sub>2</sub> Fixation in Field-Grown Legumes. *Agron. J.*, 76:785-790.
- Sarno R. e Stringi L. 1982. Sulla (*Hedysarum coronarium* L.). In: Baldoni R., Giardini L. ed. *Coltivazioni Erbacee*. Bologna: Patron Editore, 903-912.
- Squartini A., Struffi P., Döring H., Selenska-Pobell S., Tola E., Giacomini A., Vendramin E., Velázquez E., Mateos P.F., Martínez-Molina E., Dazzo F.B., Casella S., Nuti M.P. 2002. *Rhizobium sullae* sp. nov. (formerly *Rhizobium "hedysari"*): the microsymbiont of *Hedysarum coronarium* L. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52:1267-1276.
- Stringi L., Giambalvo D., Amato G., Accardo A. 1997. Insilamento della sulla (*Hedysarum coronarium* L.) in diversi stadi fenologici e a diversi tenori di sostanza secca mediante fasciatura delle rotoballe. *Riv. Agron.*, 31:299-305.
- Sulas L., Re G.A., Loi A., Howienson J.G. 1998. The selection of optimal root-nodule bacteria inoculants increases the forage yield of sulla (*Hedysarum coronarium* L.). *Proc. of the 17th EGF Meeting, Debrecen (H)*. 899-90.
- Sullivan J.T., Patrick H.N., Lowther W.L., Scott D.B., Ronson C.W. 1995. Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 12; 92(19): 8985-9.
- Talamucci P. 1998. Il ruolo della sulla nell'attuale contesto della foraggicoltura italiana. In: Talamucci P., Staglianò N., Sabatini S. eds. *La sulla: possibili ruoli nella foraggicoltura mediterranea*. Accademia dei Georgofili, Quaderni, 1998-I. Firenze: Studio Editoriale Fiorentino, 1-21.
- Thies J.E., Holmes E.M., Vachot A. 2001. Application of molecular techniques to studies in *Rhizobium* ecology: a review. *Austr. J. Exp. Agric.*, 41:299-319.
- Warembourg F. 1993. Nitrogen fixation in soil and plant systems. In: *Nitrogen isotope techniques*. Academic press.
- Yates R.J., Howienson J.G., Carr S.J. 1996. The role of root-nodule bacteria in the adaptation of two long leaved forage legumes from the mediterranean basin to Western Australia. *Proc. 11th Nitrogen-fixation Conference*. University of Western Australia. 144-145.