

EFFECTO DE LA INOCULACION Y PELLETIZACION DE SEMILLAS EN EL ESTABLECIMIENTO Y NODULACION DE TREBOLES¹

Effect of pelleting and inoculation on the establishment and nodulation of clovers

Hernán Acuña P.², Alfonso Herrera O.³ y Pedro Gajardo R.³

SUMMARY

The effect of inoculation and pelleting with calcium carbonate of clover seeds and soil liming was studied in four pot experiments, conducted in the glasshouse at the Quilamapu Experimental Station (INIA, Chillán, Chile), using four different soils, of the VII and VIII Regions of Chile.

Two species of subterranean clover (*Trifolium brachycalycinum* cv. Clare and *Trifolium subterraneum* cv. Mount Barker), red clover (*Trifolium pratense* cv. Quiñequeli) and white clover (*Trifolium repens* cv. Regal) were used. In each experiment, treatments were: seeds with and without inoculation; pelleted seeds with and without inoculation; and limed soil, seeded with and without inoculation.

In general, the effects of inoculation and pelleting on dry weight of nodules, nodule activity, dry matter production and herbage nitrogen content were positive in all species evaluated, but differences were not always statistically significant. In most cases, and interaction between inoculation and pelleting was observed. Soil liming was beneficial only when the legume was sown in low pH soil (red clover; pH = 4.9).

INTRODUCCION

El efecto de la inoculación de semillas de leguminosas forrajeras con cepas seleccionadas de bacterias, a objeto de mejorar la nodulación y la eficiencia del proceso de fijación de N atmosférico, puede verse alterado por factores genéticos de la bacteria, presencia de inhibidores en la cubierta de la semilla, competencia con otros microorganismos en la rizósfera y factores del suelo (pH, temperatura, composición química). Entre estos factores, destaca la importancia del pH, debido a que la acidez del suelo ejerce acción sobre la población de rizobios en el suelo, la masa nodular y el funcionamiento de la simbiosis.

Loneregan y colaboradores (citados por Plucknett, 1971), comenzaron a desarrollar, desde 1955, en Australia, una técnica que lograra superar los problemas de nodulación en suelos ácidos, donde el procedimiento corriente de inoculación habría fracasado. Esta técnica, ampliamente utilizada hoy en Australia, Nueva Zelanda, Uruguay, Argentina y Hawaii, especialmente en siembras aéreas, se denomina "pelletización" de semillas.

La pelletización consiste en agregar a las semillas, humedecidas con una solución adhesiva, un inoculante y polvo de revestimiento. El adhesivo puede ser a base de metil celulosa, goma arábica, o derivados de la celulosa (Brockwell, 1963; Norris, 1971; Graham, Morales y Callo, 1974). También se cita el uso de la miel de abeja, neutralizada con carbonato de calcio comercial (Acuña, 1983). Los materiales de recubrimiento más corrientemente usados, son carbonato de calcio o dolomita (Brockwell, 1963); polvo de roca fosfórica (Norris, 1971); gafsa fosfatada con dolomita en mezcla 1:1 (Hasting y Drake, 1962) o silicato de calcio, en leguminosas tropicales (Plucknett, 1971).

¹ Recepción de originales: 15 de mayo de 1986.

Se agradece al Ing. Agr. M.S. Profesor de la U. de Concepción Luis Longeri S., su colaboración en la determinación de actividad de la nitrogenasa.

² Estación Experimental Quilamapu (INIA), Casilla 426, Chillán, Chile.

³ Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales, U. de Concepción, Casilla 537, Chillán, Chile.

Brockwell (1963) y Plucknett (1971) señalan, como ventajas adicionales de la pelletización de semillas: la posibilidad de agregar micronutrientes, insecticidas o fungicidas; facilitar las siembras aéreas y en suelos con poca humedad; y hacer posible el almacenamiento de las semillas después de inoculadas, antes de la siembra.

El objetivo de la presente investigación fue determinar el efecto de la pelletización de semillas con carbonato de calcio y del encalado del suelo, sobre el establecimiento y nodulación de las especies de tréboles más importantes, en cuatro suelos de amplia distribución en la VII y la VIII Región, en comparación con el procedimiento corriente de inoculación.

MATERIALES Y METODOS

La investigación se realizó en la Estación Experimental Quilamapu (INIA), Chillán, en macetas de plástico de 1500 cc de capacidad, bajo condiciones de invernadero, con cuatro especies de trébol. Cada especie se sembró en el suelo en que presenta mejor adaptación (Acuña y otros, 1982), desarrollándose cuatro experimentos:

- I. Trébol subterráneo (*Trifolium brachycalycinum*) cv. Clare (TSC), en un suelo derivado de materiales graníticos, del Secano Interior (Cauquenes).
- II. Trébol subterráneo (*Trifolium subterraneum*) cv. Mount Barker (TSMB), en un suelo derivado de cenizas volcánicas (trumao), de la Precordillera de Ñuble (Yungay).
- III. Trébol blanco (*Trifolium repens*) cv. Regal (TB), en un suelo derivado de cenizas volcánicas (trumao), del Llano Central (Chillán).
- IV. Trébol rosado (*Trifolium pratense*) cv. Quiñeque-li (TR), en un suelo rojo-arcilloso, del Secano Costero de Arauco (Cañete).

En cada experimento, se estudió los siguientes tratamientos: semilla sin inocular (SI) y con inoculación (CI); semilla pelletizada sin inocular (PSI) y con inoculación (PCI); y suelo encalado con semilla sin inocular (ESI) y con inoculación (ECI).

Se estudió el efecto de la pelletización y encalado del suelo, en comparación con el procedimiento corriente de inoculación, mediante análisis de variancia factorial, que consideró: en un caso, los tratamientos SI y CI versus PSI y PCI y SI y CI versus ESI y ECI, en el otro (dos factoriales 2 x 2).

Se determinó, inicialmente en los suelos, los contenidos de N disponible (Keeney y Brenner, 1967), P disponible (Olsen y Dean, 1966), K soluble en acetato de amonio 1 N (Pratt, 1965), pH (Saiz y Bornemisza, 1962) y el porcentaje de materia orgánica (Thun, Hermann y Knickman, 1955), que se indican en el Cuadro 1.

Para evitar caída de plántulas, se realizó una desinfección de los suelos con fungicida Bayer 5072 PM al 70/o, en dosis de 10 mg de i.a./kg de suelo. Se fertilizó con el equivalente a 41 kg de P, a la forma de superfosfato triple, y 42 kg de K y 7 kg de S/ha, a la forma de sulfato de potasio. En los tratamientos de encalado, se mezcló el suelo con el equivalente a 2.000 kg/ha de CaCO₃, dos semanas antes de la siembra. Estas equivalencias se estimaron considerando un estrato de suelo de 10 cm.

Se efectuó una desinfección superficial de las semillas. Para ello, se sumergieron en un baño de alcohol etílico al 950/o por 3 min y luego, en un baño de agua oxigenada de 10 volúmenes, durante 5 min.

Para la inoculación, se tomó 25 g de semilla de cada especie y se agregó una solución de adhesivo Tylose (carboxi-metil-celulosa) al 1,50/o (pH 6,5), en dosis de 1,75–2,0–2,5–3,0 cc, para TSC; TSMB; TR y TB, respectivamente. Humedecidas las semillas, se agregó

CUADRO 1. Características químicas de los suelos usados en el experimento

TABLE 1. Chemical characteristics of the soils used in the experiment

| Procedencia | m.o. o/o | pH | N (ppm) | P (ppm) | K (meq/100 g) |
|-------------|-------------|-----|------------|------------|------------------|
| Cauquenes | 1,8 | 5,4 | 17,5 | 9,2 | 0,60 |
| Yungay | 11,7 | 5,7 | 40,0 | 24,0 | 0,98 |
| Chillán | 7,2 | 5,7 | 19,0 | 11,2 | 0,46 |
| Cañete | 4,8 | 4,9 | 33,0 | 10,6 | 0,62 |

las bacterias específicas para cada trébol, utilizando el inoculante comercial "Nitrofix", preparado por el Departamento de Microbiología de la Universidad de Concepción, a razón de 6 g de inoculante por kilo de semilla. Luego, para la pelletización se usó carbonato de calcio comercial, a razón del 50% del peso de las semillas.

Se utilizó 30 semillas por maceta, sembrando primero los tratamientos que no llevaban inóculo y, posteriormente, los inoculados. Entre los 14 y 21 días después de la siembra, se realizó un raleo de plantas, dejando 10 por maceta. El riego se efectuó con agua destilada, según las necesidades de las plantas. Se usó un diseño experimental completamente al azar, con siete repeticiones. Utilizando las macetas de tres repeticiones, en distintas fechas durante el desarrollo de los experimentos, se extrajo 2 plantas de cada maceta, y se midió el peso seco de nódulos y la actividad nodular por planta; ésta última, por el método de reducción de acetileno (Hardy y otros, 1968). Las macetas restantes, se usaron con las 10 plantas, para medir al término del experimento el peso seco del follaje y el contenido de N del follaje, por el método semi-micro Kjeldahl (Nelson y Sommers, 1973). Los experimentos se consideraron terminados, cuando las diferentes especies alcanzaron el estado de floración, lo que se produjo a los 95-105-120-135 días después de la siembra en TSC, TSMB, TR y TB, respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSION

El efecto de la inoculación sobre la variable peso seco de nódulos (Cuadro 2) fue positivo y significativo en todos los tréboles estudiados, a excepción de TSMB. La pelletización fue positiva en las cuatro especies y la interacción entre ambos factores fue significativa en TSC, TSMB y TB. El TR presentó un notable aumento de la nodulación al inocular y al pelletizar, sin obtenerse interacción entre ambos factores. El encalado del suelo no afectó el peso seco de nódulos de los tréboles y tampoco hubo interacción entre este factor y la inoculación.

La pelletización mejoró significativamente la fijación de N (Cuadro 3), en TB y TR y la inoculación fue efectiva en TR solamente. Del mismo modo, el encalado de suelo mejoró la actividad de la nitrogenasa en todos los tréboles, a excepción de TSC. Interacciones positivas se observaron para el caso de TSC y TR. Se estima que el efecto marcado de la pelletización y encalado en TR, está relacionado con el bajo pH (4,9) del suelo en que se sembró esta especie. Los valores de actividad de la nitrogenasa obtenidos, que varían entre 302 y 1934 nMoles de $C_2H_4/hr/planta$, serían equivalente a los informados por Johnson y Rambaugh (1981), para tréboles nodulados con bacteria nativa, si se asume que los nódulos tienen, al estado natural, 85% de agua, ya que dichos autores mencionan valores de reducción de acetileno por peso fresco de nódulos.

CUADRO 2. Peso seco de nódulos (mg/planta) en el período de crecimiento más activo de las plantas¹

TABLE 2. Dry weight of nodules (mg/plant) in the most active growth period of the plants

| Tratamientos | Tréboles | | | |
|--------------------------------|----------|------|------|------|
| | TSC | TSMB | TR | TB |
| Inoculado (CI) | 12,8 | 20,0 | 11,7 | 23,3 |
| Sin inocular (SI) | 15,0 | 21,7 | 8,3 | 10,0 |
| Pelletizado inoculado (PCI) | 22,8 | 28,3 | 20,0 | 50,0 |
| Pelletizado sin inocular (PSI) | 10,0 | 21,7 | 8,3 | 33,3 |
| Efecto de inoculación | ** | NS | ** | * |
| Efecto de pelletización | * | * | * | ** |
| Interacción (I x P) | ** | * | NS | * |
| Encalado inoculado (ECI) | 11,7 | 25,0 | 8,3 | 10,0 |
| Encalado sin inoculación (ESI) | 11,7 | 25,0 | 11,7 | 13,3 |
| Efecto de inoculación | NS | ** | NS | ** |
| Efecto de encalado | NS | NS | NS | NS |
| Interacción (I x E) | NS | NS | NS | NS |

*P = 0,05, **P = 0,01, prueba de F.

¹ 79 días después de la siembra para TSC (Clare); 100 días después de la siembra para TSMB (Mount Barker); 117 días después de la siembra para TR (Quiñequeli); 133 días después de la siembra para TB (Regal).

En el Cuadro 4 se presenta la acumulación de m.s. por maceta, al final del experimento. Se puede ver que el efecto de la inoculación es significativo en TSC, TSMB y TR, cuando se combina este factor con la pelletización. Sin embargo, este efecto se mantiene sólo en TR, cuando se combina inoculación con encalado. Ello indicaría que el encalado favoreció la bacteria nativa, más que la pelletización, en los tréboles sembrados en los suelos de pH más alto.

Cabe hacer notar que, lo que se ha llamado efecto de la inoculación, corresponde a la diferencia de comportamiento entre la bacteria inoculada y la bacteria nativa presente en el suelo.

El contenido de N del follaje (Cuadro 5) mejoró notablemente con la inoculación y el pelletizado, cuando se combinó estos factores. Así, el efecto de la inoculación fue significativo en las cuatro especies y el del

CUADRO 3. Actividad de la nitrogenasa (nMoles C₂H₄/hora/planta) en el período de crecimiento más activo de las plantas¹

TABLE 3. Nitrogenase activity (nM C₂H₄/hr/plant) in the most active growth period of the plants

| Tratamientos | Tréboles | | | |
|--------------------------------|----------|------|------|------|
| | TSC | TSMB | TR | TB |
| Inoculado (CI) | 584 | 1244 | 1137 | 1028 |
| Sin inocular (SI) | 1018 | 1057 | 1008 | 515 |
| Pelletizado inoculado (PCI) | 1216 | 1902 | 1934 | 1890 |
| Pelletizado sin inocular (PSI) | 743 | 1101 | 1003 | 1881 |
| Efecto de inoculación | NS | NS | ** | NS |
| Efecto de pelletización | NS | NS | ** | ** |
| Interacción (I x P) | * | NS | ** | NS |
| Encalado inoculado (ECI) | 756 | 1901 | 1885 | 308 |
| Encalado sin inoculación (ESI) | 302 | 1168 | 1177 | 566 |
| Efecto de inoculación | NS | NS | ** | NS |
| Efecto de encalado | NS | * | ** | * |
| Interacción (I x E) | * | NS | * | NS |

*P = 0,05, **P = 0,01, prueba de F.

¹ 79 días después de la siembra para TSC (Clare); 100 días después de la siembra para TSMB (Mount Barker); 117 días después de la siembra para TR (Quiñequeli); 133 días después de la siembra para TB (Regal).

CUADRO 4. Materia seca del follaje (g/maceta) al término del experimento¹

TABLE 4. Foliage dry matter (g/pot) at the end of the experiment

| Tratamientos | Tréboles | | | |
|--------------------------------|----------|------|-----|------|
| | TSC | TSMB | TR | TB |
| Inoculado (CI) | 10,0 | 8,0 | 4,6 | 15,9 |
| Sin inocular (SI) | 10,1 | 6,7 | 4,2 | 11,6 |
| Pelletizado inoculado (PCI) | 12,6 | 9,3 | 6,1 | 19,4 |
| Pelletizado sin inocular (PSI) | 9,3 | 6,6 | 4,6 | 14,6 |
| Efecto de inoculación | ** | ** | ** | NS |
| Efecto de pelletización | NS | NS | ** | NS |
| Interacción (I x P) | ** | NS | * | * |
| Encalado inoculado (ECI) | 10,1 | 8,2 | 7,6 | 12,9 |
| Encalado sin inoculación (ESI) | 10,0 | 8,1 | 5,4 | 11,7 |
| Efecto de inoculación | NS | NS | ** | NS |
| Efecto de encalado | NS | * | ** | NS |
| Interacción (I x E) | NS | NS | ** | NS |

*P = 0,05, **P = 0,01, prueba de F.

¹ 100 días después de la siembra para TSC (Clare); 105 días después de la siembra para TSMB (Mount Barker); 122 días después de la siembra para TR (Quiñequeli); 135 días después de la siembra para TB (Regal).

CUADRO 5. Nitrógeno en el follaje (g/maceta) al término del período experimental¹**TABLE 5. Foliage nitrogen (g/pot) at the end of the experimental period**

| Tratamientos | Tréboles | | | |
|--------------------------------|----------|------|------|------|
| | TSC | TSMB | TR | TB |
| Inoculado (CI) | 21,1 | 20,7 | 7,1 | 29,2 |
| Sin inocular (SI) | 20,0 | 17,7 | 6,9 | 20,5 |
| Pelletizado inoculado (PCI) | 29,3 | 25,3 | 11,4 | 41,5 |
| Pelletizado sin inocular (PSI) | 22,4 | 18,0 | 6,3 | 26,4 |
| Efecto de inoculación | ** | ** | ** | * |
| Efecto de pelletización | ** | * | ** | NS |
| Interacción (I x P) | * | * | ** | NS |
| Encalado inoculado (CI) | 24,3 | 19,1 | 11,3 | 19,4 |
| Encalado sin inoculación (ESI) | 22,6 | 20,4 | 8,7 | 16,6 |
| Efecto de inoculación | NS | NS | ** | NS |
| Efecto de encalado | * | NS | ** | NS |
| Interacción (I x F) | NS | NS | * | NS |

*P = 0,05, **P = 0,01, prueba de F.

¹ 100 días después de la siembra para TSC (Clare); 105 días después de la siembra para TSMB (Mount Barker); 122 días después de la siembra para TR (Quiñequeli); 135 días después de la siembra para TB (Regal).

pelletizado, en tres. En estas últimas (TSC, TSMB y TR) la interacción entre ambos factores fue positiva y significativa.

El encalado mejoró el contenido de nitrógeno en TSC y TR.

En la Figura 1 se puede ver que el peso seco de nódulos en el tratamiento inoculado y pelletizado, a partir de los 60 días después de la siembra, debido a que los nódulos hasta los 30 días estaban incipientes, va en

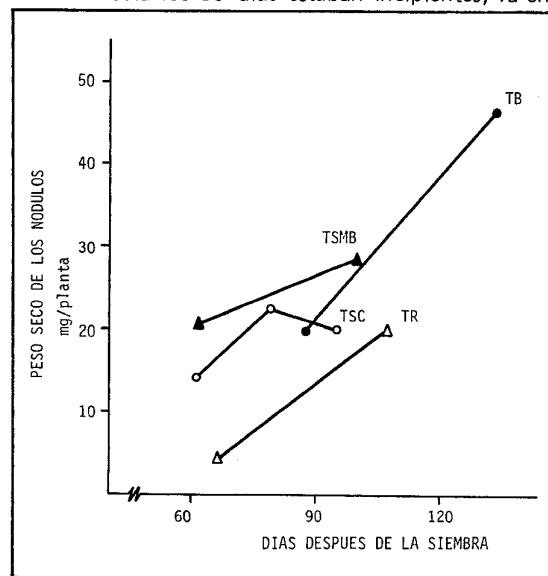


FIGURA 1. Variaciones del peso seco de nódulos en los tratamientos con inoculación y pelletizado de la semilla.

FIGURE 1. Changes in nodules dry weight in treatments with inoculated and pelleted seeds.

aumento en todas las especies; sólo el TSC, el más precoz, presenta una caída después de los 79 días.

Las variaciones en la actividad de la nitrogenasa (Figura 2) para el tratamiento inoculado con pelletización, aumentó desde valores muy bajos a los 30 días de iniciado el experimento, hasta valores cercanos a 2.000 nMoles C₂H₄/ha/planta, en tres de las especies estudiadas, entre los 90 y 130 días. Nuevamente se observa que TSC, especie anual y de ciclo de desarrollo muy corto, difiere de las otras, al alcanzar el máximo a los 79 días y luego disminuir su actividad, al alcanzar la madurez. La otra especie anual (TSMB) no presenta esta disminución, porque es más tardía, y las perennes (TR y TB) mantuvieron altos valores, aun cuando en las últimas fechas estaban entrando en floración.

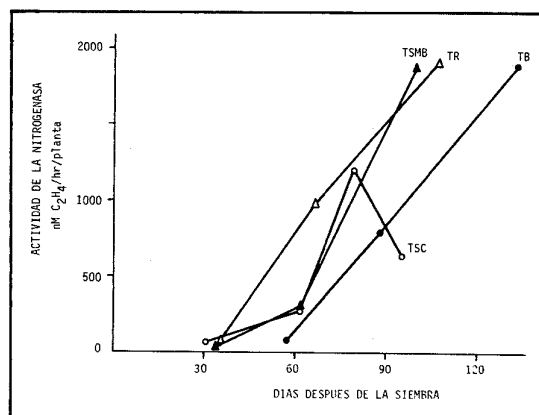


FIGURA 2. Variaciones en la actividad de la nitrogenasa en los tratamientos con inoculación y pelletización de las semillas.

FIGURE 2. Changes in nitrogenase activity for the treatments with inoculated and pelleted seed.

Los resultados presentados muestran que el efecto de los factores estudiados fue favorable en las cuatro especies y en todas las variables consideradas, pero no siempre las diferencias fueron significativas. La inte-

racción inoculación por pelletización fue también positiva y significativa, en la mayoría de los casos. El encalado del suelo resultó claramente beneficioso sólo en el suelo de bajo pH.

RESUMEN

En la Estación Experimental Quilamapu (INIA, Chillán), se estudió el efecto de la inoculación y pelletización con carbonato de calcio de semillas de tréboles y el encalado del suelo, en cuatro experimentos, bajo invernadero, en macetas: I. Trébol subterráneo (*Trifolium brachycalycinum*) var. Clare, sembrado en un suelo granítico del Secano Interior (Cauquenes); II. Trébol subterráneo (*Trifolium subterraneum*) var. Mount Barker, en un suelo "trumao" de la Precordillera de Ñuble (Yungay); III. Trébol rosado (*Trifolium pratense*) var. Quiñequeli, en un suelo rojo arcilloso del Secano Costero de Arauco (Cañete); y IV. Trébol blanco (*Trifolium repens*) var. Regal, en un suelo "trumao" del Llano Central de Ñuble (Chillán).

En general, en los cuatro experimentos se obtuvo respuestas favorables a la pelletización y a la inoculación, en relación a: peso seco de nódulos, actividad de la nitrogenasa, m.s. y contenido de nitrógeno del follaje; pero sólo en algunos casos éstas fueron significativas. La interacción inoculación por pelletización fue significativa en la mayoría de los casos. El encalado del suelo resultó beneficioso sólo cuando la leguminosa se sembró en un suelo de bajo pH (trébol rosado; pH = 4,9).

LITERATURA CITADA

- ACUÑA, H.; AVENDAÑO, J.; SOTO, P. y OVALLE, C. 1982. Praderas de secano para las regiones del Maule y Biobío. Boletín Técnico Nº 54 (15 Qu), INIA—Quilamapu, Chillán, Chile. 106 p.
- ACUÑA, H. 1983. Revestimiento e inoculación de semillas de leguminosas forrajeras. Investigación y Progreso Agropecuario—Quilamapu, Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Chillán, Chile. Nº 17: 10—15.
- BROCKWELL, J. 1963. Seed pelleting as an aid to legume seed inoculation. World Crops 15 (9): 334—338.
- GRAHAM, H.; MORALES, M. y CALLO, R. 1974. Materiales excipientes y adhesivos de posible uso en inoculación de leguminosas en Colombia. Turrialba 24 (1): 47—50.
- HARDY, R.W.F.; HOLSTEIN, R.D.; JACKSON, E.K.; and BURNS, R.C. 1968. The acetylene—ethylene assay for N² fixation: laboratory and field evaluation. Plant Physiology 43: 1185—1207.
- HASTING, A. and DRAKE, A.D. 1962. Inoculation and pelleting of Clover Seed. N.Z. J. Agriculture 101: 619—621.
- KEENEY, D.R. and BRENNER, J.M. 1967. Determination and isotoperation analysis of different forms of nitrogen in soils. 6. Mineralizable nitrogen. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 31: 34—39.
- JOHNSON, D.A. and RUMBAUGH, M.D. 1981. Nodulation and acetylene reduction by certain rangeland legumes species under field conditions. J. Range Management 34 (3): 178—181.
- NELSON, D.W. and SOMMERS, L.E. 1973. Determination of total nitrogen in plant material. Agronomy J. 65: 109—111.
- NORRIS, D.O. 1971. Nodulation of pasture legumes. En: Australian Grassland. Australian National University Press, Camberra.
- OLSEN, S.R. and DEAN, L.A. 1966. Phosphorus. En: Black, C.A. (Ed.) Methods of Soil Analysis. Part II. Madison, Wisconsin, Am. Soc. Agronomy.
- PRATT, P.F. 1965. Potassium. En: Black, C.A. (Ed.) Methods of Soil Analysis Part II. Madison, Wisconsin, Am. Soc. Agronomy: 1022—1030.
- PLUCKNETT, D.L. 1971. Use of pelleted seed in crop and pasture establishment. Honolulu, Hawaii, Univ. of Hawaii, Cooperative Extension Service, Circular 446. 15 p.
- SAIZ, J.F. and BORNEMISZA, E. 1962. Análisis Químico de Suelos. Turrialba, Costa Rica, IICA, OEA, Depto. de Energía Nuclear. 107 p.
- THUN, R.; HERMANN, R., und KNICKMAN, E. 1965. Die unter suching Bon boeden. Dritte an flage. Berlin, Neuman Verlag: 49—50.