

AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE CEPAS EFECTIVAS DE *Rhizobium leguminosarum* BIOVAR *trifolii* EN LA IX REGIÓN¹

Isolation and selection of effective *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* strains in the IX Region

Leticia Barrientos D.² y Edith Méndez A.²

S U M M A R Y

Trifolium pratense and *T. incarnatum* are the most spread legumes in the dry areas of the IX Region. As an alternative to the use of this species, a research track which considers diverse annual clovers has been initiated. However, there are non appropriate *Rhizobium* strains available in the country to inoculate such clovers. For that reason *T. incarnatum*, *T. alexandrinum*, *T. subterraneum*, *T. hirtum*, *T. resupinatum*, *T. pratense* and *T. repens* strains were isolated from nodulated plants collected in different areas of the IX Region.

Effectiveness tests were carried out by inoculating *T. incarnatum*, *T. alexandrinum* and *T. pratense* plants developed in tubes with agar medium, controlling them with and without nitrogen. The tubes were kept for five weeks in a bioclimatic chamber, controlling the temperature, light and environmental humidity.

The results show the existence of highly effective strains that exceed the nitrogen controls. It is therefore necessary to continue the evaluation with more promising *Rhizobium* strains, first in greenhouse and then in the field, in order to obtain an inoculant subject to be recommended for these species.

Key words: *Rhizobium*, *Trifolium*, isolation, effectiveness.

INTRODUCCIÓN

La novena Región posee una superficie cercana a las 900.000 ha ocupadas por praderas (INE, 1989), que constituyen la base de la alimentación de su ganadería.

En la IX Región, el trébol rosado representa un 50% del total de las praderas sembradas (INE 1982; Ortega, 1990). Otra forrajera de amplia distribución, principalmente en el secano de los suelos rojo arcillosos, es el trébol encarnado, que se ha transformado en la especie de mayor aceptación por los agricultores de esta área (Demanet, Contreras, y García, 1991).

Como una alternativa al uso de estas leguminosas, se han evaluado diversos tréboles de comportamiento anual destinados a ser utilizados con igual objetivo, pero que poseen características de crecimiento y desarrollo diferentes.

Estudios previos señalan que los *Rhizobium* se encontrarían en número suficiente para realizar su actividad fijadora en trébol blanco y rosado (INIA, 1971), y que estas cepas nativas o naturalizadas presentes en los diversos suelos serían relativamente efectivas (Torres y Urzúa, 1983; Urzúa y Torres, 1985).

Cuando se desea introducir leguminosas exóticas en nuevos ambientes, éstas pueden no encontrar cepas efectivas de *Rhizobium*, o no nodular efectivamente con cepas disponibles en los inoculantes comerciales. Esto puede evitarse si se dispone de cepas de *Rhizobium* genéticamente compatibles con la planta hospedera y adaptadas a las condiciones edafoclimáticas del lugar (Vincent, 1982).

Los objetivos de esta investigación fueron aislar cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* a partir de plantas noduladas de tréboles anuales, bianuales y perennes, recolectadas desde los jardines de introducción, ubicados en las zonas agroecológicas de precordillera andina, secano interior, valle central y secano costero de la IX Región, (Rouanet, 1983) y determinar la

¹Recepción de originales: 20 de enero de 1994.

Estudio realizado con el aporte del Proyecto FIA "Economía del N y otros nutrientes".

²Centro Regional de Investigación Carillanca (INIA). Casilla 58-D. Temuco, Chile.

capacidad para fijar nitrógeno de estas cepas en condiciones controladas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de cepas de *Rhizobium*

El aislamiento de cepas del género *Rhizobium* se realizó a partir de plantas noduladas de *Trifolium incarnatum* L. (trébol encarnado), *T. alexandrinum* L. (trébol alejandrino), *T. subterraneum* L. (trébol subterráneo), *T. hirtum* All. (trébol rosa), *T. resupinatum* L. (trébol persa), *T. pratense* L. (trébol rosado) y *T. repens* L. (trébol blanco) desde los jardines de introducción de estas especies que no se inocularon artificialmente al momento de la siembra. Los sitios de muestreo se señalan en el Cuadro 1.

Se seleccionaron aquellos nódulos de mayor tamaño y de color rosado. El aislamiento de los *Rhizobium* se realizó en agar manitol-extracto de levadura, siguiéndose la metodología recomenda-

da por Vincent (1975). Las cepas así obtenidas se mantuvieron a 4 °C hasta su utilización como inóculo.

También, se incluyeron cepas procedentes de otras colecciones, caracterizadas por su buena efectividad fijadora de nitrógeno (cepas 017, 018, 020 y 021) (Cuadro 1).

Evaluación de la efectividad

Para proceder a determinar la efectividad de las cepas de *Rhizobium* obtenidas se utilizaron tubos de ensayo con 30 ml de solución nutritiva que contenía 0,7 g de agar-agar/L medio, sin nitrógeno (Vincent, 1975). La efectividad, según este autor, se define como

$$E = \log x_i - \log c,$$

donde:

x_i : N acumulado por cepa "i",

c: N acumulado por testigo sin inoculación.

CUADRO 1. Lugares de muestreo y hospederos de las cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* evaluadas

TABLE 1. Sampling and host areas in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* strains evaluated

| Cepa | Lugar | Área agroecológica | Hospedero |
|------|----------------------|--------------------|--------------------|
| 301 | Curacautín | Precordillera | Trébol encarnado |
| 305 | Traiguén | Secano interior | Trébol encarnado |
| 308 | Chufquén | Secano interior | Trébol encarnado |
| 309 | Chufquén | Secano interior | Trébol encarnado |
| 310 | Chufquén | Secano interior | Trébol encarnado |
| 311 | Chufquén | Secano interior | Trébol encarnado |
| 312 | Galvarino | Secano interior | Trébol encarnado |
| 313 | Carillanca | Valle central | Trébol encarnado |
| 315 | Curacautín | Precordillera | Trébol encarnado |
| 402 | Traiguén | Secano interior | Trébol alejandrino |
| 403 | Chufquén | Secano interior | Trébol alejandrino |
| 407 | Chufquén | Secano interior | Trébol alejandrino |
| 409 | Carillanca | Valle central | Trébol alejandrino |
| 502 | Chufquén | Secano interior | Trébol rosa |
| 503 | Carillanca | Valle central | Trébol rosa |
| 601 | Traiguén | Secano interior | Trébol persa |
| 603 | Carillanca | Valle central | Trébol persa |
| 604 | Curacautín | Precordillera | Trébol persa |
| 210 | Inoculante comercial | | Trébol subterráneo |
| 102 | Curacautín | Precordillera | Trébol rosado |
| 004 | Pidima | Secano interior | Trébol blanco |
| 005 | Toltén | Secano costero | Trébol blanco |
| 006 | Traiguén | Secano interior | Trébol blanco |
| 008 | Traiguén | Secano interior | Trébol blanco |
| 017 | Australia | | Trébol blanco |
| 018 | Nitragin Co., EE.UU. | | Trébol blanco |
| 020 | Uruguay | | Trébol blanco |
| 021 | Nitragin Co., EE.UU. | | Trébol blanco |

Debido a que existe inoculación cruzada entre las especies de trébol (Burton, 1985), aquellas cepas aisladas desde trébol encarnado fueron inoculadas en esa especie vegetal, las aisladas desde trébol alejandrino, trébol subterráneo, trébol rosa y trébol persa, fueron evaluadas sobre trébol alejandrino; y las aisladas desde trébol rosado y trébol blanco fueron evaluadas sobre trébol rosado.

Semillas sanas, limpias y de tamaño uniforme de trébol encarnado, alejandrino y rosado se esterilizaron superficialmente, con bicloruro de mercurio (0,1%) y se sembraron en los tubos a 0,3 cm de profundidad. Luego, se incubaron en cámara bioclimática a 24 °C, con 70% de humedad relativa y 16 horas luz.

La inoculación se efectuó 4 días después de la siembra, eligiéndose una planta por tubo, sana, vigorosa y todas de tamaño uniforme. Cada planta se inoculó con 1,0 ml de la suspensión del *Rhizobium* a ensayar con una concentración de, al menos, 1×10^5 cel/ml.

Como testigos se emplearon plantas que sólo se inocularon con 1,0 ml de solución peptonada (T_0) y plantas a las que se le agregó nitrógeno (T_N)

en la forma de nitrato de potasio (0,75 g/L), semanalmente.

El diseño del ensayo fue completamente al azar, utilizando cinco repeticiones por tratamiento. Cinco semanas después de la inoculación se evaluó la producción de materia seca de las plantas y el contenido de nitrógeno de la parte aérea.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La totalidad de las plantas recolectadas presentaron nodulación, lo que sugiere que existen bacterias infectivas en los suelos de las diferentes áreas agroecológicas en donde se hicieron los muestreos.

Los resultados de la evaluación de la efectividad de cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*, en trébol encarnado, alejandrino y rosado, expresados como producción de materia seca, acumulación de nitrógeno y efectividad en base a N acumulado, se detallan en los cuadros 2, 3 y 4, respectivamente.

La evaluación de diferentes cepas de *Rhizobium* sobre la efectividad de la fijación de nitrógeno en trébol encarnado (Cuadro 2), permite observar

CUADRO 2. Efecto de diferentes cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* sobre la efectividad de la fijación de N en trébol encarnado

TABLE 2. Effect of different strains of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* on the effectiveness of the N fixation in crimson clover

| Cepas | Producción materia seca | | Nitrógeno acumulado | Efectividad (E) |
|----------------------|-------------------------|--|---------------------|-----------------|
| | mg/planta | | | |
| T_0 sin inoculante | 8,54 f ¹ | | 0,25 e | 0,0 e |
| Cepas 301 | 31,04 ab | | 0,98 a | 0,57 a |
| 302 | 20,58 bcde | | 0,30 e | 0,07 def |
| 303 | 19,12 cdef | | 0,30 e | 0,07 def |
| 304 | 15,86 ef | | 0,35 de | 0,04 ef |
| 305 | 32,52 a | | 0,91 ab | 0,53 a |
| 306 | 18,46 ef | | 0,21 e | 0,0 f |
| 308 | 29,72 abcd | | 0,65 bcd | 0,38 abc |
| 309 | 25,14 abcde | | 0,72 abc | 0,44 abc |
| 310 | 19,68 cde | | 0,45 cde | 0,21 bcde |
| 311 | 30,04 abc | | 0,76 ab | 0,48 ab |
| 312 | 27,10 abcde | | 0,83 ab | 0,52 a |
| 313 | 19,06 cdef | | 0,41 de | 0,17 bcde |
| 314 | 16,62 ef | | 0,28 e | 0,05 def |
| 315 | 23,60 abcde | | 0,64 bcd | 0,34 abcd |
| T_N | 18,70 def | | 0,37 de | 0,15 cde |

¹Cifras con distinta letra en sentido vertical son estadísticamente diferentes ($P \leq 0,05$), según Prueba de Duncan.

CUADRO 3. Efecto de diferentes cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* sobre la efectividad de la fijación de N en trébol alejandrino

TABLE 3. Effect of different strains of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* on the effectiveness of the N fixation in berseem clover

| Cepas | Producción materia seca mg/planta | Nitrógeno acumulado | Efectividad (E) |
|-------------------------------|---|------------------------|--------------------|
| T ₀ sin inoculante | 2,60 f ¹ | 0,16 e | 0,00 d |
| Cepas 210 | 32,20 abcde | 1,16 abcd | 0,85 ab |
| 401 | 24,60 de | 0,78 cd | 0,67 abc |
| 402 | 39,00 abcd | 1,35 abc | 0,91 ab |
| 403 | 27,20 de | 1,02 abcd | 0,90 ab |
| 407 | 41,80 abc | 1,47 ab | 0,96 ab |
| 408 | 21,40 e | 1,02 abcd | 0,76 abc |
| 409 | 44,40 a | 1,45 ab | 0,92 ab |
| 410 | 29,40 bcde | 0,95 bcd | 0,51 c |
| 502 | 35,80 abcde | 1,18 abcd | 0,86 ab |
| 503 | 43,60 ab | 1,63 a | 1,01 a |
| 504 | 28,60 cde | 0,93 bcd | 0,75 abc |
| 601 | 38,80 abcd | 1,47 ab | 0,96 ab |
| 603 | 26,60 de | 0,77 cd | 0,90 ab |
| 604 | 38,00 abcd | 1,46 ab | 0,95 ab |
| T _N | 25,60 de | 0,57 de | 0,64 bc |

¹Cifras con distintas letras en sentido vertical son estadísticamente diferentes ($P \leq 0,05$), según Prueba de Duncan.

CUADRO 4. Efecto de diferentes cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* sobre la efectividad de la fijación de N en trébol rosado

TABLE 4. Effect of different strains of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* on the effectiveness of the N fixation in red clover

| Cepas | Producción materia seca mg/planta | Nitrógeno acumulado | Efectividad (E) |
|-------------------------------|---|------------------------|--------------------|
| T ₀ sin inoculante | 6,4 c ¹ | 0,12 c | 0,00 d |
| Cepas 004 | 50,2 a | 1,57 a | 1,11 a |
| 005 | 50,0 a | 1,51 a | 1,09 a |
| 006 | 13,4 c | 0,45 c | 0,63 c |
| 008 | 54,4 a | 1,64 a | 1,12 a |
| 102 | 54,4 a | 1,69 a | 1,15 a |
| 017 | 6,4 de | 0,11 d | 0,25 d |
| 018 | 38,8 b | 1,19 b | 1,31 a |
| 020 | 35,0 bc | 1,07 b | 1,27 ab |
| 021 | 9,0 de | 0,18 d | 0,38 d |
| T _N | 29,4 b | 0,96 b | 0,90 b |

¹Cifras con distintas letras en sentido vertical son estadísticamente diferentes ($P \leq 0,05$), según Prueba de Duncan.

que las cepas 305 y 301, correspondientes a aislamientos desde nódulos de trébol encarnado en la zona de Traiguén y Curacautín, respectivamente, destacan por la alta respuesta, tanto en producción de materia seca (>30 mg/planta), acumulación de nitrógeno (>0,8 mg/planta) y efectividad (>0,5). Por otra parte, la cepa 311, procedente de Chufquén, presenta sólo una producción de materia seca destacada (>30 mg/planta).

Los rendimientos de las cepas mencionadas son significativamente diferentes y superiores a las del testigo con nitrógeno mineral, cuyos resultados se observaron entre los niveles de respuesta más bajos.

La evaluación de las cepas en trébol alejandrino (Cuadro 3), permite observar que la cepa 503, aislada desde suelos de Carillanca, cuyo hospedero era trébol rosa, tiene las mejores respuestas en acumulación de nitrógeno y efectividad.

Cabe destacar que la cepa 210, que corresponde a una cepa aislada desde un inoculante comercial para trébol subterráneo, presenta un comportamiento superior al testigo nitrogenado en los tres parámetros evaluados. Pero, las cepas aisladas desde nódulos de trébol rosa (503) y trébol alejandrino (409 y 407), procedentes de Carillanca y Chufquén, respectivamente, son superiores a esta cepa presente en los inoculantes.

Al considerar el efecto de diferentes cepas de *Rhizobium* sobre la efectividad de la fijación de N en trébol rosado (Cuadro 4), la respuesta más alta se obtiene con las cepas 102 de trébol rosado, 008, 004 y 005 de trébol blanco, correspondientes a aislamientos desde los lugares Curacautín, Traiguén, Pidima y Toltén, respectivamente, con producciones de materia seca superiores a 50 mg/planta, acumulaciones de nitrógeno superiores a 1,5 mg/planta, y con efectividades superiores a 1,0. Los rendimientos de estas cepas resultan ser significativamente diferentes y superiores a las respuestas obtenidas con el testigo que recibió nitrógeno mineral.

Es importante destacar, que en esta evaluación se incluyeron cuatro cepas como controles introducidos (017, 018, 020 y 021), caracterizados por sus buenas condiciones para fijar nitrógeno atmosférico. Sin embargo, las cepas 017 y 021 presentaron un comportamiento significativamente diferente e inferior al testigo nitrogenado y a las demás cepas naturalizadas e introducidas.

También, se debe hacer notar que las cepas evaluadas sobre trébol rosado tienen la más alta

respuesta en los parámetros evaluados, y aquellas que tienen como hospedero trébol encarnado son las que presentan la más baja respuesta, lo que tal vez se debería a la mejor adaptación y distribución del trébol rosado en la región.

En general, hay cepas nativas que aparecen como muy promisorias para ser evaluadas en invernadero y campo, a fin de determinar la potencialidad de ser empleadas como inoculantes para estas leguminosas.

Además, en estos resultados, se puede apreciar la superioridad que se observa en las cepas nativas o naturalizadas, en lo que se refiere a efectividad, frente a cepas de colección. Esto, concuerda con lo señalado por otros investigadores (Urzúa y Torres, 1985; Naour *et al.*, 1987), quienes también manifiestan la superioridad de la efectividad de las cepas nativas o naturalizadas frente a las cepas de colección o introducidas.

Estos resultados también indican que, los suelos de la IX Región presentan una abundante población de *Rhizobium* nativos o naturalizados, que poseen una buena capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, si no existen otras condiciones que limiten este proceso. En este punto hay que tener presente, que la presencia de *R. trifolii* en los suelos da poca seguridad que una especie o cultivar de trébol introducida será nodulada efectivamente, a menos que se le suministre la cepa de *Rhizobium* apropiada en la forma de inoculante. Además, es importante recordar que el principal interés agronómico no es la ocurrencia de *R. trifolii* como tal, sino más bien el obtener nódulos que fijen nitrógeno activamente en una especie de trébol en particular.

Todo esto sugiere que, además de seleccionar aquellas cepas más efectivas en el proceso de fijación de nitrógeno atmosférico, es primordial determinar qué factores ambientales son los que estarían limitando su correcto funcionamiento a fin de obtener todas las ventajas y beneficios de un buen proceso simbiótico.

Por este mismo motivo, es que las pruebas de efectividad, efectuadas bajo condiciones controladas, sólo forman parte de una primera e importante etapa dentro de un programa de selección de cepas, que posteriormente deberá continuar con la evaluación de los otros parámetros de eficiencia de las bacterias del género *Rhizobium*, tales como su habilidad para colonizar y nodular las raíces, su capacidad de multiplicación en el suelo y de competir con el resto de la flora existente en ellos, entre otros.

RESUMEN

En el secano de la IX Región de Chile, *Trifolium pratense* y *T. incarnatum* son las leguminosas de mayor distribución. Como alternativa de uso de dichas especies, se ha iniciado una línea de investigación que considera diversos tréboles de comportamiento anual. Sin embargo, en el país no se dispone de cepas de *Rhizobium* apropiadas para la inoculación de dichos tréboles. Por este motivo se aislaron cepas a partir de plantas noduladas de *T. incarnatum*, *T. alexandrinum*, *T. subterraneum*, *T. hirtum*, *T. resupinatum*, *T. pratense* y *T. repens*, recolectadas en diferentes localidades de la IX Región.

Los ensayos de efectividad se realizaron inoculando plántulas de *T. incarnatum*, *T. alexandrinum* y *T. pratense*, desarrolladas en tubos con

solución nutritiva adicionada de agar, utilizándose controles con y sin nitrógeno. Los tubos se mantuvieron durante cinco semanas en cámara bioclimática, con control de temperatura, luminosidad y humedad ambiental.

Los resultados indican que existen cepas altamente efectivas, que superan a los controles nitrogenados e introducidos, haciéndose necesario continuar la evaluación con aquellas cepas de *Rhizobium* más promisorias en invernadero y luego en el campo, a fin de obtener un inoculante que pueda ser recomendado para estas especies vegetales.

Palabras claves: *Rhizobium*, *Trifolium*, aislamiento, efectividad.

LITERATURA CITADA

- BURTON, J.C. 1985. *Rhizobium* relationships. In: Taylor, N.L. (ed.). Clover science and technology. American Society of Agronomy. Madison, U.S.A. Agronomy Series 25. p.: 161-184.
- DEMANET F., R.; CONTRERAS D., R. y GARCÍA D., J. 1991. Trébol encarnado: normas técnicas para mejorar su productividad. Investigación y Progreso Agropecuario Carillanca 10(1): 3-6.
- INIA-INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS. 1971. La investigación agropecuaria. INIA. Santiago, Chile. 446 p.
- INE-INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICAS, CHILE. 1982. Compendio Estadístico 1982. INE. Santiago, Chile. 57 p.
- INE-INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICAS, CHILE. 1989. Estadísticas Agropecuarias. Año agrícola 1988/1989. INE. Santiago, Chile. 47 p.
- NAOUR, E.; MILLAR, H.; POZA, L. y MORAGA, E. 1987. Efectividad de cepas de *Rhizobium trifolii* aisladas de praderas de la IX Región. Sociedad Chilena de la Ciencia del Suelo. V Simposio Nacional de la Ciencia del Suelo. Valparaíso, 26 al 28 de octubre. p.: 153-156.
- ORTEGA K., F. 1990. Qué pasa con el trébol rosado "Quiñequeli". Investigación y Progreso Agropecuario Carillanca (Chile) 9(4): 25-27.
- ROUANET M., J.L. 1983. Clasificación agroclimática de la IX Región. Investigación y Progreso Agropecuario Carillanca (Chile) 2(2): 23-26.
- TORRES, M.E. y URZÚA, H. 1983. Fijación simbiótica de nitrógeno en pradera de la zona sur de Chile. I. Selección de cepas de *Rhizobium trifolii* utilizando pruebas de efectividad en tubos. Ciencia e Investigación Agraria 10: 223-230.
- URZÚA, H. y TORRES, M.E. 1985. Fijación simbiótica de nitrógeno en praderas de la zona sur de Chile. II. Respuesta del trébol blanco y rosado a la inoculación con cepas efectivas de *Rhizobium trifolii* en suelos derivados de cenizas volcánicas. Ciencia e Investigación Agraria 12: 15-21.
- VINCENT, J.M. 1975. Manual práctico de rizobiología. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires. 200 p.
- VINCENT, J.M. 1982. Nitrogen fixation in legumes. Academic Press. Sidney, Australia. 288 p.