INVESTIGACIÓN

EFECTIVIDAD SIMBIÓTICA DE CEPAS NATURALIZADAS DE *Mesorhizobium loti* Y *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) EN PLANTAS DE TRES ESPECIES DEL GÉNERO *Lotus*[1]

Symbiotic effectiveness of indigenous strains of *Mesorhizobium loti* and *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) in three *Lotus* plant species

Leticia Barrientos[2], Marcelo Higuera[3], Hernán Acuña[4], Jaime Guerrero[5], Fernando Ortega[2] e Ivette Seguel[2]

ABSTRACT

Lotus species are very important for their interesting agricultural potential, their capacity to fix atmospheric nitrogen and adaptation to low input agricultural systems. In this study, the most utilized species in the country were used: *L. corniculatus* or birdsfoot trefoil, *L. glaber* or narrowleaf trefoil, and *L. uliginosus* or big trefoil. With the objective of determining the nitrogen fixation capacity and comparatively evaluating the symbiotic fixation of the different strains, a trial under controlled conditions was conducted with 68 indigenous strains of *Mesorhizobium loti* and *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*). Culture tubes with Norris and Date solution without nitrogen were utilized. Emerging seedlings were inoculated with one of the native strains and evaluated 45 days after inoculation. Plants without nitrogen and with nitrogen were utilized as controls. The plants were cultivated in a controlled environment with a photoperiod of 16:8 (light: dark), at 24 °C and 70% relative humidity. Of the evaluated strains, 60% were not capable of forming nodules in the *Lotus* species after inoculation. For *L. glaber* three strains were selected as being the most efficient, corresponding to 61, 65 and 66 identified as *Mesorhizobium loti*. For *L. uliginosus,* strains 38 and 52, identified as *Bradyrhizobium* sp., were selected as the most effective.

Key words: nitrogen fixation efficiency, rhizobial strains, *Lotus corniculatus, L. glaber, L. uliginosus*.

RESUMEN

La lotera destaca en nuestro medio con un interesante potencial agrícola, por su capacidad fijadora de nitrógeno atmosférico y valioso aporte a los sistemas agropecuarios de bajos insumos. En este estudio se trabajó con las especies más utilizadas en el país: *Lotus corniculatus* L. o lotera de hoja ancha, *Lotus glaber* o lotera de hoja angosta, y *Lotus uliginosus* o alfalfa chilota. Con el objetivo de determinar la capacidad de fijar nitrógeno y evaluar en forma comparativa la eficiencia de la fijación simbiótica de distintas cepas, se realizó un ensayo bajo condiciones controladas con 68 cepas naturalizadas de *Mesorhizobium loti* y *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*). Para ello se utilizaron

[1]Recepción de originales: 28 de febrero de 2001.
Estudio contemplado en las actividades del PROYECTO FONDECYT 1980003.
[2]Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Carillanca, Casilla 58-D, Temuco, Chile. E-mail: lbarrien@carillanca.inia.cl
[3]Tesis Ingeniero Agrónomo, Universidad de La Frontera, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales, Temuco, Chile.
[4]Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Quilamapu, Casilla 426, Chillán, Chile.
[5]Universidad de La Frontera, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales, Casilla 54–D, Temuco, Chile.

tubos con solución nutritiva (agarizada) de Norris y Date, sin nitrógeno. Las plantas se inocularon con cada una de las cepas nativas y la evaluación se realizó 45 días después de la inoculación. Como controles se emplearon testigos sin nitrógeno y con nitrógeno. Las plantas crecieron en ambiente controlado con un fotoperíodo de 16:8 (luz: oscuridad), a 24 °C y 70% de humedad relativa. Un 60% de las cepas evaluadas no fueron capaces de inducir la formación de nódulos sobre las especies de *Lotus* en las cuales fueron inoculadas. Para *L. glaber* se seleccionaron tres cepas como las más eficientes en la fijación de nitrógeno atmosférico, que correspondieronen a las 61, 65 y 66 identificadas como *Mesorhizobium loti*. Para *L. uliginosus* se seleccionaron las cepas 38 y 52, correspondientes a *Bradyrhizobium*, sp. como las más efectivas.

Palabras clave: eficiencia de fijación de nitrógeno, cepas de rizobios, *Lotus corniculatus, L. glaber, L. uliginosus*.

INTRODUCCIÓN

Las leguminosas son particularmente importantes debido a su habilidad para fijar nitrógeno atmosférico en simbiosis con *Rhizobium*, bacterias que nodulan sus raíces, así como por su alto valor nutricional como alimentos para humanos y como forrajes para animales. La fijación biológica de nitrógeno en los cultivos de leguminosas resulta cada vez más importante en vista de los esfuerzos para desarrollar una producción agrícola más económica y sostenible.

El potencial forrajero de algunas especies del género *Lotus*, su buena adaptación a suelos de baja fertilidad, su capacidad de fijar N y otras características, como su alto contenido de taninos que evita que se produzca meteorismo en los animales (Montes, 1988; Langer, 1990), destacan a esta especie como una forrajera importante de estudiar e introducir en algunos sectores de la zona centro-sur y sur del país.

En Chile, las especies de importancia forrajera del género *Lotus* son *Lotus corniculatus* L., conocida como lotera de hoja ancha, *L. uliginosus* Schk. (*L. pedunculatus* Cav.) o alfalfa chilota, y *L. glaber* Mill. (*L. tenuis* Wald et Kit.) o lotera de hoja angosta (Acuña, 1998). La tercera está presente en forma natural en praderas de la zona central del país y hace una importante contribución a la producción forrajera, especialmente durante la temporada estival, en suelos arcillosos que eventualmente reciben agua de riego. La lotera de hoja ancha es de crecimiento erecto, con un sistema radical profundizador; se adapta a suelos imperfectamente drenados o con restricciones de humedad en algunos períodos (Acuña, 1998). La lotera de hoja angosta es de crecimiento postrado y desarrolla una corona en su tallo principal, de la cual se originan ramas laterales de crecimiento indefinido; la raíz es pivotante de características similares a la lotera de hoja ancha (Miñon *et al.*, 1990); crece en forma espontánea en los suelos de la zona arrocera y otros de la VIII Región, pero no ha sido cultivada en Chile. Ambas crecen en suelos con pH igual o superior a 5,8-6,0. Por otro lado, la alfalfa chilota es una planta de raíz profundizadora, que desde su corona produce numerosos tallos erectos durante la temporada de crecimiento; crece bien en suelos de baja fertilidad, con exceso de agua y elevada acidez (Acuña, 1998; Langer, 1990).

Cuando se desea introducir y establecer leguminosas en nuevos ambientes, no siempre se encuentran cepas efectivas de rizobios. Esta situación puede evitarse si se dispone de cepas de bacterias fijadoras de nitrógeno, que pueden ser inoculadas favoreciendo el desarrollo y rendimiento de las praderas con leguminosas, en este caso del género *Lotus*. Dentro de las *Rhizobiaceae*, las bacterias capaces de nodular las especies de *Lotus* incluyen tanto cepas de crecimiento intermedio (*Mesorhizobium loti*) como de crecimiento lento (*Bradyrhizobium* sp.) (Jordan, 1982, 1994; Jarvis *et al.*, 1997).

Con estos antecedentes se diseñó una investigación en la cual se planteó como objetivo aislar y seleccionar cepas naturalizadas eficientes de *Mesorhizobium loti* y *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*), provenientes de colectas realizadas en la VIII, IX, X y XI regiones de Chile, a partir de plantas noduladas del género *Lotus* (*L. corniculatus, L. glaber* y *L. uliginosus*).

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología de Suelos del Centro Regional de Investigación Carillanca, del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), ubicado cerca de Temuco, IX Región, Chile.

A partir de plantas noduladas correspondientes a *L. corniculatus, L. glaber* y *L. uliginosus,* colectadas en los suelos de la zona centro-sur (VIII, IX, X y XI regiones de Chile), se aislaron cepas naturalizadas de *Mesorhizobium loti* y *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*). El aislamiento de las cepas de *Mesorhizobium* y *Bradyrhizobium* a partir de los nódulos, se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Vincent (1975).

La evaluación de la efectividad de la fijación de N se realizó en tubos cerrados de acuerdo a la metodología propuesta por Vincent (1975). El material vegetal utilizado correspondió a loteras de los cultivares Quimey (*L. corniculatus*), Toba (*L. glaber*) y Maku (*L. uliginosus*), en las cuales se evaluó un total de 68 cepas de *Mesorhizobium* y/o *Bradyrhizobium* sp., obtenidas de las colectas de germoplasma naturalizado de estas especies, cuya procedencia y hospedero se indican en el Cuadro 1.

Previo a la inoculación con las cepas colectadas se efectuó una desinfección y escarificación superficial de las semillas, sumergiéndolas en una solución concentrada de ácido sulfúrico (H_2SO_4, 95-97%) durante 30 min, y 10 lavados con agua destilada estéril. La inoculación se efectuó siete días posteriores a la siembra. Para ello se eligieron cinco plantas de cada una de las variedades, las que se inocularon con cada una de las cepas a evaluar (68). Cada planta recibió 1 mL de una suspensión de 1 x 10^8 *M. loti* o *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) mL^{-1}. Las plantas crecieron en ambiente controlado durante 45 días, con un fotoperíodo de 16 h de luz, a 24 °C y 70% de humedad atmosférica. Como testigos se emplearon cinco repeticiones sin inoculante y sin N (T0), y el mismo número de repeticiones de un testigo sin inoculante y con N (TN), que recibió cada 15 días una solución de nitrato de potasio (0,75 g N L^{-1}).

Cuadro 1. Regiones de colecta y hospederos a partir de los cuales se aislaron las cepas naturalizadas de *Mesorhizobium loti* y/o *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*)

Table 1. Regions of collection and hosts from which indigenous strains of *Mesorhizobium loti* and/or *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) were isolated

Identificación	Región de colecta	Hospedero
1 – 30	IX – X	*L. uliginosus*
31 – 59	X – XI	*L. uliginosus*
60 – 68	VIII	*L. glaber*

En cada tratamiento se determinó el tamaño, color y número de los nódulos por planta, producción de materia seca (MS) y el contenido de N de la parte aérea, cuarenta y cinco días después de la inoculación. El peso seco de la parte aérea de las loteras fue usado para calcular la producción relativa (PR), definida como PR= I/N, donde I es la producción de MS en las plantas inoculadas, y N es la producción de MS en las plantas no inoculadas, pero que recibieron nitrógeno. Una producción relativa < 1 indica que la fijación de nitrógeno no fue suficiente para cubrir los requerimientos de nitrógeno de la planta (Bordeleau *et al.*, 1977). Otro criterio de efectividad que se utilizó fue el señalado por Vincent (1975), donde $E = \log x_i - \log c$, donde x_i corresponde al nitrógeno acumulado por la cepa "i", y c es el N acumulado por el testigo sin inoculación y sin nitrógeno. Se consideró como eficiente aquella cepa

que presentó igual o mejor desarrollo que el testigo con N.

El diseño fue completamente al azar. Los datos experimentales fueron procesados mediante análisis de varianza y prueba de Tukey, utilizando el programa estadístico SAS (1989).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este estudio se determinó que un 60% de las cepas procedentes de los hospederos naturales *L. uliginosus* y *L. glaber* recolectados desde la VIII, IX, X y XI regiones, no indujeron la formación de nódulos en las tres especies de lotera evaluadas. Algunas de estas cepas (1 a 30) estuvieron almacenadas en cámara fría desde el año 1991, y fueron sometidas a sucesivos repiques en medio levadura-manitol para la mantención del cepario, por lo que podría haber pérdida de efectividad, como consecuencia de lo anterior, debido a mutaciones espontáneas, que afectarían tanto la infectividad como la efectividad de los rizobios (Date, 1982). Distinguir entre la inestabilidad genética inherente o inducida por el medio ambiente en una cepa de rizobio es difícil. Se ha demostrado que una colonia aislada de cultivos parentales mantenidos en condiciones de laboratorio muestran nodulación disminuida, efectividad simbiótica variable y aún pérdida de invasividad (Jansen y Strijdom, 1985).

Para cepas naturalizadas de *Rhizobium meliloti* Gili *et al.* (1997) reportaron, que sólo uno de cada cinco aislamientos tenía capacidad infectiva y efectiva genéticamente estable, y un 82% de las cepas de esta especie no conservaron en el tiempo su capacidad para fijar N en alfalfa. Por otra parte, Sullivan *et al.* (1996) señalaron que las propiedades simbióticas de algunos rizobios son genéticamente inestables, surgiendo la posibilidad que rizobios no simbióticos sean un componente significativo de las poblaciones rizobianas de los suelos.

Los resultados de la evaluación de las cepas de *Mesorhizobium loti* o *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) sobre la nodulación, materia seca aérea y efectividad simbiótica en *L. corniculatus* cv. Quimey, *L. glaber* cv. Toba y *L. uliginosus* cv. Maku, se presentan en los cuadros 2, 3 y 4, respectivamente.

Se observó que en *L. corniculatus* sólo tres de las 68 cepas naturalizadas evaluadas indujeron la formación de nódulos, lo que corresponde a 7% del total. Estas son las cepas de *Mesorhizobium loti* identificadas como 61, 63 y 65 aisladas del hospedero *L. glaber*. El número de nódulos formados fue muy bajo y no existieron diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$) entre estas cepas (Cuadro 2). En la evaluación de la efectividad o capacidad simbiótica de las cepas,

Cuadro 2. Propiedades simbióticas de tres cepas de *Mesorhizobium loti* inoculadas en *Lotus corniculatus* cv. Quimey

Table 2. Symbiotic properties of three strains of *Mesorhizobium loti* inoculated on *Lotus corniculatus* cv. Quimey

Cepas de *R. loti*	Materia seca[1] (mg)*	Producción relativa (PR)	Efectividad (E)	Nódulos[1]
61	3,5 b	0,20	0,03	1
63	3,6 b	0,21	0,03	1
65	3,6 b	0,21	0,04	1
Testigo (con N)	17,2 a	–	0,63	NN[2]
Testigo (sin N)	3,1 b	–	–	NN

*Valores con letra distinta son estadísticamente diferentes según la Prueba de Tukey ($P < 0,05$).
[1]Promedio de cinco plantas.
[2]NN= no nodulada.

Cuadro 3. Propiedades simbióticas de 11 cepas de *Mesorhizobium loti* o *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) inoculadas en *L. glaber* cv. Toba

Table 3. Symbiotic properties of 11 strains of *Mesorhizobium loti* or *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) inoculated on *L. glaber* cv. Toba

Cepas de *R. loti* y/o *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*)	Materia seca[1] (mg)*	Producción relativa (PR)	Efectividad (E)	Nódulos[1]
29	4,3 d	0,28	0,07	10,6 a
30	3,7 d	0,25	0,02	9,6 ab
32	4,2 d	0,28	0,06	7,6 ab
33	4,1 d	0,27	0,05	6,0 ab
34	3,5 d	0,23	0,02	3,4 ab
35	3,7 d	0,25	0,02	2,4 b
36	4,1 d	0,27	0,04	5,2 ab
61	13,9 bc	0,93	0,71	5,4 ab
64	4,9 d	0,32	0,33	1,3 ab
65	8,3 bcd	0,55	0,58	5,0 ab
66	30,1 a	2,00	0,96	5,3 ab
Testigo (con N)	15,1 b	–	0,60	NN[2]
Testigo (sin N)	2,9 d	–	–	NN

*Valores con letra distinta son estadísticamente diferentes según la Prueba de Tukey ($P < 0,05$).
[1]Promedio de cinco plantas.
[2]NN= no nodulada.

calculada según los criterios empleados, producción relativa de materia seca, y la estimación propuesta por Vincent (1975), utilizando los datos de acumulación de nitrógeno de la parte aérea, se pudo apreciar que las tres cepas presentaron una respuesta similar y muy por debajo del testigo que recibió nitrógeno mineral en la cantidad no limitante para su desarrollo, no encontrándose ninguna cepa efectiva para fijar nitrógeno en esta especie.

En otra investigación realizada en Chile, pero en trébol rosado (*Trifolium pratense)*, Urzúa y Torres (1985) también señalaron que las bajas mediciones obtenidas en peso seco de la parte aérea y radical son el resultado de nódulos inefectivos.

En la Figura 1 se puede apreciar la acción de la cepa de *Mesorhizobium loti* 61 en lotera del cv. Quimey, con escasa nodulación y poco desarrollo aéreo y radical, similar al desarrollo del testigo sin nitrógeno (TO) y menor al desarrollo del testigo con nitrógeno mineral (TN), lo que demuestra su inefectividad.

En los resultados de la inoculación en *L. glaber* cv. Toba (Cuadro 3), fue posible apreciar que sólo 11 de las 68 cepas evaluadas indujeron la formación de nódulos, lo que corresponde a un 16% del total. Estas son las cepas identificadas como 29, 30, 32, 33, 34, 35 y 36, que corresponderían a *Bradyrhizobium* sp., y 61, 64, 65 y 66 que corresponderían a *M. loti*, aisladas a partir de los hospederos naturales *L. uliginosus* y *L. glaber,* respectivamente. El número de nódulos formados después de la inoculación con estas cepas no mostró diferencias significativas.

Las plantas inoculadas con las cepas 61, 65 y 66 formaron nódulos grandes (3 a 5 mm de diámetro), de color rojizo en su interior, de forma regular y distribuidos a lo largo de toda la raíz principal, lo que coincidió con las características

Cuadro 4. Propiedades simbióticas de 15 cepas de *Mesorhizobium loti* o *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) inoculadas en *L. uliginosus* cv. Maku.
Table 4. Symbiotic properties of 15 strains of *Mesorhizobium loti* or *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) inoculated on *L. uliginosus* cv. Maku.

Cepas de *R. loti* y/o *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*)	Materia seca[1] (mg)*	Producción relativa (PR)	Efectividad (E)	Nódulos[1]
31	4,9 bc	0,36	0,25	5,4
32	3,8 c	0,28	0,22	4,6
33	4,5 bc	0,33	0,23	5,2
36	6,4 bc	0,46	0,38	5,4
37	5,3 bc	0,38	0,29	4,6
38	9,7 ba	0,70	0,70	5,2
40	8,0 abc	0,60	0,53	6,2
41	7,4 bc	0,54	0,50	7,8
42	4,8 bc	0,35	0,24	4,4
43	3,3 c	0,24	0,20	3,2
44	5,8 bc	0,42	0,31	4,8
49	4,2 bc	0,30	0,27	4,8
50	8,4 abc	0,61	0,55	5,4
52	8,8 abc	0,64	0,61	5,4
65	3,2 c	0,23	0,07	4,0
Testigo (con N)	13,8 a	–	0,63	NN[2]
Testigo (sin N)	3,1 c	–	–	NN

*Valores con letra distinta son estadísticamente diferentes según la Prueba de Tukey ($P < 0,05$).
[1]Promedio de cinco plantas.
[2]NN= no nodulada.

de una buena nodulación, descritas por Williams (1988) y Cerda (1996) para plantas del género *Lotus*. El período de formación de nódulos ocurrió 19 a 20 días después de la inoculación, coincidiendo con la formación de la primera hoja verdadera, lo que concuerda también, con lo señalado por estos mismos autores.

Las cepas 29, 30, 32, 33, 34, 35 y 36 corresponderían a *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) aisladas desde *L. uliginosus,* en colectas realizadas en la IX, X y XI regiones. De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, poseen solamente capacidad infectiva pero no efectiva sobre *L. glaber*.

A diferencia de Norris (1965), que indicó que las cepas aisladas de *L. uliginosus* no infectan a *L. glaber* y a *L. corniculatus*, la evaluación realizada mostró que algunas de las cepas de *Bradyrhizobium* sp. infectan al primero de estos hospederos, y son capaces de formar nódulos, pero inefectivos, ya que se presentaron en gran número, de tamaño pequeño (<1 mm de diámetro) y blanquecinos (Cuadro 3). Gault *et al.* (1994) señalaron que *Bradyrhizobium* sp. *(Lotus)* es específico sobre *L. uliginosus.*

Al evaluar la efectividad de las diferentes cepas inoculadas en el cv. Toba, se pudo observar que sólo la cepa 66 de *Mesorhizobium loti,* procedente de un aislamiento a partir de nódulos del mismo hospedero es la que sobresalió por su alta efectividad, de acuerdo a los dos criterios empleados. La Figura 2 muestra plantas de *L. glaber* inoculadas con la cepa 66; la inoculación

con esa cepa produjo raíces con abundante nodulación, desarrollando plantas de aspecto saludable y color verde típico. Correspondió a la cepa mejor evaluada en Toba y en las otras dos especies evaluadas, y fue sin duda una cepa altamente efectiva. Le siguió la cepa 61 con la segunda mejor respuesta sobre esta especie. Aun cuando la cepa 65 presentó una efectividad algo inferior a estas otras dos cepas y al testigo nitrogenado, también se destacó por las características de su nodulación. Por el contrario, las cepas 29, 30, 32, 33, 34, 35 y 36 presentaron baja efectividad para la fijación simbiótica de nitrógeno.

Al respecto, también debemos considerar que los taninos condensados, que se sabe están presentes en las especies de *Lotus*, son de composición variable (Pankhurst *et al.*, 1987) y pueden afectar la nodulación de estas especies e indirectamente disminuir la persistencia y calidad de las plantas en distinta magnitud, particularmente en suelos poco fértiles y de mal drenaje; los mismos autores también encontraron que los taninos ricos en delphinidina se acumulaban en las raíces y en nódulos inefectivos de *L. uliginosus*. Ellos sugirieron que tal inefectividad podría deberse a la sensibilidad de las cepas de *rizobios* localizadas en los nódulos a estos compuestos. Las raíces de *L. corniculatus* var. *hirsutus* también contienen un alto nivel de taninos ricos en delphinidina pero éste es menor que en las raíces de *L. uliginosus*. Por el contrario, los taninos condensados presentes en *L. glaber* no contienen delphinidina en su estructura (Pankhurst *et al.*, 1987).

En *L. uliginosus* cv. Maku sólo 15 de las 68 cepas de *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) evaluadas lograron la formación de nódulos, lo que correspondió a un 22% del total. Estas son las cepas identificadas como 31, 32, 33, 36, 37, 38, 40, 41, 42, 43, 44, 49, 50 y 52, que corresponderían a *Bradyrhizobium* sp., aisladas a partir del hospedero natural *L. uliginosus*, procedentes de colectas realizadas en las IX, X y XI regiones, y la 65 aislada a partir de *L. glaber* (Cuadro 4). En relación con el número de nódulos obtenidos con la inoculación de estas cepas no se observaron diferencias significativas ($P \leq 0,05$), y la mayoría formaron en promedio cinco nódulos, pequeños (< 2 mm de diámetro) y de color verdoso pálido, por lo que se consideraron como nódulos inefectivos.

Al determinar la efectividad, de acuerdo al criterio de producción relativa, no hubo ninguna cepa que destacara sobre el testigo nitrogenado. De acuerdo al criterio de Vincent (1975), la cepa 38 fue la más efectiva en *L. uliginosus*. En la Figura 3 se puede observar el efecto de la inoculación de esta cepa, correspondiente a *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) sobre el cv. Maku. Se aprecia un abundante desarrollo aéreo y radical, y buena nodulación. También se observa que el desarrollo adquirido supera ampliamente al testigo sin nitrógeno (TO) y es similar al testigo con nitrógeno mineral (TN), por lo que se considera una cepa efectiva. Otra cepa que destacó en esta especie por su efectividad fue la cepa 52.

Baraibar *et al.* (1999) en un estudio de 50 aislamientos desde 10 suelos uruguayos, encontraron una alta variabilidad en la eficiencia simbiótica y tolerancia a la acidez. Los nódulos de *Lotus pedunculatus* y *L. subbiflorus* eran pequeños, rojos en la superficie e inefectivos en la fijación de nitrógeno. Este trabajo mostró que existe una gran diversidad entre las cepas aisladas y sostiene la importancia de seleccionar entre las más eficientes y resistentes previo a su inclusión como inoculantes.

Muchos autores discuten acerca de las razones de la regular efectividad de los aislamientos de campo. Al respecto, Gibson (1964) señaló que existe la posibilidad que la mayoría de estos aislamientos representen rizobios que son simbióticamente efectivos con leguminosas endémicas, pero que son menos compatibles con las líneas huéspedes utilizadas con propósito de ensayos y agricultura comercial. En este punto sería importante, entonces, la elección del huésped en las pruebas de efectividad, ya que puede afectar la estimación de la efectividad de la población, y la

subsecuente interpretación de los resultados. En Escocia (Lowe y Holding, 1970) y en Irlanda (Sherwood y Masterson, 1974), encontraron que las pruebas de efectividad con aislamientos de *R. trifolii* de poblaciones nativas de *Trifolium repens* eran más eficientes con ecotipos del campo que con plantas de líneas comerciales. La principal conclusión que obtuvieron de su trabajo fue el alto grado de variabilidad en la efectividad de la población muestreada. Estos resultados sugieren que la proporción de los genotipos presentes en la población de *R. trifolii* están cambiando constantemente.

Por otro lado, la baja efectividad de las cepas evaluadas puede reflejar la inestabilidad genética de las mismas que ocurre a lo largo de su progenie después de varios años en el suelo. Se ha informado que la ocupación de nódulos por cepas de inoculantes declina en los años que siguen al establecimiento (Moënne-Loccoz *et al.*, 1994).

Con respecto a la baja estabilidad genética que presentan los aislamientos de *Mesorhizobium* y *Bradyrhizobium* evaluados se debe hacer mención a investigaciones de Sullivan *et al.* (1996), quienes señalaron que un grupo de simbiontes de *Lotus* spp. están representados por *R. loti*, pero análisis de secuencias de 16S rARN sugieren que *R. loti* junto con otras cepas tipo *Rhizobium* se originaron de *R. ciceri* (*Cicer arietinum*) y *R. mediterraneum*. Anteriormente, Sullivan *et al.* (1995) presentaron evidencia indirecta que rizobios no simbióticos juegan un papel significativo en la dinámica de las poblaciones de rizobios en los suelos. Ellos señalaron diversidad genética entre los aislamientos de nódulos de una pradera de *L. corniculatus* establecida siete años antes con un inoculante de una única especie en un área que carecía de rizobios naturalizados capaces de nodular especies de *Lotus*. Los aislamientos dieron distintos patrones de ADN y cambios en su 16S rARN comparados con la cepa inoculada, indicando que ellos no eran derivados de la cepa inoculada. Estos autores sugirieron que los aislamientos estaban originados de bacterias no simbióticas que adquirieron genes simbióticos de la cepa inoculada. Posteriormente, en el año 1997, (Jarvis *et al.*) propusieron la reclasificación de *R. loti* en *Mesorhizobium loti,* basándose principalmente en sus características de crecimiento "intermedio" en medios de cultivo, con respecto a las cepas conocidas típicamente como de crecimiento rápido o lento. También, se empleó como criterio el hecho que en *M. loti* los genes de nodulación y fijación de nitrógeno, generalmente son cromosomales, y no están determinados en plásmidos como en muchos de los rizobios de crecimiento rápido (Young, 1996).

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio sugieren que dada la elevada inestabilidad genética de las cepas de *Mesorhizobium loti* y *Bradyrhizobium* sp. evaluadas, debe buscarse una alternativa para la adecuada mantención de ellas. Al parecer, la simbiosis *L. corniculatus* - *M. loti* es muy específica, por lo que sería necesario evaluar cepas aisladas de este mismo hospedero para obtener una cepa eficiente en la fijación de N. Mediante las pruebas de efectividad realizadas se determinó que las cepas 61, 65 y 66 de *Mesorhizobium loti* y las cepas 38 y 52 de *Bradyrhizobium* sp. se presentan como posibles alternativas para su utilización como inoculantes comerciales.

Figura 1. Efecto de la cepa de *Mesorhizobium loti* 61 en *Lotus corniculatus* cv. Quimey.
Figure 1. Effect of strain 61 of *Mesorhizobium loti* 61 on *Lotus corniculatus* cv. Quimey.

T_N: Testigo con nitrógeno.
T_0: Testigo sin nitrógeno.

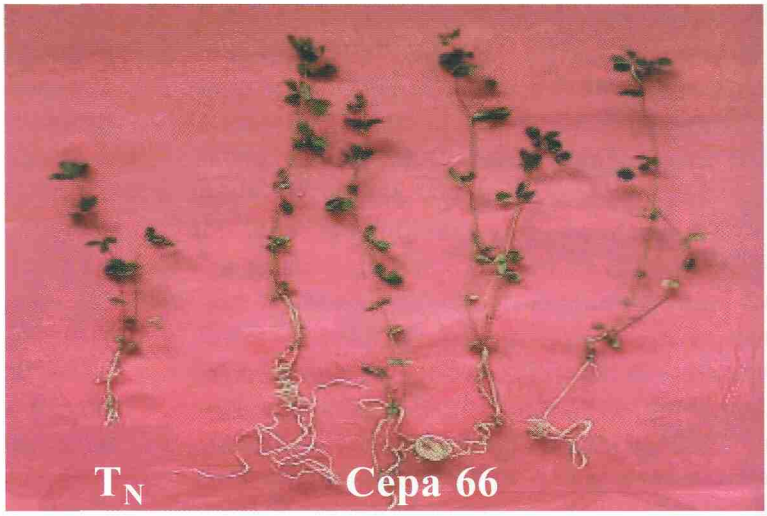

Figura 2. Efecto de la cepa de *Mesorhizobium loti* 66 en *Lotus glaber* cv. Toba.
Figure 2. Effect of strain 66 of *Mesorhizobium loti* on *Lotus glaber* cv. Toba.

T_N: Testigo con nitrógeno.

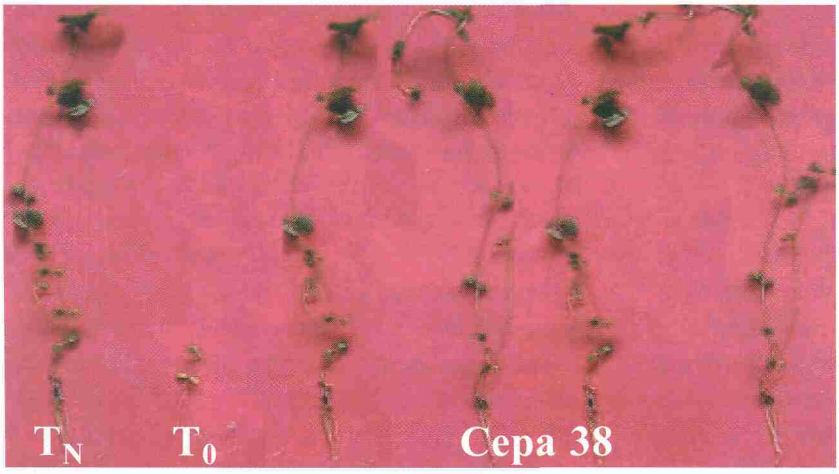

Figura 3. Efecto de la cepa de *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) 38 en *L. uliginosus* cv. Maku.
Figure 3. Effect of strain 38 of *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) on *L. uliginosus* cv. Maku.

T_N: Testigo con nitrógeno.
T_0: Testigo sin nitrógeno.

LITERATURA CITADA

Acuña, H. 1998. Comparación de variedades de tres especies del género *Lotus* (*L. corniculatus* L., *L. uliginosus* Cav. y *L. tenuis* Wald et Kit.) en suelos de aptitud arrocera. Agricultura Técnica (Chile) 58:7-14.

Baraibar, A., L. Frioni, M.E. Guedes, and H. Ljunggren. 1999. Symbiotic effectiveness and ecological characterization of indigenous *Rhizobium loti* population in Uruguay. Pesquisa Agropecuaria Brasileira 34:1011-1017.

Bordeleau, L., H. Antoun, et R. Lachance. 1977. Effets des souches de *Rhizobium meliloti* et des coupes successives de la luzerne (*Medicago sativa*) sur la fixation symbiotique d'azote. Can. J. Plant. Sci. 57:433-439.

Cerda, C. 1996. Deficiencias nutritivas y nodulación en establecimiento de especies forrajeras del género *Lotus*, en suelos arcillosos. 33 p. Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad de Concepción. Facultad de Agronomía, Chillán, Chile.

Date, R.A. 1982. Collection, isolation, characterization and conservation of *Rhizobium*. p. 95-109. *In* J.M. Vincent (ed.) Nitrogen Fixation in Legumes. Academic Press, Canberra, Australia.

Gault, R., A. Pilka, D. Hebb, and J. Brockwell. 1994. Nodulation studies on legumes exotic to Australia: symbiotic relationships between *Chamaecytisus palmensis* (tagasaste) and *Lotus* spp. Aust. J. Exp. Agr. 34:385-394.

Gibson, A.H. 1964. Genetic control of strain specific ineffective nodulation in *Trifolium subterraneum* L. Aust. J. Agric. Res. 15:37-49

Gili, P., G. Marando, y M. Sagardoy. 1997. Número y eficiencia de cepas naturalizadas de *Rhizobium meliloti* aisladas de suelos del Alto Valle de Río Negro y Neuquén (Argentina). Agricultura Técnica (Chile) 57:200-205.

Jansen van R., H., and B.W. Strijdom. 1985. Effectiveness of *Rhizobium* strains used in inoculants after their introduction into soil. Appl. Environ. Microbiol. 49:127-131.

Jarvis, B.D.W., P. Van Berkum, W.X. Chen, S.M. Nour, M.P. Fernández, J.C. Cleyet-Marel, and M. Gillis. 1997. Transfer of *Rhizobium loti, Rhizobium huakuii, Rhizobium ciceri, Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. Nov. International J. Syst. Bacteriol. 47:895-898.

Jordan, D.C. 1982. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchananm 1980 to *Bradyrhizobium japonicum* gen. Nov., a genus of slow growing root nodule bateria. Int. J. Sys. Bacteriol. 32:378-380.

Jordan, D.C. 1994. Group IV. Gram-negative aerobic/microaerophilic rods and cocci. p. 71-174. *In* John G. Holt *et al.* (eds.) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. Williams and Wilkins, Baltimore, USA.

Langer, R.H.M. 1990. Pastures plants. *In* R. H. M. Langer (ed.) Pastures: Their ecology and management. Oxford University Press, Auckland, Australia.

Lowe, J.F. and A.J. Holding. 1970. Influence of clover source and nutrient manganese concentrations on the Rhizobium/white clover association. p. 70-89. Ocasional Symposium N° 6. *In* J. Lowe (ed.) White Clover Research., British Grassland Society.

Miñon D.P., G.H. Sevilla, L. Montes, y O. Fernández. 1990. *Lotus tenuis*: leguminosa forrajera para la Pampa Deprimida. Boletín Técnico N° 98. Estación Experimental Agropecuaria Balcarce. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Buenos Aires, Argentina.

Moënne-Loccoz, Y., D. Sen, E.S. Krause, and R.W. Weaver. 1994. Plasmid profiles of rhizobia used in inoculants and isolated from clover fields. Agron. J. 86:117-121.

Montes, L. 1988. *Lotus tenuis*. Revista Argentina de Producción Animal 8:367-376.

Norris, D. 1965. Acid production by *Rhizobium*: A unifying concept. Plant Soil 22:143-166.

Pankhurst, C.E., D.H. Hopcroft, and W.T. Jones. 1987. Comparative morphology and flavolan content of *Rhizobium loti* induced effective and ineffective root nodules on *Lotus* species, *Leucaena leucocephala*, *Carmichaelia flagelliformis*, *Ornithopus sativus* and *Clianthus puniceus*. Can. J. Bot. 65:2676-2685.

SAS. 1989. User's Guide. Version 6. 846 p. Volumen 2. 4th ed. SAS Institute. Cary, North Carolina, USA.

Sherwood, M.T., and C.L. Masterson. 1974. Importance of using the correct test host in assesing the effectiveness of indigenous populations of *Rhizobium trifolii*. Ireland Journal of Agricultural Research 13:101-110.

Sullivan, J., W. Patrick, W. Lowther, D. Scott, and C. Ronson. 1995. Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. Proc. Natl. Acad. Sci., USA 92:8985-8989.

Sullivan, J., B. Eardly, P. van Berkum, and C. Ronson. 1996. Four unnamed species of nonsymbiotic rhizobia isolated from the rhizosphere of *Lotus corniculatus*. Applied and Environmental Microbiology 62:2818-2825.

Urzúa, M., y M. E. Torres. 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 *R. trifolii* en suelos derivados de cenizas volcánicas. Ciencia e Investigación Agraria 12:15-21.

Vincent, M. 1975. Manual práctico de Rhizobiología. 200 p. Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina.

Williams, G. 1988. L' intérêt des lotiers: Un possible renouveau (Revue bibliographique). Fourrages 116:329-345.

Young, J.P.W. 1996. Phylogeny and taxonomy of rhizobia. Plant Soil. 186:45-52.