

Beneficios de la Fijación Simbiótica de Nitrógeno en Chile

H. Urzúa¹

Departamento de Ciencias Vegetales
Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal
Pontificia Universidad Católica de Chile
Casilla 306-22, Santiago, Chile

Abstract

H. Urzúa. Benefits of symbiotic nitrogen fixation in Chile. The objective of the present work is to identify and estimate the advantages that symbiotic nitrogen fixation (SNF) offers for plant production in different edaphoclimatic conditions in Chile. The specific objectives are to study the amount of global nitrogen-fixed in the Chilean agriculture, expressed as annual savings of nitrogen fertilizer due to the use of legume crops, and to discuss the research conducted to improve the efficiency of different symbiosis systems in order to achieve larger savings of nitrogen-fertilizer under Chilean conditions. The method of the directed fertilization was used to estimate the current contribution of SNF to nitrogen nutrition, complemented with information of previously estimated fixed-nitrogen published in Chile. Research to improve the efficiency of the SNF included strains characterization and laboratory selection (plasmid profiles, antibiotic resistance), greenhouse studies (dry matter (DM), N-accumulated, nodulation, C₂H₂ reduction, ureides, among others) and field validation studies (DM, N-accumulated, nodulation, C₂H₂ reduction, ureides, N-fixed [isotopic dilution with ¹⁵N]) using universally accepted methodologies. Results demonstrate the importance of SNF by legumes in Chile presenting considerable savings of nitrogen fertilization of approximately 33.5% of the total consumption of nitrogen (N-fertilizer + N-fixed) of the Chilean agriculture. This represents a benefit of US\$ 178,000,000 per year, approximately, including improved and natural pastures. These results reinforce the sustainability concept regarding nitrogen. Promising results have been obtained to increase the efficiency of the symbiotic systems that will facilitate their management, achieving higher productions and improving the quality of the crops, saving N-fertilizer, and at the same time reducing the environmental impacts associated with nitrogen fertilization.

Key words: *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, legumes, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, saving nitrogen fertilization, *Sinorhizobium*, symbiotic nitrogen fixation.

Cien. Inv. Agr. 32(2) 133-150. 2005

INTRODUCCION

El nitrógeno (N) es un elemento esencial para las plantas, ya que forma parte de compuestos tan fundamentales como proteínas, ácidos nucleicos y clorofila, necesitándose

principalmente en los tejidos vegetales en crecimiento.

La ciencia ha demostrado que la vía normal de ingreso de N a las plantas proviene del suelo, y para ser absorbido, se debe encontrar mineralizado,

como nitrato (NO_3) y amonio (NH_3). Sin embargo, debido a que se acumula principalmente en formas orgánicas en el suelo, se hace necesaria su transformación microbiana, conocida como mineralización de nitrógeno (MN), para dejarlo disponible para las plantas (Urzúa, 2000b).

La agricultura moderna utiliza plantas con potenciales productivos cada vez mayores, demandando una elevada nutrición nitrogenada, la cual puede ser muy superior al aporte de N del suelo. Por lo tanto, en la mayoría de los cultivos es necesario suplementar con fertilizantes nitrogenados. Esto conlleva un considerable incremento en los costos de producción. Afortunadamente, existe otra vía de aporte de nitrógeno al sistema, llamada fijación biológica de nitrógeno (FBN), siendo la denominada fijación simbiótica de nitrógeno (FSN) altamente deseable. A través de esta vía es posible obtener un importante suministro de nitrógeno para determinadas especies vegetales, las que en simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno, principalmente del género *Rhizobium* (rizobios), obtienen este elemento con un costo generalmente reducido (Urzúa, 2000b; Olivares, 2004).

Información científica y técnica respecto de la fijación del nitrógeno existe desde hace más de un siglo. Las plantas capacitadas para realizar FSN son principalmente especies de leguminosas (Familia *Leguminosae*) que como todos los vegetales absorben nitrógeno mineral del suelo, pero además pueden obtener nitrógeno atmosférico (Twornlow, 2004). Para que esto ocurra debe existir en el suelo bacterias del género *Rhizobium*, las que infectan y colonizan las raíces, provocando las deformaciones conocidas como nódulos. En los nódulos se transforma el nitrógeno atmosférico (N_2) a nitrógeno mineral (NH_3) por acción de la enzima nitrogenasa, nutriendo a la planta con el nitrógeno necesario para su síntesis proteica. Este proceso se ha identificado como simbiosis *Rhizobium*-leguminosa y las características genéticas que lo regulan radican en el plasmidio simbiótico (PS) presente en los rizobios (Watanabe, 2000; Olivares, 2004).

La ecuación siguiente expresa la reacción por la cual el nitrógeno atmosférico se fija, quedando disponible para las plantas:



La transformación del N_2 a NH_3 corresponde a un proceso de reducción química y para crear este ambiente reductor, la planta genera una hemina (proteína) denominada leghemoglobina, que protege a la nitrogenasa del oxígeno, indispensable para la respiración celular, pero que debe estar ausente en este paso bioquímico. Cuando la leghemoglobina está activa, produce una coloración rojiza característica, que se puede apreciar al seccionar un nódulo ocupado por los bacteroides de *Rhizobium* en pleno proceso de fijación de N_2 atmosférico. Cabe destacar que esta reacción es de alto consumo energético (16 ATP); sin embargo, la planta leguminosa logra un balance positivo por la enorme cantidad de nitrógeno fertilizante equivalente que produce (Urzúa, 2000b; Olivares, 2004).

Existen diversas especies, biovares y cepas de *Rhizobium* y de otras especies bacterianas fijadoras de nitrógeno, por ejemplo, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium* y *Sinorhizobium*, compatibles con diferentes grupos de plantas leguminosas.

Las ventajas de esta simbiosis son múltiples: 1. La planta puede autoabastecerse de nitrógeno, elevando considerablemente su contenido de proteínas. 2. Puede aportar nitrógeno a un cultivo acompañante de especies diferentes a las leguminosas (ej.: praderas asociadas compuestas por gramíneas y leguminosas). 3. Puede dejar nitrógeno disponible en el suelo para el cultivo siguiente en la rotación, siempre que se incorporen los rastrojos y se mineralice el N. Una variante corresponde al uso de abonos verdes donde se establece un cultivo de leguminosas con el único objetivo de incorporarlo al suelo para promover la mineralización de su N y suplir, así, las necesidades del cultivo siguiente en la rotación. 4. La eficiencia de la utilización del nitrógeno fijado por parte de la planta es cercana al 100%,

en comparación con sólo 50-60% con los fertilizantes nitrogenados aplicados al suelo. Es necesario puntualizar que las aplicaciones de fertilizantes nitrogenados se pierden parcialmente por lixiviación, desnitrificación e inmovilización microbiana, pudiendo convertirse en contaminantes de suelos, plantas, aguas, animales e, inclusive, seres humanos (Rodríguez, 1993; Urzúa, 2000b).

A pesar de estas indiscutibles ventajas, los rizobios no siempre se encuentran en el suelo, están en poblaciones relativamente bajas o, si se encuentran presentes, muchas veces son de baja efectividad. Existe entonces la posibilidad de introducir artificialmente estos microorganismos en el suelo a través de la práctica de la inoculación y favorecer

así la simbiosis. Adicionalmente, cabe destacar que inocular las semillas de leguminosas tiene un bajo costo para el productor, con un valor promedio estimado en sólo un 5% sobre costo de la semilla (Urzúa, 2000b).

Así, para incentivar la producción animal es necesario mejorar las pasturas. Esto se logrará, en gran medida favoreciendo la fijación biológica de nitrógeno, lo que permite una excelente nutrición nitrogenada, y ahorros importantes en fertilizantes nitrogenados con evidentes ventajas económicas. La FSN resulta ser, entonces, una tecnología limpia de producción y una forma concreta de proteger el medio ambiente (Montañez *et al.*, 2003).

Cuadro 1. Especies de leguminosas cultivadas de norte a sur en Chile¹.

Table 1. Legumes cultivated from North to South in Chile¹.

Zona	Grados latitud sur	Leguminosas fijadoras	Utilización
Norte	20	Algarrobos, tamarugos (<i>Prosopis</i> spp.) Alfalfa (<i>Medicago sativa</i>)	Nutrición animal, leña. Nutrición animal.
Central	35	Alfalfa, tréboles (<i>Trifolium</i> spp.): rosado, alejandrino, subterráneo, sólo o en mezclas con gramíneas. Frejol (<i>Phaseolus vulgaris</i>), arveja (<i>Pisum sativum</i>), lenteja (<i>Lens culinaris</i>), garbanzo (<i>Cicer arietinum</i>), chícharo (<i>Lathyrus sativus</i>), haba (<i>Vicia faba</i>). Vicia (<i>Vicia</i> spp.), arveja, haba. Aromo australiano (<i>Acacia melanoxylon</i>), algarrobo, pseudoacacias (<i>Robinia pseudoacacia</i>).	Nutrición animal. Consumo humano, Nutrición animal. Abonos verdes. Leña, madera, celulosa, ornamental.
Centro-Sur	37	Tréboles: blanco (<i>T. repens</i>), rosado (<i>T. pratense</i>), subterráneo (<i>T. subterraneum</i>), sólo o en mezclas con gramíneas. Alfalfa. Frejol, lenteja, garbanzo, arveja, haba. Vicia, arveja, haba. Aromos.	Nutrición animal. Consumo humano. Abonos verdes. Madera, celulosa.
Sur	40	Tréboles blanco, rosado y subterráneo (pradera mixta con ballica inglesa (<i>Lolium perenne</i>)), lotera (<i>Lotus uliginosus</i>). Alfalfa. Arveja, haba, lupino (<i>Lupinus</i> spp.). Arveja, lupino, haba. Acacias y pseudoacacias.	Nutrición animal. Consumo humano. Nutrición animal. Abonos verdes. Madera, celulosa.

¹Urzúa, H. (2000b).

La gran diversidad de condiciones edafoclimáticas presentes en Chile permite el cultivo de numerosas especies leguminosas. Así, en el norte prosperan leguminosas arbóreas del género *Prosopis* (tamarugos y algarrobos). En la zona centro-norte y central las acacias y pseudoacacias (*Acacia* spp. y *Robinia pseudoacacia*) se encuentran ampliamente distribuidas. Desde el punto de vista agrícola, se cultivan a lo largo del país leguminosas de grano como frejol (*Phaseolus vulgaris*), lenteja (*Lens culinaris*), lupino (*Lupinus* spp.) y, en menor proporción, garbanzo (*Cicer arietinum*), arveja (*Psium sativum*), haba (*Vicia faba*) y chícharo (*Lathyrus sativus*). Las leguminosas forrajeras más difundidas, y que son fundamentales para elevar la producción ganadera chilena son: alfalfa (*Medicago sativa*), los tréboles alejandrino (*Trifolium alexandrinum*), blanco (*T. repens*), rosado (*T. pratense*) y subterráneo (*T. subterraneum*), existiendo además algunas especies de lotera, como la alfalfa chilota (*Lotus uliginosus*), muy promisorias para la zona sur de Chile (Urzúa, 1991). Finalmente, las leguminosas forrajeras para abonos verdes, como vicia (*Vicia* spp.), arveja, haba y lupino, se pueden producir satisfactoriamente desde la zona central hasta la zona sur de Chile. Estos antecedentes permiten zonificar las plantas fijadoras de N en Chile, considerando que para cada zona y especie la situación agroecosistémica puede ser muy diferente (Cuadro 1).

Respecto a la FSN, es preciso consignar que ésta se ve disminuida significativamente si el contenido de N mineral en el suelo es alto, producto de las transformaciones naturales a partir del N orgánico (MN) o a la fertilización nitrogenada excesiva (Urzúa *et al.*, 1986a; Mundy *et al.*, 2003).

Con relación a las cantidades de nitrógeno fijado simbióticamente, éstas son muy variadas, dependiendo principalmente de la especie leguminosa, de la efectividad del rizobio, de las condiciones edafoclimáticas, del manejo del cultivo y, eventualmente, del manejo del ganado. Los valores pueden fluctuar entre 50 y 800 kg·ha⁻¹·año⁻¹ de N, apreciándose que con estos

aportes de N se pueden sustituir grandes cantidades de fertilizante nitrogenados (Cuadro 2).

Cuadro 2. Rangos más frecuentemente reportados de la contribución del nitrógeno atmosférico fijado por especies leguminosas por temporada.

Table 2. Amounts of nitrogen fixed in legumes (ranks more frequently founded).

Cultivos de leguminosas	N fijado kg·ha ⁻¹ ·año ⁻¹
Forrajeras:	
Alfalfa	120-800
Trébol blanco	150-400
Trébol rosado	100-480
Trébol subterráneo	80-340
De grano y hortícolas:	
Haba	100-300
Arveja	50-270
Lupino	40-300
Frejol	25-100
Abonos Verdes:	
Arveja	70-300
Haba	80-380
Vicia	100-300
Lupino	150-310
Arbóreas:	
Tamarugo, algarrobo, espino, aramo, pseudoacacia	80-590

¹Urzúa, H. (2000b).

Este trabajo tuvo por objetivos: 1. Estimar los aportes globales de nitrógeno fijado en el sector agrario chileno, expresándolos como fertilizante nitrogenado ahorrado anualmente en Chile debido al uso de leguminosas. 2. Estudiar y discutir el manejo de la simbiosis para mejorar su eficiencia y lograr, así, un mayor ahorro de fertilizante nitrogenado en las condiciones edafoclimáticas chilenas.

METODOS DE ANALISIS

Una forma de determinar la importancia que puede tener la FSN en Chile ha sido utilizar la superficie de cultivos de leguminosas, las producciones promedio alcanzables y emplear datos de fijaciones de N promedio por hectárea, a fin de estimar la equivalencia con la fertilización nitrogenada (Morales y Urzúa, 1996; INE/ODEPA, 1997;

Loewe *et al.*, 1998; Faiguenbaum *et al.*, 2000; ODEPA, 2004). Otro método de cálculo utilizado ha sido determinar la cantidad promedio de fertilizante nitrogenado teóricamente necesario a aplicar a cultivos de leguminosas si éstas no fijaran nitrógeno, pero considerando que tienen contenidos de N más elevados que las demás especies vegetales. Estas estimaciones expresan el ahorro anual en fertilización nitrogenada en término de

la cantidad de urea (fertilizante comúnmente empleado en Chile) y en términos económicos, en dólares (EUA) ahorrados anualmente.

Ambos sistemas de cálculo se basan en el método de fertilización dirigida desarrollado previamente por Rodríguez (1993); Rodríguez y Suárez, (1999) y Rodríguez *et al.* (2001), que estima la fertilización de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

Plantas no leguminosas:

$$\text{Fertilización con N} = \frac{\text{Demanda de N de la planta} - \text{Suministro de N del suelo}}{\text{Eficiencia de absorción del N fertilizante}} \quad (1)$$

Plantas leguminosas:

$$\text{Fertilización con N} = \frac{\text{Demanda de N de la planta} - (\text{Suministro de N del suelo} + \text{N derivado de la fijación})}{\text{Eficiencia de absorción del N fertilizante}} \quad (2)$$

Los factores de las ecuaciones anteriores se calculan empleando una serie de parámetros relacionados con el rendimiento alcanzable de la planta, con la humedad a la cosecha, con la relación entre parte cosechada y los residuos remanentes en el terreno, con el N de los residuos de la parte aérea y radical, con el N-inmovilizado del fertilizante aplicado al cultivo anterior, con la relación entre N-agregado y N-no absorbido debido a mecanismos de pérdida en el suelo, y con el N-derivado de la fijación (NDF)(Rodríguez, 1993; Urzúa, 2000b).

Las investigaciones realizadas para mejorar el aporte de N vía mayor eficiencia de la FSN en las condiciones edafoclimáticas chilenas han comprendido una serie de investigaciones, principalmente, relacionadas con la selección de cepas *Rhizobium* spp. para las más importantes leguminosas presentes en Chile. Con estos propósitos se han realizado trabajos en condiciones de laboratorio relacionados con la caracterización por resistencia a agentes antibacterianos (Aguilera *et al.*, 1993), proteínas

de membrana externa de *Rhizobium* (Calderón y Urzúa, 1988) y perfiles de plásmidos rizobianos (Urzúa y Tesser, 1998) (Figura 1). En condiciones de invernadero con suelos representativos de las zonas geográficas de interés se han ejecutado diversas investigaciones (Torres y Urzúa, 1983; Urzúa y Torres, 1985; Borie *et al.*, 1988; Guaiquil *et al.*, 1988; Urzúa *et al.*, 1988; Urzúa y Navarro, 1988; Urzúa, 2000a; Urzúa *et al.*, 2001; Urzúa *et al.*, 2003) y validaciones finales en terreno determinando la materia seca producida, N-acumulado, actividad de la enzima nitrogenasa (Ruíz y Urzúa, 1980; Urzúa, 1984; Urzúa *et al.* 1985; Teuber, 1996), contenido de ureidos, alantoína, ácido alantoico (Urzúa, 2000a ; Urzúa *et al.*, 2001; Urzúa *et al.*, 2003). En forma similar el N-derivado de la fijación se ha estimado previamente con nitrógeno marcado (N¹⁵) (Longeri *et al.*, 1990; Campillo *et al.*, 2003; Urzúa *et al.*, 2003) y el efecto de factores nutricionales y ambientales limitantes de la FSN ha sido también previamente estudiado (Urzúa *et al.*, 1986 a y b; Zurita *et al.*, 1994; Urzúa *et al.*, 1995; Botha, 1999; Serraj *et al.*, 2004).

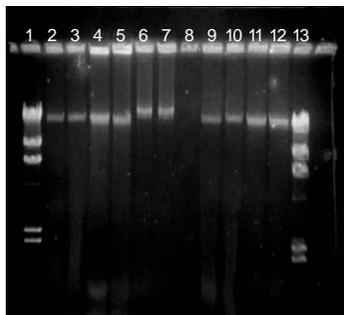


Figura 1. Perfiles de plásmidos de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. Carriles 1 y 13, estándar de peso molecular (ADN del fago λ digerido con Hind III); 2 a 12 ADN de diferentes cepas.

Figure 1. Plasmid profiles of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Phaseoli*. Rows 1 and 13, molecular weight standard (DNA of lambda phage, digested with Hind III); 2 – 12, DNA of different strains.

RESULTADOS Y DISCUSION

Fijación global de nitrógeno. Las estimaciones globales de nitrógeno actual y potencial ahorrado por el sector silvoagropecuario chileno, relacionadas con la FSN de las principales leguminosas cultivadas en Chile se presentan en el Cuadro 3 (Urzúa, 2000b). Se ha denominado situación actual a la estimación del ahorro en nitrógeno debido al uso de leguminosas de cultivo, tanto de grano como hortícolas, al empleo de leguminosas forrajeras sembradas y a las leguminosas arbóreas, estimándose una cifra de 68.020 ton·año⁻¹ de N, aproximadamente. Si a esto se agregaran las praderas mejoradas y naturales, la cifra se puede elevar a 133.750 ton anuales, aproximadamente (Sub-total 1, Cuadro 3).

El incremento adicional (Sub-total 2, Cuadro 3) correspondería al uso de abonos verdes para la producción de cultivos tradicionales, frutales y viñas, a plantaciones nuevas de acacias y pseudoacacias (Loewe *et al.*, 1998) y a un futuro aumento de la eficiencia de la FSN, estimada en 25% aproximadamente. El ahorro anual de N-fertilizante equivalente posible de alcanzar serían unas 98.655 ton. Para que este ahorro se materialice, un 20% de la superficie agrícola chilena debería adoptar el sistema de producción sustentable (Diver, 1999; Urzúa, 2000b). Obviamente, que el cultivo

directo de leguminosas fijadoras de N (aparte de los abonos verdes), es el mejor ejemplo de sustentabilidad agrícola en términos del insumo nitrógeno (Olivares, 2004).

Por último, la suma de las cifras de situación actual e incremento adicional (Sub-totales 1+2) permite estimar en forma global del impacto de la FSN en la agricultura chilena a un plazo cercano. Esta etapa se ha denominado situación potencial, y se podría estimar en unas 232.400 ton de N-fertilizante equivalente ahorrado por año, considerado praderas naturales y mejoradas.

El consumo promedio histórico de N-fertilizante, en la última década en Chile, ha sido de 230.500 ton·año⁻¹ de N, aproximadamente. Si las leguminosas no fijaran nitrógeno y hubiera que fertilizarlas, se consumirían adicionalmente alrededor de las 68.000 ton·año⁻¹ de N, siendo el consumo total actual equivalente a unas 298.500 ton·año⁻¹ de N. En esta perspectiva, las leguminosas aportarían anualmente una cifra cercana al 22% del consumo de N-exógeno total del sector agrícola chileno (N-fertilizante más N-fijado), cifra que muestra la importancia de manejar adecuadamente las simbiosis (Urzúa, 2000b). Por otra parte, en la situación potencial se supone un consumo anual de N-fertilizante de unas 265.000 ton de N. El nitrógeno ahorrado debido a la simbiosis correspondería, entonces, a un 33,5 % del N-exógeno (N-fertilizante más N-fijado) empleado en la agricultura (133.750 ton·año⁻¹, aproximadamente), incluyendo praderas mejoradas y naturales.

En relación al ahorro anual, expresado monetariamente en dólares (US\$), debido al mecanismo natural de la FSN en Chile, se puede estimar que fluctuaría entre 127 y 178 millones de dólares, aproximadamente, según se consideren o no, las praderas mejoradas y naturales, respectivamente (Cuadro 3). Esta evaluación del ahorro de fertilizante nitrogenado debido a la simbiosis no ha considerado los costos de almacenamiento, transporte, ni aplicación de fertilizantes, por lo que hace comparativamente más atractivo el uso de estas técnicas.

Cuadro 3. Beneficios de la fijación simbiótica de nitrógeno atmosférico en Chile.**Table 3.** *Benefits of symbiotic atmospheric nitrogen fixation in Chile.*

Cultivos de leguminosas	Superficie ha	N-fertilizante equivalente a aplicar kg·ha ⁻¹	N-fertilizante equivalente a aplicar ton·ha ⁻¹	Urea-fertilizante equivalente a aplicar ton·año ⁻¹	Ahorro de fertilizante urea ^(1 y 2) (Millones US\$·año ⁻¹)	
					sin praderas mejoradas ni naturales	con praderas mejoradas y naturales
Cultivadas	83.655	73	6.105	13.270	4,66	4,66
Forrajeras sembradas	442.000	126	55.690	121.650	42,69	42,69
Arbóreas	41.500	150	6.225	13.530	4,75	4,75
Praderas mejoradas	486.000	30	14.580	31.995	-	11,12
Praderas naturales	3.410.000	15	51.150	111.195	-	39,02
Situación actual	4.463.155	30	133.750	291.340	52,10	102,34
Sub-total (1)						
Leguminosas abonos verdes para Cultivos y frutales y viñas (20% superficie agrícola y frutícola).	238.320	120	28.600	62.175	21,82	21,82
Nuevas plantaciones de acacias y pseudoacacias (5% Superficie potencial) ³	353.650	150	53.050	115.325	40,47	40,47
Aumento de la FSN (25% sobre la actual) por mejora de la simbiosis. Sin considerar praderas mejoradas ni naturales	-	-	17.005	36.965	12,95	12,95
Incremento adicional	591.970	-	98.655	214.465	75,24	75,24
Sub-total (2)						
Situación futura	5.055.125	-	232.405	505.805	127,34	177,48
Total (1+2)						

¹Precio de la urea en Chile = US\$ 350.91 por tonelada.

Urea price US\$ 350.91 · ton⁻¹.

²Valor del dólar (EUA) = \$ 607.

Dollar USA value: Ch\$607 per dollar USA.

³Estimaciones a partir de estudios de INFOR/CONAF (Loewe, 1998).

Estimations: INFOR / CONAF (Loewe, 1998).

Fuente: ODEPA, 2004.

Estudios recientes realizados en Uruguay, país ganadero por excelencia, muestran ahorros de fertilización nitrogenada debidos a la eficiente FSN producida en sus praderas mixtas (trébol blanco–ballica inglesa), cercanos a US\$ 90 millones por año (Montañez *et al.*, 2003),

empleando metodologías previamente descritas (Urzúa, 2000b).

No obstante la gran importancia de la fijación simbiótica de nitrógeno, su conocimiento en Chile es insuficiente. Poco se sabe de la distribución y

efectividad de cepas nativas de *Rhizobium* para las diferentes especies de leguminosas, en las diversas zonas edafoclimáticas chilenas.

Se han estudiado, además, aspectos relacionados con efectividad, competitividad y persistencia de los rizobios, así como el efecto de diferentes factores limitantes de suelo, clima y manejo que afectan a la simbiosis (Urzúa, 1979; Urzúa, 1982a y b; Urzúa *et al.*, 1984; Urzúa *et al.* 1986a; Pijnenborg, *et al.*, 1991; Botha, 1999). Además, la tecnología de inoculación y el control de calidad de los inoculantes son temas insuficientemente abordados (Urzúa *et al.*, 1987).

También se ha estudiado exitosamente la simbiosis tripartita leguminosa-rizobio-micorriza, y su relación con la productividad, FSN, absorción de fósforo (P) y del resto de macro y micro nutrientes del trébol blanco, en suelos de la X Región de Chile (Urzúa *et al.*, 1992 y 1993). A su vez, se estudiaron los efectos negativos de insecticidas órgano-clorados tóxicos que afectaron la germinación y producción del trébol blanco, así como la simbiosis con rizobio en andisols (trumaos) de la zona sur de Chile (Urzúa *et al.*, 1986b).

Principales investigaciones realizadas en Chile
Diferentes organismos de investigación (Universidades, Instituto de Investigaciones Agropecuarias) han realizado numerosas investigaciones para comprender mejor las simbiosis, con el objetivo de manejarlas y obtener resultados prácticos, económicamente ventajosos para la agricultura chilena.

Algunos de los principales resultados obtenidos en Chile son los siguientes: Barrientos *et al.* (2002), determinaron cepas de *Mesorhizobium* y *Bradyrhizobium* eficientes fijadoras de N en trabajos realizados en loteras, praderas de la IX Región, utilizando agares nutritivos en cámaras de crecimiento. Ruz *et al.* (1999) estudiaron tasas de fijación de N₂ y el efecto de cortes y manejo del ganado en pasturas de loteras en la VII Región, señalando valores de N-fijado de 112 a 173

kg·ha⁻¹·año⁻¹ de N. Barrientos y Peñaloza (1999) estudiaron la respuesta del lupino a la inoculación con cepas efectivas de *B. lupini*, en suelos de la IX Región, sin resultados positivos, probablemente, debido a que utilizaron un inoculante comercial portador de rizobios no seleccionados por su habilidad simbiótica. Además, Herrera *et al.* (1996), investigaron la efectividad de cepas de *S. meliloti* en *Medicago polymorfa* (hualputra), en macetas con suelos provenientes del secano comprendido entre Vicuña (30° 07' LS) y Temuco (38° 47' LS), haciendo alcances agronómicos de interés en suelos de pH ácidos.

Por otra parte, Longeri *et al.* (1990), determinaron la fijación de nitrógeno y la fertilización nitrogenada del frejol empleando la técnica del N¹⁵, en suelos trumaos de la VIII Región, alcanzando valores de NDF entre 27 y 114 kg·ha⁻¹ de N, de acuerdo con el hábito de crecimiento de los frejoles estudiados. Esto significó entre 27 y 60% de NDF, según se inoculara o se omitiera la adición de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*.

Borie *et al.* (1988), encontraron cepas nativas efectivas de *R. trifolii* en trébol rosado (*T. pratense*) en praderas de la IX Región. Guaiquil *et al.* (1988), también seleccionaron cepas de *R. trifolii* para trébol blanco y rosado en suelos rojos arcillosos (Ultisols) de San Juan de la Costa (Osorno, X Región, Chile). Al mismo tiempo, Opazo y Veloso (1988), estudiaron los efectos nutricionales y la FBN en alfalfa, en suelos graníticos de la costa de la Zona Central, determinando los principales parámetros de la fijación de N, los cuales se vieron favorecidos por la modificación del pH del suelo (CaCO₃) y por la aplicación de fertilizante fosforado.

La Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal de la Pontificia Universidad Católica de Chile ha desarrollado por largo tiempo un programa en microbiología de suelos, rizobiología y fertilidad, abordando principalmente el estudio de la simbiosis en las leguminosas forrajeras alfalfa (zona sur) y en tréboles blanco (*T. repens*), rosado (*T. pratense*) y subterráneo (*T.*

subterraneum); en las leguminosas hortícolas, poroto y arveja (zona central) y en leguminosas de grano, frejol y lenteja (zona centro sur). Al respecto, se pueden indicar importantes logros en la nutrición nitrogenada de estas plantas como producto de los estudios realizados, obteniéndose aumentos significativos en la sustitución de N-fertilizante por N-fijado. Así, se puede afirmar que con un buen manejo de la inoculación, se han logrado resultados que harían variar positivamente las cantidades de nitrógeno

ahorrado estimado como fertilizante o como recursos económicos que se podrían considerar como conservadoras (Cuadro 3).

A modo de ejemplo, se indican en el Cuadro 4 resultados del efecto de la inoculación con *R. trifolii* en trébol blanco, coexistiendo con ballica inglesa (*Lolium perenne*) en pasturas mixtas del sur de Chile, cuando se controlan factores nutricionales limitantes de la fijación de N₂ (Urzúa *et al.*, 1986a; Figura 2A).

Cuadro 4. Efecto de la inoculación y fertilización nitrogenada sobre la fijación de N₂ atmosférico del trébol blanco (*Trifolium repens*) en pasturas mixtas del sur de Chile (Urzúa, 1991).

Table 4. Effect of inoculation and N-fertilization on nitrogen fixation of grass-legume pastures of southern Chile.

Tratamientos	Parámetros de fijación de N ₂ , % respecto al testigo		
	Materia seca ¹	N- acumulado ¹	Nodulación temprana
Testigo	100 c ²	100 c ²	100 c ²
Inoculado	118 c	121 c	125 c
Inoculado + cal	136 c	130 c	150 bc
Inoculado + cal + P	224 b	238 b	305 ab
Inoculado + cal + P + Mo	341 a	360 a	297 ab
Inoculado + cal + P + Mo + N	253 ab	267 ab	348 a

¹Materia seca y N acumulado, promedio de 7 cortes.

Dry matter and N-accumulated, mean of 7 cuts.

²Promedios seguidos por igual letra no son estadísticamente diferentes entre sí según la prueba de comparación múltiple de Duncan, $p \leq 0,05$.

Means with the same letter are not statistical different, Duncan $p \leq 0.05$.

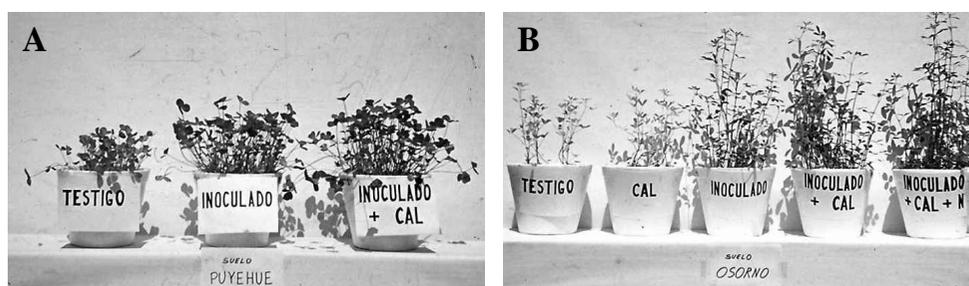


Figura 2. A. Respuesta positiva a la inoculación y al encalado de trébol blanco, en un suelo trumao de la X Región de Chile. B. Respuesta a la modificación del pH, inoculación con *Sinorhizobium meliloti* y aplicación de cal y de N-fertilizante en alfalfa. Suelo trumao, X Región de Chile.

Figure 2. A. Positive response of white clover to *Rhizobium* inoculation and liming in an andisol of southern Chile. B. Response of alfalfa to *Sinorhizobium meliloti* inoculation, liming and N-fertilization in an andisol of southern Chile.

Puede apreciarse que la inoculación, si bien aparentemente contribuye a incentivar la producción de forraje y el contenido protéico de éste, necesita cubrir previamente las necesidades nutricionales básicas de las plantas (Urzúa *et al.*, 1985 y 1986a; Campillo, 1997; Campillo *et al.*, 2003).

Las mediciones de la FSN del trébol blanco en pradera mixta de la zona sur de Chile, por el método de la reducción de acetileno (C_2H_2) a etileno (C_2H_4), han dado valores potenciales cercanos a los 100 $kg \cdot ha^{-1} \cdot año^{-1}$ de N (Urzúa *et al.*, 1985; Teuber, 1996), correspondiendo a parcelas de los productores, con baja población de trébol (situación real normal). Sin embargo, Campillo *et al.*, (2003), detectaron valores de N fijado de 350 $kg \cdot ha^{-1} \cdot año^{-1}$ de N, empleando la metodología isotópica del N^{15} (valor A), trabajando con trébol blanco en cultivo puro, lo que no corresponde a la realidad ganadera de la IX Región. Ahora bien, si hubiesen utilizado la pradera mixta, el resultado de la FSN se habría reducido considerablemente y representaría cifras inferiores a los 100-120 $kg \cdot ha^{-1} \cdot año^{-1}$ de N, cantidades que son comparables a las mencionadas anteriormente. En todo caso, con poblaciones recomendadas de trébol (30% de la mezcla forrajera, Pinochet, 1988) y un adecuado manejo de la pastura y del ganado, es posible estimar FSN cercanas a 200 $kg \cdot ha^{-1} \cdot año^{-1}$ de N, en promedio, como ocurre en Nueva Zelanda (Ettema y Ledgard, 1992). Además, es importante destacar que el método de reducción de acetileno es aun el método mas sensible para determinar la FSN (Watanabe, 2000).

En tres años de investigación, Campillo *et al.* (2003), así como Campillo (1997), no obtuvieron respuesta a la inoculación en trébol blanco, rosado o subterráneo, y sólo en el primer año hubo respuesta en alfalfa, situación explicable por utilizar cepas de rizobios no seleccionadas por efectividad, competitividad y persistencia, como ha ocurrido en estudios anteriores (Urzúa, 1982a y b; Torres y Urzúa, 1983; Urzúa y Torres, 1985; Urzúa, 1987, 1988 y 1991), en que la respuesta a la inoculación con rizobio en trébol blanco en la zona sur permitió, en las diferentes situaciones investigadas, aumentar la producción de materia seca y de N-fijado entre 15 y 50 % por sobre los testigos sin inoculación.

Respecto a la alfalfa, que ha requerido un proceso de adaptación a la zona sur de Chile, caracterizada por poseer suelos ácidos y con ausencia total de rizobios nativos, se ha obtenido éxito completo con la inoculación con cepas seleccionadas de *S. meliloti*. Obviamente, es preciso corregir la acidez del suelo ($pH \approx 6,5$) y cuidar la nutrición mineral de esta importante leguminosa forrajera. El Cuadro 5 muestra algunos resultados obtenidos, apreciándose en forma nítida que, además de controlar factores limitantes de la fijación de N en alfalfa, especialmente la acidez, es indispensable inocular con cepas efectivas de rizobio (Figura 2B). Con buenos manejos del sistema suelo-pastura-animal se han logrado producciones entre 10 y 20 $ton \cdot ha^{-1} \cdot año^{-1}$ de N. Se estima que el NDF fluctúa entre 65 y 90% del N acumulado por la alfalfa (Urzúa y Zurita, 1986; Campillo, 1997; Campillo, *et al.* 2003).

Cuadro 5. Efecto de la inoculación con cepas efectivas de *Sinorhizobium meliloti*, sobre la fijación de N_2 de alfalfa creciendo en andisols del sur de Chile.

Table 5. Effect of inoculation with effective strains of *Sinorhizobium meliloti* on N-fixation of alfalfa, growing in southern Chilean andisols.

Tratamientos	Parámetros de fijación de N_2 , % respecto al testigo		
	Materia seca 1 ^{er} corte	N- acumulado 1 ^{er} corte	Nodulación temprana
Testigo sin inocular	100 b ¹	100 b ¹	100 b ¹
Inoculado	250 a	425 a	566 a

¹Promedios seguidos por igual letra no son estadísticamente diferentes entre sí según la prueba de DMS, $p \leq 0,05$).
Means with the same letter are not statistical different, LMS, $p \leq 0.05$.

Por otra parte, se indican en el Cuadro 6 los resultados del efecto de la inoculación con *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* en poroto verde, sobre la producción de vainas, nitrógeno fijado total (N¹⁵), nitrógeno fijado en vainas, nodulación y contenido de ureidos.

En el Cuadro 6 se observan efectos claros de la inoculación sobre la producción de vainas comerciales (agroindustria). La aplicación de N-fertilizante (70

kg-ha⁻¹) logró alcanzar al tratamiento con adición de rizobio (Figura 3A). El nitrógeno fijado en las vainas fue superior cuando se usó inoculante. Los nódulos del testigo fueron abundantes, pero poco efectivos. Se aprecia, además, el efecto detrimente del N-fertilizante sobre la fijación de N y sobre la nodulación. Los ureidos, por su parte, se vieron favorecidos por el rizobio y por la fertilización (Peoples *et al.*, 1996; Urzúa y Tesser, 1998; Urzúa, 2000a; FAO, 2003; Roldán *et al.*, 2004).

Cuadro 6. Efecto de la inoculación de porotos verdes (cv. Summit) sobre aspectos productivos y de fijación de nitrógeno. Promedio temporadas 2000 y 2001. Suelo aluvial de Chile central (Urzúa *et al.*, 2003). **Table 6.** Effect of green beans inoculation (cv. Summit) on production and N-fixation in alluvial soils of central Chile (Urzúa *et al.*, 2003).

Tratamientos de inoculación	Vainas verdes kg-ha ⁻¹	Nitrógeno fijado total %	Nitrógeno fijado en vainas kg-ha ⁻¹	Masa nodular % ¹	Ureidos % ¹
Testigo, sin Inoculación	7.325 b ²	38 b ²	11 c ²	100 a ²	100 b ²
Inoculado con cepa seleccionada	10.531 a	50 a	17 a	91 a	134 a
Fertilizado con 70 kg-ha ⁻¹ de nitrógeno	10.993 a	25 c	14 b	27 c	129 ab

¹Porcentajes respecto al testigo.

Percentage of control.

²Promedios seguidos por igual letra no son estadísticamente diferentes entre sí según la prueba de comparación múltiple de Waller- Duncan, p≤ 0,05.

Means with the some letter are not statistical different, Waller - Duncan, p≤0.05.

Además del frejol, la arveja es otra leguminosa hortícola de interés, tanto para el, consumo fresco, congelada o enlatada. Esta especie se puede cultivar con éxito en la zona central de Chile y ha respondido positivamente a la inoculación con *R. leguminosarum* bv. *viceae* (Urzúa, 1996). En ocasiones, se establece la necesidad de fertilización nitrogenada adicional para alcanzar altos rendimientos cuando el suministro de N del suelo es medio a bajo y cuando no se inocula con cepas seleccionadas. Las dosis bajan significativamente en suelos con altos suministro de N y cuando se maneja convenientemente la

inoculación. El NDF se ha estimado entre 54 y 65%.

Los frejoles para grano seco, a su vez, presentan condiciones óptimas para su crecimiento en la zona centro-sur de Chile. Se ha encontrado respuesta a la inoculación, fluctuando el NDF entre el 30 y 60% (Longeri *et al.* 1990; Urzúa y Silva, 1999; (Figura 3B); Longeri *et al.* 1990. Por su parte, Longeri *et al.* (1988), detectaron toxicidad de hierro (Fe) y manganeso (Mn) en frejol, en suelos trumaos de la VIII Región, que afectarían la respuesta de esta leguminosa a la eventual fertilización con nitrato.

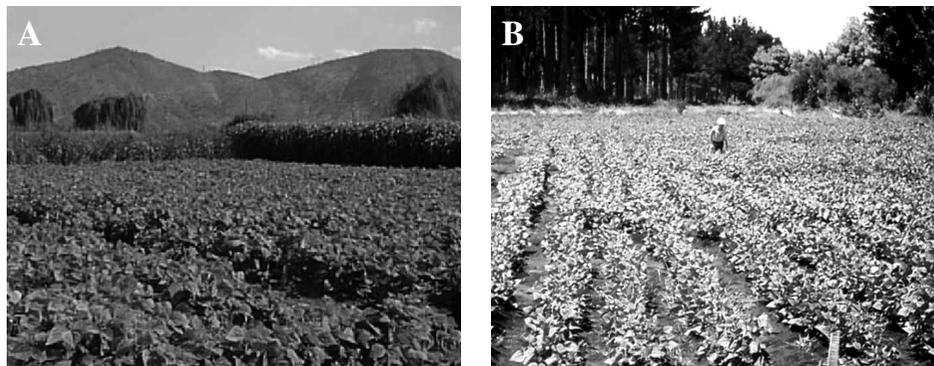


Figura 3. A. Porotos (frejol) verdes inoculados con *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* en suelo aluvial de la VI Región de Chile. B. Frejoles para grano seco. Las hileras de la izquierda corresponden a testigo sin inocular. Las hileras de la derecha fueron inoculadas con *Rhizobium* en suelo Arenales, VIII Región de Chile.
Figure 3. A. Green beans inoculated with *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* in alluvial soil of central Chile. B. Dry beans. Left rows non inoculated plants and right rows, plants inoculated with *Rhizobium* in sandy soil of south-central Chile.

Se hace necesario recalcar, una vez más, la importancia de la producción y uso de abonos verdes, como alternativa al empleo de fertilizantes nitrogenados naturales o sintéticos. En las estimaciones sobre los beneficios de la FSN en Chile mencionadas anteriormente, se consideró que alrededor de un 20% de la superficie agrícola podría optar por sistemas de agricultura sustentable, los cuales sólo son viables cuando se aporta nitrógeno a ellos a través del reciclaje de residuos vegetales y animales y, principalmente, a través de la producción e incorporación al suelo de especies leguminosas altamente fijadoras de N. Ahora bien, para lograr este propósito es indispensable estudiar estas nuevas simbiosis a fin de manejar de la forma más eficiente, técnica y económicamente, estos recursos. No obstante, es preciso aclarar que el uso de abonos verdes tiene costos adicionales asociados al establecimiento, que pueden ser superiores al costo de fertilización, pero los productos obtenidos, si cumplen además con otros requisitos, pueden ser considerados orgánicos y, por ello, obtener un precio mayor. Al mismo tiempo, el aporte de N por los abonos verdes se va haciendo menos costoso con su uso reiterado, hasta alcanzar un sistema de N del suelo en equilibrio (Rodríguez, 1993).

Otra ventaja adicional del uso de los abonos verdes en el ámbito silvoagropecuario, es el efecto favorable que ellos producen en las características físicas del suelo, actuando como mejoradores de ellas (mejora en la estructura del suelo y en la estabilidad de sus agregados, mejora en la porosidad del suelo, reflejada en mayor movimiento del agua del suelo, lixiviación y ascensión capilar, mayor capacidad de retención de humedad, lo que significa variación de las constantes hídricas edáficas, entre otros efectos positivos).

Las principales leguminosas para abonos verdes a utilizarse en Chile son vicias (*Vicia sativa*, *V. benghalensis*), arvejas forrajeras (*P. sativum*), habas forrajeras (*V. faba*), todas asociables a cepas de *R. leguminosarum* bv. *viceae*, y lupinos forrajeros (*Lupinus angustifolius* y *L. albus*), que realizan simbiosis con cepas de *R. lupini* (IX Región). Hace algún tiempo, se han realizando los primeros estudios sobre FSN en estas especies. El Cuadro 7 muestra resultados favorables de la selección de cepas en invernadero, con suelos representativos de la zona central, usando vicia forrajera (Urzúa *et al.*, 2001).

Cuadro 7. Efecto de cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* sobre la fijación simbiótica de nitrógeno en *Vicia benghalensis*, con suelos aluviales de la zona central de Chile, bajo condiciones de invernadero (Urzúa *et al.*, 2001).

Table 7. Effect of *Rhizobium* strains on nitrogen fixation SNF in *Vicia benghalensis*, with alluvial soils of central Chile, under greenhouse conditions (Urzúa *et al.*, 2001).

Tratamiento <i>Rhizobium</i>	MS total g·maceta ⁻¹	N total mg·maceta ⁻¹	Masa nodular % ¹	Etileno mg·kg ⁻¹	Ureidos % ¹
Testigo	8,3 b ²	315 b ²	100 bc ²	315 b ²	100 c ²
Cepa 2	9,2 b	352 ab	101 bc	411 b	109 b
Cepa 3	10,2 a	403 a	142 a	1.332 a	130 a
Cepa 4	8,8 b	340 b	87 c	401 b	115 b
Testigo + N	8,7 b	338 b	110 b	260 b	114 b

¹Porcentajes respecto del testigo.

Percentage of control.

²Promedios seguidos por igual letra no son estadísticamente diferentes entre sí según la prueba de comparación múltiple de Waller- Duncan, $p \leq 0,05$.

Means with the same letter are not statistical different, Waller-Duncan, $p \leq 0.05$.

Se aprecia la respuesta significativa de la vicia a la inoculación con *Rhizobium* de la cepa 3, en todos los parámetros de fijación de N₂ utilizados. La caracterización de las cepas presentó perfiles de resistencia a antibióticos normales y escasa variabilidad de peso molecular plasmidial.

Finalmente, se debe precisar que la FSN podría aumentar significativamente a nivel nacional, aunque se plantara solamente un 5% de la superficie potencial de aramo australiano (*A. melanoxylon*) y pseudoacacia (*R. pseudoacacia*), especies leguminosas arbóreas fijadoras de N₂ (354.000 ha, aproximadamente), para las zonas centro sur y sur del país, que producen madera y/o pulpa consideradas atractivas (Loewe *et al.*, 1998).

COMENTARIOS FINALES

Los diversos objetivos de las investigaciones discutidas de este artículo se han podido alcanzar a través de enfoques clásicos de la investigación. Sin embargo, en la actualidad se están utilizando métodos biotecnológicos avanzados, incluyendo ingeniería genética de plantas y de microorganismos que podrán mejorar los procesos de FSN y ofrecer al productor diferentes opciones de utilización práctica y económica de estas técnicas (Crouch *et al.*, 2004; Twornlow, 2004).

Pronto se dispondrá de inoculantes que contengan cepas bacterianas seleccionadas por su alta eficiencia para fijar nitrógeno, y especialmente adaptadas a condiciones de estrés del suelo como sequía, temperaturas extremas, salinidad excesiva, acidez del suelo asociada a presencia de aluminio y manganeso tóxicos para las plantas, agroquímicos, sustancias tóxicas de las semillas, altas concentraciones de nitrógeno mineral en el suelo, metales pesados tóxicos, etc. son los plasmidios crípticos de los rizobios, el lugar donde realizar las transformaciones genéticas necesarias. Todo lo cual contribuirá a hacer un uso cada vez más racional del suelo, aumentando su producción, ahorrando recursos empleados en la fertilización, conservando el recurso suelo y reduciendo los índices de contaminación ambiental (Urzúa, 2000b; Olivares, 2004).

Es preciso puntualizar, adicionalmente, que la inoculación de semillas de leguminosas con *Rhizobium* corresponde a un manejo tecnificado de productos biológicos que requiere trabajar con organismos vivos muy lábiles, por lo que se requieren conocimientos adecuados por parte de los productores. Inocular bien significa, indirectamente, contribuir a elevar el nivel cultural de los usuarios, a fin de lograr resultados positivos con el uso de estas técnicas. Sin embargo, existe

la alternativa de emplear semilla pre-inoculada y peletizada.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos utilizando la metodología de análisis descrita en este trabajo, se pueden obtener las siguientes conclusiones: 1. Se establece la importancia que tiene para Chile la FSN, sus alcances y la cuantificación del ahorro de N-exógeno (N-fertilizante + N-fijado) para la agricultura chilena, que en la actualidad puede significar un 22% del total anual y un 33,5% en un futuro cercano, el que podría llegar a equivaler anualmente a unos US\$ 178 millones, aproximadamente (incluyendo praderas mejoradas y naturales). 2. Se realizaron estimaciones del aporte del N a cultivos no leguminosos, frutales y viñas, como contribución a la nutrición nitrogenada, en un sistema de uso de abonos verdes (20% de la superficie agrícola). 3. Se comprueba la sustentabilidad del nitrógeno que puede lograrse al utilizar leguminosas cultivadas, de pasturas y arbóreas, así como la importancia del uso de abonos verdes leguminosos en la producción silvoagropecuaria sustentable. 4. Los resultados de las investigaciones son muy promisorios, lográndose efectos claros del manejo de las simbiosis sobre la producción y calidad de las cosechas obtenidas, ahorrando aplicaciones de N-fertilizante, recuperando suelos degradados, evitando la erosión, facilitando el control biológico de agentes perjudiciales para las plantas y preservando el medio ambiente.

RESUMEN

En el presente trabajo se definen y clarifican las ventajas que la fijación simbiótica de nitrógeno (FSN) ofrece a la producción vegetal, en las diferentes zonas edafoclimáticas de Chile. Como objetivos se seleccionaron, el estudio de las cantidades de N-fijado global en el agro chileno, expresándolo como fertilizante nitrogenado ahorrado anualmente en el país debido al uso de leguminosas y la investigación referente a mejorar la eficiencia de las diferentes simbiosis, para lograr

un mayor ahorro de N-fertilizante en las condiciones chilenas. En la metodología de cálculo para estimar el aporte global actual de la FSN a la nutrición nitrogenada, se utilizó el método de fertilización dirigida, complementado con información sobre fijación de N₂ determinada en diferentes leguminosas chilenas. Las investigaciones orientadas a mejorar el aporte de N por una mayor eficiencia de la FSN utilizaron técnicas de selección de cepas en laboratorio (perfiles de plásmidos, resistencia a antibióticos), de invernadero (materia seca, N-acumulado, nodulación, reducción de acetileno (C₂H₂), ureidos, entre otras) y validaciones en terreno (materia seca, N-acumulado, nodulación, reducción de acetileno, ureidos y N-fijado con N¹⁵), empleando metodologías universalmente difundidas. Los resultados mostraron la importancia que tiene para Chile la FSN en leguminosas, estimando un ahorro aproximado de fertilización nitrogenada de 33,5% del consumo potencial total de nitrógeno (N-fertilizante + N-fijado) del sector agrario chileno, en un futuro próximo, incluyendo praderas mejoradas y naturales, el cual podría estimarse en unos US\$ 178 millones por año, por el hecho de no comprar N-fertilizante. Estas estimaciones refuerzan el concepto de sustentabilidad respecto al N. Por otra parte, los resultados de las investigaciones relacionadas con el aumento de la efectividad de los sistemas simbióticos son promisorios para abordar su manejo, a fin de lograr mayores producciones, mejor calidad de las cosechas, ahorro de N-fertilizante y reducción de los índices de contaminación ambiental, entre otros aspectos.

Palabras clave: Ahorro de fertilización nitrogenada, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, fijación simbiótica de nitrógeno, leguminosas, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*.

LITERATURA CITADA

Aguilera, L., L. Longeri, H. Urzúa y A. Herrera. 1993. Caracterización de cepas de *Rhizobium meliloti* por su capacidad de adaptación a condiciones del medio. Anexo,

- Informe Final Proyecto FONDECYT 704-90.
- Barrientos, L., M. Higuera, H. Acuña, J. Guerrero, F. Ortega y I. Seguel. 2002. Efectividad simbiótica de cepas naturalizadas de *Mesorhizobium loti* y *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) en plantas de tres especies del género *Lotus*. Agricultura Técnica (Chile) 62: 226-236.
- Barrientos, L. y E. Peñaloza. 1999. Fijación de nitrógeno: Inoculación del lupino. Revista Tattersall 158: 3-6.
- Borie, F., E. Naour, J. Antilef y E. Méndez. 1988. Aislamiento de cepas de *Rhizobium trifolii* en la IX Región de Chile. En: H. Urzúa (ed.) Resúmenes de trabajos presentados en la XIV Reunión Latinoamericana de Rhizobiología. Ciencia e Investigación Agraria 15: 186.
- Botha, P. 1999. The persistence of clovers in grass-clover pastures. Dpt. Econ. Aff., Agric and Tourism. Southern Cape ADC. Outeniqua Exp.Farm. George, Australia. 8 pp.
- Calderón, I. y H. Urzúa. 1988. Caracterización de proteínas de membrana externa de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*. En: H. Urzúa (ed.) Resúmenes de trabajos presentados en la XIV Reunión Latinoamericana de Rhizobiología. Ciencia e Investigación Agraria 15: 190-191.
- Campillo, R. 1997. Fijación biológica de nitrógeno: mejorando praderas. Revista Tattersall 3: 4-6.
- Campillo, R., S. Urquiaga, I. Pino y A. Montenegro. 2003. Estimación de la fijación biológica de nitrógeno en leguminosas forrajeras mediante la metodología del N¹⁵. Agricultura Técnica (Chile) 63: 169-179.
- Crouch, J.H., H.K. Buhariwalla, M. Blair, E. Mace, J. Balaji, and R. Serraj. 2004. Biotechnology – based contributions to enhancing legume productivity in resource poor areas. In: Rajid Serraj (ed.) Symbiotic nitrogen fixation. Prospects of enhanced application in tropical agriculture. Science Publish, Inc. USA. 382 pp.
- Diver, S. 1999. Towards a sustainable agriculture. New Reinassance Magazine 6: 1-7.
- Ettema, P.J., and S.F. Ledgard. 1992. Getting the best out of white clover. p. 72-76. In: Proceedings of Ruakura Farmer's Conference. New Zealand.
- Faiguenbaum, H., L. Ozimica y A. Vega. 2000. Estadísticas Agrícolas. Colección de Docencia. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile, 234 pp.
- FAO. 2003. Huerta hidropónica popular. Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo. Manual Técnico (Marulenda e Izquierdo, ed.). Oficina Regional para América Latina. Santiago, Chile. 132 pp.
- Guaiquil, V., L. Ciampi y P. Bustamante. 1988. Utilización de *Rhizobium* para praderas del sur de Chile. I. Selección de cepas efectivas y eficientes *in vitro*. En: H. Urzúa (ed.) Resúmenes de trabajos presentados en la XIV RELAR. Ciencia e Investigación Agraria 15: 185-186.
- Herrera, A., L. Longeri y C. Ovalle. 1996. Estudio de la efectividad de cepas chilenas de *Rhizobium meliloti* en simbiosis con *Medicago polymorfa* L. Agricultura Técnica (Chile) 56: 36-42.
- INE/ODEPA. 1997. VI Censo Nacional Agropecuario. Instituto Nacional de Estadísticas / Oficina de Estudios y Políticas Agrarias, Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile. Santiago, Chile. p. 8-11.
- Loewe, V., M. Toral, C. López, E. Urquieta, G.T. Aromo, M.E. Camelio, M.W. Bourke, y A. Sanhueza. 1998. Monografía de aramo australiano (*Acacia melanoxylon* L.). CONAF – INFOR – FIA, Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile. Santiago, Chile. 101 pp.
- Longeri, L.; A. Herrera y I. Vidal. 1988. Fertilización nitrogenada y toxicidad de hierro (Fe) y manganeso (Mn) en frejol. En: H. Urzúa (ed.) Resúmenes de trabajos presentados en la XIV RELAR. Ciencia e Investigación Agraria 15:201-202.
- Longeri, L., H. Vidal y A. Herrera. 1990. Fijación de N en cultivares de frejol utilizando la técnica de N¹⁵ y respuesta a la fertilización nitrogenada. p. 227-232. In: Proceedings VI Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo, organizado por la Sociedad Chilena de la Ciencia del Suelo y Universidad de la Frontera. Temuco, Chile.

- Montañez, A., C. Labandera, and L. Solari. 2004. Fijación de nitrógeno a una escala nacional. LEIZA, Revista de Agroecología (Uruguay). 19:33.
- Morales, R. y H. Urzúa. 1996. Evaluación del impacto de la aplicación de las técnicas nucleares al uso de fertilizantes nitrogenados y fosfatados. Comisión Chilena de Energía Nuclear. Santiago, Chile. 22 p.
- Mundy, G.N.; H.R. Jones, and W.K. Mason. 2003. Nitrogen fixation activity by white clover pastures during flood irrigation cycles. Aust. Jour. Agric. Res. 39:409-414.
- ODEPA, 2004. Coyuntura Silvoagropecuaria (octubre, noviembre). Oficina de Estudios y Políticas Agrarias, Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile. Santiago, Chile. 8 pp.
- Olivares, J. 2004. Fijación Biológica de Nitrógeno. www.eez.csic.es/~Olivares/ciencia/fijacion/ (accessed 11 May 2005). Estación Experimental del Zaidín, Granada, España. 10 pp.
- Opazo, J.D. y G. Veloso. 1988. Efectos nutricionales en la producción de materia seca y en la fijación de nitrógeno de alfalfa establecida en suelos de origen granítico. *En*: H.Urzúa(ed.) Trabajos presentados en la XIV Reunión Latinoamericana de Rhizobiología. Ciencia e Investigación Agraria 15:198-199.
- Peoples, M.B., B. Palmer, D. Lilley, L.M. Duc, and D.F. Herridge. 1996. Application of ¹⁵N and xylem ureide methods of assessing N₂ of three shrub legumes periodically pruned for forage. *Plant and Soil* 182: 125-137.
- Pijnenborg, J., I.A. Lie, and A.J.B. Zander. 1991. Nodulation of luzerne (*Medicago sativa* L.) in acid soil: Effects of inoculation size and lime pelleting. *Plant and Soil* 131: 1-10.
- Pinochet, D. 1988. Estimación de las necesidades de trébol para la estabilidad de una pradera mixta en la Décima Región de Chile. *En*: H.Urzúa (ed.) Resúmenes de trabajos presentados en la XIV Reunión Latinoamericana de Rhizobiología. Ciencia e Investigación Agraria 15: 202.
- Rodríguez, J. 1993. Manual de Fertilización. Colección en Agricultura. Facultad Agronomía. Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile. 362 pp.
- Rodríguez, J., D. Pinochet y F. Matus. 2001. Fertilización de los cultivos. LOM Ediciones. Santiago, Talca, Valdivia, Chile. 117 pp.
- Rodríguez, J. y D. Suárez. 1999. Método de fertilización dirigida. *Gestión y Tecnología. Iansagro* 2: 8-10.
- Roldán, G., E. Soria, C. Pérez y J. García. 2004. Incrementos de la fijación de N₂ en el cultivo del frijol. Directorio Ecológico Natural. Eco Portal.Net. Cuba. 10 pp.
- Ruiz, M. y H. Urzúa. 1980. Evaluación de la actividad de la nitrogenasa por cromatografía de gases en praderas de la X Región. *Bol. Sociedad Chilena de Química*. 25: 205-206.
- Ruz, E., E. Acuña, E. Zagal, L. Barrientos y A. Pincheira. 1999. Variación en las tasas de fijación de nitrógeno en tres especies del género *Lotus* por efecto del corte y del pastoreo. *Agricultura Técnica (Chile)* 59: 35-44.
- Serraj, R., J. Adu – Gyamfi, O.P. Rupela, and J.J. Drevon. 2004. Improvement of legume productivity and role of symbiotic nitrogen fixation in cropping systems: Overcoming the physiological and agronomic limitations. *In*: Rachid Serraj (ed.) Symbiotic Nitrogen Fixation. Prospects fo Enhanced Application in Tropical Agriculture. Science Publish., Inc. USA. 382 pp.
- Teuber, N. 1996. Fijación simbiótica de nitrógeno en diferentes zonas edafoclimáticas de la Décima Región. Serie Remehue N° 62. p. 3-7. *En*: G.Bortolomeolli (ed.) Resultados de ensayos en ganadería realizados en predios de productores GTT de la Décima Región. Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) Remehue, Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile. Osorno, Chile.
- Torres, M.E. y H.Urzúa. 1983. Fijación simbiótica de nitrógeno en praderas 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.
- Twornlow, S. 2004. Increasing the role of legumes in smallholder farming systems. The future challenge. *En*: Rachid Serraj (ed.) Symbiotic

- Nitrogen Fixation. Sci. Publ. Inc. USA. 382 pp.
- Urzúa, H. 1979. Fijación simbiótica de nitrógeno en praderas. Bol. Téc. 21. Departamento Suelos Facultad de Agronomía, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile. 45 pp.
- Urzúa, H. 1982a. Evaluación estacional de la fijación simbiótica de nitrógeno en praderas mejoradas de la X Región. p. 45-66. *En*: R. Bernier (ed.) Fertilización y Productividad de las Praderas de la Región de Los Lagos. Informe de Avance, CERPLAC X Región. Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) Remehue, Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile, Osorno, Chile.
- Urzúa, H. 1982b. Estado actual de conocimientos sobre fijación simbiótica de nitrógeno en praderas de la X Región de Chile. Publicación 23, Departamento de Ciencias Vegetales. Facultad de Agronomía. Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile. 25 pp.
- Urzúa, H. 1984. Fijación simbiótica de N en praderas de la X Región: Un planteamiento metodológico. Boletín de la Sociedad Chilena de la Ciencia del Suelo. 4:76-84.
- Urzúa, H. 1991. Fijación de N₂ en leguminosas: importante herramienta para la producción agropecuaria. Panorama Económico de la Agricultura. 78: 25-27.
- Urzúa, H. 1996. Estimación de la fertilización nitrogenada de arveja (*Pisum sativum*) en la zona central de Chile. Res. XVIII Reunión Latinoamericana de Rhizobiología. Santa Cruz, Bolivia. p. 125-126.
- Urzúa, H. 2000 a. Nutrición nitrogenada de arvejas y frejoles para uso fresco o agroindustrial en la Región Metropolitana. Informe Final, Proyecto FONDECYT 1980/582. Santiago. 45 pp.
- Urzúa, H. 2000 b. Fijación simbiótica de nitrógeno en Chile: Importante herramienta para una Agricultura Sustentable. Proc. XX Reunión Latinoamericana de Rhizobiología, Arequipa, Perú. p. 211-227.
- Urzúa, H.; L. Barrales, H. Faiguenbaum, M. Gálvez, A. Ormazábal y R. Pizarro. 2003. Fertilización nitrogenada de porotos verdes, para uso agroindustrial en la zona central de Chile: Indicaciones preliminares. Ciencia e Investigación Agraria 30: 57-60.
- Urzúa, H., R. Bernier y M. Ruiz. 1985. Tasas de fijación simbiótica de nitrógeno en praderas de la zona sur de Chile. Ciencia e Investigación Agraria 12: 143-145.
- Urzúa, H.; P. Muñoz y F. Borie. 1992. Infección natural por micorrizas VA en suelos de Osorno, X Región). Ciencia e investigación Agraria 19: 131-135.
- Urzúa, H., P. Muñoz y F. Borie. 1993. Efecto de micorrizas VA sobre la fijación de N₂ en trébol blanco en suelos de la zona sur de Chile. Ciencia e Investigación Agraria 20: 47-54.
- Urzúa, H. y C. Navarro. 1988. Respuesta potencial a la inoculación en leguminosas de grano chilenas. *En*: H. Urzúa (ed.) Resúmenes de trabajos presentados en la XIV Reunión Latinoamericana de Rhizobiología. Ciencia e Investigación Agraria 15:200.
- Urzúa, H., H. Pinilla y M. Ruíz. 1986a. Factores del suelo limitantes de la fijación simbiótica de N₂ en praderas de la zona sur de Chile. Ciencia e Investigación Agraria 13: 257-262.
- Urzúa, H., J. Romero y M. Ruíz. 1986b. Effect of p, p DDT on nitrogen fixation of white clover in volcanic soils of Chile. MIRCEN Journal 2: 365-372.
- Urzúa, H., M. Ruíz y R. Bernier. 1987. Fijación de nitrógeno en praderas de la X Región. Ciencia e Investigación Agraria 14:217-223.
- Urzúa, H., M. Ruíz y M.C. Navarro. 1988. Respuesta potencial a la inoculación en leguminosas forrajeras chilenas. *En*: H. Urzúa (ed.) Resúmenes de trabajos presentados en la XIV Reunión Latinoamericana de Rhizobiología. Ciencia e Investigación Agraria 15: 200.
- Urzúa, H. y H. Silva. 1999. Fertilización y riego de leguminosas de grano para exportación en la zona centro-sur. Colecc. Extensión. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 56 pp.
- Urzúa, H. y B. Tesser. 1998. Efecto de características químicas de suelos aluviales de la zona central de Chile en la concentración de ADN plasmidial de cepas de *Rhizobium*

- leguminosarum* bv. *phaseoli*. Ciencia e Investigación Agraria 25: 185-187.
- Urzúa, H. 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 *Rhizobium trifolii* en suelos derivados de cenizas volcánicas. Ciencia e investigación Agraria 12: 25-21.
- Urzúa, H., J.M. Urzúa y R. Pizarro. 2001. Preselección de cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* en vicia forrajera, para abonos verdes. Ciencia e Investigación Agraria 28: 3-6.
- Urzúa, H. y A. Zurita. 1986. Producción y fijación de N₂ de alfalfa en andisols del sur de Chile. p. 127-128. In: Proceeding. XVIII Reunión Latinoamericana de Rhizobiología. Santa Cruz, Bolivia. p.127-128.
- Urzúa, H., A. Zurita, L. Longeri y A. Herrera. 1995. Factores de suelo limitantes del crecimiento de la alfalfa en cuatro suelos de la X Región. II. Acidez del suelo. Ciencia e Investigación Agraria 22: 49-56.
- Watanabe, I. 2000. Biological nitrogen fixation and its use in Agriculture (outline). www.osahinet.or/~it6i-wtnb/BNF.html. J.ICA/Cantho Univ. Expert. Mar – Apr. Vietnam.
- Zurita, A., H. Urzúa, L. Longeri y A. Herrera. 1994. factores del suelo limitantes del crecimiento de la alfalfa en cuatro suelos de la X Región. I. Disponibilidad de nutrientes. Ciencia e Investigación Agraria 21:137-144.