

NOTA DE INVESTIGACION

PRE-SELECCION DE CEPAS DE *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* EN VICIA FORRAJERA, PARA ABONOS VERDES¹

H. URZUA²; J. M. URZUA y R. PIZARRO

Departamento de Ciencias de los Recursos Naturales
Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal
Pontificia Universidad Católica de Chile
Casilla 306 Correo 22, Santiago, Chile.

Abstract

H. Urzúa, J. M. Urzúa y R. Pizarro. Pre-selection of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* stains in forage vetch for use as green manure. The growing emphasis in sustainable agriculture nitrogen fertilization using organic materials motivates the study of improved nitrogen availability in vetch (*Vicia benghalensis*) grown in alluvial soils of central Chile. With the aim of providing alternatives to artificial N sources, the present research analyzes symbiotic N studies aimed to optimize the contribution of N fixation as a means of attaining stability of N mineralization from organic materials in the soil. Greenhouse trails were made using central zone alluvial soils and native strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*. Strains were characterized by isolation in YEM medium and by determination antibiotics resistance profiles and plasmid profiles using DNA electrophoresis. Plants were grown under controlled environmental conditions in pots with selected soils. The behavior of different rhizobium strains was compared to uninoculated treatments with and without N-fertilizer. DM production (aerial and root), N-accumulation by the plants, nodulation, nitrogenase enzyme activity and ureides content, were superior ($p = 0,05$) for strain 3. The results support further strain 3 experimentation under field conditions.

Key words: *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*, green manure, symbiotic nitrogen fixation, *Vicia benghalensis*, sustainable agriculture.

Cien. Inv. Agr. 28(1): 3-6. 2001

INTRODUCCION

Para sostener el aumento en la eficiencia productiva de los cultivos es necesario satisfacer los requerimientos de nutrientes de las plantas. El suministro de nitrógeno del suelo no es suficiente para compensar su creciente demanda, haciéndose necesaria la aplicación de algún fertilizante nitrogenado. Sin embargo, esta estrategia productiva puede producir una creciente contaminación del suelo y del agua.

Dentro de este contexto, la agricultura sustentable constituye una modalidad productiva que disminuye la utilización de fertilizantes (Buckles, 1998), permitiendo ser recomendada como una herramienta eficaz y económica para minimizar estos problemas.

La fijación simbiótica de nitrógeno (FSN) es un proceso por el cual las plantas leguminosas, al ser infectadas con bacterias del suelo del género *Rhizobium*, fijan nitrógeno atmosférico (N_2) por acción de la enzima nitrogenasa, para convertirlo en nitrógeno mineral (NH_3), contribuyendo a sustentar su síntesis proteica. La inoculación con cepas específicas de *Rhizobium* permite maximizar la fijación de nitrógeno e incrementar la producción de biomasa aprovechable (Urzúa, 2000b).

Con el fin de aprovechar la FSN dentro de la modalidad de la agricultura sustentable, la utilización de cultivos de cobertura durante los meses de invierno, que posteriormente son incorporados y conocidos como “abonos verdes”, permiten mejorar las propiedades físicas y químicas de los suelos para su uso posterior.

¹ Trabajo financiado por el proyecto FONDECYT N° 1980582

² Dirigir correspondencia a: H.Urzúa - hurzua@puc.cl

Entre las principales ventajas de la incorporación de abonos verdes al suelo se pueden mencionar: i) fijan nitrógeno atmosférico en altas cantidades, ii) se mejoran las características físicas del suelo (estructura, aireación, capacidad de retención de agua, facilitan el laboreo, ayudan a prevenir la erosión, etc.), iii) disminuye la lixiviación de nitrógeno, iv) aumenta el nivel de humus del suelo y la actividad microbiológica, v) ayuda a controlar malezas, vi) beneficia el manejo de plagas, vii) contribuye a la obtención de cosechas no contaminadas, viii) presentan un manejo más manipulable y limpio que el abono animal, ix) puede generar beneficios complementarios al utilizar, eventualmente, estos cultivos como forraje, x) constituye una fuente de atracción para la vida silvestre, contribuyendo a la conservación de la biodiversidad, etc. (Diver, 1999; Mc Rae *et al.*, 2000).

Las especies que se cultivan para abonos verdes deben llegar a producir abundante biomasa, en un corto período vegetativo y de fácil descomposición. Entre éstas especies leguminosas, las más recomendadas para cultivar en la zona central del país corresponden a: vicia (*Vicia sativa* L.), arveja (*Pisum sativum* L.) y haba (*Vicia faba* L.), siendo importante utilizar variedades forrajeras. Dentro de su composición nutritiva destaca su alta concentración de nitrógeno, que fluctúa entre 3 y 4%.

Los objetivos de este estudio fueron: i) seleccionar cepas nativas de *R. leguminosarum* bv. *viciae* para nodular vicia forrajera en suelos aluviales de la zona central del país, ii) medir la eficiencia de la FSN de las cepas seleccionadas en vicia forrajera comparadas con poblaciones nativas y con fertilización nitrogenada, en condiciones de invernadero.

Para la colección de cepas nativas se realizaron muestreos de suelos, siembra en macetas de vicia

forrajera (*Vicia benghalensis*) variedad Atropurpúrea. Se hizo una colección y selección de nódulos, aislamiento de rizobios sobre medio agar-extracto de levadura-manitol (YEM, Urzúa *et al.*, 1995). La determinación e identificación de cepas de *Rhizobium* fue realizada por resistencia a antibióticos (Urzúa, 2000a) y electroforesis de ADN plasmidial (Urzúa y Tesser, 1998).

La determinación de la eficiencia simbiótica para la pre-selección de las cepas fue realizada en macetas con suelos aluviales de la zona central, bajo condiciones de invernadero, con la misma especie utilizada en la primera etapa. Se evaluaron tres cepas, las que fueron inoculadas al momento de la siembra, un tratamiento control, que se infectó espontáneamente, y un tratamiento con fertilización nitrogenada. Se midió materia seca (75°C) y concentración de nitrógeno en la parte aérea y raíz, masa nodular y contenido de ureidos (Urzúa y Tesser, 1998) y actividad de la enzima nitrogenasa, por el método de reducción de acetileno a etileno (Urzúa y Ruiz, 1980). Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante análisis de varianza y la diferencia de medias según Duncan. Se efectuaron, además, algunas correlaciones simples.

El análisis de las cifras muestra un efecto significativo de la inoculación con la cepa 3 sobre todos los parámetros medidos (Tabla 1), destacándose especialmente los valores de actividad de la enzima nitrogenasa. Respecto a la superioridad lograda por la cepa 3 en la producción de materia seca y en la acumulación de nitrógeno, comparadas con el tratamiento fertilizado, puede suponerse que la dosis de N usada fue insuficiente para competir con la mejor cepa. El coeficiente de masa nodular mostró clara evidencia de la eficiencia infectiva de la cepa 3. Por su parte, el contenido de ureidos en hojas y tallos muestra, una vez más, una mayor presencia de estos compuestos

Tabla 1. Efecto de la inoculación con cepas nativas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* sobre la fijación simbiótica de nitrógeno en *Vicia benghalensis*, bajo condiciones de invernadero.

Effect of inoculation with native Rhizobium leguminosarum bv. viciae strains on the symbiotic nitrogen fixation in Vicia benghalensis, under greenhouse conditions.

| Tratamiento | MS total (g/maceta) | N total (mg/maceta) | Masa Nodular (% relativo) | Actividad N-asa (etileno, mg/kg) | Ureidos (% relativo) |
|--|------------------------|------------------------|------------------------------|--|-------------------------|
| Testigo | 8.3 b ¹ | 315 b | 100 bc | 315 b | 100 c |
| <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> | | | | | |
| Cepa 2 | 9.2 b | 352 ab | 101 bc | 411 b | 109 b |
| Cepa 3 | 10.2 a | 403 a | 142 a | 1332 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 |

1. Duncan, p= 0.05.

nitrogenados orgánicos en las plantas inoculadas con la cepa más efectiva.

Además, se obtuvo una correlación significativa entre la producción de materia seca de las plantas de vicia y su correspondiente nitrógeno acumulado (Figura 1)

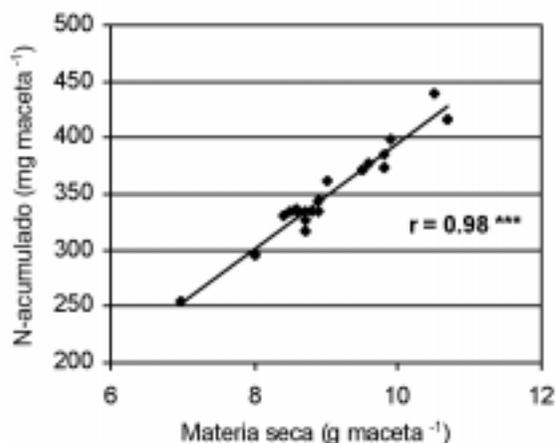


Figura 1. Relación entre materia seca producida por vicia forrajera (*Vicia benghalensis*) y su acumulación de nitrógeno, en condiciones de invernadero.

*Relationship between dry matter production by forage vetch (*Vicia benghalensis*) and nitrogen accumulation under greenhouse conditions.*

Adicionalmente, la Figura 2 muestra una normal dependencia de la acumulación de nitrógeno por las plantas de vicia de la actividad nitrogenásica nodular. Estas relaciones confirman la elección adecuada de parámetros para determinar la FSN en vicias, en las condiciones experimentales realizadas.

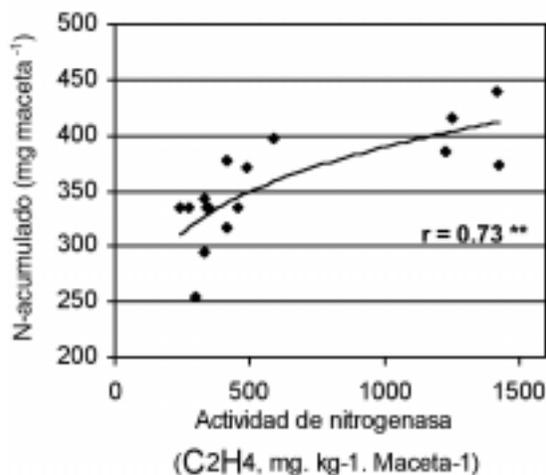


Figura 2. Relación entre actividad de la enzima nitrogenasa y la acumulación de N por vicia forrajera (*Vicia benghalensis*), en condiciones de invernadero.

*Relationship between nitrogenase enzyme activity and nitrogen accumulation by forage vetch (*Vicia benghalensis*), under greenhouse conditions.*

En la Figura 3 se presentan los resultados preliminares de electroforesis de ADN plasmidial de algunas cepas de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, identificadas y seleccionadas en los experimentos de invernadero.

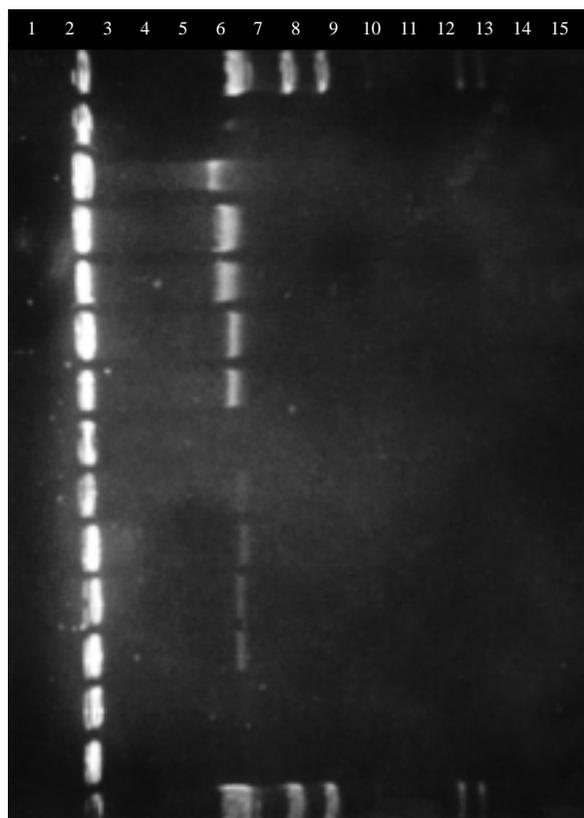


Figura 3. Perfiles de plásmidos de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. Carriles 1 y 15: estándar de peso molecular (ADN del fago λ digerido con Hind III); Carriles 2 a 6 y 7 a 14: ADN plasmidial de diferentes cepas; Carril 8; buffer de carga.

Plasmid profiles of Rhizobium leguminosarum bv. *viciae*. Lane 1 and 15: standard of molecular weight (of λ DNA digested with Hind III); Lane 2 to 6 and 7 to 14: plasmidial DNA of different strains; Lane 8; load buffer.

Finalmente, puede establecerse que este tipo de experimentos permite una selección preliminar de cepas de *R. leguminosarum* bv. *viciae* específicas para una nodulación efectiva en vicia forrajera, que incentive la FSN. Además, estos resultados deben ser validados en condiciones de campo para la obtención de abonos verdes altamente aportadores de N al sistema productivo, considerando que su uso práctico dependerá, también, de aspectos económicos (costo/beneficio), dentro del marco de una agricultura sustentable.

RESUMEN

Debido a la importancia creciente del uso de abonos verdes para aportar nitrógeno (N) a los cultivos en la modalidad de la agricultura sustentable, se estimó necesario estudiar la posibilidad de optimizar la nutrición nitrogenada de vicia (*Vicia benghalensis*) en suelos aluviales de la zona central. Los estudios tuvieron como objetivo optimizar el aporte de N, incentivando la fijación simbiótica, a fin de sustituir la fertilización nitrogenada al alcanzar la estabilización del sistema de mineralización de N de los residuos orgánicos del suelo. Se emplearon suelos aluviales de la zona central, y se caracterizaron cepas nativas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*, a través de aislamiento sobre medio YEM, determinación de perfiles de resistencia a antibióticos y de plásmidos por electroforesis de ADN, con el objeto de realizar, en una primera etapa, estudios en invernadero. Posteriormente, se establecieron las plantas en macetas con los suelos seleccionados, bajo condiciones ambientales controladas. Se probó el comportamiento de diferentes cepas rizobianas frente a testigos no inoculados con y sin aporte de N fertilizante. Los resultados de producción de materia seca de la parte aérea y raíz, el N acumulado por las plantas, la nodulación, la actividad de la enzima nitrogenasa y el contenido de ureidos, fueron significativamente superiores ($p=0.05$) con la cepa 3 en los parámetros de fijación empleados, lo que permitiría utilizarla en experimentos validatorios en terreno.

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.; Faiguenbaum, H.; Ormazábal, A.; Gálvez, M.; y R.Pizarro. 2000a. Nutrición nitrogenada de frejoles para uso agroindustrial en Chile Central. Publ. XX Reunión Latinoamericana de Rhizobiología. (IDEMA/U.S.Agustín). Arequipa p.146.

Urzúa, H. 2000b. Fijación Simbiótica de Nitrógeno en Chile: Importante herramienta para una agricultura sustentable. Publ. XX Reunión Latinoamericana de Rhizobiología (IDEMA/U.S.Agustín). Arequipa, Perú. 221-228.

LITERATURA CITADA

- Bucles, D. 1998. Cover crops for sustainable agriculture. IDRC, Ottawa, Canada.
- Diver, S. 1999. Towards a sustainable agriculture. New Renaissance Magazine. 6 (2): 1-7.
- Mc Rae, R.; Hill, G.; Mehuys and J. Henning. 2000. Farm scale agronomic and economic conversion from conventional to sustainable agriculture. Ecological Agriculture Projects. Mc Gill Univ. Publ. 108. Canadá, 30 pp.
- Urzúa, H. y M. Ruiz. 1980. Evaluación de la actividad de la nitrogenasa por cromatografía de gases en praderas de la X Región. Boletín Sociedad Chilena de Química. 25(4): 205-206.
- Urzúa, H.; Zurita, A.; Longeri, L. 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.
- Urzúa, H. y B. Tesser. 1998. Efecto de características