

## SELECCION DE CEPAS DE *Bradyrhizobium* sp PARA *Macroptilium atropurpureum* Y *Centrosema virginianun* EN EL CENTRO-NORTE DE LA PROVINCIA DE CORDOBA (ARGENTINA)

A ABRIL, S KOPP

Microbiología Agrícola. Fac. Ciencias Agropecuarias. U.N.C. c.c. 509-5000 Córdoba, Argentina.

### SELECTION OF STRAINS OF *Bradyrhizobium* sp and EVALUATION TO *Macroptilium atropurpureum* AND *Centrosema virginianun* IN THE CENTER-NORTH OF CORDOBA PROVINCE (ARGENTINA)

Forrage resources of the center-north of the province of Córdoba (Argentina) wich consist of nature pastures and introduced grasses denote a decrease in quality and dry matter limiting cattle production in autumn and winter. The EEA Manfredi INTA carries out an introductory plan of subtropical forrage legumes in wich *Macroptilium atropurpureum* and *Centrosema virginianum* resulted to be the best adapted to the enviromental conditions of this region. A very important factor in adaptation for these species is the nitrogen fixation capacity, therefore native strains from four experimental sites of the center-north of Córdoba were obtained to stablish the *Bradyrhizobium* presence, which are able to nodulate *Macroptilium atropurpureum* and *Centrosema virginianum*. The fixing effectiveness of the isolated strains was measured by means of nodules number, dry weight and nitrogen percentage in laboratory and field essays. Rhizobial native strains which only nodulate with *Macroptilium atropurpureum* were obtained and some of them proved to be very effective. *Centrosema virginianun* does not stablish symbiosis with native strains therefore its inoculation is always necessary.

**Key words:** *Macroptilium atropurpureum* -*Centrosema virginianun*- Native strains- *Bradyrhizobium*

## INTRODUCCION

Los recursos forrajeros utilizados en el centro-norte de la Provincia de Córdoba, están básicamente constituidos por pastizales naturales, gramíneas introducidas perennes de origen subtropical y verdeos anuales de ciclo estival, con escasa presencia de leguminosas forrajeras. *Chloris gayana* y *Panicum maximum* cv. Gatton Panic son las gramíneas más difundidas.

Si bien estas gramíneas producen una buena cantidad de forraje en materia seca por hectárea, su ciclo hace que entre mediados de otoño y fines de invierno, su calidad sea limitante para la producción ganadera, determinado por su caída en contenido de proteína (Cangiano *et al.* 1978, Mufarrege 1984, Virasoro, Ferreyra 1987).

Además se observa una disminución en la producción de estas pasturas a través de los años, debido fundamentalmente a la pérdida de fertilidad de los suelos en cuanto a nitrógeno disponible. Una de las formas de aportar nitrógeno al sistema suelo-planta, lo constituye la fijación simbiótica que ocurre en plantas leguminosas en asociación con bacterias del género *Rhizobium*. El empleo de

leguminosas asociadas a gramíneas, es un recurso eficiente para mantener el suelo con un buen nivel de fertilidad (Vallejos 1981, Rumbaugh, Johnson 1986) lo cual podría evitar el uso de fertilizantes nitrogenados que generalmente son costosos y de baja eficacia.

En el centro-norte existen antecedentes sobre la adaptación de algunas especies de leguminosas perennes de origen subtropical. Entre las que demostraron buena persistencia en el jardín de introducción del Campo Anexo Dean Funes de INTA fueron las pertenecientes a los géneros *Macroptilium*, *Galactia*, *Papua*, *Desmodium* y *Centrosema*. (Virasoro, Ferreyra 1987). Las especies destacadas fueron: *Macroptilium atropurpureum* y *Centrosema virginianun*. (De León 1991), coincidentemente la bibliografía señala la aptitud de estas especies para condiciones similares al área en estudio. (Kretschmer 1966, Aragao *et al.* 1983; Humphrey's 1989).

Un factor muy importante para la adaptación de estas especies es la capacidad de fijar nitrógeno, las plantas deben ser inoculadas recurriendo a inoculantes provistos por bancos de cepas, que no siempre poseen el material

más adecuado para las condiciones de la región, por consiguiente la determinación de la existencia de rizobios nativos en los sitios de implantación es prioritaria, ya que estos pueden ser más eficientes en la fijación de nitrógeno a causa de su mayor adaptación y competitividad. (Date 1976, Quinteros, Garza 1977, Date, Halliday 1987; Nornayati *et al.* 1988).

Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados se plantea como hipótesis de trabajo, la posible existencia de cepas nativas de *Bradyrhizobium* que nodulen a las leguminosas introducidas y que sean más eficientes en su capacidad fijadora a causa de su adaptación al ambiente.

De acuerdo a lo anteriormente expresado, los objetivos planteados fueron: (a) determinar la presencia de cepas de *Bradyrhizobium spp* que infecten a *Macroptilium atropurpureum* y *Centrosema virginianum*, (b) evaluar la eficiencia en fijación de nitrógeno de las cepas aisladas, y (c) establecer si se requiere inocular las especies de leguminosas introducidas.

## MATERIALES Y METODOS

### Lugar de Muestreo

La zona centro-norte de la Provincia de Córdoba, es una región semiárida con una precipitación anual de 600-700 mm, con un déficit hídrico de 100-200 mm. Los sitios de experimentación correspondieron a campos de productores situados en:

Sitio 1) a 30 km al este de Villa de María de Río Seco (Dpto Río Seco) y presentaba una pastura de *Chloris gayana* con 6 años de implantación.

Sitio 2) a 30 km al este de Villa del Totoral (Dpto Totoral) y presentaba una pastura de *Panicum maximum* cv Gatton Panic, con 8 años de implantación.

Sitio 3) a 5 km al norte de Monte Cristo (Dpto Río Primero), con una pastura de *Panicum maximum* cv Gatton Panic, con 4 años de implantación.

Sitio 4) a 6 km de Dean Funes (Dpto Ischilín) Campo Experimental Anexo de INTA, con *Cenchrus ciliaris* y *Chloris gayana* con 6 años de implantación.

No obstante las distancias existentes entre los sitios de experimentación puede afirmarse que es una misma región geomorfológica y climática. Se estableció que para los sitios 1 y 2 los suelos son similares, clasificados como Haplustol éntico, limoso-grueso, mixto térmico. Siendo los suelos de los sitios 3 y 4 clasificados como Haplustol típico de textura franco-limosa y Haplustol torrihéntico franco-limoso grueso, respectivamente.

### Muestreo

En cada sitio de experimentación, donde se realizaron los ensayos de introducción de leguminosas subtropicales, se determinó una parcela de una hectárea y se tomaron 5 muestras de suelo al azar de una profundidad hasta 30 cm, durante el mes de enero de 1989.

### Leguminosas en estudio

Las especies de leguminosas con las que se trabajó fueron: *Macroptilium atropurpureum* (semillas provistas por INTA, Salta) y *Centrosema virginianum* (semillas provenientes de INTA, Mercedes, Corrientes).

### Cepas de *Bradyrhizobium* de referencia

Las cepas fueron provistas por el Banco de cepas del Instituto de Microbiología de INTA Castelar, correspondiendo a C5 y C95 para *M. atropurpureum* y C135 para *C. virginianum*.

### Aislamientos

Cada muestra se fraccionó y distribuyó en dos jarras de Leonard (Gibson 1987), sembrándose 5 semillas por jarra previamente escarificadas en forma mecánica (Seiffert, 1982) y desinfectadas con bicloruro de mercurio al 0.2%. Las plantas fueron colocadas en cámaras de crecimiento a 25° C recibiendo 16 hs de luz y 8 de sombra diarias y regadas con agua destilada. Al cabo de 45 días se extrajeron las plantas y de las que presentaban nódulos se procedió a realizar el aislamiento bacteriano en medio Yem con carbonato, según Date y Halliday (1987).

### Pruebas de efectividad

Una vez obtenidos los cultivos puros de las cepas se determinó la capacidad fijadora de nitrógeno, utilizando tubos con medio Jensen (Gibson 1987) donde se colocaron semillas de las leguminosas en estudio previamente escarificadas, desinfectadas y pregerminadas y se realizaron los siguientes tratamientos con 6 repeticiones: (a) plántulas sin inocular y sin nitrógeno en el medio de cultivo (testigo sin N), (b) plántulas sin inocular y con nitrógeno en el medio de cultivo (0.05% de nitrato de potasio) (testigo con N), (c) plántulas inoculadas con cepas provistas por el Instituto de Microbiología de INTA Castelar, (d) plántulas inoculadas con cepas obtenidas de los aislamientos en laboratorio.

Para el desarrollo de las plantas se colocaron en cámaras con las mismas condiciones mencionadas anteriormente, durante 60 días. Al cabo de dicho período se evaluó la efectividad según los siguientes parámetros (Lepo, Ferrembach 1987): (a) número de nódulos por planta, (b) peso seco de la parte aérea (estufa a 60° C durante 48 hs), y (c) contenido de nitrógeno de la materia seca por el método Kjeldahl, modificado por colorimetría (Apostolatos, 1984).

### Ensayos a campo

Los ensayos se realizaron en los sitios de experimentación en los cuales se logró aislar bacterias del género *Bradyrhizobium* que nodularon las leguminosas en estudio.

En noviembre de 1989, se sembraron parcelas de 3,5m x 3,5m con tres repeticiones con un diseño de bloques al azar totalmente aleatorizado con los siguientes tratamientos: (a) *Macroptilium atropurpureum* inoculado con cepa C95 INTA. (b) *Macroptilium atropurpureum* sin inocular. (c) *Centrosema virginianum* inoculado con cepa C135 INTA. (d) *Centrosema virginianum* sin inocular.

Las siembras se realizaron en líneas distanciadas 70 cm a golpes sobre las mismas a 70 cm entre sí. Al cabo de 60 días, se extrajeron 10 plantas por parcela, determinándose los mismos parámetros que para los ensayos de laboratorio. En todos los sitios de experimentación las leguminosas fueron intersembradas dentro de las pasturas ya implantadas excepto en Dean Funes donde las parcelas fueron de leguminosas puras.

### Análisis estadístico

Los datos fueron evaluados estadísticamente por medio de análisis de varianza y Test de Tukey para comparación entre medias (Pimentel Gomez 1978).

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Aislamientos

La especie *Macroptilium atropurpureum* noduló en suelos de tres de los sitios de experimentación mientras que *Centrosema virginianum*, no presentó nódulos en ninguno. Según Date y Halliday (1987) *M. atropurpureum* se encuentra dentro de las especies del grupo promiscuo y efectivo, ya que nodula eficientemente con un amplio rango de cepas, mientras que *C. virginianum*, pertenece al grupo específico y efectivo, porque solo nodula con un restringido número de cepas. Algunos genotipos de plantas muestran resistencia a la mayoría de las cepas de *Rhizobium*, siendo susceptibles a una o más cepas, de esta forma se las clasifica como específicas. (Bliss 1987)

En Monte Cristo hubo escasa nodulación, obteniéndose solo una cepa (MtC) que creció con dificultad en el medio de cultivo. En Villa del Totoral, también fue poca la nodulación pero se aislaron 2 cepas (T1 y T2), mientras que en Dean Funes se encontraron abundantes nódulos, de los que se obtuvieron 7 cepas de buen crecimiento. (DF1, DF2, DF3, DF4, DF5, DF6 y DF7).

### Ensayo de efectividad

Los resultados de nodulación se expresan en la Tabla 1. Solo 5 de las cepas aisladas en la zona nodularon, (DF6, DF7, DF2, DF3 y T2), las demás no lograron establecer simbiosis. Los resultados obtenidos para el parámetro peso seco de la parte aérea se expresan en la Figura 1. Los tratamientos mostraron diferencias significativas, estando todos los valores de las plántulas inoculadas entre los testigos con y sin nitrógeno. Las cepas obtenidas en Dean Funes (DF2 y DF3) presentaron valores muy cercanos a

los del testigo con N., sin diferencias significativas con las cepas provistas por INTA.

En la Figura 2 se presentan los resultados para contenido de nitrógeno. Coincidentemente los mayores valores corresponden a las cepas de mejor nodulación. Una de las cepas INTA (C5) no presenta diferencias significativas con el testigo con N. mientras que la T2, obtuvo

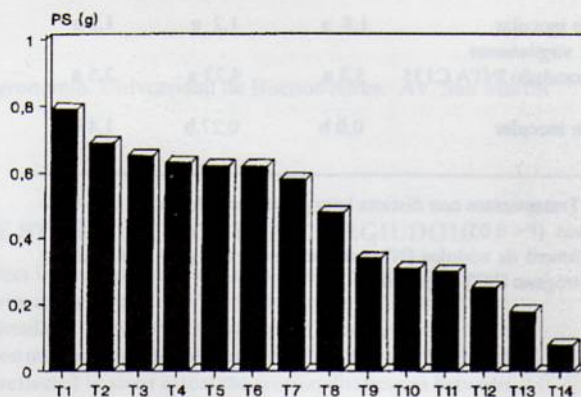


Figura 1: Peso seco (PS) de plántulas de *M. atropurpureum* (promedio de 5 plantas) en ensayos de efectividad. Tratamientos unidos por la misma línea no presentan diferencias significativas. ( $P < 0,05$ ). 1- Testigo con nitrógeno, 2- Cepa de Dean Funes (DF3), 3- Cepa de Dean Funes (DF2), 4- Cepa INTA (C5), 5- Cepa INTA (C95), 6- Cepa de Dean Funes (DF1), 7- Cepa de Villa del Totoral (T2), 8- Cepa de Dean Funes (DF4), 9- Cepa de Monte Cristo (MtC), 10- Cepa de Dean Funes (DF10), 11- Cepa de Villa del Totoral. (T1), 12- Cepa de Dean Funes, (DF6), 13- Cepa de Dean Funes (DF7), 14- Testigo sin nitrógeno.

Tabla 1: Número de nódulos en plántulas de *Macroptilium atropurpureum* en pruebas de efectividad. \*

Tratamientos	Nº nod
Cepa INTA C95	5 a
Cepa INTA C 5	4,6 a
Cepa Totoral T2	3 a
Cepa Dean Funes DF6	2,6 a
Cepa Dean Funes DF7	2,5 a
Cepa Dean Funes DF2	2,2 a
Cepa Dean Funes DF3	2,2 a
Cepa Totoral T1	0,0 b
Cepa Dean Funes DF1	0,0 b
Cepa Dean Funes DF4	0,0 b
Cepa Dean Funes DF5	0,0 b
Cepa Monte Cristo	0,0 b
Testigo sin Nitrógeno	0,0 b
Testigo con Nitrógeno	0,0 b

\* Tratamientos con distinta letra presentan diferencias significativas ( $P < 0,05$ )

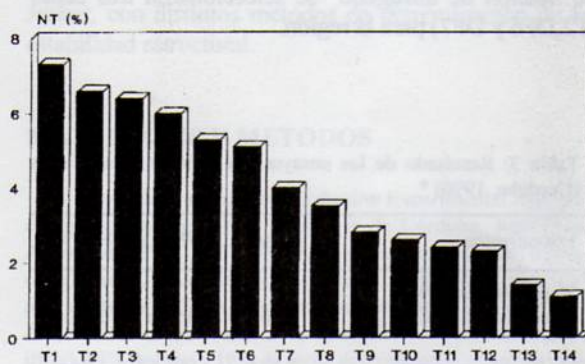


Figura 2: Nitrógeno total (NT) de plántulas de *M. atropurpureum* (promedio de 5 plantas) en ensayos de efectividad. Tratamientos unidos por la misma línea no presentan diferencias significativas ( $P < 0,05$ ). 1- Testigo con nitrógeno, 2- Cepa INTA (C5), 3- Cepa de Villa del Totoral (T2), 4- Cepa INTA (C95), 5- Cepa de Dean Funes (DF6), 6- Cepa de Dean Funes (DF7), 7- Cepa de Dean Funes (DF2), 8- Cepa de Villa del Totoral (T1), 9- Cepa de Dean Funes (DF3), 10- Cepa de Dean Funes (DF1), 11- Cepa de Dean Funes (DF5), 12- Cepa de Dean Funes (DF4), 13- Cepa de Monte Cristo (MtC), 14- Testigo sin nitrógeno.

Tabla 2: Resultado de los ensayos a campo en Villa del Totoral (Córdoba, 1990).\*

Tratamientos	Nº nod	PS (g)	NT (%)
<i>M. atropurpureum</i> inoculado INTA C95	2,6 a	1,59 a	1,4 a
sin inocular	1,8 a	1,2 a	1,3 a
<i>C. virginianun</i> inoculado INTA C135	5,3 a	4,23 a	2,5 a
sin inocular	0,0 b	0,27 b	1,4 b

\* Tratamientos con distinta letra presentan diferencias significativas ( $P < 0,05$ )

Número de nódulos (Nº nod); peso seco (PS g) y contenido de nitrógeno (NT) por planta.

valores comprendidos entre ambas cepas INTA, no mostrando diferencias significativas con ninguna de ellas. Dos de las cepas obtenidas en Dean Funes (DF6 y DF7) si bien difieren con las anteriores en su porcentaje de N., estos son muy cercanos. El resto de las cepas presentan porcentajes menores siendo la MtC la que se encuentra más cercana al testigo sin N (1,09% y 0,82% respectivamente). Es de destacar que los valores absolutos en contenido de nitrógeno son muy altos (alrededor del 7%) a causa de las condiciones controladas de crecimiento. Teniendo en cuenta la capacidad infectiva y la efectividad de fijación de nitrógeno se seleccionaron tres cepas (T2, DF6 y DF7) para la región.

Tabla 3: Resultado de los ensayos a campo en Dean Funes (Córdoba, 1990) \*

Tratamientos	Nº nod	PS (g)	NT (%)
<i>M. atropurpureum</i> inoculado INTA C95	1,20 a	0,98 a	3,53 a
sin inocular	3,10 b	1,90 b	3,25 a
<i>C. virginianun</i> inoculado INTA C135	2,10 a	1,71 a	3,18 a
sin inocular	0,0 b	0,76 b	2,19 b

\* Tratamientos con distinta letra presentan diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

Número de nódulos (Nº nod), peso seco (PS g) y contenido de nitrógeno (NT) por planta.

## Ensayos a campo

Los resultados del comportamiento a campo de las especies de leguminosas introducidas frente a la inoculación se expresan en las Tablas 2 y 3. En Villa del Totoral (Tabla 2), las plantas de *M. atropurpureum* no muestran diferencias significativas en ninguno de los parámetros para los tratamientos inoculadas y no inoculadas. Mientras que *C. virginianun* presentó diferencias en todos los parámetros a favor de las inoculadas, ya que no se obtuvo nodulación espontánea. No se obtuvieron valores altos de materia seca a causa de la competencia ofrecida por el gran porte de la gramínea implantada, (*Panicum maximum*), este efecto ha sido establecido por varios autores (Sangakkara 1988, De Leon *et al.* 1991) por lo que se recomienda la siembra de las gramíneas a posterior de las leguminosas en las asociaciones. Las cepas nativas para *M. atropurpureum*, se comportaron de igual manera que las provistas por INTA, por lo que se infiere que no sería necesario inocular dicha especie con cepas foráneas, habida cuenta de la mejor adaptación al medio que presentan siempre las nativas.

En el Campo Anexo Dean Funes (Tabla 3) la especie *M. atropurpureum*, presentó diferencias significativas entre tratamientos en número de nódulos y peso seco, siendo mayor en las plantas sin inocular, mientras que en contenido de nitrógeno no presentó diferencias significativas. Esto indicaría que las cepas autóctonas son más competitivas que las introducidas, aunque su efectividad en la fijación de nitrógeno es igual tanto en unas como en las otras, en las condiciones en que se realizó el estudio.

Si bien en este último sitio de experimentación no se intersembraron las leguminosas, los valores de peso seco también fueron muy bajos, probablemente a causa del déficit hídrico que soportó el cultivo durante los meses del ensayo ya que las precipitaciones fueron menores a las medias mensuales (60-70mm y 100-120mm respectivamente). Esta condición habría determinado la mayor agresividad de las cepas autóctonas de *M. atropurpureum* por ser más resistentes a situaciones limitantes como es el agua en estos climas semiáridos.

Para el caso de *C. virginianun*, el comportamiento fue igual a Villa del Totoral, ya que presentó diferencias significativas en todos los parámetros a causa de que no noduló espontáneamente. Los valores absolutos para contenido de nitrógeno, fueron considerablemente más bajos que en los ensayos de laboratorio, coincidiendo con los obtenidos en la misma zona y trabajando con las mismas especies por otros autores (De Leon *et al.* 1991). Para introducir, en el centro-norte de Córdoba, *C. virginianun* se recomendaría su inoculación, mientras que para *M. atropurpureum* se aconsejaría la utilización de cepas nativas seleccionadas.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo pudo realizarse gracias al subsidio otorgado por INTA Manfredi según Plan 051-069. Se agradece a A Camusso y F Barbero por su colaboración en la determinación de contenido de nitrógeno total y A O Bachmeier, por el análisis estadístico de los datos. Además a V Caucás y S Sanchez por el apoyo en las tareas de laboratorio.

## REFERENCIAS

- Aragao W, Almeida S, Sobral L, Barreto A, O. de Carvalho Filho. 1983. Avaliação de espécies do género *Cenchrus* com leguminosas na região semiárida de Sergipe. Pesquisa em Andamento. 15: 8
- Apostolatos G. 1984. A rapid inexpensive procedure of determination of nitrogen in plants material. Journal of Food Technology: 639-642
- Bliss F. 1987. Host plant control symbiotic nitrogen fixation in grain legumes. In Genetic aspects of plant mineral nutrition. Ed. Gabelman and Lougham: 479-493
- Cangiano C, Melo C, Mombelli J. 1978. Valor nutritivo de la Grama Rhodes (*Chloris gayana* Kunth) INTA Manfredi. Información Técnica 77: 7-9
- Date R.A. 1976. Inoculación de leguminosas forrajeras tropicales. College of Tropical Agricultural. Miscellaneous publication 145: 296-299
- Date R, Halliday J. 1987. Collection, isolation, cultivation and maintenance of rizobio. In Symbiotic Nitrogen Fixation Technology. Ed. Marcel Dekker: 2-27
- De León M, Abril A, Virasoro J. 1991. Asociación de gramíneas y leguminosas subtropicales en el Centro-Norte de la provincia de Córdoba. Revista Argentina de Producción Animal. 12 ( en prensa )
- Gibson A. 1987. Evaluation of nitrogen fixation by legumes in the green house and growth chamber. In Symbiotic Nitrogen Fixation Technology. Ed. Marcel Dekker: 322-369
- Humphrey's L. 1980. A guide to better pastures for the tropics and sub-tropics. Wrigh Stephenson Co. (Australia) 96 pp.
- Kretschmer A. 1966. Four year's results with Siratro (*Matropurpureum* D.C.) in South Florida. Proc. Soil Crop Sci.Soc. Fda 26: 238-245
- Lepo J, Ferrembach S. 1987. Measurement of nitrogen fixation. In Symbiotic Nitrogen Fixation Technology. Ed. Marcel Dekker. New York 221-255
- Mufarrege D, Benitez A, Sonna G. 1984. Contenido de nitrógeno de pasturas naturales de la región oriental de la provincia de Corrientes. Revista Argentina de Producción Animal 4: 1-41.
- Nornayati D, Diatloff A, Hoult H. 1988. The effectiveness of some Indonesian strains of *Rhizobium* on four tropical legumes. Plant and Soil 108: 171-177
- Pimentel Gomez F. 1978. Curso de Estadística Experimental. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires. pp 323
- Quinteros J, Garza R. 1977. Selección de estirpes de *Rhizobium* spisoladas de leguminosas nativo e introducida nos tropicos. In Simposio Internacional de Fijación Biológica de Nitrógeno en los trópicos. Brasil. p 82
- Rumbaugh M, Johnson D. 1986. Annual medics and related species as reseeding legumes for Northern Utah pastures. J. Range Management. 39: 52-58
- Sangakkara U. 1988. A study on the establishment of tropical grasses and legumes. Zeitschrift fur Acker und Pflanzenbau. 160: 235-238
- Sciffert N. 1982. Métodos de escarificación de semillas de leguminosas forrajeras tropicales. Embrapa. Comunicación Técnica 13: 1-6
- Vallejos G. 1981. Asociación de gramíneas y leguminosas tropicales. Agronea. U.N. Noreste. (Chaco-Argentina) 1:5-19
- Virasoro J, Ferreyra H. 1987. Evaluación de especies forrajeras introducidas en el Campo Anexo Dean Funes. Revista Agropecuaria de Manfredi y Marcos Juárez (RAM) 3: 31-35