

I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES .....	73
II. MATERIAL Y MÉTODOS .....	74
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	77
IV. CONCLUSIONES .....	80
V. AGRADECIMIENTOS .....	80
VI. RESUMEN Y SUMMARY .....	80
VII. BIBLIOGRAFIA .....	81

## LA ASOCIACION RHIZOBIUM-LEGUMINOSA EN ALFALFARES DE LA PROVINCIA DE CORDOBA. SEGUNDA ETAPA: INOCULACION A CAMPO.

ROBERTO P. PONTE; MARTA I. ACOSTA; ADRIANA ABRIL; LUISA DEL V. OLIVA \*

### I. INTRODUCCION Y ANTECEDENTES

Se han observado en los alfalfares de la zona central semiárida de la Pcia. de Córdoba, dificultades en el establecimiento de la simbiosis y por ende en la fijación de nitrógeno, por parte de las cepas de *Rhizobium meliloti* introducidas mediante inoculación.

La eficiencia de la fijación depende tanto del hospedante como de la cepa de *Rhizobium* asociada. Todos los estados de la simbiosis, incluyendo la preinfección, son afectados por condiciones ambientales. Los factores que influyen son múltiples (5-6-12); entre ellos se citan: pH y salinidad del suelo (3-11-13-17), temperatura (9), humedad (4-15), oligoelementos (1), nitrógeno en el suelo (7-8), carencia de fósforo (19), organismos antagonicos a la bacteria, además de aquellos que inciden en el metabolismo de la leguminosa (2).

Numerosas evidencias muestran la variación de las cepas bacterianas bajo situaciones ambientales diferentes, lo que podría explicar el mal comportamiento de cepas de *Rhizobium* importadas, conocidas como muy efectivas en sus lugares de origen.

\* Prof. Adjunto, y Jefes de Trabajos Prácticos respectivamente, de Microbiología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agropecuarias - U.N.C.

\* Trabajo subsidiado durante la Campaña 1978/79 por I.N.T.A. - E.E.A. Manfredi. Programa alfalfa Plan Nº 2.221.

Presentado: 20 de Agosto de 1987 - Aceptado: 29 de Febrero de 1988.

Se ha mostrado además, que la respuesta a la inoculación suele ser muy marcada al establecerse por primera vez una leguminosa en una determinada zona y tiende a atenuarse en el curso de cultivos sucesivos debido a la competencia en el suelo de cepas autóctonas de débil poder fijador que por mayor adaptación, desplazan a las introducidas. (18).

Buscando una primera aproximación a la solución de los problemas en el establecimiento de simbiosis encontrados en el área, se estudiaron en primer lugar las cualidades de las cepas autóctonas de la zona. De entre ellas se seleccionó a través de pruebas en laboratorio, un material con alta efectividad en la fijación de nitrógeno con el que se trabajó (10).

Constituyen los objetivos del presente trabajo:

- Conocer la aptitud de estas cepas para fijar nitrógeno en las condiciones medias clima-suelo-planta imperantes en la zona, comparadas con otras de distintos orígenes.
- Estudiar su respuesta a la aplicación de técnicas de inoculación normal y múltiple tendientes a salvar problemas de competencia con cepas autóctonas menos eficientes, que existen en número elevado.

## II. MATERIAL Y METODO

El ensayo se realizó durante dos campañas sucesivas: 1978/79 y 1980/81. La primera en la E. E. A. Manfredi de I.N.T.A., cuyo personal estuvo a cargo del desarrollo de las tareas de campo. La restante se estableció en el Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba.

Se contó durante 1978/79 con la colaboración de la Unidad Simbiosis de I.N.T.A. Castelar.

Se consignan en los Cuadros N° 1 y N° 2 las condiciones climáticas y características edáficas respectivamente, correspondientes a las dos campañas, desde la siembra hasta el último corte. Ambas zonas corresponde según la clasificación climática de Thorntwaite al clima subhúmedo seco, mesotermal sin exceso de agua.

Como hospedante se empleo *Medicago sativa* L. cv. Polihíbrido Manfredi.

Los tratamientos empleados fueron:

CUADRO Nº 1

CONDICIONES CLIMATICAS

Mes	Campaña 1978/79		Campaña 1980/81	
	Temp. media mensual °C	Precip. mm.	Temp. media mensual °C	Precip. mm.
Abril	15,7	24,5		
Mayo	12,0	0,0		
Junio	9,0	21,1		
Julio	11,0	4,8		
Agosto	8,7	0,0	14,0	0,0
Setiembre	14,0	114,7	16,6	16,8
Octubre	16,1	67,7	19,3	48,7
Noviembre	19,5	111,1	21,2	112,4
Diciembre	21,5	116,7	24,0	138,2
Enero			23,1	262,5
Febrero			23,3	185,1
Marzo			22,1	147,0

CUADRO Nº 2

CARACTERISTICAS EDAFICAS

	Campaña 1978/79	Campaña 1980/81
	E.E.A. Manfredi	Campo Exp. U.N.C.
Suelo	Haplustol éntico	Haplustol típico
Textura	Franco limoso	Franco limoso
Profundidad (cm.)	0 - 23	0 - 25
Horizonte	A <sub>1</sub>	A <sub>1</sub>
M.O. (%)	1,90	2,52
Arcilla (%)	16	25
Limo (%)	69	59,5
Arena fina (%)	15	15,5
pH	6,2	6,1
Ca (m.e./100 gr.)	9,2	16,0
Mg (m.e./100 gr.)	1,1	2,9
K (m.e./100 gr.)	2,5	2,1
Na (m.e./100 gr.)	0,1	1,1
Valor T (m.e./100 gr.)	15,0	22,9
% Saturación	86,0	96,7
Salinidad	No salino	No salino

Tratamiento 1: Semilla sin inocular.

Inoculación simple y peleteado	Inoculación múltiple o superpel.	
Tratamiento 2	Tratamiento 6	Mezcla de cepas INTA B36 - B251 - B310 y B323 sobre medio agarizado.
Tratamiento 3	Tratamiento 7	Mezcla de las cepas selectas autóctonas U.N.C.: 7, 8 y 15 sobre medio agarizado.
Tratamiento 4	Tratamiento 8	Mezcla de cepas I.N.T.A. Castelar: 1 - 211 - 7 y 91 sobre medio agarizado.
Tratamiento 5	Tratamiento 9	Mezcla de cepas I.N.T.A.: B36 - B251 - B310 - B323 en medio líquido concentrado.

Las cepas I.N.T.A. fueron gentilmente proporcionadas por la Unidad Simbiosis de I.N.T.A. Castelar. Las autóctonas U.N.C. se aislaron y seleccionaron en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba. (10).

Los inoculantes en medio sólido se prepararon en frascos rectangulares para cultivo (60x40x140 mm.) con medio de Ashby agarizado, estandarizados para proveer 50.000 bacterias por semilla aproximadamente utilizando un frasco para 7,5 Kg. de semilla.

Los inoculantes líquidos concentrados aportaron 50.000 bacterias por semilla utilizando 15 c.c. de inoculante por Kg. de semilla.

Para la técnica de inoculación simple y peleteado se mezclaron adecuadamente 3 ml. de inóculo y 12 ml. de colex neutralizado como adherente, para humedecer 200 gr. de semilla que fueron luego peleteadas con 60 gr. de Carbonato de Calcio.

Para la técnica de inoculación múltiple se mezclaron 3 ml. de inóculo y 12 ml. de Dehidazol K62 como adherente para cada 200 gr. de semilla, operación que se repitió 7 veces para cada tratamiento siendo colex el adhesivo de la octava y última aplicación de inoculante, luego de la cual se peleteó con 60 gr. de Carbonato de calcio.

El ensayo se realizó en bloques al azar con 5 repeticiones, con parcelas de 12 m<sup>2</sup> de superficie (surcos de 5 metros espaciados 0,20 m.) y caminos de 1 metro de ancho entre ellas.

La siembra se realizó en época normal para la especie y la zona, con sembradora manual tipo Planet con una densidad de 15 Kg./Ha.

Para evaluar los resultados se realizaron 3 cortes con segadora mecánica, de los 4 m<sup>2</sup> centrales de cada parcela cuando el 10 % del cultivo se encontraba en floración.

Se determinó materia seca en Kg./Ha a 65°C y porcentaje de proteínas por la técnica de semi-micro Kjeldahl. En el análisis estadístico cada una de las variables fue analizada empleando la transformación  $\text{arc. sen}\sqrt{x}$  para porcentaje de proteínas. En el análisis multivariado se consideraron las dos variables en estudio. (14 - 16).

Dichas determinaciones y análisis se llevaron a cabo en la Unidad Simbiosis de I.N.T.A. Castelar, durante la primera campaña y en el Laboratorio de Microbiología Agrícola de la Fac. de Cs. Agropecuarias de la U.N.C. durante la segunda.

Por tratarse de una especie perenne las consideraciones de los resultados son válidos sólo para el primer ciclo del cultivo.

### CUADRO N° 3

#### FECHAS DE SIEMBRA Y CORTES

	Campaña 1978/79	Campaña 1980/81
Siembra	6 - 4 - 78	29 - 5 - 80
Primer corte	30 - 10 - 78	3 - 12 - 80
Segundo corte	30 - 11 - 78	28 - 1 - 81
Tercer corte	27 - 12 - 78	6 - 3 - 81

### III. RESULTADOS Y DISCUSION

En el Cuadro N° 4 se consignan los resultados del primer ensayo (Campaña 1978/79).

El 10 % de floración, que determinó el primer corte, ocurrió a los 207 días de la siembra (a fines de Octubre). Durante ese período se produjeron abundantes lluvias tempranas (180 mm.) siendo la temperatura, normal para la época (aproximadamente 12,3°C). Esto determinó un muy buen crecimiento vegetativo del cultivo que se reflejó en los valores de materia seca; los mismos no presentaron diferencias significativas entre tratamientos. El porcentaje de proteínas no pudo ser determinado por deterioro de la muestra.

El segundo corte se realizó a los 30 días del anterior, período en el que las lluvias aportaron aproximadamente 110 mm. de agua y la temperatura se mantuvo normalmente elevada (media: 19,5°C). La cantidad de materia seca no presentó diferencias significativas entre tratamientos pero sí las hubo en el porcentaje de proteínas, donde todos los tratamientos inoculados arrojaron valores significativamente mayores al testigo.

A los 28 días del segundo, se efectuó el tercer corte luego de un período con similares condiciones climáticas que el anterior. En esta muestra se refleja muy claramente la acción fijadora del nitrógeno de las cepas de *Rhizobium meliloti* introducidas sobre las autóctonas presentes en el suelo; ya que tanto materia seca como porcentaje de proteínas mostraron diferencias significativas en favor de ellas.

Aunque las diferencias fueron significativas sólo en el 3er. corte, las cifras de materia seca del testigo fueron siempre algo menores que los tratamientos inoculados, de los que se infiere que la aptitud de fijación de las cepas nativas presentes en el suelo es siempre menor que cualquiera de las introducidas. Esto se confirma con las diferencias significativas en porcentaje de proteínas.

#### CUADRO N° 4

##### RESULTADOS DEL ENSAYO 1978/79

†	1er. Corte		2do. Corte		3er. Corte	
	Mat. seca	Mat. seca	Prot.	Mat. seca	Prot.	Mat. seca
Tratamiento	Kg./Ha.	Kg./Ha.	%	Kg./Ha.	%	Kg./Ha.
1	2.271	1.644	24,81 <sup>a</sup>	960 <sup>a</sup>	24,81 <sup>a</sup>	960 <sup>a</sup>
2	2.753	1.755	30,00 <sup>b</sup>	1.368 <sup>b</sup>	28,81 <sup>b</sup>	1.368 <sup>b</sup>
3	2.903	1.991	29,00 <sup>b</sup>	1.388 <sup>b</sup>	29,69 <sup>b</sup>	1.388 <sup>b</sup>
4	2.906	2.022	29,31 <sup>b</sup>	1.356 <sup>b</sup>	27,75 <sup>b</sup>	1.356 <sup>b</sup>
5	2.769	1.861	29,31 <sup>b</sup>	1.266 <sup>b</sup>	30,00 <sup>b</sup>	1.266 <sup>b</sup>
6	2.903	2.010	30,25 <sup>b</sup>	1.434 <sup>b</sup>	29,75 <sup>b</sup>	1.434 <sup>b</sup>
7	2.887	1.992	29,35 <sup>b</sup>	1.284 <sup>b</sup>	29,31 <sup>b</sup>	1.284 <sup>b</sup>
8	2.743	1.945	29,56 <sup>b</sup>	1.198 <sup>b</sup>	30,31 <sup>b</sup>	1.198 <sup>b</sup>
9	3.654	2.012	31,17 <sup>b</sup>	1.278 <sup>b</sup>	29,06 <sup>b</sup>	1.278 <sup>b</sup>
Prueba "F"	n. s.	n. s.	+	+	+	+

†: diferencia significativa al 5 %.

n.s.: no significativo.

Los tratamientos señalados con la misma letra no presentan diferencias significativas

Los resultados de la 2da. campaña (1980/81) se consignan en el Cuadro N° 5. El 10 % de floración para el primer corte ocurrió a 217 días de la siembra precedido de precipitaciones notables que se verificaron a mediados de octubre y noviembre y fueron acompañadas de temperaturas elevadas (media 20°C). Se observaron valores semejantes de mate-

ria seca y porcentaje de proteínas para todos los tratamientos, lo que indicaría una respuesta del cultivo a esos estímulos climáticos independientemente de la influencia de las cepas de *Rhizobium meliloti*.

El segundo corte se pudo realizar a los 56 días del primero durante los que llovió aproximadamente 250 mm. distribuidos uniformemente y las temperaturas fueron elevadas y normales para la época estival (media 23,5°C). Se encontraron diferencias entre los valores de la cantidad de materia seca de todos los tratamientos respecto al testigo lo que indicaría un mejor comportamiento de las plantas inoculadas artificialmente.

El tercer corte se realizó a los 36 días del segundo, período en el cual las temperaturas y lluvias resultaron semejantes al anterior. Los valores de materia seca resultaron menores que los del primero y segundo corte posiblemente debido a que el período vegetativo fue más corto. Además las diferencias obtenidas en los análisis de materia seca del testigo y los tratamientos inoculados resultaron significativas.

De acuerdo a estos resultados y bajo las condiciones estudiadas, la aptitud fijadora del nitrógeno de las cepas nativas presentes en los suelos de la zona del Campo Experimental es semejante a la de las cepas introducidas, medido en porcentaje de proteínas. Sin embargo los datos obtenidos en los análisis sobre materia seca mostraron siempre superioridad de todos los tratamientos sobre el testigo.

C U A D R O N° 5  
RESULTADOS DEL ENSAYO 1980/81

Trat.	1er. Corte		2do. Corte		3er. Corte	
	Mat. Seca Kg/Ha	Prot. %	Mat. Seca Kg/Ha	Prot. %	Mat. Seca Kg/Ha	Prot. %
1	1.038	10,35	960 <sup>a</sup>	17,83	785 <sup>a</sup>	21,28
2	1.034	18,40	1.075 <sup>b</sup>	16,70	926 <sup>b</sup>	21,35
3	1.071	19,18	1.087 <sup>b</sup>	18,20	985 <sup>b</sup>	21,37
4	1.070	18,49	1.100 <sup>b</sup>	17,79	931 <sup>b</sup>	21,26
5	1.046	18,14	1.112 <sup>b</sup>	16,94	905 <sup>b</sup>	20,37
6	1.089	19,42	1.104 <sup>b</sup>	17,40	924 <sup>b</sup>	23,11
7	1.049	18,71	1.102 <sup>b</sup>	17,18	976 <sup>b</sup>	19,68
8	1.072	18,77	1.047 <sup>b</sup>	17,70	935 <sup>b</sup>	21,29
9	1.098	18,83	1.067 <sup>b</sup>	16,96	971 <sup>b</sup>	19,16
Prueba						
"F"	n.s.	n.s.	+	n.s.	+	n.s.

n.s.: no significativo.

+: diferencia significativa al 5 %.

Los tratamientos señalados con la misma letra no presentan diferencias significativas

Comparando las campañas 1978/79 realizadas en la E.E.A. INTA Manfredi y la 1980/81 en el Campo Experimental de la U.N.C. surgen notables diferencias en cantidad de materia seca producida por Ha., que en algunos casos supera el 100 %. Si se considera que el tiempo transcurrido hasta el primer corte es similar en ambas, es posible atribuir la superioridad del primer ensayo a las condiciones climáticas y edáficas que se le brindaron. Respecto a las primeras se destaca el temprano y abundante aporte de lluvias en época en que las temperaturas comenzaban a ser elevadas; en cuanto a las segundas se debe tener en cuenta la mayor profundidad y textura más suelta de los suelos de Manfredi, que los hace más aptos para el desarrollo de la alfalfa.

#### IV. CONCLUSIONES

- No obstante la existencia de una numerosa población nativa de *Rhizobium meliloti* presente en el suelo, en general, la inoculación incrementó el rendimiento de materia seca y el porcentaje de proteínas de la alfalfa en los cortes considerados.
- Bajo las condiciones ecológicas de las zonas estudiadas, tanto las cepas nativas seleccionadas como las recomendadas por INTA se comportaron de forma similar con respecto a su aptitud para fijar nitrógeno, no destacándose ninguna en especial
- No se observaron diferencias entre las técnicas de inoculación de pellets simple y super pellets para estas zonas. Se recomienda el uso de técnica de inoculación simple con peleteado.

#### V. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al personal de la Unidad Simbiosis de INTA Castelar afectado al Plan de Trabajo N° 2221 del Programa Alfalfa y de la Sección Forrajeras de INTA Manfredi por su participación en la realización de los trabajos especialmente durante la primera campaña; al Ing. Agr. Omar Bachmeier, por el análisis de suelo del Campo Exp. de la U.N.C. y a la Est. Nidia B. de Bongiovani por el análisis estadístico de los datos de la última campaña.

#### VI. RESUMEN

Como segunda etapa de un trabajo de selección de cepas de *Rhizobium meliloti* se realizaron ensayos de campo con el objeto de conocer su aptitud para fijar

nitrógeno en las condiciones de la región central de Córdoba, Argentina, comparadas con otras cepas de distintos orígenes y su respuesta a la aplicación de técnicas de inoculación simple y múltiple para salvar problemas de competencia.

Se utilizaron semillas de alfalfa (*Medicago sativa* L.) c. v. Polihíbrido Manfredi sembradas en diseño de bloques al azar con 5 repeticiones durante 2 campañas sucesivas.

En cada una se analizaron 3 cortes realizados cuando el 10 % del cultivo presentaba floración. Se determinó materia seca en Kg./Ha y contenido de nitrógeno en porcentaje de proteínas.

Se concluyó que la inoculación, aún cuando existía una abundante población nativa presente en el suelo, incrementó el rendimiento y el porcentaje de proteínas en el cultivo; que bajo las condiciones ecológicas estudiadas, tanto las cepas nativas seleccionadas como las recomendadas por INTA se comportaron en forma similar respecto a su aptitud fijadora de nitrógeno y que no hubo diferencias en cuanto a la respuesta a las técnicas de inoculación simple y múltiple, recomendándose por lo tanto la primera.

#### SUMMARY

As a second step in a *Rhizobium meliloti* strain selection, field trials in the central region of Córdoba, Argentina, were carried on.

The main objective was to assess its N-fixation ability under local average climate-soil-plant conditions, compared with other strains from different sources and its response to massive or multiple inoculation methods, in order to solve competition problems.

*Medicago sativa* L. c. v. Polihíbrido Manfredi seeds were planted in a 5 repetitions completely randomized block design during 2 seasons.

Dry matter and N-content (as protein percentage) was determined at 3 cuttings when the crop presented 10% flowering.

The results showed a yield and protein increase with inoculation, even with high indigenous population; under this ecological conditions, either selects indigenous as recommend INTA strains had a similar behavior related with its N-fixation ability, and it was not detected differences in response to inoculation methods (simple or multiple).

#### VIII. BIBLIOGRAFIA

1. Adil' Bekova, K.H.K. y Yakushenko, A.D. 1977. "Effect of some trace elements on nitrogen fixation and alfalfa yield". Izu AKAD. Nauk. S.S.R. Sec. Biol. 15: 52-57.
2. Alexander M. 1980. Microbiología del Suelo. Libros y Editoriales S. A. Méjico.
3. Barber L. 1978. "Survival and plant nodulation at low pH by resistant *Rhizobium meliloti* strains". Abst. Annu. Meet. An Sec. Microbiol. 167:78.
4. Brockwell, J, y Whalley, R. D. B.1970. "Studies on seed pelleting as an aid to legume seed inoculation. 2. Survival of *Rhizobium meliloti* applied to medic. seed sown into dry soil". Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb. 10: 455-459.
5. Cardoso, Elke. 1979. "Efeitos de fatores biológicos e nao biológicos sobre a nodulacao e fixacao do N<sub>2</sub>". Curso Rápido sobre tecnologia de Rhizobium. MIR-CEN. Porto Alegre. Brasil.

6. Gibson, A. H. 1971. Factors in the physical and biological environment affecting nodulation and nitrogen fixation by legumes. *Plant and Soil; Special Volume*: 139.
7. Heichel, G. H. and Vance, C. 1979. "Nitrate -N- and Rhizobium strain roles in alfalfa seedling nodulation and growth. *Crop Science* 19: 512-518.
8. Kamberger, W. 1977. "Regulation of symbiotic nitrogen fixation in root nodules of alfalfa (*Medicago sativa*) infected with *Rhizobium meliloti*. *Arch. Microbiol.* 115: 103-108.
9. Munns, D. M.; V. W. Fogle and Hallock B. C. 1977. "Alfalfa root nodule distribution and inhibition of nitrogen fixation by heat". *Agron. J.* 69:377.
10. Ponte R. P. y M. Couto de Faedo. 1980. "La asociación Rhizobium-Leguminosa en alfalfares de la Pcia. de Cba. Ira. Etapa: Selección de cepas autóctonas de *Rh. meliloti*; determinación de efectividad, infectividad y especificidad cultivar / cepa. *Rev. Cs. Agropec.* 1:69-79.
11. Rice, W. A., Penney D. C. y Nyborg M. 1977. "Effects of soil acidity on rhizobia numbers, nodulation y nitrogen fixation by alfalfa y red clover". *Can. J. Soil Sci.* 57:197-204.
12. Ruschell, A. 1979. *Ecología do Rhizobium. Curso rápido sobre tecnología de Rhizobium.* MIRCEN. Porto Alegre, Brasil.
13. Sagardoy, M. A. 1981. Number and distribution of *Rhizobium meliloti* and other microbial populations in soils. *Anales de Edafología y Agrobiología XL* (5 - 6): 889-894. Univ. Nacional del Sur, Bahía Blanca. Argentina.
14. Sakal, R. R. y F. Rohlf. 1979. *Biometría.* Ed. Blume - Madrid.
15. Sprent, J.J. 1971. "Effects of water stress on nitrogen fixation in root, nodules. *Plant and soil, Volume Special*: 225.
16. Steel, R. G. D. and J. H. Torrie. 1960. *Principles and Procedures of Statistics.* Mc Grow Hill, New York.
17. Subba Rao, N.; Lakshmi-Kumari, M. y M. Singhech. 1974. "Salinity and alkalinity in relation to legume-Rhizobium symbiosis". *Proceedings of the Indian National Science Academy* 40 (5): 544(547. División of Microbiology, Indian Agricultural Research, Institute.
18. Vidor Caio. 1979. *Estudios ecológicos do Rhizobium no solo. Curso rápido sobre tecnología de Rhizobium.* MIRCEN. Porto Alegre, Brasil.
19. Wagner, G. H.; Kassim, G. M. and Martyniuk, S. 1978. "Nodulation of annual medicago by strains of *Rh. meliloti* in a commercial inoculant as influenced by soil phosphorus and pH". *Plant and Soil* 50:81-89.