

LEGUMINOSAS NODULANTES DE LA CUENCA DEL RÍO LOS PUESTOS, PROVINCIA DE CATAMARCA

Di Barbaro, G.; Quiroga, A.; Pernasetti, S.; Santa Cruz, R. y Stegmayer, A.

Cátedra de Microbiología Agrícola, Cátedra de Ecología Agraria y Cátedra de Pastizales Naturales. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Catamarca. Av. Belgrano y Maestro Quiroga. C.P. 4700. Catamarca. Argentina. Tel. 03833-430504.

E-mail: micro@agrarias.unca.edu.ar; ecologia@fcasuser.unca.edu.ar; pastizal@agrarias.unca.edu.ar

Financiado por la SEDECyT. UNCa.

SUMMARY

The nitrogen deficiency in the soil is usually one of the factors of fertility more related with the initiation of the degradation processes in cultivated pastures. The presence of leguminous plants symbiotically associated with bacteria of the *Rhizobiaceae* family contributes to correct this deficiency due to the nitrogen contribution via biological fixation. An exploratory study was carried out in the basin of the River Los Puestos where eight nodule-producing forage leguminous plants were gathered (*Trifolium amabile* H.B.K., *Medicago lupulina* L., *Macroptilium panduratum* (Benth) Barbosa, *Cologania obalifolia* H.B.K., *Centrosema virginianum* (L.) Bouth, *Desmodium uncinatum* (Jack.) DC., *Vicia setifolia* H.B.K. y *Lathyrus tropicalandinus* Burk.). 12 strain were isolated from the nodules, corresponding to native rizobios of quick growth and the isolations were characterized in five different colonial types according to some of the phenotypic characteristics observed. As the native stumps are more promissory as inoculate for a given region due to the local ecological adaptation, the objective of the present work is the isolation and phenotypic characterization of rizobios that produce nodules spontaneously in forage leguminous plants in the basin of the River Los Puestos in the Province of Catamarca.

RESUMEN

La deficiencia de nitrógeno en el suelo suele ser uno de los factores de fertilidad más relacionado con la iniciación de los procesos de degradación de pasturas cultivadas, por lo que la presencia de leguminosas asociadas simbióticamente con bacterias de la familia *Rhizobiaceae*, contribuyen a corregir esta deficiencia, debido al aporte de nitrógeno vía fijación biológica. Se realizó un estudio exploratorio en la cuenca del Río Los Puestos, donde se recolectaron 8 leguminosas forrajeras nodulantes (*Trifolium amabile* H.B.K., *Medicago lupulina* L., *Macroptilium panduratum* (Benth) Barbosa, *Cologania obalifolia* H.B.K., *Centrosema virginianum* (L.) Bouth, *Desmodium uncinatum* (Jack.) DC., *Vicia setifolia* H.B.K. y *Lathyrus tropicalandinus* Burk.), de las que a partir de sus nódulos se aislaron 12 cepas, las que se corresponden con rizobios nativos de crecimiento rápido y los aislamientos fueron caracterizados en 5 tipos coloniales diferentes según algunas de las características fenotípicas observadas. Como las cepas nativas frente a las comerciales son más eficientes y efectivas para una determinada región, se las consideran como más promisorias en su selección, debido a la adaptación ecológica local; el objetivo del presente trabajo es el aislamiento y caracterización fenotípica de rizobios que nodulan espontáneamente leguminosas forrajeras en la cuenca del Río Los Puestos en la Provincia de Catamarca.

INTRODUCCIÓN

La asociación simbiótica entre una leguminosa y bacterias de la familia *Rhizobiaceae*, mejora el desarrollo de las plantas y la fertilidad de los suelos, debido al aporte de nitrógeno por vía fijación biológica, entre otros factores.

La presencia de leguminosas nodulantes aumenta el contenido proteico de los pastizales, mejorando la dieta del ganado. La obtención de fuentes proteicas es sumamente costosa en los actuales momentos. En tal sentido, se trabaja desde hace tiempo en la búsqueda de alternativas que resulten económicas y viables, ya que prescindir de este componente nutritivo en sus niveles adecuados desfavorece en sumo grado la producción ganadera. Por lo que las leguminosas constituyen una buena alternativa, económica y ecológicamente posible, para lograr sistemas productivos sustentables.

La importancia de la observación de nodulación y sus posibilidades de fijación de nitrógeno atmosférico, radica en que las especies leguminosas que no nodulan son exigentes y

competidoras por el nitrógeno del suelo, teniendo efectos negativos para el crecimiento de otras especies.

Las leguminosas nodulantes contribuyen a mantener o aumentar el contenido de nitrógeno del suelo. Parte del nitrógeno de la fijación que se realiza en estos nódulos, es aportado al suelo una vez envejecidas o muertas las raíces, siendo fácilmente aprovechado por otras plantas; favoreciendo la instalación de otras forrajeras, dando origen a una pastura asociada de mayor biodiversidad y calidad nutritiva, útil en la conservación y recuperación de cuencas degradadas.

No se conocen para el área analizada, estudios exhaustivos sobre nodulación. Existe información de otros lugares de la República Argentina donde se observó nodulación con cepas de rizobios nativas o naturalizadas en algunas de las especies que se estudian (Molina et al 1984); estas cepas se comportan como promiscuas y con buena infectividad (Stegmayer et al, 1998). La caracterización de cepas autóctonas de rizobios es necesaria para determinar las más eficientes para los estudios de inoculación, ya que las interacciones planta- microorganismos pueden ser altamente específicas (Vielma, 1999).

El presente trabajo tiene como objetivos: - identificar especies de leguminosas nativas y/o naturalizadas nodulantes de diferentes ambientes de la cuenca del Río Los Puestos; - aislar y caracterizar fenotípicamente los rizobios que nodulan espontáneamente leguminosas forrajeras; - conformar un banco de cepas de rizobios con posibilidad de fijar nitrógeno en simbiosis con leguminosas útiles a los sistemas agroecológicos, como contribución al mejoramiento de los mismos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó la exploración y recolección de las plantas leguminosas en distintos ambientes de la Cuenca del Río Los Puestos en el Departamento Ambato, Provincia de Catamarca durante la finalización de la temporada estival del año 1999.

Esta región se caracteriza por presentar suelos que pertenecen al tipo *Molisoles* y *Entisoles* (Ogas, 1994) y la vegetación espontánea presente corresponde a la Provincia Fitogeográfica Chaqueña, Distrito Chaco Serrano (Morlans, 1995), con pastizales naturales que son aprovechados por la ganadería vacuna. Altitudinalmente, el área se ubica entre los 1.000 hasta los 2.278 m.s.n.m. (Leiva Mendez, 1993), presentando un clima "árido de sierras y bolsones" (Aparicio y Difiriere, 1958).

Se extrajeron una planta de cada especie con su pilón de suelo, para evitar la marchitez y el desprendimiento de los nódulos, las que fueron acondicionadas en bolsas de polietileno y rotuladas. Se trasladó el material al laboratorio para la determinación taxonómica de las leguminosas y el estudio de la nodulación. La determinación taxonómica de las leguminosas se realizó sobre la base de los trabajos de Saravia Toledo y Schinini (1995), Saravia Toledo (1997) y Burkart (1943).

Se seleccionaron entre 5 y 10 nódulos por ejemplar según su ubicación, tamaño y color, los cuales fueron lavados con agua corriente, desinfectados con $HgCl_2$ al 0,1% durante un minuto y finalmente lavados 6 veces con agua destilada estéril. El aislamiento de rizobios se realizó por aplastado de nódulos, sembrando en el medio de cultivo YEMA (Vincent, 1970). Se incubaron los cultivos a 28°C, y se purificaron por repiques sucesivos conservándolos en tubos de hemólisis en pico de flauta.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Realizada la clasificación taxonómica de los ejemplares recolectados se determinó que los mismos correspondían a ocho géneros diferentes de leguminosas forrajeras (Cuadro N°1).

CUADRO N° 1: Leguminosas forrajeras identificadas en la cuenca del río Los Puestos. Dpto. Ambato. Catamarca.

FAMILIA	SUBFAMILIA	TRIBU	ESPECIES	AMBIENTE
Fabaceae	Papilionoideae	Trifolieas	<i>Trifolium amabile</i> H.B.K.	Pastizal de cumbre
			<i>Medicago lupulina</i> L.	Pastizal de cumbre
		Faseoleas	<i>Macroptilium panduratum</i> (Benth) Barbosa	Fondo de valle
			<i>Cologania obalifolia</i> H.B.K.	Pastizal de cumbre
			<i>Centrosema virginianum</i> (L.) Bouth	Arbustal de piedemonte
		Hedysareas	<i>Desmodium uncinatum</i> (Jack.) DC.	Pastizal de cumbre
		Vicieas	<i>Vicia septifolia</i> H.B.K.	Pastizal de cumbre
			<i>Lathyrus tropicalandinus</i> Burk.	Pastizal de cumbre

Estas leguminosas poseen características especificadas ya por otros autores.

La especie *Macroptilium panduratum* (Benth) Barbosa es considerada una importante especie forrajera (Saravia Toledo, 1995); fue colectada sobre un arenal vecino al arroyo Las Tres Quebradas a 1150 m.s.n.m. en ambiente de fondo de Valle, sumamente alterado. El género *Macroptilium* se caracteriza por su fácil establecimiento, nodulando con rizobios nativos. Existen antecedentes de que esta leguminosa puede fijar el nitrógeno en forma muy efectiva (100 a 175 Kg/ha/año) y producir altos niveles de rendimientos de forraje (3 a 8 tn/ha/año de materia seca), rico en proteínas a lo largo de su período de crecimiento (www.rockfound.org.mx/macropbiesp.html).

Situada dentro de la clausura a 1300 m.s.n.m. en el piedemonte de la sierra de Humaya, se colectó *Centrocema virginianum* (L.) Benth., la cual es una especie de importancia textil y forrajera (Burkart, 1943; 418).

En un área clausurada al pastoreo de ganado, ubicada a 2010 m.s.n.m. en la cumbre de la sierra de Humaya se colectaron los siguientes especies:

- *Desmodium uncinatum* (Jacq.) DC., considerada en este ambiente una de sus forrajeras naturales (Burkart, 1943; 335).
- *Trifolium amabile* HBK., especie indígena y de importancia forrajera (Burkart, 1943; 258).
- *Lathyrus tropicalandinus* Burk., se estima que las especies indígenas de este género sirven como forraje (Burkart, 1943; 400).
- *Cologania obalifolia* H.B.K., citada como forrajera por Saravia Toledo (1995).
- *Medicago lupulina* L. o trébol carretilla, forrajera exótica naturalizada y anual, que en ambientes de pastizales húmedos y en umbría se destaca por el gran aporte en la producción y por su calidad nutritiva; contribuyendo a elevar el contenido proteico del forraje en estos ambientes (Dalmaso y Horno, 1994)
- *Vicia setifolia*, forrajera citada para el ambiente de pastizal de cumbre. (Saravia Toledo, 1997).

Saravia Toledo (1995, 1997), cita las especies estudiadas para la cuenca del Río Los Puestos.

Todas las especies de leguminosas recolectadas presentaron nodulación y en la misma serie de nódulos aparecieron muchas colonias típicas con ciertas diferencias morfológicas; esta compatibilidad está directamente relacionada con la adaptación ecológica de las especies involucradas, con lo cual dicha biodiversidad deberá ser estudiada posteriormente con el propósito de conocer las características propias de cada una, con el objetivo de determinar su posible transferencia a la actividad productiva.

Hartmann (1989), en estudios de poblaciones naturales de rizobios, determinó que estas presentan gran diversidad, lo cual es importante porque, cualquiera sea el método de

caracterización poblacional utilizado, pone en evidencia la biodiversidad de fenotipos simbióticos. La caracterización colonial permite establecer diferencias entre los aislamientos obtenidos, índice primario de variabilidad de las cepas nodulantes de rizobios nativos que nodulan naturalmente las leguminosas muestreadas, lo cual también fue demostrado en soja (Amigo et al 1996). Tal diversidad permite seleccionar cepas más eficientes para ser usadas como inoculantes en el campo.

Las características culturales de los aislamientos pueden observarse en el Cuadro N° 2.

CUADRO N°2: Características culturales de aislamientos de rizobios de leguminosas herbáceas nativas y naturalizadas.

<i>ESPECIES VEGETALES</i>	<i>AISLAMIENTOS</i>	<i>CARACTERÍSTICAS CULTURALES</i>	
		<i>COLONIAS</i>	<i>TIEMPO DE DESARROLLO</i>
<i>Trifolium amabile</i> H.B.K.	- TaC 01	Fluida, translúcida, rosada	48 hs.
<i>Centrosema virginianum</i> (L.) Bouth	- CvC 01	Fluida, translúcida, rosada	24 hs.
	- CvC 02	Creмоса, rosada	24 hs.
<i>Cologania obalifolia</i> H.B.K.	- CoC 01	Creмоса, densa, blanca	24 hs.
	- CoC 02	Fluida, translúcida, rosada	24 hs.
<i>Lathyrus tropicalandinus</i> Burk.	- LaC 01	Fluida, translúcida, rosada	48 hs.
<i>Medicago lupulina</i> L.	- MIC 01	Creмоса, blanca	48 hs.
<i>Desmodium uncinatum</i> (Jack.) DC.	- DuC 01	Fluida, translúcida, rosada fuerte	48 hs.
	- MpC 01	Creмоса, rosada	48 hs.
<i>Macroptilium panduratum</i> (Benth) Barbosa	- MpC 02	Fluida, translúcida, rosada	48 hs.
	- VsC 01	Creмоса, densa, blanca	48 hs.
<i>Vicia septifolia</i> H.B.K.	- VsC 02	Creмоса, rosada	48 hs.

Todos los aislamientos tuvieron un tiempo de desarrollo en placa de Petri entre 24 y 48hs. ubicándolos como cepas de crecimiento rápido, característica asociada con alta competitividad en la infección, aspecto deseable para una selección de cepas (Stegmayer, et al, 1998).

Se clasificaron los aislamientos en 5 tipos diferentes según las características culturales de las colonias desarrolladas en:

1. Fluida, translúcida, rosada
2. Fluida, translúcida, rosada fuerte
3. Creмоса, rosada
4. Creмоса, blanca

5. Cremosa, densa, blanca

La existencia de diferencias en las características culturales entre los aislamientos demuestra la variabilidad y diferenciación de las cepas intervinientes en la nodulación del mismo ejemplar leguminoso.

CONCLUSIONES

- Se confirma la nodulación de 8 leguminosas forrajeras, que nodulan espontáneamente con rizobios nativos, adaptados a las características edafo-climáticas de la cuenca del Río Los Puestos.
- Una misma especie leguminosa es capaz de nodular con diferentes cepas de rizobios nativos, evidenciando compatibilidad entre las mismas.
- Todos los aislamientos corresponden a rizobios del grupo de crecimiento rápido.
- Se demostró la presencia de diferentes grupos coloniales, estimándose la biodiversidad de fenotipos simbióticos.

BIBLIOGRAFÍA

- **AMIGO, J.A.; STEGMAYER, A.R.; GRASSANO, A. y RONCHI, A.L.** 1996. "Estudios de la velocidad de crecimiento de alfa y beta estereasas de cepas nativas que nodulan en soja (*Glycine max* L. Merr)". XVIII RELAR. Santa Cruz de la Sierra- Bolivia. :181-182.
- **APARICIO, F. y DIFIERE, H.** 1958. "La Argentina. Suma de Geografía". Vol. 2. Tomo II. Ed. Peuser. Buenos Aires.
- **BURKART, ARTURO. 1943. "Las Leguminosas Argentinas Silvestres y Cultivadas"**. Edición autorizada por la Academia Nacional de Ciencias Exactas Físicas y Naturales. ACME AGENCY. Buenos Aires. : 258; 335; 400; 418.
- **DALMASSO, A.D. y HORNO, M.E.** 1994. "Productividad herbácea de la pampa de altura Las Aguaditas, Mendoza". MULTEQUINA. Contribuciones de la Dirección de Recursos Naturales Renovables. V. 3, :113-124.

- **HARTMANN, A.** 1989. "Caractérisation du génoma de *Rhizobium* et *Bradyrhizobium* au niveau moléculaire et son utilisation en écologie microbienne: diversité des populations naturelles et potentiel de transfert des plasmides". Tesis Doctoral. Universidad Bourgone. Francia. :145.
- **LEIVA MENDEZ, D.** 1993. "Estudio topográfico". Informe final. Estudio integral del sistema Pirquitas y Manejo de subcuenca del Río Los Puestos. CFI- Gobierno de Catamarca.
- "*Macropodium atropurpureum* D.C.". 2002?. En <http://rockfoun.org.mx/macropbiesp.html>. Consulta: 31 de mayo de 2002. 1p.
- **MOLINA, O.E.; PEROTTI, N.; TOLL VERA, J.R. y AGUIRRE, L.** 1984. "Inoculación cruzada de *Rhizobium sp.* autóctonos, con diversos cultivares del grupo caupí.". XII RELAR. Campinas. San Pablo. Brasil. : 403-412.
- **MORLANS, M.C.** 1995. "Regiones naturales de Catamarca. Provincias geológicas y provincias fitogeográficas". Revista de Ciencia y Técnica. Catamarca - Argentina. 2 (2): 1- 36.
- **OGAS, R.** 1994. "Mapa General de Suelos". Informe final. Estudio Integral del Sistema Pirquitas y Manejo de Subcuenca del Río Los Puestos. CFI- Gobierno de Catamarca.
- **SARAVIA TOLEDO, C. J.** 1995. "Recuperación y Conservación de Áreas Críticas en la Subcuenca del Río Los Puestos". Informe Final. Etapa II. Primera Fase. Estudio Integral del Sistema Pirquitas y Manejo de la Subcuenca del Río Los Puestos. Convenio C.F.I.-Pcia. de Catamarca. Catamarca. : 123 p.
- **SARAVIA TOLEDO, C. J.** 1997. "Recuperación de áreas críticas y monitoreo de las obras realizadas en la Subcuenca del Río Los Puestos". Informe Parcial. Estudio Integral del Sistema Pirquitas y Manejo de la Subcuenca del Río Los Puestos. Consejo Federal de Inversiones. Catamarca. : 37p .
- **SARAVIA TOLEDO, C. & SCHININI, A.** 1995. "Lista preliminar de plantas de la Subcuenca del Río Los Puestos". Recuperación y Conservación de áreas Críticas en la subcuenca del Río los Puestos. Informe Final. Etapa II. Primera Fase. Estudio Integral del Sistema Pirquitas y Manejo de la Subcuenca del Río los Puestos. Convenio CFI. - CATAMARCA. Catamarca.: 23p.
- **STEGMAYER, A.; DI BARBARO, G.; AMIGO, J. y PERNASETTI, S.** 1998. "Capacidad infectiva de cepas nativas que nodulan en soja (*Glycine max* L. Merc)". XIX RELAR. Maturín-Monagas. Venezuela. :113-114.

- **VIELMA, A.** 1999. "Caracterización de cepas autóctonas de *Bradyrhizobium sp.* aisladas de *Lupinus spp.*". Rev. Fac. Agron. (LUZ) 16: 495-508.
- **VINCENT, J. M.** 1970. "Manual Práctico de Rizobiología". Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires Argentina.: 9-11.