

Capacidad competitiva de cepas de rizobio en la formación de nódulos en *Leucaena leucocephala*

J. M. Matus*, M. Valdés* y J. F. Aguirre-Medina**

Introducción

El principal criterio para seleccionar cepas de rizobio para la producción de inoculantes es su efectividad para fijar nitrógeno atmosférico. Sin embargo, es necesario considerar otros criterios como la capacidad de las bacterias para formar nódulos, especialmente en presencia de rizobios nativos. En efecto, en muchas ocasiones la falta de respuesta a la inoculación se debe a la presencia en el suelo de ese tipo de bacterias que son competitivas y muchas veces inefectivas (Weaver and Frederick, 1974). En síntesis, el éxito de la inoculación de las leguminosas depende de la capacidad competitiva del rizobio introducido para invadir la rizosfera, multiplicarse y competir con cepas homólogas en la formación de nódulos. La competencia se inicia desde el momento en que las bacterias se encuentran en un mismo ambiente hasta que se localizan dentro del nódulo (Amarger, 1984). Un ejemplo de los resultados negativos de esta competencia es el de las pruebas para aumentar el número de nódulos en soya; en este cultivo, en suelos con poblaciones adecuadas de rizobios

residentes, las cepas de *Bradyrhizobium* inoculadas forman sólo entre 5% y 20% del total de nódulos de la planta (Weaver and Frederick, 1974).

Además de su capacidad intrínseca, existen factores como exudados radiculares (Trinick et al., 1983; Amarger, 1981), propiedades químicas y físicas del suelo (Materón and Hagedorn, 1983) y otros microorganismos (Trinick et al., 1983), que influyen en la capacidad competitiva de la planta para formar nódulos.

En el estado de Chiapas, México, es común utilizar *Leucaena leucocephala* como complemento de la alimentación animal. Esta especie tiene alto valor nutritivo, es apetecible y mantiene el peso de los animales en épocas críticas. Evaluar la capacidad de algunas cepas efectivas de rizobio para formar nódulos en *L. leucocephala*, cultivada en suelos con alta población de rizobios nativos, fue el propósito del presente ensayo.

Materiales y métodos

Localización y suelos. El ensayo se realizó en un Fluvisol eutrítico arenoso del campo experimental Jericó, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP), en Pijijiapan, Chiapas, a 40 m.s.n.m., con promedio anual de 2000 mm de

* Respectivamente: Estudiante en preparación de tesis, y profesora de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (ENCB/IPN), Apartado postal 63-246, 02800 México, D. F.

** Investigador del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP), Apartado postal 96, 30700, Tapachula, Chiapas, México.

precipitación distribuida entre mayo y diciembre. El suelo tiene un pH de 6.4, 1.3% de M.O. y 3.0 ppm de P y contiene 6.4×10^4 rizobios/g de suelo, capaces de nodular *Leucaena*.

Manejo de las cepas de rizobio. Se utilizaron las siguientes cepas de rizobio: (1) ENCB 31, nativa y efectiva, con alta frecuencia de aislamiento en *L. esculenta*; (2) ENCB D17, nativa y efectiva, aislada en la zona donde se realizó el ensayo; (3) CIAT 0042 (NGR8), efectiva y recomendada para suelos alcalinos; y (4) CIAT 1967 (TAL 1145), efectiva y recomendada para suelos ácidos.

Para identificar las bacterias dentro de los nódulos se elaboraron anticuerpos específicos para cada cepa (Vincent, 1975). Estos anticuerpos se sintetizaron en conejos y se tiñeron con isotiocianato de fluoresceína (ITCF) (Kawamura, 1977), sustancia que fluoresce color verde en microscopio iluminado con luz ultravioleta (UV). Esta técnica consiste básicamente en hacer reaccionar un frotis de rizobios de un nódulo a anticuerpos específicos marcados con ITCF; después de un lavado adecuado, el frotis se observa en microscopio con luz UV. La presencia de coloración verde fluorescente alrededor de las bacterias indica la reacción del frotis (antígeno) al anticuerpo.

Para determinar si las cepas nativas se cruzaban en forma antigénica con las cepas del ensayo, se hizo un estudio consistente en cultivar *L. leucocephala* en macetas con suelo del sitio experimental. Una vez desarrolladas las plántulas, se cosecharon 200 nódulos para efectuar pruebas individuales antígeno-anticuerpo, utilizando el extracto nodular como antígeno. Como no se observaron reacciones parciales, con cada cepa en evaluación se prepararon inoculantes con base de turba.

Establecimiento y manejo del ensayo. El área del ensayo fue de 1500 m², dividida en 16 parcelas; antes de la siembra se aplicaron 22 kg/ha de P. Las semillas de *Leucaena* se escarificaron en agua caliente durante un minuto, se inocularon con las cepas seleccionadas a razón de 2% del peso de las semillas y se establecieron en surcos distanciados 1 m. Los tratamientos (cepas de rizobio) se dispusieron en un diseño de bloques al azar con cuatro repeticiones.

Cuatro semanas después de la siembra se extrajeron 200 nódulos de 10 plantas

seleccionadas al azar en cada tratamiento. Las pruebas de dominancia de las cepas se hicieron con cuatro frotis del jugo, los cuales se evaluaron con los diferentes anticuerpos.

Resultados y discusión

El Cuadro 1 muestra la capacidad competitiva de las cepas de rizobio para formar nódulos en *Leucaena*. La cepa *Rhizobium* CIAT 1967 dominó (P < 0.05) en la formación de nódulos; del 73% de los nódulos formados por esta cepa, 57% estaban constituidos por la cepa pura y 16% por una combinación con una cepa nativa no inoculada. En dos suelos tropicales diferentes y en condiciones de manejo similares a las del presente ensayo, Moawad and Bohlool (1984) encontraron igualmente un alto poder competitivo de esta cepa para nodular, aunque el número de nódulos formados fue menor.

Cuadro 1. Porcentaje de nódulos formados en *Leucaena leucocephala* por cepas de *Rhizobium* inoculadas y nativas en el suelo.

Cepas inoculadas	NS*	ND*	Total	Cepa nativa
CIAT 1967	57	16	73a**	27
CIAT 0042	27	14	41b	59
ENCB D17	18	1	19c	81
ENCB 31	42	12	54b	46

* Porcentajes correspondientes a nódulos sencillos (NS), que contienen una sola cepa inoculada, y a nódulos dobles (ND), con una cepa inoculada y una cepa nativa.

** Valores en una misma columna con letras iguales difieren en forma significativa (P < 0.05), según la prueba de Duncan.

La cepa *Rhizobium* CIAT 0042, recomendada para suelos alcalinos (Wijewardene and Waidyanatha, 1984), se encontró únicamente en 41% de los nódulos. Esta baja competitividad se debió posiblemente a su falta de adaptación a estos suelos, ligeramente ácidos, o a la alta competencia de las cepas nativas.

La cepa *Rhizobium* ENCB 31 fue bastante competitiva y se encontró en el 54% de los nódulos, de los cuales el 12% fueron de doble infección. Esta bacteria se aisló en el Laboratorio de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas a partir de nódulos de *L. esculenta* recolectados en el Estado de Oaxaca, lugar de origen de *Leucaena*, y mostró una alta tasa de aislamiento y competitividad en condiciones controladas (Valdez-Jiménez, 1988).

La cepa *Rhizobium* ENCB D17 fue aislada de nódulos de *L. leucocephala* recolectados en la región donde se realizó este ensayo; sin embargo, su capacidad para formar nódulos, inclusive en las plantas inoculadas, fue escasa e inferior al de las cepas nativas.

Conclusiones

Los resultados del presente ensayo muestran que en condiciones de campo *L. leucocephala* puede responder en forma diferente a la inoculación en invernadero. En éste, las cepas se manifiestan efectivas; en el campo, al introducirse en las plantas, se encuentran con bacterias nativas homólogas que compiten en la formación de nódulos, pero son menos efectivas que las cepas inoculadas.

La técnica de inmunofluorescencia permitió detectar un alto número de nódulos con ocupación doble, es decir, formados por dos cepas diferentes de *Rhizobium*, lo cual indica la alta competitividad de algunas bacterias en el proceso de nodulación. Se confirma la alta competitividad de la cepa de *Rhizobium* CIAT 1967 (TAL 1145); se encontró también que la cepa ENCB 31 es competitiva.

Summary

The effectiveness of *Rhizobium* strains ENCB 31, ENCB D17, and CIAT 0042 and 1967 (TAL 1145) to form nodules in *Leucaena leucocephala* was evaluated in a sandy Fluvisol of the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP), Chiapas, Mexico, at 40 m.a.s.l. and 2000 mm precipitation. Bacteria within the nodules were identified with specific antibodies, which were stained with fluorescein isothiocyanate for their microscopic identification under ultraviolet light. Four weeks after planting *L. leucocephala*, 200 nodules were extracted from 10 plants selected randomly in each treatment (*Rhizobium* strains). Strain dominance was determined in smears of the nodular juice (antigen), which were tested with different antibodies.

Rhizobium strain CIAT 1967 was dominant, with 57% of nodules; CIAT 0042 was found in 41% of the nodules; ENCB D17 in 18%; and

ENCB 31 in 42% of the nodules. Results showed that rhizobium strains compete with native strains in the field in nodule formation. Immunofluorescence allowed the detection of a high number of nodules with double occupancy, that is, formed by two rhizobium strains.

Referencias

- Amarger, N. 1981. Competition for nodule formation between effective and ineffective strains of *Rhizobium meliloti*. *Soil Biol. Biochem.* 13(6):475-480.
- . 1984. Evaluation of competition in *Rhizobium* spp. In: Klug, M. J. and Reddy, C. A. (eds.). *Current perspectives in microbiology ecology*. American Soc. Microbiol., Washington, D. C. p. 300-305.
- Kawamura, A. Jr. 1977. *Fluorescent antibody techniques and their application*. 2d. edition. University of Tokio Press. p. 13-93.
- Materón, L. A. and Hagedorn, C. 1983. Competitiveness and symbiotic effectiveness of five strains of *Rhizobium trifolii* on red clover. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 47(3):491-495.
- Moawad, H. and Bohlool, B. B. 1984. Competition among *Rhizobium* spp. for nodulation of *Leucaena leucocephala* in two tropical soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 48(1):5-9.
- Trinick, M. J.; Parker, C. A. and Palmer, M. J. 1983. Interactions of the microflora from nodulation problem and non-problem soils towards *Rhizobium* spp. on agar culture. *Soil Biol. Biochem.* 15(3):295-301.
- Valdez-Jiménez, V. M. 1988. Competencia por nodulación de cepas de *Rhizobium loti* en *Leucaena esculenta*. Tesis. Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, México. 40 p.
- Vincent, J. M. 1975. *Manual práctico de rizobiología*. Hemisferio Sur, Buenos Aires. 200 p.
- Weaver, R. W. and Frederick, L. R. 1974. Effect of inoculum rate on competitive nodulation of *Glycine max* L. Merrill; 2: Field studies. *Agron. J.* 66(2):233-236.
- Wijewardene, R. and Waidyanatha, P. 1984. *Conservation farming*. Department of Agriculture, Sri-Lanka and the Commonwealth Consultative Group on Agriculture for the Asia-Pacific Region. 39 p.