



VI CONGRESSO LATINO-AMERICANO
X CONGRESSO BRASILEIRO
V SEMINÁRIO DO DF e ENTORNO
12-15 SETEMBRO 2017
BRASÍLIA- DF, BRASIL

Tema Gerador 9

Manejo de Agroecosistemas
e Agricultura Orgánica



Aislamiento y caracterización de microsimbiontes de *Medicago sativa* L. en su capacidad solubilizadora de fósforo y su tolerancia al estrés salino

Isolation and characterization of Medicago sativa L. symbiotic bacteria in phosphorus solubilizing capacity and tolerance to saline stress

BALAGUE, Laura¹; FERMOSELLE, Geraldina¹; DAVIES, Jorge¹

¹Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata (UNLP).
balaguelaura@gmail.com; geralf75@hotmail.com; adrian_sur@live.com.ar

Tema Generador: Manejo de Agroecosistemas y Agricultura Orgánica

Resumen

Con el objetivo de aislar cepas de rizobios, simbioses de *Medicago sativa* L. (alfalfa), y caracterizar su capacidad promotora del crecimiento vegetal, se realizó la búsqueda y selección de microorganismos en suelos de diferentes zonas productivas del país. Se evaluó la colección en la capacidad de solubilizar fósforo y la resistencia a ambientes salinos. En la colección de 58 aislados se observaron 5 que tienen la capacidad de solubilizar fósforo. Se determinó que el mayor porcentaje de aislados tolerantes a salinidad (3,5% ClNa) eran procedentes de Magdalena (26%). De los aislados seleccionados se determinó el porcentaje de plantas noduladas (PPN) SENASA - Res. 264/2011. La mayoría de los aislados evaluados indujeron la formación de nódulos en un porcentaje de plantas superior al 80%. La caracterización de estas cepas es probable que nos permita identificar individuos con un potencial biotecnológico para su uso como bioinoculantes.

Palabras clave: bacterias del suelo; promotores del crecimiento vegetal; solubilización de fósforo; salinidad; rizósfera.

Abstract

With the objective of isolating strains of rhizobia, symbionts of *Medicago sativa* L. (alfalfa), and characterizing their ability to promote plant growth, the research and selection of microorganisms were carried out in soils of different productive areas of the country. The collection was evaluated in the ability to solubilize phosphorus and resistance to saline environments. In the collection of 58 isolates, 5 show the ability to solubilize phosphorus. It was determined that the highest percentage of isolates tolerant to salinity (3.5% ClNa) were from Magdalena (26%). From the selected isolates, the percentage of nodulated plants (PPN) was determined, according to the methodology used by SENASA - Res. 264/2011. Most of the isolates evaluated induced nodule formation in a percentage of plants greater than 80%. The characterization of these strains is likely to allow us to identify individuals with a biotechnological potential for their use as bioinoculants.

Keywords: soil bacteria; plant growth promoters; solubilization phosphorus; salinity; rhizosphere.

INTRODUCCIÓN:

En la República Argentina el área de siembra del cultivo de alfalfa (*Medicago sativa* L.) se estima en unas 3,7 millones de ha, (Basigalup, 2014). Los rendimientos pueden variar según las diferentes zonas de producción, a nivel nacional se referencian rendi-



mientos de 24.000 kg.ha-1.año-1 (Demin y Aguilera, 2012). La implantación de alfalfa con el objetivo de lograr una alta producción, requiere un adecuado abastecimiento de fósforo (Berardo *et al.*, 2001). La función específica del fósforo está relacionada con la síntesis de adenosina trifosfato (ATP) asociada con la actividad del complejo enzimático fijador de nitrógeno. La producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular obtenido por las rizobacterias es uno de los mecanismos más ampliamente conocidos de solubilización del fosfato del suelo, que hace al fósforo (P) disponible para la nutrición de las plantas (Paredes-Mendoza, 2010). Distintas especies de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, poseen capacidad de solubilización de fósforo inorgánico (Halder *et al.*, 1990; Halder & Chakrabarty 1993; Surange & Kumar 1993), siendo esto un factor de selección por la importancia que tiene este elemento en la producción de los cultivos.

La salinidad es un factor de estrés para los rizobios porque inhibe la persistencia y desarrollo de los microorganismos, consecuentemente la selección de cepas de rizobios tolerantes a la salinidad es de gran importancia para las zonas de cultivo de alfalfa afectadas por esta condición del suelo (Elboutahiri *et al.*, 2010; Ibragimova *et al.*, 2006). Hay estudios que demuestran que los rizobios de rápido crecimiento tienen mayor tolerancia a la salinidad por la capacidad de acumular más rápidamente poliaminas (estabilizador osmótico) y utilizan con mayor rapidez nutrientes necesarios para el crecimiento y la multiplicación en comparación con los rizobios de lento crecimiento (Marquina *et al.* 2011). En la población naturalizada es factible encontrar rizobios con características competitivas que aumenten la eficiencia de la fijación de nitrógeno y pueden ser utilizados para la fabricación de inoculantes (Chen *et al.*, 2002).

Con el objetivo de aislar y caracterizar cepas de rizobios, simbioses de alfalfa, que se destaquen por su capacidad promotora del crecimiento vegetal se realizó la búsqueda y selección de microorganismos en suelos de diferentes zonas productivas del país. En primera instancia se evaluó esta colección en la capacidad de solubilizar fósforo y la resistencia a ambientes salinos.

Metodología

Fueron seleccionados los sitios de muestreo en las regiones: Pampa Húmeda y Patagónica Extra Andina. La colección de 58 aislados obtenidos en esta etapa se caracterizó en su infectividad, capacidad para solubilizar fósforo y tolerancia a la salinidad. Cepa control: *Ensifer meliloti* B399. Solubilización de Fósforo (P): Se empleó un medio de cultivo sólido suplementado con una fuente de fósforo insoluble: Medio para solubilización de P: MMSFCP-Mg, (Paredes Mendoza, 2010). La capacidad solubilizadora se determi-



VI CONGRESSO LATINO-AMERICANO
X CONGRESSO BRASILEIRO
V SEMINÁRIO DO DF e ENTORNO
12-15 SETEMBRO 2017
BRASÍLIA- DF, BRASIL

Tema Gerador 9

Manejo de Agroecossistemas
e Agricultura Orgânica



nó en base a la formación de un halo transparente alrededor de las colonias. Tolerancia a la salinidad: Se utilizaron placas con medio YEM sólido a pH 6.9 con rojo congo y se adicionaron diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl): 0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 y 3,5 %. Como control del experimento se utilizó el medio YEM con su correspondiente concentración de NaCl (0.01 %). Se incubaron a 28°C durante 5 días.

Evaluación de la Infectividad: de los aislados seleccionados se determinó el porcentaje de plantas noduladas (PPN), según establece la metodología empleada por el SENASA (Res. 264/2011). Resultado positivo: plantas que presentaron 3 o más nódulos en los primeros 1,5 cm de la raíz principal y abarcando las raíces secundarias a una distancia de 0,5 cm. Se consideraron satisfactorios los ensayos que cuenten con un mínimo de 80% de plantas positivas (noduladas).

Los datos se analizaron por medio de ANOVA y la comparación de medias se realizó a través el Test de Tukey ($p < 0,05$).

Resultados y discusión

Se evaluó la colección de 58 aislados obtenidos en su tolerancia a la salinidad, observamos que todos los aislados evaluados desarrollaron hasta concentraciones de ClNa (1%), estos valores disminuyen a 24% en concentraciones de 2%. A la concentración de ClNa (3,5%) (Tabla 1), se observó que el mayor porcentaje de aislados tolerantes eran procedentes de Magdalena (26%), en esta zona algunos suelos presentan características salinas, Se detectó un mayor número de cepas tolerantes procedentes de suelos salinos (Ibragimova *et al.*, 2006). En los otros sitios de muestreo se observaron estos Resultados Trelew (6,25%), Colón (0%) y Arrecifes (7,69%).

Se rescataron 5 aislados (461, 541, 561, 611, 631) que presentan la capacidad de solubilizar fósforo.



Tabla 1 - Análisis de la colección de los aislados simbiotes de alfalfa (*Medicago sativa* L.) en su capacidad de solubilizar fósforo y su tolerancia a la salinidad. Porcentaje de aislados de cada sitio de muestreo.

Origen	Número de aislados	Capacidad de Solubilizar fósforo Porcentaje de aislados de cada sitio de muestreo	Porcentaje de aislados tolerantes a la salinidad de cada sitio de muestreo
			3,5% CINA
Magdalena	23	0	26
Trelew	16	0	6,25
Colón	6	16,6	0
Arrecifes	13	30,7	7,69

Se evaluó el porcentaje de plantas noduladas (PPN), de algunos aislados seleccionados por su tolerancia a la salinidad (42, 62, 112, 352, 392, 552, 622) y su capacidad de solubilizar fósforo (541, 561, 611, 631). Todos los aislados evaluados indujeron, a los 25 días de iniciado el ensayo, la formación de nódulos en un porcentaje de plantas superior al 80%, a excepción de la cepa 631, tratamiento en el que sólo el 55% de las plantas presentaron nódulos.

Se determinó el número de nódulos por planta, según el análisis estadístico de los Resultados mediante el Test de Tukey ($p < 0.05$), el aislado 561 presentó menor número de nódulos teniendo diferencias significativas con la cepa B399. El resto de los aislados presentó un comportamiento similar a la cepa control.

Conclusión

Se demostró que algunos aislados son capaces de solubilizar fósforo y toleran concentraciones mayores de CINA que la cepa control. Estudios adicionales en condiciones de campo contribuirán a definir el potencial biotecnológico de estas estirpes, evaluando la promoción del crecimiento vegetal en condiciones limitantes del suelo.

Referencias bibliográficas

- Basigalup, D. H. Situación de la alfalfa en Argentina. Mejoramiento de Alfalfa - INTA Manfredi. 2014.
- Berardo, A. y Marino, M. A. Fertilización fosfatada de alfalfa en el sudeste bonaerense. Acción Rural año 6 n° 30, p. 1-4. 2001.
- Chen L.S.; Figueredo A.; Villani H.; Michajluk J. y Hungria M. 2002. Diversity and symbiotic effectiveness of rhizobia isolated from field-grown soybean nodules in Paraguay. Biol Fertil Soils 35:448–457. 2002.



VI CONGRESSO LATINO-AMERICANO
X CONGRESSO BRASILEIRO
V SEMINÁRIO DO DF e ENTORNO
12-15 SETEMBRO 2017
BRASÍLIA- DF, BRASIL

Tema Gerador 9

Manejo de Agroecossistemas
e Agricultura Orgânica



Demin P. y Aguilera J. Efecto del régimen de riego en el rendimiento de alfalfa para corte en el Valle Central de Catamarca, Argentina. Rev. FCA UNCUYO. 2012. 44(1): 173-181. 2012.

Elboutahiri, N.; Thami-Alami, I. & Udupa S. Phenotypic and genetic diversity in *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae* from drought and salt affected region of Morocco. Microbiology DOI: 10.1186/1471-2180-10-15., BMC. 2010.

Halder A. K. & Chakrabartty P. K. Solubilization of inorganic phosphates by *Rhizobium*. Folia Microbiol. 38:325-330. 1993.

Halder A. K.; Mishra A. K.; Bhattacharyya P. & Chakrabartty P. K. Solubilization of rock phosphate by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. J. Gen. Appl. Microbiol. 36:81-92. 1990.

IBRAGIMOVA, M. V.; RUMYANTSEVA, M. L.; ONISHCHUK, O. P.; BELOVA, V. S.; KURCHAK, O. N.; ANDRONOV, E. E.; DZYUBENKO, N.I. & SIMAROV, B. V. Symbiosis between the root-nodule bacterium *Sinorhizobium meliloti* and alfalfa (*Medicago sativa*) under salinization conditions. Microbiology, 75(1), 77-81. 2006.

Marquina, M. E.; González, N. E. y Castro Y. Caracterización fenotípica y genotípica de doce rizobios aislados de diversas regiones geográficas de Venezuela. Rev. Biol. Trop., vol. 59, no. 3, p. 1017-1036. 2011.

Paredes-Mendoza, M. Tesis Doctoral. Aislamiento y caracterización bioquímica de metabolitos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfatos. Instituto de enseñanza e investigación en Ciencias agrícolas. Montecillo, Texcoco Edo de México. 2010.

SENASA. Resolución 264. Anexo I. Método de Burton Modificado, Capítulo 12. 2011.

Surange S. & Kumar N. Phosphate solubilization under varying pH by *Rhizobium* from tree legumes. Indian J. Exp. Biol. 31:855-857. 1993.

Vincent J.M. A manual for the practical study of root nodule bacteria. IBP Hand book 15. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 164 pp. 1970.