

ATRAPAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE RIZOBIOS PROCEDENTES DE SUELOS DEL ALGARROBAL DEL MONTE

RAMÓN A. MORALES

INTRODUCCIÓN

La fijación biológica del nitrógeno atmosférico es realizada por tres grupos de organismos procarióticos: bacterias, actinomicetes y cianobacterias o algas verdes azuladas. Pueden ser de vida libre o vivir asociados a plantas superiores. Se calcula que el aporte de nitrógeno combinado, procesado por estos microorganismos, es del orden de las 180 millones de toneladas anuales, correspondiendo la mayor parte a las procariontes que viven asociados a las raíces de leguminosas y a las de árboles y arbustos no leguminosas.

Muchas leguminosas arbóreas y arbustivas nativas son a menudo componentes importantes de nuestros ecosistemas áridos y semiáridos. La mayoría de ellas suelen desarrollar sistemas radicales profundos y poseen adaptaciones fisiológicas al estrés hídrico y salino. Cuando sus raíces se asocian a organismos del suelo fijadores de nitrógeno, dan origen a estructuras especializadas, los nódulos radicales, lugar donde se produce la fijación y transformación del nitrógeno. Esta facultad, unida a las características mencionadas, favorecen la sobrevivencia y productividad de dichas especies en ambientes áridos, a la vez que enriquecen el contenido de nitrógeno del suelo. Todos estos conocimientos han ido acrecentando el interés por la forestación y reforestación de nues-

tros ecosistemas áridos y semiáridos, mediante el empleo de leguminosas leñosas, para la producción de madera, forraje, estabilización de médanos y mejoramiento del suelo.

En terrenos poblados de leguminosas nativas tales como, algarrobo dulce (*Prosopis flexuosa*), algarrobo blanco (*P.chilensis*), alpataco o algarroba bruta (*P.alpataco*), algarrobo del guanaco (*P.argentina*), caballo del diablo o candelero (*Prosopidastrum globosum*), chañar brea (*Cercidium praecox*), chañar (*Geofroea decorticans*), y otras especies, pueden encontrarse bacterias del género *Rhizobium*, potencialmente fijadoras de nitrógeno atmosférico.

En programas de forestación o reforestación con leguminosas nativas, es importante utilizar especímenes con raíces noduladas o inoculadas con la bacteria apropiada, para asegurarse que la planta tenga éxito en el ambiente particular al cual va a ser trasplantada.

La práctica de inoculación con el organismo fijador de nitrógeno es frecuente cuando se trata de herbáceas anuales, porque se dispone de cultivos de rizobios específicos. En el caso particular de las leguminosas arbóreas, aún no se dispone comercialmente de cepas de *Rhizobium* adecuadas (Arce y Balboa, 1986), y las

existentes pueden resultar poco infectivas y/o efectivas en la nodulación y/o fijación del N₂. Para el caso de nuestros *Prosopis* las pocas cepas de rizobios disponibles han sido aisladas de nódulos radicales de especies de *Prosopis* que crecen en otras latitudes, bajo condiciones climáticas distintas y en suelos con diferentes características físico-químicas.

El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de *Rhizobium* en suelos de poblaciones nativas de *Prosopis chilensis* y *Prosopis flexuosa*, como así también aislar, cultivar y caracterizar las cepas del endosimbionte.

METODOLOGÍA

El método consiste en utilizar plántulas de estas especies como "atrapadoras" del microsimbionte, cultivándolas en suelos extraídos de zonas donde crecen poblaciones nativas de algarrobos. Luego de un tiempo de efectuada la siembra se examina el sistema radical para determinar la presencia o no de nódulos.

Semillas

Para el estudio se utilizó semillas de diversas especies de *Prosopis*, provenientes de diferentes zonas: *Prosopis flexuosa*: Ñacuñan (Santa Rosa, Mendoza), *P. chilensis*: Sierra de Villicum (Albardón, San Juan), *P. argentina*: Puesto El Llaullín (Lavalle, Mendoza), *P. alpataco*: Asunción (Lavalle, Mendoza) y *Prosopidastrum globosum*: Asunción (Lavalle, Mendoza).

Las semillas se escarificaron siguiendo la técnica del pinchado o de inmersión en agua hirviendo durante tres minutos.

Posteriormente se colocaron a germi-

nar 20 semillas de cada especie, en cajas de Petri preparadas con algodón y papel de filtro humedecidos con 10 ml de una solución fungicida (benomil 1,2 g/l agua). La germinación se llevo a cabo en estufa a temperatura constante de 30° C. Las semillas germinadas se llevaron a maceta cuando la radícula superó 1 cm de longitud.

Suelos

Se tomó muestras de suelos extraídas de los primeros 30 cm de profundidad, proviniendo de las localidades de: Asunción bajo el dosel de *P. flexuosa*, *P. alpataco* y *Prosopidastrum globosum*,

Puesto El Llaullín bajo el dosel de *P. argentina*,

Ñacuñan bajo y fuera el dosel de *P. flexuosa*,

Las Tumanas bajo el dosel de *P. chilensis*.

Los suelos se caracterizaron físico-químicamente mediante la determinación de: Nitrógeno orgánico (método Kjeldahl), Fósforo disponible (extracción con CO₂, usando reactivo sulfomolibdico y por espectrocolorimetría), Conductividad eléctrica (mediante conductímetro WTW modelo LF DIGI 550), pH (en extracto a saturación con peachímetro KANE MAY model 7001), textura (método de la pipeta) y Nitratos (mediante electrodo especial para nitratos ORION).

Siembra

Se emplearon envases de polietileno transparente de 30 micrones de espesor, 30 cm de longitud y 10 cm de diámetro. El suelo previamente homogeneizado se mezcló con vermiculita en una proporción de 3:1 (v/v).

En cada maceta se colocaron tres semillas germinadas, raleándose una vez enraizadas las plantulas dejando una por maceta. Las macetas se colocaron en cámara de crecimiento a temperatura constante de 30° C y con luz continua de una intensidad de radiación fotosintéticamente activa de 110 $\mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$.

Las macetas se regaron durante las primeras semanas con solución nutritiva carente de nitrógeno (Hoagland diluída a 1/4) para suplir posibles deficiencias de nutrientes de los suelos y facilitar así la nodulación. Posteriormente se continuó el riego con agua corriente, alternando con agua destilada para evitar posible salinización.

Las semillas se sembraron en suelo obtenido bajo el dosel de la planta madre, y en suelo obtenido bajo el dosel de otra especie (siembra cruzada), a fin de establecer la capacidad infectiva, generalista o no, de las cepas de rizobios que se pudieran determinar. Las variantes de siembras efectuadas se indican en la tabla 2.

Las macetas fueron llevadas a invernáculo a los sesenta días de la siembra.

Extracción de nódulos

Transcurrido unos meses de la siembra se cosecharon plantas, para lo cual se lavó el suelo con agua corriente a fin de evitar rotura de nódulos durante la extracción.

Se examinó el sistema radical en cuanto a la formación o no de nódulos; además se registró forma, color, tamaño y ubicación de los nódulos en la raíz. Los nódulos obtenidos se los conservó en tubos de ensayo en cuyo fondo se colocó una capa de sílica-gel como desecante, luego una de algodón y sobre este los nódulos.

Aislamiento de rizobios, cultivo y caracterización

Los nódulos conservados en los tubos de ensayo se rehidrataron embebiéndolos en agua destilada durante 1-2 horas. Posteriormente se efectuó varios lavados con agua estéril para eliminar restos de suelo y otros contaminantes. Inmediatamente se sumergieron 5-10 segundos en alcohol etílico 96° y seguidamente en hipoclorito de sodio al 3% durante 4-6 minutos, para desinfectar la superficie. Se completó el lavado con agua estéril. La siembra para cultivo bacteriológico se realizó en medio de cultivo líquido, compuesto de 0,4 g de extracto de levadura, 10 g de manitol, 0,5 g de PO_4HK_2 , 0,2 g de $\text{SO}_4\text{Mg}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0,1 g de CLNa; enrasando a 1 litro con agua destilada y esterilizando en autoclave a 120° C durante 30 minutos.

Las cajas inoculadas se incubaron en estufa a 28°C. Al observarse enturbiamiento se colectó el material y se sembró en cajas de Petri conteniendo el medio de cultivo adicionado de agar a razón de 15 g/l de medio de cultivo. Se observó si los rizobios aislados eran de crecimiento rápido (formaban colonias a los 2-5 días) o lento (formaban colonias entre 5-15 días). De estas colonias se hicieron subcultivos en cajas de Petri que contenían LMA (extracto de levadura-manitol-agar), para purificar y seleccionar las cepas más típicas. Luego de 3-4 subcultivos de las cepas se observó casi siempre un crecimiento muy homogéneo, momento en que se consideró que la cepa estaba purificada. Se registró entonces forma, tamaño, textura, color, etc. de las colonias de cada cepa.

Las determinaciones que se realizan a fin de identificar y caracterizar las cepas incluyen la coloración de Gram (los rizo-

bios son Gram negativos y no producen esporas); cultivo en medio LMA + rojo Congo (los rizobios no absorben generalmente el rojo Congo cuando se incuban en oscuridad, permaneciendo blancas o ligeramente rosadas); cultivo en medio LMA de pH 6,8 + azul de bromo timol (los rizobios de crecimiento lento producen alcalinidad, haciendo virar el medio a color azul; los rizobios de crecimiento rápido producen acidez y la coloración cambia al amarillo); cultivo en medio agar-peptona-glucosa (los rizobios no se desarrollan bien en este medio).

Las cepas obtenidas se conservaron en medio extracto de levadura-manitol-agar a 5°C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características físico-químicas de los suelos empleados

En general el contenido de nitrógeno orgánico es relativamente bueno (Tab. 1) en relación a la textura (arenosa a franco-arenosa).

Los suelos de Asunción, obtenidos bajo el dosel de *P. globosum*; de El Llaullín y de Ñacuñán, obtenidos fuera del dosel de *P. flexuosa*, son muy pobres en nitrógeno.

El fósforo disponible fue pobre en la mayoría de los suelos, con excepción del obtenido en el Puesto El Llaullín que superó los 12 ppm. La salinidad (conductividad eléctrica del extracto a saturación) resultó baja (menor a 2000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 25°C) para todos los suelos, excepto el de Asunción obtenido bajo el dosel de *P. alpataco* que resultó salino (mas de 7500 $\mu\text{S}/\text{cm}$).

Nodulación

Se constató la formación de nódulos en la mayoría de las especies analizadas (Tab. 2), excepto en *P. chilensis* cultivado en suelo de Asunción (bajo dosel de *P. alpataco*) y en suelo mezcla de Ñacuñán-Asunción (bajo dosel de *P. flexuosa*). Esto indicaría cierta especificidad para la asociación *Rhizobium-P. Chilensis*, especie esta que alcanzó alto porcentaje de nodulación al ser cultivada en suelo de Valle Fértil (San Juan), donde crece una población nativa de este algarrobo.

P. flexuosa noduló en todos los suelos donde fue sembrado, pero se observaron diferencias en cuanto al porcentaje de nodulación y tamaño de nódulos según el suelo empleado; así no todas las plantas cultivadas en el suelo mezcla de Ñacuñán-Asunción (obtenido bajo el dosel) presentaron nódulos, en cambio en suelo de Ñacuñán (extraído fuera de dosel) se obtuvo un alto porcentaje de nodulación. Esto sería consecuencia de un efecto depresivo del nitrógeno del suelo sobre la capacidad infectiva del simbiote, pues el suelo bajo el dosel tiene un contenido de N orgánico de 0,11% comparado con el de fuera del dosel con 0,039%.

El tamaño de los nódulos de *P. flexuosa* también varió según el suelo usado como sustrato; en suelo obtenido bajo el dosel fueron en su mayoría pequeños (menores de 2 mm), mientras que en el suelo extraído fuera del dosel los nódulos fueron de mayor tamaño (mayores de 5 mm); la forma predominante fue elongada y lobulada (nódulo de crecimiento indeterminado), en algunos casos asemejando a dedos de guante; el color fue pardo con el ápice

blanco y la ubicación en la raíz fue sobre raíces secundarias, en muy pocos casos sobre el eje principal.

Los nódulos en *P. chilensis* (cultivado en suelo de Valle Fértil-San Juan) se caracterizaron por su forma elongada y lobulada, en algunos casos anastomosados asemejando forma de abanico, el tamaño fue superior a 5 mm (en ciertos casos alcanzando 1 cm de largo) siendo el color pardo y la ubicación sobre raíces secundarias.

En *P. globosum* los nódulos tuvieron forma alargada (entre 5 y 10 mm de largo), de color pardo claro con el ápice blanco y ubicados sobre raíces secundarias.

Los nódulos de *P. argentina* y *P. alpataco* se caracterizaron por tener forma alargada y lobulada, con gran variación en el tamaño (menores de 2 mm y mayores de 5 mm); el color fue pardo claro, aunque a veces se observaron nódulos de color levemente rosado. La ubicación fue sobre raíces secundarias.

Características de las cepas de rizobios obtenidas

La cepa obtenida de *P. flexuosa*, cultivado en suelo de Ñacuñán (Santa Rosa-Mendoza) extraído fuera del dosel, se caracteriza por formar colonias de forma convexa-cónica, algunas más aplanadas; de color blanco lechoso de aspecto brillante, húmedas y de textura elástica; tamaño de 4 a 5 mm de diámetro. Son rizobios Gram negativos, de crecimiento rápido (forman colonias a las 48 horas de sembrados) y producen notable acidez (cambian totalmente el color verde al amarillo del medio LMA a pH 6.8 + azul de bromo timol en solo 48 hora).

En *P. flexuosa* cultivado en un suelo

mezcla de Ñacuñán-Asunción (obtenido bajo el dosel de este algarrobo), se obtuvo una cepa que forma colonias planas (levemente convexas), pequeñas (1 a 2 mm de diámetro); de color blanco opaco y de textura cremosa seca. La coloración de Gram resultó negativa (bastones de color rojo claro); son rizobios de crecimiento rápido y producen acidez.

De nódulos de *P. chilensis* cultivados en suelo de Valle Fértil-San Juan (extraído bajo el dosel), se obtuvo una cepa que forma colonias convexas-cónicas, de color blanco lechoso y aspecto brillante, húmedas y de textura elástica, de 5 mm de diámetro. Son rizobios Gram negativos que forman colonias a los 2 días de sembrados (crecimiento rápido) y producen acidez.

La cepa obtenida de *P. globosum*, cultivado en suelo de Asunción-Lavalle (extraído bajo su dosel), forma colonias planas, circulares, de tamaño pequeño (1 a 2 mm de diámetro); del color blanco opaco (en algunos casos desarrollan un color levemente rosado) y de textura cremosa seca; al unirse las colonias forman figuras arborescentes.

Los rizobios son de crecimiento rápido, producen acidez y son Gram negativos.

CONCLUSIONES

Las especies de algarrobos usadas como "atrapadoras" de rizobios formaron nódulos en la mayoría de los suelos empleados, a excepción de *P. chilensis* cultivado en suelo de Asunción-Lavalle (obtenido bajo el dosel de *P. alpataco* y en suelo mezcla de Ñacuñán-Asunción (obtenido bajo el dosel de *P. flexuosa*).

Los nódulos obtenidos presentaron forma alargada (crecimiento indeterminado), lobulados, muchas veces asemejando dedos de guante. Cuando se formaron pocos nódulos, éstos fueron de tamaño grande; a la inversa, fueron de tamaño pequeño cuando se formaron muchos nódulos. La ubicación en la raíz fue sobre raíces secundarias y el color predominante fue el pardo.

Las cepas de rizobios obtenidas resultaron de crecimiento rápido y productoras de acidez.

BIBLIOGRAFÍA

- ARCE, J.P. Y O. BALBOA, 1986. Antecedentes sobre el género *Prosopis* en Chile. Proc. II International Conference on *Prosopis*. Brasil (in press).
- BAUER, W.D., 1981. Infection of legumes by rhizobia. Ann. Rev. Plant Physiol. 32: 407-449.
- BERGENSEN, F.J., 1980. Measurement of nitrogen fixation by direct means. In: Methods for evaluating biological nitrogen fixation (66-110) Cap. 2 F.J. Bergersen (ed). John Willey and Sons Ltd.
- BUSHBY, H. AND K. MARSHALL, 1977. Some factors affecting the survival of root nodule bacteria on desiccation. Soil Biol. Biochem. 9: 143-147.
- CASTILLO, F. Y J. CÁRDENAS, 1987. Fijación biológica del nitrógeno. Investigación y Ciencia (Scientific American) 134: 88-96.
- FELKER, P. AND P.E. CLARK, 1980. Nitrogen fixation (acetylene reduction) and cross inoculation in 12 *Prosopis* (mesquite) species. Plant and Soil 67: 177-186.
- HALLIDAY, J. 1984. Integrated approach to nitrogen fixing trees germplasm development. Pesquisa Agropecuaria Brasileira, 19: 91-117.
- PHILLIPS, D.A., 1980. Efficiency of symbiotic nitrogen fixation in legumes. Ann. Rev. Plant Physiol. 31: 29-49.
- RUNDEL, P.W.; NILSEN, E.T.; SHARIFI, M.R.; VIRGINIA, R.A.; JARREL, W.M.; KOHL, D.H. AND G.B. SCHEARER, 1982. Seasonal dynamic of nitrogen cycling for a *Prosopis* woodland in the Sonoran desert. Plant and Soil 64: 1-10
- SHOUSHTARI, N.H. AND I.L. PEPPER, 1985. Mesquite rhizobia isolated from the Sonoran desert: competitiveness and survival in soil. Soil Biol. Biochem. 17 (6): 803-806.
- SPRENT, J.I., 1985. Nitrogen fixation in arid environments. Plants for arid lands: 215-229 (Cap. 16).
- TORRES, M.E., 1984. Fijación biológica de nitrógeno en *Prosopis tamarugo* y *Prosopis alba*. Estado actual del conocimiento sobre *Prosopis tamarugo*. Documentos presentados a la Mesa Redonda Internacional sobre *Prosopis tamarugo*. Phil. Arica-Chile, 11-15 de junio de 1984. Editado por Mario Habit.
- TORRES, M.E., 1984. Fijación de nitrógeno producida por diferentes inoculantes en *Prosopis chilensis*. Estado actual del conocimiento sobre *Prosopis tamarugo* Phil (439-443) Arica-Chile, 11-15 de junio de 1984, Editado por Mario Habit.

Tabla 1. Características físico-químicas de suelos (0-30 cm) donde crecen poblaciones nativas de *Prosopis* spp y *Prosopidastrum globosum*

Procedencia del suelo	N-org. (ppm)	P-disp. (ppmP ₂ O ₃)	C.E. µS/cm,25°C	pH	Textura	N-NO ₃ (ppm)
Asunción-Lavalle (Bajo dosel de <i>P. alpataco</i>)	1246	3.75	7530	7.92	Franco-arenoso	-
El Llaullín-Lavalle (bajo dosel de <i>P. argentina</i>)	518	12.25	700	7.65	Arenoso	-
Ñacuñán -(bajo dosel de <i>P. flexuosa</i>)	1148	9.00	1530	7.45	Arenoso	246
-(fuera dosel de <i>P. flexuosa</i>)	392	5.63	543	7.78	Arenoso	139
Ñacuñán-Asunción (mezcla) (bajo dosel de <i>P. flexuosa</i>)	1106	7.38	1870	7.30	Franco-arenoso	-
Valle Fértil (San Juan) (bajo dosel de <i>P. chilensis</i>)	1134	8.25	1750	7.80	Franco-arenoso	-
Asunción-Lavalle (bajo dosel de <i>P. globosum</i>)	252	7.75	1060	8.04	Arenoso	-

Tabla 2. Obtención de nódulos y porcentaje de nodulación en las siembras efectuadas de *Prosopepis* div. sp. y *Prosopidastrum globosum*
 +: nodulado, - no nodulado

Especies sembradas	Origen del suelo				
	Mezcla Ñac.+Asun. (b) <i>P. flexuosa</i>	Ñacuñan (f) <i>P. flexuosa</i>	Asunción (b) <i>P. alpataco</i>	El Llaullín (b) <i>P. argentina</i>	Valle Fértil (b) <i>P. chilensis</i>
<i>P. flexuosa</i>	+ (36%)	+ (42%)	+ (100%)		+ (75%)
<i>P. chilensis</i>	- (0%)	+ (50%)	- (0%)	+ (40%)	+ (100%)
<i>P. argentina</i>				+ (50%)	
<i>P. alpataco</i>			+ (33%)		
<i>P. globosum</i>			+ (100%)		