

## EFFECTO DE LA INOCULACION CON *Rhizobium loti* Y LA FERTILIZACION FOSFATADA SOBRE LA MICORRIZACION EN *Lotus tenuis*

Y E ANDREOLI, F LAICH, A M QUADRELLI DE ESCUDER, H ECHEVERRIA

Unidad Integrada FCA UNMdP-EEA INTA Balcarce C.C. 276 CP 7620 Balcarce, Argentina

### EFFECT OF INOCULATION WITH *RHIZOBIUM LOTI* AND PHOSPHORUS FERTILIZATION ON *LOTUS TENUIS* MYCORRHIZAL INFECTION

*Lotus tenuis* is a naturalized forage legume present in the Flooding Pampa (Argentina) where it can be found naturally mycorrhized and nodulated. To have a better understanding of vesicular-arbuscular-mycorrhizal (VAM) system, an experiment was carried out on *Lotus tenuis* to determine the effect of phosphate fertilizers and inoculation with *Rhizobium loti* on spontaneous VAM. The experiment was sown in the Flooding Pampa on a sodic soil as a randomized complete block design, with and without inoculation with a selected strain of *R. loti* and 0, 11 and 22 kg ha<sup>-1</sup> of phosphorus. Three plant samplings were made in which the VAM percentage was determined. Neither interaction between inoculation and phosphate levels, nor differences within inoculation treatments were detected on VAM percentage. The significantly lower percentage of VAM with increased levels of phosphorus showed that this nutrient diminished VAM-lotus symbiosis, even for the lowest amount of phosphorus added.

**Key words:** Vesicular - Arbuscular - Mycorrhizae - *Lotus tenuis* - Phosphorus - *Rhizobium loti*

### INTRODUCCION

*Lotus tenuis* es una leguminosa forrajera que se ha naturalizado en los suelos sódicos y anegadizos de la Pampa Deprimida Argentina, donde se la encuentra naturalmente nodulada y micorrizada (Picón 1984). Los suelos de esta región presentan un muy bajo nivel nativo de fósforo disponible (Darwich 1983) y se han observado para lotus importantes incrementos en la producción de materia seca como respuesta al agregado de dicho nutriente (Colabelli 1996).

Es conocido el rol de las micorrizas vesículo-arbusculares (MVA) para captar fósforo (Sanders, Tinker 1974, Harley 1975) y si bien la presencia de esta asociación ha sido descripta para estos suelos (Picón 1984), no ha sido suficientemente estudiada en lotus.

Una rápida instalación de la simbiosis rizobios-leguminosas logra en la planta un mejor estado energético, el que se traduce en mayor productividad de materia seca y nitrógeno absorbido. Se determinó que altas dosis de fósforo favorecen el establecimiento de esta simbiosis, pero disminuyen el porcentaje de arbuscúlos (Laich *et al.* 1993). Recientemente se ha reportado que pequeñas adiciones de fósforo incrementan inicialmente el porcentaje de infección radicular con MVA nativas (Mendoza, Gigli 1995). Considerando que dosis moderadas de fósforo favorecen el establecimiento del lotus (Colabelli 1996), y que de esta forma la planta estaría en mejores condiciones de albergar a ambos simbioses (*Rhizobium* y MVA), se hipotetiza que el agregado de fósforo no afectarían las relaciones micorríticas que se

dan naturalmente, colaborando a optimizar el sistema tripartito sin producir modificaciones que puedan afectar su sostenibilidad. Se realizó un ensayo a campo con el objetivo de evaluar el efecto del agregado de fósforo y la inoculación con *R. loti* sobre la micorrización espontánea en *L. tenuis*.

### MATERIALES Y METODOS

Se realizó un ensayo a campo en el partido de Maipú (Buenos Aires.-Argentina) utilizando un diseño en bloques completos al azar con un arreglo factorial 2x3 (con y sin inoculación y 0, 11 y 22 kg P ha<sup>-1</sup>). La siembra de lotus puro se realizó en líneas en el mes de abril de 1994 en un Natracuol, de pH 8,5, materia orgánica 25 g kg<sup>-1</sup> y fósforo 4,5 mg kg<sup>-1</sup>. Las parcelas tenían 6 metros de largo por 2 m de ancho con un área de muestreo destructivo de 1 m<sup>2</sup> y fueron separadas entre sí por caminos de 2 m sembrados con festuca, a fin de disminuir riesgos de contaminación. La inoculación se realizó a la siembra con una cepa seleccionada de *Rhizobium loti* 733 (Laboratorio de Microbiología, Unidad Integrada Balcarce-INTA).

Se efectuaron tres muestreos en los siguientes estadios fenológicos de la planta: cinco hojas verdaderas (julio), cuatro tallos/planta (septiembre) y seis tallos/planta (octubre). Se tomaron de cuatro a seis plantas al azar por parcela en el área destinada al muestreo, cuidando de retirar el sistema radicular de la planta lo más intacto posible. La clarificación y tinción de las raíces se realizó según la técnica propuesta por Phillips y Hayman (1970), con ligeras modificaciones para los tiempos de digestión y coloración. La digestión se realizó durante 15, 20 y 30 minutos y la coloración durante 3, 4 y 5 minutos para el primero, segundo y tercer muestreo, respectivamente, en función de las características del material procesado, para la cuantificación de la micorrización se utilizó el método de la cuadrícula de Giovannetti y Mosse (1980). En cada observación se registró la ausencia o presencia de estructuras micorríticas (hifas, arbuscúlos o vesícu-

las), determinando el porcentaje de micorrización M de la siguiente forma:

$$M = \frac{\text{número observ. con estructuras micorríticas}}{\text{número de observ. totales}} \times 100$$

Para cada tratamiento se evaluaron un mínimo de 200 intersecciones y los resultados fueron analizados con el sistema de Análisis Estadístico SAS. Se efectuó ANOVA del M con posterioridad al chequeo de los supuestos del mismo. En noviembre se efectuó un monitoreo del contenido de fósforo disponible en el suelo (Bray, Kurtz 1945) en la totalidad de las unidades experimentales.

## RESULTADOS Y DISCUSION

En todos los muestreos la variable M fue homocedástica y presentó distribución normal. En ninguno de los tres muestreos se detectó interacción entre los factores inoculación y fertilización fosfatada, y tampoco se observaron diferencias significativas dentro del factor inoculación para la variable en estudio (Tabla 1).

En el primer muestreo, el M en el tratamiento sin el agregado de fósforo fue superior ( $P < 0,05$ ) que los que recibieron 11 y 22 kg P ha<sup>-1</sup>, en el segundo se detectaron diferencias significativas a favor de los tratamientos con 0 y 11 kg ha<sup>-1</sup> y en el tercer muestreo se observaron diferencias significativas entre los tres niveles de fertilización (Tabla 1). La disminución en los M a medida que se aumentan

las dosis de fósforo aplicada al suelo, pone de manifiesto la represión que ejerce este elemento sobre la simbiosis MVA, hecho que ha sido reiteradamente citado en la literatura (Barea *et al.* 1983, Bolan *et al.* 1984). Con posterioridad a los muestreos de raíces se determinaron los niveles de fósforo disponible en el suelo (Tabla 1). Se observó que los mismos no difirieron entre tratamientos, lo que indicaría que las bajas dosis de fósforo aplicadas y la mayor absorción de las plantas de lotus en las parcelas fertilizadas (Laich *et al.* 1996), no permitieron observar diferencias en la concentración de fósforo en el suelo entre las distintas dosis agregadas.

A través de los distintos muestreos realizados se pudo observar que el M sin el agregado de fósforo se mantuvo prácticamente constante en el tiempo, mientras que para los tratamientos con 11 y 22 kg P ha<sup>-1</sup> fue disminuyendo gradualmente. Esto podría deberse a una mayor solubilización del fósforo (Tisdale *et al.* 1993) como consecuencia de las abundantes precipitaciones ocurridas durante los meses de septiembre y octubre (151 y 101 mm respectivamente). En estas condiciones las plantas fertilizadas podrían haber tomado el fósforo fácilmente de la solución del suelo y al lograr un elevado contenido del mismo en sus tejidos, reprimir el mecanismo de la micorrización que significa un mayor costo energético para el lotus. Sin embargo, cabe desta-

Tabla 1: Micorrización vesículo arbuscular en raíces de *Lotus tenuis* en el tiempo, en función de inoculación con *Rhizobium loti* y dosis de fósforo. Promedio de cuatro repeticiones.

Tratamientos		Micorrización vesículo arbuscular			Fósforo en el suelo
Inoculación	Dosis de P (kg ha <sup>-1</sup> )	Muestreo			
		Julio	Setiembre	Octubre	Noviembre
		Muestreo			
		Julio			Noviembre
		Setiembre			Noviembre
		Octubre			Noviembre
		%			(mg kg <sup>-1</sup> )
Inoculado	0	81,5	82,8	73,0	6,4
	11	73,6	78,3	66,5	7,8
	22	73,3	61,2	53,0	7,8
Sin inocular	0	82,2	82,9	83,5	7,7
	11	76,4	76,9	67,7	7,2
	22	77,2	60,6	50,3	6,2
Promedio	Inoculado	76,1	74,1	64,2	7,3
Promedio	Sin inocular	78,6	73,5	67,2	7,0
Promedio	0	81,8 a	82,9 a	78,2 a	7,0
Promedio	25	75,2 b	77,2 a	67,1 b	7,5
Promedio	50	75,3 b	60,9 b	51,7 c	7,0
Inoculación x Fósforo		ns	ns	ns	ns
Inoculación		ns	ns	ns	ns
Fósforo		*	**	**	ns

ns=no significativo, \* =  $P < 0,05$ , \*\* =  $P < 0,001$ , números seguidos por la misma letra dentro de cada columna no difieren significativamente a  $P > 0,05$ .

car que con la dosis más baja de fósforo se afectó el M, lo que indicaría que los mecanismos de represión de la micorrización se disparan con muy bajos niveles de dicho nutriente (Tabla 1). Estos resultados no concuerdan con los obtenidos en *L. tenuis* y *L. corniculatus* en suelos similares a los empleados en esta experiencia por Mendoza y Gigli (1995). En esta experiencia, realizada en condiciones de campo, la disminución en el M ya comentado se constituye en una evidencia de lo sensible que resulta este sistema biológico ante el agregado de bajas cantidades de fertilizantes fosfatados. Esto constituye un obstáculo al intentar mejorar la productividad del lotus, sin afectar las relaciones mutualísticas espontáneas, típicas en los sistemas agrícolas sustentables. En síntesis, no se determinó interacción entre el agregado de fósforo y la inoculación con *R. loti* ni se detectó efecto de este último sobre la micorrización de *L. tenuis*. La fertilización fosfatada incidió negativamente sobre la simbiosis lotus-MVA, aunque este efecto fue menor a bajas dosis de fósforo.

#### AGRADECIMIENTO

Trabajo financiado por la FCA de la UNMDP (subsidio para investigación N° 15/A027) y por la E.E.A INTA de Balcarce.

#### REFERENCIAS

- Barea J M, Azcon-Aguilar C, Azcon R. 1983. Efecto de la interacción de fertilizantes solubles de fósforo y micorrizas sobre la nodulación, micorrización crecimiento y nutrición de la alfalfa (*Medicago sativa* L.). Ciencia del Suelo. 1:39-42
- Bray R H, Kurtz L T. 1945. Determination of total, organic and available form of phosphorus in soil. Soil Sci. 59:360-361
- Bolan N S, Robson A D, Barrow N J, Aylmore L A G. 1984. Specific activity of phosphorus in mycorrhizal and non mycorrhizal plants in relation to the availability of phosphorus to plants. Soil Biol. Biochem. 16:299-304
- Colabelli M. 1996. Intersiembr de especies forrajeras en la Pampa Deprimida Bonaerense. Boletín Técnico 137. Est. Exp. Agrop. INTA Balcarce. 21 p.
- Darwich N A. 1983. Niveles de fósforo asimilable en los suelos pampeanos. IDIA enero-abril: 1-5: 409-412
- Giovannetti M, Mosse B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizae infection in roots. New Phytologist 84:489-500
- Harley J L. 1975. Problems of mycotrophy. En Sanders, F. E., Mosse, B. and Tinker, P. B. Ed. Endomycorrhizal. Academic Press, London, pp 1-22
- Laich F, Quadrelli de Escuder A M, Andreoli Y E, Picon M G, Echeverría H. 1993. Respuesta de *Lotus tenuis* a la inoculación con *Rhizobium loti* y a la fertilización con fósforo. XIV Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo: 55-56
- Laich F, Quadrelli de Escuder A M, Andreoli Y E, Echeverría H. 1996. *Lotus tenuis*: inoculación y fertilización fosfatada en un suelo de la Pampa Deprimida. XV Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo: 111-112.
- Mendoza R, Gigli S. 1995. Relative effectiveness of phosphorus on narrow-leaf and broadleaf birdsfoot trefoil growth and the effect of added phosphorus on vesicular arbuscular mycorrhizal infection. J. Plant Nutrition 18:1483-1494
- Phillips J M, Hayman D S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Trans. Br. Mycol. Soc. 55:158-161
- Picon M G. 1984. Relevamiento de micorrizas vesicular-arbusculares en especies silvestres del Partido de Balcarce. Efecto del agregado de fósforo sobre el grado de micorrización espontánea en *Lolium perenne*. Tesis Lic. Cs. Biol. FCEyN UNMDP
- Sanders F E, Tinker P B. 1971. Mechanism of absorption of phosphate from soil by Endogone mycorrhizal. Nature. 233:278-279
- Tisdale S L, Nelson W L, Beaton J D, Havlin J L. 1993. Soil Fertility and Fertilizers. Fifth edition. New York, etc. Macmillan Publishing Company. 634p.