

## COLECCION DE RHIZOBIOS DE *Prosopis* ARBOREOS EN LA ZONA SEMIARIDA DE LA PROVINCIA DE CORDOBA (ARGENTINA)

M ACOSTA, L OLIVA, A ABRIL

Microbiología Agrícola, Facultad de Ciencias Agropecuarias, U.N. de Córdoba, Casilla de Correo 509, 5000 Córdoba, Argentina

### COLLECTION OF RHIZOBIO OF ARBOREAL *Prosopis* IN THE SEMIARID REGION OF CORDOBA PROVINCE (ARGENTINA)

*Prosopis chilensis* and *Prosopis flexuosa* are conspicuous components of the arboreal stratum in arid and semiarid areas. There is no information concerning the characteristics of native *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* strains associated with them of the province of Córdoba. Low *Rhizobium* density in soil under canopies of both species was determined by counting in plant. Biological isolations from soil were realised and sufficiently competitive strains in infectivity and effectivity were selected by means of the following parameters: nodule number, dry weight and nitrogen percentage. *Prosopis chilensis* strains with high infecting and nitrogen fixing capacity were obtained. No effective strains were found in association with *Prosopis flexuosa*.

**Key word:** *Rhizobium-Prosopis*-Semiarid Region

### INTRODUCCION

En los ecosistemas áridos y semiáridos, el principal factor limitante que se menciona es el agua; sin embargo, la baja disponibilidad de nitrógeno y materia orgánica en el suelo revisten importancia similar (Felker, Bandurski 1979, West, Klemmedson 1978).

Por sus características las leguminosas arbóreas son componentes importantes de estos ecosistemas, mencionándose diferentes especies de *Prosopis* como ejemplos muy frecuentes. (Felker, Bandurki 1979, Felker, Clark 1980).

Entre sus numerosas ventajas se encuentra la capacidad de fijar nitrógeno debida a la relación simbiótica con bacterias del género *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (Allen, Allen 1981). Esta característica, unida a su adaptación fisiológica para soportar stress hídrico y salinidad, además de la habilidad de desarrollar un sistema radical profundo, favorece su sobrevivencia y productividad en estas regiones marginales.

Si bien la fijación biológica de nitrógeno ha sido cuestionada debido a la escasa nodulación observada cerca de la superficie (Farnsworth *et al.* 1978), estudios posteriores indican un aporte en verdad significativo (Shearer *et al.* 1983; Hoegberg 1986).

Hay evidencias de que en los suelos bajo la canopia de estos árboles, se produce mayor acumulación de nitrógeno y fósforo extraíbles que en los que se encuentran bajo otras especies arbóreas no leguminosas y más aún, que en los espacios entre árboles (Virginia, Jarrell 1983; Hang, Sereno 1989; Mazzarino *et al.* 1991). Esa distribución diferencial podría deberse a la actividad de

microorganismos simbiotes en las raíces de los *Prosopis* arbóreos.

Se conoce que la densidad de rizobios es mayor en zonas profundas del suelo (4-5m) con predominio de cepas de crecimiento lento; en los horizontes superiores (0,60m) las cepas de crecimiento rápido y lento se encuentran en igual proporción (Virginia *et al.* 1987; Jenkins *et al.* 1987, 1988).

Se cita la presencia de raíces noduladas en individuos de mezquite (*Prosopis glandulosa* Torr.) en ecosistemas desérticos (Jenkins *et al.* 1987, 1988, 1989); habiéndose demostrado también que las especies de *Prosopis* son infectadas por una variedad de cepas de *Rhizobium-Bradyrhizobium* marcadamente promiscuas (Allen, Allen 1981; Olivares *et al.* 1988).

Muchas de las valiosas características de estos árboles dependen del establecimiento de una simbiosis efectiva y como afirma Halliday (1984), el comportamiento de los mismos, introducidos en nuevos ambientes, depende de la reconstitución plena de las asociaciones simbióticas que contribuyen a su nutrición. Esto señala la importancia del conocimiento de la fisiología y ecología de los microorganismos simbiotes, especialmente en lo que se refiere a la evaluación de infectividad y efectividad de las poblaciones nativas.

En especies de *Prosopis* que crecen en la zona semiárida de la Pcia. de Córdoba, no se detectaron nódulos explorando hasta 1,5m de profundidad; no obstante el uso de esos suelos en vivero produjo nodulación y permitió el aislamiento de cepas autóctonas para *P. alba*, *P. chilensis* y *P. flexuosa* (Oliva, Gonzalez 1987).

No habiendo estudios sobre las características de

cepas nativas existentes en la zona mencionada se plantearon los siguientes objetivos: a determinar la presencia y densidad de *Rhizobium* sp. que realicen simbiosis con el género *Prosopis* en los suelos de la zona; b aislar y seleccionar cepas nativas eficientes.

## MATERIALES Y METODOS

La zona de estudio fue la Reserva Forestal y Parque Provincial Chancaní, situado al oeste de la Sierra de Pocho, en la Pcia. de Cba., representativa del Chaco Arido Argentino. Las temperaturas medias máximas y mínimas establecidas para invierno y verano son respectivamente: 21,9-1,1 y 34,2-14°C y las precipitaciones concentradas en los meses estivales, varían de 300 a 600 mm anuales, con un índice de evapotranspiración potencial de Thornthwaite de -20.

El suelo corresponde según Soil Taxonomy, 1975, a un Ustifluvent mólico: limosa-gruesa, mixta, térmica. (Serie Los Pocitos I). Es decir son suelos con un perfil profundo (A1-AC-IIC) con estratificación poco marcada; pH neutro o ligeramente alcalino. El horizonte superficial poco profundo (0-10 cm.) es rico en materia orgánica (Karlin, Díaz 1984). Constituye un ecosistema forestal donde coexisten *Aspidosperma quebracho blanco*, *Prosopis flexuosa* y *Prosopis chilensis* como dominantes del estrato arbóreo.

Se tomaron muestras de suelo en dos oportunidades bajo rodales de *Prosopis flexuosa* y *P. chilensis*, hasta una profundidad de 0,60 m con 5 repeticiones por especie, las que se secaron a temperatura ambiente durante 24 h y se conservaron a 4°C hasta su procesamiento. Para la cuantificación de las bacterias presentes en el suelo, se usó la técnica de recuento en planta por el número más probable (Vincent 1970). Se desinfectaron y pregerminaron semillas escarificadas de cada especie de *Prosopis* según la muestra de suelo a analizar. La siembra se realizó en bolsas plásticas de 16 x 6 cm con vermiculita tamizada por malla 1 mm y se inoculó a los 7 días de la siembra con diluciones de suelo en solución fisiológica (Garvin *et al.* 1983). El recuento se realizó a los 75 días de la siembra, considerando positivas las bolsas que presentaban nódulos. Para el aislamiento de cepas fueron escarificadas semillas de *P. chilensis* y *P. flexuosa* fueron escarificadas, desinfectadas, pregerminadas y sembradas en una mezcla de suelo y arena estéril (1:1) y colocadas en tubos plásticos de 40 x 10 cm. Las plantas se mantuvieron en condiciones semicontroladas con luz natural y riego con agua destilada. A los 60 días se extrajeron las raíces y a partir de los nódulos formados se obtuvieron cepas en cultivo puro por macerado y estriado en cajas de Petri con medio yem. con y sin  $\text{CaCO}_3$  (Vincent 1970).

Las cepas así obtenidas fueron evaluadas en infectividad y efectividad sobre la especie de *Prosopis* de la que fue aislada. El ensayo se realizó en cámara de cultivo a 28°C y 12 h de luz (3500 lux); se sembraron semillas previamente escarificadas, desinfectadas y pregerminadas en Jarras de Leonard con arena estéril, realizándose tantos tratamientos como cepas obtenidas más dos testigos sin inocular (con y sin nitrógeno en la solución de riego); en todos los casos con seis repeticiones (Vincent 1970). Los plantines fueron inoculados a los 7 y 30 días de la siembra con 1 ml del cultivo en medio líquido en fase exponencial ( $10^8$  bacterias  $\text{ml}^{-1}$ ) y regados por capilaridad con solución de Mc Knight libre de nitrógeno.

A los 75 días se determinaron los siguientes parámetros: número de nódulos, número de plantas noduladas, peso seco y contenido de nitrógeno de la parte aérea. Los datos obtenidos fueron evaluados estadísticamente mediante análisis de la varianza y las diferencias entre medias analizadas por la prueba de Duncan (Beyer 1968).

## RESULTADOS Y DISCUSION

En dos siembras realizadas con suelo del primer muestreo se obtuvieron resultados negativos, ya que la presencia de escasos nódulos muy pequeños no justificó el desarrollo de las tareas previstas.

Se trabajó sobre el segundo muestreo obtenido en la época estival, ya que las condiciones hídricas del suelo parecen determinantes para recuentos y aislamientos de los rizobios (Fuhrmann *et al.* 1986; Jenkins 1988; Miettinen *et al.* 1988).

La población de *Rhizobium* correspondiente a suelos provenientes de canopeos de *P. flexuosa* y *P. chilensis* fue 28,3 y 600 bacterias por gramo de suelo, respectivamente. Si se consideran los datos bibliográficos referidos a otras zonas para diferentes leguminosas, la densidad fue baja en ambas especies (Jenkins *et al.* 1988, 1989; Abril 1989). Este hecho podría favorecer la infección por parte de cepas eficientes introducidas mediante inoculación ya que como afirman Brockwell *et al.* (1988), los inoculantes tienen poco impacto en la nodulación cuando la población presente en el suelo con anterioridad a la misma, es superior a 1000 por gramo de suelo.

De las plantas crecidas en el suelo muestreado se obtuvieron nódulos, aislándose a partir de ellos cepas para *P. flexuosa* y *P. chilensis* que crecieron en medio Yem con  $\text{CaCO}_3$  en 48 h.; es decir, son cepas consideradas de crecimiento rápido. Los resultados de las pruebas de efectividad se consignan en la Tabla 1. Las diferencias fueron notorias sólo para *P. chilensis*. Las cepas Pr 11 y Pr 15 no presentaron diferencias significativas con el testigo fertilizado, lo que manifiesta la eficiencia de la

Tabla N° 1: Nodulación y eficiencia de cepas de *Rhizobium* en *P. flexuosa* y *P. chilensis*

Tratamiento	Nº nódulos por planta	Nº plantas noduladas	Peso Seco (g)	Nt (%)
<i>P. flexuosa</i>				
T c/N	0,0	0,0	0,254 a	4,83 a
T s/N	0,0	0,0	0,159 b	3,08 c
Cepa 6	1	1	0,167 b	3,71 b
Cepa 8	1,3	1	0,161 b	3,69 b
Cepa 9	6,6	6	0,107 c	2,66 d
Cepa 1	06,1	4	0,075 c	3,13 c
<i>P. chilensis</i>				
T c/N	0,0	0,0	1,249 a	5,45 a
T s/N	0,0	0,0	0,681 b	4,03 c
Cepa 7	11,3	6	0,580 b	4,39 b
Cepa 11	12	6	0,642 b	5,38 a
Cepa 12	13,5	6	0,704 b	4,62 b
Cepa 15	9,6	6	0,828 b	5,54 a

Los tratamientos seguidos por la misma letra no difieren significativamente ( $P < 0,05$ )

fijación. Si bien la simbiosis con estas cepas no aumentó la biomasa en los primeros estadios del desarrollo vegetativo del plantín, su aporte al contenido de nitrógeno en los tejidos podría significar una mayor resistencia al transplante.

Según Olivares *et al.* (1988), los componentes arbóreos son quienes aprovechan más eficientemente las limitadas condiciones climáticas y edáficas en las zonas áridas y semiáridas. Deben por lo tanto, considerarse particularmente en las planificaciones destinadas a la prevención de la degradación de estos frágiles ecosistemas o a su recuperación. Considerando las dos especies de leguminosas arbóreas que crecen en la zona en estudio, se prefiere a *P. chilensis*, para este propósito, debido a su mayor velocidad de crecimiento y aprovechamiento económico, con respecto a *P. flexuosa* (Pietrarelli 1991).

De acuerdo a los resultados obtenidos en laboratorio, los suelos en estudio están habitados por cepas de diversas características simbióticas (Tabla 1). La promiscuidad que caracteriza la infección en *Prosopis sp.* representa un obstáculo en cuanto a la fijación de niveles adecuados de nitrógeno en el campo, ya que la competencia por los sitios de infección de cepas inefectivas en *P. chilensis*, ha sido demostrada (Olivares *et al.* 1988). De acuerdo a ello, si las cepas seleccionadas en condiciones controladas se comportan a campo de la misma manera, es de esperar que la inoculación redunde en beneficios para el sistema suelo-planta.

## REFERENCIAS

- Abril A. 1989. Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas subtropicales consociadas en el Centro Norte de la Pcia. de Córdoba. XI. Reunión del grupo técnico regional del Cono Sur. La Rioja, Argentina.
- Allen O, Allen E. 1981. The leguminosae, a source book of characteristics, uses and nodulation. The University of Wisconsin Press-Madison.
- Beyer W. 1968. Handbook of tables for probability and statistics. 2ed. 368-378. Chemical Rubber, Cleveland.
- Brockwell J, Herridge D, Morthorpe L, Roughley L. 1988. Numerical effects of *Rhizobium* population on Legume symbiosis. In: D.P. Beeck and L.A. Materon (Ed) Nitrogen Fixation by legumes in Mediterranean Agriculture. ICARDA. p.179-192.
- Farnsworth R B, Rommey E M, Wallace A. 1978. Nitrogen fixation by microflora-higher plant associations in arid to semiarid environments. In N.E. West and J.J. Skujins (Ed) Nitrogen in desert ecosystems. Dowden, Hutchinson & Ross, Stroudsburg, PA. p.17-19.
- Felker P, Bandurski R S. 1979. Uses and potential uses of leguminous trees for minimal energy input agriculture. Economic Botany 37 : 172-184.
- Felker P, Clark P R. 1980. Nitrogen fixation (acetylene reduction) and cross inoculation in 12 *Prosopis* (mesquite) species. Plant and Soil 57: 177-186.
- Fuhrmann J, Davex C B, Wollum A G. 1986. Desiccation tolerance of clover rhizobia in sterile soils. Soil Sci. Soc. Am. J. 50: 639-644.
- Garvin S, Lindemann W C. 1983. A new plant growth technique for the most-probable-number estimation of *Rhizobium*. Soil Sci. Soc. Am. J. 47: 604-606.
- Halliday J. 1984. Integrated approach to nitrogen fixing tree germplasm development. Pesq. Agrop. Bras. 19 : 91 - 117.
- Hang S, Sereno R. 1989. Efecto de la vegetación arbórea sobre el comportamiento del fósforo en el Chaco Arido. XII Reun. Arg. de la C. del Suelo. Corrientes, Argentina.
- Hoegberg P. 1986. Nitrogen-fixation and nutrient relations in savanna woodland trees (Tanzania) J. Appl. Ecol. 23: 675-688
- Jenkins M B, Virginia R A, Jarrel W M . 1987. Rhizobial ecology of the woody legume Mesquite (*Prosopis glandulosa*) in the Sonoran Desert. Appl. Environ. Microbiol. 53: 36-40.
- Jenkins M B, Virginia R A, Jarrel W M. 1988. Depth distribution and seasonal population of Mesquite-Nodulating Rhizobia in Warm Desert ecosystems. Soil Sci. Soc. Am. J. 52: 1644-1650.
- Jenkins M B, Virginia R A, Jarrel W M. 1989. Ecology of Fast-Growing and Slow-Growing Mesquite-Nodulating Rhizobia in Chihuahuan and Sonoran Desert ecosystems. Soil Sci. Soc. Am. J. 53: 543-549.
- Karlin U, Diaz R. 1984. Potencialidad y manejo de algarrobos en el árido subtropical argentino. SECYT. Programa Nac. Rec. Nat. Renovables. Proyecto especial OEA N°53.
- Mazzarino M J, Oliva L, Nuñez A, Nuñez G. 1991. Nitrogen mineralization and soil fertility in the dry Chaco-Ecosystem (Argentino). Soil.Sci.Soc.Am.J. (en prensa).
- Miettinen P, Luvekanen O, Johansson S, Eklund E, Mulatya J. 1988. *Rhizobium* nodulation in *Prosopis juliflora* seedlings at different irrigation levels in eastern Kenya. Plant and Soil. 112: 233-238.
- Oliva L, Gonzalez C. 1987. La simbiosis *Rhizobium-Prosopis*: aislamiento y selección de cepas. I Jornadas Nac. de Zonas Áridas y Semiáridas. Santiago del Estero-Argentina.
- Olivares J, Herrera M A, Bedmar E. 1988. Woody legumes in Arid and Semi-arid zones the *Rhizobium-Prosopis chilensis* symbiosis. p 65-71 In D.P. Berek and L.A. Materon (ed) Nitrogen Fixation by Legumes in Mediterranean Agriculture. ICARDA.
- Pietrarelli L. 1990. Análisis de crecimiento y producción de poblaciones naturales de *Prosopis afflexuosa* y *Prosopis affchilensis* en diferentes densidades. Informe Científico Proyecto CONICOR.
- Shearer G, Kohl D, Virginia R, Bryan B, Skeeters J, Nilsen E, Sharifi M, Rundel P. 1983. Estimates of N<sub>2</sub>-fixation from variation in the natural abundance of <sup>15</sup>N in Sonoran Desert ecosystems. Oecologia 56: 365-373.
- Vincent J M. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. IEP handbook 15, Blackwell Scientific Publ. Oxford, England 164 p.
- Virginia R A, Jarrel W M. 1983. Soil properties in a mesquite dominated Sonoran Desert ecosystem. J. Soil Sci. Soc. Am. 47: 38-144.
- Virginia R A, Jenkins M B, Jarrel W M. 1987. Depth of root symbiont occurrence in soil. Biol. Fert. Soils 2: 127-130.
- West N, Klemmedson J O . 1978. Structural distribution of nitrogen in desert ecosystems. p. 1-16. In N.E. West and J. Skujins (Ed) Nitrogen in desert ecosystems. Dowden, Hutchinson and Ross, Stroudsburg, P.A.