

EFFECTO DE LA INTERACCION DE FERTILIZANTES SOLUBLES DE P Y MICORRIZAS SOBRE LA NODULACION, MICORRIZACION, CRECIMIENTO Y NUTRICION DE LA ALFALFA (*Medicago sativa* L.)

J. M. Barea, C. Azcón-Aguilar y R. Azcón

Unidad de Microbiología. Estación Experimental del Zaidín (C.S.I.C.). Granada, España

RESUMEN

Se estudia el efecto de la interacción de las micorrizas (se utilizó el hongo *Glomus mosseae*) y dosis crecientes de fertilizante soluble de fósforo (niveles equivalentes a 0, 20, 35, 50, 80 y 110 kg ha⁻¹ de P) sobre el desarrollo de la alfalfa (*Medicago sativa* L.) y su nodulación por *Rhizobium meliloti* en un suelo fijador de fosfato.

La alfalfa mostró un apreciable "grado de dependencia relativa a las micorrizas" para lograr su óptimo crecimiento. Dosis de fosfato superiores a la óptima (35 kg ha⁻¹) afectaron negativamente la nodulación, micorrización y nutrición de esta forrajera.

Palabras claves: Micorrizas vesículo-arbusculares, *Glomus mosseae*, *Rhizobium meliloti*, *Medicago sativa* (alfalfa), Nodulación, Curvas de respuesta al fósforo.

EFFECT OF INTERACTIONS BETWEEN A SOLUBLE P FERTILIZER AND MYCORRHIZAL FUNGI ON NODULATION, MYCORRHIZA FORMATION, GROWTH AND NUTRITION OF ALFALFA (*Medicago sativa* L.)

ABSTRACT

The interactions between a VA mycorrhizal fungus (*Glomus mosseae*) and increasing doses of soluble P fertilizers (equivalents to 0, 20, 35, 50 and 110 kg ha⁻¹ of P) on the development of alfalfa (*Medicago sativa* L.) and its nodulation by *Rhizobium meliloti* were studied on a phosphate-fixing agricultural soil.

The test plant showed a noteworthy degree of relative mycorrhizal dependency to reach its optimal growth. Phosphate additions higher than the optimal (35 kg ha⁻¹) were detrimental for the suitable nodulation, mycorrhiza formation, growth and nutrient uptake of this forage legume.

Key words: Vesicular-arbuscular mycorrhiza, *Glomus mosseae*, *Rhizobium meliloti*, *Medicago sativa* (alfalfa/lucerne), Nodulation, Phosphate response curves.

INTRODUCCION

La gran mayoría de las plantas existentes sobre la corteza terrestre son susceptibles de formar micorrizas, simbiosis entre ciertos hongos del suelo en las raíces. Actualmente se acepta que las micorrizas desempeñan un papel importante en productividad vegetal (Smith, 1980; Azcón-Aguilar y Barea, 1980; Ocampo, 1980;

Mosse y Hayman, 1981) lo cual obedece, en gran medida, a que permiten a la planta utilizar más eficazmente el fosfato propio de un suelo o el adicionado como fertilizante (Tinker, 1980; Rhodes y Gerdmann, 1980; Gianinazzi-Pearson y Gianinazzi, 1981).

La interacción entre fertilizantes fosforados x micorrizas ha sido objeto de diversos estudios (Mosse, 1973; Menge *et al.*, 1978; Azcón *et al.*, 1978; Roldan-Fajardo *et al.*, 1982), de los cuales se han obtenido

conclusiones de interés tanto básico como aplicado. Así, se sabe que:

- a) Las plantas *dependen* en mayor o menor grado de la condición de estar micorrizadas para captar fosfato del suelo. Sin embargo, tal "grado de dependencia" es afectado, a su vez, por el nivel de fosfato asimilable presente en el medio.
- b) Dosis de fosfato, a veces usadas en la práctica agrícola, influyen negativamente en la formación y operatividad de las micorrizas.

Consecuentemente, se puede afirmar que en todo sistema Suelo-Planta-Hongo existe un nivel de fosfato adecuado que permite la optimización de los beneficios que las plantas puedan obtener de esta simbiosis, manteniendo un consumo mínimo de fertilizantes. De ello se deduce la importancia de conocer las curvas respuesta al fósforo de la Planta en un determinado Suelo, y como la micorrización afecta, y es afectada, por las dosis crecientes de fosfato. Estas investigaciones adquieren una importancia adicional en el caso de las Leguminosas, plantas con una gran demanda de fosfato. Ello deriva, como es sabido, de que la nodulación de las raíces por su *Rhizobium* específico y el subsiguiente proceso de fijación simbiótica de N_2 atmosférico, son eventos bioquímicos consumidores de energía (ATP). Ensayos que utilizan trébol subterráneo (Delorenzini *et al.*, 1979), trébol blanco (Powell, 1980) o soja (Asimi *et al.*, 1980) son ejemplos de este tipo de estudios.

El presente trabajo tiene por objeto investigar la interacción Dosis de fosfato x Micorrizas Vesículo-Arbusculares sobre el sistema *Rhizobium meliloti* - *Medicago sativa* (alfalfa), en un suelo fijador de fosfato. Se utiliza un modelo experimental sencillo y fácilmente reproducible pero que permita investigar aspectos básicos de tales interacciones así como evaluar el efecto de los mismos sobre el crecimiento y nutrición de esta forrajera.

MATERIALES Y METODOS

Suelo

Se utilizó un suelo representativo de una zona de interés agrícola en la provincia de Granada (España), suelo N° 10, cuyas características analíticas se describieron anteriormente (Azcón-Aguilar *et al.*, 1982). Es un suelo calcáreo, neutro-alcalino, con un bajo contenido en P asimilable aunque el P total que posee es elevado.

El suelo se sometió a un proceso de tinalización que elimina, momentáneamente, sus microorganismos

aunque estos se reinoculan a continuación mediante un filtrado del mismo suelo en el que se retienen los propágulos de micorrizas. Esta operación permite disponer de un suelo con su actividad biológica propia y controles "micorriza (-)" adecuados, para investigar los efectos de la micorrización en los casos en la que esta se provoca.

Para ensayos en macetas este suelo se diluyó con arena de cuarzo libre de nutrientes en proporción 3 partes de suelo y 1 de arena.

Adiciones de fertilizante soluble de P

Se utilizó PO_4H_2K que fue adicionado a las dosis de 0, 150, 250, 370, 565 y 760 $mg\ kg^{-1}$ lo que equivale a aplicaciones de 0, 20, 35, 50, 80 y 110 $kg\ ha^{-1}$, calculadas en base a superficies. Las alicuotas de suelo que recibieron estos 6 tratamientos se dejaron equilibrar durante 2 semanas con humedad adecuada (capacidad de campo) y, en el momento de su distribución en macetas (10 repeticiones por dosis de fosfato). Se analizó el P asimilable (Olsen). Dado la capacidad de retención de fosfato del suelo ($\cong 60\%$), el contenido en P soluble en $CO_3\ HNa\ 0,5\ M$, pH 8,5 (olsen *et al.*, 1954) en los distintos tratamiento fue: 4.5, 10, 21, 32.5, 44 y 68 $mg\ kg^{-1}$.

Plantas, inóculos microbianos y condiciones de cultivo

Tres plántulas de alfalfa (*Medicago sativa* L. cv. Aragón) de dos días se transplantaron a macetas que contenían 330 g del suelo. En este momento se adicionaron 10 ml del inóculo de *Rhizobium meliloti* estirpe 203, aislado en este laboratorio. El inóculo se obtuvo en medio Allen (1957) en cultivo en agitación durante 2 días a 28°C.

Cinco macetas, de las 10 repeticiones preparadas con cada dosis de fosfato, recibieron un inóculo de micorriza consistente en alicuotas de rizosfera procedentes de un cultivo "stock" de alfalfa micorrizada con el endofito del tipo de espora de "Vacuolas Amarillas" (YV) (Mosse y Bowen, 1968) correspondiente a *Glomus mosseae* (Gerdemann y Trappe, 1974).

Las plantas se cultivaron en invernadero durante 8 semanas a 19-25°C, se les mantuvo la humedad por subrigación y se alimentaron con la solución de Long Ashton (Hewitt, 1952) aplicada a 5 ml maceta⁻¹ semana⁻¹, desprovista de fósforo y nitrógeno.

Determinaciones

Al cosechar se determinó el peso seco de la parte aérea de las plantas y el contenido en N y P de las mismas.

La nodulación se estimó macroscópicamente si-

conclusiones de interés tanto básico como aplicado. Así, se sabe que:

- a) Las plantas *dependen* en mayor o menor grado de la condición de estar micorrizadas para captar fosfato del suelo. Sin embargo, tal "grado de dependencia" es afectado, a su vez, por el nivel de fosfato asimilable presente en el medio.
- b) Dosis de fosfato, a veces usadas en la práctica agrícola, influyen negativamente en la formación y operatividad de las micorrizas.

Consecuentemente, se puede afirmar que en todo sistema Suelo-Planta-Hongo existe un nivel de fosfato adecuado que permite la optimización de los beneficios que las plantas puedan obtener de esta simbiosis, manteniendo un consumo mínimo de fertilizantes. De ello se deduce la importancia de conocer las curvas respuesta al fósforo de la Planta en un determinado Suelo, y como la micorrización afecta, y es afectada, por las dosis crecientes de fosfato. Estas investigaciones adquieren una importancia adicional en el caso de las Leguminosas, plantas con una gran demanda de fosfato. Ello deriva, como es sabido, de que la nodulación de las raíces por su *Rhizobium* específico y el subsiguiente proceso de fijación simbiótica de N_2 atmosférico, son eventos bioquímicos consumidores de energía (ATP). Ensayos que utilizan trébol subterráneo (Delorenzini *et al.*, 1979), trébol blanco (Powell, 1980) o soja (Asimi *et al.*, 1980) son ejemplos de este tipo de estudios.

El presente trabajo tiene por objeto investigar la interacción Dosis de fosfato x Micorrizas Vesículo-Arbusculares sobre el sistema *Rhizobium meliloti* - *Medicago sativa* (alfalfa), en un suelo fijador de fosfato. Se utiliza un modelo experimental sencillo y fácilmente reproducible pero que permita investigar aspectos básicos de tales interacciones así como evaluar el efecto de los mismos sobre el crecimiento y nutrición de esta forrajera.

MATERIALES Y METODOS

Suelo

Se utilizó un suelo representativo de una zona de interés agrícola en la provincia de Granada (España), suelo N° 10, cuyas características analíticas se describieron anteriormente (Azcón-Aguilar *et al.*, 1982). Es un suelo calcáreo, neutro-alcalino, con un bajo contenido en P asimilable aunque el P total que posee es elevado.

El suelo se sometió a un proceso de tinalización que elimina, momentáneamente, sus microorganismos

aunque estos se reinoculan a continuación mediante un filtrado del mismo suelo en el que se retienen los propágulos de micorrizas. Esta operación permite disponer de un suelo con su actividad biológica propia y controles "micorriza (-)" adecuados, para investigar los efectos de la micorrización en los casos en la que esta se provoca.

Para ensayos en macetas este suelo se diluyó con arena de cuarzo libre de nutrientes en proporción 3 partes de suelo y 1 de arena.

Adiciones de fertilizante soluble de P

Se utilizó PO_4H_2K que fue adicionado a las dosis de 0, 150, 250, 370, 565 y 760 $mg\ kg^{-1}$ lo que equivale a aplicaciones de 0, 20, 35, 50, 80 y 110 $kg\ ha^{-1}$, calculadas en base a superficies. Las alicuotas de suelo que recibieron estos 6 tratamientos se dejaron equilibrar durante 2 semanas con humedad adecuada (capacidad de campo) y, en el momento de su distribución en macetas (10 repeticiones por dosis de fosfato). Se analizó el P asimilable (Olsen). Dado la capacidad de retención de fosfato del suelo ($\cong 60\%$), el contenido en P soluble en $CO_3\ HNa\ 0,5\ M$, pH 8,5 (olsen *et al.*, 1954) en los distintos tratamiento fue: 4.5, 10, 21, 32.5, 44 y 68 $mg\ kg^{-1}$.

Plantas, inóculos microbianos y condiciones de cultivo

Tres plántulas de alfalfa (*Medicago sativa* L. cv. Aragón) de dos días se transplantaron a macetas que contenían 330 g del suelo. En este momento se adicionaron 10 ml del inóculo de *Rhizobium meliloti* estirpe 203, aislado en este laboratorio. El inóculo se obtuvo en medio Allen (1957) en cultivo en agitación durante 2 días a 28°C.

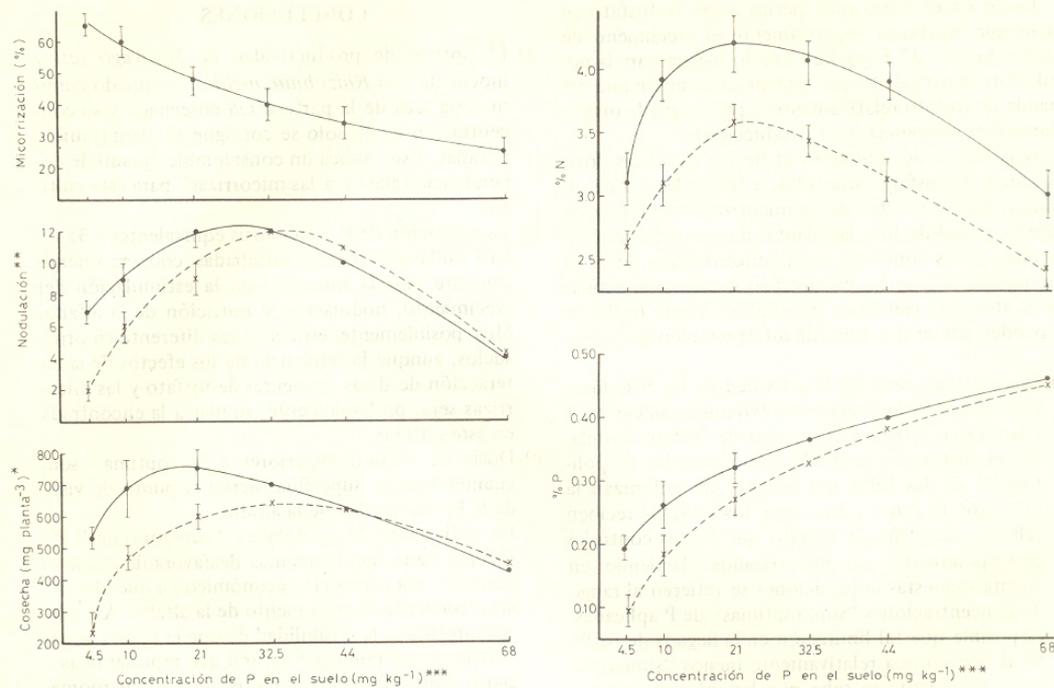
Cinco macetas, de las 10 repeticiones preparadas con cada dosis de fosfato, recibieron un inóculo de micorriza consistente en alicuotas de rizosfera procedentes de un cultivo "stock" de alfalfa micorrizada con el endofito del tipo de espora de "Vacuolas Amarillas" (YV) (Mosse y Bowen, 1968) correspondiente a *Glomus mosseae* (Gerdemann y Trappe, 1974).

Las plantas se cultivaron en invernadero durante 8 semanas a 19-25°C, se les mantuvo la humedad por subrigación y se alimentaron con la solución de Long Ashton (Hewitt, 1952) aplicada a 5 ml maceta⁻¹ semana⁻¹, desprovista de fósforo y nitrógeno.

Determinaciones

Al cosechar se determinó el peso seco de la parte aérea de las plantas y el contenido en N y P de las mismas.

La nodulación se estimó macroscópicamente si-



guiendo criterios de tamaño, número, disposición y color de los nódulos puntuando en una escala arbitraria entre 0 (sin nódulos) y 12 (abundantes nódulos de calidad).

La micorrización se estimó examinando microscópicamente muestras de raíz teñidas (Phillips y Hayman, 1970) siguiendo el método de las intercesiones (Giovannetti y Mosse, 1980).

RESULTADOS

Es evidente (Figura 1) que el aporte de cantidades crecientes de fosfato soluble afecta negativamente el proceso de micorrización. Se aprecia una interacción beneficiosa para la planta de las micorrizas con dosis de fosfato inferiores a 21 ppm en suelo, lo que equivale a la aplicación de 35 kg ha⁻¹ del elemento (como P). Dosis superiores son supraóptimas para el crecimiento y nodulación de la alfalfa.

Los datos resumidos en la Figura 2 se refieren al contenido en nutrientes en la parte aérea de las plantas, precisamente la utilizada en alimentación animal. La concentración de P incrementa con la dosis de fertilizantes aportado, mientras que la de N muestra una tendencia reflejo de la que la interacción de micorrizas y fosfato ejerció sobre el crecimiento y nodulación.

DISCUSION

Los resultados obtenidos confirman, en cuanto a sus tendencias generales, conclusiones obtenidas en otras situaciones (planta-suelo), matizan aspectos concretos referentes a Leguminosas y definen datos específicos para el sistema estudiado (*Rhizobium meliloti-Medicago sativa*, desarrollado en un suelo fijador de fosfato).

En efecto, es evidente que la micorrización estimula el crecimiento y nodulación de la alfalfa a niveles bajos e intermedios de fosfato en el suelo. Concretamente, la máxima cosecha en cuanto a peso y riqueza en N corresponde a plantas micorrizadas. De ello se deduce un apreciable "grado de dependencia" de esta planta a las micorrizas para alcanzar su óptimo desarrollo, en las condiciones de trabajo, circunstancia que no se logra con el exclusivo aporte de nutrientes químicos. Dosis de fosfato superiores a 21 ppm, en el caso estudiado, son "supraóptimas" para el crecimiento, nodulación, micorrización y captación de N. Estos resultados pueden interpretarse sobre la base de que en los tejidos vegetales se alcanzó la "concentración crítica" de fósforo, tal como discute Mosse (1973) y en que en la presente situación experimental es de, aproximadamente, 0,32 por ciento.

Es de hacer notar que ciertas dosis de fosfato en suelo que afectaron negativamente el crecimiento de las plantas (ej. 32.5 mg kg⁻¹) no lo fueron para la nodulación en virtud de que este proceso posee una demanda de fosfato relativamente superior que la propia planta (ver referencias en Introducción).

Igualmente de interés es el hecho que a las dosis máximas de fosfato ensayadas, a las cuales quedaron eliminados los efectos de las micorrizas sobre el crecimiento y nodulación, las plantas micorrizadas aún superaban a sus controles en la concentración de N en sus tejidos. No se ha encontrado descripción similar en la literatura científica disponible. A este hecho se le pueden aducir dos tipos de interpretaciones:

- a) Dado el descenso en la actividad de las fosfatasa específicas de las micorrizas (Gianinazzi-Pearson y Gianinazzi, 1981) a dosis altas de fosfato asimilable el fósforo se acumula como gránulos de polifosfato en las hifas del hongo que colonizan la raíz, por lo que en este caso, los nódulos reciben relativamente menos fosfato que en los controles correspondientes no micorrizados. Teniendo en cuenta que estas apreciaciones se refieren al rango de concentraciones "supraóptimas" de P aplicadas, es posible que tal limitación en la llegada de fosfato al nódulo, sea relativamente menos "supraóptima". Realmente se sabe que las micorrizas autocontrolan su funcionalismo a diversos niveles lo que les permite operar en un margen más amplio de concentraciones de fósforo (Rhodes y Gederman, 1980). Globalmente, esta explicación concuerda con la apreciación de Asimi et al., (1980) que encuentran que dosis crecientes de fosfato anulan, primero, el efecto de la micorrización sobre el crecimiento de soja, después la nodulación y finalmente la actividad nitrogenasa.
- b) Otra razón podría ser que la micorriza capte NO₃ ó NH₄ del suelo (ver Smith, 1980) y que este mecanismo siga operando cuando cesa el que, mediado por el aporte de fosfato, estimula la fijación de N₂ atmosférico.

CONCLUSIONES

- a) El óptimo de productividad de *Medicago sativa* inoculada con *Rhizobium meliloti*, estimado como materia seca de la parte aérea cosechada y su concentración de N, solo se consigue en plantas micorrizadas. Esto indica un considerable "grado de dependencia relativa a las micorrizas" para este cultivo.
- b) La aplicación de P, hasta dosis equivalentes a 35 kg ha⁻¹ en las condiciones estudiadas, coopera sinérgicamente con la micorriza en la estimulación del crecimiento, nodulación y nutrición de la alfalfa. Muy posiblemente, esta cifra sea diferente en otros suelos, aunque la tendencia de los efectos de la interacción de dosis crecientes de fosfato y las micorrizas será, probablemente, similar a la encontrada en este estudio.
- c) Dosis de fosfato superiores a la "óptima" son, cuando menos, superfluas desde el punto de vista de la Productividad de la alfalfa.
- d) La aplicación de cantidades "supraóptimas" de fosfato tiene una incidencia desfavorable desde el punto de vista ecológico-económico ya que afectan negativamente el crecimiento de la alfalfa. Así mismo interfieren la posibilidad de que la planta se beneficie de ese potencial natural que representa asociarse simbióticamente con dos tipos de microorganismos del suelo: hongos de la micorriza y *Rhizobium* que le van a proporcionar P y N.

RECONOCIMIENTO

Los autores dedican este trabajo a Nydia Nuñez con la esperanza de que su labor sea continuada por sus Discípulos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo forma parte del Programa de Investigación 3712/79 financiado por CAIC y T. A este Organismo se agradece su apoyo económico.

BIBLIOGRAFIA

- Allen, O. N., 1957. Experiments in soil bacteriology. Burgess, Mn. medium No 79.
- Asimi, S.; V. Gianinazzi-Pearson y S. Gianinazzi, 1980. Influence of increasing soil phosphorus levels on interactions between vesicular-arbuscular mycorrhizae and *Rhizobium* in soybeans. Can. J. Bot. 58: 2.200-2.205.
- Azcón, R.; A. Marín y J. M. Barea, 1978. Comparative role of phosphate in soil or in the host on the formation and effects of endomycorrhiza. Plant and Soil. 49: 561-567.
- Azcón-Aguilar, C. y J. M. Barea, 1980. Micorrizas. Investigación y Ciencia (Scientific American), 47: 8-16.
- Azcón-Aguilar, C.; J. M. Barea; R. Azcón y J. Olivares, 1982. Effectiveness of *Rhizobium* and VA mycorrhiza in the introduction of *Hedysarum coronarium* in a new habitat. Agric. and Environ. 7: 199-206.
- Delorenzini, C.; J. M. Barea y J. Olivares, 1979. Fertilización biológica (micorrizas, *Rhizobium*, fosfobacterias) de *Trifolium* en diferentes condiciones de cultivo. Rev. Lat-Amer. Microbiol. 21: 129-134.

- Gerdemann, J. W. y J. M. Trappe, 1974. The Endogonaceae in the Pacific Northwest. Mycology Memoir No 5, The New York Botanical Garden, Bronx, NY, 79 pp.
- Gianinazzi-Pearson V. y S. Gianinazzi, 1981. En "The fungal community; its organization and role in the ecosystem" (Wicklow y Carrol, Ed.) Marcel Dekker, New York. pp. 637-652.
- Giovanetti, M. and B. Mosse, 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol.* 84: 489-500.
- Hewitt, E. J., 1952. Sand and Walter culture methods used in the study of plant nutrition. Tech. Commun. No 22. Commonw. Agric. Bur. Farnham Royal, Great Britain, 547 pp.
- Menge, J. A.; H. Lembricht y E. L. Johnson, 1977. Utilization of mycorrhizal fungi in citrus nurseries. *Proc. Int. Soc. Citriculture.* 1: 129-132.
- Mosse, B., 1973. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. IV. In Soil given additional phosphate. *New Phytol.* 72: 127-136.
- Mosse, B. and G. D. Bowen, 1968. A key to the recognition of some Endogone spore types. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 51: 469-483.
- Mosse, B. y D. S. Hayman, 1981. *En* "Tropical Mycorrhiza Research" (P. Mikola, Ed.) Oxford University Press, Oxford. pp. 213-230.
- Ocampo, J. A., 1980. Micorrizas VA. *Anal. Edafol. y Agrobiol.* 39: 1.071-1.088.
- Olsen, S. R.; C. V. Cole; F. S. Watanabe y L. A. Dean, 1954. Estimation of available phosphorus in soil by extraction with sodium bicarbonate. Circular No 939. U.S. Dep. Agric. Washington. DC. 19 pp.
- Phillips, J. M. and D. S. Hayman, 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.
- Powell, C. LI, 1980. Phosphate response curves of mycorrhizal and non-mycorrhizal plants. *N. Z. J. Agric. Res.* 23: 225-231.
- Rhodes, L. H. y J. W. Gerdemann, 1980. *En* "Cellular Interactions y Symbiosis and Parasitism (C. B. Cook *et al.*, Ed.) Ohio State University Press. Columbus, 173-198.
- Roldan-Fajardo, B. E.; J. M. Barea; J. A. Ocampo y C. Azcón-Aguilar, 1982. The effect of season on VA mycorrhiza of the almond tree and of phosphate fertilization and species of endophyte on its mycorrhizal dependency. *Plant and Soil.* 68: 361-367.
- Smith, S. E., 1980. Mycorrhizas of autotrophic higher plants. *Biol. Rev.* 55: 475-510.
- Tinker, P. B., 1980. *En* "The role of phosphorus in agriculture" Amer. Soc. of Agron. Madison, pp. 617-653.