

ACCION DE LA INOCULACION DE PHASEOLUS VULGARIS CON RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM SUPLEMENTADO CON TIERRAS RARAS EN UN SUELO SUB DESERTICO

J. C. ZANOTTI CAVAZZONI; T. V. JIMENEZ; S. M. ALVAREZ; M. E. CASTILLO;
M. A. BRUNETTI; L. M. DENIS; L. N. JURE y L. SANTANDER*

RESUMEN: *El presente trabajo ha sido diseñado para investigar el efecto de la inoculación de **Phaseolus vulgaris** con **Rhizobium leguminosarum** bv. **phaseoli** suplementos con cloruros de tierras raras en un suelo subdesérticos. Para ese fin, se cultivaron cuatro grupos de plantas de **P. vulgaris**. El primer grupo fué obtenido por inoculación de las semillas con **R. leguminosarum** bv. **phaseoli**, el segundo grupo fué obtenido por cultivo en un suelo suplementado con tierras raras, el tercer grupo fué obtenido por cultivo de semillas inoculadas con **R. Leguminosarum** bv. **phaseoli** en un suelo subdesértico suplementado con tierras raras, y el cuarto grupo consistió en plantas obtenidas sin inoculación de las semillas ni la suplementación del suelo con tierras raras, y fué utilizado como control. El tercer grupo mostró un incremento de crecimiento de 35%, un aumento neto de peso de 54%, un aumento de raíces de 70%, un incremento de proteínas totales de 97% y un aumento de cinco veces de clorofila, con relación al grupo control. Además, el tercer grupo mostró varios aspectos ventajosos comparado con los otros grupos, siendo el más prominente el hecho de que éste fué el único grupo que no fué atacado por los insectos.*

Abstract: *The present work has been designed to investigate the effect of the inoculation of **Phaseolus vulgaris** with **Rhizobium leguminosarum** bv. **phaseoli** supplemented with rare earth chlorides in a subdesertic soil. For that purpose, four groups of **P. vulgaris** plants were grown. The first group was obtained by inoculation of the seeds with **R. leguminosarum** bv. **phaseoli**, the second group was obtained by sowing in a soil supplement with rare earth chloride, the third group with both **R. leguminosarum** bv. **phaseoli** and rare earth chlorides, and the four group was neith inoculated nor supplemented, an was used as a control.*

The third group showed 35% growth increase, 54% net weight increase, 70% root increase, 97% increase in total plant protein and five-fold increase in chlorophyll, as compared with the control group. In addition, it showed several advantageous aspects as compared with the other experimental groups, the most outstanding one being the fact that it was the only group which was not attacked by insects.

* Cátedra de Microbiología Industrial, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción. C. C. 1055. Asunción, Paraguay.

INTRODUCCION

Los suelos con abusivos, monocultivos, sujeto a fertilización con el agregado de nutrientes salinos escasos o nulos, de materia orgánica, afectados por la erosión causada por las lluvias tropicales, sin la protección por árboles se van deteriorando y desertificando (1,2,3,4,5,6,7). Por otro lado, los suelos son habitats de una enorme variedad de organismo vivos, tales como, hongos, algas, mohos, insectos y algunos tipos de vertebrados. Todos estos seres son residentes del humus y del agua, de modo que cuando decrece el número de seres vivos, los suelos se van empobreciendo en vida y, por lo tanto, en productividad. De aquí, la importancia de reincorporar materia orgánica y microorganismo, especialmente aquellos involucrados en el ciclo del nitrógeno, para recuperar suelos empobrecidos.

Las áreas donde las deficiencia de luz solar y de suplemento hídrico no son factores limitantes, la productividad es determinada por la disponibilidad de nitrógeno asimilable. La cantidad de nitrógeno presente en la tierra como dinitrógeno es inmensa. Sin embargo nada del mismo es accesible para las plantas hasta que sea fijado. Este proceso es debido a microorganismos. Los principales sistemas fijadores de nitrógeno en el mundo están constituidos por la asociación simbiótica de algunas especies del género **Rhizobium**, con algunas especies de plantas leguminosas. En la simbiosis, los microorganismos infectan en las raíces formando nódulos, en donde tiene lugar la fijación de nitrógeno por parte de la bacteria; en contraparte, la planta provee de fotosintatos a la bacteria.

Varios trabajos avalan la ventaja de la inoculación de semillas de leguminosas con cepas seleccionadas de **Rhizobium** y el suplemento del suelo con sales como las de Zn, Mo, y tierras raras (lantánidos) en pequeñas cantidades para la regulación de las actividades enzimáticas, la absorción de nutrientes y la respuesta defensiva de las plantas (8,9,10). Es probable que el suplemento con oligoelementos no sólo favorece el metabolismo sino que también hacen a las plantas resistentes al ataque por plagas. Esto resulta en un mejor rendimiento, mejor calidad y anula la necesidad del agregado de agrotóxicos (11).

Las tierras raras son en si tóxicas, pero tienen aplicaciones en medicina, donde se las utiliza como complejos; por ejemplo como contraste de radiografía (12). La dosis empleada es tan pequeña, sin embargo, que su toxicidad es relativamente baja, especialmente cuando se las usa como complejo (13).

En este trabajo se investiga el efecto de la asociación de **R. leguminosarum** bv. **phaseoli** con tierras raras en la inoculación de **P. vulgaris**. Aparentemente, la suplementación del suelo con tierras raras al mismo tiempo que la inoculación no sólo resulta en un mejor crecimiento de las plantas sino también protege a esta del ataque por insectos depredadores.

MATERIALES Y METODOS

Suelo: Se recolectaron muestras de suelo subdesértico de la región de Guarambaré, Ruta 1 Dpto. Central, la cual ha sido afectada por una larga práctica de monocultivo, el de la caña de azúcar. Este suelo muestra elevada sanilización, reducción de contenido de humus, de microorganismos, pobre retención de agua y fácil erosión. Las muestras de suelo, previa remoción de grava y cascajos, se colocaron en cuatro cajones de 50 cm de largo, 30,5 cm de ancho y 25 cm de alto. El fondo de los cajones fue revestido con tela de plástico tipo Sarán, con malla de 1 mm a fin de evitar la pérdida de suelo por regado. La cantidad de suelo por cajón fué de 0,03 m³.

Semillas: Se eligieron semillas de poroto (fresco) de tipo San Francisco, sin contaminación con *Rhizobium*, descartando las defectuosas, las atacadas por insectos o deterioradas por acción mecánica.

Tierras Raras: Se utilizó una mezcla de elementos de tierras raras obtenida de monazita brasileña conteniendo las mismas tierras raras como el contenido original en el mineral. Los lantanideos fueron obsequiados por IPEN S. Paulo.

Inoculación y Siembra: El primer cajón se sembró con 25 semillas tratadas previamente con un cultivo de *R. leguminosarum* bv. *Phaseoli* en medio glicerol-manitol-fosfato-extracto de levadura, de una concentración de 2×10^6 CFU/ml. Una vez sembradas las semillas, se vertió unos 15 ml de cultivo en la zonas de siembra, resultando en una cantidad de 3×10^7 de bacterias por cajón. El segundo cajón fue sembrado con 25 semillas y la tierra fue regada con 20 ml de una solución de 6 mg de cloruro de tierras raras/ ml, resultando en el agregado de 1,2 mg de tierras raras en el cajón. El tercer cajón fué sembrado con 25 semillas inoculadas con la bacteria como el primer cajón, y regada con una solución de tierras raras como el segundo cajón. El último cajón fué sembrado con 25 semillas sin tratamiento especial. En todos los casos, las semillas se sembraron a 5 cm de profundidad y separadas por 10 cm de distancia. Los cajones fueron regados regularmente con 1 litro de agua según las necesidades impuestas por las fluctuaciones climáticas.

RESULTADOS

Crecimiento de las plantas: A los seis días se empezó a observar germinación. Aparecieron 23 plantitas en los cajones I y IV, y 25 plantitas en los cajones II y III. A los pocos días, una de las plantas del cajón IV pereció. Al cabo de 15 días del sembrado, en el cajón IV las plantas tenían una altura entre 3 y 6 cm; en el cajón I entre 5 y 8 cm; en el cajón II entre 8 y 10 cm; en el cajón III entre 8 y 15 cm. Al cabo de 21 días, en el cajón IV se observó que las plantas habían sido atacadas por insectos, y que diferían entre sí en cuanto al crecimiento, coloración, y aspecto.

El cajón I presentó plantas atacadas por insectos, como en el cajón IV, pero las mismas tenían desarrollo más homogéneos, colores más vivos y mejores aspectos. El cajón II presentó plantas atacadas por insectos, pero con menos intensidad que en los casos anteriores. Sin embargo, el crecimiento fué más

uniforme, las plantas eran de mayor altura, mejor desarrolladas, de mejor aspecto y de verdor vívido. Por su parte, en el cajón III ninguna planta fué atacada por insecto, las plantas eran de color verde brillante, de aspecto sano, altura uniforme, aunque algo menor que la del grupo II. Al cabo de 35 días, por razones metereológicas se perdieron algunas hojas en todos los cajones.

Cosecha y relevamiento de las plantas: a los 60 días se arrancaron las plantas procurando evitar pérdida de las raíces.

Se lavaron con chorros de agua para eliminar la tierra y una vez secadas se separaron las raíces de los tallos para su medición y promediación. los resultados se presentan en la tabla I.

Tabla I
Evaluación del crecimiento de las plantas al cabo de 60 días.
(los valores que se presentan son valores medios)

Grupo	Raíces	Tallos (cm)	Hojas (cm)	No. hojas
I	6,5	52,1	7,5	9,2
II	4,8	57,1	7,8	10,8
III	5,6	54,4	8,7	11,3
IV	4,2	40,5	7,1	7,8

Se contaron los nódulos radiculares y se encontraron dos tipos de nódulos; a saber, macronódulos claros y micronódulos color ocre. Todos los grupos presentaron un promedio de 2 macronódulos, mientras que los micronódulos estuvieron presentes en cantidades variables, siendo nulos en los grupos II y IV. y de 4,2 y 7,2 en los grupos I y III, respectivamente.

Peso de las plantas: Primeramente fueron secadas a temperatura ambiente y entre hojas de papel de periódicos, y una vez secas se procedió a la pesada de las plantas. Posteriormente, se efectuó el secado en estufa a 100C, de 30 g de muestras de plantas para evaluar la pérdida de agua residual y substancias volátiles. Estos dato se presentan en la tabla II.

Tabla II
Peso promedio de plantas secas y porcentaje de pérdida de agua residual y substancias volátiles sobre planta seca.

Grupo	Peso medio (g/planta)	Pérdida de agua (%)
I	3,5	13,1
II	3,8	11,7
III	4,0	12,4
VI	2,6	10,3

Contenido de ceniza y proteínas: Se incineraron por separado tallos y raíces y se calcularon los porcentajes de cenizas. Por otro lado, se cuantificaron proteínas en las hojas secas, por el método de Kjeldahl. Estos datos se presentan en la tabla III.

Tabla III
Porcentaje de cenizas en raíces y tallos y porcentaje de proteínas en hojas secas.

Grupo	Cenizas(%)		Proteínas(%)
	Raíces	Tallos	
I	14,27	7,43	35,8
II	15,91	7,98	29,6
III	13,98	7,24	35,3
VI	9,29	9,50	23,8

Contenido de tierras raras en las cenizas: Se investigó la presencia de tierras raras en las cenizas y se encontró que las que procedían de plantas que habían sido tratadas con tierras raras contenían cantidades por debajo de 6 μg por 100 mg de cenizas, mientras que en las otras no se detectó tierras raras (ver ref. 14).

Contenido de clorofila en las hojas: Se extrajo clorofila de las hojas según se describe en 15 y se obtuvo un aumento sustancial de clorofila B en los grupos I y III. Tomando en cuenta el peso relativo de hojas de cada grupo, se encontró un aumento aproximado de cinco veces en el grupo 3 y de 2 veces en el grupo II, con respecto al control (ver ref. 15).

DISCUSION Y CONCLUSIONES

En las plantas nacidas de semillas tratadas con **R. leguminosarum Bv, phaseoli** y tierras raras al mismo tiempo se observó un desarrollo más rápido que las plantas (en un 30%).

Las mismas tenían mayor número de hojas y estas eran de mayor tamaño (en un 20%). Las raíces también fueron mayores (en un 70%). La germinación fue del 100%, sin pérdidas posteriores.

El peso medio de las plantas fué más del 50% superior con respecto al control. El contenido de proteínas de este grupo fué superior en un 30% con respecto al control, aunque el incremento fue algo menor que en el grupo I, pero superior que el grupo II. El contenido total de cenizas fué más o menos equivalente en todos los grupos; sin embargo, el contenido de clorofila fué de cinco veces el del control. Un aspecto resaltante de los resultados es que las plantas de este grupo fueron resistente al ataque por insectos.

La aparente resistencia a insectos inducida por el tratamiento con tierras raras harían de éstas excelentes candidatos para ser usados como sustitutos de insecticidas. La ventaja de esto es evidente por el daño que causan los insecticidas químicos a la ecología, además de la ventaja económica que representaría la disminución del uso de aquellos.

Algunos grupos de plantas presentaron, clorosis foliar, y esta estaba acentuada en el grupo control. Este efecto podría ser debido a **Rhizobia** naturales, muchos de las cuales secretan rhizobitoxinas (16).

La práctica eventual del suplementos con tierras raras en la inoculación con **Rhizobium** sería muy beneficiosa para la recuperación del suelo. Por el ritmo de crecimiento de las plantas, se podría pensar en tres o cuatro incorporaciones de abono verde por año. Una recolección bimensual de 7.000 Kg/Ha representarían unos 25.000 Kg/Ha de abono orgánico, lo que en nitrógeno correspondería a unos 75.000 Kg/cm, con poco costo, rápido, y de alta efectividad.

Agradecimiento: Los autores agradecen al IEN- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, S Paulo, Brasil, por la donación de las muestras de tierras raras. También agradecen a Antonio Figueredo por la lectura crítica del manuscrito.

BIBLIOGRAFIA

1. FAUFFMANN, J. TRAVARAUX. (1962). **Pratiques de microbiologie du sol**. Ostone Boudy Francia.
2. DOMERGES Y. & MANGENOT, F. (1970). **Ecologie microbienne du sol**. Masson et Cie Editeurs, París.
3. PRAMER, D & SCHMIDT, E.L. (1965). **Experimental soil microbiology**. 2da. edición Burguess Public. Co. Minnesota.
4. CARDOZO, E. & NOGUERA, J. V. (1962). **Microbiología do solo**. S.V.C.S. Campinas.
5. ALEXANDER, M. (1982). **Introducción a la microbiología del suelo**. A.G.T. Mexico.
6. TELZAR, M. (1982). **Microbiología**. Mac Graw. Mexico.
7. HINCHEE, M. A, W.; Connor-ward, C, A., y Newelie, J. (1988). **Production of transgenic soybean plants using Agrobacterium tumefaciens mediated DNA transfer**. Bio/Tech. 6: 915-922.
8. FASSARDI, L.; Guillén et al. (1992). **Potencialidad y limitaciones para la fijación biológica de nitrógeno en soja en Paraguay**. No publicado. Ministerio de Agronomía.
9. SNEH, B. ZEIDAN, M., ICHIELEVICH, M.; BARASH, I. & KOLTIN, Y. (1985). **Increased growth responses induced by a nonpathogenic Thizoctinia solani**. Can. J. Bot. 64 : 2372-2378.
10. VINCENT, J. M. (1975). **Manual práctico de Rhizobiología**. Ed. hemisferio Sur.
11. MAY, R, M & DOBSON, A. P. (1986). **Pesticide resistance: strategies and tactics for management**. pp. 170-193. National Academy Press. W. D.C.

12. BOSHENG GUO A. (1987). **New application fiel for rare earhts.** Inorgánica Clínica Acta 140: 353-354.
13. LAUFFER, R, B. (1987). **A toxicity of metal complexes.** Chem. Rev. 87: 5-917.
14. ZANOTTI CAVAZZONI; J. C. Bóveda; J. C. ABRAO, A. (1994). **Reconhecimento de terras raras individuais por meio de seus complexos fluorescentes com tetraciclina.** Química dos lantanídeos e Actínídeos. Anais do XVIII Simoisio Anual da ACIEPS, S. Paulo. Publicación ACIEPS Nº. 89.
15. WOLENFRIEND, J. (1962). **Fluorescence assay in biology and medicine.** Academic Press. pp 372-378.
16. RUMJANEK, N. G.; DOBERT, R. C.; VAN BERKUM, P. & TRIPLET, E. W. (1993). **Common soybean inoculant strains in Brazil are members of Bradyrhizobium elkanil,** Appl. and Environ. Microbiol. 54 : 4371-4373



GRUPO 1



GRUPO 2



GRUPO 3



GRUPO 4