



Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

**Universidad Nacional de La Plata**  
**Facultad de ciencias Agrarias y Forestales**

**TRABAJO FINAL**

**Título:** “Aislamiento y caracterización de microsimbiontes de *Medicago sativa* en base a su capacidad solubilizadora de fósforo y su tolerancia al estrés salino”

26/10/2018

**Alumno:** Jorge Davies

**Director:** Ing. Agr. Fermoselle, Geraldina

**Co-director:** Lic. Balagué, Laura

## ÍNDICE

ÍNDICE .....	2
1. RESUMEN .....	4
2.1 INTRODUCCIÓN: .....	5
2.1. Importancia del cultivo de alfalfa en la Argentina .....	5
Figura 1. Zonas cultivadas con alfalfa en Argentina.....	6
2.2 Características y condiciones ambientales del cultivo de alfalfa .....	7
2.3 Importancia del Fósforo en el suelo .....	8
2.4 El fósforo y su relación con la fijación biológica de nitrógeno:.....	10
2.5 Rizobios.....	11
2.6 Pasos de la infección.....	12
Figura 2: Formación del hilo infectivo en el pelo radical de la planta.....	13
2.7 Solubilización de fosfatos por Bacterias.....	14
2.8 Tolerancia a la salinidad en leguminosas:.....	15
2.9 Relación entre la tolerancia a la salinidad y la asociación simbiótica: .....	16
3 HIPÓTESIS: .....	18
3.1 Objetivo general:.....	19
3.2 Objetivos específicos: .....	19
4 MATERIALES Y MÉTODOS .....	19
4.1 Generación de una colección de aislados.....	19
4.2 Características de los sitios de muestreo.....	19
4.3 Preparación de material.....	21
4.4 Medios de cultivo .....	22
Figura 3: Medio de cultivo con fuente de fósforo insoluble.....	23
4.5 Ensayos para evaluar la infectividad de los aislados:.....	24
4.5. a Método de determinación del Porcentaje de Plantas Noduladas.....	24
5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	25
5.1 Tolerancia a la salinidad .....	25
Tabla 1: Crecimiento de los Aislados a distintas concentraciones de NaCl....	27
Tabla 2: Aislados tolerantes a la concentración de 3,5 % de NaCl .....	28
5.2 Solubilización de fósforo: .....	28

Tabla 3: Evaluación de la Solubilización de Fósforo .....	29
5.3 Evaluación de la infectividad.....	29
5.3.a. Porcentaje de plantas noduladas.....	29
Tabla 4: Porcentaje de plantas noduladas.....	29
Figura 5: Evaluación de la infectividad. Número de nódulos por planta .....	30
5.3.b. Determinación del Número de Nódulos en la raíz principal.....	30
Tabla 5: Porcentaje de nódulos ubicados en la raíz principal.....	31
6 CONCLUSIÓN: .....	32
7 BIBLIOGRAFÍA: .....	34

## 1. RESUMEN

En el presente trabajo se realizó el aislamiento y posterior caracterización de microsimbiontes de *Medicago sativa* (alfalfa), originarios de distintas regiones del país, en base a su capacidad solubilizadora de fósforo y su tolerancia al estrés salino. El objetivo fue identificar cepas de rizobios simbioses de alfalfa con características particulares en los aspectos ya nombrados, que hacen a la capacidad competitiva de los rizobios en el suelo y al aumento de la producción del cultivo de alfalfa. El comportamiento de las cepas aisladas se comparó con la cepa de referencia *Ensifer meliloti* B399, siendo la recomendada por el INTA. Los resultados revelan que si bien algunos aislados han mostrado un comportamiento promisorio en infectividad, tolerancia a la salinidad y en la solubilización de fósforo, debería evaluarse el comportamiento en ensayos con plantas en condiciones controladas.

## 2.1 INTRODUCCIÓN: Importancia del cultivo de alfalfa en la Argentina

La alfalfa (*Medicago sativa*) es una especie perteneciente a la familia *Fabáceas* sub familia *Papilionoidea*, tiene su área de origen en Asia menor y sur del Cáucaso, abarcando países como Turquía, Irak, Irán, Siria, Afganistán y Pakistán. La llegada al nuevo mundo se produjo en el año 1519 a México. Posteriormente, por la ruta del Pacífico, fue trasladada a Perú y Chile, por Pedro de Valdivia en 1541 y Pedro del Castillo la introduce en Cuyo (Mendoza) en 1561 (Arenas *et al.*, 2014).

La superficie implantada con alfalfa en la Argentina, sea pura o consociada con otras forrajeras, en la década del 60 era de poco más de 7 millones de ha. Luego se registra un descenso del área de siembra, para ubicarse en 2000/01 en las cercanías de los 5 millones de ha., esto se debe a la baja rentabilidad de la actividad ganadera en ese período, particularmente de la producción lechera (Basigalup, 2007).

El cultivo de alfalfa se encuentra repartido entre las provincias de Buenos Aires con 46,2%, Córdoba con el 23,6%, Santa Fé con 15,8%, La Pampa con el 10,7% y Entre Ríos con 3,7%. En la actualidad, en la República Argentina el área de siembra del cultivo de alfalfa se estima en unas 3,7 millones de ha, (Basigalup, 2014). Los rendimientos pueden variar según las diferentes zonas de producción, a nivel nacional se referencian rendimientos de 24.000 kg.ha<sup>-1</sup>.año<sup>-1</sup> (Demin y Aguilera, 2012).

Es un cultivo muy importante para la producción de carne y leche bovina en planteos pastoriles con suplementación. Se ha incrementado el uso de la alfalfa para la confección de reservas forrajeras, sobretodo la producción de alfalfa de alta calidad para la elaboración de pellets, cubos y megafardos, destinados tanto al mercado interno (bovinos, equinos, aves, chinchillas, etc.) como a la exportación. Generando posibilidades para el país frente a la demanda mundial de megafardos re-compactados por parte de países de Medio y Lejano Oriente y de pellets por parte de países de Latinoamérica (Basigalup, 2014).



**Figura 1.** Zonas cultivadas con alfalfa en Argentina. (Extraído de Bertin, OD., 2006. Producción y futuro de la alfalfa en la Argentina. INTA.)

Si bien la superficie de alfalfa está fuertemente concentrada en la región pampeana, en condiciones de secano, la producción bajo riego en otras regiones del país es cada vez mayor, como sucede en Cuyo, Norte de Patagonia y Santiago del Estero (Bertín, 2006); (Figura 1).

Su adaptabilidad a los distintos tipos de clima y suelo, su capacidad para recuperar la fertilidad nitrogenada y la calidad del forraje, son características que refuerzan la incorporación de este cultivo a los principales sistemas de producción agrícola ganaderos (Romero, 1995).

## **2.2 Características y condiciones ambientales del cultivo de alfalfa**

Se trata de una planta perenne, vivaz y de porte erecto. Presenta un sistema radical robusto y profundo. La raíz puede alcanzar los 2 a 5 metros de longitud, siempre que no existan impedimentos en el perfil del suelo. Debido al importante sistema radical que posee, le permite extraer el agua de capas profundas, lo que le confiere tolerancia a las sequías (Basigalup and Rossanigo, 2007).

El tallo primario es cuadrado en su sección transversal y presenta estomas y pelos. Posee además del crecimiento primario un crecimiento secundario, que da origen a un eje leñoso o porción perenne que forma parte de la corona. Es importante destacar que la corona no es una estructura simple sino que es una zona compleja que incluye varias estructuras separadas (Teuber and Brick, 1988), cuya función principal es el almacenamiento de sustancias de reservas y sede de yemas, a partir de donde se desarrollarán los rebrotes de la planta. (Basigalup and Rossanigo, 2007). El número de tallos depende de la edad y vigor de la planta y pueden llegar a 20. Las primeras hojas de alfalfa son unifoliadas y de forma orbicular, mientras que cuando la planta ya está desarrollada son trifoliales, unidas al tallo a través del peciolo. El borde de los folíolos es dentado, usualmente solo en el tercio superior, aunque puede extenderse hasta la mitad superior o incluso el tercio inferior. Pueden encontrarse también hojas tetrafoliadas, pentafoiliadas o de más folíolos, que reciben el nombre de hojas multifoliadas (Basigalup and Rossanigo, 2007).

Las flores se desarrollan cuando el ápice del tallo pasa del estado de crecimiento vegetativo al reproductivo. Estas son completas y están formadas por el cáliz, la corola, los estambres y el gineceo. Son de color púrpura, con extremos que van desde el violeta claro al morado oscuro, aunque también pueden encontrarse flores blancas, azuladas, amarillas y variegadas, que son mezclas de colores o tonalidades que van cambiando a medida que la flor se desarrolla (Del Pozo Inañez, 1977).

El fruto es del tipo legumbre o vaina, monocarpelar, seco e indehisciente, generalmente alargado y comprimido, con las semillas alargadas en la hilera ventral. La vaina, por encorvamiento desarrolla un espiral que generalmente posee una espira con autofecundación (Basigalup and Rossanigo, 2007).

Para una alta producción de forraje se requiere suelos profundos, bien aireados, de reacción más bien neutra (pH 6,5 a 7,5) y buena fertilidad, especialmente fósforo y en menor proporción azufre (Hijano, 1995). El pH mínimo sería 6 y preferiblemente 6,5 – 7 para favorecer la nodulación y fijación de nitrógeno (Del Papa *et al.*, 1999). A medida que las condiciones reales se alejen de este marco ideal, el cultivo disminuye su rendimiento y persistencia (Basigalup, 2007)

### **2.3 Importancia del Fósforo en el suelo**

El fósforo es un nutriente esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas, este elemento clave influye sobre el rendimiento de los sistemas productivos. El fósforo (P) junto con el nitrógeno (N), potasio (K), azufre (S), calcio (Ca) y magnesio (Mg) conforman el grupo de macronutrientes por las cantidades requeridas.

En el suelo el fósforo se encuentra combinado con otros elementos formando los complejos minerales (fósforo inorgánico) o unido en los compuestos orgánicos (fósforo orgánico). La mayor parte del P total no se encuentra directamente disponible para los cultivos, sino que está en un equilibrio dinámico entre las formas orgánicas e inorgánicas, que depende del ambiente edáfico.

La disponibilidad de fósforo es uno de los factores determinantes del resultado productivo de las pasturas de alfalfa, afectando particularmente el crecimiento del cultivo, la calidad y la capacidad de la fijación de nitrógeno (Christian, 1977)

La intensificación de la agricultura de las últimas décadas ha acentuado las deficiencias ya que los balances de P son negativos en la mayoría de los sistemas

agrícolas y ganaderos argentinos (Duval *et al.*, 2013). Si bien se comenzó a aplicar fertilizante aún no compensa la exportación que se realiza (Suñer y Galantini, 2013).

Las plantas toman los fosfatos desde la solución del suelo, los que se reponen a partir de formas de P lábiles. Si estas se agotan, las formas menos solubles, tales como minerales primarios y secundarios, serán las que determinen la concentración de P en la solución del suelo (Suñer y Galantini, 2013).

Los microorganismos del suelo son los que continuamente participan en todas las transformaciones regulando las entradas (descomposición) y salidas (utilización) del P de la solución del suelo según la calidad del material presente (Suñer y Galantini, 2013).

Los suelos que se cultivan pierden P a través de la remoción en los productos de cosecha (granos, frutos, forrajes) y por erosión (Galantini *et al.*, 2006). Los primeros efectos se ven en las caídas del P orgánico, ya que la materia orgánica (MO) disminuye rápidamente cuando los suelos se cultivan (Suñer y Galantini, 2013).

En los suelos de la región pampeana, el contenido de P constituye una de las principales limitantes para el desarrollo de cultivos y pasturas, y en alfalfa, se ha comprobado una marcada respuesta a la aplicación de P en el horizonte superficial (Vivas y Guaita, 1997; Berardo y Marino, 2000)

Los Molisoles de la región pampeana suelen presentar una baja disponibilidad de P tanto por sus características edáficas como por el prolongado uso agrícola sin la adecuada reposición del nutriente (Berardo y Grattone, 1994).

Al analizar el fósforo disponible en suelos agrícolas de zona pampeana y extrapampeana, encontraron gran variabilidad en el contenido de P Bray en suelos de la Argentina, en un rango de entre 1 ppm a 196 ppm de P Bray (Rozas *et al.*, 2012). Esta variabilidad depende de la naturaleza del material original, su grado de meteorización, de las características climáticas y del manejo agronómico (Suñer y Galantini, 2013).

En los sistemas de producción de forraje para corte, la extracción de nutrientes es muy importante, ya que se está cortando toda la planta y llevando ese material fuera del sistema. En estos sistemas de corte y remoción, la exportación de P puede llegar a superar a la extracción de los cultivos agrícolas. Algunos investigadores (Vivas y Guaitia, 1995/1996) midieron extracciones de P superiores para alfalfa de corte que para la rotación trigo/soja 2° (García *et al.*, 2002).

En la zona de pampa húmeda se estima un umbral para alfalfa de alrededor de 25 ppm de P Bray, tomando una profundidad de muestreo de 0-20 cm (Díaz Zorita y Gambaudo, 2007; Rubio *et al.*, 2013; Pautasso y Barbagelata, 2017)

En la región semiárida central ha ocurrido una disminución progresiva en los contenidos de P Total, asociada a la intensificación del uso agrícola de las tierras (Urioste *et al.*, 2006), y a la baja reposición del nutriente vía fertilización. En los suelos calcáreos o con influencia de napa alcalina, la disponibilidad de P puede estar afectada por la abundancia de calcio (Álvarez L. *et al.*, 2016)

#### **2.4 El fósforo y su relación con la fijación biológica de nitrógeno:**

La función específica del fósforo está relacionada con la síntesis de adenosina trifosfato (ATP) asociada con la actividad del complejo enzimático fijador de nitrógeno. La producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular obtenido por las rizobacterias es uno de los mecanismos más ampliamente conocidos de solubilización del fosfato del suelo, que hace al fósforo disponible para la nutrición de las plantas (Paredes-Mendoza 2010). El fósforo es un componente esencial de moléculas como ARN, ADN y ATP, así como de los fosfolípidos (Coyne, 2000).

El P disponible es absorbido por la planta en forma de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  en suelos ácidos, y como  $\text{HPO}_4^{2-}$  en suelos alcalinos. El P disponible en el suelo es fácilmente convertido en complejos insolubles, como fosfatos de Fe, Al o Mn en suelos ácidos y fosfatos de Ca o Mg en suelos alcalinos (Torriani-Gorini, 1994).

La implantación de alfalfa con el objetivo de lograr una alta producción, solo sería posible con una adecuada provisión de fósforo (Berardo *et al.*, 2001). Debido a lo anterior, el P es uno de los elementos que con mayor frecuencia resulta limitante en los suelos (Paredes-Mendoza y Espinosa, 2006) siendo necesario realizar fertilizaciones en el momento de la siembra o refertilizaciones en alfalfares establecidos para lograr una producción exitosa.

## **2.5 Rizobios**

El nitrógeno es esencial para la nutrición de plantas y animales, ya que es un elemento vital que forma parte de aminoácidos, proteínas y otros materiales esenciales. La atmósfera contiene aproximadamente 80 por ciento de nitrógeno por volumen, pero esta gran cantidad de nitrógeno atmosférico no está disponible para la mayoría de las plantas o animales. La alfalfa se caracteriza por tener altos requerimientos de nitrógeno los que pueden ser obtenidos por medio de la asociación simbiótica entre la leguminosa y bacterias denominadas "rizobios". Este término abarca a bacterias que se pueden describir como bacilos, móviles, Gram (-), pertenecientes a la subdivisión  $\alpha$ -Proteobacteria. Esta simbiosis es el resultado de una compleja serie de eventos coordinados de comunicación, reconocimiento y diferenciación entre los organismos participantes. La asociación resulta en la formación de nódulos, estructuras que albergan a las bacterias simbióticas, las que por medio de la enzima nitrogenasa reducen el  $N_2$  (atmosférico) a  $NH_4^+$  dejándolo disponible para la planta (Mulder *et al.*, 2005).

La fijación biológica de nitrógeno (FBN) ha ganado valor en la agricultura y juega un importante rol en beneficio de la fertilidad de los sistemas productivos. La FBN permite que ingresen 180 millones tn/ año de nitrógeno en la biósfera. Esto lo convierte en un proceso sustentable para los sistemas productivos, ya que cuando se utilizan fertilizantes nitrogenados estos tienen alto costo y pueden convertirse en

contaminantes ambientales porque la planta utiliza entre el 30 y 50 % del fertilizante y el resto puede perderse por volatilización, desnitrificación o percolación de nitratos que pasan al agua subterránea (Danso *et al.*, 1984).

Los microsimbiontes característicos de esta asociación, capaces de interactuar en forma eficiente con las raíces de *Medicago sativa* para formar nódulos fijadores de nitrógeno son las especies de *Ensifer meliloti* y *E. medicae* (Silva *et al.*, 2007).

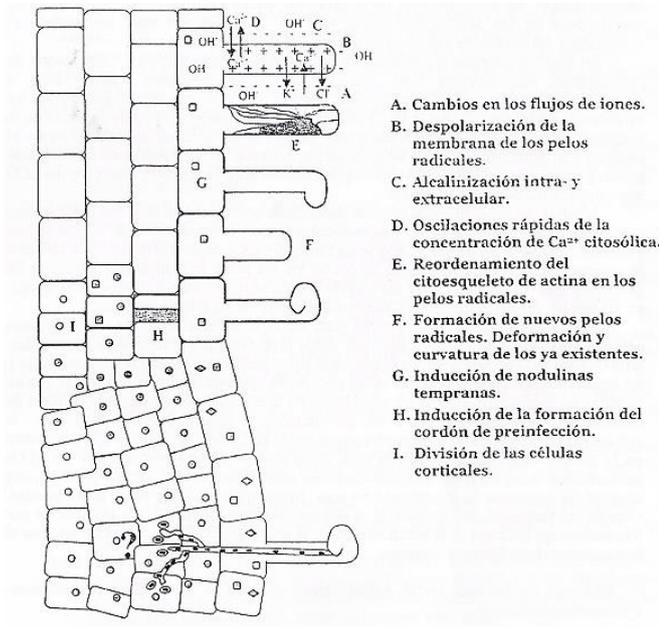
## 2.6 Pasos de la infección

El proceso de nodulación se inicia con el intercambio de señales, ya que como respuesta a los compuestos excretados por las plantas (flavonoides, ac. adónicos y betaínas) que interactúan con la proteína NodD sintetizada por las bacterias, se induce en ellas la síntesis de una molécula lipoquitooligosacáridica, conocida como “factor Nod” o factor de nodulación. Esta molécula, desencadena una serie de cambios en la raíz de la planta que finalizará con la formación del nódulo (Lodeiro, 2003). Luego de la adherencia del rizobio a la planta, a través de proteínas específicas, como la ricasina, los pelos radicales se enroscan, debido a la acción de tipo hormonal de los factores Nod secretados por la bacteria (Wang, 2002).

Se forma en el pelo radical el hilo infectivo (Figura 2), que contiene a los rizobios. Este hilo infectivo es una vía por la que los rizobios se mueven hacia la corteza de la raíz en donde se induce la división celular que se extiende hacia capas más profundas, formándose así el meristema del nódulo, que es infectado por los rizobios que llegan a través del hilo infectivo. En el interior de los nódulos las bacterias adoptan forma de bacteroides, que son las formas diferenciadas que fijan  $N_2$ . El nódulo provee un ambiente, de baja tensión de oxígeno y allí es donde el nitrógeno es reducido a  $NH_4^+$ , por la enzima nitrogenasa. (Morón *et al.*, 2006).

Los nódulos contienen una proteína, llamada leghemoglobina, que compleja al  $O_2$  del aire, generando dentro del mismo, tensiones de  $O_2$  tales que evitan la

inactivación de la enzima nitrogenasa. La presencia de la proteína leghemoglobina se puede visualizar por el color rojizo de los nódulos, lo que de manera indirecta indica actividad de fijación de nitrógeno (Morón *et al.*, 2006).



**Figura 2: Formación del hilo infectivo en el pelo radical de la planta.** (Extraído de Morón, 2006).

Existen dos tipos morfológicos de nódulos en las leguminosas: determinado e indeterminado. Las diferencias entre los dos tipos de nódulos son el sitio de las primeras divisiones celulares internas, el mantenimiento de una región meristemática, y la forma de los nódulos maduros (Ferguson *et al.*, 2010). La alfalfa posee nódulos indeterminados, tienen un meristema persistente, que se ubica en el ápice del nódulo, cuando crece se alarga resultando en una forma cilíndrica. Los nódulos contienen además una zona en donde se infectan las células, una zona de activa fijación y una zona de senescencia en la que las células contienen acumulación de almidón. (Ferguson *et al.*, 2010).

Por medio de la inoculación se agregan rizobios seleccionados al suelo, lo que permite que se aumente la eficiencia de la fijación de nitrógeno y así los niveles de

producción. Pero también se considera a la población naturalizada como fuente de rizobios con potenciales características que podrían utilizarse para la fabricación de inoculantes (Chen *et al.*, 2002). A través de la selección de bacterias con rasgos deseables se pretende maximizar la productividad de los cultivos (Bromfield *et al.*, 2010).

Estudios realizados en los continentes Africano (Elboutahiri *et al.*, 2010) y Australiano (Howieson y Ewing., 1988; 1989) y en nuestro país (Del Papa, *et al.*, 1999; Martínez-Abarca *et al.*, 1999) demuestran una gran diversidad genotípica y fenotípica que está presente en las poblaciones naturalizadas de *E. meliloti* y *E. medicae* en distintas condiciones climáticas y edáficas.

### **2.7 Solubilización de fosfatos por Bacterias**

Distintas especies de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, poseen capacidad de solubilización de fósforo inorgánico (Halder *et al.*, 1990; Halder y Chakrabartty 1993; Surange y Kumar 1993). Siendo esto un factor de selección por la importancia que tiene este elemento en la producción de los cultivos.

Los microorganismos están involucrados en procesos que afectan la transformación del P del suelo, participan en la solubilización del fosfato inorgánico y en la mineralización del fosfato orgánico, así como en su inmovilización (Richardson, 1994). En particular, las bacterias solubilizadoras de fosfato (BSP) solubilizan tanto fosfato orgánico, como inorgánico (Banik y Dey, 1982; Goldstein *et al.*, 2003). El fosfato orgánico es mineralizado por la enzima fosfatasa excretada por algunos microorganismos (Gerretsen, 1948; Kucey *et al.*, 1989). Las bacterias *Bacillus megaterium*, *Bacillus mesentericus* y *Pseudomonas putida* mineralizan las formas orgánicas de P (ortofosfato) (Tarafdar y Claassen, 1988; Das *et al.*, 2003). En general, se acepta que el mecanismo más común de solubilización del fosfato mineral es la

acción de ácidos orgánicos sintetizados por las BSP (Goldstein, 1995; Wan y Wong, 2004).

Los ácidos orgánicos son constituyentes normales de la mayoría de los suelos agrícolas. Su papel dentro del suelo no ha sido aún bien definido, pero existen numerosas evidencias que indican sus efectos fisiológicos en el crecimiento de las plantas (Illmer y Shinner, 1995; Scheffer y Schachtschabel, 1998; Igual *et al.*, 2001). Algunos ácidos orgánicos incrementan la disponibilidad de formas insolubles de diferentes nutrientes de las plantas, en especial el P (Goldstein, 1995). Estos ácidos orgánicos de bajo peso molecular son producidos por microorganismos que se encuentran en la rizósfera. La concentración de los ácidos orgánicos en la solución del suelo normalmente es baja, variando de 1 a 50 mM (Baziramakenga *et al.*, 1995; Strobel, 2001).

### **2.8 Tolerancia a la salinidad en leguminosas:**

Las leguminosas constituyen la fuente primaria de nitrógeno en las zonas áridas y semiáridas (Zahran 1999), donde el aumento de la salinidad del suelo representa una limitación importante para la agricultura, al provocar bajas en el rendimiento del cultivo. La fijación simbiótica del nitrógeno es sensible al estrés por parte de la leguminosa huésped y de los rizobios libres (Coba de la Peña y Pueyo, 2012). En los nódulos de leguminosas, las condiciones salinas inducen una disminución en la actividad de fijación de nitrógeno, disminución en los niveles de leghemoglobina, así como en la disponibilidad de fotosíntesis y el índice respiratorio del nódulo, y se produce un aumento en la resistencia a la difusión de oxígeno (Zahran, 1999; Coba de la Peña y Pueyo 2012). Se observan alteraciones estructurales y ultraestructurales indicativas del nódulo senescente en condiciones de salinidad (James *et al.*, 1993, Serraj *et al.*, 1995, Fernández-Pascual *et al.*, 1996, Borucki y Sujkowska 2008). El estrés por salinidad induce la senescencia del nódulo

umentando la producción de especies de oxígeno reactivo tóxico y disminuyendo las defensas antioxidantes (Swaraj and Bishnoi 1999; Puppo *et al.*, 2005; Redondo *et al.*, 2012).

Más de 800 millones de hectáreas alrededor del mundo están afectadas por sales, y de las áreas cultivadas más del 4 % tienen esta problemática, por lo cual, la salinización de los suelos es uno de los retos más importantes a los cuales se enfrenta la agricultura a nivel internacional (Padilla, 2013). Argentina es el tercer país del mundo con mayor superficie afectada por el halo-hidromorfismo (Lavado y Taboada, 2009). Más de 13 millones de hectáreas se caracterizan por la presencia de sales en el perfil. El chaco semiárido, la depresión del salado y el noroeste de Buenos Aires son zonas afectadas por sales y sodio. Este daño podría ir en aumento si no se realiza un uso racional de la tierra. (INTA 2013)

La alfalfa se clasifica como un cultivar moderadamente sensible a la salinidad (2 dS/m), valores de conductividad eléctrica de 6 dS/m pueden producir reducciones del rendimiento de 25% llegando al 50% de reducción con valores de 8 dS/m (Lus, 2015).

### **2.9 Relación entre la tolerancia a la salinidad y la asociación simbiótica:**

Las plantas leguminosas que crecen en ambientes altamente salinos requieren que tanto el rizobio y el huésped sean tolerantes a la sal (Craig *et al.*, 1991). Wilson (1970), Bhardwaj (1975), y (Singleton *et al.*, 1982) han encontrado que los límites superiores de tolerancia a la salinidad de *Rhizobium* parecen ser más altos que los de su leguminosa huésped. La sal puede afectar la simbiosis a través de los efectos sobre el crecimiento y supervivencia de *Rhizobium* en el suelo, la colonización de las raíces, la inhibición de la infección y el desarrollo de los nódulos o el deterioro del funcionamiento del nódulo activo (Craig *et al.*, 1991).

Para el caso del frijol Caupí, algunos investigadores encontraron que la salinidad puede dañar directamente a los cultivos desde las primeras etapas del desarrollo hasta la culminación de su ciclo biológico, afectando sus rendimientos e incluso generando la muerte en las especies más susceptibles. Algunos de los efectos más comunes y perjudiciales provocados por la salinidad tienen relación con el incremento de la toxicidad específica, normalmente asociada a la absorción excesiva de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{Cl}^-$ ; un desequilibrio nutricional causado por la interferencia de los iones salinos con los nutrientes esenciales, el efecto osmótico y la combinación de los efectos antes mencionados (Padilla, 2013).

La salinidad también afecta la simbiosis rizobio-leguminosa. Se ha reportado que las poblaciones de rizobios del suelo disminuyen al igual que la capacidad de las plantas para formar nódulos, se afecta de manera directa el proceso de fijación simbiótica de nitrógeno por la disminución de la actividad de la enzima nitrogenasa y disminuyen los niveles de leghemoglobina en el interior de los nódulos formados (Padilla, 2013).

Se ha observado en plantas de *Vicia faba* que la salinidad inhibió el crecimiento del cordón de infección (Zahran y Sprent, 1986), mientras que para el caso de plantas de Arveja (*Pisum sativum*) se encontró que la salinidad inhibe los puntos de infección y el tamaño y el número de los nódulos resultó menor (Borucki y Sujkowska, 2008).

Hay estudios que demuestran que los rizobios de rápido crecimiento tienen mayor tolerancia a la salinidad por la capacidad de acumular más rápidamente poliaminas (estabilizador osmótico) y utilizan con mayor rapidez nutrientes necesarios para el crecimiento y la multiplicación en comparación con los rizobios de lento crecimiento (Marquina *et al.*, 2011). Las bacterias tolerantes también pueden acumular diferentes compuestos azucarados intracelularmente como almidón, actuando luego como fuente de energía y osmoregulador (Hunt y Layzell, 1993)

La salinidad es un factor de estrés muy importante para los rizobios porque inhibe la persistencia y desarrollo de los microorganismos, consecuentemente la selección de cepas de rizobios tolerantes a la salinidad es de gran importancia para las zonas de cultivo de alfalfa, que son afectadas por esta condición del suelo (Elboutahiri *et al.*, 2010).

Diversos autores han realizado el aislamiento, identificación y caracterización de aislados de rizobios tolerantes a altas concentraciones de NaCl, estos estudios permitieron mejorar el establecimiento de las leguminosas en los suelos afectados por esta limitante, incrementar la materia orgánica de los suelos y disminuir la erosión de los mismos (Nichols *et al.*, 2009; Vriezen *et al.*, 2007).

La combinación de cultivares resistentes a la salinidad y también de rizobios tolerantes a este estrés puede resultar una ventaja en el crecimiento y supervivencia de la leguminosa bajo condiciones salinas (Hashem *et al.*, 1998; Nogales *et al.*, 2002)

La búsqueda y selección de microorganismos se realizará en suelos de diferentes zonas productivas del país. Con el desarrollo de este plan de investigación y la realización del análisis de los rizobios aislados de suelos de Argentina, es probable que nos permita identificar individuos con una mayor tolerancia a la salinidad de los suelos y con capacidad solubilizadora de fósforo, obteniendo individuos con potencial biotecnológico que podrían ser utilizados en la producción de inoculantes.

### **3 HIPÓTESIS:**

Las poblaciones naturalizadas en nuestro país, de rizobios simbioses de *Medicago sativa* son tolerantes al estrés salino y son capaces de solubilizar fósforo, lo que les da valor biotecnológico para su aislamiento y futuro aprovechamiento.

### **3.1 Objetivo general:**

Identificar cepas de rizobios simbiotes de alfalfa aislados de diferentes zonas productoras que se destaquen por su capacidad para solubilizar fósforo y resistan ambientes salinos, que hacen a la capacidad competitiva de los rizobios en el suelo.

### **3.2 Objetivos específicos:**

- Aislar cepas de distintos suelos de Argentina representativos de zonas de cultivo de alfalfa.
- Crear un cepario con los aislados provenientes de diferentes zonas productoras de alfalfa.
- Caracterizar los aislados según: la tolerancia a la salinidad y su capacidad de solubilización de fósforo.
- Evaluar la infectividad de los aislados determinando el número de nódulos y su disposición en la raíz de la planta. (Porcentaje de plantas noduladas y Determinación del Número de Nódulos en la raíz principal).

## **4 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 Generación de una colección de aislados simbiotes de alfalfa**

Fueron seleccionados los sitios de muestreo en diferentes zonas de la pampa húmeda abarcando las provincias de Buenos aires, Entre Ríos, y de sitios extrapampeanos como la provincia del Chubut.

### **4.2 Características de los sitios de muestreo**

**Zona de Trelew** (43° 17' 45" Lat. S, 65° 24' 1" Long. O). Las coordenadas geográficas se refieren al lugar de muestreo.

Es una ciudad del valle inferior del río Chubut, en el noreste de la provincia del Chubut en la Patagonia Argentina. Se encuentra a 1.451 km de Buenos Aires y a 17 km de Rawson, la capital provincial.

El valle está situado entre los paralelos 43 y 44 de latitud sur, en el territorio patagónico argentino. El riego se inició en el año 1867 con el asentamiento de una colonia galesa. El valle posee un clima árido desértico. El valle inferior tiene una extensión de aproximadamente 48.000 ha susceptibles de ser regadas. No obstante existen limitaciones de suelos que disminuye apreciablemente esa superficie. Actualmente se riegan entre 19.000 y 23.000 ha.

El sistema de riego es de baja eficiencia, por el sistema de entrega a demanda libre. La modalidad de riego utilizada a nivel de predio es por manto en los cultivos de alfalfa y forrajeras en general, y por medio de surcos se suministra a cultivos de papa y otras hortalizas.

En esta zona seleccionamos muestras de suelos de potreros que se encontraban implantados con alfalfa pura para corte. Los potreros se encuentran ubicados en la chacra 166, perteneciente a la localidad de Trelew. Capacidad de uso para el riego: II st d. suelo con posibles evidencias de hidromorfismo, con requerimientos especiales en prácticas de drenaje, y sin o ligeros problemas de salinidad y sodicidad. Orden de suelo predominante: Vertisol.

**Partido de Arrecifes** (34° 12' 18.508 " Lat. S, 60° 6' 13.705 " Long. O)

Ubicado al norte de la provincia de Buenos Aires. Los cultivos que se desarrollan en la zona son soja- maíz, trigo, girasol. En el lote donde se tomaron las muestras han transcurrido 18 años sin una pastura implantada.

**Serie: Arroyo dulce (AD)**

Es un suelo oscuro, muy profundo, con aptitud agrícola, en un paisaje de lomas extendidas, en posición de loma de la Subregión Pampa Ondulada alta, formado en sedimentos loésicos, franco limoso, no alcalino, no salino, con gradiente de 0 a 3 %.

Bien drenado, escurrimiento medio, permeabilidad moderadamente lenta. Capacidad de uso I-1 Clasificación taxonómica: Argiudol típico. Limitaciones de uso: susceptibilidad a la erosión hídrica moderada.

**Partido de Magdalena** (35° 24 '30.254 " S, 57° 50 '50.154 " O).

Serie Brandsen (Br). Es un suelo grisáceo, profundo, con aptitud agrícola, en un paisaje de lomas o planos relativamente altos de la cuenca del Río Samborombón, en posición de loma, en la Subregión pampa ondulada alta, moderadamente bien drenado; se ha desarrollado a partir de sedimentos loésicos franco limoso, tiene horizonte argílico con cambio textural abrupto, no alcalino, no salino, con pendientes entre 0 a 1 %. Moderadamente bien drenado, escurrimiento medio, permeabilidad moderadamente lenta, capa freática profunda. Capacidad de uso II w. Clasificación taxonómica Hapludol Tupto Árgico. Limitaciones de uso Bt fuertemente textural que limita el drenaje.

**Zona de Colón** (32° 14 '6.227 " S, 58° 11 '7.648 " O).

Serie Los Charrúas (LCh): Los suelos de esta serie son profundos y de colores oscuros. Los materiales originales que formaron esta serie están constituidos por una mezcla de los sedimentos arcillosos, redepositados con materiales arenosos característicos de las terrazas del río Uruguay. Imperfectamente drenado; escurrimiento superficial lento. Permeabilidad lenta a muy lenta. Napa freática profunda. Limitaciones de uso erosión actual leve y tienen susceptibilidad potencial moderada. Clasificación taxonómica Argiudol vértico.

#### **4.3 Preparación de material**

Todo el material empleado en los trabajos de laboratorio se acondicionó y esterilizó en autoclave a 121°C con 1 atm de sobre presión durante 20 minutos.

#### **4.4 Medios de cultivo**

Las bacterias se cultivaron en medio **YEM** (Yeast Extract Mannitol):

Manitol 10 g/l

SO<sub>4</sub>Mg 0,2 g/l

PO<sub>4</sub>HK<sub>2</sub> 0,5 g/l

NaCl 0,1 g/l

Extracto de levadura 0,4 g/l

pH 6,9. Cuando se formuló el medio sólido se le adicionó 18 g/l de agar agar. El medio además contiene Rojo Congo (1:400) 10 ml. (Vincent, 1970).

Los microorganismos se cultivaron en cajas de Petri y tubos de repique y en YEM líquido. El cultivo en medio líquido se realizó incorporando oxígeno al medio por agitación en un agitador orbital (150 rpm) a 28°C en oscuridad durante 3 días.

#### **Solución nutritiva para plantas**

Cl<sub>3</sub>Fe 1 g/l

SO<sub>4</sub>Mg. 7H<sub>2</sub>O 2 g/l

NaCl 2 g/l

PO<sub>4</sub>HCa 10 g/l

PO<sub>4</sub>HK 2 g/l

Agua 1000 ml.

#### **Solubilización de Fósforo (P)**

Se empleó un medio de cultivo sólido suplementado con una fuente de fósforo insoluble (Mendoza Paredes, 2010), en donde se sembraron los aislados. La capacidad solubilizadora se determinó en base a la formación de un halo transparente alrededor de las colonias de cada cepa (figura 3).

#### **Medio para solubilización de P: MMSFCP-Mg**

### Componentes (g/l)

Glucosa 10 g/l

(PO<sub>4</sub>) Ca<sub>3</sub> 5 g/l

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 g/l

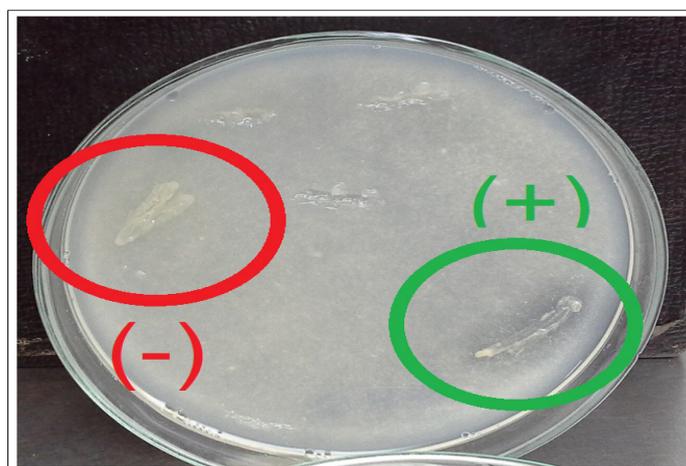
Extracto de levadura 0, 5 g/l

MgCl<sub>2</sub> 3 g/l

Agar 18 g/l

Agua bidestilada 1000 ml.

**Cepa control empleada: inoculante comercial para alfalfa: *Ensifer meliloti* B399**



**Figura 3: Medio de cultivo con fuente de fósforo insoluble.** Referencia: Se observa resultado positivo de solubilización de fósforo (círculo verde); resultado negativo (círculo rojo).

### Medio para evaluar tolerancia a salinidad

Para evaluar la tolerancia de los aislados bacterianos a la salinidad, se utilizaron placas con medio YEM sólido a pH 6.9 con rojo congo y se adicionaron diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl): 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 y 3.5 %. Como control del experimento se utilizó el medio YEM con su correspondiente concentración de NaCl (0.01 %). Todas las placas se incubaron a 28°C durante 3 días.

### **Ensayos para evaluar la infectividad de los aislados:**

Las plantas se cultivaron en recipientes plásticos estériles de seis centímetros (8 cm) de diámetro por seis centímetros (8 cm) de altura con vermiculita. Los recipientes se colocaron en bandejas plásticas, para mantener aisladas a todas las macetas inoculadas con la misma cepa y evitar contaminaciones cruzadas.

Las semilla de cada tratamiento de inoculación y la semilla control no inoculada (control negativo) o inoculada con *E. meliloti* B399 (control positivo), se sembraron en los recipientes, a una profundidad no mayor a dos (2) veces el tamaño de la semilla. Las bandejas con los recipientes plásticos conteniendo las semillas se colocaron en la cámara de cultivo. Se utilizó un fotoperiodo de 14 hs diarias y se mantuvo la temperatura entre 20 y 25° C. Fueron regadas con la solución nutritiva Yensen. A los 25 días de la siembra se procedió a realizar la evaluación.

#### **4.5. a Método de determinación del Porcentaje de Plantas Noduladas**

Se determinó el porcentaje de plantas noduladas (PPN) por el Método Burton (Capítulo 12; SENASA Resolución 264/2011). Se eligió este método para la evaluación, ya que sus resultados tienen validez nacional y, a su vez, permite hacer comparaciones con otros ensayos realizados con la misma metodología.

Para la cuantificación de la nodulación se consideró como positivas aquellas plantas con 1 o más nódulos, ubicados en la parte superior de la raíz, en la cual se define un cilindro imaginario con eje central en la raíz principal, con un diámetro de 2,5 cm y una longitud de 2,5 cm como se observa en la figura 4. Se identificó el número de nódulos en raíz principal y en secundaria.

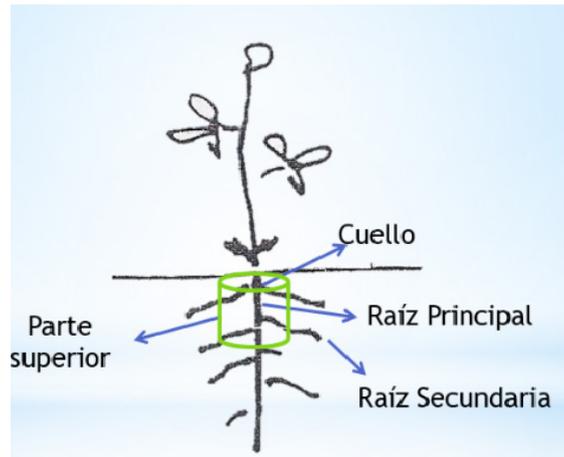


Figura 4: Representación gráfica del cilindro imaginario definido para la cuantificación de nódulos con el método PPN.

Los resultados se expresan como porcentaje de plantas noduladas satisfactoriamente. Se considera como satisfactorio aquel ensayo que cuente con un mínimo de ochenta por ciento (80%) de plantas positivas (noduladas).

#### **Estrategia para aislar las cepas.**

Obtención de los aislados: se utilizaron macetas con muestras de suelo de los diferentes sitios y se colocaron semillas estériles de alfalfa var. Monarca, como planta hospedera, en condiciones controladas de luz y humedad (fotoperiodo de 14 hs diarias y temperatura entre 20 y 25° C).

Los aislados se conservaron en una solución de glicerol en tubos eppendorf y a una temperatura de -20°C.

## **5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **5.1 Tolerancia a la salinidad**

La salinidad en los suelos es un problema para la agricultura del mundo, siendo el factor que más limita la productividad de los cultivos (Gouia *et al.*, 1994). Las sales tienen efectos adversos sobre las propiedades físicas y químicas y sobre los procesos

microbiológicos del suelo. Los suelos afectados por sales representan cerca del 15% de las tierras áridas y semiáridas del mundo y además representan 40% de las tierras irrigadas (Hoffman *et al.*, 1980; Shannon, 1984; Serrano y Gaxiola, 1994, Gili, 2004). En el año 2006, la superficie afectada por sales en Argentina era de 600.000 ha (Siebert *et al.*, 2006).

Los problemas que genera la salinización son entre otros, una disminución de la disponibilidad de agua al punto de reducir los rendimientos de los cultivos, aumento de toxicidad por la acumulación de iones como el sodio, cloro y boro (Sanchez, 2015) y también se pueden ver afectados procesos específicos como la simbiosis *Rhizobium*- Leguminosa.

En el presente trabajo se procedió a elaborar una colección de 65 aislados simbiotes de *Medicago sativa*, y posterior caracterización. Se evaluó el comportamiento de los aislados en distintas concentraciones de NaCl, Los resultados de la tolerancia a la salinidad muestran que la cepa de referencia de *E. melliloti* B399 presentó crecimiento hasta una concentración de NaCl del 2,5% (Tabla 1). A la concentración salina de 2,5%, alrededor del 71% de las cepas registraron crecimiento, mientras que al 3% de concentración de NaCl, solo el 33% de las cepas lo hizo. Cuando la concentración de NaCl fue de 3,5%, solo el 13 % de las cepas demostraron crecimiento aunque este fue de menor proporción comparándolo con el testigo. A resultados similares arribó Mashhady *et al.*, 1997, en Arabia Saudita, trabajando con dos cepas de simbiotes de alfalfa importadas (*E.melliloti* NRG<sub>185</sub> y Can.A<sub>2</sub>) en un medio al 3,5% NaCl observó una supervivencia del 15% y 17,3% respectivamente. Otros investigadores encontraron que el límite de tolerancia a la salinidad para simbiotes de *Medicago sativa* L. es menor o igual al 3% NaCl (Mohammad y Campbell, 1991; Lakshmi- Kumari *et al* 1974). Algunos reportes han mostrado que simbiotes toleraban 0,5 – 0,7 % NaCl (Yadav y Vyas, 1971). Por lo tanto, es importante la selección de simbiotes tolerantes a la salinidad para su utilización como inóculo en suelos salinos.

**Tabla 1: Crecimiento de los Aislados a distintas concentraciones de NaCl.**

Cepa Denominación	Origen	Código	Niveles de Salinidad								
			Concentración de CINA ( %)								
			0	0,1	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5
B399	INTA*	Inoculante	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-	-
2	Magdalena	J3	+++	+++	+++	++	+	+	+	-	-
3	Magdalena	J4	+++	+++	+++	++	+	+	+	-	-
4	Magdalena	J5	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+
5	Magdalena	J6	+++	+++	+++	+	+	+	+	-	-
6	Magdalena	J7	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+
7	Magdalena	J8	+++	+++	+++	++	+	+	-	-	-
8	Magdalena	J9	+++	+++	+++	+	+	+	-	-	-
9	Magdalena	J10	+++	+++	+++	++	+	+	-	-	-
10	Magdalena	J11	+++	+++	+++	++	+	+	-	-	-
11	Magdalena	J12	+++	+++	+++	++	++	++	+	+	+
12	Magdalena	J14	+++	+++	+++	++	++	++	+	+	+
13	Magdalena	J15	+++	+++	+++	++	++	++	+	+	+
14	Magdalena	J16	+++	+++	+++	++	++	++	-	-	-
15	Magdalena	J17	+++	+++	+++	++	++	++	-	-	-
16	Magdalena	J19	+++	+++	+++	++	++	++	-	-	-
17	Magdalena	J20	+++	+++	+++	++	++	+	-	-	-
18	Magdalena	J21	+++	+++	+++	++	++	+	-	-	-
19	Magdalena	J22	+++	+++	+++	+	+	+	-	-	-
22	Trelew	T4	+++	+++	+++	++	++	++	+	-	-
23	Trelew	T5 BIS	+++	+++	+++	++	+	+	+	-	-
24	Trelew	T6	+++	+++	+++	++	++	+	+	-	-
25	Trelew	T7	+++	+++	+++	++	++	++	+	-	-
26	Trelew	T8	+++	+++	+++	++	++	++	+	-	-
27	Trelew	T9	+++	+++	+++	++	++	++	+	-	-
28	Trelew	T10	+++	+++	+++	++	++	++	+	-	-
29	Trelew	T11	+++	+++	+++	++	++	++	+	-	-
30	Trelew	T13	+++	+++	+++	++	++	+	-	-	-
31	Trelew	T14	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-
32	Trelew	T15	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	-	-
33	Trelew	T16	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	-
34	Trelew	T17	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	-
35	Trelew	T18	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+
36	Trelew	T19	+++	+++	+++	+++	+++	+	-	-	-
37	Trelew	T20	+++	+++	+++	+++	+++	+	-	-	-
38	Magdalena	F1	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	-	-
39	Magdalena	F3	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+
40	Magdalena	F4	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	-	-
42	Magdalena	F6	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	-
43	Magdalena	F9	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	-
44	Entre Ríos	ER1	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	-
45	Entre Ríos	ER2	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	-
46	Entre Ríos	ER3	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	-
47	Entre Ríos	ER4	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	-
48	Entre Ríos	ER5	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	-
49	Entre Ríos	ER6	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	-
53	Arrecifes	A1y2	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-
54	Arrecifes	A3	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-	-
55	Arrecifes	A4	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-	-
56	Arrecifes	A5y6	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-
57	Arrecifes	A8	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-	-
58	Arrecifes	A9	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-
59	Arrecifes	A10	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-	-
61	Arrecifes	A12	+++	+++	+++	++	++	++	+	+	-
62	Arrecifes	A13	+++	+++	+++	++	++	+	-	-	-
63	Arrecifes	A14	+++	+++	+++	++	++	++	+	+	-
64	Arrecifes	A15	+++	+++	+++	++	++	+	-	-	-
65	Arrecifes	A16	+++	+++	+++	++	++	+	-	-	-
66	Arrecifes	A17	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	+

Los aislados provenientes de Magdalena, presentaron la mayor tolerancia a la concentración de NaCl 3,5 % (Tabla 2). Estos resultados concuerdan con lo expresado por Mashhady *et al.*, (1997) quienes encontraron que la mayor tolerancia a la salinidad fue expresada por aquellos aislados provenientes de zonas con suelos salinos, esto

indicaría la influencia de las características del suelo en algunos parámetros de los simbiontes como es la tolerancia a la salinidad.

**Tabla 2: Aislados tolerantes a la concentración de 3,5 % de NaCl**

<b>Origen</b>	<b>Número de aislados</b>	<b>Porcentaje de aislado tolerantes al 3,5 % de NaCl</b>
Magdalena	23	26%
Arrecifes	13	7,69%
Trelew	16	6,25%
Colón	6	0%

### **5.2 Solubilización de Fósforo:**

La cepa de referencia B399 no demostró la capacidad de solubilizar fósforo inorgánico. Del total de los aislados, sólo el 8% fue capaz de solubilizar el fósforo del medio de cultivo. Los aislados de las localidades de Colón (Entre Ríos) y Arrecifes (Buenos Aires) manifestaron mejor capacidad solubilizadora de fósforo (Tabla 3). Se conoce que la presencia de ácidos orgánicos, producidos por las rizobacterias, aumenta la disponibilidad de P, ya que modifican el pH en la rizósfera de la planta acidificándolo como así también favorecen la disponibilidad de micronutrientes, como Fe, Zn y Mn, en el suelo al disminuir el pH, o por la quelación de estos micronutrientes. Los ácidos glucónico y 2-cetoglucónico son los agentes más frecuentemente reportados como solubilizadores de fosfato. Se han descrito metabolitos solubilizadores de fosfato como el ácido 2-cetoglucónico, sintetizado por *Rhizobium leguminosarum* y *E. meliloti* (Halder *et al.*, 1990).

**Tabla 3: Evaluación de la Solubilización de Fósforo:**

Origen	Número de aislados evaluados	Solubilización de fósforo Número de aislados positivos
Magdalena	23	0
Trelew	16	0
Colón	6	1 (Aislado: 46)
Arrecifes	13	4 (Aislados: 54,56,61,63)

### 5.3 Evaluación de la infectividad

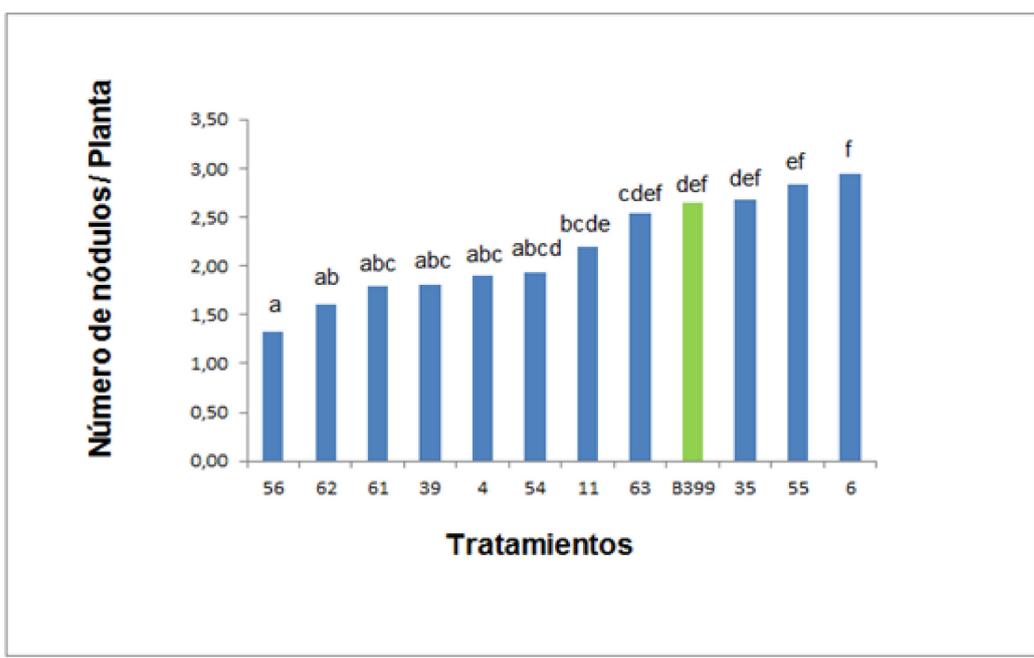
#### 5.3.a. Porcentaje de plantas noduladas

Los aislados evaluados indujeron la formación de nódulos en un porcentaje de plantas superior al 80% con excepción del aislado 63, tratamiento en el que sólo el 55% de las plantas presentaron nódulos (Tabla 4).

**Tabla 4: Porcentaje de plantas noduladas**

Cepa	Total de Plantas observadas por Tratamiento	Plantas noduladas (%)
B399	20	100,00%
4	20	95,00%
6	17	100,00%
11	20	100,00%
35	17	94,12%
39	20	80,00%
54	18	88,89%
55	20	95,00%
56	20	90,00%
61	15	93,33%
62	20	100,00%
63	20	55,00%

Se observó que en los tratamientos inoculados con los aislados 6,11 (Magdalena) y 62 (Arrecifes), fueron noduladas el 100% de las plantas y tuvieron el mismo comportamiento que el tratamiento inoculado con la cepa de referencia B399. El resto tuvo valores de plantas noduladas entre el 80 y 90%. La cepa 63 (Arrecifes) tuvo un mínimo valor de nodulación que fue del 55%. La capacidad de formar nódulos por parte de los microorganismos en condiciones de laboratorio, no permite asegurar que en condiciones de campo se generen resultados similares, pero por el contrario, la falta o escasa nodulación en condiciones de laboratorio, es información suficiente para considerar que el aislamiento debe ser descartado (Peticari, 2013).



**Figura 5: Evaluación de la infectividad. Número de nódulos por planta.** Referencia: Letras iguales sobre las columnas indican diferencias no significativas entre las cepas (test LSD,  $p < 0,05$ ).

### 5.3.b. Determinación del Número de Nódulos en la raíz principal

En la mayoría de los tratamientos los nódulos se ubicaron mayormente en la raíz principal. Sin embargo los aislados 6 (Magdalena), 35 (Trelew), 55 y 63 (Arrecifes) presentaron una proporción de nódulos ubicados en raíz principal

menor con respecto a los nódulos ubicados en raíz secundaria. Esto es una desventaja en la competitividad debido a que en el suelo los rizobios que están como población naturalizada tendrían mayor probabilidad de formar nódulos.

Como dato complementario se contabilizaron los nódulos ubicados en la raíz principal, para diferenciarlos de aquellos formados en raíces secundarias. Este dato es de importancia ya que expresa la capacidad competitiva del simbiote. La cual es una característica importante, según a lo expresado por algunos autores que manifestaron que los simbioses difieren en la eficiencia de la fijación de nitrógeno, la sensibilidad a factores ambientales y en la capacidad de nodulación (Depret *et al.*, 2008).

**Tabla 5: Porcentaje de nódulos ubicados en la raíz principal**

Tratamientos	Porcentaje del total de nódulos observados que están ubicados en la raíz principal
B399	73,58%
4	94,44%
6	62,00%
11	95,45%
35	53,49%
39	89,66%
54	87,10%
55	57,41%
56	91,67%
61	92,00%
62	87,50%
63	42,86%

La presencia de nódulos en los primeros centímetros indicaría que las cepas presentan un proceso rápido de infección y nodulación, marcando una ventaja competitiva en relación a otras (Handelsman, 1984).

Si se comparan los resultados obtenidos de los aislamientos en distintos parámetros, como ser tolerancia a la salinidad, capacidad de solubilización de fósforo, infectividad, se pueden apreciar lo siguiente:

Los aislamientos 11 y 6, alcanzaron muy buenos resultados de la tolerancia a la salinidad (crecimiento a 3,5% NaCl) e infectividad (100%). En una situación similar se encontraron los tratamientos 35 y 55, con la salvedad de que este último presentó menor tolerancia a la salinidad (crecimiento a 2,5% NaCl).

Un caso particular fue el del aislado 63, el cual presentó un buen resultado en la tolerancia a la salinidad (3% NaCl), buena capacidad de solubilizar fósforo, pero una muy baja capacidad infectiva (55%) con lo cual se puede deducir que posee muy baja capacidad competitiva y no sería recomendable su uso.

El aislado 54 es un caso particular, ya que presentó valores intermedios en cuanto a la tolerancia a la salinidad (2,5%), el 89% de las plantas nodularon según los parámetros establecidos por SENASA y presenta capacidad de solubilizar fósforo.

Los aislados 4 y 39, han manifestado buena tolerancia a la salinidad (3,5%) y nodularon el 100 y 89% de las plantas según SENASA.

## **6 CONCLUSIÓN:**

En este trabajo se observó que las cepas aisladas de suelos provenientes de diversas zonas de cultivo, mostraron diferente comportamiento con respecto a la tolerancia a la salinidad y a la capacidad de solubilizar fósforo.

En las poblaciones naturalizada de rizobios simbiotes de *Medicago sativa* se han detectado aislados que son más tolerantes al estrés salino y otros que son capaces de solubilizar fósforo.

Posiblemente las propiedades del suelo hicieron que las cepas presentaran diversidad en las características estudiadas al influir el ambiente sobre estos microorganismos.

Las cepas aisladas que demostraron tolerancia a altas concentraciones de sales, permitirían la implantación de cultivares de alfalfa en zonas que son afectadas por esta problemática.

Sería conveniente continuar con el estudio de las cepas de simbiontes de alfalfa que solubilizan fósforo para evaluar la eficiencia de la fijación de nitrógeno, ya que el fósforo juega un importante rol en la producción de los cultivos, siendo el empleo de estos microsimbiontes de gran utilidad para futuras aplicaciones biotecnológicas.

## 7 BIBLIOGRAFÍA:

**Álvarez, L; Magdalena T; Morazzo, G; Noellemeier, E.** 2016. Evaluación de fósforo Bray-Kurtz 1 y Olsen en toposecuencias de la Región Semiárida Central. XXV Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo "Ordenamiento Territorial: Un Desafío para la Ciencia del Suelo". Compiladores: Cholaky, C y Cisneros, J.

**Arenas, F; Antonini, C y Barros, A.** 2014. Alfalfa: la reina de las forrajeras Miembros de la Cátedra de Agricultura Especial – Universidad Nacional de Cuyo. Diario Los Andes.

**Banik, S., & Dey, B. K.** 1982. Available phosphate content of an alluvial soil as influenced by inoculation of some isolated phosphate-solubilizing micro-organisms. *Plant and soil*, 69(3), 353-364.

**Basigalup, D. H., Rossanigo, R. O., & Ballario, M. V.** 2007. Panorama actual de la alfalfa en la Argentina.

**Basigalup, D., & Manfredi, M. D. A. I.** 2014. Situación de la alfalfa en Argentina. Jornada Nacional de Forrajes Conservados. 5. 2014 04 09-10, 09 y 10 de abril de 2014. Manfredi, Córdoba. AR.

**Basigalup, D. H. R., Rodríguez, R. O., Spada, N. E., Collino, M. D. C., Dardanelli, D. J., De Luca, J. L. & Pagano, F.** 2007. El cultivo de la alfalfa en la Argentina.

**Baziramakenga, R., Simard, R. R., & Leroux, G. D.** 1995. Determination of organic acids in soil extracts by ion chromatography. *Soil Biology and Biochemistry*, 27(3), 349-356.

**Berardo, A.; Marino, M.A.** 2000a. Producción de forraje de alfalfa bajo diferentes niveles de nutrición fosfatada en el sudeste bonaerense. *Revista Argentina de Producción Animal*. Vol. 20.

**Berardo, A. y Marino, M. A.** 2001. Fertilización fosfatada de alfalfa en el sudeste bonaerense. *Acción Rural* año 6 n° 30 ISSN 1514-9323.

**Bertin,** 2006. Producción y futuro de la alfalfa en la Argentina. *Bolsa de cereales de Buenos Aires*.

**Bhardwaj, K. K. R.** 1975. Survival and symbiotic characteristics of *Rhizobium* in saline-alkali soils. *Plant and soil*, 43(1-3), 377-385.

**Borucki W, Sujkowska M.** 2008 The effects of sodium chloride-salinity upon growth, nodulation, and root nodule structure of pea (*Pisum sativum* L.) plants. *Acta Physiol Plant* 30:293–301.

**Bromfield, E. S. P; Tambong, J. T; Cloutier, S. Pre´ vost, D. Laguerre, G; van Berkum, P; Tran Thi, T. V; Assabgui R and Barran, L. R.** 2010. Ensifer, *Phyllobacterium* and *Rhizobium* species occupy nodules of *Medicago sativa* (alfalfa)

and *Melilotus alba* (sweet clover) grown at a Canadian site without a history of cultivation. *Microbiology* 156, 505–520

**Chen L.S.; Figueredo A.; Villani H.; Michajluk J. y Hungria M.** 2002. Diversity and symbiotic effectiveness of rhizobia isolated from field-grown soybean nodules in Paraguay. *Biol Fertil Soils* 35:448–457.

**Coba de la Peña T, Verdoy D, Redondo FJ, Pueyo JJ** 2003. Salt tolerance in the *Rhizobium*-legume symbiosis: an overview. In: Pandalai SG(ed) Recent research developments in plant molecular biology. Research Singpost, Trivandrum, pp 187-205.

**Coba de la Peña T, Cárcamo CB, Almonacid L, Zaballos A, Lucas MM, Balomenos D, Pueyo JJ** 2008. A salt stress-responsive cytokinin receptor homologue isolated from *Medicago sativa* nodules. *Planta* 227:769–779.

**Christian, K. R.** 1977. Effects of the environment on the growth of alfalfa. *Advances in Agronomy*, 29, 183-227.

**Coyne, M.** 2000. *Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio* (No. 631.46 C881m). Madrid, ES: Edit. Paraninfo.

**Craig, G. F., Atkins, C. A., & Bell, D. T.** 1991. Effect of salinity on growth of four strains of *Rhizobium* and their infectivity and effectiveness on two species of *Acacia*. *Plant and Soil*, 133(2), 253-262.

**Das, F., Luyten, E., Michiels, J., & Vanderleyden, J. Spaepen, S.,** 2009. Indole-3-acetic acid-regulated genes in *Rhizobium etli* CNPAF512. *FEMS microbiology letters*, 291(2), 195-200.

**Danso, s.k.a. y D.I. Eskew.** 1984. Aumento de la capacidad de fijación biológica del nitrógeno. OIEA BOLETÍN, VOL.26, n° 2

**David B. Hannaway. et al** Inoculating Alfalfa and clover seed. Prepared by David B. Hannaway, Extension agronomist, William S. McGuire, Professor of agronomy, and Harold W. Youngberg, Extension agronomist, Oregon State University, Corvallis 1981.

**Del Papa MF, Balague LJ, Sowinski SC, Wegener C, Segundo E, Abarca FM, Toro N, Niehaus K, Pühler A, Aguilar OM, Martinez-Drets G, Lagares** 1999. A: Isolation and characterization of alfalfa-nodulating rhizobia present in acidic soils of central Argentina and Uruguay. *Appl Environ Microbiol*, 65:1420-1427.

**Del Pozo Inañez, M.** 1977. *La alfalfa, su cultivo y aprovechamiento* (2° ed.). Ediciones Mundi- Prensa Madrid, España, 379 p.

**Demin P. y Aguilera J. J.** 2012. Efecto del régimen de riego en el rendimiento de alfalfa para corte en el Valle Central de Catamarca, Argentina. *Rev. FCA UNCUYO*. 2012. 44(1): 173-181. ISSN impreso 0370-4661. ISSN (en línea) 18538665.

**Depret, G., & Laguerre, G.** 2008. Plant phenology and genetic variability in root and nodule development strongly influence genetic structuring of *Rhizobium*

leguminosarum biovar viciae populations nodulating pea. *New Phytologist*, 179(1), 224-235.

**Díaz-Zorita, M., y S. Gambaudo.** 2007. Capítulo 11: Fertilización y encalado en alfalfa. En *El Cultivo de la Alfalfa en Argentina*. Basigalup (Editor). INTA Manfredi. ISBN 978-987-521-242-8. pp. 227-246. Disponible [http://inta.gob.ar/sites/default/files/inta-el\\_cultivo\\_de\\_la\\_alfalfa\\_en\\_la\\_argentina.pdf](http://inta.gob.ar/sites/default/files/inta-el_cultivo_de_la_alfalfa_en_la_argentina.pdf) [Verificación: febrero de 2017].

**Duval, M. E., Galantini, J. A., Iglesias, J. O., Canelo, S., Martinez, J. M., & Wall, L.** 2013. Analysis of organic fractions as indicators of soil quality under natural and cultivated systems. *Soil and Tillage Research*, 131, 11-19

**Elboutahiri, N. Thami-Alami, I. Sripada M Udupa.** 2010. Phenotypic and genetic diversity in *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae* from drought and salt affected region of Morocco. *Microbiology* DOI: 10.1186/1471-2180-10-15,.BMC.

**Ferguson, B., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M., Lin, Y., Reid, D., & Gresshoff, P.** 2010. Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52(1), 61-76.

**Fernández-Pascual M, de Lorenzo C, de Felipe MR, Rajalakshmi S, Gordon AJ, Thomas BJ, Minchin FR** 1996. Possible reasons for relative salt stress tolerance in nodules of white lupin cv. Multolupa. *J Exp Bot* 47:1709–1716.

**Galantini, A. y Suñer, L.** 2013. El fósforo en Agroecosistemas de Argentina. Implicancias para la producción sustentable. Boletín electrónico N° 23. Recuperado de <http://www.boletin.cerzos-conicet.gob.ar/index.php/articulos/el-fosforo-en-agroecosistemas-de-argentina>.

**García, F., Micucci, F., Rubio, G., Ruffo, M., & Daverede, I.** 2002. Fertilización de forrajes en la región pampeana. Una revisión de los avances en el manejo de la fertilización de pasturas, pastizales y verdeos. Instituto de la Potasa y el Fósforo. INFOPOS-Cono Sur.

**Gerretsen, F. C.** 1948. The influence of microorganisms on the phosphate intake by the plant. *Plant and Soil*, 1(1), 51-81.

**Gili, S., Marando, I., Irisarri, E., & Sagardoy, R.** 2004. Efecto de las técnicas de lavado y fertilización sobre la salinidad en suelos del Alto Valle de Río Negro y Neuquén, Argentina. *Agricultura Técnica*, 64(3), 295-304.

**Goldstein, A., Lester, T., & Brown, J.** 2003. Research on the metabolic engineering of the direct oxidation pathway for extraction of phosphate from ore has generated preliminary evidence for PQQ biosynthesis in *Escherichia coli* as well as a possible role for the highly conserved region of quinoprotein dehydrogenases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1647(1), 266-271.

**Gómez Padilla, E. J., Argentel Martínez, L., Amador, C., Alarcón Barrero, K., López Sánchez, R., Ruiz-Díez, B., & Eichler-Loebermann, B.** 2013. Evaluación de la tolerancia a la salinidad en frijol Caupí a partir de variables relacionadas con la nodulación y la acumulación de nitrógeno foliar. *Cultivos Tropicales*, 34(3), 11-16.

**Gouia, H., Ghorbal, M. H., & Touraine, B.** 1994. Effects of NaCl on flows of N and mineral ions and on NO<sub>3</sub>-reduction rate within whole plants of salt-sensitive bean and salt-tolerant cotton. *Plant Physiology*, 105(4), 1409-1418.

**Halder A K, Chakrabarty P K.** 1993. Solubilization of inorganic phosphates by *Rhizobium*. *Folia Microbiol.* 38:325-330.

**Halder A K; Mishra A K; Bhattacharyya P; Chakrabarty P K.** 1990. Solubilization of rock phosphate by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 36:81-92.

**Hashem F.M., Swelim D.M., Kuykendall L.D., Mohamed A.I., Abdel-Wahab S.M. and Hegazi N.I.** 1998. Identification and characterization of salt- and thermotolerant *Leucaena*-nodulating *Rhizobium* strains. *Biology and Fertility of Soils*. 27: 335-341.

**Hijano, E. H., and D. H. Basigalup.** 1995. El cultivo de la alfalfa en la República Argentina, p. 151,152. *In* E. H. Hijano and A. Navarro (ed.), *La alfalfa en la Argentina*. INTA C. R. Cuyo, Editar, San Juan, Argentina.

**Hoffman, G.J., R.S. Ayers, E.J. Doering, and B.L. McNeal.** 1980. Salinity in irrigated agriculture. p. 1455-185. *In* Design and operation of farm irrigation systems. American Society of Agricultural Engineering, St. Joseph, Michigan, USA.

**Howieson, J. G., and M. A. Ewing.** 1989. Annual species of *Medicago* differ greatly in their ability to nodulate on acid soils. *Aust. J. Agric. Res.* 40:843–850.

**Howieson, J. G., M. A. Ewing, and M. F. d'Antuono.** 1988. Selection for acid tolerance in *Rhizobium meliloti*. *Plant Soil* 105:179–188.

**Hunt, S., & Layzell, D. B.** 1993. Gas exchange of legume nodules and the regulation of nitrogenase activity. *Annual review of plant biology*, 44(1), 483-511.

**Igual, J., Valverde, A., Cervantes, E., & Velázquez, E.** 2001. Phosphate-solubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use of updated molecular techniques in their study. *Agronomie*, 21(6-7), 561-568.

**Illmer, P. and F. Schinner.** 1995. Solubilization of inorganic calcium phosphates solubilization mechanisms. *Soil Biol. Biochem.* 27: 257–263

**INTA.** Carta de suelos de la Provincia de Buenos Aires. Disponible en <https://anterior.ita.gov.ar/suelos/cartas/index.htm>.

**INTA Paraná.** Cartas de suelos de Entre Ríos. Disponible en [http://geointa.inta.gov.ar/geoparana/www/files/LOS\\_CHARRUAS.pdf](http://geointa.inta.gov.ar/geoparana/www/files/LOS_CHARRUAS.pdf). Último acceso Agosto 2017.

- James EK, Sprent JI, Hay GT, Minchin FR** 1993. The effect of irradiance on the recovery of soybean nodules from sodium chloride-induced senescence. *J Exp Bot* 44:997–1005.
- Kucey, R. M. N., Janzen, H. H., & Leggett, M. E.** 1989. Microbially mediated increases in plant-available phosphorus. *Advances in agronomy*, 42, 199-228.
- Lus, Juan.** 2015. Boletín todo agro. Sitio argentino de producción animal. (consultado 09/2017).
- Marek-Kozaczuk, M. O. N. I. K. A., Wielbo, J., Pawlik, A. N. N. A., & Skorupska, A. N. N. A.** 2014. Nodulation competitiveness of Ensifer meliloti alfalfa nodule isolates and their potential for application as inoculants. *Pol J Microbiol*, 63, 375-86.
- Marquina, M. E.; González, N. E. y Castro, Y.** 2011 Caracterización fenotípica y genotípica de doce rizobios aislados de diversas regiones geográficas de Venezuela. *Rev. Biol. Trop.*, vol. 59, no. 3, p. 1017-1036.
- Martín, P. P. 2012.** Incidencia de rizobacterias locales en el rendimiento de alfalfa en suelos que sufrieron salinización por anegamiento. Licenciatura en Química, Tesis. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UN de la Pampa, Santa Rosa, La Pampa, Argentina. 77 pp.
- Martínez-Abarca, Segundo E F, P; van Dillewijn, Fernández-López M, Lagares A, Martínez-Drets G, Niehaus K, Pühler A, Toro N.** (1999) Characterisation of symbiotically efficient alfalfa nodulating rhizobia isolated from acid soils of Argentina and Uruguay. *FEMS Microbiol Ecol* 28:169–176.
- Mashhady, A. S., Salem, S. H., Barakah, F. N., & Heggo, A. M.** 1998. Effect of salinity on survival and symbiotic performance between rhizobium meliloti and medicago sativa l. in Saudi Arabian soils. *Arid Land Research and Management*, 12(1), 3-14.
- Mendoza Paredes, M.** (2010) Tesis Doctoral. Aislamiento y caracterización bioquímica de metabolitos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfatos. Instituto de enseñanza e investigación en Ciencias agrícolas. Montecillo, texoco Edo de México.
- Mohammad, R. M., Akhavan-Kharazian, M., Campbell, W. F., & Rumbaugh, M. D.** 1991. Identification of salt-and drought-tolerant Rhizobium meliloti L. strains. *Plant and Soil*, 134(2), 271-276.
- Morón, B., Dardanelli, M.S., Sousa, C. y Megias, M. Dialogo.** 2006 Molecular en la Simbiosis Rizobio-Leguminosa. Pag. 160-171. En: Fijación de Nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones. Granada. Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno.
- Mulder L., Hogg B., Bersoult A. Cullimore J.** (2005). Integration of signalling pathways in the establishment of the legume-rhizobia symbiosis. *Physiologia Plantarum*. Volume 123, Issue 2, pages 207–218.

**Nichols, P.; Malik, A.; Stockdale, M. /et al./**2009. Salt tolerance and avoidance mechanisms at germination of annual pasture legumes: importance for adaptation to saline environments. *Plant Soil*, vol. 315, p. 241-255.

**Nogales, J., Campos, R., BenAbdelkhalek, H., Olivares, J., Lluch, C., & Sanjuan, J.** 2002. Rhizobium tropici genes involved in free-living salt tolerance are required for the establishment of efficient nitrogen-fixing symbiosis with Phaseolus vulgaris. *Molecular plant-microbe interactions*, 15(3), 225-232.

**Paoli H. P., Volante J.N., Noé Y.E., Vale L.M., Campos C., Mosciaro M.J/** INFORME CULTIVOS verano 2014 salta-jujuy.pdf <http://inta.gob.ar/documentos/monitoreo-de-cultivos-del-noroeste-argentino-a-partir-de-sensores-remotos-campaña-agricola-2013-2014.cultivos-extensivos-de-verano-provincias-de-salta-y-jujuy>.

**Paredes Mendoza, M. y Espinosa Victoria, d.** 2010. Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica. *Terra latinoamericana*, vol. 28, núm. 1, enero-marzo, 2010, pp. 61-70 Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A.C. Chapingo, México.

**Pautasso, J.M y Barbagelata, P.A,** 2017. Actualización del umbral de fósforo Bray para el cultivo de alfalfa en Entre Ríos (Argentina).

**Perticari, A.** 2013. Evolución de las tecnologías de inoculación rizobios y sus aportes a la producción de soja en la Argentina. Aportes de la microbiología a la producción de cultivos: tercera jornada del Instituto de Investigaciones en Biociencias Agrícolas y Ambientales, Editorial Facultad de Agronomía, Buenos Aires (Argentina), 49-53.

**Puppo A, Groten K, Bastian F, Carzaniga R, Soussi M, Lucas MM, De Felipe MR, Harrison J, Vanacker H, Foyer CH** .2005. Legume nodule senescence: roles for redox and hormone signalling in the orchestration of the natural aging process. *New Phytol* 165:683–701.

**Redondo, F. J., de la Peña, T. C., Lucas, M. M., & Pueyo, J. J.** 2012. Alfalfa nodules elicited by a flavodoxin-overexpressing Ensifer meliloti strain display nitrogen-fixing activity with enhanced tolerance to salinity stress. *Planta*, 236(6), 1687-1700.

**Richardson, A. E.** 1994. Soil microorganisms and phosphorus availability. *Soil Biota*, 50, 35-39.

**Romero, N. A., y L. A. Romero.** 1995. Establecimiento de la alfalfa en la Región Pampeana. In: H. Hijano y A. Navarro (ed). *La alfalfa en la Argentina*. INTA, Subprograma Alfalfa. Enciclopedia Agro de Cuyo Manuales 11, Capítulo 2, pp. 21-36.

**Rozas, H. S., Echeverría, H., & Angelini, H.** 2012. Fósforo disponible en suelos agrícolas de la región Pampeana y ExtraPampeana argentina. *RIA. Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 38(1), 33-39.

**Rubio, G., F. Micucci, y F.O. García.** 2013. Capítulo 14: Ciclado de nutrientes y fertilización de pasturas. En *Fertilización de cultivos y pasturas*. Diagnóstico y

recomendación en la región pampeana. Editorial Facultad de Agronomía. UBA. ISBN 978-987-27793-7-5. pp. 263-292.

**Sánchez, R. M., Dunel Guerra, L., & Scherger, M.** 2015. Evaluación de las áreas bajo riego afectadas por salinidad y/o sodicidad en Argentina.

**Sanderson, M.A.; Jones, R. M.** 1993. Stand dynamics and yield components of alfalfa as affected by phosphorus fertility. *Agronomy Journal*, vol. 85, no 2, p. 241-246.

**Scheffer, F. und P. Schachtschabel.** 1998. *Lehrbuch der Bodenkunde*. Enke. Stuttgart, Germany.

**Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca,** Buenos Aires 1995. El deterioro de las tierras en la República Argentina.

**Senasa** 2011. Resolución 264. Anexo I. Método de Burton Modificado, Capítulo 12.

**Serraj R, Fleurat-Lessard P, Jaillard B, Drevon JJ** 1995. Structural changes in the innercortex cells of soybean root nodules are induced by short-term exposure to high salt or oxygen concentrations. *Plant Cell Environ* 18:455–462.

**Serrano, R., & Gaxiola, R.** 1994. Microbial models and salt stress tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 13(2), 121-138.

**Shannon, M. C.** 1984. Breeding, selection, and the genetics of salt tolerance.

**Siebert, S., Hoogeveen J. & Frenken, K.** 2006. Irrigation in Africa, Europe and Latin America. Frankfurt. Hydrology paper N° 5. Physical Geography, University of Frankfurt. Rome, Italy 2006.

**Silva C, Kan FL, Martínez-Romero E.** 2007. Population genetic structure of *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae* isolated from nodules of *Medicago spp.* in Mexico. *FEMS Microbiol Ecol*, 60:477-489.

**Singleton, F. L., Attwell, R., Jangi, S., & Colwell, R. R.** 1982. Effects of temperature and salinity on *Vibrio cholerae* growth. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(5), 1047-1058.

**Strobel, B. W.** 2001. Influence of vegetation on low–molecular–weight carboxylic acids in soil solution: A review. *Geoderma* 99: 169–198.

**Surange S; Kumar N.** 1993. Phosphate solubilization under varying pH by *Rhizobium* from tree legumes. *Indian J. Exp. Biol.* 31:855-857.

**Swaraj K, Bishnoi NR** 1999. Effect of salt stress on nodulation and nitrogen fixation in legumes. *Indian J Exp Bot* 37:843–848.

**Taboada, M. A., Damiano, F., & Lavado, R. S.** 2009. Inundaciones en la región pampeana. Consecuencias sobre los suelos. Alteraciones de la fertilidad de los suelos: el halomorfismo, la acidez, el hidro-morfismo y las inundaciones. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, 103-127.

**Tarafdar, J. C., & Claassen, N.** 1988. Organic phosphorus compounds as a phosphorus source for higher plants through the activity of phosphatases produced by plant roots and microorganisms. *Biology and Fertility of Soils*, 5(4), 308-312.

**Torriani-Gorini, A., Yagil, E., & Silver, S. (Eds.)**. 1994. Phosphate in microorganisms: cellular and molecular biology. Zondervan.

**Teuber LR. and Brick MA. Authors. A. A. Hanson, D. K. Barnes, R. R. Hill, editors,** 1988. Alfalfa and Alfalfa Improvement. Agron. Monogr. 29. ASA, CSSA, SSSA, Madison, WI. doi:10.2134/agronmonogr29.

**Uribe, L.** 1994. Formación de nódulos de Rhizobium: factores que pueden conferir ventaja competitiva Rhizobium nodule formation: factors that may confer competitive advantage. *Agronomía Costarricense (Costa Rica)* v. 18 (1) p. 121-131.

**Verdoy D, Lucas MM, Manrique E, Covarrubias AA, de Felipe MR, Pueyo JJ** 2004. Differential organ-specific response to salt stress and water deficit in nodulated bean (*Phaseolus vulgaris*). *Plant Cell Environ* 27:757–767.

**Verdoy D, Coba de la Peña T, Redondo FJ, Lucas MM, Pueyo JJ** 2006. Transgenic *Medicago truncatula* plants that accumulate proline display nitrogen-fixing activity with enhanced tolerance to osmotic stress. *Plant Cell Environ* 29:1913–1923.

**Vincent J.M.** (1970). A manual for the practical study of root nodule bacteria. Blackwell Scientific, Oxford.

**Vivas, H.S.; Guaita, M.S.** 1997. Respuesta a la fertilización fosfatada de alfalfa en un año caracterizado por estrés hídrico. *Publicación Miscelánea*. N.º 84. EEAINTA Rafaela, Santa Fe.

**Vriezen, J. A. C.; de Bruijn, F. J. y Nüsslein, K.** 2007. Responses of Rhizobia to desiccation in relation to osmotic stress, oxygen, and temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 73. no. 11, p. 3451-3459

**Wang, K. L. C., Li, H., & Ecker, J. R.** 2002. Ethylene biosynthesis and signaling networks. *The plant cell*, 14(suppl 1), S131-S151.

**Wan, J. H. C. and M. H. Wong.** 2004. Effects of earthworm activity and P-solubilizing bacteria on P availability in soil. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 167: 209–213.

**Wikipedia.** 2017. Arrecifes (Argentina). Disponible en [https://es.wikipedia.org/wiki/Arrecifes\\_\(Argentina\)](https://es.wikipedia.org/wiki/Arrecifes_(Argentina)). Último acceso Agosto 2017.

**Wikipedia.** 2017. Arrecifes (Argentina). Disponible en [https://es.wikipedia.org/wiki/Magdalenita\\_\(Argentina\)](https://es.wikipedia.org/wiki/Magdalenita_(Argentina)). Último acceso Agosto 2017.

**Wikipedia.** 2017. Arrecifes (Argentina). Disponible en <https://es.wikipedia.org/wiki/Trelew> Último acceso Agosto 2017.

**Wilson, J. R.** 1970. Response to salinity in Glycine. VI. Some effects of a range of short-term salt stresses on the growth, nodulation, and nitrogen fixation of Glycine wightii (Formerly Javancia). Australian Journal of Agricultural Research, 21(4), 571-582.

**Zahran, H. H.** 1999. Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. Microbiology and molecular biology reviews, 63(4), 968-989.