



INFECTIVIDAD DE CEPAS NATURALIZADAS E INTRODUCIDAS DE
***Ensifer meliloti* EN ALFALFA**

Trabajo final de graduación presentado para obtener el título de Ingeniero Agrónomo

Autores: Espósito, Victoria - Ratto, Delfina

Director: Gallace, María Eugenia. Microbiología Agrícola.

Co-Director: Díaz-Zorita, Martin. Cereales y Oleaginosas.

Evaluadores:

Dalmasso, Lucas Pablo. Cereales y Oleaginosas, Microbiología Agrícola.

Murcia, Marcos Germán. Introducción a la vida universitaria.

FACULTAD DE AGRONOMÍA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

Santa Rosa (La Pampa) - Argentina 2023

ÍNDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT	2
PALABRAS CLAVES	3
KEY WORDS.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
HIPÓTESIS	9
OBJETIVO GENERAL	9
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
METODOLOGÍA EMPLEADA	10
Determinación del número más probable de rizobios en muestras de suelos (Objetivo A).	11
Ensayos y evaluaciones de nodulación (objetivos B, C y D)	12
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
Rizobios naturalizados en suelos de la región de la pampa arenosa y nodulación.....	14
Inoculación con <i>E. meliloti</i> y germinación de alfalfa.....	16
CONCLUSIONES	20
AGRADECIMIENTOS	21
BIBLIOGRAFÍA	22

RESUMEN

La inclusión de alfalfa (*Medicago sativa* L) en las rotaciones de sistemas agropecuarios es una práctica frecuente por la gran producción de biomasa de calidad forrajera y sus aportes a la fertilidad de los suelos, ya que aumentan los niveles de nitrógeno edáfico por el proceso de fijación biológica del nitrógeno en simbiosis con rizobios específicos. Estos atributos hacen que el uso de la alfalfa sea un eje central para el manejo sostenible de los agroecosistemas del mundo. Dado que la inoculación se realiza mayormente a través del proceso de peleteado y que este difiere entre orígenes y condiciones de manejo, resta identificar si la calidad del proceso de inoculación, a campo o industrial, explica en parte diferencias sobre la nodulación en el desarrollo temprano de la alfalfa. El objetivo de este trabajo final de graduación es describir, en condiciones de cámara de crecimiento, diferencias en germinación y en nodulación de alfalfa al aplicar cepas de *E. meliloti* seleccionadas por su capacidad de fijar nitrógeno y naturalizadas en suelos de la región de la pampa arenosa y según tecnologías de inoculación. Se evaluó la nodulación de 18 sitios y se concluyó que inocular alfalfa con buenas prácticas es necesario para lograr establecer un adecuado sistema nodular que pueda realizar eficientemente el proceso de FBN y atendiendo a la calidad del proceso de inoculación.

ABSTRACT

The inclusion of alfalfa (*Medicago sativa* L) in the rotations of agricultural systems is a frequent practice due to the large production of forage quality biomass and its contributions to soil fertility, since it increases soil nitrogen levels through the process of biological nitrogen fixation in symbiosis with specific rhizobia. These attributes make the use of alfalfa a central axis for the sustainable management of the world's agroecosystems. Given that inoculation is carried out mainly through the pelleting process and that this differs between origins and handling conditions, it remains to identify whether the quality of the inoculation process, whether in the

field or industrially, partly explains differences in nodulation in early development of alfalfa. The objective of this final graduation work is to describe, under growth chamber conditions, differences in germination and nodulation of alfalfa when applying strains of *E. meliloti* selected for their ability to fix nitrogen and naturalized in soils of the Pampa region sandy and according to inoculation technologies. The nodulation of 18 sites evaluated and it was concluded that inoculating alfalfa with good practices is necessary to establish an adequate nodular system that can efficiently carry out the FBN process and taking into account the quality of the inoculation process.

PALABRAS CLAVES

Inoculación, *Medicago sativa*, fijación biológica de nitrógeno, simbiosis

KEY WORDS

Inoculation, *Medicago sativa*, nitrogen biological fixation, symbiosis

INTRODUCCIÓN

La inclusión de alfalfa (*Medicago sativa* L) y otras leguminosas perennes en las rotaciones de sistemas agropecuarios es una práctica frecuente por la gran producción de biomasa de calidad forrajera y sus aportes a la fertilidad de los suelos. Las pasturas con leguminosas mejoran la estructura de los suelos, facilitan la biodisponibilidad de nutrientes, el secuestro de carbono incorporando materia orgánica en los suelos y aumentan los niveles de nitrógeno edáfico por fijación biológica del nitrógeno (FBN) en simbiosis con rizobios específicos. Estos atributos hacen que el uso de leguminosas perennes tal es el caso de la alfalfa, sean un eje central para el manejo sostenible de los agroecosistemas del mundo.

El buen funcionamiento de la simbiosis rizobio-leguminosa es a la vez un pilar de importancia para alcanzar los beneficios de las pasturas en los agroecosistemas aportando desde el aire nitrógeno necesario para el normal crecimiento de la leguminosa. Para lograr con éxito la simbiosis, dada la especificidad de este proceso, es preciso que en el suelo se encuentren poblaciones nativas o naturalizadas de rizobios capaces de formar nódulos y de fijar N de forma efectiva con la leguminosa. En algunos casos no se encuentran poblaciones de rizobios con estas características, su presencia en el suelo es baja, no son infectivos o es escasa su capacidad de fijación de nitrógeno con la leguminosa y es necesario incorporar al suelo rizobios infectivos y efectivos mediante la práctica de la inoculación (Gallace, 2020).

La alfalfa es la principal especie forrajera cultivada en el país, con alrededor de 3 millones de hectáreas mayormente en la región pampeana y es la base en los sistemas de producción de carne y de leche. Su importancia radica en los altos rendimientos de materia seca, su excelente calidad forrajera y su adaptabilidad a diversas condiciones ambientales, tanto de suelo, de clima y de manejo agronómico. Para obtener alta producción de forraje requiere de suelos profundos (>1,2 m) y permeables, con adecuada aireación, valores de pH entre 6,5 y 7,5 y adecuada

fertilidad química (niveles suficientes de fósforo, de potasio y de calcio entre otros elementos). Puede aprovecharse mediante pastoreo directo o conservarse en forma de heno mediante la confección de rollos, de fardos o de mega-fardos. Una de las características sobresalientes es la capacidad de exploración de las raíces en el suelo, mediante un extenso sistema radicular que en ausencia de impedimentos en el perfil puede llegar hasta los 6 m de profundidad accediendo al agua contenida en horizontes profundos incluyendo los que se encuentran bajo la influencia de la capa de agua freática o napa. Es una especie tolerante a la sequía y muy sensible al anegamiento del suelo (Basigalup *et al.*, 2022).

La capacidad de la alfalfa de realizar el proceso de FBN contribuye directa y positivamente a la sustentabilidad de los sistemas productivos (Basigalup *et al.*, 2007). La FBN es un proceso en el que microorganismos del suelo específicos, en simbiosis con leguminosas, utilizan el nitrógeno atmosférico para la producción de precursores de aminoácidos que son utilizados para la formación de proteínas que contribuyen entre otros aspectos a la expansión del área foliar, a una mayor eficiencia en el uso de la radiación, al crecimiento de la planta huésped y a una mejor composición proteica y calidad del forraje producido. La alfalfa posee alto contenido de nitrógeno total principalmente en las hojas, por lo tanto, tiene elevados requerimientos de nutrición nitrogenada el cual es aportado entre el 43 y 64% por la FBN (Racca *et al.*, 2001). Este proceso es de gran importancia para el normal funcionamiento de los sistemas biológicos porque el N en la atmósfera se encuentra en forma molecular (N_2) no asimilable por las plantas y representa aproximadamente el 80 % de la composición del aire (Paredes, 2013).

La interacción simbiótica de la alfalfa se ha descrito con especies de rizobios clasificadas como *Ensifer meliloti* o *Ensifer medicae*, con las cepas de tipo Oregón conocida como *Rhizobium sp.* Or191 inicialmente aislada en USA y con *Rhizobium favelukessi* LPU83 aislada en Argentina (Tejerizo *et al.*, 2016). Durante la relación entre la planta huésped y la bacteria específica

ocurren eventos coordinados de comunicación, de reconocimiento y de diferenciación que se manifiestan con la formación de un nuevo órgano vegetal en las raíces conocido como nódulo. Las plantas de alfalfa forman nódulos de crecimiento indeterminado que tienen un meristema apical que continúa activo durante la vida del nódulo formando nuevos lóbulos activos. Además, estos nódulos son perennes por lo que el meristema puede reiniciar su actividad en cada estación de crecimiento (Frioni, 2011). Los nódulos de alfalfa, cuando son nuevos, tienen forma unilobulada o alargada; a medida que siguen desarrollándose adquieren aspecto palmado, y finalmente forman ramilletes coraloides o racimos (Oldroyd *et al.*, 2011).

La cantidad de N fijado en la alfalfa está condicionada por varios factores, entre los que se incluyen la efectividad de la cepa del rizobio y su interacción con el genotipo de la planta, las condiciones ambientales (pH, contenido de fósforo y de potasio del suelo, la disponibilidad de agua, la radiación, la temperatura y el manejo del cultivo (Vance *et al.*, 2002). Además de los efectos descritos sobre la cantidad de nódulos formados en las raíces de alfalfa, los microorganismos que se encuentran en estos nódulos también varían ante la presencia de limitantes edáficas y en su ubicación relativa en las raíces de alfalfa (Gallace *et al.*, 2022). En el manejo de las pasturas de alfalfa es de importancia considerar, además de su manejo forrajero, decisiones para favorecer factores que condicionan a la FBN, ya que si esto no ocurriera la sustentabilidad de los sistemas estaría en juego al disminuir rápidamente la fertilidad nitrogenada de los suelos, disminuyendo la productividad de cultivos posteriores y aumentando el empleo de fertilizantes nitrogenados, teniendo un fuerte impacto económico y ambiental (Basigalup, 2022).

La inoculación es una de las decisiones clave para facilitar la normal FBN y es una tecnología desarrollada para incorporar rizobios infectivos y eficientes en las leguminosas de interés agropecuario (Peticari, 2006). Es un método destinado a incorporar bacterias fijadoras de

nitrógeno a las semillas o al suelo en el momento de la siembra con el objeto de dotar con una cantidad apropiada de bacterias a la raíz de la planta, en el momento de inicio de la formación de nódulos. Las cepas más eficientes se caracterizan por formar mayor cantidad de nódulos de tamaño mediano y grande, arracimados, siendo rojos en su interior y ubicados en la raíz primaria (Fernández, 2005). Si bien esta práctica está ampliamente difundida y aplicada, existen reportes sobre la falla en la obtención de plantas noduladas y, además, en el caso de leguminosas bianuales y perennes disminución en la persistencia de nódulos, ya que los mismos deben poseer alta capacidad competitiva frente a los rizobios nativos y/o naturalizados presentes en el suelo y por otra parte deben poder adaptarse en su nuevo ambiente (Castellari *et al.*, 2004).

La inoculación de la alfalfa se realiza de manera convencional, impregnando el inoculante sobre la semilla a tratar según lo indicado por el fabricante o bien, el tratamiento profesional de semillas o peleteado donde las semillas son inoculadas con anticipación a su distribución y siembra (“pre-inoculado” industrial), lo que permite extender el período de supervivencia de los rizobios sobre las semillas (entre 6 y 24 meses) y por otra parte adecua al medio ambiente que rodea las semillas en combinación con otros productos compatibles (terápicos, colorantes y otros aditivos) permitiendo mejorar las condiciones de siembra e implantación de alfalfa y en su nutrición inicial (Gallace *et al.*, 2023).

Independientemente del método utilizado, para implementar una correcta inoculación debemos considerar y aplicar las recomendaciones propuestas por Peticari (2020) de contemplar tres buenas prácticas o elecciones para el manejo adecuado de productos biológicos con microorganismo vivos (inoculantes) para la nutrición vegetal. El primero es la buena elección del inoculante a partir de la utilización de cepas específicas (*E. meliloti* para alfalfa), del aporte de suficiente cantidad de bacterias sobre las semillas a tratar, de la aplicación de una formulación compatible con agroquímicos, otros tratamientos y prácticas culturales o de

manejo. La segunda buena práctica es sobre la ejecución del proceso de aplicación o inoculación que tiene que cuidar el mantenimiento de la calidad original de las semillas y la dosificación uniforme de los productos aplicados en el tratamiento de las semillas (aditivos, otros). Finalmente, para alcanzar una adecuada nodulación y FBN es importante considerar el buen establecimiento de condiciones de crecimiento de los cultivos con tal de mantener el vigor de las semillas y la viabilidad de las bacterias durante el almacenamiento (Por ejemplo, ambientes ventilados y con temperaturas de hasta 22 a 25°C) y promover a una rápida germinación, emergencia y crecimiento de las plántulas.

Generalmente en los suelos de la región pampeana se ha descrito la existencia de poblaciones nativas o naturalizadas de *Ensifer meliloti* capaces de nodular especies de los géneros *Medicago*. Estas poblaciones de rizobios se encuentran en número variable y a distintas profundidades. (Castellari y Quadrelli 2004; Racca *et al.*, 2001). Sin embargo, en condiciones extensivas de producción en la región de la pampa arenosa se observaron casos con limitada nodulación en plantas de alfalfa inoculadas que podrían limitar su normal nutrición nitrogenada, producción y persistencia. (Lopez Seco *et al.*, 2022). Una de las posibles causas del decaimiento de los alfalfares podría deberse a la falta de nódulos en sus raíces, provocado por la disminución de la población de rizobios en el suelo, la baja infectividad y efectividad de las cepas naturalizadas. Estudios preliminares identifican algunos factores edáficos potencial y parcialmente ligados a la menor o ausente nodulación descrita. Dado que la inoculación se realiza mayormente a través del proceso de peleteado y que este difiere entre orígenes y condiciones de manejo, resta identificar si la calidad del proceso de inoculación, a campo o industrial, explica en parte diferencias sobre la nodulación en el desarrollo temprano de la alfalfa.

HIPÓTESIS

- La germinación y la nodulación de alfalfa mejoraría al aplicar *E. meliloti* sobre semillas.
- Las cepas de *E. meliloti* naturalizadas en suelos de la región de la pampa arenosa limitarían la adecuada nodulación de plántulas de alfalfa por lo que la inoculación con cepas seleccionadas de *E. meliloti* permitirían mejorar este proceso.

OBJETIVO GENERAL

Describir, en condiciones de cámara de crecimiento, diferencias en germinación y en nodulación de alfalfa al aplicar cepas de *E. meliloti* seleccionadas por su capacidad de fijar nitrógeno y naturalizadas en suelos de la región de la pampa arenosa y según tecnologías de inoculación.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A. Cuantificar la cantidad de rizobios naturalizados presentes en suelos representativos de la región de la pampa arenosa aptos para la producción de alfalfa.
- B. Describir la evolución de la germinación de alfalfa según tratamientos de semillas con *E. meliloti*.
- C. Cuantificar la proporción de plántulas de alfalfa noduladas según tratamientos de inoculación.
- D. Establecer relaciones entre condiciones de manejo de la inoculación y tipos de cepas de *E. meliloti*.

METODOLOGÍA EMPLEADA

Se emplearon muestras de suelos y de semillas de alfalfa de 18 sitios a sembrar en la región de la pampa arenosa provenientes del noroeste de la provincia de Buenos Aires (Tabla 1). En la mayoría de los sitios las semillas estaban peleteadas conteniendo *E. meliloti* en su formulación y en los sitios que utilizaron inoculantes base turba para tratamientos en el momento de la siembra se recolectaron muestra de los inoculantes. Las muestras de semillas se identificaron por su variedad, sitio de origen (lote a sembrar), fecha y tratamiento de inoculación. En los lotes de producción se tomaron muestras de suelo de los 20 cm superficiales y se conservaron frescas (sin desecar y en temperaturas menores a 20°C, sin congelar) contenidas en bolsas de polietileno triples colocando la etiqueta identificadora entre la primera y segunda bolsa para evitar el contacto con la muestra de suelo.

Tabla 1: Ubicación, propiedades de suelos (capa de 0 a 20 cm) y descripción general de los sitios de producción de alfalfa en la región de la pampa arenosa. Pe: fósforo extractable (Bray Kurtz 1), MO: materia orgánica.

Sitio	Localidad	Variiedad	Peleteada	Paisaje	Pe (ppm)	MO (%)	pH
1	Lincoln	Monarca G8	No	Media loma	19,5	2,2	5,1
2	América	Mora	Sí	Media loma	52,3	1,7	5,4
3	América	Mora	Sí	Media loma	25,7	2,6	5,6
4	Trenque Lauquen	WL 611	Sí	Plano	15,1	2,2	5,7
5	Germania	Dorgan	Sí	Media loma	34,8	3,2	5,5
6	América	Versi	Sí	Media loma	18,2	3,1	5,8
7	Trenque Lauquen	Mayacó	No	Media loma	25,0	1,4	7,3
8	América	Victoria	No	Plano	32,6	2,6	5,6
9	Trenque Lauquen	Mayacó	No	Media loma	9,1	2,7	5,8
10	Drabble	CW 660	Sí	Media loma	10,6	2,3	6,0
11	Trenque Lauquen	S/D	No	Media loma	11,2	1,6	6,5
12	Trenque Lauquen	Albert	Sí	Media loma	9,9	1,8	6,0
13	Laureles	WL 611	Sí	Media loma	22,5	2,5	6,6
14	Lincoln	WL 909	Sí	Media loma	28,2	2,6	5,6
15	Drabble	CW 809	Sí	Media loma	12,8	2,4	6,0
16	Drabble	CW 660	Sí	Media loma	21,3	2,4	5,7
17	América	Victoria	Sí	Media loma	15,7	2,4	5,7
18	General Pinto	WL 194	Sí	Media loma	13,3	2,7	5,8

Determinación del número más probable de rizobios en muestras de suelos (Objetivo A)

Se determinó el número de rizobios de cada sitio a través de la técnica del número más probable o NMP (Vincent, 1970). Se colocaron 10 g de suelo en Erlenmeyers que contenían 90 mL de solución fisiológica (SF). Se agitaron en agitador orbital durante 15 minutos y se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-4} en tubos con 9 mL de solución de SF. Posteriormente se inocularon plántulas de alfalfa desinfectadas en tubos Jensen con 200 μ L de cada dilución. Este procedimiento se realizó por cuadruplicado. Luego de 4 semanas de la inoculación, se contabilizaron los tubos negativos y positivos, considerando positivos aquellos con al menos 1 nódulo visible.

Ensayos y evaluaciones de nodulación (objetivos B, C y D)

Se realizaron estudios de nodulación de alfalfa en tubos de ensayo de 50 mL con 20 mL de medio de cultivo agarizado Jensen sin nitrógeno (Tabla 2). En cada tubo se colocó una semilla de alfalfa según uno de los siguientes tratamientos:

- **T0: Control negativo sin inocular** (semillas no peleteadas y desinfectadas superficialmente con peróxido de hidrógeno al 3%).
- **T1: Control positivo inoculado** (semillas no peleteadas, desinfectadas e inoculadas en el momento de la siembra con 0,5 ml/semilla con un inoculante de referencia conteniendo la cepa *E. meliloti* B399 con 1×10^9 UFC ml⁻¹).
- **T2: Semillas inoculadas** (semillas en su condición original de inoculación en peleteo o con aplicación de turba y sin acondicionamiento de lavado o desinfección previos a la siembra).
- **T3: Control del sitio** (semillas sin peletear, desinfectadas e inoculadas en el momento de la siembra con 0,5 ml por semilla de una suspensión del suelo de origen de cada sitio bajo estudio).
- **T4: Nodulación del sitio** (semillas de variedad de referencia Victoria INTA, sin peletear, e inoculadas en el momento de la siembra de una suspensión del suelo de origen del estudio).
- **T5: Nodulación de variedad de referencia inoculada** (semillas Victoria INTA no peleteadas inoculadas en el momento de la siembra con un inoculante de referencia conteniendo la cepa *E. meliloti* B399).

Tabla 2: Composición medio de cultivo Jensen sin nitrógeno.

CaHPO ₄	1,0 g
K ₂ HPO ₄	0,2 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,2 g
FeCl ₃	0,1 g
Agar	7,0 g
Solución compuesta de elementos traza	1,0 mL
Agua destilada	1000 mL
pH	6,8 a 7,0

En los tratamientos 0, 1 y 3 se eliminó el peleteo de las semillas con lavados sucesivos con agua estéril. En los tratamientos 0, 1, 3, 4 y 5, sobre las semillas sin peleteo, se realizó la desinfección superficial de estas colocando las semillas en alcohol 96° durante 30 segundos y luego una solución de peróxido de hidrógeno (3%) durante un minuto. Luego se enjuagaron con agua destilada estéril.

Para cada tratamiento se realizaron 10 repeticiones conteniendo 1 semilla por tubo. Los tubos se colocaron en gradillas en condiciones controladas de cámara de crecimiento con un régimen de temperaturas de 25°C día/18°C noche \pm 1°C y de fotoperiodo de 12 h de luz y 12 de oscuridad. En cada unidad experimental (tubo) se evaluó el momento de inicio de la germinación (aparición de la radícula) con observaciones diarias para determinar la evolución de la germinación y el porcentaje de germinación a los 7 días. A los 21 días de la siembra se determinó el número de nódulos en cada planta para establecer el porcentaje de nodulación.

Análisis estadístico

El ensayo se realizó con un diseño completamente aleatorizado con 10 réplicas por tratamiento y los datos se analizaron mediante ANAVA. Las comparaciones entre medias de tratamientos

se analizaron a través de la prueba LSD de Fisher. Para estos análisis se utilizó el programa InfoStat (Di Rienzo, 2020).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Rizobios naturalizados en suelos de la región de la pampa arenosa y nodulación

En promedio, en los suelos de los sitios estudiados, la población de rizobios fue de $2,9 \cdot 10^2$ NPM g^{-1} . Con la metodología de cuantificación empleada, sólo en los sitios 2 y 13 no se detectaron rizobios y alcanzó un máximo de $3,3 \cdot 10^3$ NMP g^{-1} de suelo en el sitio 4 (Figura1). Estos valores son similares a reportados por otros autores en suelos de la provincia de Santa Fe (Argentina) donde se describieron valores medios de $2 \cdot 10^2$ NMP g^{-1} (Toniutti & Fornasero; 2020). Por otra parte, en suelos del sudeste de provincia de Buenos Aires, Castellari & Quadrelli (2004) reportaron un promedio de $1 \cdot 10^2$ NMP g^{-1} .

Las diferencias en los NPM de los suelos no mostraron relaciones estrechas entre las propiedades de los suelos ni posiciones en el paisaje. Según Brockwell *et al.*, (1991), el pH del suelo es el mayor determinante del número de poblaciones *de E. meliloti*. En los sitios los valores de pH en agua se distribuyeron en el rango de levemente ácidos a neutros coincidiendo con condiciones no limitantes para la normal sobrevivencia de estos rizobios.

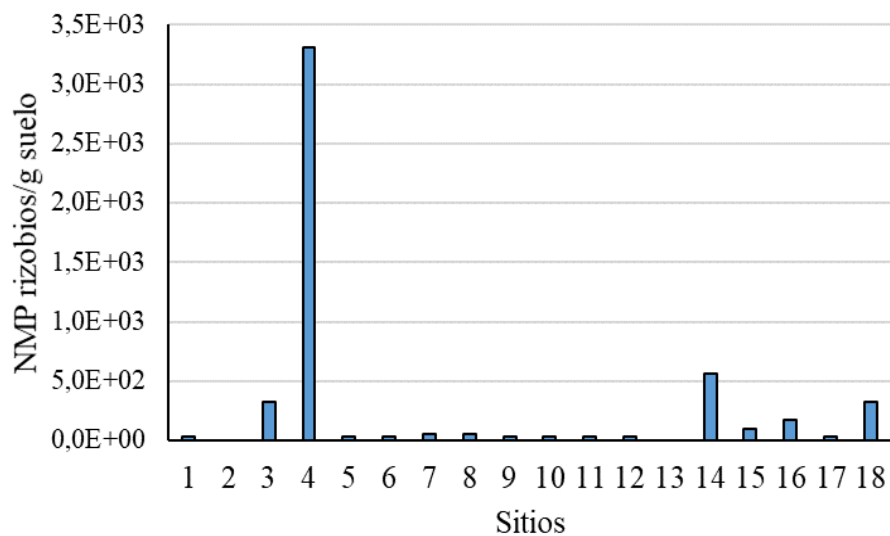


Figura 1: Número más probable de rizobios (NMP) en la capa superficial (0 a 20 cm) de 18 suelos de la región de la pampa arenosa aptos para el cultivo de alfalfa.

La nodulación con las suspensiones de extractos de los suelos (T3) varió entre 0 y 90 % de plantas noduladas. La mayoría de los sitios mostró valores de NMP inferiores a $5 \cdot 10^2$ NMP g^{-1} alcanzando, en presencia de rizobios, entre 10 y 60 % de plantas noduladas. En toda la población analizada se observó que la mayor nodulación ocurrió en los casos con mayores NMP (Figura 2).

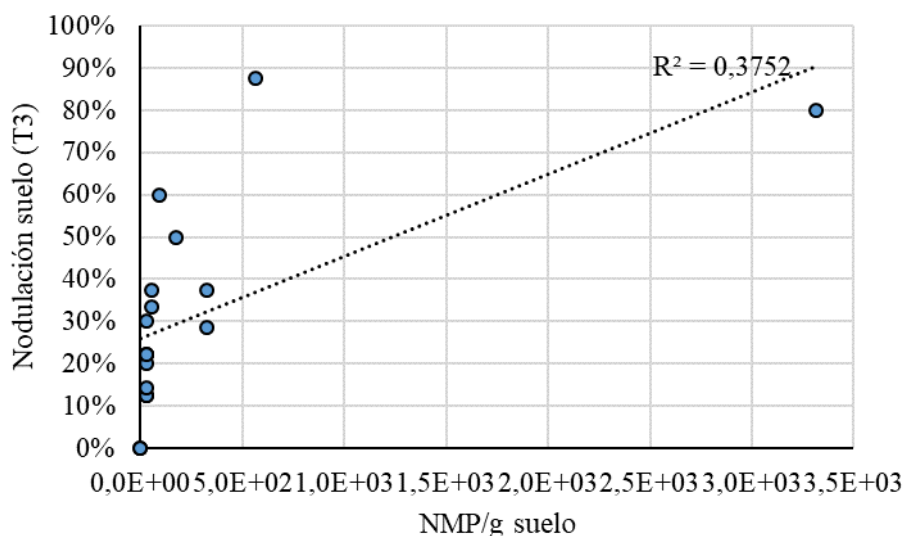


Figura 2: Porcentaje de nodulación de plantas de alfalfa inoculadas con suspensión de suelo según el número más probable (NMP) de rizobios en 18 sitios de la región de la pampa arenosa.

Inoculación con *E. meliloti* y germinación de alfalfa

A los 7 días de la siembra, la germinación de semillas tratadas con diferentes tecnologías de inoculación varió entre 87 % en el T2 (semillas con tratamiento original) y 100 % en el T5 (variedad e inoculante de referencia) con un valor promedio de todos los tratamientos de 93% (Figura 3). En los tratamientos T2 y T3 la germinación fue menor que en el resto de los tratamientos, incluyendo el control sin inoculación. La máxima germinación en los tratamientos de inoculación con cepas de referencia se observó aproximadamente 1 día antes que en el T2 donde se mantuvo la cubierta original de los tratamientos.

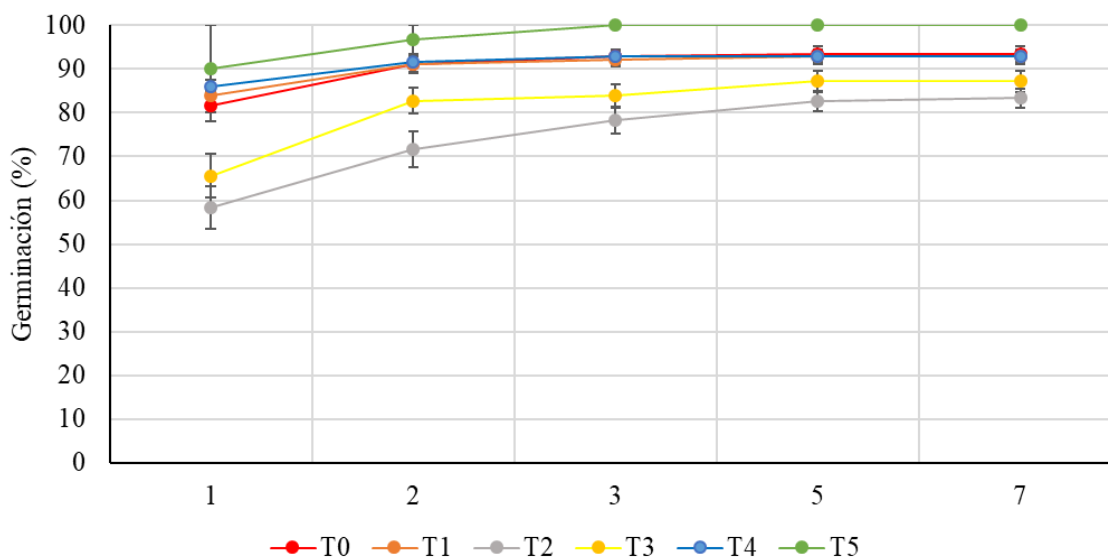


Figura 3: Evolución del porcentaje de germinación de semillas de alfalfa según tratamientos de inoculación. Promedios \pm EE. T0: Control negativo sin inocular; T1: Control positivo inoculado; T2: Semillas con inoculación original; T3: inoculadas con extracto del suelo T4: semillas referencia inoculadas con extracto del suelo y T5: semillas referencia inoculadas con inoculante de referencia.

La nodulación a los 21 días de la siembra varió entre 0 en el control sin inocular (T0) y 100% al inocular una única variedad de alfalfa con la cepa de referencia (T5). Al inocular con suspensión de suelo (T3) la nodulación fue del 32% y al hacerlo con la cepa de referencia (T1) la proporción de lotes de plántulas que nodularon adecuadamente fue del 89%. Con la condición original de las semillas (T2) la nodulación alcanzó el 55 % (Figura 4). Diversos autores indican que la inoculación resultaría beneficiosa en sitios con una población de rizobios nativos o naturalizados inferior a $1 \cdot 10^2$ bacterias por gramo de suelo, independientemente de la efectividad de estos (Thies *et al.*, 1991; Catroux *et al.*, 2001). En este sentido, los resultados muestran esta tendencia, ya que al inocular con la cepa B399 la nodulación fue de casi el 90% de los casos. El inoculante utilizado tenía alta concentración celular ($1 \cdot 10^9$ UFC ml^{-1}) en

concordancia con lo recomendado por las buenas prácticas de inoculación descritas por Peticari (2020). Las poblaciones de rizobios del suelo varían en su tolerancia a los principales factores ambientales y la supervivencia y el funcionamiento eficaz de las poblaciones de rizobios autóctonos e inoculados se reducen por las altas temperaturas del suelo, el estrés salino y osmótico, la acidez y la alcalinidad del suelo (Kajic *et al.*, 2019). Diversos son los factores que pueden afectar la nodulación de alfalfa. Toniutti & Fornasero (2020) evaluaron el efecto de la inoculación con *E. meliloti* y la fertilización con fósforo sobre la nodulación y productividad de una pastura de alfalfa en el centro de la provincia de Santa Fe y concluyeron que la inoculación con *E. meliloti* y la aplicación de dosis crecientes de fertilizante fosfatado incrementa la nodulación y producción del cultivo de alfalfa.

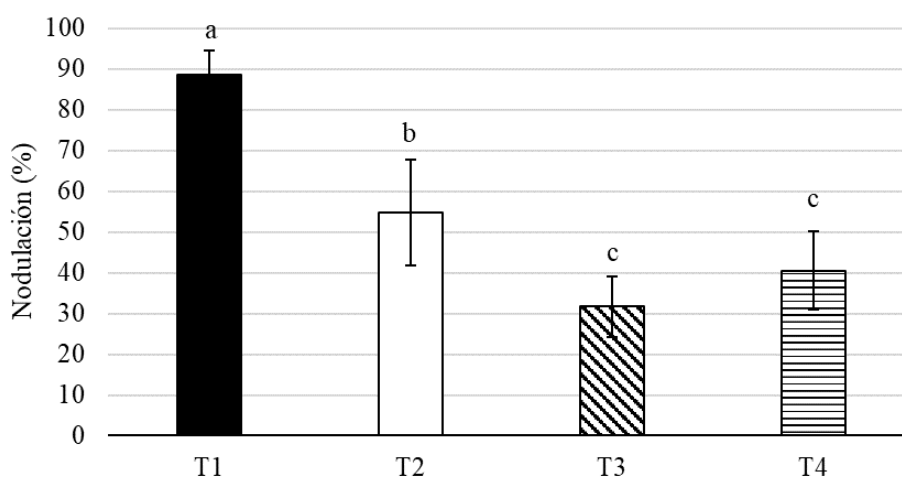


Figura 4. Porcentaje de plántulas de alfalfa noduladas según tratamientos de inoculación evaluados en condiciones controladas de crecimiento. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). T1: Control positivo inoculado; T2: Semillas con inoculación original; T3: inoculadas con extracto del suelo T4: semillas referencia inoculadas con extracto del suelo.

En la figura 5 se observa que el mayor número de nódulos se obtuvo cuando las semillas fueron inoculadas con la cepa de referencia B399 (T1) con diferencias significativas con T2 (tratamiento original). Cuando se inoculó con suspensión de suelo, tanto en T3 y T4 la nodulación fue menor sin diferencias estadísticas entre ellos. Aquellas plantas con más nódulos coincidieron con los tratamientos con mayores porcentajes de nodulación. Toniutti & Fornasero (2020) encontraron que con aplicación de dosis crecientes de fósforo se produjo un aumento en el número de nódulos y biomasa nodular y de materia seca de las plantas. Este comportamiento estaría asociado con mejoras en el ambiente nutricional logrando un mayor rendimiento del cultivo. Este estudio se llevó a cabo en condiciones controladas y sin limitaciones nutricionales.

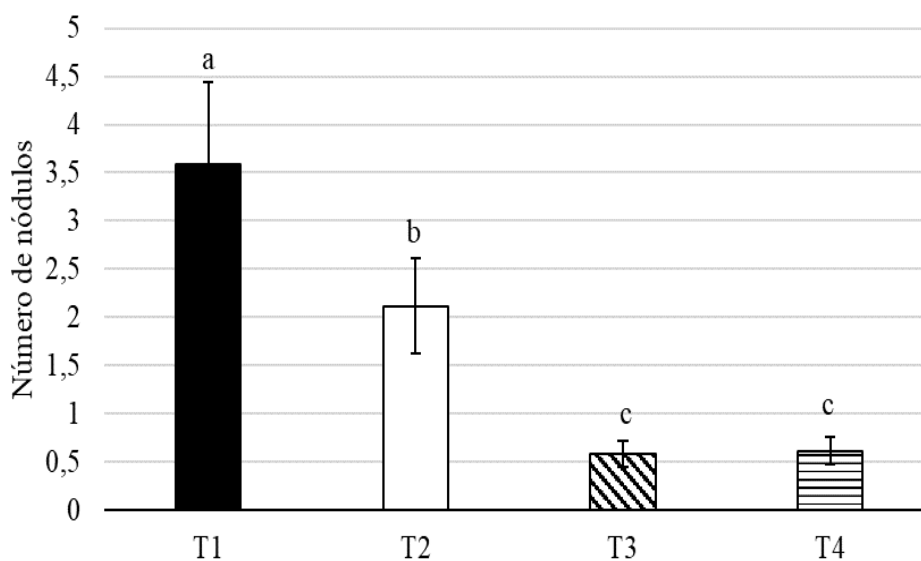


Figura 5. Promedio de nódulos por planta según tratamientos de inoculación evaluados en condiciones controladas de crecimiento. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). T1: Control positivo inoculado; T2: Semillas con inoculación original; T3: inoculadas con extracto del suelo T4: semillas de referencia inoculadas con extracto del suelo.

CONCLUSIONES

La incorporación de *E. meliloti* no modifica significativamente la evolución ni la proporción de la germinación de alfalfa, pero sí su nodulación dependiendo de la tecnología de tratamiento de las semillas

La incorporación de cepas infectivas mejora la nodulación de la alfalfa comparada con la nodulación originada a partir de extractos de suelos representativos de la pampa arenosa conteniendo rizobios infectivos. En condiciones naturales la infectividad aumenta ante mayores concentraciones de rizobios naturalizados pero la nodulación es inferior que la lograda al inocular con la cepa infectiva y efectiva de referencia. Estos resultados validan la importancia de inocular alfalfa para lograr establecer un adecuado sistema nodular que pueda realizar eficientemente el proceso de FBN y que en esta práctica es de importancia atender la calidad del proceso de inoculación.

AGRADECIMIENTOS

A nuestros directores Mg. María Eugenia Gallace y Dr. Martín Díaz-Zorita por su dedicación y guía a la hora de realizar este TFG y aportar en nuestra formación profesional.

A los evaluadores Ing. Agr. Lucas Pablo Dalmasso e Ing. Agr. Marcos German Murcia por sus valiosos aportes y correcciones.

A la Facultad de Agronomía de la UNLPam por brindarnos las herramientas y el espacio para llevar a cabo este trabajo y formarnos como profesionales.

Al laboratorio de Microbiología Agrícola por colaborar en la realización de los diferentes ensayos.

A nuestras familias por acompañarnos de manera incondicional y darnos aliento para cumplir nuestros objetivos. Por siempre creer en nosotras.

A nuestros amigos/as por ser parte de esta etapa y acompañar el proceso.

BIBLIOGRAFÍA

- Basigalup, D. H. (2007). El Cultivo de la Alfalfa en la Argentina. Ediciones INTA.
- Basigalup, D. H. (2022). Panorama actual del cultivo de alfalfa en Argentina. Investigación, producción e industrialización de la alfalfa en Argentina. Ediciones INTA.
- Brockwell J, Pilka A, Holliday RA. 1991. Soil pH is a major determinant of the numbers of naturally occurring *Rhizobium meliloti* in non-cultivated soils in central New South Wales. *Animal Production Science*, 31(2): 211-219.
- Castellari, C. C. y Quadrelli, A. M. (2004). Persistencia en el suelo de cepas de *Sinorhizobium meliloti*. *Ciencia del Suelo* 22 (1).
- Catroux, G., Hartmann, A. y Revellin, C. (2001). Trends in rhizobial inoculant production and use. *Plant and Soil*, 230, 21-30. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1004777115628>
- Di Rienzo J.A., F., C., M.G., B., L., G., M., T., & C.W, R. (2020). InfoStat. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Retrieved from <http://www.infostat.com.ar>
- Fernandez L. A. (2005). Nodulación, inoculantes y métodos de inoculación. *Ciencia hoy*, Vol. 14 n°84.
- Frioni, L. (2011). Microbiología: básica, ambiental y agrícola. Orientación Gráfica Editora.
- Gallace, M. E. (2020). Interacción Alfalfa-*Ensifer meliloti*: respuesta al estrés salino. Tesis de Maestría. FA-UNLPam.
- Gallace, M.E.; Vigna, C.M., Dalmaso, L.P; Porta Siota, F. y Díaz-Zorita, M. 2022. Aislamientos de endófitos en nódulos de alfalfa en Haplustoles salinos y anegables. Actas XXVIII Congreso de la AACCS, Buenos Aires (Argentina).
- Gallace, M.E; Dalmaso L., Barraco, M. y Díaz-Zorita, M. 2023. Fijación biológica de nitrógeno e inoculación en leguminosas forrajeras. <https://horizontedigital.com/fijacion-biologica-de-nitrogeno-e-inoculacion-en-leguminosas-forrajeras/>

- Kajić, S., Hajdari, E., Komes, A., Rajnović, I., & Sikora, S. (2019). Selection of stress-tolerant indigenous rhizobia nodulating alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Agriculturae Conspectus Scientificus*, Vol 84, No 4
- López Seco E; Gallace E; Demateis Llera,F; Otero A; Maekawa M; Díaz-Zorita M. (2022). Nodulación de alfalfa en establecimientos del noroeste de Buenos Aires. *Memoria Técnica INTA 2020 – 2021*, p 61-62. ISSN 1850-6038
- Oldroyd, G. E. D., Murray, J. D., Poole, P. S., & Downie, J. A. (2011). The Rules of Engagement in the Legume-Rhizobial Symbiosis. *Annual Review of Genetics*, 45(1), 119–144. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132549>.
- Paredes, M. C. (2013). Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas y gramíneas. Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Católica Argentina. Disponible en: <http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/repositorio/tesis/fijacion-biologica-nitrogeno-leguminosas.pdf>.
- Peticari, A. (2006). Pasturas de alfalfa: importancia de una adecuada inoculación. Segundo Congreso Nacional de Conservación y Uso de Forrajes.
- Peticari, A. (2020). Las B en el manejo adecuado de productos biológicos para la nutrición vegetal. En: Manual de buenas prácticas de manejo. Grasso A. y Díaz-Zorita M. Fertilizar AC.
- Racca, R.; Collino, D.; Dardanelli, J.; Basigalup, D.; González, N.; Brenzoni, E.; Hein, N. y M. Balzarini. (2001). Contribución de la fijación biológica de nitrógeno a la nutrición nitrogenada de la alfalfa en la región pampeana. Ediciones INTA.
- Thies, J. E., Singleton, P. W. y Bohlool, B. B. (1991). Influence of the size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced Rhizobia on field-grown legumes. *Applied and environmental microbiology*, 57, 19-28. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.57.1.19-28.1991>

- Toniutti, M. A. y Fornasero, L. V. (2020). Efecto de la inoculación con rizobios y la fertilización fosfatada sobre la nodulación y producción de alfalfa (*Medicago sativa* L.) en el centro de Santa Fe (Argentina). *AgriScientia*, Vol. 37 (2): 1-10.
- Vance, C. P. (2002). Root-Bacteria Interactions: Symbiotic N₂ Fixation. In U. K. Yoav Waisel, Amram Eshel, Tom Beeckman (Ed.), *Plant Roots* (3rd ed., pp. 839–868). The Hidden Half.
- Vincent, J. M. (1970). *A manual for the practical study of the root nodule bacteria*. Oxford: Blackwell Scientific Publications.