



A1-201 Mejora del crecimiento de la leguminosa arbórea *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan en condiciones de cultivo a campo mediante el uso de bacterias del grupo de los Rizobios

María Zabaleta, Raúl Platero, Cecilia Taulé, Cintia Mareque, Federico Battistoni y Elena Fabiano

Laboratorio de Bioquímica y Genómica Microbianas. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Ministerio de Educación y Cultura. Av. Italia 3318. Montevideo 11600, Uruguay

Correo electrónico: mzabaleta@iibce.edu.uy , rplatero@iibce.edu.uy, ctaule@iibce.edu.uy, cmareque@iibce.edu.uy , fbattistoni@iibce.edu.uy y efabiano@iibce.edu.uy

Resumen

El angico (*Parapiptadenia rigida*), árbol de gran porte originario de la zona norte de Uruguay, surge como especie de interés para su incorporación en sistemas de bosques multipropósito, debido a su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico a través de su asociación con bacterias del grupo de los rizobios. Cepas de rizobio que habían promovido el crecimiento en invernáculo fueron llevadas al campo para su evaluación en el departamento de Montevideo. Se distribuyeron con un diseño completamente al azar y se evaluó su crecimiento a través del diámetro del tronco a nivel del suelo.

La cepa correspondiente a *Cupriavidus sp.* UYPR2.512 promovió el crecimiento de *P. rigida* de manera significativa, observándose diferencia con respecto a los controles de acuerdo al test de Fisher y al test de Tukey a un nivel de significación del 0,05.

La posibilidad de utilizar este tipo de biofertilización es prometedora para ser usada en bosques multipropósito de forma de disminuir el uso de fertilizantes químicos.

Palabras-clave: Angico; bacterias fijadoras de nitrógeno, rizobios, PGPB, biofertilizantes; *Burkholderia sp.*; *Cupriavidus sp.*; bosques multipropósito.

Abstract

Among the leguminous trees native to Uruguay, *Parapiptadenia rigida* (Angico), a Mimosoideae legume, is one of the most promising species for agroforestry. Like many other legumes, it is able to establish symbiotic associations with rhizobia. A collection of Angico-nodulating isolates, able to promote plant growth under greenhouse conditions, was tested in field trials in Montevideo. An assay with a completely random design was settling and the Angico trunk diameter at the field level was measured.

A significant plant growth promotion by *Cupriavidus sp.* UYPR2.512 strain was obtained with a confidence level of 0.05.

Results obtained indicate that this type of biofertilisation is a promising practice to be used for agroforestry, reducing the amount of chemical products incorporated to the environment.

Key words: *Burkholderia sp.*; *Cupriavidus sp.*, agroforestry, biofertilizers, rhizobia, nitrogen-fixing bacteria.

Introducción

En las últimas décadas el territorio uruguayo ha visto incrementada de manera sostenida su superficie de plantación de especies forestales. *Pinus* y *Eucalyptus* han sido las dos especies utilizadas para este propósito, destinándose su producción principalmente a la extracción de pulpa de papel. La FAO reporta una superficie plantada de 50.000 has en el año 2000 y el Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP) consigna 700.000 has para el año 2012.

En contraposición a este tipo de producción mono-específica a gran escala, la implementación de sistemas mixtos agroforestales surge como una alternativa, al menos complementaria, con el objetivo de obtener beneficios y preservar los servicios ecosistémicos brindados por los montes. Para este tipo de bosques se prioriza el uso de especies nativas en tanto adaptadas al clima y al tipo de suelo y como abrigo de otras especies locales, tanto vegetales como animales. Últimamente, el MGAP estimula a los productores a la implantación de bosques multipropósito en sus predios a través de incentivos económicos.

En Uruguay se cuenta con poca información sobre las especies forestales nativas y no se han desarrollado en el país viveros dedicados a la producción y reimplantación de especies arbóreas nativas a gran escala y se sabe muy poco sobre el comportamiento de estas especies a nivel de vivero y a nivel de su implantación en campo, etapas importantes a la hora de utilizar una especie arbórea con fines productivos.

El angico (*Parapiptadenia rigida*) ha sido propuesto por diversos investigadores como un árbol de alto potencial para la forestación y reforestación. *P. rigida* pertenece a la familia Fabaceae, subfamilia Mimosoideae (Brenan, 1963; Izaguirre and Beyhaut, 2003). Es nativa de Sudamérica y se distribuye en Brasil austral, Paraguay, Uruguay y Argentina. Crece tanto en suelos húmedos como secos, pero con más frecuencia en los sitios de buen drenaje. Es una especie heliófila y pionera, ya que prospera en condiciones severas y de baja fertilidad (Carvalho, 1994). Es un árbol caducifolio a semi-caducifolio, y alcanza alturas de hasta 35 m y diámetro a la altura del pecho (DAP) de 30 a 120 cm, con fuste cilíndrico. La especie es muy apreciada por la población local gracias a sus múltiples valores y es explotada por extracción del monte nativo en cantidades limitadas. Sin embargo, su producción comercial no ha sido explorada en Uruguay.

Su madera de alta densidad ($0,74 - 0,98 \text{ g/cm}^3$) y resistente a las condiciones naturales es muy utilizada (Brenan, 1963; Izaguirre and Beyhaut, 2003). Además de su uso para la fabricación de herramientas, muebles y construcciones de casas, los pisos de parquet de color rojizo son muy apreciados. Su alto poder calórico y el escaso humo que produce al quemarse la hace muy apta como combustible. Otros usos reportados son la producción de gomas, taninos y aceites esenciales. Sus extractos medicinales han sido incluidos en la Farmacopea brasilera (de Souza *et al.*, 2004; Schmidt *et al.*, 2010). Se la utiliza también como forrajera para ganado vacuno por su alto poder de regeneración de brotes.

Su capacidad para establecer relaciones simbióticas con bacterias fijadoras de nitrógeno del grupo de los rizobios ha sido ampliamente documentada (Faria *et al.*, 1989; Franco and Faria, 1997; Frioni *et al.*, 1998; Moreira, 2008). Los simbioses nativos se perfilan como importantes bio-fertilizantes naturales y su utilización aportaría grandes ventajas en la producción sin afectar negativamente el ecosistema en el que se desarrolla.

La fijación biológica de nitrógeno surge como una alternativa natural a la falta de este elemento en los suelos cultivables. A su vez la utilización de una vía biológica de adquisición de nitrógeno disminuye la pérdida de este elemento en el suelo, cuyos excesos contaminan los cuerpos de agua por escorrentía con la posibilidad de desencadenar procesos de eutrofización. También disminuye significativamente el gasto proveniente de compuestos orgánicos altamente energéticos como el petróleo, necesario en la producción de fertilizantes químicos.

Nuestro grupo de trabajo ha realizado una prospección de cepas naturales asociadas a angico generándose una colección de más de 50 cepas bacterianas simbioses de esta especie arbórea. Las cepas fueron caracterizadas por técnicas de biología molecular y de microbiología clásica encontrándose que el género bacteriano predominante fue *Burkholderia* aunque también se encontraron cepas de *Cupriavidus*, *Ensifer* y *Rhizobium* (Taulé *et al.*, 2012). Ensayos realizados en condiciones de cultivo controladas (solario e invernáculo) mostraron que gran parte de los aislamientos promovían el crecimiento de plantas crecidas sin el agregado de N. Algunas de las cepas que promovieron el crecimiento vegetal fueron utilizadas para ser ensayadas en condiciones de campo.

HIPOTESIS: Existen bacterias del grupo de los rizobios que promocionan más efectivamente que otras el crecimiento del angico y pueden ser utilizados como inoculantes naturales para la explotación de esta especie arbórea.

OBJETIVO: Determinar la eficiencia de algunas cepas de rizobio naturalmente asociadas a angico en condiciones de cultivo a campo fuera de las zonas naturales de distribución de la especie.

Metodología

Plantas. Las semillas para la producción de mudas fueron colectadas en el Departamento de Artigas (ROU), zona de distribución natural de la especie, en un rodal añejo, plantado en una propiedad privada. Las mismas fueron sembradas en bolsas de cultivo con 1,5 Kg de sustrato de tierra:arena:compost en iguales proporciones.

Preparación del inóculo bacteriano. Las cepas empleadas en el ensayo fueron *Burkholderia* sp. UYPR1.413, *Burkholderia* sp. UYPR 5.94, *Cupriavidus* sp. UYPR2.512 y *Cupriavidus* sp. UYPR2.55. A partir de una alícuota de una suspensión celular almacenada a -80 °C en glicerol 25 % (v/v) se sembraron 5 ml de medio de cultivo YMA+G con la siguiente composición: K₂HPO₄ 0,5 g/l, MgSO₄.7H₂O 0,2 g/l, NaCl 0,1 g/l, extracto de levadura 0,5 g/l, manitol 10g/l, glutamato 1g/l, pH 6,8. El cultivo se creció con agitación a 30 °C hasta alcanzar una DO a 620 nm de aprox. 1. Se realizó una dilución en agua hasta obtener aprox. 1 x 10⁷ células por ml la cual fue empleada para inocular las plantas.

Sitio del ensayo. El predio de plantación, de 8.000 m², se encuentra situado en el Departamento de Montevideo, ROU (GPS. S34°46'54.83", W56°14'19.95") y pertenece al programa de Montevideo Rural de la Intendencia Municipal de Montevideo. El historial del predio es de cultivo de legumbres orgánicas.

Inoculación. Dos semanas luego de germinadas las plántulas fueron inoculadas con una suspensión de rizobios de *Burkholderia* sp. UYPR1.413 y *Cupriavidus* sp. UYPR2.512 de 1 x 10⁷ CFU por planta y re-inoculadas 30 días después con una suspensión similar. Una mezcla de las 2 cepas (MIX) con alrededor de 1 x 10⁷ CFU de cada tipo así como una mezcla con *Burkholderia* sp. UYPR1.413, *Burkholderia* sp. UYPR 5.94, *Cupriavidus* sp. UYPR2.512 y *Cupriavidus* sp. UYPR2.55 (M4) se incluyeron en el ensayo Un ml de agua estéril fue agregado a los controles negativos y KNO₃ 0,05 % (p/v) a los controles positivos de fertilización nitrogenada.

Se distribuyeron al azar 30 repeticiones de cada tratamiento en invernáculo con un fotoperíodo de 16/8 luz/oscuridad a una temperatura media de 26 °C.

Luego de 8 meses de crecimiento en invernáculo, en el mes de mayo de 2010, las mudas fueron llevadas al campo y plantadas con su terrón. Tres repeticiones de 10 plantas cada una fueron dispuestas con un diseño completamente al azar, conformando líneas con distancias de 2 metros entre plantas y 4 metros entre líneas.

Se plantaron líneas de plantas sin tratamiento entre las repeticiones inoculadas como barrera entre los mismos. Se colocaron protecciones para la depredación por liebres en forma de redes individuales con tutores. Dos cortes anuales de las zonas entre líneas fueron realizadas por parte del personal de la Intendencia Municipal de Montevideo a quien pertenece el predio.

Para evaluar el crecimiento vegetal se midió el diámetro de tronco a nivel del suelo con calibre digital.

Evaluación de la promoción del crecimiento

Las mediciones fueron realizadas el día de la plantación a campo y hacia fines del período de crecimiento anual (abril-mayo) los siguientes años, realizándose la última medición el 6 de mayo de 2014.

Las diferencias entre los tratamientos fueron evaluadas con el test de Fisher y el test comparativo de Tukey a un nivel de significancia del 0,05.

Resultados y discusión

P. rigida respondió a los tratamientos de inoculación con diferentes cepas de rizobios, observándose diferencias en el crecimiento con respecto a los testigos (Fig. 1).

La cepa que más se destacó fue *Cupriavidus sp.* UYPR2.512, lográndose duplicar el diámetro del tronco de las plantas inoculadas con esta cepa con respecto a los controles fertilizados y sin tratamiento (Fig.1).

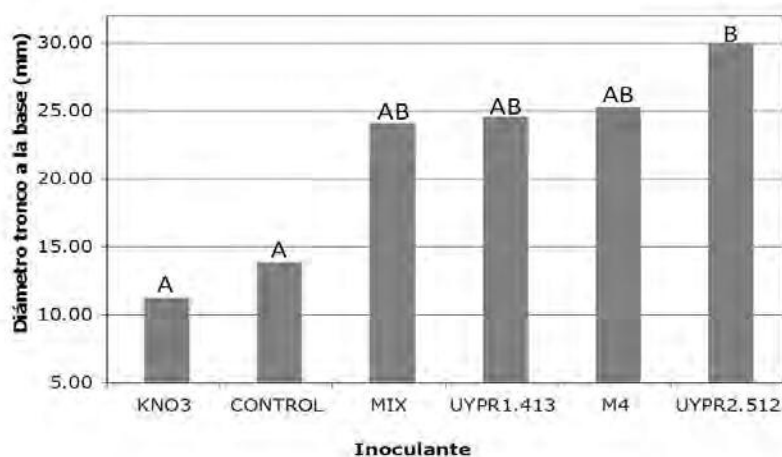


FIGURA 1. Respuesta de *P. rigida* a la inoculación con diferentes cepas de rizobio en el Departamento de Montevideo, Uruguay.

La capacidad del angico para desarrollarse en suelos pobres y la existencia de rizobios naturales que promueven su crecimiento hace promisorio a esta especie para su cultivo en



sistemas agrobiológicos, ya sea para explotación maderera o para su introducción en bosques multipropósito.

Se observa que el tiempo de respuesta a la inoculación es de varios años, ya que recién al cuarto año pudieron evidenciarse las diferencias en el crecimiento de los fustes. De todas maneras esto no es un inconveniente cuando se trata de especies de crecimiento medio con perspectivas de explotación a largo plazo.

Mediciones más certeras podrían ser realizadas a los fines de verificar el efecto de la fijación de nitrógeno sobre el suelo y la planta a largo plazo pero esto requeriría la realización de análisis de suelo regulares y de análisis de nitrógeno en el material vegetal.

Considerando que el nitrógeno es una de las principales fuentes de nutrientes del vegetal, el valor de crecimiento inferido a través del diámetro del tronco parece ser un buen indicador. Análisis complementarios podrían ser programados en un futuro en las mismas parcelas en las que fue realizado el presente ensayo.

Una etapa importante resta a desarrollar y es la de hacer llegar este conocimiento a los potenciales productores que estén interesados en la implantación de bosques multipropósito. Destacar las ventajas de la especie y realizar el asesoramiento para que el productor pueda producir sus propios árboles e inocularlos con estas cepas sería un escenario deseable.

Referencias bibliográficas

- Carvalho, P. E. R. (1994). Especies florestais brasileiras. Recomendacoes Silviculturais, potencialidades e uso da madeira, Brasilia.
- Brenan, J. P. M. (1963). Notes on Mimosoideae: VIII. Kew Bulletin 17:227-228.
- de Souza, G. C., A. P. Haas, G. L. von Poser, E. E. Schapoval, and E. Elisabetsky (2004). Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. J Ethnopharmacol 90:135-43.
- Faria, S. M., G. P. Lewis, J. I. Sprent, and J. M. Sutherland (1989). Occurrence of nodulation in the Leguminosae. New Phytologist 111:607-619.
- Franco, A., and S. M. Faria (1997). The contribution on N₂-fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. Soil Biology and Biochemistry 29:897-903.
- Frioni, L., R. Dodera, D. Malatés, and I. Irigoyen. (1998). An assessment of nitrogen fixation capability of leguminous trees in Uruguay. Applied Soil Ecology 7:271-279.
- Izaguirre, P. And R. Beyhaut (2003). Las leguminosas del Uruguay y regiones vecinas. Parte 2. Caesalpinoideae y Mimosoideae. Hemisferio Sur, Montevideo, Uruguay.
- Moreira, F. M. S. (2008). Bacterias Fixadoras de Nitrogenio que Nodulam Leguminosae, p. 768. In F. M. S. Moreira, J. O. Siqueira, and L. Brussaard (ed.), Biodiversidade do Solo em Ecosistemas Brasileiros. Editora UFLA, Lavras.
- Moscovich, FA, C Dummel, M Pinazo, O Knebel & R Alcazar (2010) Análisis fitosociológico de un remanente de selva misionera secundaria en Misiones, Argentina. Jornadas Técnicas Forestales y Ambientales. Facultad de Ciencias Forestales, UNaM - EEA Montecarlo, INTA. 10, 11 y 12 de Junio de 2010 -Eldorado, Misiones, Argentina
- Schmidt, C. A., R. Murillo, T. Bruhn, G. Bringmann, M. Goettert, B. Heinzmann, V. Brecht, S. A. Laufer, and I. Merfort. (2010). Catechin derivatives from *Parapiptadenia rigida* with *in vitro* wound-healing properties. J Nat Prod 73:2035-41.
- Taulé, C, M Zabaleta, C Mareque, R Platero, L Sanjurjo, M Sicardi, L Frioni, F Battistoni and E Fabiano (2012). New betaproteobacterial *Rhizobium* strains able to efficiently nodulate *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan. Applied and Environmental Microbiology, 78(6), 1692–700.
- Vaccaro, S, M Arturi, J Goya, J Frangi & G Piccolo (2003) Almacenaje de carbono en estadios medios de la sucesión secundaria en la Provincia de Misiones, Argentina. INCI v.28 n.9 Caracas