

SELECCIÓN DE SIMBIOSIS LEGUMINOSAS - RHIZOBIUM TOLERANTES A ESTRÉS ABIÓTICO COMO ESTRATEGIA PARA LA SUSTITUCIÓN DE IMPORTACIONES EN LA PRODUCCIÓN DE GRANOS EN SUELOS AFECTADOS POR SALINIDAD Y BAJA FERTILIDAD

ENTIDAD EJECUTORA PRINCIPAL:

Instituto de Suelos. Ministerio de la Agricultura. Dirección: Autopista Costa y Antigua Carretera de Vento, Km. 8 ½ Capdevila, Boyeros, La Habana. CP: 10800.

AUTOR PRINCIPAL: Luis Agustín Gómez Jorrin¹.

OTROS AUTORES: Tomas Shagarodsky²; Aurelio García⁺¹; Manuel Sánchez³, Germán Hernández¹ Graciela Dueñas¹; Humberto Vásquez¹; Amalia Morales¹ y Jean Jacques Drevon⁴.

COLABORADORES: Grisel Herrero; Juana M. Dantin; Nancy Méndez; Nereida Chávez; Marcela Hernández; José Pascual; Maritza Mosquera; Juan Miguel Pérez; Dalmacio Bosch y Vicent Vadez.

OTRAS ENTIDADES PARTICIPANTES:

- Instituto de Investigaciones Fundamentales en la Agricultura Tropical** “Alejandro de Humboldt” Ministerio de la Agricultura, calle 1 y 2, Santiago de las Vegas, La Habana, Cuba. Código Postal 17200. Correo electrónico: shagarodski@inifat.co.cu
- Instituto de Investigaciones Hortícolas “Liliana Dimitrova”**, Quivicán, Mayabeque, Cuba.
- INRA-IRD-SUPAGRO, UMR1222, Montpellier, Francia.

OTRAS ENTIDADES COLABORADORAS:

- Instituto de Ecología y Sistemática, CITMA, Boyeros, La Habana, Cuba.
- International Crops Research Institute for Semi-Arid Tropics (ICRISAT), La India. Correo electrónico: vvadez@cgiar.org

AUTOR PARA LA CORRESPONDENCIA:

Luis Agustín Gómez Jorrin
Instituto de Suelos. MINAG. Autopista Costa – Costa y Antigua Carretera de Vento, Km. 8 ½ Capdevila, Boyeros, La Habana. C.P 10800.
Dirección electrónica: gomezjo@isuelos.co.cu o director@isuelos.co.cu

RESUMEN:

Antecedentes: En Cuba se siembran anualmente más **50 000** ha de leguminosas, lo que demanda unos **11.1 millones** de dólares solo por

concepto del uso de fertilizantes nitrogenados. La agricultura cubana protege con fertilizantes minerales menos del 30 % de las áreas siembra, el resto de las producciones se realiza a partir de la utilización de las reservas de nutrientes del suelo, fenómeno que provoca una pérdida de su fertilidad y los rendimientos agrícolas. Por ello el país decidió inocular la mayor parte de las áreas con el inoculante **BIOFER**® (*Rhizobium*), tecnología que permite alcanzar ganancias de 173.0 USD por hectárea inoculada. *Sin embargo el beneficio de la inoculación disminuye o se pierden, debido a que la simbiosis Leguminosa - Rhizobium se ve afectada por la baja disponibilidad de fósforo (P) y la presencia de sales en los suelos.* **Objetivos:** El objetivo general de este trabajo fue identificar líneas de leguminosas tolerantes a la deficiencia de P y al estrés salino entre los cultivares de cuatro especies (**fríjol común, caupí, fríjol chino y garbanzo**); así como definir los mecanismos asociados a estas tolerancias. **Resultados:** La ponencia resume el esfuerzo realizado por seis instituciones científicas en 16 proyectos de investigación durante 25 años, lo que permitió evaluar **220 cultivares**, en las que se emplearon métodos de trabajo novedosos como el cultivo en solución nutritiva para los estudios de la fisiología de la fijación simbiótica del nitrógeno y la metodología de dilución isotópica ¹⁵N para el cálculo de los niveles de N₂ fijado del aire en finca de productores. *Como resultado de estos estudios se cuenta con una valiosa información para el manejo de la inoculación con BIOFER® en todo el país.*

Novedad científica: El trabajo muestra como principales novedades: i) la disminución de las cantidades de N₂ fijado del aire observadas en leguminosas sometidas a estrés de P, es debido principalmente al decrecimiento en el número de nódulos y por tanto de la masa nodular producida por planta como consecuencia de la alta concentración de P necesaria para formar el tejido nodular, así como al incremento o mantenimiento de la producción de unidades de raíces que se realiza a costa de profundos cambios de distribución de masa entre los diferentes órganos de las plantas, y que afectan mayormente la nodulación. Sin embargo, la **actividad nodular específica** (mg N₂ fijado g nódulo⁻¹ día⁻¹) y el consumo de O₂ se incrementan para disminuir el efecto depresivo que provoca la falta de P sobre la nodulación. La distribución de P nodular es también afectada por el aislado de *Rhizobium* inoculado; ii) la conductancia nodular al oxígeno incrementó significativamente en condiciones de salinidad solo en líneas sensibles, aunque la presión crítica de oxígeno dentro de los nódulos sometidos a estrés salino, no cambió. La tolerancia a la salinidad es en parte relacionada a la capacidad de mantener alto potencial simbiótico bajo estrés salino; iii) el efecto de la salinidad y la deficiencia de fósforo sobre los parámetros consumo de oxígeno y la conductancia nodular al O₂ es cultivar específica e incrementan en las líneas sensibles, iv) el **cultivar ideal** en cuanto a tolerancia a la salinidad y a la baja disponibilidad de fósforo es aquel que produce un elevado número de pequeños nódulos, una alta producción de biomasa foliar y una alta y estable conductancia nodular al oxígeno; v) **en finca de productores** se comprobó que los cultivares que produjeron un elevado número de largas raíces adventicias fueron los que más unidades de fósforo extrajeron del suelo, lo que contribuyó a un mayor rendimiento de grano; vi) las líneas con alta capacidad para fijar N₂ del aire en condiciones de estrés fueron también las de mayor producción de grano; vii) la incorporación de los residuos de cosecha de las leguminosas aportó a las

gramíneas en sucesión entre 20 y 40 kg de N ha⁻¹. Los resultados anteriormente comentados se publicaron en **28 artículos científicos**, entre los que se destacan los divulgados en las revistas **Agronomía Mesoamericana**, **Agronomie** 21 (2001) 645 – 651 <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00886137> y **Terra**; así como en los libros de la OIEA (**TEC DOC No. 1721**, ISBN 978-92-0-113113-3 <http://www.iaea.org/books>) y En “**La Fijación Biológica del Nitrógeno en América Latina: El Aporte de las Técnicas Isotópicas**” y se difundieron en más de **14 eventos científicos internacionales** entre los que sobresalen, **14 Congreso Latinoamericano** de la Ciencia del Suelo, Chile, 1999; LI Reunión del **PCCMCA**, Panamá, 2005; **RHIZOSPHERE 2**, Montpellier, Francia 2007; **RELAR** e **IBEMPA 2009** y 2013; Simposio Internacional sobre Suelo y Cambio Climático, Viena, Austria 2012; International Conference of Agro-ecology for Africa (AFA), Madagascar, 2014 y **ECOLEG**, Montpellier, Francia, 2015. **Impacto económico**: La recomendación de líneas tolerantes al estrés salino y baja disponibilidad de P permite obtener ganancias de **200 USD** por hectárea cultivada. Las propuestas emanadas de estas investigaciones se introdujeron en las provincias de Holguín, Mayabeque, y Artemisa.

COMUNICACIÓN CORTA

Introducción.

La salinidad afecta cerca de 80 millones de hectáreas de suelos cultivables en todo el mundo y la baja disponibilidad de fósforo (P) limita el crecimiento de las plantas en el 70 % de los agro-ecosistemas terrestres, incluyendo la mitad de los suelos agrícolas. Estos factores ejercen un impacto negativo sobre la fijación simbiótica del nitrógeno (FSN) y el rendimiento de grano de las leguminosas en interacción con la bacteria *Rhizobium*, dada la particular sensibilidad de la simbiosis a los estreses abióticos (*Flowers et al.*, 2010; Lynch, 2011).

En Cuba estudios recientes del Instituto de Suelos, muestran que la situación en las áreas de siembra no es muy diferente, pues cerca de un millón de hectáreas están afectadas por salinidad y el 50 % de los suelos tienen bajas concentraciones de P para el uso agrícola reportado.

Una de las *alternativas propuestas* para resolver este problema es la selección de líneas o cultivares de leguminosas tolerantes (Sinclair y Vadez, 2002; Flowers *et al.*, 2010). El presente trabajo evaluó la tolerancia a la salinidad y a la deficiencia de fósforo de **212 cultivares** de leguminosas (**110 de frijol común** (*Phaseolus vulgaris* L.), **48 de caupí** (*Vigna unguiculata*, (L.) Walp), **42 de garbanzo** (*Cicer arietinum* L.), **12 fríjol chino** (*Vigna radiata* (L) Wilczel), con el objetivo de identificar líneas tolerantes, parámetros y mecanismos fisiológicos asociados a la tolerancia.

Material Genético Estudiado.

Se evaluaron **212 cultivares** de cuatro especies de leguminosas:

110 cultivares de frijol común: 85 Líneas híbridas recombinantes del cruce BAT 477 x DOR 364 (1.1.1, 2.1.1, 3.1.1, 4.1.1, 6.1.1, 7.1.1, 8.1.1, 9.1.1, 10.1.1, 12.1.1,13.1.1, 14.1.1, 15.1.1, 17.1.1 22.1.1, 25.1.1, 26.1.1, 27.1.1, 28.1.1,

30.1.1, 31.1.1, 33.1.1, 34.1.1,35.1.1, 35.1.4, 36.1.1, 38.1.1, 39.1.1 45.1.1, 46.1.1, 47.1.1, 48.1.1, 50.1.1, 53.1.1, 54.1.1, 55.1.1, 56.1.1, 57.1.1, 58.1.1, 59.1.1, 60.1.1, 65.1.1, 66.1.1, 67.1.1, 68.1.1, 69.1.1, 70.1.1, 71.1.1, 72.1.1, 73.1.1, 74.1.1, 75.1.1, 76.1.1, 77.1.1, 83.1.1, 84.1.1, 85.1.1, 88.1.1, 89.1.1, 90.1.1, 92.1.1, 93.1.1, 94.1.1, 95.1.1, 96.1.1 and 97.1.1) del cruce BAT 477 x DOR 364 y **24 variedades comerciales:** (BAT 24, BAT 58, BAT 93, BAT 304, BAT 482, BAT 832, Guama 23, Rosas, M112, Bolita 42, Güira 89, Jamapa, CC – 25-9R, CC-25-9N, CC 25-9B, CC 25-9C, ICA Pijao, Bonita 11, Red Kloud, Velazco Largo, BAT 477, DOR 364, UPR 56 and UPR 70).

48 cultivares de caupí: BR Poty, Frijol garbanzo, Viñales 144 A, P 19, P 141 A, Cancarro Holguín, MINICA III, Habana 82, 69F – 18, Caupí E. Semilla, Titán, CENIAP 214, CENIAP 215, CENIAP 219, CENIAP 307, CENIAP 314, California Black EYES, INIFAT 93, INIFAT 94, 19F 311, Baracoa, BR 4 Rio Branco, BR 8 Calderio, CENIAP 308, CNC 0434, Espace 10, I -17, I-18, ICA Llanura, ICA Menegua, P 1766, P903, Tuy, Vigna Perú, Cancarro Güira, CENIAP 208, CENIAP 223, CENIAP 301, CENIAP 306, CNCX 67621E, Cubanita 666, IITA Precoz, Mulatina 314, Ojito Negro, OR 574-3, Pink Eyes, Titán, Trópico 782, Yarey 792.

42 cultivares de garbanzo: Nacional 5HA, Nacional 6, Nacional 10, Nacional 27, Nacional 29, Nacional 38, Jamu 96, Blanco Sinaloa 92, JP 94, L-25, Suprema 03, Nacional 30, ICC-V2, ICCV-10, ICC-67, ICC-867, ICC-1431, ICC-1915, ICC-2580, ICC-3946, ICC-4495, ICC-4593, ICC-5003, ICC-5337, ICC-6263, ICC-6306, ICC-8058, ICC- 8522, ICC -8950, ICC- 9942, ICC-10885, ICC-11121, ICC-12155, ICC-13357, ICC-15518, ICC-15610, ICC- 96029, JG 11, CSG-8962, ICC-4973(L550), INRAT 93.1 y Amdoun.

12 cultivares de frijol chino: Chino Venezuela, MU 1973, MU 1974, MU 1977, MU 1977 VII, Mungo erecto, VC 93 01 (DX 044TN8), VC 93 02(DX 3746 A, VC 93 03(DX 4152 A, Vigna radiata AVRS Francia, Vigna radiata Cadmi, Vigna radiata INIFAT.

Metodologías de trabajo empleadas y parámetros evaluados.

Durante los estudios fisiológicos y la identificación de líneas tolerantes al estrés salino y la baja disponibilidad de P, las plantas se cultivaron en solución nutritiva libre de nitrógeno, similar a la propuesta de Drevon *et al.*, 1988. Los estudios de la salinidad se realizaron a concentraciones que variaron entre 0 y 25 mM de NaCl; mientras las evaluaciones de la tolerancia a la baja disponibilidad de fósforo se realizaron a concentraciones que oscilaron entre 0 y 600 µM de P. Se emplearon como especies sensibles y tolerantes a la baja deficiencia de P el frijol común y el caupí respectivamente (Sinclair y Vadez, 2002), y como modelo de planta sensible a la salinidad el garbanzo (Vadez *et al.*, 2007 y Flowers *et al.*, 2010). Se evaluaron 32 *parámetros fisiológicos* asociados a crecimiento, nodulación y concentración y distribución de nutrientes entre los diferentes órganos de las plantas, así como consumo y conductancia nodular al oxígeno (Jebara y Drevon, 2001). Los estudios en macetas con suelo se realizaron en casa de cristal con volúmenes de suelo que variaron desde 1.3 y 5 kg, a las macetas se le aplicaron dosis de P que oscilaron entre 0 y 150 mg P₂O₅ x kg de suelo y se impusieron diferentes concentraciones de sal (0 – 100 mM NaCl). Las evaluaciones agronómicas se

llevaron a cabo en parcelas experimentales que variaron desde 11.2 m² hasta 1 hectárea de superficie, en suelos con baja disponibilidad de fósforo (4 – 10 mg de P kg⁻¹ suelo, Bray I) y afectados por sales, en las provincias de Pinar del Rio, Artemisa, Mayabeque y Holguín. Se determinaron los parámetros asociados a crecimiento, nodulación, rendimiento de grano e índices como *caracteres* de raíces (Lynch, 2011), proporción de nitrógeno (N) derivado del aire y balance de N después de la cosecha de acuerdo a la metodología de dilución isotópica de ¹⁵N (Hardanson, 1990). Se determinaron los niveles críticos de P en suelo para máxima fijación de N₂ empleando el método de Cate y Nelson, 1971.

Los resultados se procesaron por medio de análisis de varianza y prueba de rango múltiple de Duncan a $\alpha \leq 0.05$, utilizando el paquete estadístico **MSTAT-C** versión 2.10 (Michigan, 1988). Para identificar líneas tolerantes y parámetros fisiológicos asociados se empleó el análisis de componentes principales y el análisis numérico de dendograma para disimilitudes, utilizando los paquetes estadísticos **XLSTAT 2005 y-2010**.

PRINCIPALES RESULTADOS

Aportes científicos:

Determinación del efecto de la **deficiencia de P** sobre la FSN: La disminución de las cantidades de N₂ fijado del aire observadas en plantas de leguminosas sometidas a **baja disponibilidad de fósforo**, es debido principalmente al decrecimiento en el número de nódulos y por tanto de la masa nodular producida por planta como consecuencia de la alta concentración de P necesaria para formar el tejido nodular, así como al incremento o mantenimiento de la producción de unidades de raíces que se realiza a costa de profundos cambios de distribución de masa entre los diferentes órganos de las plantas, que afectan mayormente la nodulación. *Sin embargo, la actividad nodular específica (N₂ fijado g nódulo⁻¹ día⁻¹) y el consumo de O₂ (μM O₂ h⁻¹ g⁻¹ raíz nodulada) se incrementan en cultivares tolerantes para disminuir el efecto depresivo que provoca la falta de fósforo sobre la nodulación.*

Determinación de la influencia del **estrés salino** sobre la FSN: El decrecimiento de la FSN debido al efecto del estrés salino estuvo asociado a la disminución del crecimiento del follaje aéreo, la biomasa nodular y el número de nódulos por planta, como consecuencia del efecto tóxico ejercido por los iones Na⁺ y Cl⁻. Sin embargo los cultivares tolerantes ponen en marcha varias estrategias, entre las que se encuentran los mecanismo de protección del follaje y los nódulos como unidades fotosintéticas y fijadoras de N₂ respectivamente, en la que se involucra las raíces acumulando la mayor parte de los iones tóxicos como parte de un ajuste osmótico para evitar dañar los órganos más sensibles. Por el contrario las variedades más sensibles incrementan la conductancia nodular del O₂ para compensar el decrecimiento de la nodulación y la falta de envío de nitrógeno al follaje aéreo por parte de los nódulos.

El trabajo demostró que cultivares y especies de leguminosas tolerantes a la baja deficiencia de P incrementan la actividad nodular específica (mg N₂ fijado g nódulo⁻¹ día⁻¹), como estrategia para incrementar las cantidades de N₂ fijados del aire y compensar la baja en la producción de nódulos, sin un suministro suplementario de fósforo. Los resultados también mostraron, que, cultivares muy sensibles a la salinidad elevaron la conductancia nodular al oxígeno ($\mu\text{m s}^{-1}$), como estrategia para poner en marcha un mecanismo alternativo para fijar nitrógeno del aire y compensar el decrecimiento de la nodulación provocado por la salinidad, todo lo cual quedó plasmado en publicaciones científicas (ver anexos). Las evaluaciones en parcelas de productores campo empleando método de dilución isotópica del ¹⁵N permitieron comprobar que los niveles de N derivados del aire en el país oscilan entre 40 – 60 %, por lo que se hace necesario continuar con un trabajo de mejoramiento de la FSN en suelos afectados por factores limitantes.

Valor práctico de los resultados.

Ventajas del empleo de líneas tolerantes en campo de productores: El trabajo permitió comprobar que la recomendación de líneas tolerantes incrementan los rendimientos de granos en más de 0,5 t de granos ha⁻¹ y el aporte de nitrógeno al suelo en más de 40 kg de N ha⁻¹.

Recomendaciones para Programas Nacionales. El trabajo permitió comprobar la necesidad de incorporar en los programas de mejoramiento genético de leguminosas de grano en el país y en el programa de producción de materia orgánica y biofertilizantes el trabajo de identificación de líneas tolerantes a estrés abiótico y su posterior introducción en las fincas de los productores, como estrategia para elevar los rendimientos agrícolas y el aporte de nitrógeno al suelo en campos de leguminosas inoculadas con *Rhizobium*. Se identificaron como parámetros necesarios a evaluar durante el trabajo de mejoramiento genético, el número y biomasa de los nódulos, la producción de raíces, la distribución de biomasa entre los órganos de las plantas, el contenido de sodio, cloro, nitrógeno y fósforo en el follaje, y parámetros como la eficiencia de uso del P y el consumo de O₂ de las raíces noduladas.

Líneas promisorias identificadas. **Frijol común:** BAT 24, BAT 304, BAT 832, Guama 23, ICA Pijao y RILs 22.1 RILs 75.1, DOR 364. **Caupí:** Habana 82, Viñales 144 A, California Black Eyes. INIFAT 94 y Titán. **Garbanzo:** ICC49-73, ICC 1431, Nacional 6, Nacional 29, Nacional 27, Jamu 96. **Frijol chino:** Chino Venezuela, MU 1974, VC 93- 02C y Vigna Radiata INIFAT

REFERENCIAS

- **Drevon *et al.*, 1988.** Plant. Physiol. Bioch. 26,73-78.
- **Flowers *et al.*, 2010.** Plant Cell Environment. **1365**, 3040 – 3060.
- **Jebara y Drevon, 2001.** Agronomie 21, 667 – 674.
- **Lynch, 2011.** Plant. Physiol. 156, 1041 – 1049.
- **Sinclair y Vadez 2002.** Plant. Soil. 245, 1-15.
- **Vadez *et al.*, 2007.** Field Crop Research **104**, 123 – 129.