

## Mejora de la germinación del trébol bajo estrés metálico mediante la inoculación con *Bradyrhizobium* sp. (Lotus)

Hoceme Degaichia<sup>1\*</sup>

Farid Hamas<sup>2</sup>

Ahmed Ramzi Boussahoua<sup>2</sup>

Touati Bakria<sup>1</sup>

Fatima Bouchenak<sup>2</sup>

1 Centro de Investigaciones en Agropastoreo. Djelfa, Argelia.

2 Laboratorio de Investigación en Biotecnología de la Producción Vegetal. Blida, Argelia.

Autor para correspondencia: [hoceme.degaichia@crapast.dz](mailto:hoceme.degaichia@crapast.dz).

### Resumen

Este estudio investiga el efecto de la inoculación con *Bradyrhizobium* sp. (Lotus), una rizobacteria simbiótica, en la germinación del trébol bajo estrés inducido por cobre, cadmio y su combinación. El objetivo es destacar el papel de *Bradyrhizobium* sp. (Lotus) en la mitigación del estrés por cobre y cadmio y mejorar la germinación del trébol, una especie espontánea de interés forrajero. La investigación, realizada en Blida (Argelia) en 2024, se centra en los aspectos fisiológicos de la germinación, incluido el conteo total de germinación, el tiempo medio de germinación y la inhibición de la reversibilidad de la germinación. El análisis estadístico se realizó mediante Manova con un umbral del 5%. Los resultados indican que la inoculación con *Bradyrhizobium* sp. (Lotus) aumenta los valores de conteo total de germinación y reduce la fase de retardo de la germinación de +168 h a 48 h. Además, la inhibición de la germinación se reduce en un 20 a 30% en comparación con las semillas no inoculadas y los parámetros fisiológicos de germinación mejoran bajo condiciones de estrés por metal. Los hallazgos sugieren que *Bradyrhizobium* sp. (Lotus) puede mitigar el estrés por cobre y cadmio mediante la detoxificación o quelación, mejorando así la tolerancia del trébol a estos elementos traza metálicos durante la etapa de germinación.

### Palabras clave:

cadmio, cobre, fisiología, PGPR.



## Introducción

El trébol tiene una gran importancia ecológica y agrícola debido a su adaptabilidad a diversos ambientes y su papel como leguminosa forrajera. Contribuye a la fertilidad del suelo a través de la fijación biológica de nitrógeno, lo que mejora el contenido de nutrientes del suelo y reduce la necesidad de fertilizantes químicos, lo que lo convierte en un candidato ideal para la agricultura sostenible (Smýkal *et al.*, 2015). Su capacidad para prosperar en suelos pobres en nutrientes lo hace particularmente valioso en los esfuerzos de restauración de tierras (Brockwell *et al.*, 2005).

Las iniciativas de desarrollo sostenible a nivel mundial enfatizan cada vez más la incompatibilidad de la contaminación ambiental, en particular de los compuestos persistentes como los oligoelementos metálicos, con la integridad ecológica. Estos elementos, estables y persistentes, plantean importantes riesgos de contaminación al acumularse en los ecosistemas y transferirse a organismos superiores, afectando así a la salud pública y al equilibrio ecológico (Croteau *et al.*, 2005; DeForest *et al.*, 2007). Algunos metales exhiben toxicidad incluso a bajas concentraciones (Mills *et al.*, 1977).

Los microorganismos, particularmente las bacterias, desempeñan un papel vital como constructores, reguladores, fijadores y estabilizadores en el medio ambiente, como la fijación de nitrógeno atmosférico por parte de las rizobacterias (Brockwell *et al.*, 2005). Su diversidad y actividad pueden verse significativamente afectadas por varios factores, incluyendo altas concentraciones de iones metálicos en el suelo, que inducen cambios estructurales, bioquímicos y fisiológicos en las semillas, reduciendo en última instancia las tasas de germinación y retrasando el desarrollo de las plantas (Ashraf *et al.*, 2007).

A pesar de las numerosas limitaciones ambientales que pueden impedir la germinación de las semillas, pocos estudios han explorado el impacto del estrés por oligoelementos metálicos en la germinación. El objetivo de este estudio es evaluar el papel de la inoculación de la rizobacteria *Bradyrhizobium* sp. (Lotus) en la mitigación del deterioro de la germinación de semillas de trébol bajo estrés por cobre.

## Material y métodos

### Material vegetal

Las semillas utilizadas en este experimento son de *Lotus ornithopodioides* L., una fabácea espontánea con carácter forrajero. *Lotus ornithopodioides* L. es silvestre con distribución en el Mediterráneo. Las semillas se recolectaron en la región de Soumâa (Blida-Argelia) en mayo de 2023.

### Cepa bacteriana

La bacteria utilizada en este experimento es *Bradyrhizobium* sp. (Lotus) aislada de nódulos de *Lotus ornithopodioides* L. Se utiliza en una concentración de  $10^8$  UFC ml<sup>-1</sup> a las 24 h (Degaichia *et al.*, 2024).

### Ensayo de inoculación y germinación

La esterilización de las semillas se lleva a cabo según el método de Vincent (1970) y Somasegaran *et al.* (1994). La inoculación de las semillas por *Bradyrhizobium* sp. (Lotus) se llevó a cabo según el método recomendado por Silini *et al.* (2016).

Las semillas se germinaron en placas de Petri (20 semillas por placa) cuyo fondo se cubrió con una doble capa de papel de filtro empapado en agua destilada (testigo), soluciones de diferentes concentraciones de CdCl<sub>2</sub> y CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich; pureza 99.99%) (pruebas). La germinación se llevó a cabo en la oscuridad a una temperatura de 25 °C (Mihoub *et al.*, 2005) (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Concentración de cobre y cadmio utilizada ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ).**

Concentración ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Cu(II)	Cd(II)		Cu(II): Cd(II)
C1	1 500	2 000	I	1 500:2 000
C2	2 000	3 500	II	2 000: 3 500
C3	3 000	6 000	III	3 000:6 000

### Tasa de germinación acumulada

La tasa de germinación acumulada (TGA) se determinó de acuerdo con la siguiente fórmula (Bouton *et al.*, 1976).

$$\text{TGA \%} = \left[ \frac{G2}{2} \right] + \left[ \frac{G4}{4} \right] + \left[ \frac{G6}{6} \right]$$

Donde: G2, G4 y G6 son los porcentajes de germinación a los 2, 4 y 6 días después del inicio de la germinación.

### Cinética de germinación

El número de semillas germinadas se registró cada 24 h durante siete días.

### Germinación media diaria

Es la relación entre el porcentaje de germinación final (TG%) y el número de días hasta la germinación final (N) designada por GMD (Osborne *et al.*, 1993).

$$\text{GMD} = \frac{\text{TG\%}}{N}$$

### Velocidad de germinación

La velocidad de germinación (TMG) se calcula de acuerdo con la siguiente fórmula (Come, 1970).

$$\text{TMG(día)} = \frac{(N_1 \cdot T_1) + (N_2 \cdot T_2) + \dots + (N_n \cdot T_n)}{(N_1 + N_2 + \dots + N_n)}$$

Donde:  $N_1$  es el número de semillas germinadas en el momento  $T_1$ ;  $N_2$  es el número de semillas germinadas en el intervalo  $T_1 - T_2$ .

### Inhibición de la germinación

El porcentaje de inhibición (I%) de la germinación se calculó según El Hadji-Djibo *et al.* (2014) de la siguiente manera:

$$I\% = \left[ \frac{X_i - Y_i}{X_i} \right] \times 100$$

Donde:  $X_i$  = número de semillas que han germinado en el medio de control;  $Y_i$  = número de semillas que han germinado en el medio que contiene Cu(II) o Cd(II).

### Reversibilidad de la acción del cobre y el cadmio

Se utilizaron las 20 semillas germinadas en presencia de C1, C2 y C3 de metales traza (MT) durante siete días. Entre estas semillas se eligieron las que no germinaron. Se enjuagaron tres veces y

luego se transfirieron a un medio que contenía agua destilada durante veinte días adicionales. El porcentaje de recuperación de la germinación (RG%) se determinó mediante la siguiente fórmula (Bennani *et al.*, 2015):

$$RG\% = \frac{(a-b)}{(c-b)} \times 100$$

Donde: a= número total de semillas germinadas después de ser transferidas al agua destilada; b= número total de semillas germinadas en una solución que contiene MT; C= número total de semillas germinadas.

## Toxicidad de los iones y efectos osmóticos en la germinación

Diez semillas no inoculadas se colocaron en un medio suplementado con 10 ml de solución que contenía diferentes concentraciones de cadmio y cobre o soluciones iso-osmóticas de manitol (Bennani *et al.*, 2015) (Cuadro 2).

**Cuadro 2. Concentración de soluciones de manitol iso-osmóticas (g L<sup>-1</sup>).**

		Cu(II)			Cd(II)			Cu(II)+Cd(II)		
MT (μg ml <sup>-1</sup> )		1 500	2 000	3 000	2 000	3 500	6 000	I	II	III
Manitol (g L <sup>-1</sup> )		5.08	10.16	15.24	0.5	1.01	1.52	6	11.18	16.77

La incubación duró 20 días (Bennani *et al.*, 2015). La ley de Van't Hoff se utiliza para calcular las soluciones iso-osmóticas del manitol:

$$\pi = RT \left( \frac{n}{V} \right) i \phi$$

Donde:  $\pi$ = presión osmótica (Pa); R= constante de gas ideal 8.314 (UI); T= temperatura absoluta en °K 273 + temperatura en °C; n= número de moles de soluto; V= volumen (m<sup>3</sup>); i= número de partículas formadas por disociación del soluto;  $\phi$ (phi)= coeficiente osmótico= factor de corrección.

## Efecto de la combinación de cobre y cadmio

El tipo de interacción entre los dos MT se evaluó mediante la fórmula de Abbott (Gisi, 1996). En este modelo, la inhibición de la germinación teórica de la mezcla,  $I_{th}$ , expresada en porcentaje, se determinó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$I_{th} = I_A + I_B \left( \frac{I_A \cdot I_B}{100} \right)$$

Donde:  $I_A$  e  $I_B$  representan las inhibiciones causadas por los MT solos (cobre y cadmio, respectivamente). La tasa de inhibición (TI) correspondiente a cada combinación se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$TI = \frac{I_{obs}}{I_{th}}$$

Los valores de (TI) mayores que 1 indican una sinergia entre los dos MT; los valores de (TI) menores que 1 significan antagonismo entre los dos MT; los valores de (TI) iguales a 1 corresponden a una aditividad de los efectos.

## Análisis estadístico de los datos

El análisis estadístico de los resultados se realizó con el programa SPSS® versión 20.0.0 para Windows™. Los experimentos se replicaron seis veces, mostrando consistentemente tendencias similares según la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk ( $p=0.89 > 0.05$ ). Las pruebas de Manova se realizaron con un nivel de significancia del 5% para evaluar el impacto de la inoculación bacteriana en los parámetros. Además, se evaluó el efecto de *Bradyrhizobium* sp. (Lotus) sobre la toxicidad iónica durante la germinación en condiciones metálicas mediante la prueba binomial.

## Resultados

Los resultados ilustran los efectos de diferentes concentraciones de cobre y cadmio sobre los parámetros de germinación de las semillas, con y sin inoculación de *Bradyrhizobium* sp. (Lotus) (Cuadro 3).

**Cuadro 3. Impacto de la inoculación de *Bradyrhizobium* sp. (Lotus) sobre los parámetros de germinación.**

MT	Conc	TGA (%)		GMD (semillas días <sup>-1</sup> )		TMG (días)		Inhibición (%)	
		Nino	Ino	Nino	Ino	Nino	Ino	Nino	Ino
Control	0	86.89 <sup>cb</sup>	86.67 <sup>ib</sup>	33.01 <sup>cb</sup>	33.33 <sup>ib</sup>	2.01 <sup>bb</sup>	1.6 <sup>ab</sup>	0 <sup>ca</sup>	0 <sup>aa</sup>
Cu(II)	1 500	0 <sup>aA</sup>	10.83 <sup>ab</sup>	0 <sup>aA</sup>	2.86 <sup>ab</sup>	0 <sup>aA</sup>	3.5 <sup>db</sup>	100 <sup>ab</sup>	80 <sup>fa</sup>
	2 000	0 <sup>aA</sup>	18.33 <sup>ib</sup>	0 <sup>aA</sup>	4.29 <sup>bb</sup>	0 <sup>aA</sup>	3.67 <sup>eb</sup>	100 <sup>ab</sup>	70 <sup>ea</sup>
	3 000	0 <sup>aA</sup>	17.5 <sup>eb</sup>	0 <sup>aA</sup>	4.29 <sup>bb</sup>	0 <sup>aA</sup>	2.5 <sup>cb</sup>	100 <sup>ab</sup>	70 <sup>ea</sup>
Cd(II)	2 000	0 <sup>aA</sup>	45 <sup>hb</sup>	0 <sup>aA</sup>	8.57 <sup>eb</sup>	0 <sup>aA</sup>	2.33 <sup>bb</sup>	100 <sup>ab</sup>	40 <sup>ba</sup>
	3 500	0 <sup>aA</sup>	16.67 <sup>db</sup>	0 <sup>aA</sup>	7.14 <sup>db</sup>	0 <sup>aA</sup>	4.1 <sup>fb</sup>	100 <sup>ab</sup>	50 <sup>ca</sup>
	6 000	0 <sup>aA</sup>	18.33 <sup>ib</sup>	0 <sup>aA</sup>	5.71 <sup>cb</sup>	0 <sup>aA</sup>	4.75 <sup>ib</sup>	100 <sup>ab</sup>	60 <sup>da</sup>
Cu(II) +	I	4 <sup>bA</sup>	20 <sup>gb</sup>	1 <sup>bA</sup>	5.71 <sup>cb</sup>	4 <sup>ca</sup>	4.25 <sup>gb</sup>	90 <sup>bb</sup>	60 <sup>da</sup>
Cd(II)	II	0 <sup>aA</sup>	15 <sup>cb</sup>	1 <sup>bA</sup>	4.29 <sup>bb</sup>	7 <sup>da</sup>	3.67 <sup>eb</sup>	95 <sup>bb</sup>	70 <sup>ea</sup>
	III	0 <sup>aA</sup>	12.5 <sup>bb</sup>	0 <sup>aA</sup>	4.29 <sup>bb</sup>	0 <sup>aA</sup>	4.33 <sup>hb</sup>	100 <sup>ab</sup>	70 <sup>ea</sup>

Conc= concentración de MT ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ); Nino= semillas no inoculadas; Ino= semillas inoculadas. Las medias seguidas de la misma letra mayúscula en filas y minúscula en columnas, no difieren estadísticamente entre sí según la prueba t de Student y la prueba de Tukey, respectivamente, con un 5% de probabilidad.

## Efecto de *Bradyrhizobium* sp. (Lotus) sobre la tasa de germinación acumulada

Sin embargo, la inoculación con *Bradyrhizobium* sp. (Lotus) condujo a una mejora en los valores de TGA. En un ambiente cádmico, la presencia de *Bradyrhizobium* sp. (Lotus) resultó en una TGA superior al 45% a una concentración de cadmio de 2 000  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , la cual disminuyó a 18.33% a 6 000  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . La germinación del trébol en un medio mixto de cobre y cadmio mostró una disminución proporcional de TGA con concentraciones crecientes. Los valores más altos de TGA se registraron a 1 500 y 2 000  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de Cu:Cd (20%). En general, el análisis multivariado de varianza (Manova) confirmó que *Bradyrhizobium* sp. (Lotus) impactó significativamente la tasa de germinación acumulada ( $p=0 < 0.05$ ).

## Efecto de *Bradyrhizobium* sp. (Lotus) en la cinética de germinación

Después de siete días de tratamiento con metales, el proceso de germinación se puede dividir en tres fases distintas:

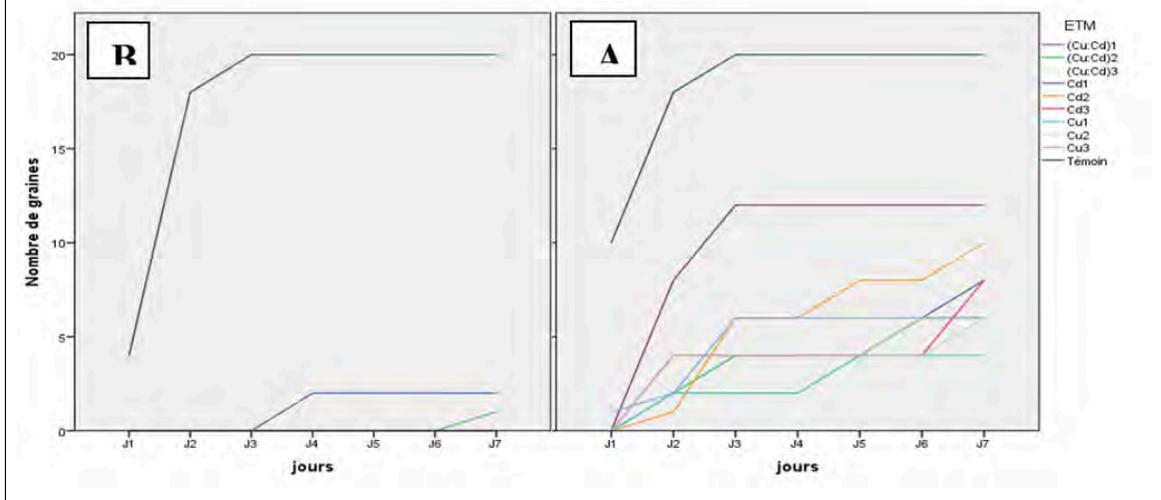
1) fase de latencia: en condiciones de control y con un medio cúprico de 1 500  $\mu\text{g ml}^{-1}$  inoculado con *Bradyrhizobium* sp. (Lotus), esta fase dura aproximadamente 24 h. No obstante, en semillas estresadas por metales con inoculación de *Bradyrhizobium* sp. (Lotus), esta fase se extiende a

48 h. En contraste, sin la inoculación de *Bradyrhizobium* sp. (Lotus), particularmente en semillas tratadas con mezclas metálicas ( $1\ 500:2\ 000\ \mu\text{g ml}^{-1}$  y  $2\ 000:3\ 500\ \mu\text{g ml}^{-1}$  Cu:Cd), la fase de latencia dura significativamente más tiempo, hasta 96 y 144 h, respectivamente.

2) fase lineal: las semillas inoculadas muestran un aumento inicial más pronunciado en la tasa de germinación en comparación con las semillas no inoculadas. Sin embargo, esta fase lineal está ausente en las semillas sometidas a diferentes tratamientos metálicos sin inoculación de *Bradyrhizobium* sp. (Lotus).

3) Fase final de germinación: representa el porcentaje final de germinación, reflejando la capacidad global de germinación en condiciones experimentales. En condiciones de control, la tasa de germinación alcanza su máximo (100%) después de 3 a 4 días, independientemente de la inoculación de *Bradyrhizobium* sp. (Lotus). Bajo estrés metálico y con inoculación de *Bradyrhizobium* sp. (Lotus), la tasa de germinación final se logra mucho más rápidamente en comparación con las semillas no inoculadas en condiciones similares (Figura 1).

**Figura 1. Efectos del estrés metálico sobre la cinética de germinación de tréboles inoculados (A) y no inoculados (B) con *Bradyrhizobium* sp. (Lotus)**



## Germinación media diaria

Bajo estrés metálico sin inoculación bacteriana, la GMD cae a 0%, lo que es consistente entre las diferentes concentraciones de cobre, cadmio y tratamientos combinados de cobre-cadmio ( $3\ 000:6\ 000\ \mu\text{g ml}^{-1}$ ).

La GMD sigue siendo notablemente baja a concentraciones de  $1\ 500:2\ 000\ \mu\text{g ml}^{-1}$  y  $2\ 000:3\ 500\ \mu\text{g ml}^{-1}$  en el medio combinado de cobre y cadmio, al 1.43% y al 0.71%, respectivamente. Las semillas inoculadas muestran una GMD más alta en comparación con las semillas no inoculadas. Con el aumento de las concentraciones de cadmio, los valores de la GMD disminuyen; por ejemplo, a  $2\ 000\ \mu\text{g ml}^{-1}$ , la GMD alcanza 8.75%, que es moderado en comparación con el control (33.33%).

La GMD disminuye proporcionalmente con el aumento de la concentración. La GMD más baja se observa a una concentración de cobre de  $1\ 500\ \mu\text{g ml}^{-1}$  (2.86%), la cual aumenta a 4.29% a  $2\ 000$  y  $3\ 000\ \mu\text{g ml}^{-1}$ . Bajo estrés metálico en un medio cúprico-cádmico con inoculación de *Bradyrhizobium* sp. (Lotus), la GMD promedio de semillas de trébol disminuye con el aumento de las concentraciones de metales.

El valor máximo registrado es de 5.71% para la concentración de  $1\ 500:2\ 000\ \mu\text{g ml}^{-1}$  (Cu:Cd). El análisis multivariado de varianza (Manova) indica un impacto significativo de *Bradyrhizobium* sp. (Lotus) en la tasa promedio diaria de germinación ( $p=0 < 0.05$ ).

## Velocidad de germinación

Las semillas germinadas en agua destilada tuvieron un tiempo medio de germinación (TMG) de 1.9 días. No obstante, no se pudo calcular el TMG para las semillas germinadas en soluciones puras de cadmio o cobre debido a la ausencia de germinación en todas las concentraciones analizadas. Bajo estrés metálico sin inoculación bacteriana, la velocidad de germinación (TMG) disminuyó entre un 50% y un 90% en comparación con el control cuando se utilizó una mezcla de cobre y cadmio, con reducciones proporcionales a la concentración, excepto a 3 000:6 000  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (Cu:Cd) donde no se produjo germinación.

El TMG del control (1.6 días) disminuyó en presencia de *Bradyrhizobium* sp. (Lotus), lo que indica un aumento de la velocidad de germinación con la inoculación bacteriana. Después de la inoculación, hubo una reducción en la velocidad de germinación proporcional a la concentración de cadmio, alcanzando un TMG= 4.75 días para 6 000  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de  $\text{CdCl}_2$ . En un medio de cobre, el TMG fue de 3.5 y 3.67 días para concentraciones de 1 500 y 2 000  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , respectivamente.

El análisis multivariado de varianza (Manova) reveló que *Bradyrhizobium* sp. (Lotus) impactó significativamente la velocidad de germinación ( $p= 0 < 0.05$ ).

## Inhibición de la germinación

En ausencia de *Bradyrhizobium* sp. (Lotus), la tasa de inhibición de la germinación fue del 100% cuando se aplicó cobre o cadmio por separado, independientemente de la concentración de iones, contrastando con la tasa cero observada en el control. La tasa de inhibición más baja se observó en la concentración C1 de la mezcla de cobre-cadmio (90%), con un aumento del 5% proporcional a la concentración. La tasa alcanzó un máximo del 80% para la concentración de cobre C1 y disminuyó al 70% con el aumento de la concentración.

Para el cadmio, la tasa de inhibición fue más baja al 40% para la concentración C1, aumentando al 60% en la C3. La mezcla de cobre y cadmio mostró una tasa de inhibición del 60% en C1, aumentando a un 70% comparable con el cobre solo. A pesar de estas variaciones, las tasas de inhibición fueron notablemente más bajas que las de las pruebas no inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. (Lotus). El análisis multivariado de varianza (Manova) demostró que *Bradyrhizobium* sp. (Lotus) influyó significativamente en la tasa de inhibición de la germinación ( $p= 0 < 0.05$ ).

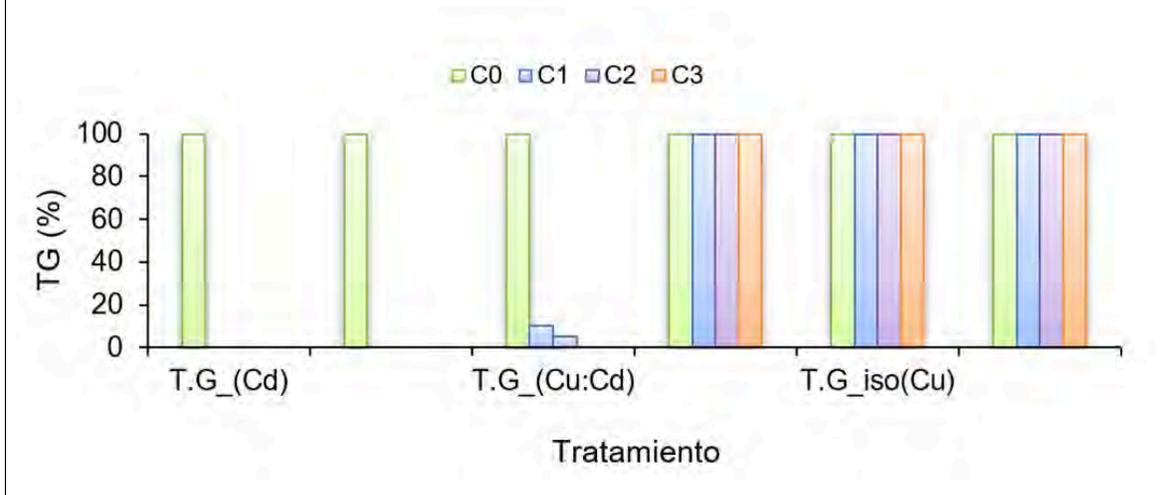
## Reversibilidad de la inhibición de la germinación

Se ha demostrado en resultados previos que el cobre y el cadmio y su combinación, ejercen a diferentes concentraciones, un efecto depresivo sobre la germinación de las semillas. Esta inhibición puede ser osmótica y tóxica. Si es de origen osmótico, deberíamos esperar una reanudación de la germinación después de levantar esta restricción. Sin embargo, si se producen fenómenos de toxicidad iónica, podemos esperar una falta de reanudación de la germinación. En particular, observamos la ausencia de reanudación de la germinación del trébol, independientemente del pretratamiento metálico y bacteriano. Esto confirma que la acción de los MT es de naturaleza tóxica.

## Determinación de la toxicidad iónica en la germinación

Para probar mejor el efecto osmótico o tóxico de los MT sobre el trébol, comparamos el comportamiento de la germinación en medio metálico y en manitol. La interacción Trébol vs Manitol fue significativa (binomial= 0.002 < 0.05). Los porcentajes de germinación sobre manitol (100%) fueron superiores a los registrados a las diferentes concentraciones de MT (C1, C2 y C3) y esto a pesar de la presión osmótica que indica los efectos tóxicos de los iones metálicos (Figura 2).

Figura 2. Tasa de germinación final del trébol en soluciones iso-osmóticas (TG-iso) en comparación con diferentes concentraciones de MT.



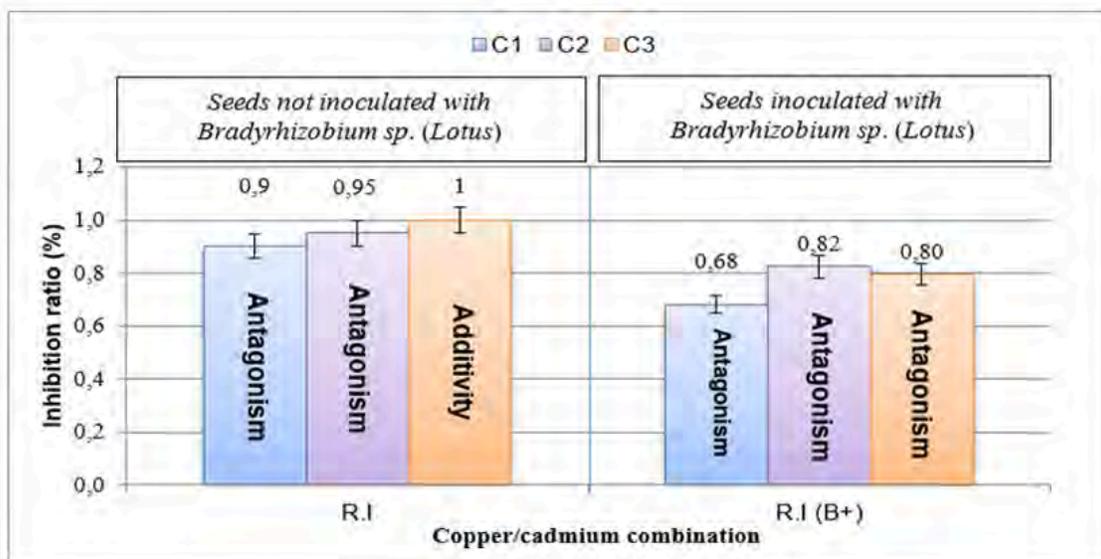
### Combinación de cobre y cadmio

Sin *Bradyrhizobium* sp. (Lotus), la tasa de inhibición de la germinación (TI) varió de 0.9 a 1, mostrando un aumento del 5% proporcional a la concentración, sugiriendo interacciones antagónicas entre el cobre y el cadmio; la TI fue de 1, indicando una interacción aditiva entre los elementos.

La inoculación con *Bradyrhizobium* sp. (Lotus) redujo la tasa de inhibición entre un 13 y un 22% en comparación con los controles sin inoculación bacteriana. Esta reducción de la TI con *Bradyrhizobium* sp. (Lotus) indica una interacción antagónica para todas las combinaciones. En particular, hubo un cambio de aditividad a antagonismo entre el cobre y el cadmio en la concentración C3. El análisis multivariado de varianza (Manova) mostró que la preinoculación de semillas de trébol con *Bradyrhizobium* sp. (Lotus) condujo a respuestas significativamente diferentes en comparación con las pruebas no inoculadas ( $p= 0.02 < 0.05$ ) (Figura 3).



Figura 3. Efecto de *Bradyrhizobium* sp. (Lotus) sobre la tasa de inhibición de la germinación (TI) (%) y la combinación cobre/cadmio.



## Discusión

*Bradyrhizobium* sp. (Lotus) muestra una notable resistencia tanto al cobre como al cadmio. Las estimaciones in silico sugieren que la concentración inhibitoria mínima (CIM) para el cadmio es de aproximadamente  $10\ 000\ \mu\text{g ml}^{-1}$ , mientras que para el cobre es de  $2\ 000\ \mu\text{g ml}^{-1}$  (Degaichia *et al.*, 2024). Esta alta tolerancia de *Bradyrhizobium* sp. (Lotus) a estos metales pesados lo posiciona como una solución prometedora para hacer frente a la contaminación ambiental causada por metales traza.

La tasa acumulativa y el porcentaje de germinación final de las semillas de trébol disminuyen con el aumento de la concentración de MT en el medio. De hecho, nuestros resultados ponen de manifiesto que el exceso de cobre y/o cadmio en el medio ambiente provoca una toxicidad irreversible. Lo mismo ocurre con la velocidad, la media y la cinética de la germinación. Estos resultados están alineados con los reportados por Mihoub *et al.* (2005); Lamhamdi *et al.* (2011).

Según estos autores, los MT (cobre, cadmio y plomo, etc.) en el medio inhiben significativamente la germinación de las semillas de algunas fabáceas. La inoculación de semillas de trébol con *Bradyrhizobium* sp. (Lotus) mejora significativamente la germinación bajo estrés metálico.

Según Nelson (2004), los rizobios pueden ejercer un efecto beneficioso sobre el crecimiento de las plantas al aumentar la tasa acumulativa de germinación y su velocidad. El efecto positivo de los rizobios sobre la germinación de semillas en ambientes desfavorables y la aparición del coleóptilo se atribuiría a la capacidad bacteriana para producir o modificar hormonas vegetales, incluidas las giberelinas, que juegan un papel clave en la germinación (Barassi *et al.*, 2006).

Al analizar el impacto de los MT en multitud de funciones fisiológicas vitales de la planta, Ernst (1998) admite que la germinación es un proceso ciertamente vulnerable al estrés metálico, pero que sería uno de los más resistentes entre las otras fases del desarrollo de la planta.

Las barreras tegumentarias de las semillas evitarían una fuerte acumulación de oligoelementos metálicos. Además, para cualquier proceso fisiológico o metabólico, son los umbrales críticos de fitotoxicidad, definidos en términos de acumulación de tejidos, los que determinan la sensibilidad a los MT (Woolhouse, 1983; Fernandes *et al.*, 1991).

La inhibición de la germinación es extremadamente pronunciada en los ensayos no inoculados. Esto se debe, como se ha explicado anteriormente, al efecto tóxico de los MT. *Bradyrhizobium* sp. (Lotus) induce una reducción significativa de esta inhibición.

## Conclusiones

Los resultados demuestran que la inoculación de *Bradyrhizobium* sp. (Lotus) mejora significativamente los parámetros de germinación en condiciones de estrés metálico. La inoculación aumentó el porcentaje total de germinación (TGA) y redujo la latencia de germinación inducida por el estrés por metales traza. Las semillas tratadas con *Bradyrhizobium* sp. (Lotus) exhibieron valores más altos de TGA y tiempos medios de germinación (TMG) más cortos en comparación con las semillas no tratadas, particularmente a concentraciones más altas de cobre y cadmio.

El uso de *Bradyrhizobium* sp. (Lotus) representa una estrategia prometedora para mejorar la germinación del trébol bajo estrés por metales traza, lo que indica el potencial de esta bacteria simbiótica para mejorar la tolerancia de las plantas a los elementos metálicos traza durante la germinación. Estos hallazgos proporcionan información valiosa para el desarrollo de prácticas agrícolas sostenibles destinadas a mitigar los efectos adversos del estrés metálico en la productividad de los cultivos.

## Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento a la Direction Générale de la Recherche Scientifique et du Développement Technologique (DGRSDT) de Argelia y al Centre de Recherche en Agropastoralisme-CRAPast de Argelia.

## Bibliografía

- 1 Ashraf, M. and Foolad, M. R. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Journal of Experimental Botany*. 59(2):206-216.
- 2 Barassi, C. A.; Ayrault, G.; Creus, C. M.; Sueldo, R. J. and Sobrero, M. T. 2006. Seed inoculation with *Azospirillum* mitigates NaCl effects on lettuce. *Scientia Horticulturae*. 109(1):8-14.
- 3 Bennani, K. and Bendaou, N. 2015. Influence de la salinité en plein champ sur la teneur en phytoestrogènes et la germination d'écotypes marocains de *Trifolium*. *Canadian Journal of Plant Science*. 95(3):461-466.
- 4 Brockwell, J.; Pilka, A. and Holliday, R. A. 2005. Soil restoration through the introduction of legumes in degraded land. *Plant and Soil*. 270(1-2):251-264.
- 5 Come, D. 1970. Obstacles to germination. Ed. Masson et Cie. 162 p.
- 6 Croteau, M. N.; Luoma, S. N. and Stewart, A. R. 2005. Trophic transfer of metals along freshwater food webs: Evidence of cadmium biomagnification in nature. *Limnology and Oceanography*. 50(5):1511-1519.
- 7 De-Forest, D. K.; Brix, K. V. and Adams, W. J. 2007. Assessing metal bioaccumulation in aquatic environments: the inverse relationship between bioaccumulation factors, trophic transfer factors and exposure concentration. *Aquatic Toxicology*. 84(2):236-246.
- 8 Degaichia, H.; Boussahoua, A. R. and Bakria, T. 2024. Resistance of *Bradyrhizobium* sp. (Lotus) to metallic stress. *Agropastoralis Scientia*. 1(2):73-83.
- 9 Ernst, W. H. O. 1998. Effects of heavy metals in plants at the cellular and organismic level ecotoxicology. In: Gerrit, S. & Bernd, M. Ed. *Bioaccumulation and biological effects of chemicals*, John Wiley & Sons and Spektrum Akademischer Verlag. 587-620 pp.

- 10 Fernandes, J. C. and Henriques, F. S. 1991. Biochemical, physiological and structural effects of excess copper in plants. *Botanical Review*. 57(1):246-273.
- 11 Mihoub, A.; Chaoui, A. and Ferjani, E. 2005. Biochemical changes induced by cadmium and copper during germination of pea seeds (*Pisum sativum* L.). *Comptes Rendus Biologies*. 328 (1) 33-41 p.
- 12 Mills, A. L. and Colwell, R. R. 1977. Microbiological effects of metal ions in Chesapeake Bay and sediments. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 18(1):99-103.
- 13 Nelson, L. M. 2004. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): prospects for new inoculants. *Crop Management*. 3(1):1-7.
- 14 Osborne, J. M.; Fox, J. E. D. and Mercer, S. 1993. Germination response under elevated salinities of six semi-arid blue bush species (Western Australia). *In: Lieth, H. & Masoom, A. Al. Ed. Towards the rational use of high salinity plants*. 323-338. pp
- 15 Silini, A.; Cherif-Silini, H. and Yahiaoui, B. 2016. Growing varieties durum wheat (*Triticum durum*) in response to the effect of osmolytes and inoculation by *Azotobacter chroococcum* under salt stress. *African Journal of Microbiology Research*. 10(12):387-399.
- 16 Smýkal, P.; Vernoud, V.; Blair, M. W.; Soukup, A. and Thompson, R. D. 2015. The role of the legume *Lotus* spp. in sustainable agriculture and ecological restoration. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 34(1-3):43-80.
- 17 Somasegaran, P. and Hoben, H. J. 1994. *Handbook for rhizobia*. Springer Verlag New York Inc. 450 p.
- 18 Vincent, J. M. 1970. *A manual for the practical study of the root-nodule bacteria*. IBP Handbook No. 15. Blackwell Scientific Publishers. 154 p.
- 19 Woolhouse, H. W. 1983. Toxicity and tolerance in the responses of plants to metals. *In O. L. Lange, P. S. Nobel, C. B. Osmond, & H. Ziegler Ed. Encyclopaedia of Plant Physiology, New Series 12C*. Springer-Verlag. 245-300 pp.



## Mejora de la germinación del trébol bajo estrés metálico mediante la inoculación con *Bradyrhizobium* sp. (Lotus)

Journal Information
Journal ID (publisher-id): remexca
Title: Revista mexicana de ciencias agrícolas
Abbreviated Title: Rev. Mex. Cienc. Agríc
ISSN (print): 2007-0934
Publisher: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

Article/Issue Information
Date received: 01 March 2025
Date accepted: 01 June 2025
Publication date: 04 June 2025
Publication date: May-Jun 2025
Volume: 16
Issue: 4
Electronic Location Identifier: e3658
DOI: 10.29312/remexca.v16i4.3658

### Categories

Subject: Artículo

### Palabras clave:

#### Palabras clave:

cadmio  
cobre  
fisiología  
PGPR.

### Counts

Figures: 3  
Tables: 3  
Equations: 8  
References: 19  
Pages: 0