

## RESPUESTA DE LAS POBLACIONES DE RIZOBIOS DE SOJA DEL SUELO AL MANEJO DE LOS CULTIVOS

G.N. Pastorino<sup>12</sup>, C. De Titto<sup>1</sup>, S.M.Y. López<sup>1</sup> y \*P.A. Balatti<sup>123</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE), CONICET. <sup>2</sup>Cátedra de Microbiología Agrícola.

<sup>3</sup>Centro de Investigaciones en Fitopatología - (CIDEFI-UNLP). FCAyF. Calle 60 y 119 s/Nº.

Tel: 0221-4236618. Universidad Nacional de La Plata (pbalatti@gmail.com)

### Introducción

El suelo es el hábitat de poblaciones microbianas que con frecuencia sufren modificaciones a nivel genético tanto evolutivas como adaptativas. Esto es aún más importante cuando se introducen bacterias exóticas a los ambientes, como es el caso de la inoculación de las leguminosas con las bacterias Gram (-) conocidas como rizobios.

Los cambios a nivel del genoma de los rizobios que son el resultado de mutaciones y rearrreglos que contribuye aún más a generar diversidad y a la evolución del organismo (Mavingui et al., 2002) a lo que contribuye también la transferencia horizontal de material genético (Sullivan et al., 1995; Suominen et al., 2001; Moulin et al., 2004)

El ambiente es modificado sustancialmente por las labores culturales (Kaschuk et al 2006) que contribuyen a la aparición de rizobios mutantes que potencian el efecto logrado con la inoculación, como por ejemplo estirpes más competitivas, resistentes a estreses ambientales bióticos y abióticos. (Aguilar, et al., 2001).

Los suelos de Brasil y Argentina originalmente no contenían rizobios simbioses de la soja, que es una leguminosa exótica, por ello estos se introdujeron e introducen con los inoculantes. La soja establece una relación simbiótica con 5 especies de rizobios *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium liaoningense*, *Mesorhizobium thianshanense*, *Sinorhizobium fredii* y *Sinorhizobium xingjianense* (Saldaña et al., 2003). Las estirpes de rizobios de los inoculantes se adaptan a los suelos. En estudios recientes en suelos de Paraguay, Brasil y Argentina se detectó la presencia de una gran diversidad de rizobios (Santos et al., 1999; Chen et al., 2002; Galli-Terasawa et al., 2003; Zabaloy et al., 2005). Más aún, Ferreira et al. (2000), en estudios realizados en los suelos de Brasil encontraron que la diversidad de las poblaciones de rizobios fue modificada por los sistemas de labranza y estas además suelen competir con las cepas inoculadas.

En general, los sistemas de suelos más evolucionados se caracterizan por contener una mayor diversidad de rizobios. En estos sistemas los diversos nichos ecológicos que coexisten pueden ser explotados por la gran diversidad de rizobios que se adaptan a una gran diversidad de ambientes, actuando esto en detrimento del éxito de la práctica de la inoculación debido a que la presencia de una gran diversidad de rizobios puede comprometer la capacidad de colonización de cepas introducidas por los inoculantes (CITA).

El objetivo de este trabajo fue analizar la diversidad de las poblaciones de rizobios que se generan en el suelo, como resultado de la interacción de las bacterias entre sí, de la influencia del medio ambiente y de las labranzas con que se trabajan los lotes, es decir de las fuerzas antropogénicas

La hipótesis de trabajo es que en los suelos de la Región Pampeana existe una gran diversidad de rizobios, que se generó en los mismos suelos, a partir de la cepa E109 (Colección INTA) (derivado de la cepa USDA138), diversidad que probablemente, esté relacionada con las prácticas culturales realizadas.

## Materiales y Métodos

### Aislamientos de rizobios nodulantes de soja

Se obtuvieron 180 aislamientos de bacterias nodulantes de soja a partir de muestras de suelos de la región pampeana (Runciman, pcia Santa Fe) con historia de cultivos, empleando como plantas trampa un cultivar de soja comercial. Las muestras de suelos estudiadas provenían de dos condiciones de cultivo diferentes: por un lado suelos trabajados con siembra directa y cultivo antecesor soja, y por otro lado suelos con siembra convencional y cultivo antecesor maíz. Estos se caracterizaron en base a su tipo de colonia (tamaño y mucosidad), resistencia a antibióticos, producción de AIA (ácido indol acético), producción de melanina, tolerancia a temperatura (37° y 40°), tolerancia a ClNa (0,5% y 2%). También se realizó la caracterización molecular empleando las reacciones de PCR con primers específicos BOX, RSα y Multiplex (Pastorino et al 2003)

Como controles se emplearon las cepas recomendadas como inoculantes comerciales en Argentina y Brasil: *Bradyrhizobium japonicum* E109 y SEMIA5080, *B. elkanii* SEMIA587 y SEMIA5019. Los repiques de los rizobios se mantuvieron en tubos pico de flauta con medio de cultivo YEM (Vincent, 1970) en heladera a 5°C. El inóculo se realizó repicando al medio de cultivo YEM líquido, el cual se incubó por 5 días a 28°C en agitación continua (150 rpm). Luego se midió la D.O. (densidad óptica) a 625 nm, para estimar el número de bacterias.

### Evaluación de la capacidad de fijación de nitrógeno

Para el cultivo de las plantas se utilizaron Jarras de Leonard con una capacidad de 250 cm<sup>3</sup>. El armado de las mismas se realizó empleando como sustrato vermiculita y luego se completaron con la solución nutritiva Jensen (solución Jensen 5X: PO<sub>4</sub>HCa 1g, PO<sub>4</sub>HK<sub>2</sub> 0.2g, SO<sub>4</sub>Mg.7H<sub>2</sub>O 0.2g, ClNa 0.2g, Cl<sub>3</sub>Fe 0.1g, solución de oligoelementos 1ml, agua hasta 1000ml) (Vincent, 1970). Las jarras se esterilizaron en autoclave a 121 C durante 1 hora.

Las semillas se esterilizaron superficialmente por inmersión en alcohol 50% durante 5 min y luego en hipoclorito de sodio 50%, lavando los residuos de hipoclorito con agua corriente. Las semillas esterilizadas se pregerminaron en agar agua (500ml H<sub>2</sub>O + 5g Agar) a 28°C durante 48 hs. Se transplantaron dos plántulas a cada Jarra de Leonard (4 jarras por cada cepa, mas 4 jarras controles sin inocular). Cada una de las semillas se inoculó con 1x10<sup>7</sup> bacterias. Las plantas se mantuvieron en el invernáculo bajo condiciones controladas de temperatura y luminosidad. A los 45 días de cultivo se procedió a cosechar las plantas. Luego, se realizó el recuento de nódulos y luego estos y la parte aérea de la planta se secaron en estufa a 80°C hasta peso constante.

### Evaluación de supervivencia

Se analizó la supervivencia de los rizobios sobre semillas de soja. Cada tratamiento incluyó 50g semillas (320 semillas), que fueron inoculadas con una suspensión de 1x10<sup>6</sup> bacterias/semilla, con la adición de un adherente y protector. Luego se incubaron en oscuridad a 20°C, en potes plásticos, con filtro de algodón para facilitar el intercambio gaseoso. Cada tratamiento se realizó por triplicado.

Periódicamente se tomaron muestras de 10 semillas, las que se mezclaron con 9 ml agua estéril, a partir de los cuales se realizaron diluciones 1/10. El recuento de rizobios se realizó empleando medio YEM (5 g/l de manitol y 0,4 g/l de extracto de levadura) suplementado con fungicida (Maxim 35 µl/100ml medio).

Tratamiento estadístico de los resultados. Se realizó un ANOVA tomando como variable aleatoria el promedio de Peso seco de nódulos (PSN) y el Peso seco de la parte aérea (PSA) entre las 2 plantas por jarra, para el ensayo de Fijación de N y de los recuentos (UFC) para supervivencia sobre semilla. Los contrastes de medias se realizaron con el test de Tukey y Dunnet, p=0,05.

## Resultados y Conclusiones:

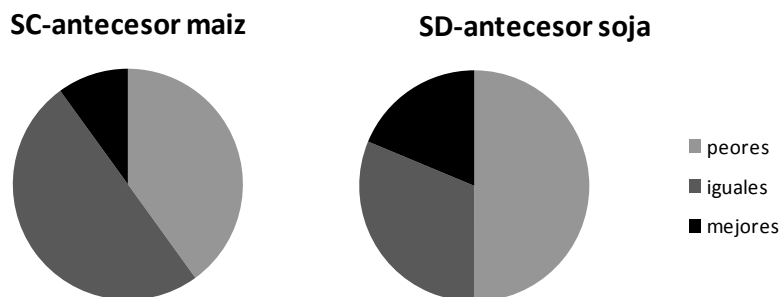
Los aislamientos se caracterizaron con marcadores moleculares, las estirpes comerciales de Argentina Berasil y Uruguay se utilizaron como control. Los aislamientos son del género *Bradyrhizobium* y se agruparon en clusters, cada uno asociado a una de las cepas patrón de *B. japonicum* (E109, SEMIA5079 y SEMIA5080) y de *B. elkanii* (SEMIA587 y SEMIA5019), lo que sugiere que los aislamientos derivan de ellas. Se evaluó un total de 170 aislamientos en lo que hace a su capacidad de fijación de nitrógeno, 95 se obtuvieron de los suelos bajo siembra directa de las cuales 28 cepas mostraron niveles de fijación de nitrógeno superiores a E109. A partir de los suelos cultivados con labranza convencional se obtuvieron 75 aislamientos, de ellos solo uno fijó más nitrógeno que E109. Los valores de peso seco de parte aérea de las estirpes con mayor capacidad de fijación superaron a la cepa control E109 entre un 10 y 20 %.

Se analizó la supervivencia de los aislamientos en la superficie de la semilla. Las estirpes no difirieron sustancialmente en el comportamiento, si bien existen diferencias en el número de células viables la pendiente de las curvas es similar, lo que indica que la tasa de mortalidad de las bacterias sobre la superficie de la semilla fue similar.

En la Fig 1 se representan los resultados de supervivencia sobre semillas. Se presentan resultados preliminares de 25 aislamientos, 16 provenientes de suelos cultivados bajo siembra directa y los 10 restantes provenían del suelo con siembra convencional y cultivo antecesor maíz. Los resultados muestran que solo el 18.7% y 10% de los aislamientos respectivamente, mostraron una mejor capacidad de sobrevivencia que la estirpe control.

Los suelos albergan una relevante diversidad de rizobios que probablemente se originaron a partir de las estirpes inoculadas. Esta diversidad debe ser explorada en diversas direcciones de manera de seleccionar organismos polifuncionales con potencial biotecnológico.

Fig.1



## Bibliografía

- AGUILAR, O.M., LÓPEZ, M.V. RICCILO, P.M. 2001. The diversity of rhizobia nodulating beans in Northwest Argentina as a source of more efficient inoculant strains. *Journal of Biotechnology* 91, 181-188.
- CHEN, L.S., FIGUEREDO, A., VILLANI, H., MICHAJLUK, J. & HUNGRIA, M. 2002. Diversity and symbiotic effectiveness of rhizobia isolated from field-grown soybean nodules. *Biology and Fertility of Soils* 35, 448-457.
- FERREIRA, M.C., ANDRADE, D.S., CHUEIRE, L.M.O., TAKEMURA, S.M. & HUNGRIA, M. 2000. Tillage method and crop rotation effects on the population sizes and diversity of bradyrhizobia nodulating soybean. *Soil Biology & Biochemistry* 32, 627-637.
- GALLI-TERASAWA, L., GLIENKE-BLANCO, G. & HUNGRIA, M. 2003. Diversity of a soybean rhizobial population adapted to a Cerrados soil. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 19, 933-939
- KASCHUK G., HUNGRIA M., SANTOS J.C.P and BERTON-JUNIOR J.F 2006. Differences in common bean rhizobial populations associated with soil tillage management in southern Brazil, *Soil and Tillage Research*, 87, Issue 2, 205-217

- MAVINGUI, P., FLORES, M., GUO, X., DAVILA, G., PERRET, X., BROUGHTON, W.J. & PALACIOS, R. 2002. Dynamics of genome architecture in *Rhizobium* sp. strain NGR234. *Journal of Bacteriology* 184, 171-176.
- MENDES, I.C., HUNGRIA, M. & VARGAS, M.A.T. 2004. Establishment of *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* strains in a Brazilian Cerrado oxisol. *Biology and Fertility of Soils* 40, 28-35.
- MOULIN, L., BÉNA, G., BOIVIN-MASSON, C. & STEPKOWSKI, T. 2004. Phylogenetic analyses of symbiotic nodulation genes support vertical and lateral co-transfer within the *Bradyrhizobium* genus. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30, 720-732.
- PASTORINO, G.N., MARTINEZ-ALCÁNTARA, V. & BALATTI, P.A. 2003. Identification of fast growing rhizobia nodulating soybean (*Glycine max* L. Merr) by a multiplex PCR reaction. *FEMS Microbiology Letters* 229, 153-158.
- SANTOS, M.A., VARGAS, M.A.T. & HUNGRIA, M. 1999. Characterization of soybean bradyrhizobia strains adapted to the Brazilian Cerrados Region. *FEMS Microbiology Ecology* 30, 261-272.
- SALDAÑA G, MARTINEZ-ALCÁNTARA V., VINARDEL J. M L, BELLOGÍN R, RUÍZ-SAINZ J.E. AND BALATTI P.A., 2003. Genetic diversity of fast-growing rhizobia that nodulate soybean (*Glycine max* L. Merr). *Archives of Microbiology*, 180, Number 1, 45-52.
- SULLIVAN, J.T., PATRICK, H.N., LOWTHER, W.L., SCOTT, D.B. & RONSON, C.W. 1995. Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. *Proceeding of the National Academy of Sciences of USA* 92, 8985-8989.
- SUOMINEN L., ROOS C., LORTET G., PAULIN L., LINDSTRÖM K. 2001. Identification and structure of the *Rhizobium galegae* common nodulation genes: evidence for horizontal gene transfer. *Molecular Biology and Evolution* 18, 907-916.
- VINCENT, JM 1970. *A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria*. Oxford. Blackwell Scientific Publications
- ZABALOY M.C. & GOMEZ M.A. 2005. Diversity of rhizobia isolated from an agricultural soil in Argentina based on carbon utilization and effects of herbicides on growth. *Biology and Fertility of Soils* 42, 83-88.