

Pastorino G.N.^{1,3}, S. M. Y. López³ y P.A. Balatti^{1,2,3}.

1Cátedra de Microbiología Agrícola- 2Centro de Investigaciones en Fitopatología- 3 Instituto de Fisiología vegetal (INFIVE)
Universidad Nacional de La Plata CC31-La Plata 1900 Argentina. CC 327, La Plata (1900), Argentina. E-mail: gpastorino@agro.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

En el suelo las bacterias frecuentemente sufren modificaciones a nivel genético que aportan a la diversidad de la población. Esto mismo sucede con las poblaciones de bacterias exóticas que son dinámicas, en las que aparecen poblaciones con características alteradas o con propiedades diferentes de la estirpe de origen. Esto es particularmente frecuente cuando se introducen bacterias en ambientes exóticos, como es el caso de la inoculación de las leguminosas. Estas cepas inoculadas suelen mutar con celeridad, con lo que suelen adquirir capacidades de sobrevivencia, perdiendo junto con ello eficiencia en la fijación de nitrógeno. Entre otros, el ambiente es uno de los factores más importantes porque es modificado sustancialmente por las labores culturales.

OBJETIVO

Evaluar el efecto de las labranzas sobre las poblaciones de los rizobios del suelo como resultado de los distintos ambientes que se generan.

Identificar aislamientos de cepas con aptitudes simbióticas superiores a las cepas parenterales que se utilizan en los inoculantes comerciales.

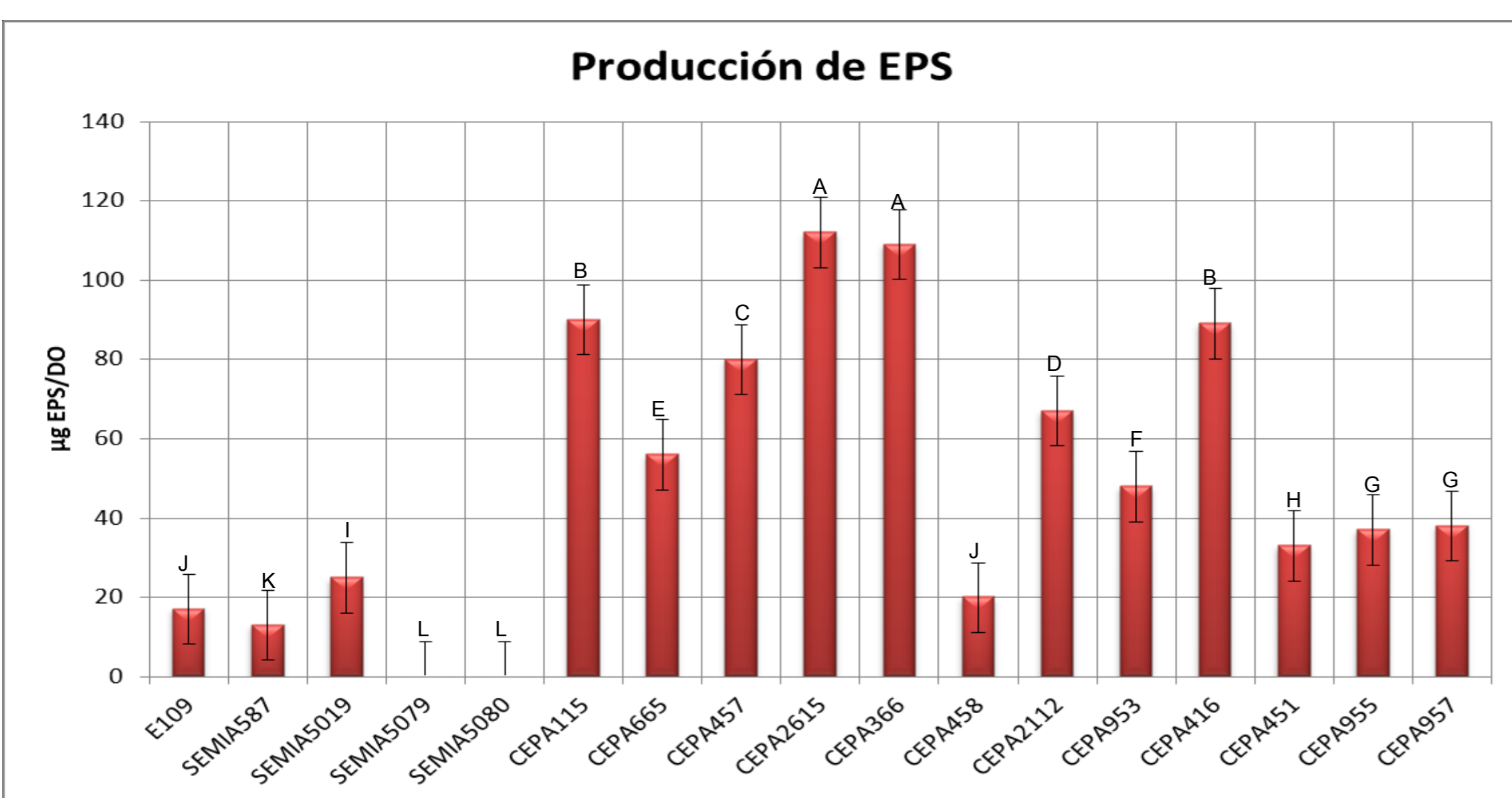


Fig. 3. Evaluación de la producción de EPS de los aislamientos que produjeron mayor PSA en el ensayo de fijación de N.

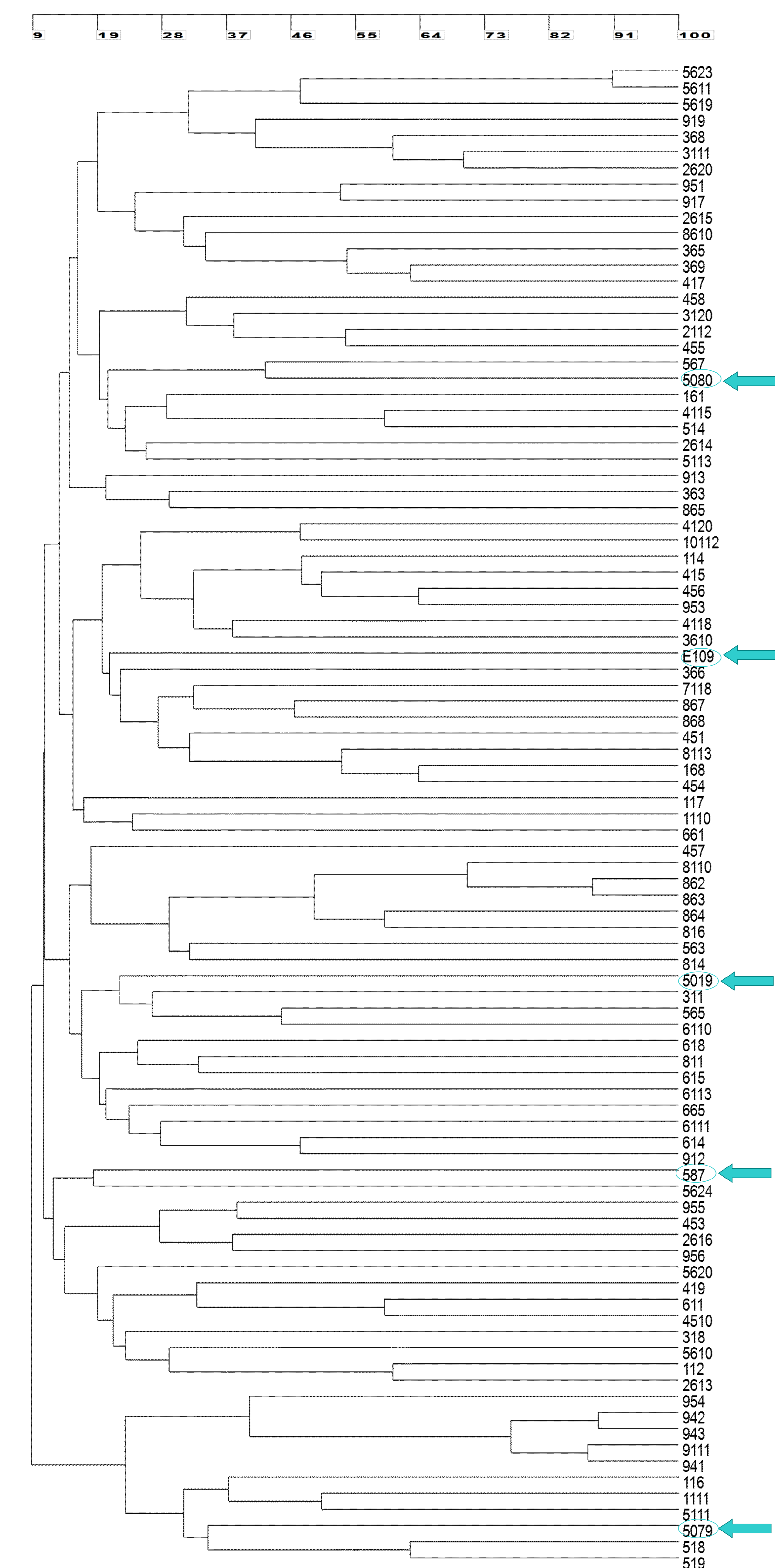


Fig. 4. Fenograma generado a partir de la reacción BOX. Con las flechas se indican la cepas tipo empleadas como inoculantes comerciales, en Argentina, Brasil y Uruguay.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de suelo: se emplearon muestras de suelo de la llanura pampeana (Runciman, Santa Fe) con historia de cultivo conocida:

- Muestras de un lote bajo labranza convencional, cultivo antecesor maíz (aislamientos con número inicial del 1 al 5).
- Muestras de un lote con labranza mínima, cultivo antecesor soja (aislamientos con número inicial del 6 al 10).

Aislamiento de rizobios: Se realizaron aislamientos de rizobios inoculando plantas de soja con diluciones de las dos muestras de suelo. Se inició el estudio con 200 aislamientos.

Caracterización de los aislamientos: Los aislamientos se caracterizaron mediante *pruebas fisiológicas*.

- La producción de ácido indol acético (AIA), se evaluó cualitativamente por método colorimétrico para todos los aislamientos (John M. Bric *et al.*, 1991). Aquellos que presentaron resultados positivos o de coloración dudosa se evaluaron cuantitativamente por el método de Gordon y Weber (1951). (Fig. 2)
- La capacidad de fijación de N se evaluó en jarras de Leonard (Vincent, 1970). (Fig. 1)
- A las estirpes con mayor peso seco aéreo (PSA), se las evaluó en la supervivencia de exopolisacáridos EPS (M. Girgis *et al.*, 2007) y en la supervivencia sobre semillas (Fig. 3 y 6 respectivamente).
- La supervivencia sobre semillas se realizó en potes plásticos (Fig. 5), con filtro de algodón para facilitar el intercambio gaseoso, por triplicado. Cada pote contenía 50g semillas de soja, las que fueron inoculadas con una suspensión de 1×10^6 bacterias. semilla⁻¹, adicionando un producto comercial adherente-protector. Luego los potes se mantuvieron en un lugar oscuro a 20°C. Periódicamente se tomaron muestras de 10 semillas por pote. Se las sumergió en tubos con 9 ml agua estéril y se realizaron diluciones decimales. El recuento de rizobios viables (Ufc) se realizó empleando el medio de cultivo EMA (Vincent, 1970) con la suplementación de fungicida.
- La caracterización molecular de los aislamientos se basó en reacciones de PCR con primers específicos (RSa) y BOX.

Se utilizaron como cepas controles, las empleadas en la fabricación de inoculantes comerciales: *Bradyrhizobium japonicum*, cepas E109, SEMIA5079 y SEMIA5080; *B. elkanii*, cepas SEMIA587 y SEMIA5019.

- Se realizó un ANOVA en cada determinación. Los contrastes de medias se realizaron con el test de Tukey y Dunnet, $p=0,05$ (Sokal y Rohlf, 1995; Sneath y Sokal, 1973).

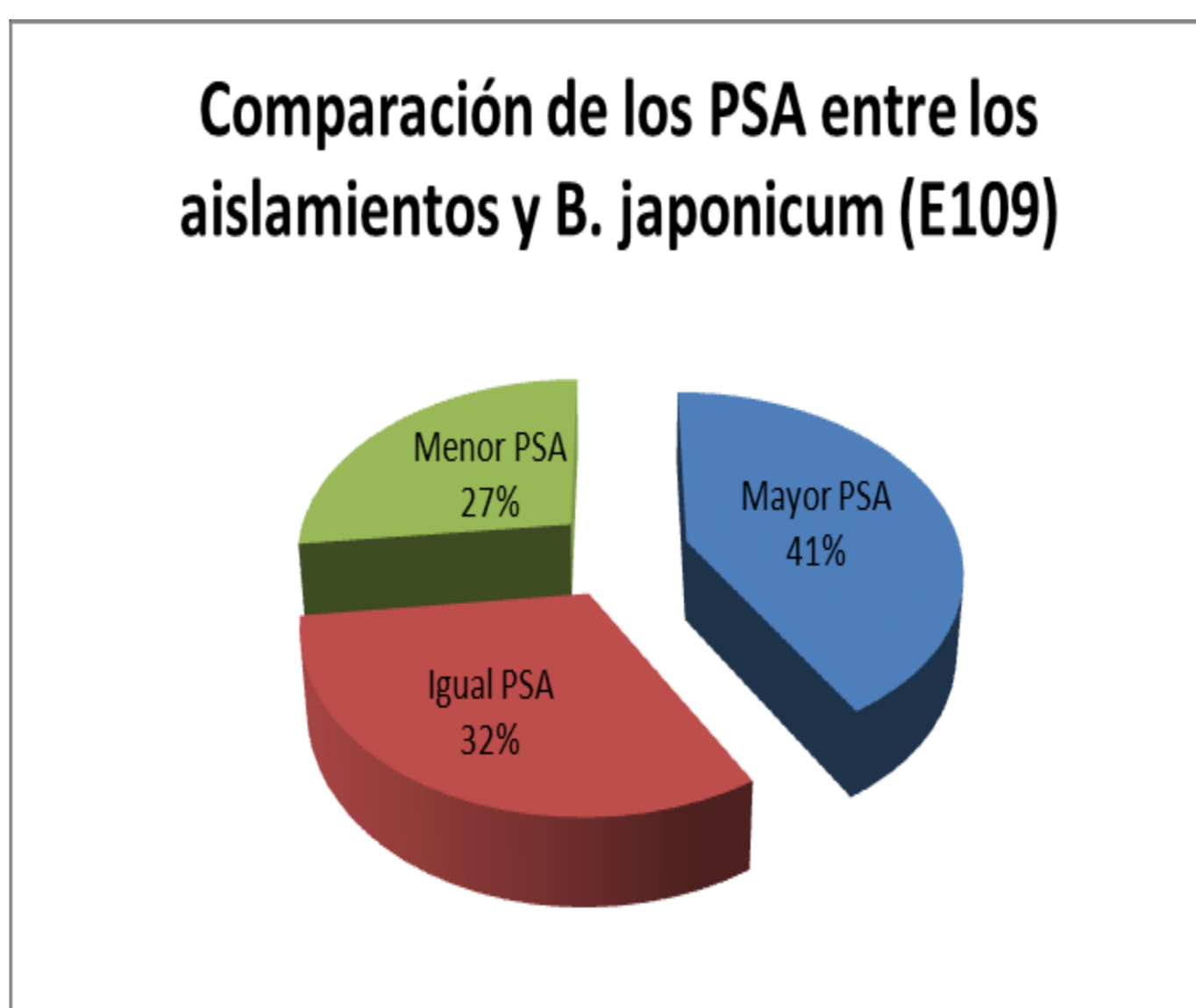


Fig. 1. Comparación de los PSA obtenidos a los 45 días de cultivo en jarras de Leonard, empleando como control la cepa E109.

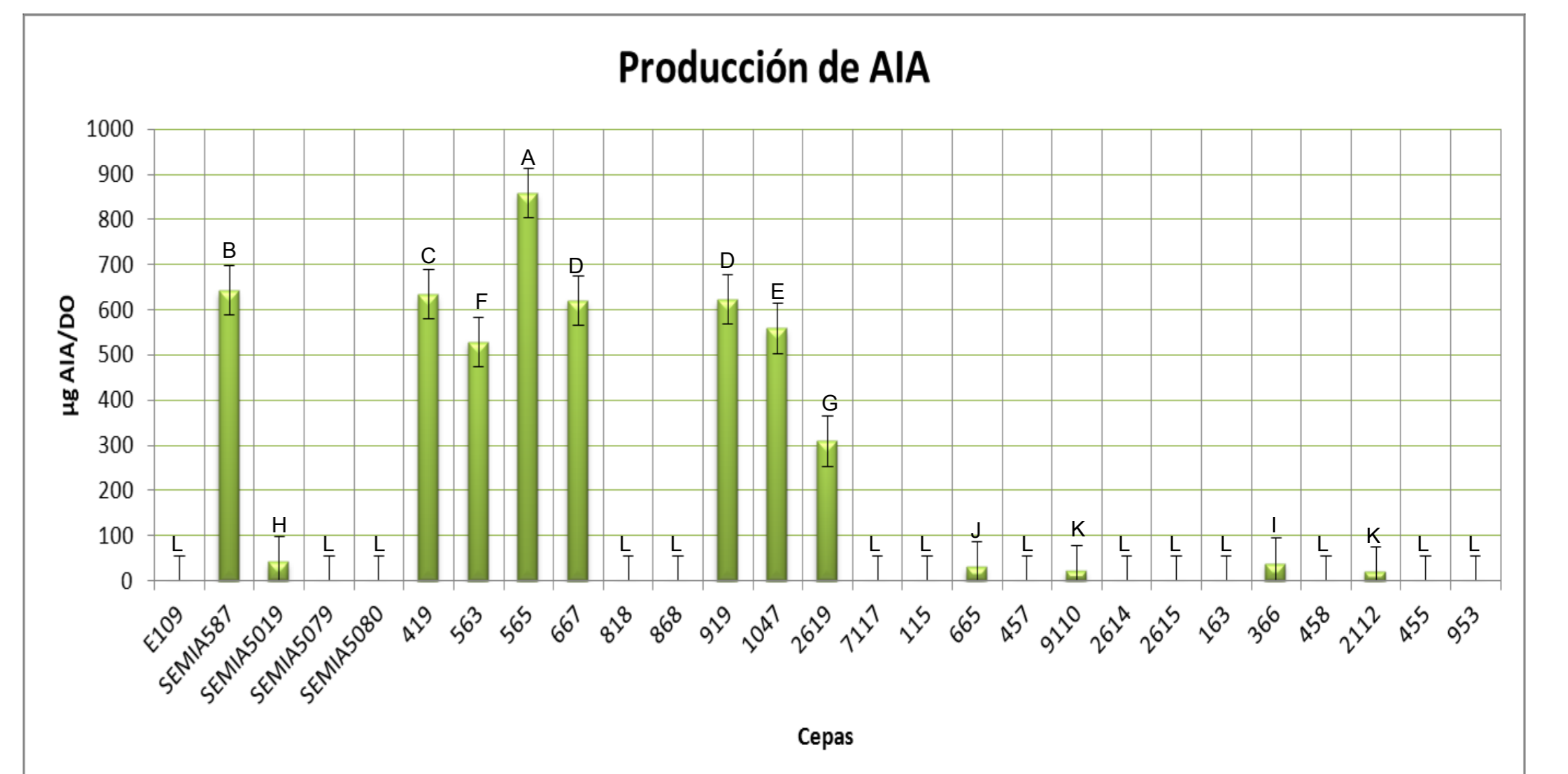


Fig. 2. Evaluación de la producción de AIA por el método de Gordon y Weber.



Fig. 5. Ensayo de la evaluación de la supervivencia sobre semillas

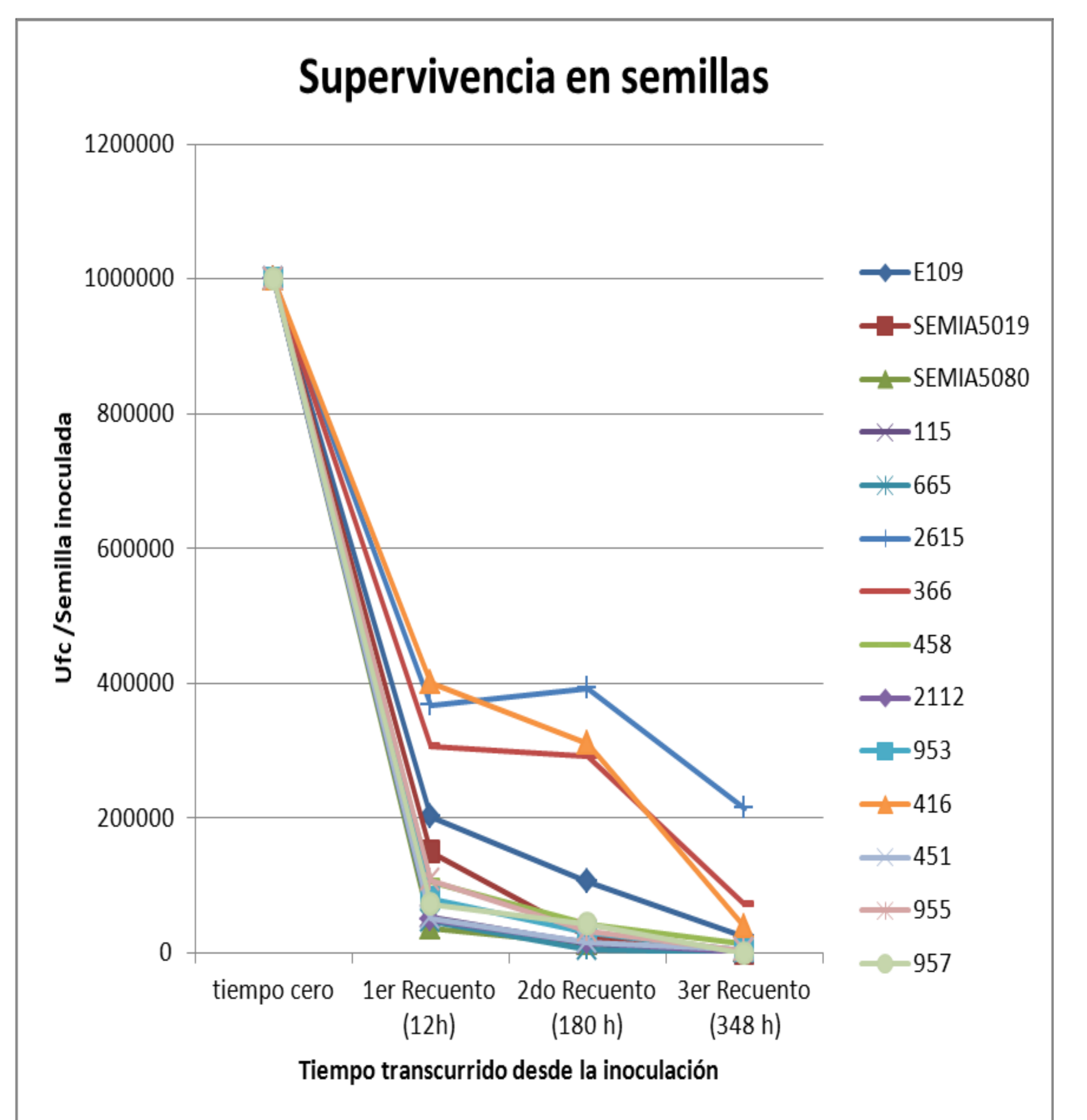


Fig. 6. Análisis de los datos obtenidos de la evaluación de la supervivencia sobre semilla para las cepas seleccionadas.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

- La caracterización molecular con la reacción de multiplex PCR confirmó que los aislamientos pertenecen al género *Bradyrhizobium*. Más aún, los patrones de amplificación obtenidos con el primer BOX agruparon a los aislamientos en cinco clusters en cada uno de los cuales se ubica una de las cepas utilizadas como patrón de *B. japonicum* (E109, SEMIA5079 y SEMIA5080) y de *B. elkanii* (SEMIA587 y SEMIA5019), lo que sugiere que los suelos contienen cepas probablemente derivadas de *B. japonicum* y *B. elkanii* (Fig. 4).
- Las estirpes de *B. elkanii* produjeron, tal cual era de esperar, mayor cantidad de AIA que las estirpes de *Bradyrhizobium* que no producen esta hormona o lo hacen en baja cantidad.
- Además, las estirpes difieren en su capacidad de fijación de nitrógeno, encontrándose un 41% de cepas que superan a la estirpe comercial E109.
- Se observó que los aislamientos 2615, 366 y 416 mostraron una capacidad de sobrevivencia sobre la semilla superior a la estirpe control, durante el periodo evaluado de 180 hs.
- Los resultados confirman que las cepas aisladas derivan de las estirpes utilizadas en los inoculantes comerciales formulados en base a *B. japonicum* y *B. elkanii*.
- Los aislamientos que tuvieron mejor comportamiento tanto en la fijación de N como en la supervivencia de semillas, provienen de la muestra de suelo bajo labranza convencional, cultivo antecesor maíz.

Citas Bibliográficas

Evgueneva-Hackenberg et al, 1995. Letters in Applied Microbiol 21, 402-405
Perret *et al.*, 2000. Microbiol. and Molec. Biol. Rev. 64, 180-201
Hungria y Vargas. 2000. Field Crops Research 65, 151-164
M. Girgis *et al.*, 2007
John M. Bric *et al.*, 1991
Mpepereki *et al.*, 2000. Field Crops Research 65, 137-149
Versalovic 1991. Nucl acid Res. 19 : 6823-6831.
Videira L.B., 2002. Applied Microbiology and Biotechnology 59, 265-269
Gordon and Weber, 1951.
Vincent, 1970.