

## “CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE RIZOBIOS NODULADORES DE *Macroptilium erythroloma* EN SUELOS DE CORRIENTES Y SANTA FE”

Zuber Nicolás Emilio.<sup>A</sup>, Trod Betiana Soledad<sup>B</sup>

<sup>A</sup>Cientibecario UNL

<sup>B</sup>Licenciada en Biotecnología

Área: Ingeniería

Sub-Área: Agronomía

Grupo: X

**Palabras clave:** *Macroptilium erythroloma*, rizobios, fenotipo.

### INTRODUCCIÓN

Las simbiosis fijadoras de nitrógeno más importantes son las que se establecen entre las raíces de leguminosas y bacterias de diferentes géneros denominadas colectivamente rizobios. Entre las leguminosas forrajeras nativas con reconocido potencial productivo se destaca el género *Macroptilium*, plantas herbáceas anuales o perennes y de ciclo primavera-estivo-otoño. *Macroptilium erythroloma* (Bentham) Urban, crece en las regiones fitogeográficas Paranaense, Yungas y Chaqueña (Juarez y Perez, 1987) y se destaca por su producción y capacidad de rebrote (Fernandez y col. 1988).

Un factor determinante del establecimiento exitoso de las leguminosas forrajeras es una efectiva fijación biológica de nitrógeno a través de la simbiosis con rizobios noduladores (Armstrong y col. 1999). La caracterización fenotípica de los rizobios adaptados a condiciones estresantes constituye una de las primeras etapas para la obtención de un inoculante eficiente.

### OBJETIVOS

El objetivo de la presente investigación fue el aislamiento y la caracterización fenotípica y funcional de los rizobios simbiotes de *M. erythroloma*.

### METODOLOGÍA

Se colectaron nódulos de plantas de *M. erythroloma* a partir de ensayos de laboratorio en cámara de crecimiento, en condiciones controladas (28°C de temperatura, fotoperíodo de 16/8 horas luz/oscuridad), empleando suelos provenientes de las localidades de General Obligado, provincia de Santa Fe (28°18'S, 59°16'W) y Santa Tomé, Corrientes (28°07'S, 56°03'W), con buena aptitud potencial para el cultivo de esta leguminosa. Los sitios de muestreo correspondieron a Santa Tomé, Provincia Fitogeográfica Paranaense, con clima cálido y húmedo, y suelos ultisoles, y a General Obligado, provincia fitogeográfica Chaqueña, con clima cálido subtropical y suelos alfisoles. Se tomaron muestras de suelo y se utilizó el cv. Don Augusto de *M.*

Proyecto: CAI+D 2011 Caracterización funcional de rizobios noduladores del Género *Macroptilium* sp.

Director del proyecto: Ing. Agr. Laura Viviana Fornasero

Director del becario/tesista: Ing. Agr. Laura Viviana Fornasero

*erythroloma* como “planta trampa” para la obtención de los nódulos.

### **Aislamiento y purificación de los rizobios. Caracteres culturales**

El procesamiento de los nódulos y aislamiento de rizobios se realizó según Vincent (1970). Los nódulos se desinfectaron, maceraron y sembraron en cajas de Petri con Agar Extracto de Levadura Manitol (LMA) e indicador rojo Congo (Vincent, 1970). Posteriormente, fueron incubadas a 28°C durante 10 días y repicadas hasta colonia pura, confirmando la pureza por su escaso ó nulo crecimiento en medio Peptona-glucosa- agar (PGA). Los aislados fueron autenticados por su habilidad de formar nódulos en la planta huésped (Vincent, 1970) y conservados en tubos a -20°C.

Los rizobios se caracterizaron fenotípicamente a través de caracteres culturales (CIAT, 1988). Las características morfológicas y respuesta a la tinción de Gram se observaron a través de un microscopio óptico. La velocidad de crecimiento, se evaluó visualmente según Jordan (1984), determinando el tiempo de aparición de las colonias en placas incubadas en estufa a 28°C.

### **Producción de ácido ó base**

De cada aislamiento proveniente de medio LMA sólido se tomó una asada y se sembró en caldo LMA (pH 6,8) e indicador azul de bromo timol (0,5% en NaOH 0,016N). Los aislados fueron incubados en estufa a 28°C, durante diez días y se observó el cambio de color a azul (alcalinidad) ó amarillo (acidez).

### **Crecimiento a diferentes temperaturas, concentraciones de NaCl y pH y resistencia intrínseca a antibióticos**

Los aislamientos se hicieron crecer en medio LMA y se incubaron a 28°C, 32°C, 35°C, 37°C y 40°C. La tolerancia a diferentes concentraciones de NaCl y pH se determinó en placas con medio LMA conteniendo 0,01; 0,5; 1; 2 y 3% (p/v) de NaCl y con el pH ajustado a 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10. Para la resistencia intrínseca a antibióticos se sembraron los aislamientos en medio LMA con adición de los siguientes antibióticos: Ampicilina (20 y 40µg/mL), Kanamicina (10 y 40µg/mL), Gentamicina (5 y 20µg/mL) y Estreptomina (20 y 100µg/mL). Los antibióticos se adicionaron al medio de cultivo luego de ser esterilizado en autoclave.

Para todos los estudios de autenticación y caracterización morfológica, fisiológica y bioquímica se emplearon las cepas de referencia: *B. liaoningense* USDA 3622T, *B. elkanii* USDA 76T *B. yuanmingense* CCBAU10071T, *E. fredii* USDA 205T y *R. tropici* CIAT 899T. Se realizó un análisis multivariado para la estimación del patrón de variación entre las cepas a partir de una matriz de 27 caracteres por 32 aislados. Para el análisis de agrupamiento se empleó la distancia de Jaccard, generando un dendrograma (UPGMA). Los análisis se realizaron con el paquete estadístico Infostat (Di Rienzo y col., 2013).

## **RESULTADOS**

En el presente trabajo, a partir de los ensayos de crecimiento en cámara bajo condiciones controladas fueron colectados nódulos de *M. erythroloma* con diferentes suelos. En la Tabla 1 se detallan las características químicas de los suelos de origen. Tabla 1: Propiedades químicas de los suelos de origen de la colección de rizobios noduladores de plantas de *M. erythroloma*.

| Sitio de origen<br>(Localidad, provincia) | Materia<br>Orgánica <sup>a</sup> (%) | Nitrógeno<br>orgánico total <sup>b</sup> (%) | Fósforo<br>asimilable <sup>c</sup> (ppm) | pH <sup>d</sup><br>(rel.2:1) |
|---|--------------------------------------|--|--|------------------------------|
| Santa Tomé, Corrientes                    | 2,97                                 | 0,114  | 6  | 5,4                          |
| General Obligado, Santa Fe                | 4,90                                 | 0,227  | 22                                       | 6,2                          |

<sup>a</sup>: Walkey y Black, (1934). <sup>b</sup>:Kjeldhal, AOAC, (1990). <sup>c</sup>Bray y Kurtz, (1945). <sup>d</sup>: potenciometría MAG, (1982)

Se conformó una colección de treinta y dos aislados, dieciocho recuperados de Corrientes y catorce de Santa Fe. Mediante la tinción Gram se observó que la morfología de las células se correspondía con las descritas para los rizobios. Se observaron bacilos finos, Gram negativos y sin presencia de esporas. Los aislados presentaron crecimiento lento y las colonias se caracterizaron por ser menores a un milímetro, circulares, con bordes regulares y color naranja traslúcido.

Los aislamientos provenientes de Santa Fe, mostraron una marcada aptitud de crecimiento a altas temperaturas, ya que el 57% de los aislados presentó crecimiento a 37°C y tres cepas a 40°C. Las cepas de la colección presentaron crecimiento óptimo en un rango de pHs 5 a 8. Además el 57% de los aislados de Santa Fe, mostraron tolerancia a 0,5% de NaCl mientras que el 16% de las cepas de Corrientes pudieron crecer en moderadas concentraciones de sal. En relación a la resistencia intrínseca a antibióticos, las bacterias simbiotes manifestaron resistencia a diferentes concentraciones de Ampicilina y Gentamicina. Cabe destacar que, el 70% de los aislados de Santa Fe fueron resistentes a Kanamicina (10 ug/ml) y la cepa MeSF2.6 también mostró resistencia a Estreptomycin (20 y 100µg/mL).

El dendrograma de la Figura 1 elaborado con base a 27 atributos relacionados a la velocidad de crecimiento, tolerancia a diferentes temperaturas, rangos de pH, acidez o alcalinidad, concentración de sales y resistencia a diferentes antibióticos permitió reconocer seis grupos principales de actividad metabólica.

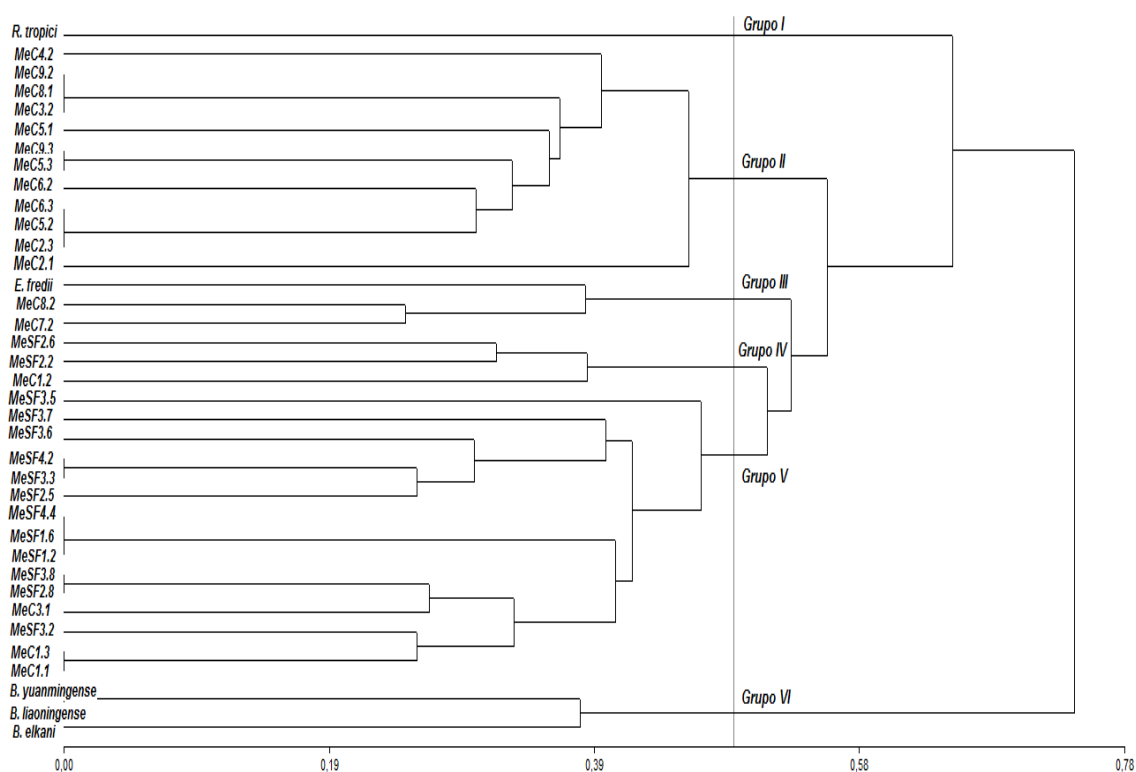


Figura 1: Dendrograma UGMA de las cepas autóctonas y de referencia relativos a todas las características fenotípicas provenientes de *M. erythroloma* (MeC: cepas procedentes de Corrientes, MeSF: cepas provenientes de Santa Fe).

El grupo I incluyó la cepa de referencia *R. tropici*, de crecimiento rápido, productora de acidez, tolerante a pH ácido y a una temperatura de crecimiento de 37°C. Además

presentó resistencia a Ampicilina, Gentamicina y Estreptomina (100 µg/mL). El grupo II estuvo representado por doce aislamientos recuperados del suelo de Corrientes, que se caracterizaron por crecer en un rango de pHs 5 a 8, no toleraron concentraciones de NaCl superiores a 0,01g/L y mostraron resistencia a los antibióticos Ampicilina y Gentamicina. En este grupo la cepa MeC 2.1 se destacó por su producción de acidez y resistencia a Kanamicina. El grupo III incluyó la cepa de referencia *E. fredii* y dos aislamientos recuperados de Corrientes, que se caracterizaron por crecer a temperaturas hasta 35°C, en pHs 5 a 9 y tolerar 1% de NaCl. El grupo IV está representado por dos cepas de Santa Fe y una de Corrientes, que toleraron elevadas temperaturas (40°C), 1% de NaCl y mostraron resistencia a Ampicilina, Gentamicina y Kanamicina (10 µg/mL). El grupo V incluyó quince cepas nativas, representado por doce aislamientos recuperados de Santa Fe, que se caracterizaron por producir alcalinidad, crecer a temperaturas hasta 35°C, pH 5–8 y presentar sensibilidad a la salinidad. El grupo VI está integrado por las cepas de referencia *B. elkani*, *B. liaoningense* y *B. yuanmingense*, de crecimiento lento, productoras de alcalinidad y sensibles a pH extremos, salinidad y todos los antibióticos ensayados.

### CONCLUSIONES

Se han hallado rizobios con capacidad de crecimiento a 40°C, a pH 9 y a 1% (p/v) de NaCl. Las evidencias disponibles permitirán seleccionar aislamientos representativos de la diversidad colectada hacia su caracterización simbiótica en cámaras de crecimiento controlado de cultivo y como inoculantes en condiciones reales de campo.

### BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

**Armstrong, R.D.; K. McCosker; S.B. Johnson; K.B. Walsh; G. Millar; B. Kuskopf; J. Standley; and M.E. Probert**, 1999. Legume and opportunity cropping systems in central Queensland. 1. Legume growth, nitrogen fixation, and water use. Australian Journal of Agricultural Research 50: 909-924.

**AOAC**. 1990. Official Methods of Analysis of the AOAC. 14<sup>th</sup> Ed. AOAC, Washington, D.C.

**Bray , R.H. and Kurtz L.T.** 1945. Determination of total, organic and available forms of phosphorus in soils. Soils Sc. 59: 39-45.

**CIAT**. 1988. Simbiosis leguminosa-rizobio. Manual de métodos de evaluación, selección y manejo agronómico. Proyecto CIAT- UNDP. Cali, Colombia. 178 p.

**DI RIENZO, J.A.; CASANOVES, F.; BALZARINI, M.G.; GONZALEZ, L.; TABLADA, M. Y ROBLEDO, C.W.** InfoStat versión 2013. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

**Fernandez J. G., C. A. Benítez, R. F. Pizzio y O. R. Pallares**. 1988. Leguminosas forrajeras nativas del este de la provincia de Corrientes. Serie Técnica N° 26, EEA Mercedes del INTA, 86 págs.

**JORDAN, D.C.** 1984. *Bradyrhizobium*, in: Krieg, N.R. y Holt, J.G. (Eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 1, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, p. 242–244.

**Juarez F.C. y S.M. Perez**. 1987. El género *Macroptilium* (Fabaceae) en la Provincia de Salta, Argentina. Anales INTA Salta 1: 31-42

**MAG**. 1982. Toma de muestras y Determinaciones Analíticas en Suelos y Aguas Santa Fe. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Dirección General de Extensión e Investigaciones

**Perez S.M, Camardelli M.C., Juarez F., Bianchi A.R. and R. Newman**. 1999. Geographical distribution of *Macroptilium* species in Argentina. Tropical Grassland 33:22-33.

**Toor R., Mohseni M.**, 2007. UV- based AOP and its integration with biological activated carbon treatment for DBP reduction in drinking water. Chemosphere, 66, 2087-2095.

**Vincent, J.M.** 1970. A Manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacteria. IBP Handbook N°15, Blackwell Scientific, Oxford.

**Walkey A. and Balck, I.A.** 1934. An examination of the dagthareff method for determining soil organic matter and proposed modification of the chromic acid titration method. Soil Sci. 37: