

POBLACIONES DE MICROORGANISMOS RIZOSFÉRICOS DE MAÍZ (*Zea mays*)

PETENELLO, M. C.¹, ROMAGNOLI, M. V.¹ & GONZÁLEZ, M. DEL P.²

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto rizosférico de plantas de maíz (*Zea mays* L.) sobre las densidades poblacionales de algunos grupos microbianos. En cámara de crecimiento durante 20 días se cultivaron plantas de cuatro híbridos con diferente respuesta a vuelco, y se tomaron muestras de suelo rizosférico a los 13 y a los 20 días. Se evaluó la densidad de heterótrofos totales, *Azospirillum*, pseudomónadas y hongos en la rizósfera y en el suelo testigo, efectuando recuentos en medio sólido de cultivo y expresando los resultados como ufc / g de suelo seco. En el caso de uno de los híbridos con buen comportamiento frente a vuelco el número de heterótrofos totales, *Azospirillum* y pseudomónadas se incrementó en forma relativa en el segundo recuento, pero no así el número de hongos. Sin embargo esto no se observó en el otro material de características similares en cuanto a vuelco. Estudios posteriores permitirán confirmar éstos resultados y comprobar la relación entre el vuelco y la microflora rizosférica.

Palabras claves: *Zea mays*, rizósfera, hongos de suelo, pseudomónadas.

SUMMARY

Microbial populations in the rhizosphere of corn (*Zea mays*)

The rhizosphere effect of four hybrids of corn (*Zea mays* L.) on several groups of microorganisms was determined. Corn plants were grown during 20 days in growth chamber and total numbers of heterotrophic bacteria, *Azospirillum*, pseudomonads and soil fungus from rhizospheric soil (0–3ml from root surface) were counted by the soil – dilution method, 13 and 20 days after planting. Microbial populations of non – rhizospheric soil were also studied. Bacterial growth in the rhizosphere was much greater in those hybrids damping resistant, but not fungal growth, as counts at the 20th days indicated. Relationship damping - rhizospheric populations will be confirmed and verified by further studies.

Key words: *Zea mays*, rhizosphere, soil fungi, pseudomonads.

1.- Cátedra de Microbiología Agrícola, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario. C.C.14, (2123) Zavalla, provincia de Santa Fe, Argentina.

2.- Cátedra de Fitopatología, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario.

Manuscrito recibido el 29 de enero de 2001 y aceptado para su publicación el 9 de noviembre de 2001.

INTRODUCCIÓN

La rizósfera es la porción del suelo que se encuentra bajo la influencia directa de las raíces de las plantas que incluye a la superficie misma de las raíces y al suelo adherido a ellas (Tate, 1995) en la cual el suelo está enriquecido con azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, nucleótidos y reguladores del crecimiento exudados por las raíces. Esto permite el crecimiento de mayor cantidad de microorganismos, particularmente bacterias, en relación al suelo no rizosférico.

Las bacterias de las raíces difieren de las del suelo, en consecuencia, la actividad rizosférica será diferente de la del suelo no rizosférico (Sylvia *et al.*, 1999). Esta actividad es muy diversa: fijación de nitrógeno, denitrificación, provisión de fósforo para la micorriza, movilización de minerales y producción de reguladores del crecimiento, hormonas e inhibidores, siendo muy importante para el cultivo de plantas. Por lo tanto, a través de los exudados radicales, las plantas controlan el desarrollo de la microflora rizosférica, y también la microflora rizosférica actúa directa e indirectamente sobre las plantas (Davison, 1988; Michiels, 1989; Wei *et al.*, 1991; Bolton *et al.*, 1993; Jones & Darrah, 1995; Sylvia *et al.*, 1999).

El control de enfermedades en plantas utilizando métodos biológicos se logra mediante selección y producción de plantas resistentes a ciertos patógenos o mediante el empleo de otros microorganismos que sean antagonistas a ellos o que los parasiten (Mathre *et al.*, 1999). Aún cuando la producción y el uso de variedades resistentes sea el método de control más antiguo, más económico y más efectivo para controlar a las enfermedades de las plantas, en los últimos años ha cobrado un considerable interés el uso de hiperparásitos o microorganismos antagonistas para controlar las enfermedades

de las plantas (Agrios, 1998).

Muchos reportes de control biológico en enfermedades de raíz involucran a la microflora rizosférica. Rovira en 1988 determinó que la presencia de bacterias, actinomicetes y hongos en la rizósfera puede controlar a los hongos patógenos presentes en el suelo. Es abundante la información acerca de los efectos benéficos de muchas pseudomonas fluorescentes, ya que son capaces de controlar biológicamente hongos patógenos presentes en el suelo (Parke, 1990; Paulitz *et al.*, 1992; Tate, 1995; Harman, 2000). *Pseudomonas fluorescens* produce ciertos antibióticos de amplio espectro tales como la pirrolnitrina y la piolulterina, capaces de controlar el desarrollo de *Rhizoctonia solani* y *Pythium ultimum*, causantes de enfermedades en la plántula de maíz (Howell & Stipanovic, 1980; Weller & Cook, 1983; Rovira, 1988; Mathre *et al.*, 1999). Por otro lado, la producción de ciertos sideróforos por parte de las pseudomonas, tendrían efecto positivo sobre los cultivos dado que impedirían el acceso por parte de la microflora patógena al hierro cercano a las raíces (Loper, 1988).

Las bacterias de género *Azospirillum* han sido muy estudiadas debido a su capacidad para producir sustancias promotoras del crecimiento de las plantas y para fijar nitrógeno atmosférico (Michiels *et al.*, 1989; Bashan & Levanony, 1990; Fallik & Okon, 1996) aunque no en cantidades importantes (Hubbell & Gaskins, 1984; Tate, 1995). *Azospirillum* forma una simbiosis asociativa con la superficie de las raíces de maíz, trigo y otras especies tropicales, generando un sitio particularmente favorable para este microorganismo (Stevenson, 1986).

El objetivo del presente trabajo fue estudiar las poblaciones naturales de microorganismos en la rizósfera de híbridos de maíz con diferente comportamiento frente

a vuelco.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron para este trabajo cuatro híbridos de maíz con buenas características agronómicas y diferente comportamiento frente a vuelco. Los híbridos 31Y09 y DK696 (ambos híbridos Bt) se seleccionaron por expresar muy buen comportamiento frente a vuelco y los materiales Experimental 273 y Atar481 por su mala respuesta frente al mismo carácter. El suelo empleado para la siembra proveniente de los 10 cmts. superficiales, poseía un contenido hídrico del 13.6%, fue secado a temperatura ambiente, tamizado (tamiz de 2mm), colocado en macetas de plástico soplado y llevado a capacidad de campo con agua corriente (23% de agua p/p). El lote del cual provenía el suelo está situado en la localidad de Zavalla, provincia de Santa Fe (ubicada a 33°01' L.S. – 60°53' L.O. y 50m, snm) y en las últimas tres campañas se cultivó maíz en el mismo. Taxonómicamente se trata de un *Argiudol* vértico, familia fina, illítica, térmica, contenido de MO = 3.41% en el horizonte A, relación C/N = 12.94% en el horizonte A, pH en agua (1:2.5) = 6.09.

Se utilizaron cuatro macetas por cada híbrido, sembrándose cuatro semillas en cada una.

El tratamiento control consistió en una maceta de suelo no rizosférico.

Posteriormente se llevaron a cámara de crecimiento a 26°C, con un fotoperíodo de 16hs de luz / 8hs de oscuridad, y se mantuvieron a humedad constante por subirrigación.

Cada uno de los cultivares más el suelo no rizosférico fueron considerados como tratamientos. Con ellos se realizó un ANOVA de dos vías y se compararon los dos momentos de obtención de suelo por medio del método

prog glm del programa estadístico SAS.

Recuento de microorganismos

La extracción del suelo rizosférico se realizó en dos momentos: 1°) a los 13 días de sembradas (cuando la mayoría de las plantas presentó su 3° hoja desplegada) y 2°) a los 20 días (4° hoja desplegada). Para ello, 2 plantas de cada híbrido fueron descalzadas totalmente, se lavaron las raíces con agua corriente para desprender el exceso de suelo y se cortaron a la altura del cuello. Posteriormente se colocaron en erlenmeyers de 250ml que contenían 50ml de agua destilada estéril que se llevaron a un agitador excéntrico durante 30 minutos a 100rpm, tras lo cual se efectuó una serie de diluciones decimales por cada tratamiento (10^{-1} a 10^{-7}). El mismo procedimiento de diluciones se efectuó con una muestra de 5g de suelo no rizosférico (Frioni, 1990).

Las diluciones se sembraron en diferentes medios de cultivo, con el fin de realizar el recuento de los microorganismos presentes.

Para el recuento de Heterótrofos totales se empleó el medio Agar Plate Count (Merck) sembrando por inclusión en masa 1ml de cada suspensión – dilución. Tras 5 días de incubación a 28°C, en oscuridad, se contaron las cajas que contenían entre 30 y 300 colonias, expresándose el resultado en ufc / g de suelo seco.

Para el recuento de *Azospirillum* se empleó el medio Nfb (Döbereiner, 1980) semisólido, sembrando 0.2 ml de cada suspensión dilución, utilizando la técnica del número más probable (NMP), las lecturas se efectuaron entre los 7 y 14 días de incubación a 28°C en oscuridad, considerándose positivos los tubos con viraje de color y típica película subsuperficial.

Para evaluar pseudomónadas fue utilizado el Medio B de King (King *et al*, 1954), sembrando por inclusión en masa 1ml de cada suspensión - dilución, por duplicado.

Cuadro 1: Número de heterótrofos totales; *Azospirillum*; pseudomonadas y hongos (ufc x 10⁶ /g suelo seco) en la rizosfera de plantulas de 13 y 20 días correspondientes a cuatro híbridos de maíz. Letras diferentes representan diferencias significativas con p 0,01.

Híbridos	HETEROTROFOS		AZOSPIRILLUM		PSEUDOMONAS		HONGOS	
	13 Días	20 Días	13 Días	20 Días	13 Días	20 Días	13 Días	20 Días
31Y09	58,00b	82,50c	5,10b	205,00b	7,80a	205,00b	1,71a	0,93b
DK0696	8,10b	350,00b	155,00a	215,00b	21,00a	1900,00a	0,15a	399,00ab
EXP273	160,00a	180,00bc	26,50b	26,50c	30,80a	97,00b	0,49a	1120,00a
ATAR481	47,00b	1250,00a	190,00a	1250,00a	770,00a	1200,00ab	1,04a	805,00a
SUELO no rizosférico	23,00b		5,88b					

Luego de 4 - 5 días de incubación a 28°C, en oscuridad, se contaron las cajas que contenían entre 30 - 300 colonias, expresándose el resultado en ufc / g de suelo seco.

Los recuentos de Hongos del suelo se realizaron en medio de cultivo PDA (Potato Dextrose Agar-Difco), sembrando por extensión en superficie 0.1ml de cada suspensión -dilución por duplicado. Se contaron las colonias luego de 2-3 días de incubación a 20°C y el resultado se expresó como propágulos / g de suelo seco (Gasoni & Rímolo, 1983).

RESULTADOS

Primer muestreo:

Microflora heterótrofa aerobia total: Se encontraron diferencias significativas entre tratamientos (híbridos) y suelo no rizosférico. El valor más alto fue registrado para el suelo rizosférico del cultivar Experimental 273. En el caso de *Azospirillum* se encontraron diferencias significativas entre tratamientos, obteniéndose los valores más altos en el caso de Atar 481 y DK696. Para las poblaciones de pseudomónadas y hongos no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos (Cuadro 1).

Segundo muestreo:

Se encontraron diferencias significativas entre tratamientos para los microorganismos heterótrofos totales. El valor mínimo lo presentó el suelo no rizosférico y los valores más altos Atar481 y DK696.

En el caso de *Azospirillum* se encontraron diferencias entre tratamientos, presentándose en el siguiente orden de mayor a menor: 1° Atar481, 2° DK696 y 3° 31Y09.

También se encontraron diferencias significativas en el recuento de pseudomónadas, y los mayores valores fueron para el suelo rizosférico de 31Y09 y DK696.

En el recuento de hongos se presentaron diferencias significativas entre tratamientos, y el suelo rizosférico de Experimental 273 presentó los mayores valores.

Hubo diferencias entre los momentos de extracción de suelo rizosférico (13 y 20 días) para heterótrofos totales, *Azospirillum*, y hongos. Existe una interacción entre tratamientos y momentos de extracción de suelo. Para pseudomónadas hay diferencias entre momentos de obtención del suelo pero no hay interacción tratamiento / momento (Cuadro 1).

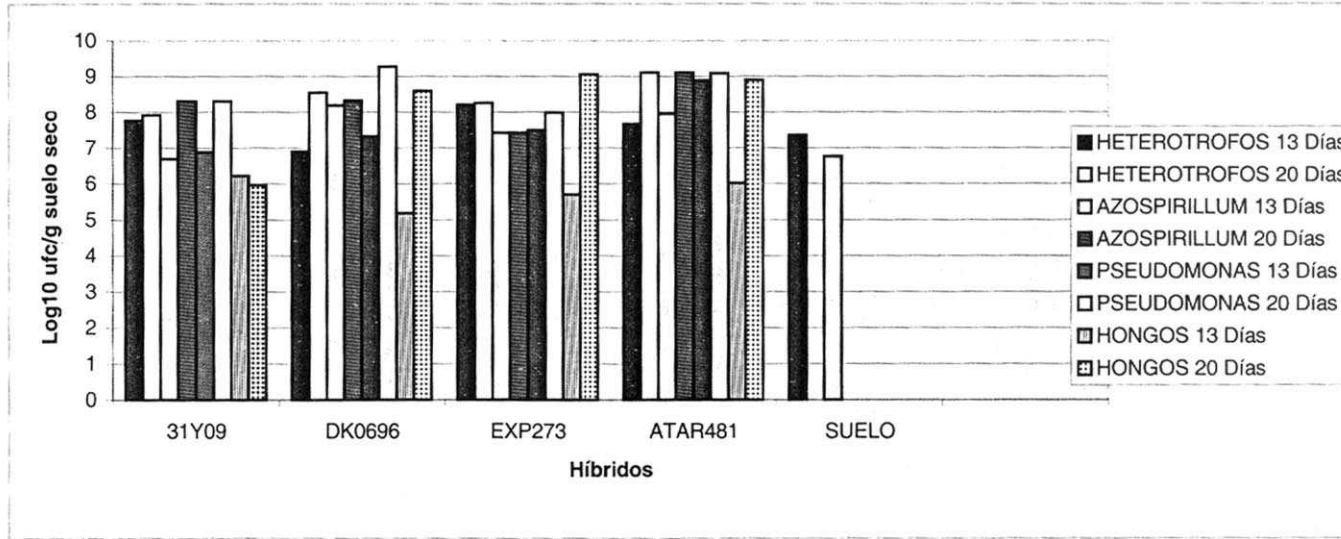
En la Fig. 1 se puede observar la representación gráfica de los resultados obtenidos en los ensayos realizados.

DISCUSIÓN

En los últimos años se ha incrementado el estudio de la biología de la rizósfera y el impacto que ésta tiene en distintas áreas de la microbiología del suelo, patología de raíces, control biológico de enfermedades de raíz, nutrición de las plantas y crecimiento de las mismas.

Las poblaciones rizosféricas bacterianas comienzan a aumentar a partir de la germinación de la semilla y llegan a un máximo alrededor de los 30 días. Es difícil la evaluación del efecto de las raíces sobre las poblaciones de hongos porque si bien los recuentos totales no parecerían resultar incrementados por la presencia de la raíz, sí pueden resultar estimuladas algunas poblaciones individuales (Tate, 1995). En consecuencia el efecto rizosférico es positivo, aunque menos espectacular que para el caso de bacterias (Davison, 1988; Bolton *et al.*, 1993). Los resultados encontrados en los híbridos ensayados concuerdan con los citados por la bibliografía antes mencionada, ya que entre los 13 y 20 días se vieron

Fig. 1: Número de microorganismos rizosféricos estimados en plántulas de diferentes híbridos de maíz a los 13 y 20 días comparados con suelo no rizosférico.



incrementados los recuentos de todos los grupos estudiados.

Entre los híbridos de buen y mal comportamiento frente a vuelco no se encontró homogeneidad en los resultados. En 31Y09 se incrementaron las poblaciones rizosféricas de heterótrofos totales, *Azospirillum*, y pseudomonadas a lo largo del período estudiado, pero no lo hicieron significativamente los hongos. Esto podría estar relacionado con su buen comportamiento frente a vuelco. Sería interesante considerar en futuros ensayos si esta reducción relativa de propágulos fúngicos en la rizosfera está efectivamente asociada a poblaciones bacterianas promotoras del crecimiento (Wei *et al.*, 1991), a un efecto antagónico en particular por parte de las pseudomonadas fluorescentes (Davison, 1988) o al hecho de tratarse de un híbrido Bt. El comportamiento de las proteínas insecticidas Bt sobre la microflora del suelo no ha sido todavía muy estudiado, si bien hay datos acerca de su comportamiento sobre la microfauna (Saxena *et al.*, 1999; Shelton *et al.*, 2000). Por lo tanto convendría evaluar si el poco representativo incremento de los hongos rizosféricos en 31Y09 podría relacionarse con la presencia de dichas toxinas en el suelo, si bien tal comparación debería hacerse entre los híbridos Bt y los no Bt de los cuales se partió para su modificación genética. Sin embargo en DK696 no se observó este fenómeno en relación a los hongos.

En cuanto al grupo de las pseudomonadas se observó un notable incremento en el transcurso del período estudiado, en el caso de los híbridos 31Y09 y DK696, los recuentos aumentaron un 2628% y un 9047%, respectivamente. En cambio, para Experimental 273 y Atar481, los incrementos fueron sólo del 314% y 155% respectivamente, a lo largo del mismo período. Sería conveniente investigar si este

hecho está o no relacionado con su comportamiento frente a vuelco, ya que el efecto benéfico del grupo de las pseudomonadas es ampliamente citado por la bibliografía. (Howell & Stipanovic 1980; Weller & Cook 1983; Loper, 1988; Rovira, 1988; Parke, 1990; Paulitz *et al.* 1992; Matrhe *et al.* 1999)

En cuanto a *Azospirillum*, nuestros resultados, indicadores de una estimulación de todos los híbridos sobre este diazótrofo, concuerdan en general con la bibliografía (Davison, 1988; Michiels *et al.* 1989; Tate, 1995). Queda por determinar la real importancia que pueda tener la presencia de este microorganismo en la rizosfera del maíz y el posible efecto antagónico sobre él que puedan presentar ciertos hongos (Fallik & Okon, 1996).

BIBLIOGRAFÍA

- AGRIOS, G. N.** 1998. Fitopatología. 2ª ed. Ed. Limusa. Grupo Noriega Eds. México.
- BASHAN, Y. & H. LEVANONY.** 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. Can. J. Microbiol. 36: 591 - 608.
- BOLTON, H.; J. FREDRIKSON & L. ELLIOT.** 1993. Microbial Ecology of the Rhizosphere. (pp. 27 - 63). In: BLAINE METTING Jr.; F. (ed.). Soil Microbial Ecology. Marcel Dekker, Inc. New York.
- DAVISON, J.** 1988. Plant Beneficial Bacteria. Biotechnology 6: 282 - 286.
- DÖBEREINER, J.** 1980. Forrage grasses and grain crops. (pp. 535 - 555). In: BERGENSEN, F. J. (ed.). Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation. Wiley, J. & Sons, Nueva York.
- FALLIK, E. & Y. OKON.** 1996. The response of maize (*Zea mays* L.) to *Azospirillum*

- inoculation in various types of soils in the field. *World Journal of Microbiology & Biotechnol.* 12: 511 – 515.
- FRIONI, L.** 1990. *Ecología Microbiana del Suelo*. Dpto. de publicaciones. Univ. de la República. Montevideo.
- GASONI, L. & M. RIMOLO.** 1983. Evolución de la microflora en campos anegables de la pampa deprimida. *Ciencia del suelo* 2: 97 – 103.
- HOWELL, C. R. & R. D. STIPANOVIC.** 1980. Suppression of *Pythium ultimum* induced Damping – off of Control Seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, pyoluterin. *Phytopatology* 70: 712 – 715.
- HUBBEL, D. H. & M. H. GASKIN.** 1985. Associative N₂ Fixation with *Azospirillum*. (pp. 201 – 224). In Alexander, M. (ed.). *Biological Nitrogen Fixation*. Plenum Publ. Corp., New York.
- JONES, D.L. & P. DARRAH.** 1995. Influx and efflux of organic acids across the soil-root interface of *Zea mays* L. and its implications in rhizosphere C flow. *Plant and Soil*: 103 -109.
- KING, E. O.; M. K. WARD & D. RANNEY.** 1954. Two simple media for demonstration the pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. & Clin. Med.* 44: 301 – 307.
- LOPER, J.** 1988. Role of Fluorescent Siderophore production in Biological Control of *Pythiumultimum* by *Pseudomonas fluorescens* Strein. *Phytopatology*, 78: 166 - 172.
- MATRHE, D. E.; R. J. COOK & N. W. CALLAN.** 1999. From Discovery to Use. Traversing the world of commercializing Biocontrol Agents for Plant Disease Control. *Plant Disease* 83: 972 – 983.
- MICHELIS, K.; J. VANDERLEYDEN & M. VAN GOOD.** 1989. *Azospirillum* – plant root associations. A review. *Biol. Fertil. Soils* 8: 356 – 368.
- PARKE, J. L.** 1990. Population Dynamics of *Pseudomonas cepacia* in the pea spermosphere in relation to biocontrol of *Pythium*. *Phytopathology*, 80: 1307 – 1311.
- PAULITZ, T. C.; O. ANAS & D. G. FERNANDO.** 1992. Biological control of *Pythium* Damping-off by seed treatment with *Pseudomonas putida*: relationship with ethanol production by Pea and Soybean seeds. *Biocontrol Science and Technology* 2: 193 – 201.
- ROVIRA, A. D.** 1988. Ecology and Management of the Rhizosphere Microflora (pp. 221 – 238). En: MURRELL, W. G. and KENNEDY, I. R. (eds). *Microbiology in Action*. Wiley, J. & Sons, New York.
- SAXENA, D.; S. FLORES & G. STOTZKY.** 1999. Insecticidal toxin in root exudates from Bt corn. *Nature* 402: 480.
- SHELTON, A. M.; J. D. TANG; R. T. ROUSCH; T. D. METZ & E. D. EARLE.** 2000. Field tests on managing resistance to Bt engineered plants. *Nature Biotechnology* 18: 339 – 342.
- STEVENSON, F. J.** 1986. *Cycles of the soil*. Wiley, J. & Sons, New York.
- SYLVIA, D.; J. FUHRMANN; P. HARTEL & D. ZUBERER.** 1999. *Principles and Applications of soil Microbiology*. Prentice Hall, New Jersey.
- TATE, R. L.** 1995. *Soil Microbiology*. Wiley, J. & Sons, New York.
- WEI, G.; W. KLOPPER & S. TUZUM.** 1991. Induction of Systemic Resistance of Cucumber to *Collectotrichum orbiculare* by Selec Strains of Plant Growth – Promoting Rhizobacteria. *Phytopathology* 81: 1508 – 1511.
- WELLER, D. M. & R. J. COOK.** 1983. Suppression of take all of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonads.