



Encuentro
de JÓVENES
INVESTIGADORES

CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE RIZOBIOS SIMBIOTES DE *Crotalaria juncea* COMO ALTERNATIVA DE BIOFERTILIZACIÓN PARA UNA AGRICULTURA SUSTENTABLE

Miretti, Josefina

*Facultad de Ciencias Agrarias
Laboratorio de Microbiología Agrícola
Director/a: Laura Viviana Fornasero
Codirector/a: María Antonieta Toniutti*

Área: Ciencias Naturales

Palabras claves: rizobios, nodulación, inoculante

INTRODUCCION

La agricultura sustentable es una preocupación creciente en la sociedad actual debido a los impactos negativos asociados con el uso intensivo de fertilizantes químicos y su efecto en el medio ambiente. En tal sentido, la biofertilización ha surgido como una alternativa prometedora para mejorar la fertilidad del suelo y promover prácticas agrícolas más sostenibles (Moreno Reséndez *et al.*, 2018).

En particular, los rizobios simbiotes desempeñan un papel crucial en la biofertilización ya que establecen una relación simbiótica con las plantas leguminosas, como *Crotalaria juncea*. Estas bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico tienen la capacidad de convertir el nitrógeno gaseoso en formas asimilables por las plantas, lo que promueve su crecimiento y desarrollo (Verma *et al.*, 2010). Asimismo, los rizobios pueden mejorar la disponibilidad de otros nutrientes esenciales para las plantas, como el fósforo y el potasio (Paredes-Mendoza & Espinosa-Victoria, 2010).

La simbiosis rizobio-leguminosa presenta un papel muy importante en el crecimiento de las plantas y la adaptación a nuevos ambientes (Howieson & Ballard, 2004; Gerding *et al.*, 2014). Desde el punto de vista práctico, la selección y caracterización de rizobios autóctonos adaptados a las condiciones edafoclimáticas de nuestro país favorecería el establecimiento exitoso de la simbiosis. En este contexto, la caracterización funcional de las poblaciones de rizobios nativos constituirá una herramienta muy valiosa hacia la selección de potenciales cepas inoculantes que permitan un mejor establecimiento de las leguminosas y con ello un incremento en la producción agropecuaria y una reducción del empleo de fertilizantes nitrogenados.

Título del proyecto: Rizobios noduladores y promotores del crecimiento vegetal de leguminosas forrajeras como alternativa de biofertilización para una agricultura sustentable

Instrumento: CAI+D

Año convocatoria: 2020

Organismo financiador: UNL

Director/a: Dra. Laura Viviana Fornasero

OBJETIVOS

El objetivo del trabajo fue evaluar las características fenotípicas y la capacidad de crecimiento *in vitro* en diferentes condiciones de estrés abiótico de rizobios simbiotes de *Crotalaria juncea* aislados en suelos de Santa Fe.

METODOLOGÍA

La colección de rizobios se estableció mediante aislamientos a partir de nódulos de plantas trampas en cámaras de crecimiento de cultivo en condiciones ambientales controladas (plantas cultivadas en ensayos de laboratorio e inoculadas con muestras de suelo).

Los muestreos se realizaron en diferentes sitios de la provincia de Santa Fe, registrándose sus coordenadas geográficas a través de un posicionamiento geográfico satelital (GPS). En cada sitio se tomaron muestras compuestas de suelo que se colocaron en bolsas plásticas y se remitieron al laboratorio. Las semillas de *C. juncea* se desinfectaron por inmersión en etanol 96% durante un minuto, hipoclorito de sodio (0,5% p/v) siete minutos y se lavaron seis veces con agua destilada estéril. La germinación se efectuó extendiendo las semillas en condiciones asépticas sobre agar-agua 1% (p/v) contenido en placas de Petri y posteriormente se colocaron en macetas con vermiculita estéril y suelo, en relación 5:1. Las plántulas se regaron con agua destilada estéril y permanecieron en cámaras de cultivo durante 30 días en las siguientes condiciones: 500 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ (400-700 nm) de intensidad luminosa, fotoperíodo de 16/8 horas (luz/oscuridad), 25/18 °C de temperatura (día/noche) y 50% de humedad relativa. Se evaluó la nodulación de las plantas y los nódulos se colectaron en tubos conteniendo gel de sílice.

El aislamiento de los rizobios a partir de los nódulos se realizó en medio Levadura manitol agar (LMA) con rojo Congo, según (Vincent, 1970). Posteriormente, las cepas fueron confirmadas por su habilidad para formar nódulos en la planta huésped (Vincent, 1970) y conservadas a -20 °C.

La caracterización fenotípica de los rizobios se realizó por métodos microbiológicos clásicos. Las bacterias se cultivaron en LMA y se observó la morfología macroscópica de las colonias (CIAT, 1988). Las características morfológicas celulares y tinción diferencial de Gram se observaron a través de un microscopio óptico (Vincent, 1970). La velocidad de crecimiento se evaluó según el tiempo de aparición de las colonias (Jordan, 1984). Para analizar la respuesta al cambio de coloración del medio, cada aislamiento se cultivó en caldo LMA (pH 6,8) e indicador azul de bromotimol (0,5 % en NaOH 0,016N) a 28 °C durante 5 días y se observó el cambio de coloración a azul (alcalinidad) o amarillo (acidez). Posteriormente, los aislamientos se cultivaron en medio LMA bajo diferentes condiciones de temperatura (28 °C, 32 °C, 35 °C, 37 °C y 40 °C), niveles de pH (4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10) y de salinidad (0,01%; 0,1%; 0,5%; 1%; 2% y 3% (p/v) de NaCl). El crecimiento de las cepas se evaluó por duplicado y se calificó según una escala numérica gradual desde 0 (ausencia de crecimiento) hasta 3 (desarrollo normal), comparándolo con el crecimiento obtenido en medio LMA en condiciones óptimas (pH 7; 28 °C y 0,01% p/v NaCl).

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

A partir de los nódulos se realizaron aislamientos y se obtuvieron 32 rizobios simbiotes de *C. juncea*. La colección se conformó con ocho aislamientos provenientes del suelo

identificado como CAS (Ataliva 1 [-30° 29' 01" sur/ -61° 41' 03" oeste]); diecisiete de CA (Ataliva 3 [-30° 59' 16" sur/ -61° 17' 37" oeste]) y siete de CMA (Malabrigo [-30° 22' sur/ -60° 01' oeste]).

Las colonias de los rizobios se caracterizaron por presentar formas circulares de bordes enteros y lisos, elevaciones cóncavas o convexas, colores rosados, beige o blanquecinos y translúcidos, semitranslúcido u opacos. El 37,5 % de las colonias mostraron un diámetro menor a 1 mm y el 62,5% igual o mayor a 2 mm. Mediante la tinción de Gram se observaron bacilos pequeños, Gram negativos y no esporulados, correspondiendo a la descripción de bacterias que forman nódulos con leguminosas en el *Phylum* B12 Proteobacteria (Garrity *et al.*, 2005). Los rizobios presentaron una marcada diversidad en torno a la velocidad de crecimiento (rápida, intermedia, lenta y muy lenta). La respuesta a la producción de acidez fue variable, al menos el 50% de los aislamientos proveniente de CAS y CMA produjeron acidez, mientras que menos del 40% lo hicieron en CA. Las bacterias que produjeron acidez presentaron un crecimiento rápido o intermedio, mientras que aquellas que alcalinizaron el medio de cultivo mostraron un crecimiento lento o muy lento. Esta información podría estar relacionada con los diferentes géneros de rizobios que presentan la capacidad de nodular *C. juncea*.

La capacidad de crecimiento *in vitro* de los aislamientos en diferentes condiciones abióticas (niveles de pH, temperaturas y concentraciones de NaCl) se presenta en la Figura 1.

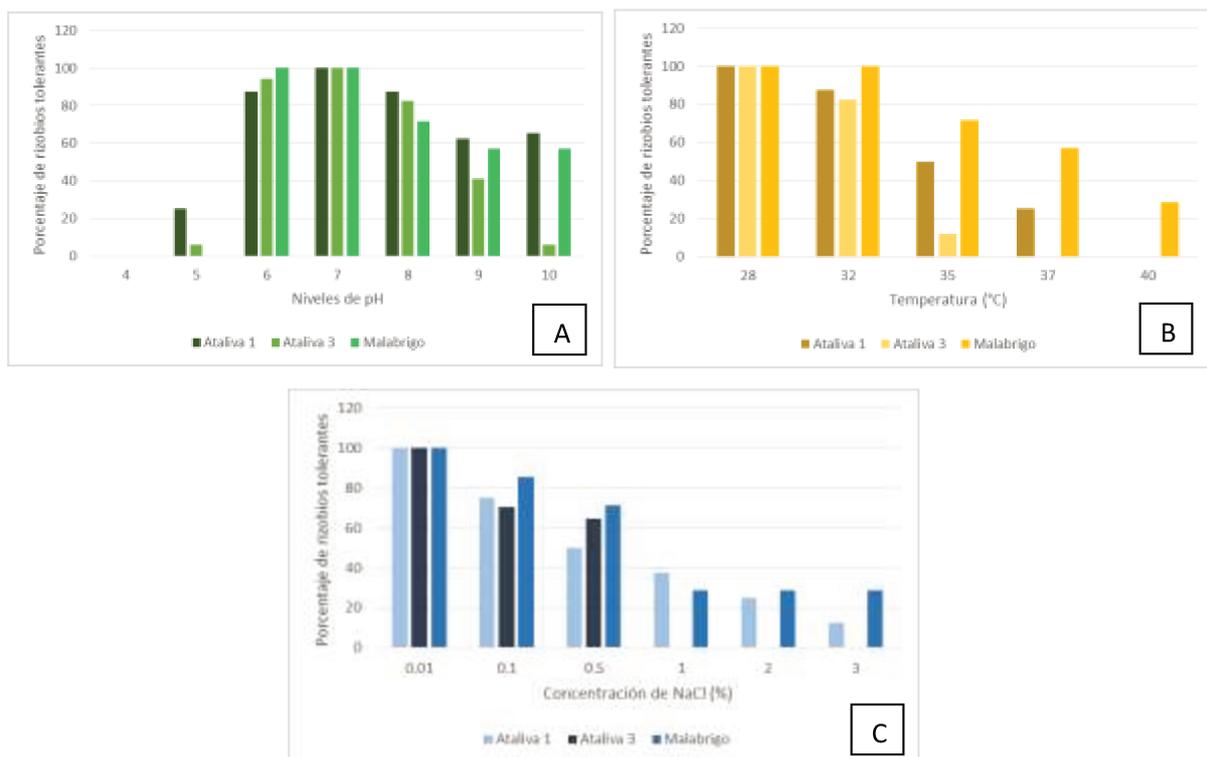


Figura 1: Tolerancia de rizobios simbiotes de *Crotalaria juncea* (A): diferentes niveles de pH. (B): distintos grados de temperatura. (C): diferentes niveles de salinidad (% p/v de NaCl). Las barras indican el porcentaje de rizobios tolerantes en relación al número de aislamientos obtenidos de cada sitio. Tolerancia expresa el crecimiento bacteriano óptimo. Los cultivos de rizobios se repicaron por duplicado en placas con medio LMA modificado según la condición indicada.

En relación con los niveles de pH, los aislamientos de la colección presentaron un desarrollo óptimo en medio nutritivo a pH 6 y 7, mostrando variaciones en términos de su

tolerancia a condiciones de acidez y alcalinidad. En la Figura 1A se puede observar la escasa capacidad de crecimiento de las cepas simbiotes en medios de cultivo ácidos. Los rizobios se caracterizaron por presentar una mejor aptitud para crecer en pH alcalinos, ya que el 57 a 63% de los aislamientos provenientes de CAS y CMA mostraron un crecimiento óptimo a pH 9 y 10.

Con respecto a la temperatura, como se observa en la figura 1B, la mayoría de los rizobios presentaron un desarrollo adecuado en medio de cultivo a 32 °C de incubación. Los resultados obtenidos mostraron que 57% de los rizobios de CMA presentó crecimiento a 37 °C y 29% fue capaz de crecer a la temperatura extrema de 40 °C.

En este trabajo, el 62% de los aislamientos de la colección manifestaron un crecimiento normal en 0,5% (p/v) de NaCl. Los microsimbiontes aislados de CAS mostraron una reducción del crecimiento a medida que incrementó la concentración salina en el medio nutritivo, mientras que el 29% de los rizobios de CMA presentaron un desarrollo óptimo en concentraciones de 1, 2 y 3 % (p/v) NaCl, como se ve reflejado en la figura 1C.

Los resultados de este trabajo de investigación aportan información consistente que pone en evidencia que en suelos de la provincia de Santa Fe existen rizobios capaces de nodular *C. juncea*. Asimismo, se hallaron microsimbiontes con capacidad de crecimiento en condiciones que se consideran adversas y que sugieren una mayor flexibilidad fisiológica y capacidad de adaptación al ambiente.

Se lograron recuperar simbiotes de *C. juncea* que constituyen un material valioso como potenciales candidatos para ser considerados en programas de selección de rizobios inoculantes como alternativa de biofertilización para una agricultura sustentable.

BIBLIOGRAFÍA

- CIAT** (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1988. Simbiosis leguminosa-rizobio. Manual de métodos de evaluación, selección y manejo agronómico. (Ed. Proy. CIATUNDP). Colombia. 178 pp.
- Garrity GM, Bell JA & Lilburn T.** 2005. The revised road map to the manual. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT & Garrity GM(Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Proteobacteria*. Vol. 2. 2nd Ed. Pp. 159- 187. Springer, New York.
- Gerding M, O'Hara GW, Howieson & Bräu L.** 2014. Overcoming nonselective nodulation of *Lessertia* by soilborne rhizobium in the presence of inoculant mesorhizobium. *Plant Soil*. 380: 117-132.
- Howieson, J & Ballard R.** 2004. Optimising the legume symbiosis in stressful and competitive environments within southern Australia - some contemporary thoughts. *Soil Biol. Biochem.* 36:1261-1273.
- Jordan DC.** 1984. Family III. Rhizobiaceae Conn 1938. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. (Eds. Krieg NR y Holt JG) Williams and Wilkins, Baltimore, EE.UU. pp. 234-256.
- Moreno Reséndez A, Carda Mendoza V, Reyes Carrillo JL, Vásquez Arroyo J & Cano Ríos P.** 2018. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20(1), 68-83.
- Paredes-Mendoza M & Espinosa-Victoria D.** 2010. Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica. *Terra Latinoamericana*, 28(1), 61-70.
- Verma JP, Yadav J, Tiwari KN, Lavakush, Singh V.** 2010. Impact of plant growth promoting rhizobacteria on crop production. *Int. J Agric. Res.*, 5 (11): 954-983.
- Vincent JM.** 1970. *A Manual for the Practical Study of the Root-Nodule Bacteria*. IBP Handbook No. 15, Blackwell Scientific, Oxford.

