

## 27. Agroalimentos

### **Eficiencia simbiótica de cepas de rizobios naturalizadas que nodulan soja en Uruguay**

Rodriguez, Natalia; Lagurara, Paula; Rodríguez, Andrea (Orientadora)

nataliarodriguezuy@gmail.com; plagurara@gmail.com; andrearb@fagro.edu.uy

Facultad de Agronomía

Universidad de la República

---

### **Resumen**

La soja (*Glycine max* L. Merr) es el principal cultivo de grano en Uruguay. El uso de inoculantes en nuestro país está ampliamente extendido debido a los beneficios económicos y ambientales de la disminución del uso de fertilizantes químicos. Los inoculantes comerciales utilizados en Uruguay contienen dos cepas de *Bradyrhizobium elkanii* (U1301 y U1302), recomendadas desde 1984 por el MGAP. En trabajos anteriores se verificó la presencia en suelos con historia de cultivo de una cepa de *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5080), utilizada en inoculantes de Brasil. La aplicación de inoculantes por largos periodos de tiempo resulta en la evolución de las cepas debido a modificaciones fenotípicas y genotípicas resultando en cepas “naturalizadas”. El objetivo de este trabajo fue determinar la eficiencia simbiótica de cepas de rizobios naturalizadas que nodulan soja, aisladas de suelos con y sin historia de cultivo. Mediante la técnica de PCR-BOX se analizó la diversidad de 55 aislamientos resultando en la identificación de 16 cepas naturalizadas. Se realizaron ensayos en condiciones controladas utilizando plantas de soja creciendo en magentas con sustrato estéril inoculadas con las cepas naturalizadas, con las cepas comerciales y sin inocular. Se determinó: número de nódulos, peso seco de los nódulos, peso seco de la parte aérea y peso seco de la raíz. Se observó variabilidad en la eficiencia simbiótica, destacándose 4 cepas que superaron, en las condiciones ensayas, a la mezcla de cepas comerciales utilizadas actualmente en el país. Es necesario seguir evaluando el potencial de estas cepas y su capacidad competitiva frente a las poblaciones de rizobios presentes en los suelos el país.

**Palabras clave:** inoculantes, bioinsumos, soja, naturalizadas, FBN.

## Introducción

La principal fuente natural de nitrógeno para los suelos es la fijación biológica de nitrógeno (FBN). Este proceso es realizado únicamente por procariontes y consiste en la reducción del  $N_2$  presente en la atmósfera para obtener  $NH_4^+$ , el cual puede ser asimilado por las plantas (Monza y Palacios, 2004). La soja (*Glycine max* L. Merr), al igual que la mayoría de las leguminosas, establece una relación simbiótica con bacterias llamadas rizobios. Estas bacterias fijan el nitrógeno atmosférico y lo convierten a su forma bioactiva para la planta. La interacción entre los rizobios y las plantas de soja es altamente específica y está mediada por una variedad de moléculas señal, dicha interacción promueve la formación de nódulos (**Figura 1**) en las raíces de la planta donde los rizobios llevan a cabo la FBN.

La soja es el principal cultivo de grano en Uruguay, y existe una tendencia hacia el aumento del área de siembra incluyendo zonas no tradicionalmente agrícolas. La FBN es de gran importancia para la viabilidad económica del cultivo. Además aporta beneficios ambientales debido a la



**Figura 1:** Nódulos en raíces de soja

disminución del uso de fertilizantes nitrogenados, evitando los efectos negativos en los suelos y en la calidad de las aguas superficiales y profundas.

Gracias a sus ventajas la práctica de inoculación de semillas de soja con inoculantes rizobianos es utilizada en todos los cultivos de este grano en nuestro país. Las formulaciones comerciales ofrecidas actualmente en el Uruguay contienen dos cepas de origen brasileño pertenecientes a la especie *Bradyrhizobium elkanii*, U1301 (SEMIA587) y U1302 (SEMIA5019), las cuales fueron recomendadas en 1984 por el Laboratorio de Microbiología de suelos del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP) como inoculantes de soja. Adicionalmente, en trabajos anteriores realizados por nuestro grupo se ha detectado la presencia de dos cepas de *Bradyrhizobium japonicum*, SEMIA5080 y E109, utilizadas en inoculantes de soja en Brasil y Argentina respectivamente.

La bibliografía reporta variación fenotípica y genética en las cepas por multiplicación frecuente en el laboratorio o en el suelo (Flores, *et al.*, 1998; Brunel, *et al.*, 1990). Debido a la persistencia de los rizobios en el suelo y la probabilidad de alteración genética de las cepas inoculadas originalmente, pueden desarrollarse nuevas cepas “naturalizadas” con una mejor adaptación al ambiente y cambios en sus características simbióticas. También se han reportado cepas de

rizobios nativas, presentes originalmente en el suelos con alta eficiencia simbiótica (Chibeba *et al.*, 2017; de Almeida Ribero *et. al*, 2015)

## Objetivos

Identificar cepas naturalizadas de rizobios que nodulan soja en suelos de Uruguay y evaluar su eficiencia simbiótica.

## Materiales y Métodos

### *Sitios de muestreo de suelo*

Se aislaron rizobios presentes en suelos con y sin historia de cultivo de soja situados en los departamentos de Colonia (Ombúes de Lavalle), Canelones (Las Brujas), Cerro Largo (Melo), Treinta y Tres (Paso de la Laguna), San José (Santa Clara) y Soriano (Dolores e Invernada). Los mismos se encuentran ubicados en el mapa de la **Figura 2**.

### *Aislamiento de rizobios*

Los rizobios fueron aislados de nódulos de plantas de soja de experimentos a campo o en invernáculo.

Los nódulos se desinfectaron por inmersión en etanol 70% por 1 min y luego en hipoclorito de sodio 2% durante 3 min. Finalmente se realizaron 5 lavados con agua destilada estéril.

Se aplastaron los nódulos con portaobjetos estériles y la suspensión resultante fue estriada en placas con medio EMA (Howieson y Dilworth, 2016).

Posteriormente se incubaron a 28°C durante 5 a 10 días.

Las colonias de cultivo puro fueron sembradas en medio líquido TY e incubadas a 28°C por 3 a 10 días. Se conservaron en mezcla 1:1 de cultivo y glicerol 50%, a -20°C.

### *Extracción de ADN*

Se picó una colonia pura desde medio EMA y se suspendió en 25 µL de solución de lisis (NaOH 0.05%-SDS 0.25%). Luego se calentó a 95°C durante 10 min. Cuando la suspensión se enfrió a temperatura ambiente, se agregaron 250 µL de MiliQ. Se centrifugó a 12000 rpm por 5 min. Finalmente se apartaron 60 µL de lisado.

### *Amplificación por PCR con primer BOX*

El ADN obtenido fue amplificado en una reacción de PCR con primer BOX A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'). La reacción de PCR consistió en 25 µL de



**Figura 2:** Sitios de muestreo de rizobios naturalizados

mezcla: 3.00  $\mu\text{L}$  de lisado, 2.50  $\mu\text{L}$  solución DreamTaq buffer-PCR ThermoScientific, 0.50  $\mu\text{L}$  dNTPs (10 mM), 0.50  $\mu\text{L}$  MgCl (0.5 mM), 1.25  $\mu\text{L}$  (0.5  $\mu\text{M}$ ), 0.20  $\mu\text{L}$  Dream Taq polimerasa (1 U/ $\mu\text{L}$ ) y 17.05  $\mu\text{L}$  agua bidestilada.

El programa de amplificación utilizado fue: desnaturalización inicial a 94°C por 7 min, seguido de 30 ciclos de 94°C durante 1 min, 52°C durante 1 min y 72°C durante 3 min, finalmente extensión a 72°C por 15 min.

Los amplicones fueron separados por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2% con buffer TBE 0.5 X (Tris-Ácido Bórico-EDTA), a 5 V/cm durante 3 hs. Se utilizó marcador de peso molecular 100pb Plus (Thermo Scientific) y el intercalante Good View (SBS, China). La detección de las bandas se realizó bajo luz UV.

Los perfiles obtenidos fueron analizados con el software BioNumerics versión 7.6 (AppliedMaths). Se consideraron aislamientos con igual perfil cuando presentaban una similitud mayor al 70%.

#### *Ensayo bajo condiciones controladas*

Se realizaron 3 ensayos en condiciones controladas para evaluar un total de 16 cepas naturalizadas con perfil distinto. Se sembraron semillas de soja, previamente desinfectadas y pregerminadas, en magentas (**Figura 3**) con arena estéril y solución nutritiva sin nitrógeno (Somasegaran, 1994). A las 48 hs las plántulas fueron inoculadas con 1 mL de

cultivo conteniendo  $10^7$  ufc de rizobio/mL. Además de las cepas de interés se incluyeron como control negativo tratamientos sin inocular y como control positivo tratamientos inoculados con una mezcla 1:1 de las cepas comerciales U1301 y U1302. Los tratamientos se evaluaron por quintuplicado. Las plantas se cosecharon a los 30 días posteriores a la siembra.

Los parámetros determinados fueron: número y peso seco de los nódulos, peso seco de la raíz y peso seco de la parte aérea. Para determinar los pesos secos del material vegetal se mantuvieron en estufa a 65°C hasta peso constante.

El análisis estadístico de los datos se realizó en el software Infostat, se evaluó la normalidad con el test de Shapiro –Wilks y la homogeneidad de varianzas con el test de Levene. En el caso de las variables que presentaron distribución normal se



**Figura 3:** Ensayo en magentas de eficiencia simbiótica de rizobios naturalizados

realizó un análisis de varianza (ANAVA) y se compararon las medias aplicando el test de Fisher. En caso contrario, se aplicó el Modelo Lineal Generalizado Mixto y se compararon las medianas entre tratamientos con el test de LSD-Fisher. El nivel de significancia utilizado en todos los análisis fue de  $P < 0.05$ .

## Resultados y Discusión

### Identificación de cepas

Se analizaron un total de 55 aislamientos con perfil de PCR-BOX diferente al de las cepas comerciales de la región. Se consideró un límite de 70% de similitud para diferenciar los perfiles, sugerido por trabajos en diversidad de rizobios por rep-PCR (Delamuta et al., 2017). Se agruparon 16 perfiles de fingerprinting diferentes, estos se ilustran en el dendrograma de la **Figura 4**. Se observa que 2 de los perfiles (E01 y E02) obtenidos están incluidos en el cláster de la especie *B. elkanii* (U1301 y U1302),

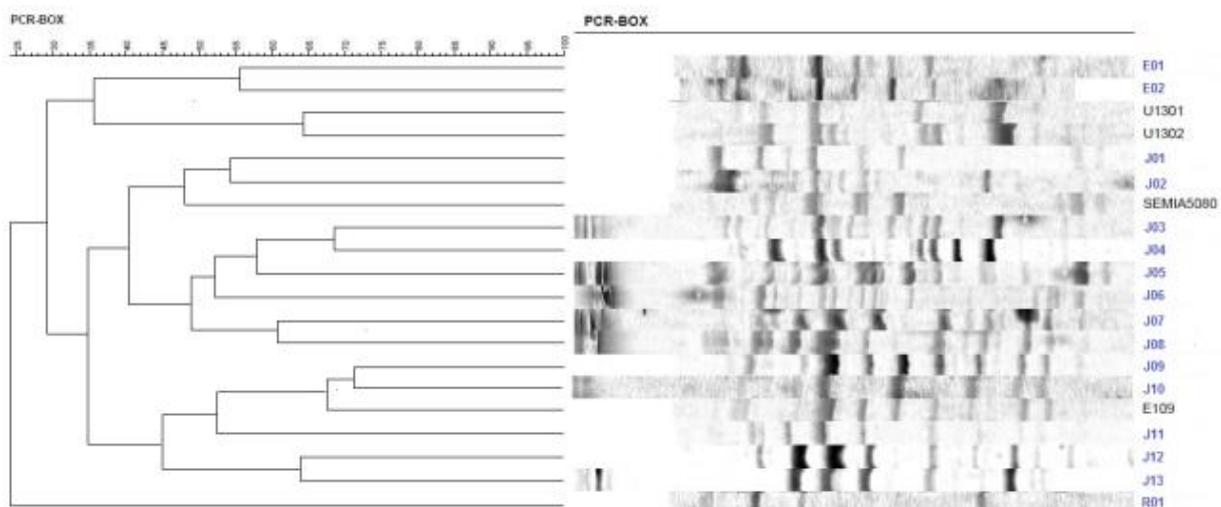
mientras que 13 (J01 a J13) de ellos presentan mayor similitud con las cepas de *B. japonicum* (SEMIA508 y E109) y solamente uno de los perfiles (R01) presentó una similitud muy baja del 25% con las demás cepas estudiadas.

En la **Tabla 1** se presentan los aislamientos correspondientes a cada perfil, destacándose un gran número de aislamientos correspondientes a los perfiles J06, J12 y J13 provenientes de San José, Invernada y Soriano, suelos con historia de cultivo de Soja. Es interesante destacar los perfiles J01, J10 y J13, originarios de suelos sin historia de cultivo de soja de Colonia y Soriano.

La caracterización genética posterior de las cepas identificadas permitirá obtener más información sobre su origen y diversidad.

### Eficiencia simbiótica de cepas

Los resultados obtenidos en cada experimento para el control positivo, la



**Figura 4:** Dendrograma de perfiles de rizobios naturalizados y cepas comerciales de fingerprinting por BOX-PCR.

**Tabla 1:** Aislamientos de cepas nativas y sitios de muestreo

Perfil	N° Aislamientos	Departamento	Localidad	Suelo
E01	1	Cerro Largo	Melo	Con historia
E02	1	Colonia	Ombúes de Lavalle	Con historia
J01	2	Colonia	Ombúes de Lavalle	Sin historia
J02	1	Canelones	Las Brujas	Con historia
J03	1	Cerro Largo	Melo	Con historia
J04	2	Soriano	Invernada	Con historia
J05	1	Treinta y Tres	Paso de la Laguna	Con historia
J06	7	San José	Santa Clara	Con historia
J07	3	Cerro Largo	Melo	Con historia
J08	2	Colonia	Ombúes de Lavalle	Con y sin historia
J09	3	Cerro Largo	Melo	Con y sin historia
J10	1	Colonia	Ombúes de Lavalle	Sin historia
J11	1	Cerro Largo	Melo	Con historia
J12	18	Soriano	Invernada	Con historia
J13	9	Soriano	Dolores	Sin historia
R01	2	Colonia	Ombúes de Lavalle	Con historia

mezcla de cepas comerciales U1301:U1302 (1:1), se presentan en la **Tabla 2**.

Con el fin de unificar los tres experimento realizados y facilitar la comparación de las cepas estudiadas, los resultados obtenidos se expresan como valores relativos al control positivo (la mezcla de cepas U1301 y U1302) del experimento correspondiente en la **Tabla 3**. Se destacan los valores que resultaron significativamente superiores (color verde) o inferiores (color rojo) al control positivo. La mitad de cepas estudiadas mostraron

valores de número de nódulos (NN) estadísticamente iguales a los obtenidos para el control positivo, mientras que un 31% presentaron un mayor número de nódulos y por el contrario de tres cepas se obtuvo una cantidad inferior. La variabilidad fue considerablemente mayor al considerar el peso seco de los nódulos (PSN), donde la mayoría (63%) resultaron significativamente inferiores al control, obteniéndose una única cepa (R01) con mayor biomasa nodular. Al evaluar el peso seco de la raíz (PSR) no se observan diferencias significativas

**Tabla 2:** Eficiencia simbiótica de control positivo en cada experimento

Experimento	Resultados obtenidos para mezcla U1301:U1302				
	NN	PSN (g)	PSR (g)	PSPA (g)	PST (g)
dic-17	94,20	0,37	0,96	1,88	3,22
mar-18	153,2	0,37	0,81	2,09	3,27
jun-18	58,2	0,34	0,87	2,46	3,67

**Tabla 3:** Eficiencia simbiótica relativa de las cepas estudiadas

Perfil	Experimento	Relativo a U1301:U1302				
		NN	PSN	PSR	PSPA	PST
E01	jun-18	1,20	<b>0,76</b>	0,89	1,14	1,04
E02	mar-18	<b>0,64</b>	0,84	1,27	<b>1,33</b>	<b>1,26</b>
J01	mar-18	0,95	0,95	1,32	<b>1,22</b>	<b>1,24</b>
J02	jun-18	1,10	1,09	1,09	0,91	0,97
J03	dic-17	1,05	<b>0,76</b>	0,74	0,88	0,82
J04	dic-17	<b>1,24</b>	0,86	0,88	1,13	1,02
J05	dic-17	1,12	<b>0,65</b>	0,81	1,00	0,90
J06	dic-17	<b>1,15</b>	<b>0,76</b>	1,22	0,48	1,08
J07	dic-17	1,03	<b>0,78</b>	0,81	1,13	0,99
J08	dic-17	<b>1,30</b>	<b>0,78</b>	1,17	1,26	1,17
J09	mar-18	<b>0,68</b>	<b>0,81</b>	<b>1,37</b>	<b>1,32</b>	<b>1,30</b>
J10	dic-17	<b>1,56</b>	0,76	0,94	<b>1,34</b>	1,15
J11	mar-18	<b>0,45</b>	<b>0,76</b>	1,17	0,96	0,99
J12	jun-18	1,17	<b>0,79</b>	0,86	0,95	0,91
J13	dic-17	<b>1,25</b>	<b>0,68</b>	0,70	1,14	1,02
R01	jun-18	1,14	<b>1,12</b>	0,84	1,03	0,99

excepto el tratamiento con la cepa J09 la cual generó un mayor desarrollo radicular. Resultados similares se observan para la parte aérea (PSPA) de las plantas, un 75% de los tratamientos presentaron valores estadísticamente iguales a la mezcla de cepas comerciales, destacándose 4 cepas (E02, J01, J09 y J10) que promovieron un mayor crecimiento de la parte aérea de las plantas. De estas 3 (E02, J01 y J09) resultaron en una mayor biomasa vegetal (PST), mientras que un 81% obtuvo valores similares al control positivo. Los resultados obtenidos sugieren una eficiencia simbiótica de las cepas naturalizadas similar a las utilizadas en los inoculantes comerciales de nuestro país, con 4 cepas potencialmente más

eficientes. Es necesario profundizar el estudio, mediante ensayos con diferentes suelos del país como sustrato, para de esta forma conocer la adaptación de las cepas a las condiciones climáticas y edáficas de nuestro país, así como su capacidad competitiva frente a otros rizobios presentes en los suelos.

### Conclusiones

Se aislaron cepas naturalizadas presentes en suelos de distintas regiones de Uruguay, identificándose 16 perfiles de PCR-BOX.

La eficiencia simbiótica de cepas naturalizadas aisladas fue similar a la obtenida con cepas de los inoculantes comerciales nacionales. Se destacan 4 cepas con mayor biomasa aérea.

## Bibliografía

Brunel, B., Boeufgras, J.M., Bernillon, D. & Bardin, R. (1990). Phenotypic drift in *Bradyrhizobium japonicum* populations after introduction into soils as established by numerical analysis. *Microb. Ecol.*, 19(2) 163-170.

Chibeba, A. M., Kyei-Boahen, S., Guimarães, M., Nogueira, M. A., & Hungria, M. (2017). Isolation, characterization and selection of indigenous *Bradyrhizobium* strains with outstanding symbiotic performance to increase soybean yields in Mozambique. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 246, 291–305.

de Almeida Ribero, P. R., dos Santos, J. V., da Costa, E. M., Lebbe, L., Assis, S., Oliveira Louzada, M., Guimarães, A. A., Willems, A. & de Souza Moreira, F. M. (2015). Symbiotic efficiency and genetic diversity of soybean bradyrhizobia in Brazilian soils. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 212, 85-93.

Delamuta, J. R. M., Menna, P, Ribeiro, R. A. & Hungria, M. (2017). Phylogenies of symbiotic genes of *Bradyrhizobium* symbionts of legumes of economic and environmental importance in Brazil support the definition of the new symbiovars *pachyrhizi* and *sojae*. *Systematic and Applied Microbiology*, 40, 254-265.

Monza, J. & Palacios, J. (2004). Fijación Biológica de Nitrógeno en la simbiosis Rizobio-Leguminosa. En J. Monza (1°

ed.), *El metabolismo del Nitrógeno en plantas* (p 15-38). Córdoba, Argentina: Almuzara.

Somasegaran, P., Hoben, H. J. (1994). *Handbook of Rhizobia*. New York, Estados Unidos de América: Springer- Verlag.

## Agradecimientos

Agradecemos al Laboratorio de Microbiología de Suelos del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) por permitirnos utilizar sus instalaciones durante los ensayos de eficiencia simbiótica y colaborar en el desarrollo de los mismos.

## Financiamiento

La investigación que da origen a los resultados presentados en la presente publicación recibió fondos de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación bajo el código POS\_NAC\_2017\_1\_141269.

La misma también fue financiada por el fondo María Viñas- ANII 2014.