

# CARACTERIZACION DE PLASMIDOS SIMBIOTICOS Y COMPETITIVIDAD DE RIZOBIOS NODULANTES DE MANÍ OBTENIDOS DE SUELOS MANISEROS DE LA PROVINCIA DE CÓRDOBA.

Taurian, T, Ponzio, M., Morgante, C., Ibañez, F., Angelini, J., Castro, S. y Fabra, A. Dpto. de Cs. Naturales. Fac. de Cs. Exactas, Fco-Qcas y Naturales. UNRC. 5800 Río Cuarto. E-mail. taurian@exa.unrc.edu.ar

## Introducción

Las bacterias denominadas rizobios crecen en el suelo en asociación simbiótica con raíces de leguminosas. Esta interacción resulta en la formación de nódulos en los cuales las bacterias realizan la Fijación Biológica del Nitrógeno atmosférico (FBN), permitiendo la introducción de nitrógeno en el suelo agrícola y evitando el uso masivo de fertilizantes químicos. Una de las leguminosas que establece asociación con bacterias simbióticas es el maní. Estudios previos realizados por nuestro laboratorio en aislamientos nativos de maní de la región de Córdoba revelaron que dicha población es heterogénea y que involucra a rizobios de crecimiento lento (género *Bradyrhizobium*) así como a rizobios de crecimiento rápido (género *Rhizobium*).

Una colección de aislamientos bacterianos obtenidos a partir de suelos agrícolas representa una fuente potencial de nuevas cepas que podrían ser empleadas como inoculantes biológicos en agricultura. La selección de cepas más eficaces (asociadas al uso de inoculantes de buena calidad) así como una eficiente combinación hospedador-rizobio puede mejorar la FBN en dichos cultivos (Peoples y Craswell, 1992; Nava Juárez y col., 1997). Para que un microorganismo pueda utilizarse como inoculante debe estar adaptado a las condiciones edafocológicas del ambiente en que se lo introduzca, mantener una elevada densidad poblacional después de su inoculación y colonizar efectivamente la superficie de la raíz.

La caracterización de los aislamientos de crecimiento rápido nodulantes de maní de nuestra colección, mostró que los mismos poseen una mayor tolerancia que los de crecimiento lento a diferentes condiciones adversas (elevadas temperaturas y concentraciones de sal y bajo pH) e incluso, algunos de ellos solubilizan el fosfato en el medio de cultivo (Taurian y col., 2002). El hallazgo de aislamientos rápidos capaces de nodular maní condujo a determinar si los genes simbióticos están localizados en plásmidos autotransmisibles, tal como lo describe la bibliografía para otros simbioses. Ello permitiría explicar la existencia de genotipos tan heterogéneos anteriormente no descritos capaces de nodular maní. Por otro lado, las características de mayor tolerancia a las condiciones ambientales adversas, la mayor velocidad de crecimiento y la capacidad de solubilizar fosfatos de este grupo de aislamientos condujo a evaluar su competitividad frente a una cepa de *Bradyrhizobium sp* recomendada como inoculante, para su posible transferencia campo. Objetivos: 1. Determinar si los genes simbióticos de aislamientos rápidos que nodulan eficientemente maní están localizados en plásmidos autotransmisibles. 2. Evaluar la competitividad para la ocupancia de nódulos de un aislamiento rápido altamente eficiente en la fijación de nitrógeno en simbiosis con maní.

## Metodología

**Cepas bacterianas** Cepas de referencia curadas de plásmido simbiótico (*pSym*): *Rhizobium etli* CFN42, *R.tropici* CIAT899, *Sinorhizobium fredii* 192, Aislamientos nativos: NCHA22 y NET30, Cepa de referencia recomendada como inoculante para maní: *Bradyrhizobium sp*. SEMIA 6144.

**Ensayos de conjugación** Se siguió la técnica propuesta por Simons y col., 1983.

**Ensayos de nodulación** Se siguió la metodología descrita por Vincent, 1970.

**PCR-nodC** La amplificación de un fragmento de 930 pb correspondiente al gen de nodulación *nodC* se realizó empleando los cebadores *nodCF/nodCI* (Laguerre y col., 2001).

**Ensayos de competitividad** Se analizó la competitividad del aislamiento NCHA22 respecto a la cepa *B. sp* SEMIA 6144 inoculando plántulas de maní con las dos bacterias en idénticas cantidades. Las plantas fueron cosechadas 60 días postinoculación y las bacterias fueron aisladas de los nódulos para estudiar la ocupancia de las mismas.

## Resultados y Discusión

### 1. Determinación de la presencia de plásmidos autotransmisibles en dos aislamientos de maní eficientes en la fijación biológica del nitrógeno

La estrategia planteada con el objeto de conocer si los genes simbióticos de los aislamientos se ubican en plásmidos autotransmisibles, consistió en transferir los mismos por conjugación a una cepa de *Rhizobium* curada del plásmido simbiótico *pSym* (*Rif<sup>R</sup>*) y luego ensayar la capacidad de esta última para nodular maní y analizar la presencia de uno de los genes de nodulación (gen *nodC*). Se incubaron juntas una cepa nodulante de maní (donadora) y una cepa curada de su respectivo plásmido simbiótico que naturalmente no nodula maní (receptora); seguidamente se contraseleccionó la cepa donadora por su sensibilidad al antibiótico. Los rizobios resistentes al antibiótico y los potenciales receptores se usaron para inocular en masa a raíces de maní. En la tabla 1 se muestra la capacidad de nodular maní y presencia del gen *nodC* en las transconjugantes obtenidas.

Tabla 1. Capacidad de nodular maní y presencia del gen *nodC* en las transconjugantes.

Conjugación	Transconjugantes	Nodulación en maní	Presencia del gen simbiótico <i>nodC</i>
NCHA22xR. <i>etli</i> CFN42	CFN42p <sup>22</sup>	-	+
NCHA22xR. <i>tropici</i> CIAT899	CIAT899p <sup>22</sup>	+	+
NCHA22xS. <i>fredii</i> 192	F192p <sup>22</sup>	+	+
NET30xR. <i>etli</i> CFN42	CFN42p <sup>30</sup>	-	-
NET30xR. <i>tropici</i> CIAT899	CIAT899p <sup>30</sup>	+	+
NET30xS. <i>fredii</i> 192	F192p <sup>30</sup>	+	+

La capacidad de nodular maní y presencia del gen de nodulación *nodC* en cepas originalmente curadas (carentes) de plásmido simbiótico permite sugerir que los aislamientos de crecimiento rápido analizaron transfirieron esta capacidad a las mismas. La presencia de los mismos en estas bacterias y la capacidad de autotransmitirse a otros rizobios permite sugerir que los aislamientos han adquirido la capacidad de nodular maní por transferencia horizontal de estos genes.

## 2. Competitividad de un aislamiento rápido altamente eficiente en la fijación de nitrógeno en simbiosis con maní.

Se analizó la competitividad para nodular maní del aislamiento NCHA22, altamente eficiente en la fijación biológica de nitrógeno en esta leguminosa, con respecto a la cepa *Bradyrhizobium* sp SEMIA 6144, recomendada como inoculante para maní (IPAGRO). En la Tabla 2 se muestra la ocupancia de los nódulos con cada una de las dos cepas inoculadas en plantas de maní cosechadas a los 40 días postinoculación.

Tabla 2. Proporción de nódulos ocupados por el aislamiento NCHA22 y la cepa *B. sp* SEMIA 6144.

Cepas	Número de nódulos ocupados	
	Coinoculación con 1x10 <sup>5</sup> ufc/semilla	Coinoculación con 3x10 <sup>5</sup> ufc/semilla
NCHA22	18±2	13±3
<i>B. sp</i> SEMIA 6144	19±8	10±3

Los datos corresponden la media de ± ES de n: 4 determinaciones

Si bien no se observaron diferencias significativas entre los nódulos ocupados por la cepa de referencia *B. sp* SEMIA 6144 y el aislamiento NCHA22, se observa una tendencia a una mayor ocupancia por parte del simbionte nativo de maní. Es importante destacar las ventajas que presentan los aislamientos rápidos frente a esta cepa y los aislamientos de crecimiento lento hallados, ya que los mismos tienen mayor tolerancia a las condiciones extremas (alta temperatura, elevadas concentraciones de sal y pH ácido). A ellos se suma su mayor velocidad de crecimiento, lo cual reduce los tiempos y costos en la preparación del inoculante, y la propiedad de solubilizar el fosfato, segundo macronutriente, luego del N, limitante de la producción agrícola y cuyo contenido se encuentra reducido en algunos suelos maniseros de la provincia de Córdoba (Bosch y da Veiga, 2002).

Subsidiado por AMPCyT, SECyT-UNRC.