

POTENCIAL AGRONÓMICO DE BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO ENDÓFITAS DE ARROZ

M. Carlomagno, K. Punschke y C. Labandera. DMS, Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, Burgues 3208, Montevideo, Uruguay. lmencilab@adinet.com.uy

Palabras clave: endófitos, diazótrofos, promoción.

En Uruguay, en el año 2001 el arroz (*Oryza sativa*) representó el 99 % de las exportaciones de cereales. Es un cultivo extensivo de verano, realizándose en forma mecanizada y bajo inundación. Se cultiva generalmente en rotación con pasturas; sin embargo es común el uso de fertilizantes nitrogenados. Se intenta reducir su aplicación mediante el uso del potencial de promoción del crecimiento de bacterias endófitas. Estas colonizan el interior de las raíces y en algunos casos se dispersan sistémicamente sin formar estructuras especializadas. Algunas pueden transmitirse en el grano. Presentan ventajas frente a las rizosféricas, pues no compiten con los microorganismos del suelo, están protegidas de cambios ambientales y establecen un intercambio más directo de metabolitos con la planta. Promueven el crecimiento vegetal por: fijación biológica de nitrógeno (FBN), producción de fitohormonas y resistencia a enfermedades, entre otros. El grado de colonización varía según el genotipo de la planta (Barraquio y col., 1997; Canzani y col., 1998; Hallmann y col., 1997; Bashan y Holguin, 1997; Okon y Vanderleyden, 1997; Pádua, 2001; Baldani y col., 2000; Mirza y col., 2000). Un amplio rango de bacterias diazótroficas se confirmaron como endófitas de arroz, entre ellas las microaerófilicas: *Azospirillum brasilense* (Baldani y col., 1993), *Azospirillum irakense* (Vermeiren y col., 1998), *Azoarcus* BH72 (Reinhold-Hurek y Hurek, 2000), *Herbaspirillum seropedicae* (Baldani y col., 1995; Olivares y col., 1996; James y col., 2000), *Burkholderia brasilense* (Baldani y col., 2000). Cepas diazótroficas de *Bacillus* y *Paenibacillus* serían endófitas de arroz (James y col., 2000). El objetivo de este trabajo fue cuantificar, aislar y caracterizar bacterias diazótroficas endófitas de las variedades comerciales El Paso 144 e INIA Tacuarí. Se evaluó la capacidad de los aislamientos de fijar N y de promover el crecimiento vegetal.

Se recolectaron 84 muestras de plantas de arroz en estadio vegetativo de las variedades El Paso 144 e INIA Tacuarí, de chacras comerciales y parcelas experimentales en las zafras 2000/2001 y 2001/2002. Para cada muestra tallos y hojas se desinfectaron superficialmente con alcohol 70%, se maceró 1g en agua estéril, y se prepararon diluciones (Döbereiner y col., 1995). Se sembraron 0,1 ml de estas en los medios selectivos semisólidos sin N NFb (Döbereiner y col., 1995) y JMV (Baldani y col., 2000) por triplicado, para cuantificar por número más probable (NMP) y aislar: *Azospirillum* spp., *Herbaspirillum* spp. y *Azoarcus* spp. en NFb, y *Burkholderia brasilense* en JMV. Se incubó a 35°C por 4 a 7 días, y se siguió la metodología descrita por Döbereiner y col. (1995). Para aislar *Bacillus* spp., la dilución 10^{-1} de la muestra se incubó por 10 min. a 80°C (McInroy y col., 2000). Se sembró 0,1 ml en Rennie semisólido sin N, incubó a 28°C por 3 días, y se continuó según Döbereiner y col. (1995). Colonias aisladas provenientes de los 3 medios crecieron en LB (Luria Bertani) líquido y se conservaron en glicerol al 20% a -80°C (Döbereiner y col., 1995). Se evaluó la FBN de algunos aislamientos de NFb y JMV por reducción de acetileno (ARA). Para evaluar promoción del crecimiento, se descascararon granos El Paso 144 e INIA Tacuarí. Se esterilizaron con $HgCl_2$ 0,2% por 4 min y se pregerminaron en agar agua a 28°C. Las cepas crecieron en LB líquido a 30°C con agitación, toda la noche. Tubos para plantas de 80 ml con 40 ml de medio Hoagland sin y con 0.05% KNO_3 esterilizados, se inocularon antes de la solidificación con 1 mL del cultivo (10^8 cél.) o con 1 ml de buffer fosfato. Una vez germinadas se sembró una plántula por tubo, empleando 2 repeticiones por tratamiento. Las plantas crecieron en cámara con un fotoperíodo de 12 hs, a 25-30°C por 45 días (Baldani y col., 2000). Se consideró aislamiento promotor aquel que produjo un incremento mayor al 20% de la materia seca de parte aérea o raíz, respecto al control sin inocular. Estos se evaluaron en las condiciones descritas pero utilizando 3 repeticiones por

tratamiento. Los aislamientos que confirmaron la promoción se ensayaron usando 5 repeticiones, y se registró el efecto sobre el desarrollo radicular. Las materias secas se analizaron por ANOVA-1 y se determinaron las diferencias significativas mínimas según LSD al 5%.

Los resultados de NMP indicaron que en la mayoría de las muestras se encontraron concentraciones de endófitas diazotróficas microaerofílicas mayores a 10^5 cél/g de tejido. El 100% de las muestras El Paso 144 mostraron concentraciones mayores a 10^5 cél/g, mientras que hubo un 69% de las muestras INIA Tacuarí con concentraciones mayores a 10^5 cél/g y el resto presentó concentraciones menores a 10^4 cél/g. Estas diferencias podrían deberse a las distintas capacidades de las variedades de asociarse a diazótrofos. Estos dos resultados apoyan trabajos previos (Canzani y col., 1998). En todas las muestras se obtuvieron aislamientos en los medios empleados: se conservaron 59 aislamientos de NFb, 51 de JMV y 13 de Rennie, lo que indicaría una gran diversidad de endófitos diazótrofos. Un 56% de los 66 aislamientos de NFb (37) y JMV (29) manifestaron capacidad de fijar N según ARA. En los ensayos de promoción de crecimiento vegetal se evaluaron 31 aislamientos de NFb, 31 de JMV y 13 de Rennie. El 33% del total de los aislamientos presentaron potencial de promoción en parte aérea y/o raíz, con y/o sin N. El 23% de los aislamientos de NFb y JMV promovieron, con incrementos en el peso fresco del 20 al 100%. A su vez, un 85% de los de Rennie fueron promotores; de estos, un 36% mostró niveles de promoción del 100 al 150% en Tacuarí (Figura 1). Treinta aislamientos se evaluaron con 3 repeticiones (Tabla 1).

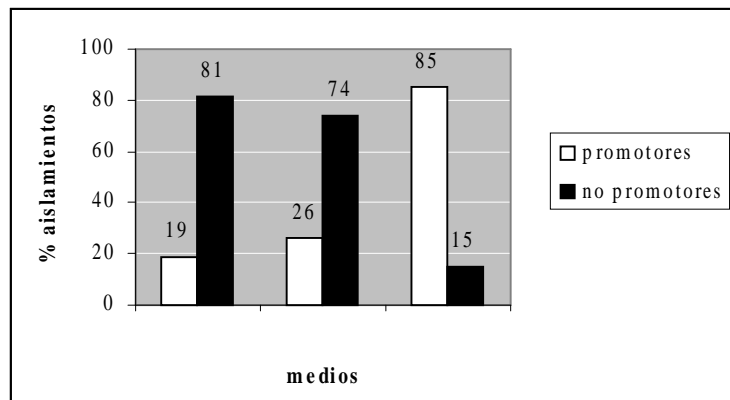


Fig. 1 Porcentajes de aislamientos promotores en ensayos con 2 repeticiones según el medio donde se aislaron.

Nueve aislamientos de NFb, 4 de JMV y 9 de Rennie mostraron porcentajes de promoción mayores al 20% cuando se evaluaron con 3 repeticiones. 56aN, 56bN, 46R, 60R, 73R y 81R provocaron promociones significativas mayores al 100% en El Paso, y 5J en Tacuarí. 56aN, 46R y 81R también presentaron este efecto en Tacuarí, confirmando 46R y 81R el alto porcentaje obtenido con 2 repeticiones. Además 2N, 38N, 56N y 56aN mostraron promociones significativas en Tacuarí. 38N, 56aN, 81R, 73R también mostraron promociones significativas en alguna otra de las fracciones de las plantas con y/o sin N (no se muestra). Siete de 19 aislamientos confirmaron la promoción en El Paso. Sin embargo, 9 de 12 promotores en Tacuarí repitieron el efecto. Para 44N, 82aJ, 83J, 82R y 83R no se confirmó la promoción del 20 al 100%. Los porcentajes de promoción alcanzados son similares a los obtenidos por Baldani y col. (2000). Es de interés que el medio Rennie se utilizó para aislar cepas de *Bacillus*, y que las especies formadoras de esporas de este género tienen una vida útil suficiente para ser utilizados comercialmente (McInroy y col., 2000). Con los aislamientos promisorios en los ensayos con 3 repeticiones se realizaron los ensayos con 5 repeticiones por tratamiento, incorporando cepas de referencia. Se verificará la condición endófitas de las cepas seleccionadas, se identificarán por técnicas bioquímicas y moleculares, y su potencial de promoción se evaluará en suelo en invernáculo.

Tabla 1 Aumento en la materia seca de plantas inoculadas con aislamientos promotores en presencia y ausencia de N, en ensayos con 2 o 3 repeticiones por tratamiento.

Cepa ^a	2 repeticiones				3 repeticiones				
	EP	Aumento (%) ^c		T	EP	Aumento (%) ^c		T	
2N ^b	77 ^d	sd	(-)	75 ^{d*}	76J	(-)	34	32	(-)
33N ^b	30	sd	52 ^d	63	83J	39	(-)	(-)	(-)
38N	39	77 ^d	(-)	79 ^{d*}	82aJ	sd	sd	(-)	(-)
44N	90	(-)	(-)	(-)	82bJ	sd	sd	sd	sd
46N	38	(-)	(-)	48 ^d	46R	(-)	73	235 [*]	169 [*]
56N	59	(-)	(-)	39 [*]	53R	29 ^d	110 ^d	48	60
56aN	sd	sd	213 [*]	198 [*]	57R	27	114 ^d	54	72
56bN	sd	sd	101 [*]	87	60R	29	50 ^d	140 [*]	34
70N	sd	sd	(-)	87	67R	35	108	(-)	52
80N	sd	sd	(-)	23	69R	37	81	53	24
5J ^b	50 ^d	sd	(-)	194 ^{d*}	73R	29	(-)	125 [*]	73
22J ^b	67 ^d	sd	(-)	24 ^d	74R	29 ^d	35 ^d	21 ^d	33 ^d
23J ^b	30 ^d	sd	(-)	26	81R	(-)	94 ^d	154 [*]	198 [*]
25J ^b	49 ^d	sd	sd	sd	82R	51	152	(-)	(-)
71J	(-)	65	sd	sd	83R	37	143 ^d	(-)	(-)

sd sin dato; (-) no promovió; * promociones significativamente diferentes de los controles sin inocular (LSD, p<0.05); ^a se designaron usando la inicial del medio de aislamiento; ^b ARA+. El resto sin dato; ^c para cada aislamiento se eligió el mayor porcentaje de promoción obtenido a partir de las medias de parte aérea y/o raíz, con y/o sin N; ^d en presencia de N.

Referencias Bibliográficas.

- BALDANI VLD et al Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. **Biology and Fertility of Soils** v30: (5-6) p485-491, 2000
- BALDANI VLD et al Selection of *Herbaspirillum* spp strains associated with rice seedlings amended with ¹⁵N-labeled fertiliser. In: BODDEY RM; DE RESENDE AS (Eds) **International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics: The role of BNF** Rio de Janeiro: EMBRAPA, 1995 p202-203
- BALDANI VL et al Colonization of rice by the nitrogen fixing bacteria *Herbaspirillum* spp and *Azospirillum brasilense*. In: PALACIOS R et al (Eds) **New horizons in nitrogen fixation** Dordrecht (Netherlands): Kluwer Academic Publishers, 1993 p705
- BARRAQUIO, W.L. et al Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. **Plant and Soil** v194 p15-24, 1997
- BASHAN Y; HOLGUIN G *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology** v43 p103-121, 1997
- CANZANI F y col Cuantificación y aislamiento de microorganismos fijadores de N en arroz. En "Arroz, Resultados Experimentales 1997-1998" INIA Treinta y Tres Actividades de difusión N° 166, 1998
- DÖBEREINER J et al **Como isolar e identificar bacterias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. EMBRAPA-SPI Brasília-DF, 1995
- HALLMANN J et al Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology** v43 p895-914, 1997
- JAMES EK et al Endophytic diazotrophs associated with rice. In: LADHA JK; REDDY PM (Eds) **The quest for nitrogen fixation in rice** IRRI, 2000 p119-140
- MIRZA M et al Beneficial effects of inoculated N-fixing bacteria on rice. In: LADHA JK; REDDY PM (Eds) **The quest for N fixation in rice** IRRI, 2000 p191-204
- MCINROY J et al Emergence promotion in maize by soil, rhizosphere and endophytic bacilli in conjunction with solid matrix priming. In: **Fifth International PGPR Workshop** Córdoba, Argentina, 2000
- OKON Y; VANDERLEYDEN J Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. **ASM News** v63, 7 p366-370, 1997
- OLIVARES FL et al Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp in roots, stems and leaves predominantly of Gramineae. **Biology and Fertility of Soils** v21 p197-200, 1996
- PÁDUA VLM et al Effect of endophytic bacterial indole-acetic acid (IAA) on rice development. on line [Citado: 31 de octubre, 2001] Disponible en internet: <www.ag.auburn.edu/argentina/pdfmanuscripts/padua.pdf>, 2001
- REINHOLD-HUREK B; HUREK T Reassessment of the taxonomic structure of the diazotrophic genus *Azoarcus* sensu lato and description of three new genera and new species, *Azovibrio restrictus* gen nov, sp nov, *Azospira oryzae* gen nov, sp nov, and *Azonexus fungiphilus* gen nov, sp nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** v50 p649-659, 2000
- VERMEIREN H et al Colonization and nifH expression on rice roots by *Alcaligenes faecalis* A15. In: MALIK KA; LADHA JK (Eds) **Nitrogen fixation with non-legumes** Dordrecht (Netherlands): Kluwer Academic Publishers, 1998 p287-305