

**DESARROLLO DE INOCULANTES A BASE DE BACTERIAS
FIJADORAS DE NITRÓGENO EN ARROZ. LIA 009**

Carlos Labandera^{1/}, Karina Punschke^{1/}, Mariana Carlomagno^{1/}

ANTECEDENTES

En Uruguay el arroz se cultiva generalmente en rotación con pasturas; sin embargo, es común el uso de fertilizantes nitrogenados. El objetivo de este proyecto es contribuir a la sostenibilidad del cultivo reduciendo la aplicación de nitrógeno químico, a través del estudio del potencial de promoción del crecimiento de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno (N).

Estas bacterias colonizan el interior de las raíces y en algunos casos se dispersan sistémicamente en la planta sin formar estructuras especializadas. Algunas pueden transmitirse en el grano. Además de la fijación biológica de N (FBN), existen otros mecanismos implicados en la promoción de crecimiento: producción de fitohormonas, control biológico, etc.

(Baldani, J.I. et al, 1997 y Mirza, M.S. et al, 2000).

La concentración de estas bacterias en los tejidos de la planta, el grado de colonización y su funcionamiento están relacionados con: el genotipo de la planta, el tejido vegetal, el estadio fenológico del cultivo, el desarrollo radical, el flujo de fotosintatos hacia la raíz y el marco agronómico fundamentalmente en lo que refiere a variedades, condiciones de siembra y uso de fertilizantes (Canzani, F. et al, 1998).

En varios ensayos de inoculación de arroz se demostró que los fijadores de N confirmados como endófitos promueven significativamente su crecimiento, como se muestra en el siguiente cuadro:

Bacteria	Condiciones / Mecanismo de promoción
- <i>Azospirillum brasilense</i> <i>A. irakense</i>	en campo / aumento en el crecimiento radical, en compuestos nitrogenados y en rendimiento (4; 5; 6).
- <i>Azoarcus</i> BH72	condiciones controladas / aumento en peso seco y compuestos con N, por FBN
- <i>Herbaspirillum seropedicae</i> <i>Burkholderia brasilense</i>	condiciones controladas / aumento del peso fresco de raíz y parte aérea en 50% por FBN y producción de hormonas (7; 8; 1; 9; 2)
-presuntos <i>Azospirillum</i> y otros fijadores de N de El Paso 144	condiciones controladas / incremento significativo en el peso de las plantas (10,11)

RESULTADOS

1. Cuantificación y aislamiento de bacterias fijadoras de N endófitas.

Se recolectaron plantas en estadio vegetativo de El Paso 144 e INIA Tacuarí, de chacras comerciales y parcelas experimentales de INIA (zafras 2000/2001 y 2001/2002). Se desinfectaron tallos y hojas, se maceraron y se sembraron los medios de cultivo para aislar fijadores de N: NFb

^{1/} Depto. Microbiología de Suelos - MGAP

para *Azospirillum* spp., *Herbaspirillum* spp. y *Azoarcus* spp., JMV para *Burkholderia brasilense*, Rennie para *Bacillus* spp., y LG modificado para bacterias aerobias (Dobereiner, J. et al, 1995).

- Todas las muestras El Paso y 69% de las Tacuarí presentaron concentraciones de endófitas fijadoras de N mayores a 10⁵ células/g de tejido para los medios NFb y JMV. Estos resultados apoyan trabajos previos de nuestro Departamento y sugieren que estas diferencias podrían

deberse a las distintas capacidades de las variedades de asociarse a estas bacterias (Canzani, F. et al, 1998).

2. Caracterización

Promoción del Crecimiento en cámara iluminada

Se realizaron ensayos de promoción en condiciones controladas con y sin N mineral

(Figura 1). Se consideró aislamiento promotor aquel que produjo un incremento mayor al 20% de la materia seca de raíz y/o parte aérea, respecto al testigo sin inocular. El Cuadro 1 muestra un resumen de los resultados de estos ensayos.

Cuadro 1. Promoción de crecimiento en arroz inoculado con diferentes aislamientos de bacterias endófitas, en condiciones controladas. Se incluyen solo aislamientos c/ promoción significativa^(a).

Código del Aislamiento ^(b)	Promoción		Código del aislamiento	Promoción	
	El Paso 144	INIA Tacuarí		El Paso 144	INIA Tacuarí
2N	(-)	+	31L	+	+
38N	(-)	++*	59L	(-)	+
46N	+	+	59 1L	(-)	+
56N	+	+	59 2L	+	+
70N	+	+	60L	+	+
			66 aL ^c	+	(-)
			66 bL	+	+
23J	(-)	+	67L	+	+
82 2J	+	+	69 a1L ^c	+	(-)
			72 bL	+	+
53R	(-)	++*	75L ^c	+	+
73R	+	++*	76 cL	+	+
81R	+	++*	82 aL ^c	(-)	+
			82 bL	+	+
			83 aL	++*	++*

^(a) (-) aislamiento no promotor; + aislamiento con promoción del 20 al 100%; ++ aislamiento con promoción de 100% a 272%; * promoción significativa (LSD, $p < 0.05$) ^(b) N: NFB; J: JMV; R: Rennie; L: LGm. ^(c) aislamiento con efecto promotor en presencia de N (KNO_3 , 0.05%).



Figura 1. Ensayo de promoción del crecimiento en cámara de crecimiento, 45 días de sembrado.

- De 257 cepas, 50 confirmaron la promoción; de éstas, 25 mostraron niveles de promoción significativos (Cuadro 1), 5 de las cuales aumentaron la materia seca en más del 100% en Tacuarí (Cuadro 1).

- De las 25 cepas promotoras, 15 (60%) se aislaron en el medio LGm sin N en condiciones aerobias (Cuadro 1).

- De las 25 cepas con promoción significativa 21 (84%) tuvieron este efecto en Tacuarí, 11 (44%) lo hizo en El Paso y 7 cepas (28%) promovieron en ambas variedades (Cuadro 1).

- De las 25 cepas con promoción significativa, 21 (84%) lo hicieron en ausencia de N combinado

Promoción del Crecimiento en invernáculo

Se seleccionaron 4 aislamientos con promoción significativa en condiciones controladas en ausencia de N mineral (56aN 82J2, 81R, 60L), y se probaron en ambas variedades en invernáculo utilizando 2 cepas de referencia y un testigo sin inocular. Se utilizó suelo de la Unidad Experimental Paso de la Laguna de INIA, Departamento de Treinta y Tres, con pH (en H₂O) 5.1, materia orgánica 3.7%, y nivel de fósforo corregido con el agregado de superfosfato triple. El diseño fue completamente al azar con 5 repeticiones. El ensayo se cosechó a inicio de floración (110 días).

- Hubo un efecto estimulador de la inoculación sobre el sistema radicular en ambas variedades.

- Hubo una tendencia a una mayor producción de materia seca en los tratamientos inoculados en Tacuarí.

- Las plantas Tacuarí inoculadas mostraron mayor altura respecto al testigo a los 50 días de sembradas.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Existe un potencial de respuesta a la inoculación con bacterias endófitas fijadoras de N en arroz en cámara de crecimiento e invernáculo, tanto en parte aérea como raíz.

Este potencial de respuesta se asocia a la variedad y a la fertilización nitrogenada del cultivo. Los resultados más significativos se asocian con Tacuarí, y su mayor expresión se manifiesta en ausencia de N combinado.

Es muy significativo el aislamiento de bacterias endófitas fijadoras de N en condiciones aerobias.

Los resultados muestran que existe un potencial de manejo de la expresión de los

endófitos del arroz en relación al marco agronómico.

LITERATURA CITADA

1. Baldani JI, Caruso L, Baldani VLD, Goi SR and Döbereiner J (1997) Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biol Biochem* 29: 911-922

2. Mirza MS, Rasul G, Mehnaz S et al (2000) Beneficial effects of inoculated nitrogen-fixing bacteria on rice. In: *The quest for nitrogen fixation in rice* (Ladha JK and Reddy PM Eds) IRRI Pp: 191-204

3. Canzani F, Vitola G, Dutto P y Labandera C (1998) Cuantificación y aislamiento de microorganismos fijadores de nitrógeno en arroz. En "Arroz. Resultados experimentales 1997-1998" INIA Treinta y Tres Actividades de difusión N° 166.

4. Okon Y and Vanderleyden J (1997) Root-associated Azospirillum species can stimulate plants. *ASM News* Vol 63, 7 Pp:366-370

5. Yanni YG, Rizk RY, Corich V et al (1997) Natural endophytic association between *R leguminosarum* bv *trifolii* and rice, assessment of its potential to promote rice growth. *Plant and Soil* 194: 99-114

6. Dazzo FB, Yanni YG, Rizk R et al (2000) Progress in multinational collaborative studies on the beneficial association between *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* and rice. In: *The quest for nitrogen fixation in rice*, (Ladha JK and Reddy PM Eds) IRRI Pp: 167-189

7. Pádua VLM, Masuda HP, Alves HM et al (2001) Effect of endophytic bacterial indoleacetic acid (IAA) on rice development. on line [Citado: 31 de octubre, 2001] Disponible en internet: <www.ag.auburn.edu/argentina/pdfmanuscripts/padua.pdf>

8. Baldani VLD, Olivares FL and Döbereiner J (1995) Selection of *Herbaspirillum* spp strains associated with rice seedlings amended with ¹⁵N-labeled fertiliser. In: *International Symposium on Sustainable*

Agriculture for the Tropics: The role of biological nitrogen fixation (Boddey RM and de Resende AS Eds) Rio de Janeiro: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Pp: 202-203

9. Baldani VLD, Baldani JI, Döbereiner J (2000) Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. *Biology and Fertility of Soils* 30: (5-6) 485- 491

10. Dutto P y Labandera C (1999) Informe final de actividades Proyecto "Uso de bacterias rizosféricas promotoras del

crecimiento de plantas de interés agronómico"

11. Vitola G (2001) Aislamiento y caracterización de endófitos de plantas de arroz con énfasis en *Azospirillum* Trabajo Especial II Licenciatura en Bioquímica Facultad de Ciencias

12. Döbereiner J, Baldani VL, Baldani I (1995) Como isolar e identificar bacterias diazotróficas de plantas nao-leguminosas EMBRAPA-SPI Brasilia-DF