

NUEVAS HERRAMIENTAS PARA ESTUDIAR LA DIVERSIDAD BACTERIANA DEL SUELO E IDENTIFICAR MICROORGANISMOS DE INTERÉS AGRÍCOLA

María Teresa Federici¹, Natalia Bajsa², Paula Lagurara², Marco Dalla Rizza¹

¹ Unidad de Biotecnología. INIA Las Brujas

² Laboratorio de Ecología Microbiana, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE)

INTRODUCCIÓN

El avance en el conocimiento de los ecosistemas microbianos a la par del desarrollo de nuevas herramientas, como las técnicas de secuenciación masiva, permite un conocimiento más profundo de los grupos de microorganismos que habitan el suelo en asociación con las plantas. Esta relación entre conocimiento y tecnología ha permitido identificar microorganismos no cultivables en medios sintéticos, y por tanto nuevos indicadores microbianos sobre el uso del suelo y la salud de las plantas en el marco de una agricultura sustentable. Este trabajo representa una apuesta importante de INIA en el uso de nuevas herramientas biotecnológicas que den respuesta a uno de los principales y más complejos sistemas de estudio: la variación de la microbiota asociada al suelo y a los cultivos.

Indicadores microbianos de calidad del suelo

Los microorganismos que habitan el suelo juegan un rol clave en el funcionamiento de los ecosistemas debido a que llevan a cabo procesos importantes, como la descomposición de la materia orgánica y el ciclado de los nutrientes. Por su parte, los sistemas agrícolas, las especies de plantas y árboles, el pH, los tipos de suelo, la labranza y la rotación de cultivos ejercen un efecto directo sobre la estructura de las comunidades microbianas y por tanto las funciones que estas cumplen. Debido a esto, es importante considerar aquellas especies de microorganismos con funciones clave en los agroecosistemas, no sólo como indicadores de la calidad del suelo, sino también de la salud de los cultivos. Desde este punto de vista, se pasa a observar el suelo como un sistema complejo donde se dan procesos físico-químicos y biológicos importantes para el crecimiento de las plantas.

La rizósfera: “el segundo genoma de la planta”

Las raíces de las plantas secretan metabolitos y azúcares que favorecen el crecimiento de los microorganismos que habitan la delgada capa de suelo que las recubre.

Esta zona del suelo que recibe las secreciones de la raíz, es conocida como rizósfera y puede contener hasta 10^{11} microorganismos por gramo, representando más de 30.000 especies. La información genética de esta comunidad microbiana de suelo, estrechamente asociada a la raíz, es mucho mayor que la de la propia planta y se le conoce comúnmente como “segundo genoma de la planta”.

La metagenómica permite determinar una diversidad microbiana mucho mayor que las técnicas tradicionales de cultivo de microorganismos. Recientemente se ha definido el término metagenómica como la aplicación de técnicas modernas de análisis del ADN de las comunidades microbianas presente en el ambiente, evitando de esta forma el aislamiento individual de los microorganismos y permitiendo además estudiar aquellos que no son cultivables.

Para ilustrar el alcance del empleo de la metagenómica se estudió la diversidad bacteriana en el suelo y la rizósfera de maíz con los siguientes objetivos:

1 - Identificar grupos de microorganismos de potencial utilización en la agricultura o como indicadores de actividad agrícola.

2 - Caracterizar la diversidad microbiana en la rizósfera de maíz durante las distintas fases de su crecimiento (elongación, floración y madurez).

ENSAYO EXPERIMENTAL

En enero de 2012 se instaló un ensayo con maíz en un predio experimental de INIA Las Brujas (Figura 1). Antes de la siembra se tomaron muestras de suelo de uso agrícola dentro del ensayo, así como de áreas adyacentes (con vegetación natural). Se sembraron dos materiales que se comercializan en Uruguay: DK699MGRR y DKfeedRR2.

El primero presenta resistencia a insectos lepidópteros y tolerancia al herbicida glifosato, mientras que el segundo sólo presenta tolerancia al herbicida. Luego, durante el ciclo del maíz, se tomaron muestras de rizósfera en las distintas fases de crecimiento de las plantas (elongación, floración y madurez). Todas las muestras fueron sometidas al proceso de extracción del ADN total por el cual se obtiene el ADN de todos los microorganismos presentes en la rizósfera o en el suelo. Posteriormente, fue determinada la composición de microorganismos de cada muestra a través de dos abordajes moleculares distintos, pirosecuenciación y DGGE (Figura 2).



Figura 1 - Ensayo sembrado con maíz (DK699MGRR y DKfeedRR2). Este ensayo se instaló en un predio experimental ubicado en INIA Las Brujas. Se tomaron en éste muestras de suelo (antes de la siembra) y de la rizósfera del maíz en las distintas fases de crecimiento.

IDENTIFICACIÓN DE GRUPOS DE MICROORGANISMOS DE POTENCIAL UTILIZACIÓN EN LA AGRICULTURA O COMO INDICADORES DE ACTIVIDAD AGRÍCOLA

Mediante el primer abordaje (pirosecuenciación), se identificaron los principales grupos de microorganismos presentes en los distintos tipos de muestras. Estos grupos microbianos predominantes podrían representar potenciales indicadores microbiológicos que se deberían validar para distintos tipos de suelos y sistemas agrícolas.

Grupos de microorganismos predominantes en la rizósfera del maíz

En la rizósfera se destacan los géneros *Skermanella* (filogenéticamente relacionado a *Azospirillum* y *Rhodocista*) y *Opitutus* (del filo Verrucomicrobia, encontrado inicialmente en suelos de arrozales) así como miembros del orden Nitrospirales (Nitrospirae) y del filo Gemmatimonadetes (recientemente descrito y hasta ahora, con un único tipo de microorganismo cultivable conocido).

Grupos de microorganismos predominantes en suelo agrícola y suelo con vegetación natural

Por su parte, el género *Bradyrhizobium* se observó en mayor proporción en las muestras correspondientes a suelos del ensayo antes de la siembra. Este género se compone de bacterias Gram negativas que, al igual que *Rhizobium*, posee muchas especies fijadoras de nitrógeno pero de crecimiento mucho más lento. La abundancia de *Bradyrhizobium* en estos tipos de suelo podría relacionarse con el manejo agrícola y la historia del cultivo del predio experimental.

Contrariamente, en las muestras de suelo con vegetación natural predominaron microorganismos de la familia Chthoniobacteraceae (Verrucomicrobia). Este filo, Verrucomicrobia, incluye muy pocos microorganismos cultivables y sus integrantes son sensibles al contenido de humedad del suelo (Figura 3).

Se identificaron también en este estudio algunos grupos taxonómicos que pueden ser de interés agrícola para la promoción del crecimiento vegetal a través del control biológico de plagas agrícolas, la supresión de enfermedades y la fijación de nitrógeno. Sin embargo, se encontró un 0,8% de bacterias no identificadas en las bases de datos (455 secuencias de ADN) que podrían representar nuevos microorganismos.

CARACTERIZACIÓN DE LA DIVERSIDAD MICROBIANA EN LA RIZÓSFERA DURANTE LAS DISTINTAS FASES DE CRECIMIENTO DEL MAÍZ

Mediante el segundo abordaje (DGGE), se observó que las diferentes muestras de rizósfera (maíz DK699MGRR) se agruparon de acuerdo al estadio de desarrollo fenológico del cultivo (elongación, floración y madurez), evidenciando una composición de bacterias característica para cada estadio (Figura 4). Esta composición podría deberse a que la producción y difusión de los exudados de la raíz varía con el desarrollo del cultivo y por tanto, favorece selectivamente a microorganismos más adaptados para cada fase.

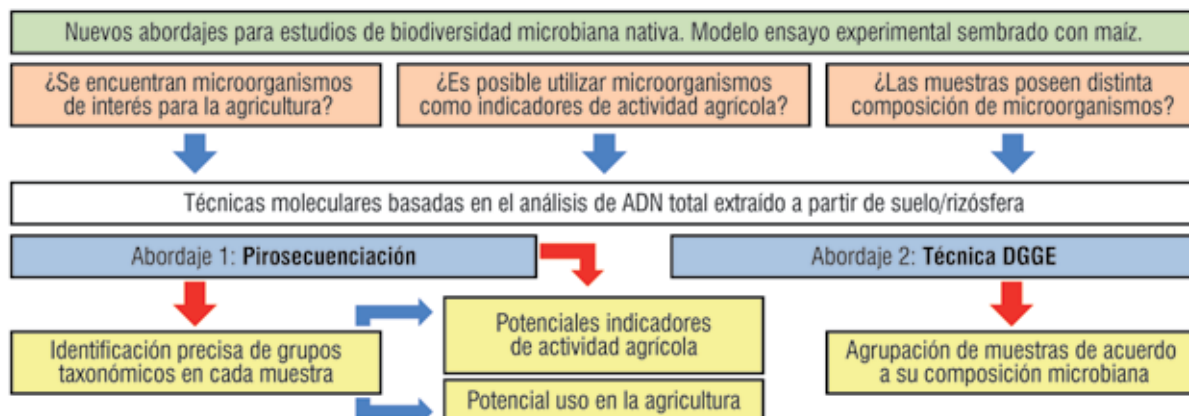


Figura 2 - Técnicas utilizadas para el estudio de la diversidad microbiana. Preguntas, abordajes metodológicos y resultados a obtener.

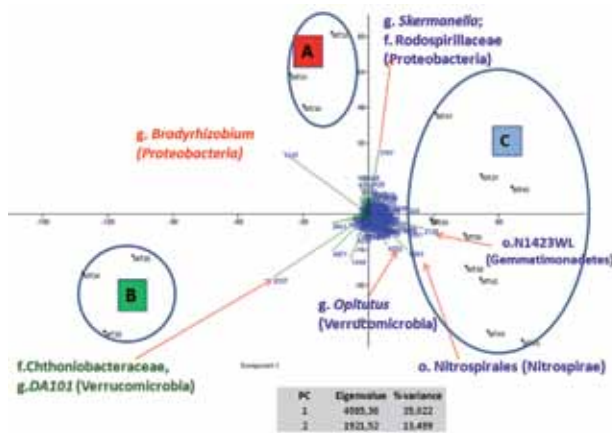


Figura 3 - Análisis de Componentes Principales (software PAST, índice Bray Curtis). Las distintas muestras se discriminan de acuerdo con la composición de los grupos taxonómicos presentes en los tipos de suelo analizados. **A:** suelo del ensayo antes de la siembra; **B:** suelo con vegetación natural; **C:** rizósfera de maíz en elongación y floración.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Se determinaron grupos bacterianos específicos que predominaron en las muestras de suelo antes de la siembra, suelo con vegetación natural y rizósfera. Estas técnicas permiten la identificación de grupos taxonómicos indicadores que pueden validarse para discriminar diferentes sistemas de producción o detectar perturbaciones en los agroecosistemas.

Se observó un cambio en la estructura y dinámica de las comunidades microbianas asociadas a la rizósfera en los estadios de elongación, floración y madurez. Estas comunidades podrían ser claves en la promoción del crecimiento de la planta o en la protección contra patógenos. Los abordajes presentados en este trabajo pueden utilizarse para determinar posibles alteraciones de la comunidad bacteriana del suelo bajo distintos manejos agrícolas, aplicación de

insecticidas o introducción de agentes de control biológico.

Con estas herramientas también es posible estudiar el efecto de las plantas transgénicas sobre la comunidad bacteriana de la rizósfera, por lo que están comenzando a utilizarse en estudios de bioseguridad relacionados a la introducción y uso de cultivos genéticamente modificados.

Este estudio marcó una línea de base para una caracterización más profunda de los cambios en la composición de las comunidades microbianas de la rizósfera en plantas cultivadas.

REFERENCIAS

- Acosta- Martínez V, Dowd S, Sun Y, Allen V. (2008). Tag- encoded pyrosequencing analysis of bacterial diversity in a single soil type as affected by management and land use. *Soil Biol. Biochem* 40: 2762- 2770
- Baumgarte, S. y Tebbe, C.C. (2005) Field studies on the environmental fate of the Cry1Ab Bt-toxin produced by transgenic maize (MON810) and its effect on bacterial communities in the maize rhizosphere *Molecular Ecology* 14,2539-2551,
- Berendsen, R.L., Pieterse C.M.J. and Bakker, P.A.H.M. (2012) "The rhizosphere microbiome and plant health" *Trends in Plant Science*, vol. 17, n° 8
- Dohrmann, A.B., Küting, M., Jünemann, S., Jaenicke, S., Schlüter, A. y Tebbe, C.C. (2012) Importance of rare taxa for bacterial diversity in the rhizosphere of Bt- and conventional maize varieties. *The ISME Journal* 1-13
- El-kersh, T.A., Al-sheikh, Y.A., Al-akeel, R.A. y Alsayed, A.A. (2012). Isolation and characterization of native *Bacillus thuringiensis* isolates from Saudi Arabia. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 11(8), pp. 1924-1938
- Figueroa, ELM, Guerrero, LD., Rosa SM., Simonetti L, Duval, M.E. (2012). Bacterial Indicator of Agricultural Management for Soil under No-Till Crop Production *PLoS ONE* 7(11): e51075. doi: 10.1371/journal.pone.0051075
- Mendes, R., Kruijt M., de Bruijn I., Dekkers E., van der Voort M., Shneider J.H.M et al (2011) Deciphering the rhizosphere microbiome for disease -suppressive bacteria. *Science* 332, 1097- 1100
- Travers, S.R., Martin, P.A.W. y Reichelderfer, C.F. (1987). Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* ssp. *Applied and environmental microbiology*. 53(6), p. 1263-1266.
- Yin C., Jones K.L., Peterson D.E., Garrett K.A., Hulbert S.H., et al. (2010). Members of soil bacterial communities sensitive to tillage and crop rotation. *Soil Biol Biochem* 42: 2111- 2118

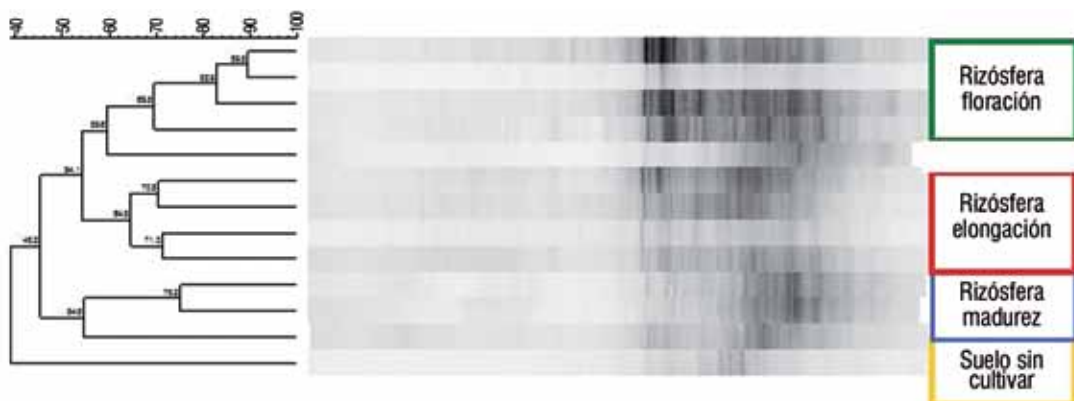


Figura 4 - Patrones de bandas obtenidos mediante la técnica DGGE (electroforesis en gel con gradiente desnaturante, sigla en inglés). Las muestras se agrupan de acuerdo a su composición de especies bacterianas característica para cada estadio del maíz (DK699MGR).