

CARACTERIZACIÓN DE LA COLECCIÓN NACIONAL DE CEPAS DE RIZOBIOS: MULTIFUNCIONALIDAD

Barlocco, C^{1*} Cerecetto, V¹ Mattos, N¹, Mortalena, M¹ Mayans, M² Beyhaut, E¹ Altier, N¹

¹Laboratorio de Microbiología de Suelos, Plataforma Bioinsumos, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria.

²Dirección General de Servicios Agrícolas, Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, Uruguay.

* E-mail: cbarlocco@inia.org.uy

Palabras claves: Colección Nacional de Cepas de Rizobios, WFCC, Convenio INIA-MGAP

Introducción

En la década del sesenta, el Estado uruguayo creó la Colección Nacional de Cepas de Rizobios. Inicialmente en el ámbito del Plan Agropecuario, y transferida luego al Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP), fue concebida como una colección abierta y sin fines de lucro. Se integra con cepas de referencia de Instituciones Internacionales y con aislamientos provenientes de diversos proyectos de investigación. Esta colección constituyó, por muchos años, la base de los Programas de Selección de Cepas para leguminosas de interés agronómico, de donde surgieron las recomendaciones oficiales de cepas para la Industria Nacional de Inoculantes. En el 2012 se firmó un convenio entre el MGAP y el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), donde se establece que el MGAP otorga a INIA la curaduría de la Colección Nacional de Cepas de Rizobios y la tarea de suministrar las cepas oficialmente recomendadas por el MGAP a las industrias fabricantes de inoculantes y a otras instituciones. Por su parte, la Dirección General de Servicios Agrícolas (DGSSAA) del MGAP conserva las potestades que la ley le confiere de fiscalizar el registro y el control de calidad de los inoculantes comercializados en el país. En una decisión que potencia un área de conocimiento relevante para el uso sustentable del suelo y para el ambiente, se consolida una alianza basada en las complementariedades interinstitucionales. En este marco, el Laboratorio de Microbiología de Suelos de INIA, tiene el cometido de mantener y valorizar la Colección Nacional de Cepas de Rizobios, e identificar cepas eficientes para nuevas leguminosas de interés agronómico. INIA asimismo, lleva a cabo investigación sobre microorganismos benéficos para la nutrición y protección de cultivos y forrajes, que posibiliten sistemas de producción más sustentables.

Puesta en valor

La Colección Nacional de Cepas de Rizobios está identificada con el código de Uruguay “U” y está constituida con más de 300 cepas, de las cuales 20 son cepas comerciales que se recomiendan a la industria de inoculantes previa evaluación *in planta* de las características simbióticas originales (cuadro 1). A partir del 2012, se comenzó con la evaluación de viabilidad en medio YEM y pureza en medio AS y TSA de toda la Colección. Las cepas evaluadas positivamente, fueron conservadas en tubos conteniendo medio YEM-agar inclinado a 4°C (4 réplicas) y en criotubos con glicerol al 20% a -20 y -80°C (4 réplicas). A su vez, las 20 cepas comerciales también se almacenaron liofilizadas a 4°C (2 réplicas).

Huésped	Código de las cepas	Especie de rizobio	Otras designaciones
<i>Medicago sativa</i>	U-143	<i>Sinorhizobium melloti</i>	MCH3
<i>Trifolium pratense</i> , <i>T. repens</i> , <i>T. subterraneum</i> , <i>T. incarnatum</i>	U-204	<i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>bv.</i> <i>trifolii</i>	U-28
<i>Trifolium alexandrinum</i>	U-206	<i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>bv.</i> <i>trifolii</i>	NA 120
<i>Trifolium vericulosum</i>	U-276	<i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>bv.</i> <i>trifolii</i>	TAC 8
<i>Trifolium fragiferum</i>	U-262	<i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>bv.</i> <i>trifolii</i>	SEMIA 235
<i>Trifolium balansae</i>	U-2082	<i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>bv.</i> <i>trifolii</i>	T Bal
<i>Ornithopus compressus</i> y <i>O. sativus</i>	U-612 + U620	<i>Bradyrhizobium</i> <i>sp.</i>	OR 1 + CAL 22
<i>Vicia sativa</i>	U-331	<i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>bv.</i> <i>viceae</i>	INTA D 53
<i>Lotononis bainesii</i> Baker	U-1205	<i>Methylobacterium</i> <i>sp.</i>	XCT 16
<i>Lotus corniculatus</i> y <i>L. glaber</i>	U-510	<i>Mesorhizobium huakuii</i>	U-226
<i>Lotus subbiflorus</i>	U-531	<i>Mesorhizobium loti</i>	NC3
<i>Lotus uliginosus</i> Maku	U-1401	<i>Bradyrhizobium loti</i>	NZP 2309
<i>Pisum sativum</i>	U-315	<i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>bv.</i> <i>viceae</i>	SEMIA 335
<i>Phaseolus vulgaris</i>	U-808 + U-809	<i>Rhizobium tropici</i>	SEMIA 4077 + SEMIA 4080
<i>Glycine max</i>	U-1301 + U-1302	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	SEMIA 587 + SEMIA 5019
<i>Trifolium resupinatum</i>	U-223	<i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>bv.</i> <i>trifolii</i>	NA 146
<i>Vicia villosa</i>	U-344	<i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>bv.</i> <i>viceae</i>	WISM 1131

Cuadro 1.- Lista de las 20 cepas comerciales pertenecientes a la Colección Nacional de Cepas de Rizobios. Se indica para cada cepa; el huésped, el código, la especie y otra designación en colecciones internacionales.

Teniendo en cuenta la importancia de las 20 cepas comerciales para la industria de inoculantes, se continuó con la caracterización, evaluando la eficiencia simbiótica *in planta* y realizando el perfil genético por BOX-PCR (foto 1).

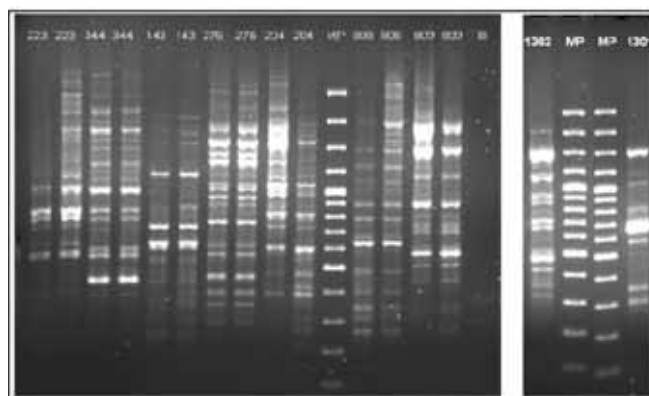


Foto 1.- Perfil genético obtenido por BOX-PCR de las cepas U-223, U-344, U-143, U-276, U-204, U-808, U-809, U-1301, U-1302. B: blanco. MP: marcador de peso molecular (100 pb, Fermentas)

A partir del año 2014, INIA asumió nuevos desafíos, logrando ingresar las 20 cepas comerciales en la base de datos de la World Federation for Culture Collections (WFCC), destacándose que es la primera Colección del Uruguay en ser indexada (foto 2). A su vez, se finalizó con la presentación de la documentación correspondiente para el guardado de las 20 cepas comerciales en el Banco de Recursos genético Microbianos de Chile (CChRGM), logrando a mediano plazo un respaldo de las cepas en un banco con permiso de Autoridad Internacional de Depósito (IDA).

Latin America	Cuba	BAMFA	Acronym:	CNCRU
			Full Name:	Colección Nacional de Cepas de Rizobium
North America	Mexico	CM-CNRG	WDCM Number:	1082
	USA	FGSC, IMC, UCDPST	Country:	Uruguay
			Contact person:	Claudia Barroco
			Email of Contact:	cbarroco@inia.org.uy
			Director:	Elena Seydoux
South America	Argentina	INM, DMi	Number of Species:	Bacterium Total 10 10
	Brazil	Flora CIQOC, IAL	Number of Strains:	Bacterium Total 20 20
	Uruguay	CNCRU	Online Homepage Updated:	Registration Date: 2014-12-19
	Venezuela	CVCA	Information Updated Date:	2014-12-19
			Online Catalogue Updated:	Bacterium Total 20 20
			Home Page:	http://gen.wdcf.net/1082

Foto 2.- Las 20 cepas comerciales de la Colección Nacional de Cepas de Rizobios del Uruguay (CNCRU) indexada en la World Federation for Culture Collections (WFCC).

Actualmente, la Colección Nacional de Cepas de Rizobios está siendo caracterizada por la capacidad de mineralizar/solubilizar fósforo. Primero se realizaron ensayos cualitativos en medio sólido, donde se evaluó la capacidad de las cepas de mineralizar fitato de sodio y de solubilizar FePO_4 , AlPO_4 y $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ observando la producción o no de halos. A su vez, se verificó la capacidad de mantener estos fenotipos luego de 3 repiques sucesivos. Las cepas halo positivas fueron seleccionadas para realizar ensayos cuantitativos en medio sólido, donde se midió el diámetro del halo con respecto al diámetro del inóculo a través del tiempo. Por último se están realizando ensayos cuantitativos en medio líquido, donde se mide la concentración de fosfato solubilizado/mineralizado a través del tiempo por las cepas, de acuerdo al método del vanado-molibdato.

Según los ensayos cualitativos, el 37% de las cepas de la Colección fueron capaces de mineralizar fitato de sodio incluyendo 6 cepas comerciales (foto 3), 8 cepas presentaron capacidad solubilizadora de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ y ninguna cepa fue capaz de solubilizar FePO_4 y AlPO_4 .

Hasta la fecha, las cepas evaluadas cuantitativamente en fitato de sodio más auspiciosas son U331, U664, U801/U802 y U1302 (foto 4), aunque aún hacen falta realizar ensayos cuantitativos en medio líquido. Las cepas más propicias serán utilizadas para realizar bioensayos en condiciones controladas.

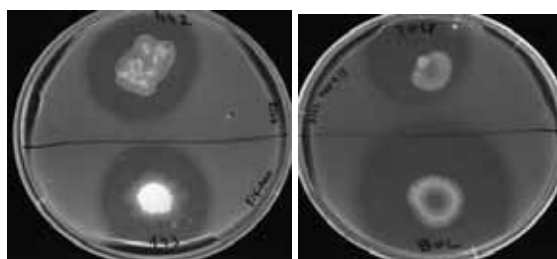


Foto 3.- Halo de mineralización de cepas de rizobios a los 28 días de inoculación en medio sólido Angle + fitato de sodio.

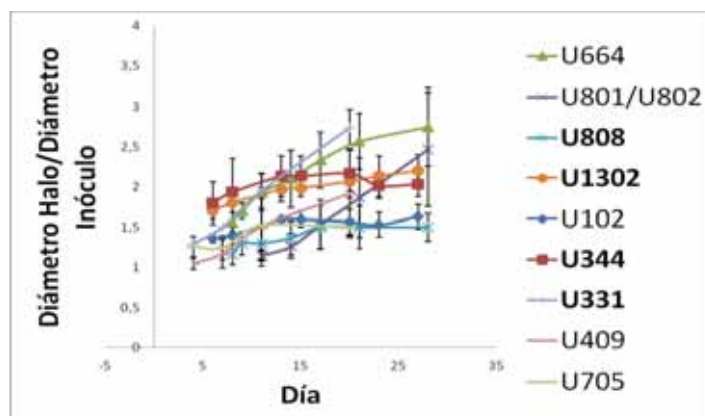


Foto 4.- Relación entre el diámetro del halo y el diámetro del inóculo a través del tiempo de las cepas de rizobios que mineralizaron fitato de sodio. Las cepas en negrita son cepas comerciales.

Conclusiones

Los avances en la caracterización y puesta en valor alientan a continuar con el estudio de la Colección Nacional de Cepas de Rizobios. La conservación de recursos genéticos microbianos representa una importante oportunidad para generar tecnologías de innovación para el manejo de la fertilización en base a microorganismos y la conservación del recurso suelo.

Bibliografía

Altier N, Beyhaut E, Pérez CA. 2013. Root Nodule and Rhizosphere Bacteria for Forage Legume Growth Promotion and Disease Management. En: Maheshwari DK, Saraf M, Aeron A. (Eds.). Bacteria in Agrobiolgy: Crop Productivity. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. p. 167-184.

Lindström K, Murwira M, Willems A, Altier N. 2010. The biodiversity of beneficial microbehost mutualism: the case of rhizobial. *Research in Microbiology*, 161:453-463.

Real D, Labandera CA, Howieson JG. 2005. Performance of temperate and subtropical forage legumes when over-seeding native pastures in the basaltic region of Uruguay. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 45:279-287.