

IDENTIFICACION SEROLOGICA DE RAZAS DE *Bradyrhizobium japonicum* NATURALIZADAS EN LA REGION PAMPEANA NORTE

N S GONZALEZ¹, M G PICON², Y E ANDREOLI², R M ZABLOTOWICZ³, C A NAVARRO, R MARTINEZ LALIS⁴

¹INTA Balcarce y ²FCA UN Mar del Plata. cc 276 (7620) Balcarce Argentina. ³Allied Co. USA. ⁴Nitragin Argentina

SEROLOGICAL IDENTIFICATION OF NATURALIZED *Bradyrhizobium japonicum* STRAINS IN THE NORTHERN PAMPEAN REGION, ARGENTINA.

In 1984 fifteen commercial soybean crops located in the northern Pampean Region, which had not been inoculated that season, were sampled to determine the spontaneous nodulation status; nodules were collected for serological identification in order to assess the prevalent serogroups of *Bradyrhizobium japonicum* naturalized in the soybean belt. *B. japonicum* isolation was performed from fifty random nodules per site. The isolates were considered to be *B. japonicum* on the basis of growth rate, colony aspect and negative growth on Luria Agar. All the 165 isolates thus obtained were tested against six antisera, representing some of the most widespread serogroups in the USA soybean belt. Those were anti C1, C3, 122, 123, 101 and 110. Only 28.5 % of the isolates were identified; C3, 101, C1 and 110 were present in nine, eight, five, four and one of the fifteen sampled sites respectively. Strains of serogroup 122 were not detected. Strains responding to antiserum 101 predominated, being present in 11.51 % of the serotyped isolates. They were followed by C3, C1, 110 and 123, with 8.48 %, 5.45 %, 2.42 % and 0.6 % respectively. The naturalized population of *B. japonicum* estimated on the basis of plant nodulation seemed to be abundant.

Key words: *Bradyrhizobium japonicum*, Soybean-Serological identification-Argentina-Northern Pampean Region

INTRODUCCION

La tarea de selección de cepas de *Rhizobium* para cualquier leguminosa que se cultive en una región donde la especie correspondiente del microsimbionte ya esté naturalizada constituye un verdadero desafío. Cualquier programa de selección tendrá que producir materiales que, además de ser probadamente más eficientes que los nativos en cuanto a fijación biológica de nitrógeno, también deberán superar a éstos en capacidad competitiva.

En el caso de *B. japonicum* un claro cuadro del éxito relativo de la introducción de nuevas cepas a suelos que ya albergan razas indígenas o naturalizadas lo plantean Johnson *et al.* (1965), Caldwell y Best (1970), Semu *et al.* (1979). Johnson y Means (1963) demostraron que el porcentaje de nódulos producidos por cepas de *B. japonicum*, aplicadas a las dosis de inoculación standard (alrededor de $7 \cdot 10^4$ bacterias semilla⁻¹, para los Estados Unidos) promedió sólo el 5%; el resto fue colonizado por los rizobios presentes en el suelo. En los campos de Iowa,

donde se ha cultivado soja por largo tiempo y los suelos contienen más de 10^4 células de *B. japonicum* por gramo de suelo, menos del 15 % de los nódulos formados proceden de las razas incorporadas en el inóculo, cuando éste se aplica a las dosis standard (Weaver, Frederick 1974).

En consecuencia, como primer paso de todo programa de selección es importante caracterizar las cepas naturalizadas para conocer su capacidad competitiva y confrontar con ellas los nuevos materiales, también en este sentido, antes de lanzarlos comercialmente (Amarger 1984, Bohlool, Schmidt 1973).

Hasta la fecha no se tiene conocimiento de que se haya realizado un relevamiento de las cepas de *B. japonicum* naturalizadas en la Región Pampeana Norte, principal zona productora de soja en la Argentina. Dado que en los suelos de nuestro país *B. japonicum* no existe como flora nativa y considerando que la mayor parte de los inoculantes que se utilizaron cuando se comenzó a producir soja en la Argentina se importaban de los Estados Unidos o se fabricaban en el país con cepas

eventualmente procedentes de allí, se partió del supuesto que las cepas naturalizadas podrían responder a algunos de los serogrupos más difundidos en los campos sojeros americanos.

El objetivo de este trabajo fue, por lo tanto, tratar de identificar las razas naturalizadas en base a seis de los serogrupos más difundidos en los Estados Unidos, para que la información obtenida sirva como punto de partida a cualquier programa de selección de *B. japonicum* que se desee encarar en el país.

MATERIALES Y METODOS

Durante la campaña 1983/84 se muestrearon quince cultivos comerciales de soja en las provincias de Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe, durante los estadios reproductivos R4 y R6. Los lugares de muestreo fueron seleccionados en función de las siguientes condiciones:

- Mayor cantidad posible de años con cultivo continuado de soja, con historia de inoculación preferentemente conocida.
- Sin inoculación con *B. japonicum* durante la campaña 1983/84.

En la Tabla 1 se sintetiza información sobre localización, variedades de soja cultivadas en cada lote muestreado y caracterización de los suelos de los mismos. En cada lote se muestrearon al azar quince plantas; sus nódulos fueron separados de las raíces, contados y clasificados según su ubicación en raíz principal o laterales. Al menos cincuenta nódulos por sitio, seleccionados al azar, se remitieron al Laboratorio de Microbiología y Bioquímica de Suelos de la EEA INTA Balcarce, acondicionados en frascos de plástico con tapa hermética, que contenían cloruro de calcio anhidro.

Una vez en el laboratorio, los nódulos fueron rehidratados con buffer de fosfatos 0,05 M, pH 6,8; luego fueron esterilizados

en superficie con cloruro de mercurio 0,1 % por 15 segundos y enjuagados seis veces con agua destilada estéril. De cada nódulo se efectuó un aislamiento por puntura, atravesando asépticamente el córtex nodular con una aguja de disección y efectuando luego tres estrías paralelas de aproximadamente un cm de largo en una placa de Petri cuadrada, cuadrículada, de modo que cada una de ellas albergara a nueve aislamientos. El medio utilizado fue agar-extracto de levadura-manitol adicionado con rojo congo, actidione (50 mg l⁻¹) (Vincent 1970) y penicilina (10 mg l⁻¹) (R Zablutowicz, comunicación personal). La adición de penicilina en baja concentración respondió a la necesidad de controlar en alguna medida la contaminación, aún a riesgo de excluir algunas cepas de *B. japonicum* susceptibles. Las placas fueron incubadas a 28 °C durante diez días. Para asegurar la pureza del material y controlar nuevamente la velocidad de crecimiento, una sola colonia por aislamiento, que respondiera a las características morfológicas de *B. japonicum* fue repicada a una nueva placa de agar-extracto de levadura-manitol-rojo congo. Al mismo tiempo, cada aislamiento fue sembrado en agar-Luria (gramos por litro: triptona 5; extracto de levadura 5 y NaCl 0,5), con el fin de excluir *Pseudomonas* y otras bacterias entéricas que pudieran haber sido confundidas con *B. japonicum*. Estas últimas no crecen en agar-Luria a 28 °C y durante 48 horas de incubación.

Fueron considerados *B. japonicum* aquellos aislamientos obtenidos de colonias que tardaron más de cinco días en crecer en agar-extracto de levadura-manitol-rojo congo y que coincidentemente no crecieron en agar-Luria.

Posteriormente, cada aislamiento fue cultivado en 20 ml de caldo extracto de levadura-manitol durante diez días, sin agitación y a 28°C. Al cabo de este período el cultivo fue centrifugado a 10.000 g por diez minutos y el sobrenadante fue descartado. Las células sedimentadas fueron resuspendidas y lavadas en buffer de fosfatos 0,05 M pH 6,8 y centrifugadas una vez más. Después de esta operación se las resuspendió en 1 ml de buffer de fosfatos, se las llevó a absorbancia 2 (650 nm) y se las colocó a 100°C durante una hora en baño termostático. Así preparados

TABLA 1. Localización, variedades de soja y caracterización del suelo de los lotes muestreados.

Lote	Ubicación	Variedad de soja	Análisis de suelo		
			pH	P (ppm)	MO(%)
1	Caseros, SF	Hood	5,9	19,14	2,48
2	Caseros, SF	Bragg	6,1	23,30	2,97
4	Caseros, SF	Bragg	5,9	28,70	3,24
5	Caseros, SF	Hood	5,8	39,94	2,90
6	San Lorenzo, SF	Hood	6,2	38,38	3,52
7	Gral. López, SF	Bragg	6,1	38,58	3,66
8	Gral. López, SF	Hood	6,0	27,07	3,17
9	Gral. López, SF	Essex	6,1	14,95	3,31
10	Pergamino, BA	Bragg	5,9	30,80	2,90
B1	Pergamino, BA	Essex	5,7	13,89	2,76
B2	Colón, BA	Essex	5,5	27,67	4,10
B3	Colón, BA	Mitchel	5,7	33,28	4,14
B4	Pergamino, BA	Pergamino 40	6,0	29,20	2,90
C1	Marcos Juárez, C	Bragg	6,34	2,02	2,69
C2	Marcos Juárez, C	Hood	6,1	107,05	2,90

SF : Santa Fe; BA: Buenos Aires; C: Córdoba.

los antígenos, se los conservó en refrigerador (4°C) hasta efectuar el serotipado.

Para la identificación serológica se utilizó la técnica de inmunodifusión en gel de agar (Zablutowicz, Focht 1981); las placas, una vez acondicionadas con las preparaciones de antígeno y los antisueros correspondientes, fueron incubadas por 48 horas a temperatura ambiente. Los sueros anti USDA 122, USDA 123, 61 101 AC, C1, C3 y USDA 110 fueron proporcionados por Allied Co. (Laboratorio de Siracusa).

Se efectuaron análisis de varianza (Programa SAS) sobre las variables número de nódulos totales y relación nódulos sobre raíz principal/nódulos sobre raíces laterales (NRP/NRL). Los datos se analizaron de acuerdo a un diseño completamente aleatorizado, desbalanceado, considerando a las provincias (Santa Fé, Buenos Aires y Córdoba) como tratamientos y a los diferentes sitios muestreados como repeticiones.

RESULTADOS Y DISCUSION

A través de la nodulación registrada (Tabla 2) se puede inferir que en todos los lotes muestreados hay una

población naturalizada abundante de *B. japonicum*. El número promedio de nódulos logrados en cualquiera de los sitios no se diferencia de los conseguidos por inoculación de la semilla con una dosis de $2 \cdot 10^4$ bacterias semilla⁻¹, en un suelo libre de inóculo (González *et al.* datos no publicados).

Llama la atención el marcado predominio de nódulos de raíz principal sobre los de raíces laterales registrado en los cinco sitios de la provincia de Buenos Aires. La relación NRP/NRL (Tabla 2) es significativamente mayor ($P < 0,0002$) en Buenos Aires, con una media de 0,913, que en Córdoba y Santa Fé, con medias de 0,363 y 0,303 respectivamente (Duncan, $P < 0,05$). El número total de nódulos, sin embargo, no difiere entre las tres provincias ($P < 0,428$). La naturaleza de ese predominio no es clara; no guarda relación aparente con la historia de cultivo o inoculación, pesticidas usados o fecha de siembra (datos no mostrados); tampoco se advierte una asociación clara con el cultivar de soja. El pH promedio de la localidad Buenos Aires es ligeramente inferior al resto de los sitios

TABLA 2. Número y ubicación de los nódulos en las raíces de las plantas muestreadas.

Lote	Número de nódulos		Lote	Número de nódulos	
	Total	NRP/NRL		Total	NRP/NRL
1	NRP	153	9	NRP	202
	NRL	394		NRL	494
	T	547		T	696
		0,3883			0,4089
2	NRP	241	10	NRP	384
	NRL	501		NRL	292
	T	742		T	676
		0,48			1,3151
4	NRP	96	B1	NRP	214
	NRL	917		NRL	215
	T	1013		T	429
		0,1047			0,9953
5	NRP	164	B2	NRP	211
	NRL	695		NRL	252
	T	859		T	463
		0,2360			0,8373
6	NRP	83	B3	NRP	336
	NRL	359		NRL	427
	T	442		T	763
		0,2312			0,7869
7	NRP	97	B4	NRP	267
	NRL	288		NRL	424
	T	385		T	691
		0,3368			0,6297
8	NRP	168	C1	NRP	201
		702		NRL	553
	NRL	870	0,2393	T	754
				C2	NRP
	NRL	643			0,3624
	T	876			

NRP: número de nódulos en raíz principal; NRL: número de nódulos en raíces laterales; T: Totales.

tomados en su conjunto (5,75 versus 6,05), aunque se estima que la diferencia no es de tal magnitud como para explicar la variación en localización de los nódulos. Smith y Wollum (1989) hipotetizan que la planta sería la responsable de la relación NRP/NRL. Cuando se forman suficientes nódulos en raíz principal, hecho que aparentemente no depende de la competitividad de las cepas involucradas ni de la cantidad de rizobios presentes, la planta suprime las infecciones laterales.

De los quince lotes muestreados se recuperaron 165 aislamientos que, al ser confrontados con los seis antisueros disponibles arrojaron los resultados descriptos en la Tabla 3. Solamente fue posible identificar 28,5 % de los aislamientos (Tabla 3) indicando esto que las cepas pertenecientes a los serogrupos probados no han participado mayoritariamente de los inoculantes empleados, no sobrevivieron o, si existían en el suelo, no exhibieron suficiente capacidad competitiva como para colonizar mayor proporción de nódulos. Las cepas de los serogrupos C1, C3, y 123 han sido componentes principales de los primeros inoculantes comerciales difundidos en los Estados Unidos. Las cepas USDA 110 y USDA 122, standard para los serogrupos del mismo nombre, fueron aisladas de suelos del sur de los Estados Unidos y han integrado inoculantes en una etapa posterior (Weber *et al.* 1989), de igual modo que 101. Los cinco primeros representan el 50 % de los aislamientos correspondientes a un relevamiento efectuado en 27 estados de USA en 1979 (Weber *et al.* 1989) hecho que sustenta nuestra hipótesis.

En nuestro reconocimiento el serogrupo 123 apareció en un 0,6 % de los aislamientos; es poco probable que las cepas de este serogrupo hayan estado presentes y no se hayan expresado ya que colonizan ampliamente los suelos de Iowa, Ohio, Minnesota, Wisconsin e Illinois (Zdor, Pueppke 1988) y se caracterizan por su alto poder competitivo. Se recuperaron en una gran proporción de los nódulos de soja no inoculada (Johnson, Means 1963) y aún de la inoculada con otros materiales (Damirgi *et al.* 1967; Ham *et al.* 1971). Fuhrmann y Wollum (1989) confirmaron en un estudio en condiciones controladas la marcada competitividad de las cepas del serogrupo 123. El pH de los suelos muestreados tampoco habría limitado su presencia dado que se las encuentra profusamente en un rango de pH que va de 5,8 (Dunigan *et al.* 1984) a 7,3 (Damirgi *et al.* 1967). Su ausencia no es de lamentar, ya que el serogrupo es considerado en su conjunto como de comportamiento mediocre (Caldwell, Vest 1970; Ham 1980 b; Chamber *et al.* 1983).

El serogrupo 122 tampoco fue detectado en nuestro estudio y 110 estuvo presente en 2,42 % del total de aislamientos; ambos serotipos fueron incorporados al cepario del USDA en 1969 y 1960, respectivamente e incluidos en los actuales inoculantes comerciales norteamericanos debido a su buen comportamiento en cuanto

TABLA 3. Identificación serológica de los aislamientos.

Lote	Total por sitio	Total de positivos						Total
		122	123	101	C1	110	C3	
1	12	-	-	1	-	1	-	2
2	8	-	-	-	2	1	1	4
4	11	-	-	-	-	-	-	-
5	19	-	-	1	-	-	2	3
6	12	-	-	9	3	-	-	12
7	11	-	-	1	1	1	1	4
8	12	-	-	-	-	-	1	1
9	6	-	-	-	1	-	1	2
10	12	-	-	-	-	-	4	4
B1	9	-	-	1	-	-	-	1
B2	6	-	-	1	-	-	1	2
B3	17	-	1	3	2	1	2	9
B4	13	-	-	2	-	-	-	2
C1	5	-	-	-	-	-	-	-
C2	7	-	-	-	-	-	1	1
Total	165	-	1	19	9	4	14	47
%	100	0	0,6	11,5	5,45	2,42	8,48	28,48

a competitividad y eficiencia en la FBN, ya que presentan una mayor frecuencia de genotipos Hup⁺ entre sus aislamientos, que otros serogrupos (Weber 1989). Es probable que su inclusión, relativamente reciente, en los inoculantes comerciales sea la causa de su falta de difusión en la Argentina en el 83/84.

Dentro de los aislamientos identificados, los más difundidos pertenecen a los serogrupos C3, 101 y C1 (Tabla 3). El primero y el último deben haberse diseminado a través del uso de inoculantes americanos de la primera etapa. El serogrupo 101, por su parte, participa de uno de los inoculantes usados actualmente en la Argentina. Su presencia no implica un riesgo para la eficiencia de las asociaciones simbióticas que pueda generar. En Balcarce, si bien en condiciones ecológicas y de suelos distintas a las de la región estudiada, ha manifestado muy buen comportamiento asociada a los cultivares de soja Asgrow 3127 y Williams (González *et al.*, datos no publicados).

El 71,5 % de los aislamientos sin identificar demuestra la insuficiencia de los seis antisueros probados para caracterizar exhaustivamente las cepas de *B. japonicum* naturalizadas en la Región Pampeana Norte y plantea dudas sobre cuáles fueron las vías por las que se difundieron las cepas que actualmente contiene el suelo.

AGRADECIMIENTO

* Trabajo realizado merced a un convenio efectuado entre el Laboratorio de Microbiología y Bioquímica de Suelos (Unidad integrada INTA Balcarce-FCA. UNMdP) y Allied Co. (USA).

REFERENCIAS

- Amarger N. 1984. Evaluation of competition in *Rhizobium* spp. En: Current Perspectives in Microbial Ecology. M.J. Keng and C.A. Reddy (Ed.). American Society for Microbiology. Washington DC. 300-305.
- Bohlool B B, Schmidt E L. 1973. Persistence and competition aspects of *Rhizobium japonicum* observed in soil by immunofluorescence microscopy. Soil Sci.Soc.Am. Proc. 37: 561-564.
- Caldwell B E, Best G. 1970. Effect of *Rhizobium japonicum* strains on soybean fields. Crop Sci. 10: 19-21.
- Chamber Pérez M A, Orive Echevarrieta R, Temprano Vera F J, Lavandera González C. 1983. Selección de razas de *Rhizobium japonicum* para la producción de inoculantes para soja. Eurosoya. 1: 21-25.
- Damirgi S M, Frederick L R, Anderson I C. 1967. Serogroups of *Rhizobium japonicum* in soybean nodules as affected by soil types. Agron. J. 59: 10-12.
- Dunigan E P, Bollich P K, Hutchinson R L, Hicks P M, Zaumbrecher F C, Scott S G, Mowers R P. 1984. Introduction and survival of an inoculant strain of *Rhizobium japonicum* in soil. Agron. J. 76: 63-466.
- Fuhrmann J, Wollum A G. 1989. Symbiotic interactions between soybean and competing strains of *Bradyrhizobium japonicum*. Pl. Soil. 119: 139-145.
- Ham G E. 1980b. Interactions of *Glycine max* and *Rhizobium japonicum*. En R. J. Summerfield and A.H. Bunting (Ed.). Advances in legume science. Royal Botanical Gardens, Kew, UK. pp 289-296.
- Ham G E, Frederick L R, Anderson I C. 1971. Serogroups of *Rhizobium japonicum* in soybean nodules sampled in Iowa. Agron. J. 63: 69-72.
- Johnson H W, Means U M. 1963. Serological groups of *Rhizobium japonicum* recovered from nodules of soybean (*Glycine max*) in field soils. Agron. J. 55: 269-271.
- Johnson H W, Means U M, Weber C R. 1965. Competition for nodule sites between strains of *Rhizobium japonicum* applied as inoculum and strains in the soil. Agron. J. 57: 179-185.
- Semu E, Hume D J, Corke C T. 1979. Influence of soybean inoculation and nitrogen levels on populations and serogroups of *Rhizobium japonicum* in Ontario. Can. J. Microbiol. 25: 739-745.
- Smith G B, Wollum A G. 1989. Nodulation of *Glycine max* by six *Bradyrhizobium japonicum* strains with different competitive abilities. Appl. and Environ. Microbiol. 55: 1957-1962.
- Vincent J M. 1970. A manual for the practical study of root nodule bacteria. IBP Handbook N° 15. Burgess & Son. Berkshire. 164 pp.
- Weaver R W, Frederick L R. 1974. Effect of inoculum rate on competitive nodulation of *Glycine max*. II. Field studies. Agron. J. 66: 233-236.
- Weber D F, Keyser H H, Uratsu S L. 1989. Serological distribution of *Bradyrhizobium japonicum* from US soybean production areas. Agron. J. 81: 786-789.
- Zablotowicz R M, Focht D D. 1981. Physiological characteristics of cowpea Rhizobia. Evaluation of symbiotic efficiency in *Vigna unguiculata*. Appl. and Environ. Microb. 41: 679-685.
- Zdor R P, Pueppke S G. 1988. Early infection and competition for nodulation of soybean by *Bradyrhizobium japonicum* 123 and 138. Appl. and Environ. Microbiol. 54: 1996-2002.