

# IDENTIFICACION DE *Rhizobium loti* POR INMUNODIFUSION

YE ANDREOLI, AM QUADRELLI DE ESCUDER, FS LAICH, NS GONZALEZ.

Unidad Integrada FCA (UNMP)-EEA INTA Balcarce. C.C. 276 CP 7620 Balcarce, Argentina.

## IDENTIFICATION OF *RHIZOBIUM LOTI* BY IMMUNODIFFUSION

The aim of this research was to determine the percentage of nodules occupation and the persistence of *Rhizobium loti* strain 733, in *Lotus tenuis*, against native rhizobial populations in the soil. Field trials were sown in Balcarce, Maipú and Ayacucho, (Bs. As., Argentina); in 1992, 1994 and 1995. A randomized complete block design with twelve repetitions, with and without inoculation was used. Before sowing the most probable number (MPN) of indigenous populations of rhizobia in the soil was determined. Lotus seeds were inoculated with the selected strain 733. Samplings were carried out in autumn and spring, two samplings in Balcarce and three in Maipú and Ayacucho. In the first sampling at Balcarce, all the nodules from each plot were processed as a pool. In the remaining samplings, ten nodules were selected at random for each plot to obtain pure cultures. Dilutions from pure isolations or suspensions of total nodules per sample were studied by immunodiffusion using antiserum 733. Serologic relationship reactions were classified as: total identity, partial identity and lack of identity. In Balcarce and Maipú no naturalized rhizobia were detected before sowing and the recovery of strain 733 after 18 months from inoculation was 78% and 69% respectively. In Ayacucho, with a naturalized population of  $5,7 \times 10^2$  rhizobia  $g^{-1}$  of soil, the recovery was only 13%.

**Key words:** *Rhizobium loti*- *Lotus tenuis*- Immunodiffusion

## INTRODUCCION

*Lotus tenuis* es una leguminosa forrajera que se ha adaptado y está colonizando los suelos sódicos y anegadizos de la Pampa Deprimida Argentina. Se asocia simbióticamente y en forma específica con *Rhizobium loti*. En esta región el lotus se encuentra naturalmente nodulado; sin embargo cuando es sembrado en dichos suelos la implantación es lenta y la nodulación tardía (Montes, Cauhépe 1985). Habitualmente las semillas de las leguminosas son inoculadas antes de la siembra con cepas seleccionadas de rizobios para lograr una nodulación efectiva. Un aspecto importante es la persistencia de las cepas introducidas en el suelo para mantener la nodulación de las leguminosas perennes (Dudman, Brockwell 1968).

En el Laboratorio de Microbiología, Unidad Integrada Balcarce -INTA se ha aislado la cepa de *R. loti* 733 a partir de un suelo alcalino hidromórfico de la Pampa Deprimida y se la ha seleccionado en base a criterios de eficiencia en la fijación de nitrógeno en condiciones controladas. En esta etapa del trabajo se hipotetiza que 733, cuando es inoculada a la semilla, es capaz de competir exitosamente frente a los rizobios naturalizados y de reinfestar en alta proporción en los sucesivos ciclos de nodulación de *L. tenuis*.

Ante la necesidad de diferenciar entre los rizobios presentes en el suelo antes de la siembra y aquellos introducidos mediante la inoculación de las semillas,

surge como una alternativa la utilización del test serológico de inmunodifusión en gel de agar, sobre todo cuando es necesario analizar miles de nódulos para esclarecer el fenómeno de competencia. Este es muy útil para la identificación de cepas de rizobios (Dudman 1964) y al mismo tiempo simple, de fácil manipulación y bajo costo. El objetivo del presente trabajo fue determinar en ensayos realizados a campo en tres localidades de la Provincia de Bs.As. (Argentina), el porcentaje de penetración y la persistencia de la cepa introducida de *R. loti* 733, en nódulos de *L. tenuis*, frente a la población naturalizada del suelo, por medio del mencionado test serológico.

## MATERIALES Y METODOS

Los experimentos se sembraron en las localidades de Balcarce, Maipú y Ayacucho (Buenos Aires Argentina), en el mes de abril de los años 1992, 1994 y 1995 respectivamente, en Natracuoles. Se utilizó en todos los casos un diseño en bloques completos al azar con doce repeticiones, los tratamientos fueron inoculados con *R. loti* sin inocular (nodulado con la flora rizobial específica naturalizada en el suelo). El lotus se sembró puro, en líneas y a una densidad de seis  $kg\ ha^{-1}$ . Las parcelas tenían seis metros de largo por dos m de ancho con un área de muestreo de un  $m^2$ , separadas entre sí por caminos de dos m, sembrados con festuca, a fin de disminuir riesgos de contaminación. Previo a la siembra se efectuaron recuentos de *R. loti* nativos en el suelo, utilizando la técnica del número más probable (NMP) en plantas (Brockwell 1980). La semilla se inoculó con la cepa de *R. loti* 733 (Laboratorio de Microbiología, Unidad Integrada Balcarce-INTA) que

demostró un buen comportamiento en condiciones de invernáculo. La misma se seleccionó entre 23 aislamientos obtenidos de la depresión del Río Salado, (Picón *et al.* 1991). El inoculante fue preparado en el laboratorio, sorbiendo una suspensión de la cepa seleccionada sobre turba estéril.

Los muestreos de plantas se realizaron en primavera y otoño. Se tomaron de cuatro a seis plantas al azar por parcela en el área destinada al muestreo, tratando de mantener el sistema radical lo más intacto posible para no afectar la nodulación. En el primer muestreo de Balcarce, que se realizó en la primavera de 1992, con plantas que se encontraban en estado vegetativo y muy poco desarrolladas, se procesó en conjunto el total de nódulos de cada parcela, esterilizándolos en superficie con bicloruro de mercurio al 0,1 % durante un minuto y realizando posteriormente varios lavados con agua estéril para su eliminación. Se colocaron en tubos de ensayo con 0,2 ml de buffer fosfato 0,05 M pH 6,8 y se machacaron. Esta suspensión, que incluía eventualmente nódulos de distintos serogrupos, fue utilizada como antígeno en el test de inmunodifusión, dado que una prueba individual de nódulos no era posible y sobre el supuesto de que, si 733 había ingresado en un cierto número de nódulos, se expresaría la banda de identidad.

Para el resto de los muestreos se seleccionaron diez nódulos al azar por parcela, se desinfectaron en superficie como se detalló anteriormente, se machacaron individualmente y su extracto se sembró por estria en placas de Petri con medio de cultivo agar-extracto de levadura-manitol con rojo congo (Vincent 1970). Las placas fueron incubadas, durante cinco días a 28 °C. Se realizaron varios repiques hasta la obtención de un cultivo puro, que fue utilizado para la realización del test sero-lógico.

En Balcarce se efectuaron dos muestreos, uno a los siete meses de implantado el ensayo (primavera de 1992) y el otro al año de la implantación (otoño de 1993). En Maipú y Ayacucho se realizaron tres muestreos. El primero, en el otoño correspondiente al mismo año de implantado el lotus y los otros dos en el otoño y la primavera del año siguiente.

La elaboración del suero anti-733 se efectuó según el plan de inoculación propuesto por Vincent (1970). Los cultivos puros de los aislamientos obtenidos a partir de los diez nódulos seleccionados al azar por parcela, fueron diluidos a aproximadamente  $10^9$  bacterias  $ml^{-1}$ , en solución fisiológica estéril (absorbancia 2 a 450 nm de longitud de onda). Las diluciones provenientes de los aislamientos puros o las suspensiones del total de nódulos por parcela se colocaron en un baño termostático durante una hora a 90 °C para sensibilizar la reacción y posteriormente se enfrentaron con el antisuero 733 en placas de gel de agar. (Zablatoewicz, Focht 1981).

Las relaciones de parentesco serológico entre la cepa introducida y los aislamientos obtenidos, fueron leídas en base a la banda específica (Vincent 1982). Las reacciones se clasificaron en tres tipos: identidad total, identidad parcial y ausencia de reacción. Se efectuaron análisis de varianza mediante el sistema de Análisis Estadístico SAS (SAS Institute, Inc. 1988).

## RESULTADOS Y DISCUSION

No se detectaron rizobios nativos en Balcarce y Maipú y en Ayacucho el NMP de *R. loti* nativos fue de  $5,7 \times 10^2$  por gramo de suelo. La síntesis de las reacciones serológicas se presentan en las Tablas 1, 2 y 3.

Balcarce: Para el primer muestreo se demostró que la cepa 733 se encontraba presente en el 100% de las parcelas pertenecientes a los tratamientos inoculados y en el 78% de aquellos correspondientes a los tratamientos sin inoculación (Tabla 1). Estos resultados indican el éxito en la introducción de la cepa, pero no son concluyentes dado que se trabajó con antígeno del total de nódulos, y sólo indica que en ese conjunto hubo suficiente cantidad de antígeno de la cepa 733 como para expresar la banda de identidad. Por otro lado, hubo contaminación entre parcelas ya que se encontró 733 en los tratamientos sin inoculación. Estas contaminaciones, presumiblemente fueron debidas a que durante los meses de invierno el suelo permaneció con una lámina de agua superficial, facilitando el transporte de rizobios. En el segundo muestreo, que se realizó en otoño luego de un ciclo reproductivo, se presume pudo existir reinfección con formación de nuevos nódulos, ya que se hallaron los tres tipos de reacciones serológicas. Las reacciones de identidad total en ambos tratamientos demostraron la capacidad de persistencia de la cepa introducida. Las reacciones de identidad parcial indicaron la existencia de cepas con cierto parentesco serológico, ya que comparten algunos determinantes antigénicos con la cepa 733. La ausencia de reacción fue significativamente diferente entre tratamientos. Las reacciones parciales y

Tabla 1. Balcarce. Reacciones serológicas observadas a 7 y 18 meses de implantado *Lotus tenuis*.

Tratamientos	N° obs.*	Primavera 1992			Otoño 1993			
		IT ----- (%)	IP ----- (%)	AUS. ----- (%)	N° obs.**	IT ----- (%)	IP ----- (%)	AUS. ----- (%)
Inoculado	11	100	0	0	115	78a	17a	5a
Sin Inocular	9	78	0	22	107	70a	13a	17b

\* Machacado del total de nódulos de cada muestra. \*\* Aislamiento hasta cultivo puro, a partir de cada nódulo. IT=identidad total IP=identidad parcial AUS=ausencia de reacción. Cada dato es el promedio de 12 repeticiones. Para una misma reacción, los valores con letras iguales no difieren significativamente entre sí a  $P > 0,05$  (DSM).

Tabla 2. Maipú. Reacciones serológicas observadas en el primer, segundo y tercer muestreo.

Tratamientos	Primavera 1994			Otoño 1995			Primavera 1995					
	Nº Obs. *	IT ----- (%)	IP ----- (%)	AUS.	Nº Obs. *	IT ----- (%)	IP ----- (%)	AUS.	Nº Obs. *	IT ----- (%)	IP ----- (%)	AUS.
Inoculado	115	75a	16a	9a	116	62a	4a	34a	86	69a	0a	31a
Sin Inocular	101	60b	12a	28b	96	18b	9b	73b	95	17b	8b	75b

\*Aislamiento hasta cultivo puro, a partir de cada nódulo. IT=identidad total IP=identidad parcial AUS=ausencia de reacción. Cada dato es el promedio de 12 repeticiones. Para una misma reacción, los valores con letras iguales no difieren significativamente entre sí a  $P > 0,05$  (DSM).

ausencia de reacción demostraron la presencia de rizobios nativos que a la siembra se hallaban en muy bajo número (no detectables por la técnica del NMP) y ante la presencia de la planta eventualmente se estimularon, siendo capaces de reinfestarla en una segunda instancia.

Maipú: Los resultados expuestos en la Tabla 2 indican la buena introducción de la cepa y por otro lado, la contaminación entre parcelas, ya que se la encontró también en los tratamientos sin inocular. La recuperación de la cepa inoculada en los nódulos se mantiene alto y sin mayor variación a través del tiempo, lo cual sugiere su naturalización. No es claro, sin embargo el resultado obtenido en el primer año de implantado el ensayo en el tratamiento no inoculado y su posterior drástica disminución en los años subsiguientes. Las reacciones de identidad parcial demuestran la existencia de rizobios nativos, que si bien no fueron detectados por la técnica del NMP, existían en muy bajo número y aumentaron con la presencia del cultivo homólogo.

Ayacucho: En el primer muestreo se observó la pobre competencia de la cepa introducida ya que las reacciones de identidad total se encontraron en solo un

5% de los tratamientos inoculados (Tabla 3). Las reacciones de identidad parcial y ausencia de reacción indican la presencia de cepas nativas, corroboradas por el hecho de que en el sitio experimental existía antes de la siembra gran cantidad de plantas espontáneas de lotus y, coherentemente el número de rizobios naturalizados fue de  $5,7 \times 10^2 \text{ g}^{-1}$  de suelo. Esta respuesta pudo haber sido provocada por la existencia en el suelo de esa población de rizobios naturalizada, que aunque pequeña compitió e impidió la entrada de la cepa introducida. Estos resultados son coincidentes con los encontrados por Singleton, Tavares (1986), Thies *et al.* (1991) y Evans *et al.* (1996), quienes demostraron cómo el incremento en el número de rizobios naturalizados incide negativamente en la respuesta a la inoculación. Este concepto se vería respaldado por la dinámica de la recuperación de la cepa inoculada en Balcarce y Maipú, sitios en los cuales se partió de un suelo exento de *R. loti*, o portándolos en cantidades mínimas, por debajo del nivel de detección de la técnica usada (Brockwell 1980). Asimismo el suelo de Ayacucho presentaba un valor de pH de 7,5 versus 8,6 de los suelos de Balcarce y Maipú. Es proba-

Tabla 3. Ayacucho. Reacciones serológicas observadas en el primer, segundo y tercer muestreo.

Tratamientos	Primavera 1995			Otoño 1996			Primavera 1996					
	Nº Obs.*	IT ----- (%)	IP ----- (%)	AUS.	Nº Obs.*	IT ----- (%)	IP ----- (%)	AUS.	Nº Obs.*	IT ----- (%)	IP ----- (%)	AUS.
Inoculado	77	5a	17a	78a	74	18a	20a	62a	80	13a	22a	65a
Sin Inocular	79	0a	16a	84a	67	13a	23a	64a	89	21a	14a	65a

\*Aislamiento hasta cultivo puro, a partir de cada nódulo. IT= identidad total IP= identidad parcial AUS=ausencia de reacción. Cada dato es el promedio de 12 repeticiones. Para una misma reacción, los valores con letras iguales no difieren significativamente entre sí a  $P > 0,05$  (DSM).

ble que el pH pueda influir sobre las relaciones de competencia que se establecen entre las poblaciones rizobiales inoculadas y naturalizadas (Damirgi *et al.* 1967, Dunigan *et al.* 1984), pero se considera que fue la presencia de rizobios específicos naturalizados la causa principal de la no penetración de la cepa. Sería interesante efectuar un seguimiento prolongado de la tasa de recuperación de 733 en el suelo de Ayacucho, a fin de determinar si se mantiene su nivel en el orden del 13%, incrementa con el tiempo o decrece, siendo finalmente dominada totalmente por la flora naturalizada.

La proporción de recuperación de *R. loti* 733 al poco tiempo de implantado el lotus y a los 18 meses de la implantación, permiten concluir que esta cepa mostró una muy buena capacidad de infección, adaptación y persistencia en Balcarce y Maipú donde no existían rizobios naturalizados. En Ayacucho, no fue capaz de introducirse exitosamente por la presencia de una población de rizobios naturalizada, que aunque pequeña, compitió e impidió su ingreso a los nódulos.

#### REFERENCIAS

- Brockwell J. 1980. Experiments with crop and pasture legumes-principles and practice. En F. Bergersen (Ed.). Methods for evaluating biological nitrogen fixation. John Wiley, Chichester. U K. pp. 417-488
- Damirgi S M, Frederick L R, Anderson I C. 1967. Serogroups of *Rhizobium japonicum* in soybean nodules as affected by soil types. *Agron. J.* 57: 10-12
- Dudman W F. 1964. Immunodiffusion analysis of the extracellular soluble antigens of two strains of *Rhizobium meliloti*. *J. of Bacteriol.* 88: 782-794
- Dudman W F, Brockwell J. 1968. Ecological studies of root-nodule bacteria introduced into field environments. *Aust. J. agric. Res.* 19: 739-47
- Dunigan E P, Bollich P K, Hutchinson R L, Hicks P M, Zaunbrecher F C, Scott S G, Mowers R P. 1984. Introduction and survival of an inoculant strain of *Rhizobium japonicum* in soil. *Agron. J.* 76: 463- 466
- Evans J, Gregory A, Dobrowolski N, Morris S, O'Connor G, Wallace C. 1996. Nodulation of field-grown *Pisum sativum* and *Vicia faba*: competitiveness of inoculant strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* determined by an indirect, competitive elisa method. *Soil Biol. Biochem.* 28: 247-255
- Montes L, Cauhepe M A. 1985. Evaluación de *Lotus tenuis* mediante dos métodos de siembra. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 5: 313-321
- Picón M, Navarro C, González N, Andreoli Y. 1991. Selección de cepas de *Rhizobium* para *Lotus tenuis* adaptadas a suelos alcalinos hidromórficos de la Pampa Deprimida. I Simposio Argentino del Género *Lotus*: 8
- SAS institute Inc., 1988. SAS-STAT. Users Guide. Release 6.03 Edition. Cary, NC: SAS Institute. 1028pp.
- Singleton P W, Tavares J W. 1986. Inoculation response of legumes in relation to the number and effectiveness of indigenous *Rhizobium* populations. *Applied Environm. Microbiol.* 51: 1013-1018
- Thies J E, Singleton P W, Bohlool B B. 1991. Influence of the size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field-grown legumes. *Applied Environm. Microbiol.* 57: 19-28
- Vincent J M. 1970. A manual for the practical study of root nodule bacteria. (IBP handbook 5). Blackwell Scientific publications. Oxford. 164 pp.
- Vincent, J M. 1982. Serologia. In : W. J. Broughton (Ed.). Nitrogen fixation. Clarendon Press, Oxford. V 2 ; pp 235-273
- Zablatowicz R M, Focht D D. 1981. Physiological characteristics of cowpea rhizobia. Evaluation of symbiotic efficiency in *Vigna unguiculata*. *Applied Environm. Microbiol.* 41: 679-685