

CAPÍTULO 1

Hongos y bacterias del suelo con capacidades biofertilizantes y biocontroladoras para su aplicación con fines biotecnológicos

V. Fabiana Consolo¹, Keren Hernandez Guijarro²,
A. Julieta Thougnon Islas^{2,3}, Fernanda Covacevich^{1,2}

¹Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Biotecnología (INBIOTEC-CONICET), y Fundación para Investigaciones Biológicas Aplicadas (FIBA), Mar del Plata, Argentina.

²Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), UI INTA-FCA, Balcarce

³Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET)

faconsolo@fiba.org.ar

RESUMEN

La provincia de Buenos Aires representa un área agrícola por excelencia en nuestro país debido a sus características edáficas y climáticas, adecuadas para la producción de cultivos. Sin embargo, como consecuencia de la explotación intensiva del suelo en las últimas décadas con permanente extracción de nutrientes, se han evidenciado pérdidas de materia orgánica con los consecuentes desbalances de nutrientes claves para la producción agropecuaria. Por esta razón, la fertilización (destinada a la reposición de nutrientes) y la utilización de la siembra directa (para minimizar las pérdidas de materia orgánica) se han implementado de manera generalizada en nuestro país. Sin embargo, la mayor incidencia de enfermedades fúngicas (asociada a la siembra directa) ha generado mayor dependencia en el uso de pesticidas. Tanto la aplicación de fertilizantes



como de pesticidas puede afectar negativamente las poblaciones microbianas del suelo que podrían a su vez contribuir a reducir el uso de agroquímicos y fertilizantes sintéticos. Sin embargo, estos aspectos no siempre son considerados al planificar emprendimientos productivos.

Nuestro grupo de trabajo tiene como blanco de estudio los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA; reconocidos por incrementar la nutrición vegetal, la capacidad de recuperación de las plantas frente a estrés y por incrementar la estabilidad de los agregados del suelo), hongos del género *Trichoderma* (reconocidos como agentes de control biológico contra hongos patógenos, solubilizadores de fósforo (P) y productores de factores de promoción del crecimiento vegetal) y microorganismos solubilizadores de P. Nuestra línea de investigación tiene como objetivos: a) aislar, multiplicar y caracterizar HMA, *Trichoderma* y solubilizadores de P nativos de la Provincia de Buenos Aires; b) testear la potencialidad de los grupos seleccionados como potenciales promotores de crecimiento (biofertilizantes y biocontroladores) de cultivos de importancia agrícola; y c) formular biofertilizantes compuestos de consorcios microbianos nativos de la Provincia de Buenos Aires.

En el presente se están ensayando diferentes combinaciones de consorcios microbianos con el objetivo de ser utilizados como herramientas dentro de programas de manejo integrado de nutrición y control de enfermedades fúngicas en cultivos de importancia agronómica. Además, se está generando una colección de microorganismos nativos de la Provincia de Buenos Aires que han evidenciado, bajo condiciones controladas, capacidades promotoras de crecimiento en plantas de maíz, trigo, cebada y tomate. Dichos microorganismos están siendo caracterizados en su actividad y diversidad genética, con el objetivo de ser utilizados como bioinoculantes.





INTRODUCCIÓN

La explotación intensiva del suelo de la agricultura convencional (de alto insumo) de las últimas décadas en Argentina, con permanente extracción de nutrientes, aceleró su degradación y afectó su fertilidad natural, y está poniendo en peligro su productividad y sostenibilidad. La materia orgánica constituye gran parte del reservorio de nutrientes del suelo. Sin embargo, se han registrado importantes pérdidas de materia orgánica asociadas al uso intensivo del suelo. En consecuencia, los suelos de la Provincia de Buenos Aires están evidenciando desbalances de nutrientes claves en la producción agropecuaria tales como fósforo (P) y zinc, entre otros [1]. En este sentido, si bien la fertilización química es una práctica generalizada, no siempre cubre los requerimientos de los cultivos. A efectos de minimizar las pérdidas en materia orgánica, en las últimas décadas la siembra directa (SD) se ha implementado y extendido en aproximadamente un 75% del total de la superficie sembrada en nuestro país (www.aapresid.org.ar). Debido a que la mayor disponibilidad de residuos incrementa la humedad del suelo, en la mayoría de los casos la SD está asociada a mayor incidencia de enfermedades fúngicas lo que ha generado además importante dependencia en el uso de pesticidas.

Los microorganismos del suelo que cumplen funciones claves en el ciclado de nutrientes, en el mantenimiento del equilibrio microbiológico, en la resiliencia del sistema edáfico y consecuentemente en la productividad vegetal, están evidenciando cumplir roles protagónicos en el sustento de la integridad de los sistemas terrestres. Sin embargo, ha sido demostrado que tanto la aplicación de fertilizantes como de pesticidas puede afectar negativamente las poblaciones microbianas del suelo que podrían a su vez contribuir a reducir el uso de agroquímicos y fertilizantes sintéticos [2, 3]. Paradójicamente, estos aspectos no siempre son considerados al planificar emprendimientos productivos.

La pérdida de biodiversidad microbiana ha sido identificada como la principal amenaza para el mantenimiento del equilibrio en los ciclos biogeoquímicos del suelo. Sin embargo, el rol de los microorganismos en la capacidad de resiliencia del suelo así como los mecanismos involucrados permanecen aún no bien clarificados. Ha sido reportado que el manejo agrícola puede afectar las capacidades microbianas. Sin embargo, no siempre los resultados evidencian las mismas respuestas de actividad o diversidad microbiana asociadas a disturbios en el sistema suelo [4].





En nuestro país la diversidad microbiana edáfica está comenzando a ser explorada en su potencialidad como fuente de bioinoculantes. El primer paso es disponer de colecciones de microorganismos nativos aislados, seleccionados, caracterizados en sus capacidades biofertilizantes o bioprotectoras para luego ser multiplicados, conservados y utilizados para la formulación de inoculantes biológicos. En tal sentido, las técnicas bioquímicas y moleculares constituyen herramientas muy eficientes para caracterizar poblaciones microbianas.

Tres grandes grupos de microorganismos del suelo presentan características para ser utilizados como inoculantes biológicos solos o asociados, y son el centro de estudio de nuestro grupo de investigación. Uno de ellos lo constituyen los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) (Fig. 1) que establecen relaciones simbióticas mutualistas al colonizar las raíces del 90% de las plantas terrestres. Los HMA son reconocidos por mejorar la nutrición vegetal, absorción de agua y funciones metabólicas, incrementar la resistencia o recuperación de las plantas frente a situaciones de estrés y contribuir a la estabilidad de los agregados del suelo [5]. Otro grupo de hongos de vida libre, constituido por representantes del género *Trichoderma* (Fig. 2A) pueden actuar como agentes de control biológico contra hongos patógenos, son capaces de solubilizar nutrientes del suelo y producir factores que contribuyen a la promoción del crecimiento vegetal [6]. Asimismo, otro grupo funcional que ha recibido la atención de nuestras investigaciones por las interacciones sinérgicas que pueden establecer con los HMA y *Trichoderma*, lo constituyen microorganismos con capacidad de convertir formas insolubles del P en formas solubles y accesibles por las plantas [7].

En la búsqueda de alternativas tendientes a favorecer la producción agrícola sostenible con el ambiente edáfico, estamos explorando cómo las características edáficas, resultado del manejo, afectan las poblaciones HMA, *Trichoderma* y solubilizadores de P nativos de la región. Además, consorcios o grupos individuales con capacidades promisorias están siendo testeados, solos o combinados, como posibles promotores de crecimiento vegetal en plantas de importancia agrícola.

RESULTADOS DE LA LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

Se ha evidenciado que la capacidad de formar micorrizas de consorcios microbianos nativos de la Provincia de Buenos Aires es afectada negativamente



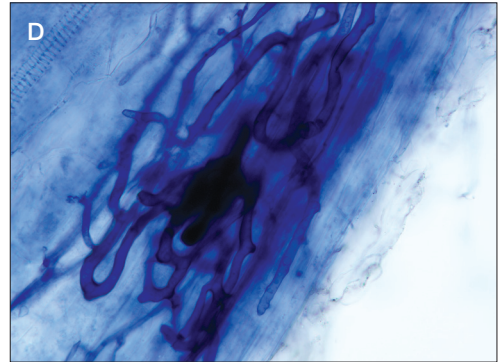
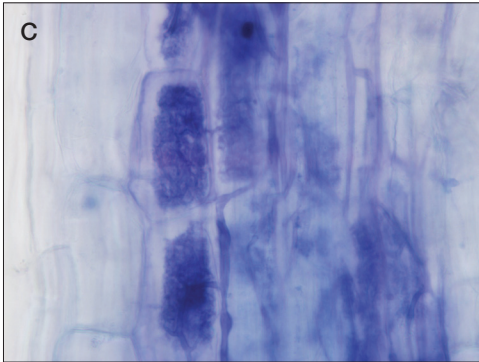
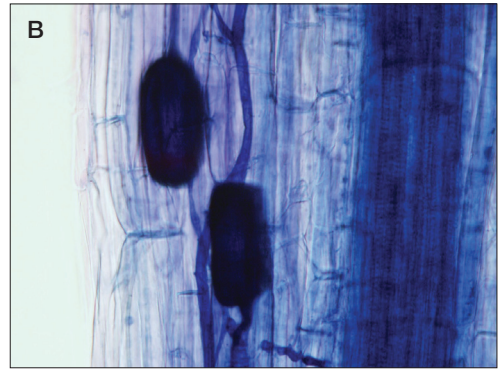
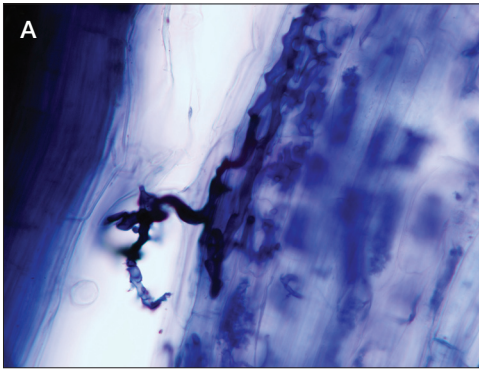


Figura 1. Estructuras de colonización radical por Hongos formadores de Micorrizas Arbusculares (HMA) nativos de la Provincia de Buenos Aires.

A) Hifa de HMA ingresando en raíz de girasol, con formación de arbusculos (40X).

B) Colonización de raíz de raigrás (*Lolium multiflorum* Lam.) por HMA, con formación de vesículas (40X).

C-D) Diferentes tipos de colonización por HMA en raíces (C: tipo *arum*, con formación de arbusculos en maíz) y de girasol (D: tipo *paris* con formación de enrollamientos denominados 'coils' en girasol) (40X).



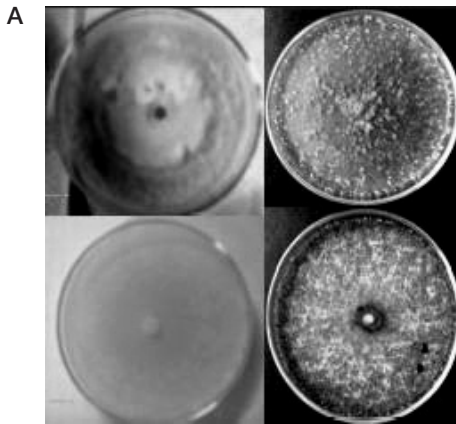
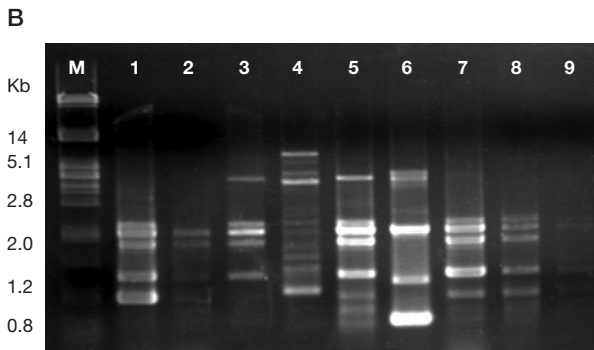


Figura 2. Morfología y patrones obtenidos por ISSR de cepas de *Trichoderma harzianum*.

A) Variación morfológica de cuatro cepas nativas de *T. harzianum* crecidas en medio de cultivo APG .

B) Patrones de amplificación de nueve aislamientos de *T. harzianum* utilizando la técnica de ISSR. M, marcador de peso molecular λ PstI (DNA del fago Lambda digerido con la enzima PstI)



por elevados contenidos de nutrientes tales como P y hierro [8]. En la mayoría de los casos la fertilización, particularmente proveniente de fuentes sintéticas y a dosis elevadas, afecta negativamente la capacidad colonizadora de los HMA nativos de la región [3, 9].

A partir de consorcios que evidenciaron elevada capacidad de colonización radical por HMA, se está evaluando su potencialidad promotora del crecimien-





to vegetal. La inoculación con consorcios microbianos (con HMA) nativos de lotes bajo manejo agrícola de Lobería mostró respuesta positiva temprana (incremento de crecimiento a las dos semanas) en plantas de maíz y tomate [10]. Consorcios microbianos con HMA nativos de lotes bajo manejo agrícola de Balcarce incrementaron el crecimiento y absorción de zinc en plantas de maíz en el período vegetativo V6 [3]. La inoculación combinada de solubilizadores de P nativos de Balcarce de lotes bajo SD con consorcios microbianos con HMA nativos de lotes prístinos de Tandil también incrementó el crecimiento de plantas de trigo en preantesis. Sin embargo, los mayores incrementos se lograron por la inoculación individual con los solubilizadores de P y no se evidenció efecto sinérgico por la inoculación combinada. Los resultados indicarían que más que el manejo, la zona geográfica, las características edáficas y la capacidad micotrófica permitirían seleccionar consorcios microbianos con HMA potencialmente promotores de crecimiento vegetal.

Por otra parte, se ha evidenciado que cepas de *Trichoderma* productoras de ácido indol acético y capaces de solubilizar P inorgánico en condiciones *in vitro*, mostraron ser potencialmente promotoras del crecimiento vegetal en estadios tempranos sobre plantas de arroz y soja.

Si bien se cuenta con un cepario de más de 100 cepas de *Trichoderma* aisladas de diferentes regiones agrícolas del país, actualmente nos hemos centrado en el relevamiento de cepas nativas de regiones bajo cultivo y prístinas de la Provincia de Buenos Aires. En este contexto se han aislado 30 cepas de *Trichoderma*, los cuales provienen mayoritariamente de la zona del sudeste bonaerense (73%), que fueron identificadas como *T. koningii*, *T. gamsii*, *T. harzianum*, siendo esta última la especie más abundante (93%). Las cepas más eficientes presentaron valores de eficiencia relativa de solubilización de P del 275%. Además, se evidenció elevada capacidad micotrófica (mayor al 50%) en consorcios microbianos multiplicados durante 6 meses provenientes de suelos del norte, centro y sudeste de la Provincia. En general, la mayor capacidad micotrófica provino de los consorcios nativos de sitios prístinos. Bajo estas últimas condiciones siempre se aislaron cepas de *Trichoderma* y la capacidad micotrófica fue en general la más elevada. Los consorcios microbianos provenientes de lotes bajo manejo agrícola mostraron, en general, menor capacidad micotrófica por HMA que los consorcios provenientes de suelos prístinos; y en ocasiones no se aislaron cepas de *Trichoderma* en los consorcios provenientes de manejo agrícola. Se evidenciaron asociaciones negativas entre la capacidad micotrófica





de HMA, la abundancia de solubilizadores de P y de hongos *Trichoderma* con el contenido de P, hierro, materia orgánica y el pH de los suelos. Cepas individuales de *Trichoderma* y solubilizadores de P con capacidades promisorias, combinadas con consorcios de HMA con capacidad micotrófica del 60% han ocasionado incrementos en el crecimiento de plantas de cebada.

DETERMINACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE LOS GRUPOS BLANCO DE ESTUDIO

Se están realizando relevamientos regionales en la Provincia de Buenos Aires y analizando la diversidad genética de HMA mediante *Single Stranded Conformation Polymorphism* (SSCP). Esta estrategia permite determinar por electroforesis no desnaturalizante diferencias en la secuencia genética de nucleótidos entre cadenas simples y ha demostrado ser eficiente en detectar diferencias entre HMA mediante la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de una región de la subunidad ribosomal mayor (DNAr 28S) [11]. Utilizando esta estrategia hemos detectado diferencias genéticas entre especies de hongos las cuales estuvieron estrechamente relacionadas a la región de muestreo más que al manejo agrícola.

A partir de patrones moleculares de SSCP hemos detectado elevada diversidad para HMA nativos de la Provincia de Buenos Aires. El corte de bandas con su subsiguiente reamplificación y secuenciación ha confirmado la presencia de HMA en el perfil, y las secuencias están siendo depositadas en bases públicas (NCBI; números de acceso KJ920202.1 y KM262654 a KM262657). El análisis de Máxima Parsimonia permitió agrupar las secuencias obtenidas a partir de las bandas junto a representantes de HMA del género *Glomus* (coincidentalmente con los cebadores utilizados para la reacción de PCR) y las separó de otros géneros de HMA (*Acaulospora*, *Gigaspora* y *Scutellospora*). Además, con los patrones de SSCP obtenidos se realizaron dendrogramas de similitud (Fig. 3) y se analizó el reagrupamiento en Clusters de acuerdo a regiones, manejo o características químicas de los suelos. La técnica de SSCP también está siendo utilizada para la caracterización de la biodiversidad de cepas de *Trichoderma* de suelos de la Provincia de Buenos Aires. Además la variabilidad genética de *Trichoderma* también es analizada mediante otras técnicas (Fig. 2B) como UP-PCR e ISSR [12].



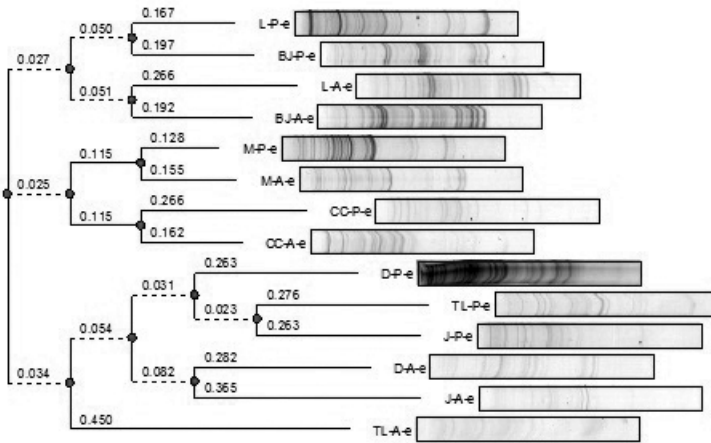


Figura 3. Dendrograma Neighbor-Joining basado en los patrones de bandas obtenidos por análisis PCR-SSCP a partir de DNA de esporas de HMA.

Detalle de siglas en dendrograma: Primeras letras indican localidades: Benito Juárez (BJ), Carlos Casares (CC), Coronel Dorrego (CD), Junín (J), Lobería (L), Madariaga (M) y Trenque Lauquen (TL). Letra intermedia indica manejo: agrícola (A) y prístino (P). Última letra en minúscula indica origen del DNA: esporas (e).

POTENCIALIDADES DE LA LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

Nuestra línea de trabajo es pionera en integrar estudios tendientes a evaluar la potencialidad de la aplicación individual o combinada de HMA, *Trichoderma* y solubilizadores de P para favorecer la nutrición mineral, el crecimiento y/o sanidad de cultivos de importancia en la producción agrícola de nuestro país. En este sentido, estamos evidenciando las capacidades promotoras de crecimiento vegetal de estos microorganismos que forman parte de la microbiota edáfica nativa de la Provincia de Buenos Aires. Mediante estudios de microbiología clásica, biología molecular y ensayos de inoculación estamos contribuyendo a la caracterización, selección, multiplicación, detección y conservación de estos microorganismos. Nuestros estudios constituyen el primer paso para la





selección de estos organismos potencialmente benéficos para que en un futuro puedan formar parte de bioinoculantes.

OFERTA TECNOLÓGICA

La formulación de bioproductos conformados con microorganismos del suelo nativos de la Provincia de Buenos Aires, quienes solos o combinados incrementen el rendimiento y la calidad de cultivos de importancia agronómica atendiendo a la sostenibilidad de los agroecosistemas, resulta un objetivo estratégico y pionero para nuestro país. Las metodologías moleculares de detección de los microorganismos y su diversidad que estamos empleando, podrían ser utilizadas para monitorear la persistencia de los organismos utilizados como biofertilizantes en el suelo inoculado. Esto permitirá vincular la información tecnológica con la generación de inoculantes con probada instalación y persistencia, que puedan ser fácilmente transferidos a técnicos y agricultores dedicados a la producción de cultivos de importancia económica del país



REFERENCIAS

1. Sainz Rozas HR, Echeverría HE, Calviño PA, Barbieri PA, Redolatti M (2003) Respuesta del Trigo al agregado de Zinc y Cobre en suelos del Sudeste Bonaerense. *Ciencia del Suelo* 21(2):52-58.
2. Marshall CB, McLaren JR, Turkington R (2011) Soil microbial communities resistant to changes in plant functional group composition. *Soil Biol Biochem* 43(1):78-85.
3. Astiz Imaz P, Barbieri PA, Echeverría HE, Sainz Rozas HR, Covacevich F (2014) Indigenous mycorrhizal fungi from Argentina increase Zn nutrition of maize modulated by Zn fertilization. *Soil and Env* 31(1):23-32.
4. Griffiths BS, Philippot L (2013) Insights into the resistance and resilience of the soil microbial community. *FEMS Microbiol Rev* 37(2):112-129.
5. Siddiqui ZA, Akhtar MS, Futai K (eds) (2008) Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry. Springer, New Delhi
6. Samuels GJ (1996) *Trichoderma*: A review of biology and systematics of the genus. *Mycol Res* 100 (8):923-935.
7. Adesemoye AO, Klopper JW (2009) Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Appl Microbiol Biotechnol* 85(1):1-12.
8. Covacevich F, Eyherabide M, Sainz Rozas HR, Echeverría HE (2012) Capacidad micotrófica arbuscular y características químicas de suelos agrícolas y prístinos de Buenos Aires (Argentina). *Ciencia del Suelo* 30(2):119-128.
9. Covacevich F, Marino MA, Echeverría HE (2006) The phosphorus source determines the arbuscular mycorrhizal potential and the native mycorrhizal colonization of tall fescue and wheatgrass in a moderately acidic Argentinean soil. *Eur J Soil Biol* 42(3):127-138.
10. Thougnon Islas AJ, Eyherabide M, Echeverría HE, Sainz Rozas HR, Covacevich F (2014) Capacidad micotrófica y eficiencia de consorcios con hongos micorrícicos nativos de suelos de la Provincia de Buenos Aires con manejo contrastante. *Revista Argentina de Microbiología* 46(2):133-143.
11. Kjølner R, Rosendahl S (2000) Detection of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales) in roots by nested PCR and SSCP (Single Stranded Conformation Polymorphism). *Plant and Soil* 226(2):189-196.
12. Consolo VF, Monaco CI, Cordo CA, Salerno GL (2012) Characterisation of novel *Trichoderma* spp. isolates as a search for effective biocontrollers of fungal diseases of economical important crops in Argentina. *World J Microbiol Biotechnol* 28(4):1389-1398.