



Universidad de la República - CSIC

Formulario de Informe final del Programa de Apoyo
a la Investigación Estudiantil
Edición 2014



DATOS DEL PROYECTO	
• Título del Proyecto:	Diversidad de cianobacterias formadoras de heterocistos en dos suelos de arrozal
• Número ID del proyecto:	159
• Área de conocimiento:	Microbiología Agrícola
• Facultad o Servicio:	Facultad de Agronomía, UDELAR. Montevideo, Uruguay
• Nombre completo de los-as Integrantes del equipo:	María Eugenia Salvat Sosa Mariano Blanco Vieira Andrea Bentos Guimarães Rodríguez Matías Giménez Martínez Santiago Pena
Correo electrónico del/de la estudiante referente:	marianobv@hotmail.com marianoblancovieira@gmail.com
• Nombre completo del/de la docente orientador-a:	Germán Pérez Pesamosca
• Correo electrónico del/de la docente orientador-a:	gperez@fagro.edu.uy gerrez@gmail.com

1. OBJETIVOS

1.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar si las características del suelo en la zona Norte y Este afecta la diversidad de la comunidad de cianobacterias formadoras de heterocisto en los arrozales.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar las principales características fisicoquímicas de cada suelo.
- Aislar cianobacterias formadoras de heterocisto de ambos arrozales
- Caracterizar los aislamientos en base a su morfología y estimar la diversidad de la comunidad de cianobacterias formadoras de heterocisto.
- Determinar la diversidad de la comunidad de cianobacterias formadoras de heterocisto por amplificación del gen *hetR* y análisis por DGGE.
- Comparar la diversidad y variación de la comunidad de cianobacterias formadoras de heterocisto provenientes de ambos suelos.
- Determinar si existen diferencias en la comunidad de cianobacterias a distintas profundidades en los suelos estudiados.

2. ACTIVIDADES DE CAMPO

2.1 DISEÑO EXPERIMENTAL Y MUESTREO

Los sitios de muestreos se desarrollaron en el Departamento de Salto, Unidades de suelo Itapebí-Tres Árboles, y al Este en el Departamento de Treinta y Tres, en ensayos de rotación pertenecientes a la Estación experimental Paso de la Laguna (Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA). En Salto se establecieron dos sitios de muestreo, JUN y PUM. En cada sitio se delimitaron tres parcelas enumeradas del 1, 2, 3 y se tomaron muestras a dos profundidades, de 0 a 5 cm. (A) y de 5 a 10 cm. (B) en cada una de las parcelas. Se hicieron ocho tomas por cada profundidad y parcela, de manera de generar muestras compuestas y representativas. En Treinta y Tres se realizó solo se tomaron muestras de un sitio. Las muestras de suelo se tomaron en una transecta con un correr en las parcelas a estudiar de los primeros 5 cm de la superficie. La etapa fenológica elegida para realizar las actividades fue pre y pos-cosecha en el mes de marzo, donde la producción había sido drenada

2.2. ACTIVIDADES DE LABORATORIO

2.2.1 Acondicionamiento y conservación de muestras

Previo al trabajo de laboratorio las muestras de suelo fueron pasadas por tamiz de 2 mm., de manera de retirarle todo tipo de elemento extraño como resto vegetales, fragmentos de roca, etc. Las muestras de suelo para ADN se conservaron a -20°C hasta su uso para la extracción.

2.2.2. Aislamiento

Para lograr el aislamiento se realizaron diluciones seriadas 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} de cada muestra de suelo. Se sembró por extensión la dilución 10^{-3} con rastrillo de vidrio en placa con medio BG11₀ sólido (agarizado 15 g/l) sin nitrógeno (ajustado con NaOH 10 M a pH 7.6). Los aislamientos se cultivaron en un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a 25°C .

2.2.3 Caracterización

A nivel macroscópico (lupa binocular) se distinguieron los distintos morfotipos de los aislamientos. A nivel microscópico (microscopio óptico, 40X y 100X) se incluyeron los caracteres: formas celulares, tricomas y simetría y distribución y posición de las células diferenciadas (heterocisto y acinetes). Se tomaron microfotografías con una cámara acoplada al microscopio (DinoLite) para hacer el registro de cada aislamiento.

2.2.4 Extracción de ADN genómico microbiano del suelo

Para realizar la extracción de ADN, se utilizó 0.3 g de suelo con el kit PowerSoil de MO BIO Laboratories, Inc. La calidad y cantidad de ADN genómico se determinó en geles de agarosa al 1% y por Nanodrop respectivamente.

2.2.5 DGGE

El protocolo que se utilizó fue de acuerdo a literatura consultada.

2.2.6 Análisis de nutrientes y pH del suelo

Previo al análisis, las muestras de suelo fueron secadas a 60°C por 48 horas y tamizadas (2 mm). Las medidas que se tomaron fueron: Nitrato (NO_3^-), Amonio (NH_4^+), Fósforo Bray y pH, empleando técnicas de rutina. Las medidas fueron realizadas en el Laboratorio de Fertilidad de Suelos, Facultad de Agronomía.

2.2.7 Análisis Estadístico

Se hicieron Diagramas de caja (boxplots), con el fin de visualizar la distribución de los datos e identificar posibles valores atípicos y pruebas de comparación de 2 medias (Welch test) según zona (Norte y Este). Se hizo un análisis de regresión simple para evaluar la respuesta de la diversidad en función de distintas variables explicativas. Asimismo se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP), con el fin de determinar si los datos podían ser agrupados según alguna característica. Todos los análisis fueron realizados con el software R.

3. Si bien se pudo poner a punto la amplificación del gen *hetR* por PCR, por un desperfecto técnico en el equipo del DGGE, quedó pendiente el análisis de la diversidad de cianobacterias formadoras de heterocistos por una aproximación independiente de cultivo.
4. La zona Norte presentó mayores valores de NH_4^+ , NO_3^- y pH (solo se muestra el determinado en H_2O) mientras que en la zona Este la concentración de Fósforo fue mayor (Fig. 1).

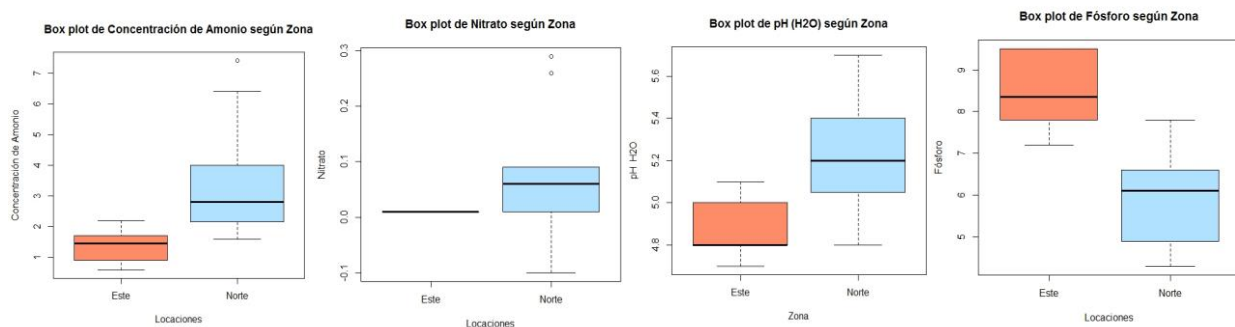


Fig. 1. Diagrama de cajas para las variables NH_4^+ , NO_3^- , pH y Fósforo para la zona Este y Norte

En la zona Este, la cantidad de aislamientos fue mayor en ambas secciones de suelo estudiadas (Fig. 2).

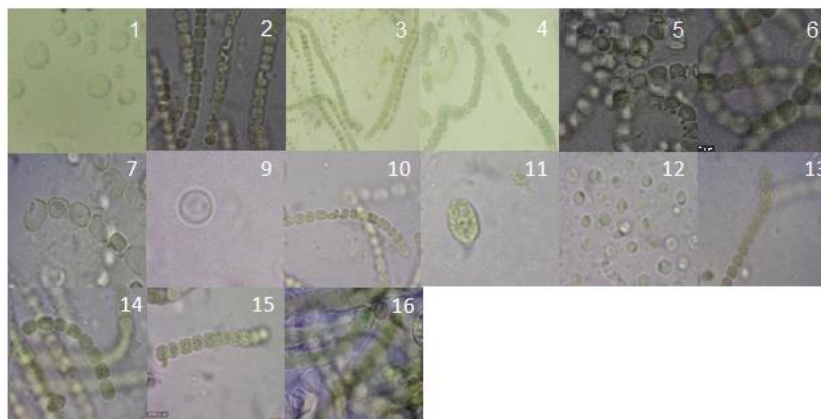


Fig. 2. Aislamientos correspondientes de cianobacterias al arrozal de la zona Este de la sección 0-5 cm. Nótese que se muestran (a modo informativo) aislamientos de unicelulares (1,9, 11 y 12) pero estos no fueron incluidos en los análisis. Aumento 100X

En cambio, en los dos arrozales de la zona Norte, la cantidad de aislamientos fue mucho menor (Fig. 3).

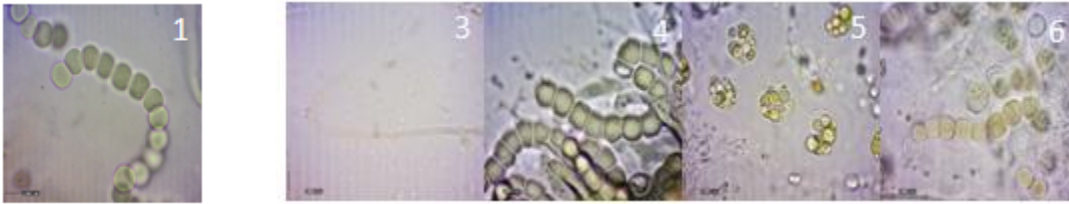


Fig. 3. (1). Único aislamiento obtenido del arrozal JUN y (3-6) aislamientos del arrozal PUM ubicados en Salto (0-5 cm). Aumento 100X

El análisis estadístico (regresión lineal simple) mostró que la diversidad de los aislamientos está afectada por el tipo de suelo y que la diversidad de cianobacterias formadoras de heterocisto es mayor en la zona Este. Por otro lado, la variable fósforo estaría incidiendo en ese resultado y en la zona Norte las variables NH_4^+ y pH incidirían en la baja diversidad observada (Fig. 4).

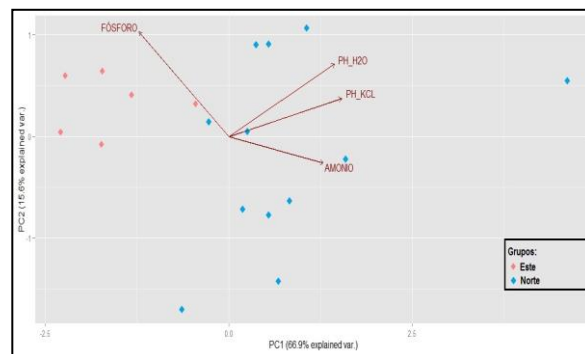


Fig 4. Biplot, gráfico en el que en simultáneo se visualizan los datos agrupados según Zona (Este y Norte) y las variables consideradas para el ACP (NH_4^+ , Fósforo, pH H_2O v pH KCl).

Se logró amplificar el gen *hetR* (Fig. 5), pero no se pudo realizar el DGGE.

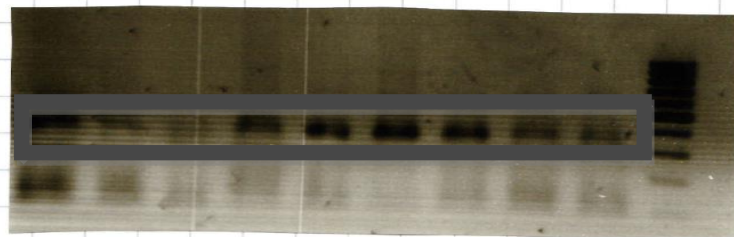


Fig. 5. Gel de agarosa al 1% donde se muestran los amplicones de 270 pares de bases esperado (recuadro gris)

5. No hubo instancias para poder difundir estos resultados durante la realización del proyecto.

6. La mayor dificultad fue la de poner a punto el PCR para amplificar el gen *hetR* de muestras de suelo. Si bien se logró para todas las muestras de la sección 0-5 cm (y algunas de la sección 5-10 cm), el DGGE no se pudo realizar. Esto impidió analizar la diversidad desde otra aproximación y poder cumplir uno de los objetivos.

7. No corresponde.

8. Resumen publicable

Diversidad de cianobacterias formadoras de heterocistos en dos suelos de arrozal

Lab. Microbiología, Depto. Biología Vegetal. Fac. Agronomía.

Mariano Blanco, Andrea Bentos-Guimaraes, Matías Giménez, María Salvat, Santiago Pena

Docente Orientador: Germán Pérez, Docente co-orientador: Pilar Irisarri

Las cianobacterias formadoras de heterocisto juegan un rol relevante en el aporte de nitrógeno en suelos de arrozales. La diversidad de esta comunidad puede estar afectada, entre otros factores, por el tipo de suelo. En este trabajo se buscó estudiar por dos aproximaciones, dependiente e independiente de cultivo, la diversidad de las cianobacterias formadoras de heterocisto. La primera aproximación incluyó la caracterización morfológica de los aislamientos y en la segunda a partir de la extracción de ADN genómico, amplificación del gen *hetR* y realización de un gel en gradiente desnaturizante. Por medio de análisis estadísticos se buscó algún factor del suelo que pudiera incidir en su diversidad. Para ello, se trabajó en arrozales de las zonas Este (Treinta y Tres) y zona Norte (Salto).

La diversidad de cianobacterias formadoras de heterocisto fue mayor en la zona Este. En dichos arrozales, el nivel de fósforo sería el que estaría incidiendo en la diversidad de la comunidad mientras que en la zona Norte, las variables que inciden son el amonio y el pH.

En este estudio se comprobó que el tipo de suelo tiene un efecto sobre la diversidad de la comunidad de cianobacterias formadoras de heterocisto.

9 En la siguiente tabla ingrese la información solicitada en relación a los **equipos y la bibliografía adquiridos con fondos del PAIE**. Recuerde que debe entregar todos los ítems adquiridos en los dos rubros antes mencionados, para que éstos formen parte del acervo de su institución y puedan ser utilizados por equipos financiados en posteriores ediciones de este programa.

EQUIPOS	
cantidad	ítem - descripción
	NO corresponde

BIBLIOGRAFÍA	
cantidad	autor(es), título, editorial, año
	No corresponde