

ESTUDIO DEL EFECTO QUIMIOTÁCTICO DE LOS EXUDADOS RADICALES DEL ARROZ SOBRE *Azospirillum brasilense* Sp7 Y *A. brasilense* R5(15). PRODUCCIÓN DE AUXINAS POR AMBAS CEPAS

Mabel Pazos[✉], Digna Hernández y Annia Hernández

ABSTRACT. The genus *Azospirillum* contains free-life diazotroph bacteria in tropical and subtropical soils in association with roots from economically important crops as rice, wheat and diverse vegetable species. Most studies carried out with this genus have demonstrated its practically universal distribution and its numerous effects on the growth of colonized plants, so that they are promissory for its application in agriculture. In this work, the chemotactic effect of root exudates from rice variety J-104 is demonstrated on two strains of *A. brasilense* R5(15) and Sp 7, as well as the capacity of them to produce auxins $16.60 \mu\text{g.mL}^{-1}$ and $11.82 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively

Key words: *Azospirillum*, rice, rhizosphere, chemotaxis, auxins

RESUMEN. El género *Azospirillum* agrupa bacterias diazotróficas de vida libre, ampliamente encontradas en suelos tropicales y subtropicales, en asociación con raíces de cultivos de importancia económica como arroz, trigo y diversas especies vegetales. La gran mayoría de los estudios realizados con este género han demostrado su distribución prácticamente universal y sus numerosos efectos sobre el crecimiento de las plantas que coloniza. En este trabajo se demuestra el efecto quimiotáctico que ejercen los exudados radicales del arroz variedad J-104 sobre dos cepas de *A. brasilense* (R5(15) y Sp7), así como la capacidad de ambas de producir auxinas 16.60 mg.mL^{-1} y 11.82 mg.mL^{-1} respectivamente.

Palabras clave: *Azospirillum*, arroz, rizósfera, quimiotactismo, auxina

INTRODUCCIÓN

Se ha establecido que las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) juegan un papel importante en la agricultura tropical, en particular en cultivos como el arroz, maíz y pastos forrajeros. Entre las PGPR se incluye *Azospirillum*, el cual es un sistema modelo para el estudio de la asociación entre bacterias y plantas que no nodulan (1).

Es en 1925 que aparece descrito por primera vez el primer representante de este género; sin embargo, no es hasta 1973 que se reinician los estudios taxonómicos que conducen a la reclasificación del género y la integración de seis especies en él (2). Es alrededor de 1993 que el género *Azospirillum* se convierte en el más estudiado, debido a su capacidad de estimular el crecimiento de las plantas y aumentar sus rendimientos. Se promueven entonces numerosos estudios sobre la fisiología, ecología y genética de estas bacterias.

Es conocido que el establecimiento de una colonización efectiva, la estimulación del sistema de la raíz y

el desarrollo vegetal dependen de varios parámetros, dentro de los que se encuentran el mantenimiento del microorganismo en el suelo, su movilidad y quimiotaxis en respuesta a la estimulación de los exudados radicales, la producción de sideróforos y bacteriocinas, la excreción de fitohormonas, el mecanismo de adherencia al sistema de la raíz y la transferencia efectiva del nitrógeno fijado a la planta hospedera.

Precisamente, este trabajo se realiza con el objetivo de estudiar el efecto quimiotáctico que ejercen los exudados producidos por el cultivo del arroz, variedad J-104, sobre *Azospirillum brasilense* Sp7 y *A. brasilense* R5(15), así como la capacidad de estas cepas de producir hormonas de tipo auxínico, en aras de esclarecer algunos de los importantes aspectos antes mencionados, con vistas a obtener bioproductos efectivos, perfectamente caracterizados con mayores posibilidades de éxito.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Plantas de arroz *Oryza sativa* var. J-104. **Cepas bacterianas.** *Azospirillum brasilense* Sp7 (LMG1263) proveniente de la rizosfera de *Digitaria decumbes* y la cepa nativa *A. brasilense* R5(15) aislada de la rizosfera del arroz, conservadas en tubo de Agar Nutriente en plano inclinado a 4°C en el Cepario de Rizobacterias del INCA.

Ms.C. Mabel Pazos, y Dra.C. Annia Hernández, Investigadores Agregados del Departamento de Biofertilizantes y Nutrición de las Plantas, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana, Cp 32 700; Ms.C. Digna Hernández, Investigadora del Instituto de Investigaciones del Arroz.

✉ mabel@inin.cu

Colecta de los exudados radicales. Las semillas de arroz de la variedad J-104, previamente desinfectadas y pregerminadas, se colocaron en tubos espermosféricos (Figura 1) que contenían solución nutritiva de Hoagland diluida con agua destilada estéril 1:2. Se incubaron con un fotoperíodo de 14 horas luz 10 horas oscuridad a 30°C. A los siete días se tomaron 5 tubos de cultivo, colectándose los exudados radicales y se guardaron a 4°C.



Figura 1. Tubo espermosférico

Efecto quimiotáctico de los exudados radicales. Se empleó la cámara de quimiotaxis (Figura 2), la cual está formada por un bloque de acrílico con dos orificios y un pozo central de 1 cm de diámetro. En uno de los orificios se introduce un capilar que contiene la muestra de exudado radical y en el otro se coloca el testigo (solución de Hoagland estéril diluida 1:2). En el pozo se colocan 0.5 mL de suspensión bacteriana, colocándose un cubreobjetos para posibilitar la entrada de las bacterias a los capilares. Se utilizan los exudados radicales de plantas, a tiempos de exposición de 20, 40 y 60 minutos. Luego se extrajeron los capilares y su contenido se diluyó en agua destilada estéril para tomar alícuotas de 100 µL y sembrarlas en cajas de Petri conteniendo el medio Rojo Congo Agar. Se incubaron a 35°C durante 48 horas y luego se cuantificó el número de unidades formadoras de colonias por mililitros (UFC.mL⁻¹).



Figura 2. Cámara de quimiotaxis

Determinación de auxinas. Para ello se preparó un preinóculo en medio Grapelli y Rossi (3). Se empleó como inductor el DL-Triptófano a una concentración de 0.1 g.L⁻¹. Los cultivos bacterianos se centrifugaron a 15 000 rpm durante 20 minutos. Se tomaron 5 mL de los caldos libres de células para la extracción de hormonas.

La muestra de sobrenadante se acidificó con HCl 1N hasta pH 2.8-3.0, posteriormente se llevó a cabo la extracción de las auxinas con acetato de etilo (1:1). Se realizaron tres extracciones y se unieron las fases orgánicas. Se evaporaron en rotoevaporador y se resuspendieron en 1 mL de metanol.

La determinación cuantitativa de ácido indol acético se realizó siguiendo el protocolo descrito por Krebs (4). Para ello se mezclaron 20 µL del reactivo de Salkowski y 1 mL FeCl₃ 0.5 M más la muestra. Se calentó a 60°C durante cinco minutos y se añadió 1.5 mL de metanol, se agitó y se leyó a 540 nm en espectrofotocolorímetro, contra un blanco formado con 20 µL de metanol. Previamente se realizó una curva patrón de ácido indol acético en un rango entre 20 y 100 µg.mL⁻¹.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las plantas liberan por sus raíces multitud de sustancias, que actúan como atrayentes de bacterias y hongos de la rizosfera. Entre los exudados radicales se distinguen, según su naturaleza, azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, lípidos, vitaminas, proteínas, enzimas, entre otras. El tipo y la cantidad de estos compuestos varía bastante de una planta a la otra (5).

Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que ambas cepas son atraídas por los exudados radicales producidos por el cultivo del arroz (variedad J-104), que fueron colectados empleando el modelo espermosférico; en ambos casos, el tiempo de exposición donde se observó mayor concentración microbiana (UFC.mL⁻¹) resultó ser a los 60 minutos. La mayor atracción correspondió a la cepa nativa *A. brasilense* R5(15) con una concentración de 4.2x10⁸ UFC.mL⁻¹ en medio Rojo Congo, mientras que al cuantificar el crecimiento en este medio de *A. brasilense* Sp7 se obtuvo 1.1x10⁸ UFC.mL⁻¹. En este sentido, se considera lógico este resultado, ya que la cepa *A. brasilense* Sp7 fue aislada de la rizosfera de *Digitaria decumbes* y la cepa *A. brasilense* R5(15), por el contrario, procede de la rizosfera del arroz, variedad J-104. Como es conocido, los atrayentes segregados por las raíces de los vegetales tienen como misión movilizar y favorecer el establecimiento de colonias de bacterias u hongos simbióticos beneficiadores para la planta, actuando de manera selectiva sobre las diferentes poblaciones.

En investigaciones realizadas por diversos autores (1), se ha podido comprobar que tanto *A. lipoferum* como *A. brasilense* poseen una fuerte actividad quimiotáctica hacia diversos azúcares, ácidos orgánicos y aminoácidos, así como hacia compuestos aromáticos. Se ha visto,

además, que la respuesta quimiotáctica hacia diferentes fuentes de carbono es variable, dependiendo de la especie de *Azospirillum* e incluso es cepa-específica (6, 7). Se sugiere que tanto las respuestas quimiotáctica como aerotáctica son características que contribuyen en el proceso de colonización de las raíces de las plantas, ya que el consumo de oxígeno durante el crecimiento activo de las raíces enriquece el ambiente con sustratos orgánicos, de igual forma que genera gradientes de oxígeno, al consumirse este durante la respiración. No obstante, la colonización de la rizosfera y la superficie o el interior de las raíces será el resultado del enriquecimiento selectivo de los microorganismos mejor adaptados a estos ambientes (6, 8).

Son diversos los microorganismos (hongos y bacterias) que producen auxinas como producto del metabolismo del aminoácido L-Triptófano (9), las que afectarán a las plantas si no son asimiladas por otros microorganismos.

Las rizobacterias del género *Azospirillum*, si bien son conocidas como microorganismos diazotróficos, el aporte de nitrógeno que realizan a las plantas que colonizan, no contribuye a su nutrición nitrogenada; sin embargo, algunos estudios indican que inoculando a los cereales con estas bacterias, se observan cambios que favorecen el crecimiento y desarrollo del vegetal. En estudios más recientes, numerosos autores plantean que son los efectos hormonales de estas rizobacterias las que originan aumentos en los rendimientos de aquellos cultivos que son beneficiados (10, 11).

Al determinar la concentración de la auxina ácido indol acético en esta investigación, se obtiene que la cepa *A. brasilense* Sp7 produce $11.82 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y la cepa R5(15) $16.60 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. La acción de esta hormona se traduce en la modificación del contenido de fitohormonas de las plantas, lo que conduce al aumento del sistema radical y consecuentemente mayor superficie de absorción de nutrientes, así como un mayor desarrollo de la parte aérea de las plantas. Por su parte, otros investigadores (12) plantean además que el ácido indol acético se produce como respuesta de los microorganismos a la interacción con la planta que coloniza y a sus exudados.

La interacción positiva entre las plantas y los microorganismos de la rizosfera puede mejorar la nutrición de las plantas, aumentando la fijación de nitrógeno, la tolerancia a limitaciones ambientales y controlar biológicamente a los patógenos, reduciendo la necesidad de fertilizantes y pesticidas (10, 13). En general, la utilización práctica de algunos microorganismos, como son las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, ya no puede ser ignorada en los planes agroforestales, por sus aportes al desarrollo sano y vigoroso de los cultivos.

REFERENCIAS

1. Bashan, Y. y Holguin, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances. *Can. J. Microbiol.*, 1997, vol. 43, p. 103-121.
2. Burdman, S.; Jurkevitch, E. y Okon, Y. Recent advances in the use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in agriculture. En: *Microbial interactions in agriculture and forestry*, Enfield : Science Publishers, 2000-p. 225-250.
3. Burdman, S.; Okon, Y. y Jurkevitch, E. Surface characteristics of *Azospirillum brasilense* in relation to cell aggregation and attachment to plant roots. *Crit. Rev. Microbiol.*, 2000, vol. 26, p. 91-110.
4. Caballero-Mellado, J.; Von Scheven-Cordero, E.; González-Cu, G. R. y Aguirre, J. F. *Azospirillum* inoculation and its agronomic application in Mexico. En: *European Nitrogen Fixation Conference*. (4:2000:Sevilla). p. 45.
5. Carreno-Lopez, R.; Campos-Reales, N.; Elmerich, C. y Baca, B. E. Control of *Azospirillum brasilense* NifA activity by P(II): effect of replacing Tyr residues of the NifA N-terminal domain on NifA activity. Physiological evidence for differently regulated tryptophan-dependent pathways for indole-3-acetic acid synthesis in *Azospirillum brasilense*. *Mol. Gen. Genet.*, 2000, vol. 264, no. 4, p. 521-530.
6. Troch, P. de y Vanderleyden, J. Surface properties and motility of *Rhizobium* and *Azospirillum* in relation to plant root attachment. *Microb. Ecol.*, 1996, vol. 32, p. 149-169.
7. Grapelly, A. y Rossi, W. The effect of phytohormones produced by *Arthrobacter* sp. on the phosphatase activity in plants roots. *Folia Microbiol.*, 1981, vol. 26, p. 137-141.
8. Hirsch, A. M.; Fang, Y.; Asad, S. y Kapulnik, Y. The role of phytohormones in plant-microbe symbiosis. *Plant Soil*, 1981, vol. 194, p. 171-184.
9. Itzigsohn, R.; Burdman, S.; Okon, Y.; Zaady, E.; Yonatan, R. y Perevolotsky, A. Plant-growth promotion in natural pastures by inoculation with *Azospirillum brasilense* under suboptimal growth conditions. *Arid Soil Res. Rehab.*, 2000, vol. 13, p. 151-158.
10. Kirschbaur, D. S. Reunión Científico Técnica de Biología del Suelo, Fijación Biológica del Nitrógeno. Catamarca : Univ. de Catamarca, 1999. p. 165-168.
11. Krebs, K. G.; Heusser, D. y Wimmer, H. Spray reagent. En: *The layer chromatography*. Springer-Verlag : New York, 1969, p. 854-909.
12. Lambrecht, M.; Okon, Y.; Vande Broek, A. y Vanderleyden, J. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. *Trends Microbiol.*, 2000, vol. 8, p. 298-300.
13. Pereg-Gerk, L.; Paquelin, A.; Gounon, P.; Kennedy, I. R. y Elmerich, C. A transcriptional regulator of the LuxR-UhpA family, FlcA, controls flocculation and wheat root surface colonization by *Azospirillum brasilense* Sp7. *Mol Plant Microbe Interact. Mar.*, 1998, vol. 11, no. 3, p. 177-87.

Recibido: 3 de julio del 2002

Aceptado: 2 de abril del 2003