

ESTUDIO DE ALGUNOS GÉNEROS MICROBIANOS ASOCIADOS A DIFERENTES VARIEDADES DE TRIGO (*Triticum aestivum* L.) EN SUELO FERRALÍTICO ROJO

Annia Hernández[✉], R. Plana, Gloria M. Martín y J. L. Santander

ABSTRACT. The predominant bacterial genera were studied in the rhizosphere of four wheat varieties (*Triticum aestivum* L.) grown in a Red Ferralitic soil. The chemoattraction of some rhizobacteria was also evaluated toward root exudates of this crop. The Espermospher Model was used for the isolation and collector tubes and the chemotaxis camera modified for the evaluation of the chemotactic effect of those radical exudates. Results demonstrated that in Gang and Caete varieties, *Pseudomonas* is a dominant population, *Pseudomonas (Burkholderia) cepacia* being the most strongly attracted species by those root exudates at 14 days and 40 minutes of exposure. In Culiacam and Antisama varieties, *Azospirillum* is the predominant genus in the rhizosphere, this species being the most strongly attracted by radical exudates at 14 days and 60 minutes of exposure. This investigation allows fertilizer application based on predominant microbial genera of wheat rhizosphere, strengthening its activity without altering soil biology.

Key words: chemotaxis, wheat, rhizosphere, bacteria

RESUMEN. Se estudiaron los géneros bacterianos predominantes en la rizosfera de cuatro variedades de trigo (*Triticum aestivum* L.) crecido en un suelo Ferralítico Rojo. También se evaluó la quimioatracción de algunas rizobacterias hacia los exudados radicales de este cultivo. Se utilizó el Modelo Espermoférico para el aislamiento y los tubos colectores y la cámara de quimiotaxis modificada para la evaluación del efecto quimiotáctico de los exudados radicales. Los resultados obtenidos demostraron que en las variedades Gang y Caeté, *Pseudomonas* es la población dominante, siendo *Pseudomonas (Burkholderia) cepacia* la especie más fuertemente atraída por los exudados radicales a los 14 días y 40 minutos de exposición. En las variedades Culiacam y Antisama, es el género *Azospirillum* el predominante en la rizosfera, siendo esta especie la más fuertemente atraída por los exudados radicales a los 14 días y 60 minutos de exposición. Esta investigación permite la aplicación de biofertilizantes a base de los géneros microbianos predominantes en la rizosfera del trigo, potenciando su actividad sin alterar la biología del suelo.

Palabras clave: quimiotactismo, trigo, rizosfera, bacteria

INTRODUCCIÓN

Un amplio número de microorganismos son comúnmente encontrados en el suelo, incluyéndose entre ellos bacterias, hongos, actinomicetos, protozoos y algas (1). La diversidad y el número en que aparecen en la rizosfera depende en gran medida de la composición y concentración de los nutrientes exudados por las raíces de las plantas.

La interacción entre los microorganismos rizosféricos y las raíces de las plantas puede ser beneficiosa, dañina o neutral. En ocasiones este efecto puede variar en dependencia de las condiciones del suelo (1). Desde el punto de vista ecológico, es importante conocer los integrantes de la comunidad bacteriana, favoreciendo la aplicación de inoculantes sin provocar daños en el equilibrio biológico de los suelos.

La inoculación del trigo (*Triticum aestivum* L.) con bacterias benéficas que estimulan el crecimiento vegetal y/o biocontrolan patógenos ha sido informada por varios autores. Así se han encontrado efectos positivos al inocular este cultivo con bacterias de los géneros *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Beijerinckii*, *Pseudomonas* y otros (2), lográndose en todos los casos incrementos en los pesos seco y fresco de la parte aérea, la altura de las plantas y del rendimiento y sus componentes (3, 4).

Este trabajo tiene como objetivos estudiar algunos géneros bacterianos predominantes en la rizosfera de cuatro variedades de trigo y evidenciar la quimioatracción de algunas rizobacterias hacia los exudados radicales de este cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Se utilizó el cultivo del trigo (*Triticum aestivum* L.), variedades comerciales Gang, Culiacam, Caeté y Antisana, crecidas en suelo Ferralítico Rojo, extraído del Departamento de Servicios Agrícolas del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas perteneciente a la Gran Llanura Roja Habana-Matanzas, ubicada a 138 m snm.

Ms.C. Annia Hernández, Investigador Agregado; Gloria M. Martín y J. L. Santander, Investigadores del Departamento de Biofertilizantes y Nutrición de las Plantas; Dr.C. R. Plana, Investigador Titular del Departamento de Fitotecnia, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana, Cuba. CP 32 700.

✉ annia@inca.edu.cu

Características del suelo. Al suelo utilizado se le determinaron algunas propiedades químicas (Tabla I) en el Laboratorio de Análisis Químico del Departamento de Biofertilizantes y Nutrición de las Plantas del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (5).

Tabla I. Principales características químicas del suelo empleado

Localidad	Tipo de suelo	K ⁺	Ca ²⁺ Mg ²⁺ (Cmol.kg ⁻¹)	P (ppm)	Materia orgánica (%)	PH (H ₂ O)
San José, La Habana.	Ferralítico Rojo	0.76	15.5 4.07	175.4	3.57	7.3

El suelo Ferralítico Rojo se caracteriza por tener un contenido alto de materia orgánica para este tipo de suelo, un pH ligeramente alcalino y un contenido medio de Ca, K, Mg y P. Estos suelos presentan un predominio de minerales arcillosos del tipo 1:1. El proceso de formación de estos es de Ferralitización, caracterizado por una alteración intensa de los minerales y acumulación de óxidos e hidróxidos de hierro y aluminio. Estos suelos tienen una capacidad retentiva del agua de media a baja y tienen una alta productividad agrícola (6).

Caracterización de la rizosfera. Se tomaron plantas de tres semanas de sembradas, a partir de las cuales se conformaron cinco muestras (7). El muestreo se repitió tres veces en diferentes áreas de la misma localidad. Se pesó un gramo de suelo rizosférico por muestra, se maceró en morteros estériles, se agitó en vortex y se llevó a un volumen final de 100 mL de solución salina fisiológica (PBS). Se realizaron diluciones seriadas de 10⁻¹ a 10⁻¹⁰ (8).

Las semillas de trigo de las variedades en estudio, previamente desinfectadas (7) y germinadas, se colocaron en tubos espermosféricos (9) que contenían medio mineral semisólido Watanabe. Posteriormente, se inocularon con alícuotas de 0.1 mL de cada una de las diluciones seriadas y se incubaron con un fotoperíodo de 14 horas luz-10 horas oscuridad a 30°C durante siete días. Se montaron cinco tubos de cada dilución.

Para el aislamiento se utilizaron los medios Agar Nutriente (microbiota total), King B (*Pseudomonas*), Watanabe (*Bacillus*), Caseína almidón agar (*Streptomyces*), Asbhy (*Azotobacter*) y Nfb-Rojo Congo Agar (*Azospirillum*) (8). Las cepas fueron identificadas mediante la combinación de métodos tradicionales y serológicos (10).

Colección de exudados radicales. Se estudió la quimioatracción de los exudados de las cuatro variedades de trigo en estudio hacia diferentes especies de rizobacterias pertenecientes a los géneros dominantes en la rizosfera (*Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* y *Azospirillum brasilense*). Para la colección de los exudados radicales, se desinfectaron semillas de las variedades en estudio (11), se pregerminaron y colocaron en tubos colectores que contenían solución nutritiva de Hoagland diluida 1:2 (12). Se colocó una planta en cada tubo. Se incubaron bajo un fotoperíodo de 14 h luz-

10h oscuridad, a temperatura ambiente. Se desmontaron 10 tubos a los siete días y 10 a los 14 días. Los exudados fueron colectados y guardados a 4°C.

Determinación del efecto quimiotáctico. Para evaluar el efecto quimiotáctico de los exudados radicales se utilizó la cámara de quimiotaxis modificada (12). En el pocillo se colocaron 0.5 mL de la suspensión bacteriana de las cepas en estudio ajustada a una concentración de 10⁸UFC.mL⁻¹. En un capilar se colocaron los exudados radicales y en el otro solución de Hougland estéril. Se permitió la entrada de las bacterias al capilar a tiempos de 20, 40 y 60 minutos de exposición. Posteriormente, los capilares fueron extraídos y su contenido se diluyó en agua destilada estéril. Se sembró en medio Agar Nutriente y se incubó a 30°C durante 48 horas. Se cuantificó el número de UFC.mL⁻¹.

Análisis estadístico. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante un análisis de varianza con arreglo trifactorial, mediante el procesador estadístico Start (Ver 4.10, 1998), tomando como factores las cepas en estudio, la edad de los exudados radicales (siete y 14 días) y los minutos de exposición (20, 40 y 60).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El empleo del Modelo Espermosférico permitió el aislamiento de un conjunto de cepas pertenecientes a diferentes grupos microbianos. De ellas 36 fueron clasificadas como pertenecientes al género *Pseudomonas*, 30 como *Azospirillum*, 23 como *Bacillus*, 18 como *Azotobacter* y nueve como *Streptomyces*, por la correspondencia de sus características con las cepas de referencia (Tabla II).

Tabla II. Principales características micromorfológico-culturales de los géneros microbianos en estudio

Género	Características culturales	Respuesta a la tinción de gram	Motilidad
<i>Pseudomonas</i>	Colonias pequeñas redondas, de apariencia translúcida, presencia de pigmentos difusibles en agar	-	+
<i>Azospirillum</i>	Colonias pequeñas con bordes irregulares, secas, opacas, color rojo escarlata	-	+
<i>Bacillus</i>	Colonias pequeñas, cóncavas, con bordes regulares, opacas	+	+(Presencia de endosporas)
<i>Azotobacter</i>	Colonias pequeñas, convexas, secas, con bordes regulares, producción de pigmentos insolubles en el agar	-	+/-
<i>Streptomyces</i>	Crecimiento micelial, olor a suelo húmedo, presencia de esporóforos formando micelio aéreo y micelio sustrato	NR	NR

NR: no responde

Numerosas investigaciones han sido desarrolladas con el objetivo de aislar microorganismos rizosféricos asociados a diferentes cultivos de interés agrícola, mediante este modelo. Diversos autores plantean que al emplear este procedimiento aumenta la probabilidad de conocer la verdadera composición y estructura de la comunidad bacteriana asociada con las raíces de las plantas estudiadas (13).

En este sentido, dicho procedimiento fue utilizado para el aislamiento de rizobacterias de la rizosfera del maíz en tres localidades edafoclimáticas de la provincia La Habana, demostrando su efectividad para estos fines (7). Asimismo se demostró que mediante este modelo se logra favorecer el aislamiento de nuevos tipos bacterianos, permitiendo además esclarecer algunos aspectos relacionados con la interacción planta-bacteria (14).

Las cepas de *Pseudomonas* y *Azospirillum* mostraron respuesta positiva al ser enfrentadas a los antiseros anti-*Pseudomonas* sp. y anti-*Azospirillum* sp., mediante inmunofluorescencia indirecta, cuestión que corrobora los resultados obtenidos mediante los métodos tradicionales. Estudios realizados han demostrado la importancia de combinar métodos tradicionales con serológicos, con vistas a viabilizar el diagnóstico microbiano (10, 14).

Determinación de la frecuencia de aparición de los géneros estudiados. Como se puede observar, la estructura de la comunidad microbiana en las variedades Gang y Caeté es muy similar, apareciendo el género *Pseudomonas* como dominante, seguido por *Azospirillum*, *Bacillus*, *Azotobacter* y *Streptomyces* (Figura 1).

Mientras en las variedades Culiacam y Antisama es *Azospirillum* quien aparece dominando en la rizosfera del cultivo, seguido por los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azotobacter* y *Streptomyces*. Esto podría deberse al amplio espectro de exudados radicales producidos por el cultivo del trigo, los cuales seleccionan y estimulan el tipo bacteriano que lo colonizan. Se dice que existen diferencias en la respuesta de este cultivo cuando se inocula con rizobacterias, lo cual podría deberse a la variabilidad que existe en el tipo y la composición de los exudados radicales entre las variedades (15).

Es frecuente que *Pseudomonas* constituya poblaciones sobresalientes en la rizosfera, lo cual se explica por poseer un corto período de latencia, rápida velocidad de crecimiento y metabolismo versátil, además de producir una amplia gama de metabolitos secundarios, lo que le permite asociarse fuertemente a las raíces y multiplicarse con facilidad (7).

En diferentes estudios realizados se demostró que este género constituye una población dominante en la rizosfera del cultivo del maíz, destacándose en este caso *B. cepacia* por la mayor frecuencia de aparición (10). Así mismo se demostró la presencia abundante de este grupo en la rizosfera del cultivo de la gerbera, constituyendo la población de *Pseudomonas* el 30.6 % de la microbiota total (16). Estudios de taxonomía polifásica, que involucran técnicas de Biología Molecular, han demostrado que *B. cepacia* es una rizobacteria comúnmente asociada a las plantas (17).

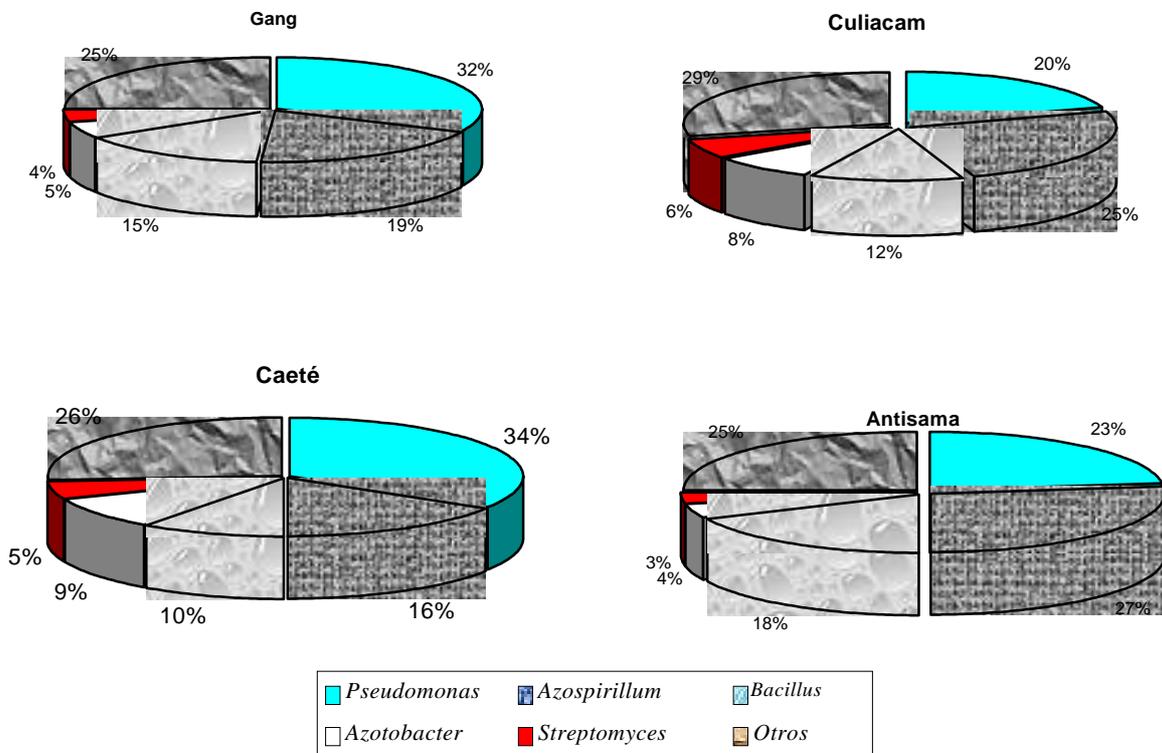


Figura 1. Frecuencia de aparición de los géneros estudiados en las variedades analizadas

Con regularidad aparecen en los aislamientos de la rizosfera de gramíneas, poblaciones altas del género *Azospirillum*. Se demostró que este género constituye una población dominante en el cultivo del arroz, variedad J-104, sembrada sobre suelos Ferralítico Rojo y Ferralítico Amarillento (14). En caña de azúcar también predomina este género microbiano (18). Sin embargo, en maíz demostró que aparece en poblaciones relativamente pequeñas en relación con la población bacteriana heterotrófica total (9, 10).

Una gran parte de los estudios realizados en la zona rizosférica de las *Poaceas* evidencian que las especies correspondientes a los géneros *Bacillus* y *Azotobacter* se hayan presentes en una pequeña proporción (19). *Streptomyces* presentó los menores porcentajes, sin embargo, diversos autores han demostrado su presencia

abundante en diferentes ecosistemas. Así, se demostró su alta frecuencia de aparición en caña de azúcar y maíz (20).

Quimiotaxis de la interacción planta-bacteria. Para las variables estudiadas en las cuatro variedades, se presentó una interacción significativa entre los factores analizados, lo cual indica el efecto conjunto de las cepas, la edad de los exudados radicales y el tiempo de exposición.

En las variedades Gang y Caeté, *Pseudomonas (Burkholderia) cepacia* es la especie más fuertemente atraída por los exudados radicales del cultivo. En la variedad Gang, seguida por *A. brasilense* y *P. fluorescens*, mientras que en Caeté ocurre lo contrario (Figura 2). En todos los casos, la mayor atracción se obtuvo a los 14 días y 40 minutos de exposición.

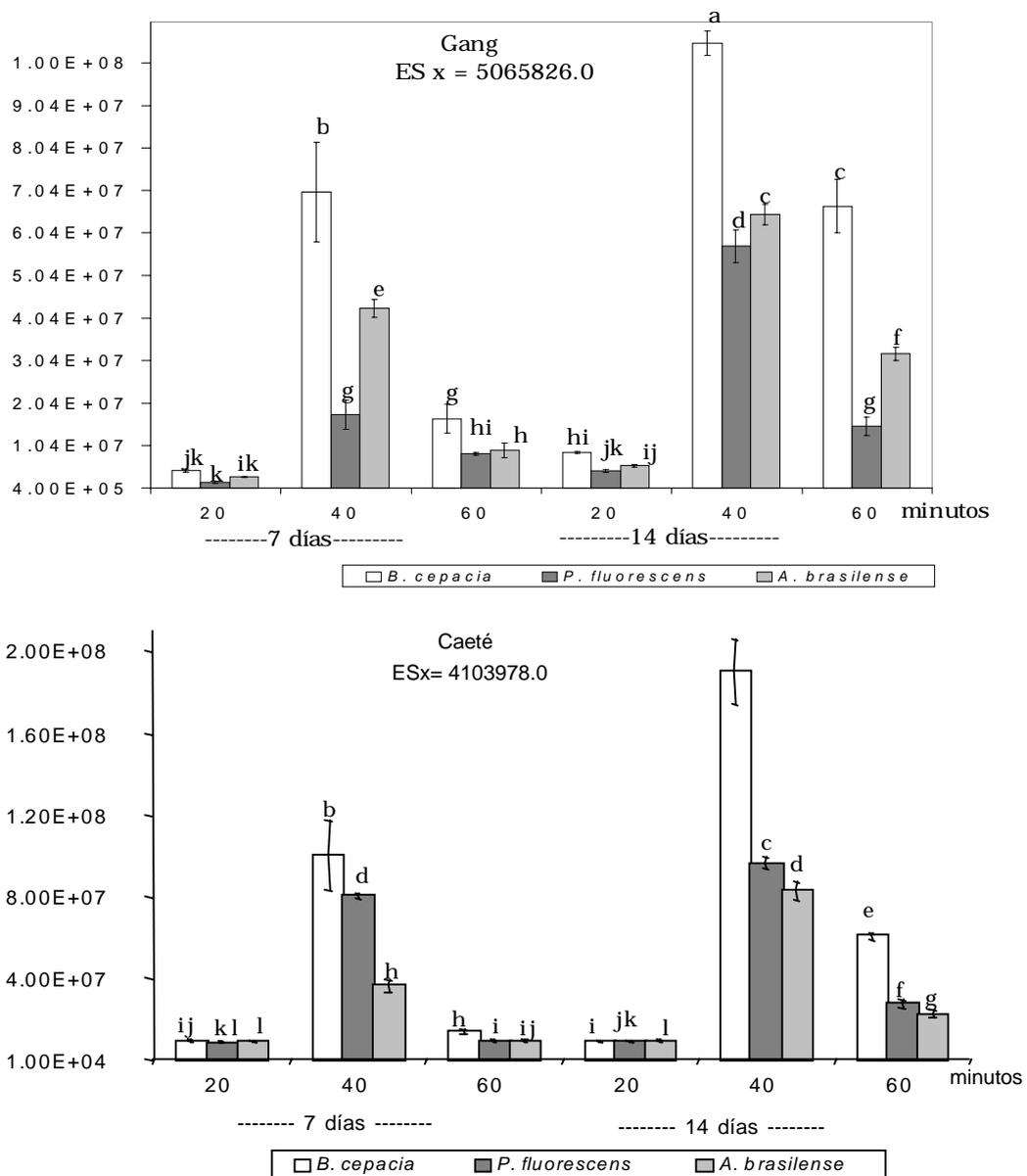


Figura 2. Respuesta quimiotáctica de las cepas en estudio ante exudados radicales de las variedades Gang y Caeté

En el caso de las variedades Antisama y Culiacam, la mayor atracción se establece con cepas de *Azospirillum*, y exudados de 14 días de edad, a los 60 minutos de exposición, diferenciándose significativamente del resto de los tratamientos (Figura 3).

En este experimento se demuestra que los exudados radicales colectados durante siete y 14 días pueden contener diferentes sustancias liberadas por las raíces de las plantas. En este caso, la mayor atracción se establece con exudados radicales de 14 días de edad, corroborando los resultados obtenidos por otros autores, quienes señalan que en los exudados radicales se encuentran presentes compuestos tales como azúcares y aminoácidos, y que su composición puede diferir con la edad del cultivo (21), desempeñando un importante papel en el establecimiento de los microorganismos en la rizosfera.

Los resultados obtenidos coinciden con otros estudios realizados en gramíneas. En el cultivo del maíz, en un estudio con exudados radicales de siete, 14 y 21 días de edad, se demostró que la mayor respuesta quimiotáctica de *Burkholderia cepacia* se produce con exudados de 14 días (24). En el arroz se demostró que las cepas de *Azospirillum* eran las más fuertemente atraídas por los exudados radicales del cultivo (14, 22).

Se evidencia que el tiempo óptimo para evaluar el potencial quimiotáctico en el trigo es de 40 ó 60 minutos, en dependencia de la variedad. Este comportamiento podría estar relacionado con la atracción y motilidad de las rizobacterias en estudio, cuestión que coincide con la mayor entrada de microorganismos al capilar.

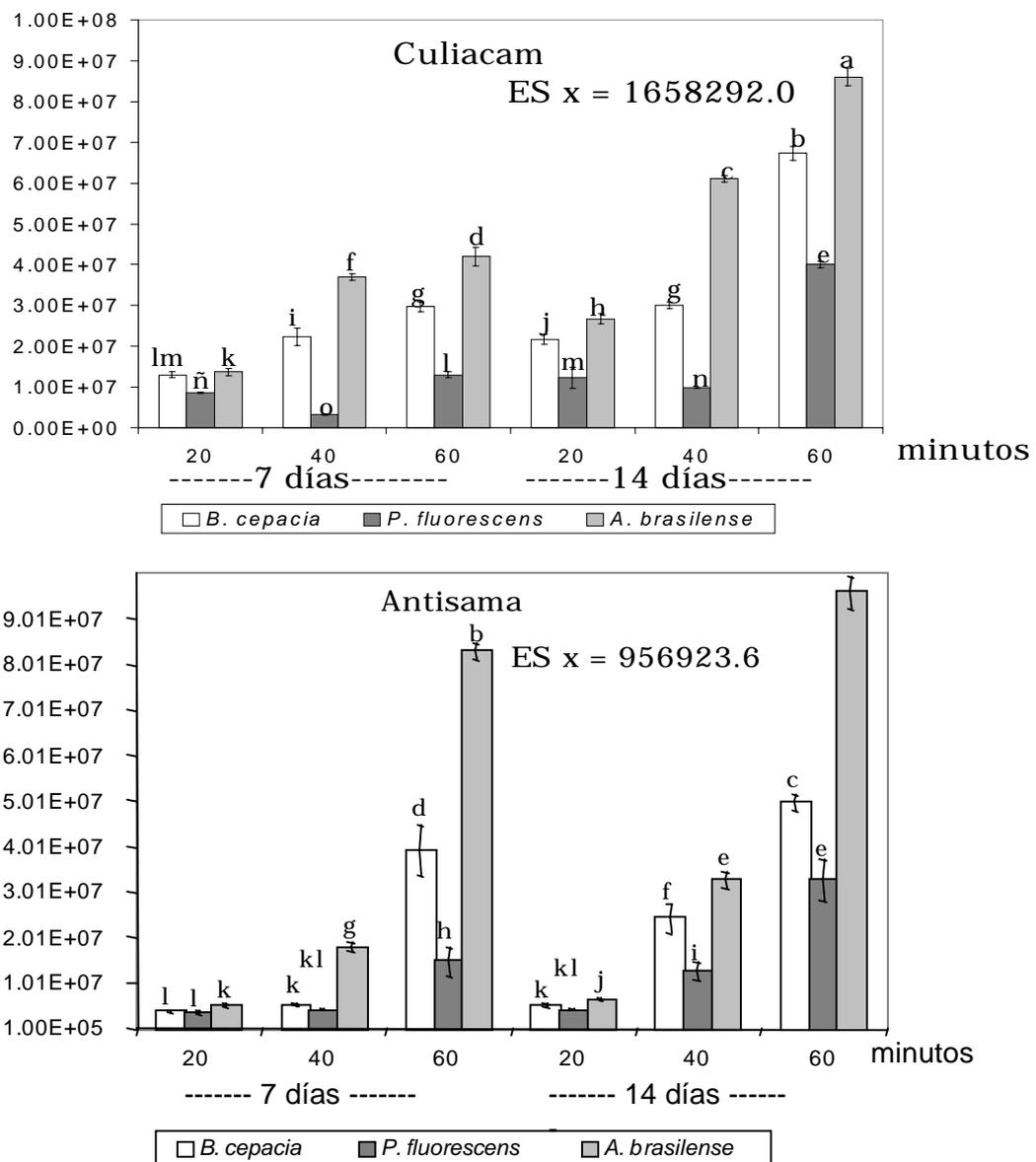


Figura 3. Respuesta quimiotáctica de las cepas en estudio ante exudados radicales de la variedades Culiacam y Antisama

Las raíces de las plantas secretan un complejo polisacárido mucilaginoso, que constituye fuente de carbono para el desarrollo de los microorganismos, ejerciendo un efecto selectivo sobre los microorganismos en la rizosfera. Estudios realizados con el mucílago producido por plantas de trigo, arroz y maíz purificado y como única fuente de carbono para el desarrollo de microorganismos rizosféricos, demostraron que *P. fluorescens* y *B. cepacia* crecen normalmente en estas condiciones (23).

Mediante el empleo de la cámara de quimiotaxis, fue posible conocer que los compuestos presentes en los exudados radicales de las diferentes variedades de trigo estudiadas atraen a las especies bacterianas en estudio, cuestión que no ocurre en el caso del capilar utilizado como testigo, donde no existió crecimiento microbiano al sembrarse en el medio Agar Nutriente.

Constituye un principio básico de las relaciones planta-microorganismo conocer el comportamiento de las especies estudiadas ante exudados radicales de las plantas de interés, debido a que ellos son utilizados inmediatamente por los microorganismos que viven en la superficie de las raíces y la rizosfera, sirviendo como fuente de nutrientes y energía (24). De este modo, inhiben o estimulan la actividad microbiana e influyen indirectamente en las interrelaciones entre los microorganismos colonizadores, a través de la acción selectiva que ejercen sobre especies o grupos particulares.

Esta investigación permite la aplicación de biofertilizantes a base de los géneros microbianos predominantes en la rizosfera del trigo, potenciando su actividad sin alterar la biología del suelo.

REFERENCIAS

- Lynch, J. M. The rhizosphere. London: Mc. Millansd, 1990. 366 p.
- Jacoud, B. /et al./ Initiation of root growth stimulation by *Azospirillum lipoferum* CRT1 during maize seed germination. *Can. J. Microbiol.*, 1999, vol. 45, p. 339-342.
- Valdivia-Urdiales, Fernández, J. M. y Sánchez- Yáñez, J. M. Efecto de la inoculación de *P. putida* y *Glomus* sp. sobre trigo. *Rev. Lat-Amer. Microbiol.*, 1999, vol. 41, p. 214-217.
- Withmore, A. P. The biological management of soil fertility project. *Neth. J. Agric. Sci.*, 2000, vol. 48, p. 115-122.
- Paneque, V. M. /et al./ Manual de análisis de laboratorio para suelo, foliar y aguas residuales. En: Fórum de Ciencia y Técnica. INCA. (13:2000:San José de las Lajas).
- Cuba. MINAGRI. Instituto de Suelos. Nueva versión de clasificación genética de los suelos de Cuba. La Habana : Agrifor, 1999, 64 p.
- Hernández, A. N. Selección de rizobacterias para al biofertilización en el cultivo del maíz. [Tesis de Maestría], Facultad de Biología; Universidad de La Habana, 1996. 48 p.
- Bashan, Y. Potential use of *Azospirillum* as biofertilizer. *Turrialba*. 1993, vol. 23, no. 4, p. 286-291.
- Thomas-Bauzon, D. /et al./ The Espermopher Model and its use in growing counting and isolating N-fixing bacteria from the rizosphere of rice. *Can. J. Microbiol.*, 1982, vol. 28, p. 922-928.
- Hernández, A. Caracterización de cepas de *Pseudomonas (Burkholderia cepacia)* y *P. fluorescens* aisladas de la rizosfera del maíz. [Tesis de Maestría], Facultad de Biología, Universidad de La Habana, 1998. 48 p.
- Hernández, A. N. Rizobacterias para la biofertilización del maíz. Reporte a las Naciones Unidas. México. 1998. 22 p.
- Jiménez, M. Estudio de la interacción plantas de arroz-rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. [Tesis de grado], Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. México. 1997. 101 p.
- Omar, A. /et al./ Using the spermosphere model technique to describe the dominant nitrogen-fixing microflora associated with wetland rice in two Egyptian soils. *Biol. Fertil. Soils.*, 1989, vol. 1, p. 158-163.
- Pazos, M. Aislamiento e identificación de cepas nativas, pertenecientes al género *Azospirillum* mediante técnicas moleculares. [Tesis de Maestría], Universidad de La Habana, 2000. 82 p.
- Sánchez-Yañez, J. M. Influencia de bacteria y ácidos húmicos en trigo (*Triticum aestivum* L.) bajo riego. Anuario del IIQB; UMSNH. México. 1994.
- Hernández, A.; García, D.; Soroa, M. R. y Hernández, A. N. Estudio de géneros bacterianos asociados a la rizosfera de los cultivos de gerbera y clavel. *Cultivos Tropicales*, 2000, vol. 21, no.3, p. 15-18.
- Balandreau, J. /et al./ *Burkholderia cepacia* genomovar III is a common plant-associated bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, vol. 67, no. 2, p. 982-985.
- Hernández, A. I. *Azospirillum lipoferum* y *Azospirillum brasilense*, sus relaciones con maíz y caña de azúcar. [Tesis de Maestría], Facultad de Biología. Universidad de La Habana, 1995.
- Arschner; P. y Crowley, D. Iron stress and pyoverdinin production by a fluorescent pseudomonad in the rhizosphere of white lupine (*Lupinus albus* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.). *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, vol. 63, no. 1, p. 277.
- Heydrich, M.; Fernández, A. I. y Fernández, C. Taxonomía y serología de cepas de actinomicetos aislados del rizoplano de la caña de azúcar. *Ciencias de la Agricultura*, 1986, vol. 29, p. 99-111.
- Manson, M.; Armitage, J.; Hoch, J.; Macnab, R. Bacterial locomotion and signal transduction. *J. Bacteriol.*, 1998, vol. 180, p. 1009-1922.
- Bashan, Y.; Holguín, G. y Ferrera-Cerrato, R. Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos. I *Azospirillum*. *Ferra*, 1996, vol. 14, no. 2, p. 159-195, 26.
- Knee, E. M. /et al./ Root mucilage from pea and its utilization by rhizosphere bacteria as a sole carbon source. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 2001, vol. 14, no. 6, p. 775-784.
- Velázquez, M. /et al./ Estudio de la interacción maíz-*Burkholderia cepacia*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 1999, vol. 41, p. 17-23.

Recibido: 2 de julio del 2001

Aceptado: 13 de diciembre del 2001