

EVALUACIÓN DE CEPAS NATIVAS DEL GÉNERO *Azospirillum* Y SU INTERACCIÓN CON EL CULTIVO DEL ARROZ

Mabel Pazos[✉] y Annia Hernández

ABSTRACT. Fourteen native strains belonging to *Azospirillum brasilense* species were characterized for their capacity to fix atmospheric nitrogen. Their effect was studied on rice (*Oryza sativa*) cultivation by means of Microcosm model. Inoculated plant height, fresh weight of root, free phenol content and protein quantification were determined in leaves. A positive effect for the inoculation with these rhizobacteria was observed in all cases, R5(15) strain being remarkable with the highest increments of the indicators studied.

Key words: *Azospirillum*, rice, proteins, nitrogen fixation, phenolic compounds

RESUMEN. Catorce cepas nativas pertenecientes a la especie *Azospirillum brasilense* se caracterizaron en cuanto a su capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico. Se estudió su efecto en el cultivo del arroz (*Oryza sativa*), mediante el modelo Microcosmos, realizando determinaciones de la altura de las plantas inoculadas, masa fresca de la raíz y el contenido de fenoles libres y la cuantificación de proteínas en las hojas. Se observó en todos los casos un efecto positivo por la inoculación con estas rizobacterias, donde se destaca la cepa R5(15) con los mayores incrementos en los indicadores estudiados.

Palabras clave: *Azospirillum*, arroz, proteínas, fijación del nitrógeno, compuestos fenólicos

INTRODUCCIÓN

El empleo de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en el beneficio de cultivos de interés económico, cobra cada día mayor auge, debido al incremento en la demanda de alimentos y a la búsqueda de alternativas para lograr una agricultura sostenible, libre de contaminantes químicos.

El género *Azospirillum* sp es bien conocido como fijador de nitrógeno y se encuentra habitualmente en asociación con las raíces de pastos y cereales de diferentes regiones del mundo, donde se ha observado que la bacterización con cepas de este género se traduce en un aumento significativo de los rendimientos y, consecuentemente, en el ahorro de fertilizantes minerales y la disminución de la contaminación ambiental (1).

La caracterización de bacterias rizosféricas y el estudio de los efectos que produce su inoculación en las plantas, contribuye al esclarecimiento de la interacción planta-microorganismo; el empleo de estas como inoculantes bacterianos ha puesto en evidencia la influencia que ellas ejercen sobre algunas respuestas fisiológicas y bioquímicas en las plantas, en cuyo caso se encuentran los compuestos fenólicos y las proteínas (2).

El presente trabajo tiene como objetivos caracterizar cepas nativas pertenecientes a la especie *Azospirillum brasilense*, en cuanto a su capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico y emplear el modelo Microcosmos para estudiar el efecto de estas en el cultivo del arroz.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon 14 cepas bacterianas previamente aisladas de la rizosfera del cultivo del arroz e identificadas como pertenecientes a la especie *Azospirillum brasilense* mediante combinación de métodos tradicionales y moleculares (3). Se utilizó la cepa *A. brasilense* Sp 7 ATCC como patrón y se realizó la determinación de la capacidad fijadora de nitrógeno mediante el método indirecto de actividad reductora del acetileno (ARA) en cromatógrafo gaseoso (4). Las cepas fueron inoculadas en 2 mL de medio semisólido (5) contenido en viales de 5 mL de capacidad con tapones de algodón y se incubaron a 37°C durante 24 h. Se empleó un diseño completamente aleatorizado con tres observaciones para cada cepa.

Se realizó el montaje del modelo Microcosmos (6) (Figura 1), para lo cual se sembró una semilla de arroz de la variedad J-104 pregerminada, en jeringuillas hipodérmicas que contenían 8 g de suelo Ferralítico Cuarcítico procedente del Complejo Agroindustrial Arrocero «Los Palacios», Pinar del Río y, con posterioridad, se procedió a la inoculación de 2 mL de las suspensiones bacterianas obtenidas por fermentación en zaramda utilizando caldo nutriente a 30°C durante 24 horas. Se establecieron 16 tratamientos con tres observaciones.

A los 23 días de la inoculación se midió la altura de las plántulas, se determinaron la masa fresca de la raíz y el contenido de fenoles libres en hojas (7) y se efectuó la cuantificación de proteínas solubles en hojas (8). Los datos obtenidos en cada determinación se analizaron según un análisis de varianza completamente aleatorizado, balanceado.

Ms.C. Mabel Pazos, Investigadora y Ms.C. Investigador Agregado del Departamento de Biofertilizantes y Nutrición de las Plantas, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.

✉ mpazos@inca.edu.cu



Figura 1. Modelo Microcosmos

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todas las cepas presentaron actividad reductora del acetileno (ARA), como se aprecia en la Tabla I; sus valores oscilaron entre 19-114 nmoles de C_2H_4 . La mayor capacidad de reducción la presentó la cepa R5(15), que se diferenció significativamente de las restantes. Estos resultados son superiores a los encontrados al estudiar bacterias nitro fijadoras pertenecientes a la especie *Azospirillum irakense* aisladas de la rizosfera del cultivo del arroz en Iraq (9).

Tabla I. Actividad reductora del acetileno de las cepas en estudio

| Tratamientos | Media de nmoles de C_2H_4 /h/m |
|---------------------------|----------------------------------|
| <i>A. brasilense</i> Sp 7 | 93.32 c |
| R 5 (3) | 42.64 d |
| R 5 (8) | 43.32 d |
| R 5 (9) | 37.44 e |
| R 5 (10) | 38.73 e |
| R 5 (11) | 35.82 e |
| R 5 (13) | 19.24 h |
| R 5 (14) | 96.29 bc |
| R 5 (15) | 114.00 a |
| R 5 (18) | 21.98 g |
| R 5 (19) | 101.00 b |
| R 5 (20) | 95.67 c |
| R 5 (21) | 29.23 f |
| R 5 (33) | 98.72 b |
| R 5 (36) | 35.34 e |
| ESx | 1.38*** |

Estudios de laboratorio demuestran que particularmente las cepas del género *Azospirillum* reducen más intensamente el acetileno que otros grupos microbianos con igual capacidad, al ser observados diferentes diazotófos de la rizosfera del arroz y caña de azúcar, y encontrar que los mayores valores de reducción del acetileno se correspondieron con los de este género (10).

Este resultado es importante si se tiene en cuenta que las gramíneas son potencialmente capaces de establecer simbiosis con bacterias diazotróficas, como es el caso de *Azospirillum*; en tal sentido, el aporte de nitrógeno a la planta puede ser fundamental en etapas críticas del desarrollo vegetal, tales como la reproducción y la generación de retoños (11).

La altura de las plántulas se vio estimulada en todos los tratamientos donde se inoculó con rizobacterias con respecto al control (Figura 2). Se destacan los tratamientos donde se emplearon las cepas R5(15), R5(19), R5(33), R5(14) y R5(20) por los mayores incrementos, las que presentaron diferencias significativas con respecto a la cepa *A. brasilense* Sp 7.

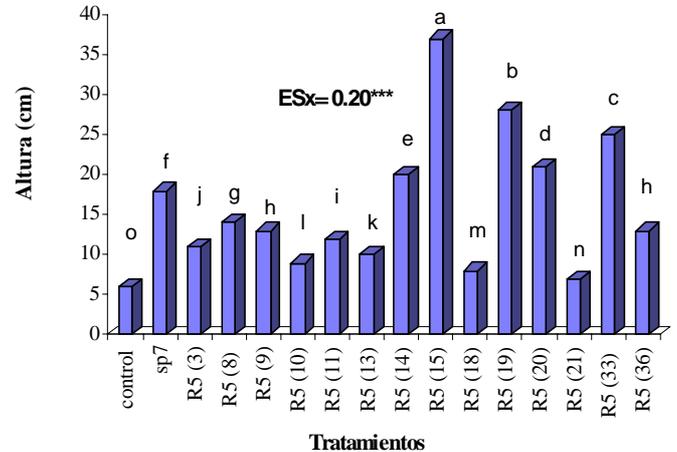


Figura 2. Efecto de la inoculación sobre la altura de las plántulas

Resultados similares han sido descritos (12), al observar que la inoculación con cepas del género *Azospirillum* produce un aumento en la altura de plantas de arroz con respecto al control sin inocular. Esto se atribuye, fundamentalmente, a la producción de hormonas estimuladoras del crecimiento y a la excreción de nitrato por estos microorganismos (13).

La masa fresca de la raíz (Figura 3) se incrementó en las plántulas inoculadas con las cepas en estudio; se ha visto comúnmente que la inoculación con rizobacterias provoca una estimulación en el desarrollo del sistema radical, lo que a su vez se traduce en una mayor absorción de agua y nutrientes (14).

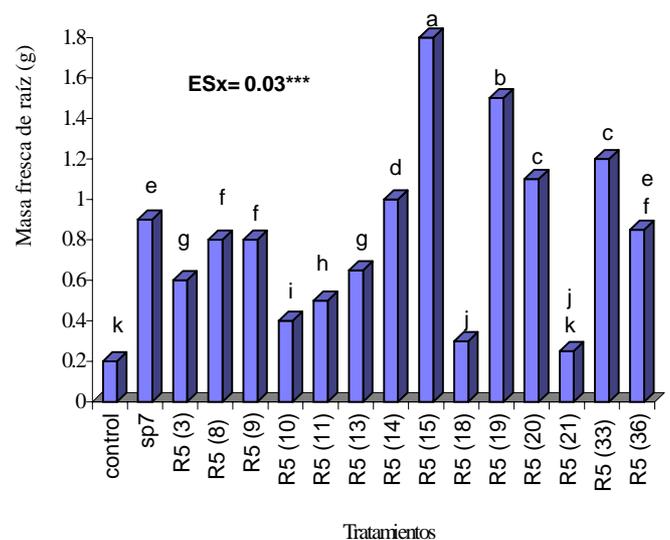


Figura 3. Efecto de la inoculación sobre la masa fresca de la raíz

El efecto más detectable de la acción de las bacterias del género *Azospirillum* sobre las plantas se manifiesta fundamentalmente en el desarrollo y aumento en número de los pelos radicales, lo que puede que esté directamente vinculado con la producción de hormonas promotoras del crecimiento vegetal. En el caso de las bacterias pertenecientes a la especie *Azospirillum brasilense*, se plantea que producen bacteriocinas y sideróforos y que fundamentalmente su estimulación está dada por la producción de hormonas del tipo ácido indol butírico (15, 16).

La Figura 4 refleja los valores correspondientes al contenido de fenoles en hojas. Los resultados obtenidos demuestran que los valores de fenoles en las hojas varían con la inoculación de las rizobacterias del género *Azospirillum* y que existen diferencias entre los tratamientos.

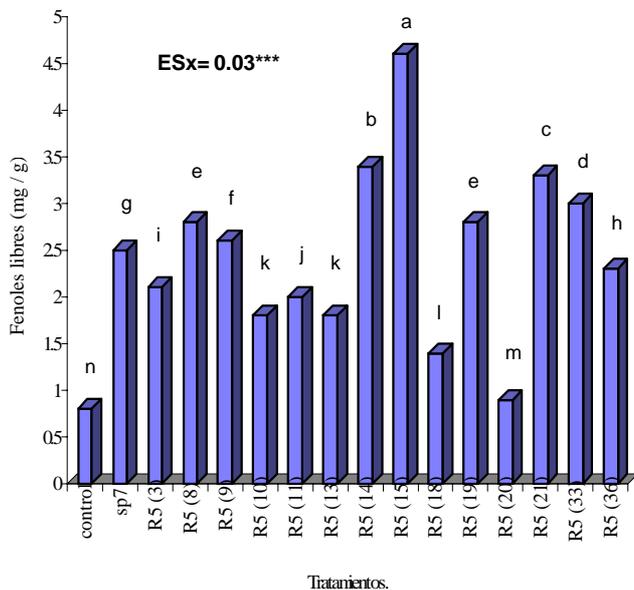


Figura 4. Efecto de la inoculación sobre el contenido de fenoles en las hojas

Mediante el estudio de los compuestos fenólicos y las proteínas en la parte aérea del vegetal, se puede conocer el efecto de la inoculación bacteriana sobre la planta. Se han observado incrementos en estos índices como respuesta a la acción microbiana, estando estos a su vez relacionados con el crecimiento y desarrollo de los cultivos.

Los resultados evidencian una actividad fenólica pobre en la raíz y el tallo, que pudiera deberse a la propia actividad antibiótica y enzimática de los microorganismos asociados (17) y, por tal sentido, no valoramos estos resultados como indicadores del efecto del *Azospirillum* en el arroz.

Al analizar los valores de proteínas totales solubles en las hojas (Figura 5), se evidenció un incremento en los tratamientos donde se inoculó con las cepas en estudio. Se obtuvieron los mayores valores con las cepas R5(15), R5(19), R5(33), R5(20) y R5(14), en coincidencia con los mayores valores obtenidos para la altura de las plántulas.

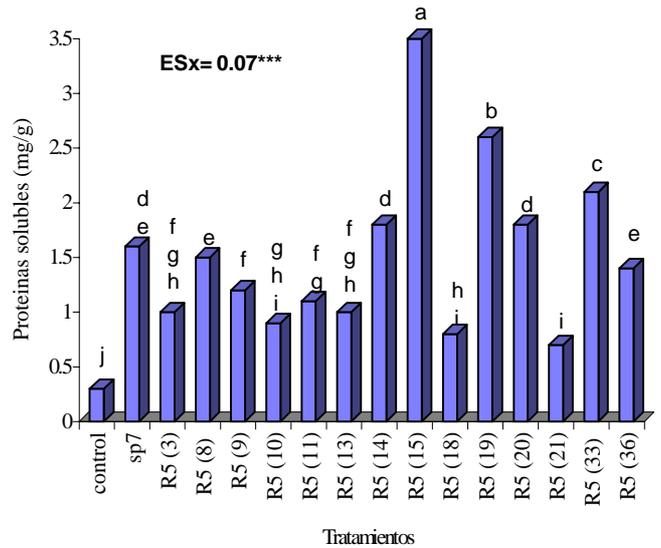


Figura 5. Efecto sobre el contenido de proteínas solubles en las hojas

Los resultados corroboran que la inoculación con cepas del género *Azospirillum* produce un efecto positivo en el cultivo del arroz, lo que se evidencia por los incrementos en la altura de las plantas, la masa fresca de la raíz y, a su vez, en la variación de los indicadores bioquímicos, tales como el contenido de fenoles libres y proteínas solubles (18).

REFERENCIAS

1. Bashan, Y. y Holguín, G. (1997). *Azospirillum* plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Can. J. Microbiol.*, 1997, vol. 43, p. 103-121.
2. Bashan, Y., Holguín, G. y Ferrera-Cerrato, R. Interacciones entre plantas y microorganismos beneficiosos. I *Azospirillum*. *TERRA*. 1996, vol. 14, no. 2, p. 159-195.
3. Pazos, M. y Hernández, A. Aislamiento e identificación de cepas de *Azospirillum* sp provenientes de la rizosfera del arroz (*O. sativa*). *Cultivos Tropicales*, 1999, vol. 20, no. 1, p. 17-19.
4. Hardy, R. N.; Burns, R. C. y Dodd Holsten, R. Applications of the acetylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil. Biol. Biochem.*, 1973, vol. 5, p. 47-81.
5. Day, J. H. y Döbereiner, J. Physiological aspects of N_2 fixation by *Spirillum* from *Digitaria* roots. *Soil. Biol. Biochem.*, 1976, vol. 8, p. 45-50.
6. Kabir, M.; Faure, D.; Haurat, J.; Normand, P.; Jacoud, C.; Wadoux, P.; Bally, R. Oligonucleotide probes based on 16s RNA sequences for identifications of four *Azospirillum* species. *Can. J. Microbiol.*, 1995, vol. 41, p. 1081-1087.
7. Palazón, Z.. Variaciones en el contenido fenólico en plantas de maíz biofertilizadas y obtención de un antisuero anti- AIA. Trabajo de Diploma. Facultad de Biología. 1991.

8. Peláez, A. y Piñón, D. Comparación de dos métodos para cuantificar las proteínas solubles en hojas de caña de azúcar. *Cien. Agri.*, 1986, vol. 28, p. p. 19-23.
9. Kammas, K. M.; Ageron, E; Gremont, P. A. y Kassier, P. The nitrogen fixing -bacteria from iraqi rice-fields soils. *Eur. J. Soil.*, 1994, vol. 30, no. 3, p. 101-106.
10. Velazco, A. C. *Azospirillum* sp. como diazótrofo predominante en los cultivos de caña de azúcar y arroz. Tesis. La Habana. CU (Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas). Facultad de Biología. Universidad de la Habana. 46 p.
11. Van Dommelen, A.; Keijers, V.; Vanderleyden, J. y Zamaroczy, M. de. (Methyl) ammonium transport in the nitrogen-fixing bacterium *Azospirillum brasilense*. *J. Bacteriol.*, 1998, vol. 180, no. 10, p. 2652-2659.
12. Boddey, R. M.; Olivera, O. C. de; Urquiaga, S.; Reis, M. M.; Baldany, V. L. D. y Döbereiner, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. *Plant and Soil.*, 1995, vol. 174, no. 1-2, p. 195-209.
13. Van, Anne. Amonium transport in *Azospirillum brasilense*. *Disertaciones de Agricultura*, 1998, vol. 5, no. 2, p. 5-98.
14. Fallik, E. y Ocón, Y. Inoculants of *Azospirillum brasilense*: Biomass production, survival and growth promotion of *Setaria italica* and *Zea mays*. *Soil Biol. Biochem.*, 1996, vol. 28, p. 123-126.
15. Bashan, Y. Interaction of *Azospirillum* spp in solis: A review. *Biol. Fertil. Soils*, 1999, vol. 29, p. 246-256.
16. Patten, C. L. y Glick, B. R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can. J. Microbiol.*, 1996, vol. 39, p. 187-192.
17. Hernández, A. Caracterización de cepas de *Pseudomonas cepacia* y *Pseudomonas fluorescens* aisladas de la rizosfera del maíz. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. 64 p.
18. Bashan, Y. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnol. Adv.*, 1998, vol. 16, p. 729-770.

Recibido: 2 de julio del 2001

Aceptado: 3 de noviembre del 2001



Precio: 500 USD

Agricultura orgánica sostenible

Coordinador: Dr.C. Angel Leyva Galán

Duración: 1 año



SOLICITAR INFORMACIÓN

Dr.C. Walfredo Torres de la Noval
Dirección de Educación, Servicios Informativos
y Relaciones Públicas
Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA)
Gaveta Postal 1, San José de las Lajas,
La Habana, Cuba. CP 32700
Telef: (53) (64) 6-3773
Fax: (53) (64) 6-3867
E.mail: posgrado@inca.edu.cu