

## COMPORTAMIENTO DE VARIAS CEPAS DE *Azospirillum* SOBRE TRIGO (*Triticum aestivum*) Y SORGO (*Sorgum vulgare*) \*

María Azucena Monzón de Asconegui (1) y Clotilde Oliveira Martins (2).

Recibido: 30/10/80.

Aceptado: 7/4/81.

### RESUMEN

Se estudió el comportamiento de varias cepas de *Azospirillum* en plantas de vía fotosintética C<sub>3</sub> (trigo) y C<sub>4</sub> (sorgo). Se determinó en cultivo monoxénico y en cultivo de enriquecimiento la fijación de N<sub>2</sub> por *Azospirillum* en plántulas de los citados cereales. Se empleó el método de reducción de acetileno por la nitrogenasa, hallándose que la cepa 107 aislada de trigo dio la más elevada tasa de fijación en cultivo monoxénico. En cultivo de enriquecimiento con 20 ppm de estreptomycina, también la cepa 107 fue la que dio igual o mayor valor de reducción de acetileno que en el medio sin antibiótico.

Además se ensayó la acción reductora de *Azospirillum* sobre 2,3,5 difeniltetrazolio (TTC) realizándose cortes de raíces. Se encontró correspondencia entre el número de sitios de reducción y la fijación de N<sub>2</sub> de acuerdo a los nanomoles de C<sub>2</sub>N<sub>4</sub> obtenidos.

Por otra parte se trató de investigar el posible sitio de iniciación de la infección de *Azospirillum* para lo cual se emplearon semillas de maíz pregerminadas a las que se agregó TTC en medio de cultivo sin ácido málico. La coloración rosa intenso de las extremidades de la radícula indicó la posible penetración de la bacteria por el ápice de la raíz.

### SUMMARY

The behavior of various strains of *Azospirillum* was studied in plants of photosynthetic pathway C<sub>3</sub> (wheat) and C<sub>4</sub> (sorghum).

Nitrogen fixation by *Azospirillum* in plantlets of above mentioned cereals was determined in monoxenic culture and enrichment media.

The method of acetylene reduction by nitrogenase (N<sub>2</sub> - ase) was used; it was found out that the 107 strain isolated from wheat had the highest fixation rate in the monoxenic culture. In the enrichment media with 20 ppm of streptomycin, it was strain 107 that also showed equal or higher value of acetylene reduction than in the media without antibiotic.

Moreover, the reducing action of *Azospirillum* on 2,3,5 triphenyltetrazolium chloride (TTC) was tried out and observations of root cuts were made. Correspondence resulted between the number of reduction spots and nitrogen fixation based on C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> nmoles obtained.

Furthermore, an attempt was made to find out where the infection of *Azospirillum* was likely to begin for which pregerminated maize seeds were used, TTC having been added to them in the culture media without malic acid. The strong pink coloring of the ends of the radicle showed that bacteria were apt to have penetrated the root through the apex.

---

(1) Cátedra de Microbiología Agrícola, Departamento de Tecnología de Alimentos, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Av. San Martín 4453 - (1417) Buenos Aires.

(2) Universidade Federal do Maranhao. 65000- São Luiz- Maranhao - Brasil.

\* Trabajo presentado en el Seminario del III Curso Intensivo sobre Fijación Biológica de Nitrógeno realizado en Brasil en julio de 1980.

## INTRODUCCION

Se sabe que el  $N_2$  es un elemento abundante en la atmósfera terrestre, pero paradójicamente es una escasa fuente nutricional porque precisa ser reducido para entrar en un sistema biológico (Brill, 1977).

Las plantas superiores no poseen esta propiedad reductora, pero existe un grupo de microorganismos procariotas que por acción de la enzima nitrogenasa combinan el  $N_2$  con el  $H_2$  para fijarlo como  $NH_3$ .

Gracias a los progresos metodológicos (Balandreau y Domergues, 1973; De Polli, 1975) hoy se puede detectar esa actividad enzimática y así se sabe que numerosas plantas, la mayor parte gramíneas, presentan fijación de  $N_2$  en sus rizosferas o en el interior del tejido radicular.

Este tipo de asociaciones se conoce ahora con el nombre de "Rhizocoenoses" (Döbereiner y De Polli, 1980).

Si bien las leguminosas son los vegetales que contribuyen con mayor cantidad de  $N_2$  a través de su simbiosis con *Rhizobium*, las contribuciones de las gramíneas pueden llegar a ser de hasta 20% del  $N_2$  necesario, lo que significa una economía en el uso de fertilizantes nitrogenados. De allí la importancia de conocer muy bien esta asociación gramínea-bacteria, con el fin de buscar el mejoramiento del genotipo de plantas que ofrezcan mejores perspectivas para la fijación de  $N_2$  (Baldani *et al.*, 1979; Döbereiner, 1979; Döbereiner y Baldani, 1979).

Entre las especies bacterianas que viven asociadas a las gramíneas, además de *Azotobacter paspali* (Döbereiner, 1966) se destaca el género *Azospirillum* con sus especies *A. lipoferum* y *A. brasilense* ambas nitrato reductasa positivo (nir<sup>+</sup>) y nitrato reductasa negativo (nir<sup>-</sup>) (Baldani y Döbereiner, 1980; Tarrand *et al.*, 1978).

Existen varios trabajos que demuestran la actividad de la nitrogenasa de *Azospirillum* en plantas de vía fotosintética  $C_4$  como maíz y caña de azúcar (Baldani y Döbereiner, 1980; Berg *et al.*, 1980) sobre la localización de la bacteria en el tejido radicular, especial-

mente en la zona interna del cortex (Magalhaes *et al.*, 1979; Patriquín y Döbereiner, 1978), pero poco se conoce en plantas de  $C_3$  como el trigo, sobre todo en el modo de infección de la bacteria.

En este trabajo se intenta hacer alguna contribución en este sentido al estudiarse el comportamiento de varias cepas de *Azospirillum* inoculadas en plántulas monoxénicas de trigo y compararlas con igual tratamiento en sorgo.

## MATERIALES Y METODOS

### Materiales

a) Cepas utilizadas (de la colección de EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria. Río de Janeiro - Brasil).

<i>Azospirillum lipoferum</i>	- Cepa	234
<i>Azospirillum lipoferum</i>	- "	229
<i>Azospirillum brasilense</i>	- "	214 nir <sup>+</sup>
<i>Azospirillum brasilense</i>	- "	107 nir <sup>-</sup>

b) Plántulas de trigo y sorgo de 17 días fueron desarrolladas en tubos de ensayo con vermiculita y arena (2:1) más una mezcla de fertilizantes (1 ml de  $K_2HPO_4$  al 3,5%; 1 ml de  $KNO_3$  al 0,84%; 0,01 g de  $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ ; 0,05 ml de solución de micronutrientes) por cada tubo de 20 cm x 3 cm.

### Preparación de los inóculos

Cepas de *Azospirillum lipoferum* y *A. brasilense*, mantenidas en vermiculita estéril, fueron desarrollados en agar papa (semi-sólido) (Döbereiner y Baldani, 1979) a 32°C durante 24 horas.

Estos cultivos fueron repicados en medio NFb líquido + vitaminas +  $NH_4Cl$  10 mM (Döbereiner y Baldani, 1979) y agitados por 24 horas a 32°C después de lo cual se usaron como inóculo de las plántulas de trigo y sorgo.

**Reducción de 2, 3, 5 trifenil-tetrazolio:** TTC en sistema intacto y semillas pregerminadas.

Solución tampón fosfato 0,05 M de pH 7 conteniendo 1 g/l de glucosa; 1,5 g/l de cloruro de 2,3,5 trifenil-tetrazolio (TTC); 1 g/l de ácido málico (estas sustancias fueron adicionadas estériles después de la esterilización en autoclave del tampón).

#### Actividad de la nitrogenasa

Después de 5 días de incubación se midió la actividad de la nitrogenasa en tubos monoxénicos y en cultivo de enriquecimiento (que es medio NFb semi-sólido, Döbereiner y Baldani, 1979). Después de 1, 2 y 3 horas de incubación fueron efectuadas las lecturas en los tubos intactos y después de 42 horas en los cultivos de enriquecimiento. Fue usado cromatógrafo de gas, Perkin Elmer con columna Poropak N.

#### Cortes de raíces

Para la observación de los sitios de infección se hicieron cortes con micrótopo crioscópico.

#### Comprobación de resistencia a estreptomycin

Trocitos de raíces y de vermiculita fueron sembrados en frascos con 4 ml de medio NFb semi-sólido (Döbereiner y Baldani, 1979) sin y con 20 ppm de estreptomycin. Estos frascos fueron incubados a 32°C por 42 horas y al cabo de ese tiempo fue medida la actividad de la  $N_2$ -asa en cromatógrafo de gas.

#### Reidentificación de estirpes

Fue realizada microscópicamente.

### RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados demuestran que de las cuatro cepas utilizadas en las experiencias, sólo la 107, *Azospirillum brasilense* nir<sup>-</sup> presenta fijación de  $N_2$  (actividad de nitrogenasa) tanto en trigo como en sorgo. La di-

ferencia de nanomoles de  $C_2H_4$  obtenidos en estas plantas (Figura 1) se explicaría por el origen de esta cepa, ya que fue aislada de raíces esterilizadas de trigo. Su fase lag es de más de media hora en este vegetal, en cambio en sorgo no presenta fase lag. Este comportamiento posiblemente se deba a la influencia de la planta (Baldani y Döbereiner, 1980) pues el sorgo ( $C_4$ ) ofrece mayor disponibilidad de fotosintatos lo que permitiría una rápida síntesis de nitrogenasa. Sin embargo el resultado final de menor actividad demuestra su preferencia por plantas de trigo lo que concuerda con estudios anteriores (Baldani y Döbereiner, 1980).

Las otras cepas, 229, 234 (aisladas de sorgo) y 214 (aislada de trigo) se comportaron prácticamente como el testigo.

Se realizó también un estudio de la interrelación entre la actividad de la  $N_2$ -asa y la resistencia a estreptomycin con las cepas en estudio. De los resultados obtenidos (Cuadros 1 y 2) se desprende que en las muestras donde se utilizaron trocitos de raíces como inóculo, las cepas menos fijadoras en sistema intacto se mostraron sensibles al antibiótico (en trigo) o no fueron afectadas (en sorgo). La cepa 107, la más fijadora en los cultivos en tubos, fijó prácticamente igual con y sin antibiótico en trigo, mientras que en sorgo triplicó los valores de reducción de acetileno con estreptomycin. Semejantes resultados fueron encontrados en leguminosas (Döbereiner, 1979).

Son inexplicables los resultados de no resistencia a estreptomycin encontrados en vermiculita, pues las raíces crecidas en esa misma vermiculita daban *Azospirillum* resistentes al antibiótico.

En el tratamiento testigo con las raíces de trigo en medio NFb con estreptomycin se obtuvo un resultado positivo, razón por la cual se efectuó la identificación de la cepa.

Evidentemente, la semilla ya tenía la bacteria alojada en su interior, de modo que no fue afectada durante la esterilización con  $HgCl_2$ .

Los tubos con los cultivos monoxénicos

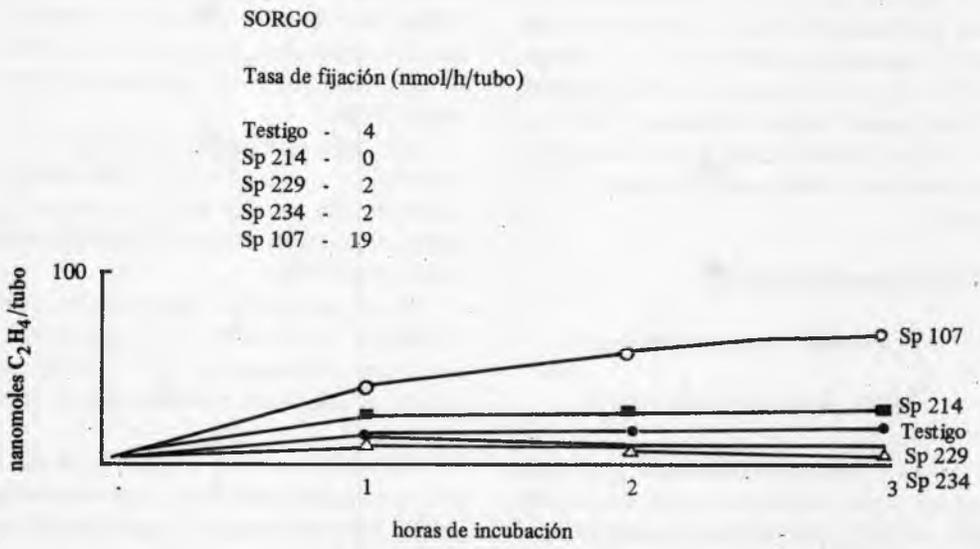
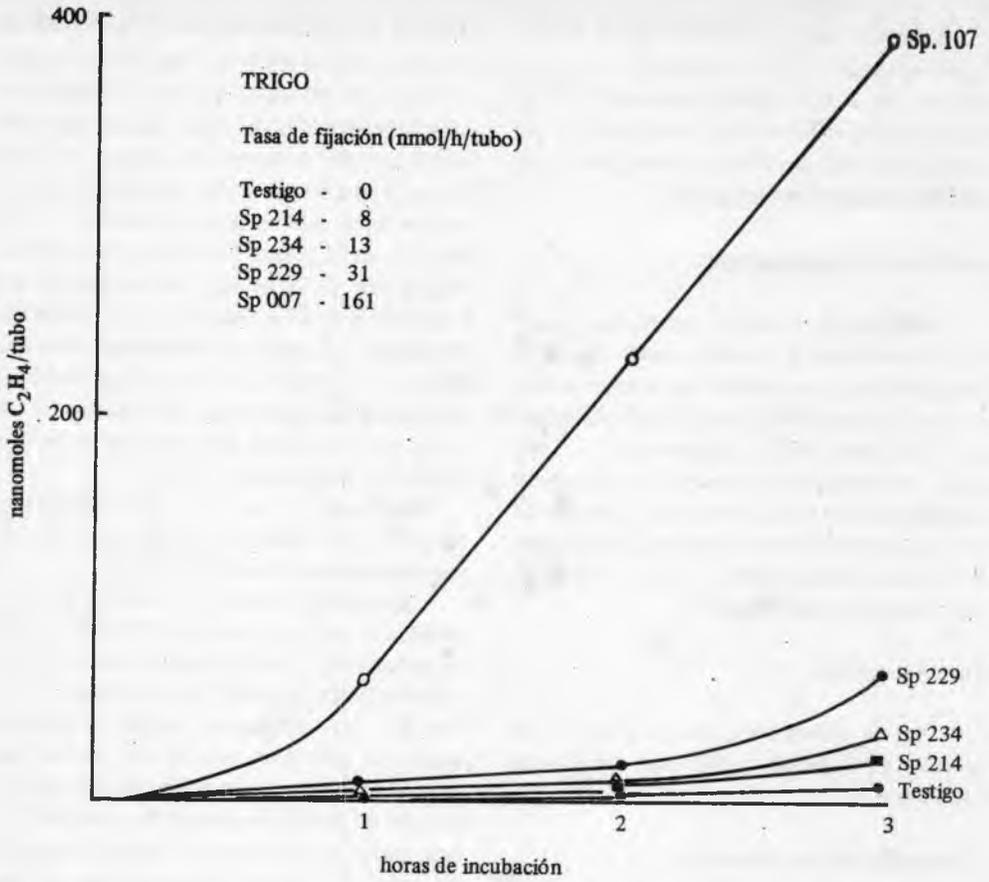


Figura 1: Tasas de fijación en trigo y sorgo (nmol./h/tubo).

**CUADRO 1: Determinación de la actividad nitrogenásica en los cultivos de enriquecimiento. (nanomoles C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h/cultivo). Promedio de 4 repeticiones.**

Trigo (vermiculita)		
Tratamiento	Con 20 ppm de estreptomicina	Sin estreptomicina
Testigo	0	0
cepa 229	0	74
cepa 214	0	44
cepa 234	0	253
cepa 107	1	600

Trigo (raíz)		
Tratamiento	Con 20 ppm de estreptomicina	Sin estreptomicina
Testigo	7	98
cepa 229	65	526
cepa 214	-	566
cepa 234	30	305
cepa 107	1032	1049

**CUADRO 2: Determinación de la actividad nitrogenásica en los cultivos de enriquecimiento. (nanomoles C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h/cultivo). Promedio de 4 repeticiones.**

Sorgo (vermiculita)		
Tratamiento	Con 20 ppm de estreptomicina	Sin estreptomicina
Testigo	0	1
cepa 229	0	99
cepa 214	1	282
cepa 234	1	68
cepa 107	1	138

Sorgo (raíz)		
Tratamiento	Con 20 ppm de estreptomicina	Sin estreptomicina
Testigo	1	0
cepa 229	295	269
cepa 214	359	184
cepa 234	325	-
cepa 107	826	238

después de la última medida de acetileno fueron inyectados con 20 cc de TTC e incubados por una noche protegidos de la luz y en anaerobiosis a fin de crear las condiciones que favorecieran la reducción. Después de la

incubación se efectuaron cortes de raicillas con micrótopo crioscópico y se observaron al microscopio con 400 X de aumento. Se detectaron así los sitios de reducción (Cuadro 3).

CUADRO 3: Porcentaje de frecuencia de sitios de reducción de TTC en trigo y sorgo por la acción de *Azospirillum spp.*

Trigo

Tratamiento	Vermiculita	Cortex	Cilindro central
Testigo	25	0	0
cepa 214	12	12	37
cepa 234	37	0	25
cepa 229	37	0	37
cepa 107	25	62	100

Sorgo

Tratamiento	Vermiculita	Cortex	Cilindro central
Testigo	0	0	0
cepa 214	37	0	12
cepa 234	37	0	0
cepa 229	50	0	0
cepa 107	12	37	25

Estos resultados fueron obtenidos examinando tres preparados de cada cepa.

Los resultados demuestran que la cepa 107 es la que presenta mayor número de sitios de reducción llegando al 100% en el cilindro central de las raíces de trigo. En esta zona se observaron típicas colonias de *Azospirillum* de color castaño oscuro casi negro, localizadas preferentemente en la región vascular coincidiendo con resultados que se obtuvieron anteriormente (Patriquín y Döbereiner, 1978). También fueron observados sitios de reducción en el cortex y en menor cantidad en vermiculita.

Comparando con los resultados obtenidos de la actividad nitrogenásica, se pudo ver que hay correlación con el número de sitios de reducción. En trigo y sorgo, la cepa que mostró más alta frecuencia de lugares de reducción fue también la que fijó más  $N_2$ , es decir, la cepa 107.

Con el fin de observar el lugar de iniciación de la infección en gramíneas por *Azospirillum*, se aplicó TTC en semillas de maíz pre-germinadas en agar al 1% y colocadas en medio NFb con 5 g de agar por litro. Se inoculó con 1 ml de inóculo ( $10^7$

células/ml) y se incubó 48 horas a 32°C. Después se adicionó 5 ml de TTC y se incubó 2 horas más protegiendo los frasquitos con las plántulas de la acción de la luz. Al cabo de ese tiempo las extremidades de las raicillas presentaban coloración rosada intensa, indicando posible penetración de la bacteria por el ápice de la raíz.

Debido a que la coloración rojiza de las extremidades de las raíces además de ser el resultado de la acción reductora de bacterias, puede ser producida también por la acción reductora de sustancias amiláceas (Magalhaes *et al.*, 1979; Patriquín y Döbereiner, 1978) se repitió el experimento en medio NFb sin ácido málico a fin de que fuera utilizado el almidón de la semilla como fuente de carbono. El resultado que se obtuvo fue igual al anterior, es decir, coloración rojiza en la extremidad de las raicillas.

Tal vez esta acción reductora de *Azospirillum* sobre TTC se podría utilizar como un test rápido que permita la selección de genotipos de plantas que fijen mejor en su sistema radicular.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Licenciada Agrícola Vera Lucía Divan Baldani por su orientación en este trabajo, a la Doctora Johanna Döbereiner por sus oportunas sugerencias y al personal de EMBRAPA que en una u otra forma prestó su colaboración.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Balandreau, J. and Y. Dommergues, 1973. Assaying nitrogenase ( $C_2H_4$ ) activity in the field. In: Modern Methods in the study of Microbial Ecology (T. Rosswall ed.) *Bull. Ecol. Res. Comm.* (Stockholm) 17: 247-254.
- 2) Baldani, J. I., R. A. G. Blaña e J. Döbereiner, 1979. Efeito do genotipo do milho na actividade da nitrogenase e da nitrato-reductase. *Pesq. agropec. bras.*, Brasilia 14 (2): 165-173.
- 3) Baldani, V. L. D. and J. Döbereiner, 1980. Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. *Soil. Biol. Bioch.* (In press).
- 4) Berg, R.H., M.E. Tyler, N.J. Novick and V. Vasil (1980). Biology of *Azospirillum* -sugar cane association: Enhancement of nitrogenase activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 39(3): 642-649.
- 5) Brill, W.J. (1977). Biological Nitrogen Fixation. *Scientific American*, 236(1): 68-81.
- 6) De- Polli, H. (1975). Ocorrência de fixação de  $^{15}N_2$  nas gramíneas tropicais *Digitaria decumbens* e *Paspalum notatum*. M.S. Thesis, Univ. de São Paulo., Piracicaba, Brazil.
- 7) Döbereiner, J. (1966). *Azotobacter paspali* sp. n. una bacteria fijadora de nitrógeno na rizosfera de *Paspalum*. *Pesq. agropec. bras.* 1: 357-367.
- 8) Döbereiner, J. (1978). Potential for nitrogen fixation in tropical legumes and grasses. In: Limitations and potentials for biological nitrogen fixation in the tropics (J. Döbereiner, R.H. Burris and A. Hollander, eds.) *Basic Life Sciences* 10, Plenum Press, New York and London, 13-24.
- 9) Döbereiner, J. (1979). Fixação de nitrógeno em gramíneas tropicais. *Interciência*, 4 (4) - Julho-Agosto.
- 10) Döbereiner, J. and V.L.D. Baldani (1979). Selective infection of maize roots by streptomycin-resistant *Azospirillum lipoferum* and other bacteria. *Can. J. Microbiol.* 25: 1264-1269.
- 11) Döbereiner, J. and H. De- Polli (1980). Nitrogen Fixation in Rhizocoenoses. International Symposium on Root/Soil System. Londrina, March 3 - 11, 1980.
- 12) Magalhaes, F.M.M., D. Patriquín and J. Döbereiner (1979). Infection of field grown maize with *Azospirillum* spp. *Rev. Brasil. Biol.*, 39 (3): 587-596.
- 13) Patriquín, D.G. and J. Döbereiner, (1978). Light microscopy observations of tetrazolium-reducing bacteria in the endorhizosphere of maize and other grasses in Brazil. *Can. J. of Microbiol.* 24 (6): 734-742.
- 14) Tarrand, J., N. Krieg and J. Döbereiner (1978). A taxonomy study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Can. J. of Microbiol.* 24: 967-980.