

ESTUDIOS SOBRE LA INFECCION DE RAICES DE TRIGO (*Triticum aestivum*) por *Azospirillum* spp. *

María Azucena Monzón de Asconegui (1)

Recibido: 13/12/82

Aceptado: 30/7/83

RESUMEN

En el presente trabajo se han efectuado estudios sobre la localización de *Azospirillum* spp. en el tejido radicular de trigo (*Triticum aestivum*) y su relación con las posibles vías de infección.

Para ello se incubaron raíces de trigo (cortadas de plántulas de 5, 10 y 15 días de edad inicialmente inoculadas con *Azospirillum* spp.) en un medio con cloruro de 2, 3, 5 trifeniltetrazolio (TTC) durante 2, 4 ó 12 horas a 30°C. Las bacterias reductoras de esta sustancia se diferenciaron mejor de las partículas reductoras del tejido vegetal a las 4 horas de incubación.

Al mismo tiempo se hicieron determinaciones de la actividad nitrogenásica de las plantas en estudio por el método acetileno-etileno, comprobándose que la iniciación de la fijación se realiza en condiciones de invernáculo después de 2 semanas de desarrollo de las plántulas.

De acuerdo a los sitios de reducción observados, los posibles puntos de entrada de *Azospirillum* spp. en raíces de trigo, serían a nivel de puntas de raíces y sitios de formación de raíces secundarias. La infección se extendería luego por el tejido cortical y en los comienzos de la actividad nitrogenásica, las bacterias recién se ubicarían en el xilema.

STUDIES ON WHEAT (*Triticum aestivum*) ROOT INFECTION BY *Azospirillum* spp.

SUMMARY

In the present research, we have done studies on the localization of *Azospirillum* spp. in the radicular tissue of wheat (*triticum aestivum*) and its relation with the possible infections ways.

For this purpose wheat roots were incubated (wich were cut from seedlings of 5, 10 and 15 days old and were initially inoculated with *Azospirillum* spp.) in a media with 2, 3, 5 triphenyltetrazolium chloride (TTC) during 2, 4 or 12 hours to 30°C.

The reducing bacteria of this substance were better differed from the reducing particles of the vegetable tissue four hours after the incubation.

Also, nitrogenase activity of seedling was determined by the acethylene-ethylene method and we could demontrate that nitrogen fixation iniciation occurs in glass-house conditions after a 2 week of developing of the seedlings.

Considering the bacterial reduction sites observed, the possible points where infection by *Azospirillum* spp. begins would be at the root tips and at the sites of secondary root formation. Then, the infection would be extended by the cortex tissue and at the beginning of the nitrogenase activity, the bacteria would begin to enter the xilem.

(1) Cátedra de Microbiología Agrícola. Departamento de Industrias Agrícolas y Alimentarias. Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Av. San Martín 4453 (1417) Buenos Aires, Argentina.

* Trabajo realizado en EMBRAPA, km 47, Río de Janeiro, Brasil, en agosto-septiembre de 1981. Los resultados aquí descriptos han sido comunicados al III Congreso Argentino de Microbiología, 1-5 de agosto de 1982.

INTRODUCCION

En los últimos años, la fijación biológica de nitrógeno por *Azospirillum* spp. en raíces de gramíneas ha sido objeto de estudio por numerosos investigadores (Döbereiner, *et al.*, 1976; Lekshmi-Kumari, *et al.*, 1977; Okon, *et al.*, 1977; Patriquin y Döbereiner, 1978) y es probable que un buen aprovechamiento de esa fijación podría contribuir a disminuir el consumo de los fertilizantes nitrogenados (Kapulnik, *et al.*, 1981).

Se ha avanzado bastante en el conocimiento de la fisiología de ese microorganismo (Tarrand, *et al.*, 1978; Ber, *et al.*, 1979) pero poco se conoce sobre los fenómenos de interacción en la simbiosis asociativa gramíneas -*Azospirillum*, si bien existen varios trabajos que demuestran la presencia de esta bacteria en la endorizosfera de maíz, y trigo y algunas pasturas tropicales (Patriquis y Döbereiner, 1978).

Así como los estudios sobre el mecanismo de infección de *Rhizobium* en leguminosas fueron muy útiles en el establecimiento exitoso en las asociaciones a campo, es razonable esperar que en el caso de *Azospirillum* también podría proporcionar resultados promisorios (Umali-García, *et al.*, 1978).

En este sentido, se han realizado estudios sobre los pasos de la infección en raíces de gramíneas tales como *Zea mays* (Magalhaes, *et al.*, 1979), *Panicum maximum* (Umali-García, *et al.*, 1978), pero aún no se ha investigado la forma de invasión en trigo.

En el presente trabajo se estudia la localización de *Azospirillum* dentro de la raíz de trigo y su posible relación con las vías de infección.

MATERIALES Y METODOS

Semillas de trigo empleadas:

B H 1146 de un cultivar de la Estación Experimental de EMBRAPA, Km 47, Estado de Río de Janeiro (Brasil).

Medio de pregerminación de semillas:

- NFb (Döbereiner y Baldani, 1979), sin malato, adicionado de 40 p.p.m. de actidione (cicloheximida) y agar Oxoid 5 por ciento.
- Medio de Fåhraeus, 1957, modificado.
0,143 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,17 de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,143 g de KH_2PO_4 ; 0,214 de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 0,043 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,072 g de KNO_3 ; H_2O destilada hasta 1000 ml; agar Oxoid, 8 % o ; pH 6,8.

Inóculo empleado:

Desarrollo de 48 horas de *Azospirillum* sp. en medio NFz .

Solución A: 0,053 g de NH_4Cl ; 1 g de ácido málico; 2 ml de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ al 10 por ciento; 1 ml de NaCl al 10 por ciento; 1 ml de solución de vitaminas (19 mg de biotina y 20 mg de piridoxal en 100 ml de agua destilada); 1 ml de solución de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + ácido nitrilotriacético (NTA) (200 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + 140 mg de NTA en 100 ml de agua destilada). El pH se ajusta a 6,8 y se completa la solución a 950 ml.

Solución B: 13 ml de K_2HPO_4 al 10 por ciento; 8 ml de KH_2PO_4 al 10 por ciento; se completa a 50 ml.

Se esterilizan por separado ambas soluciones; luego se agrega para cada 50 ml de A, 2,5 ml de B.

Cepas de *Azospirillum* utilizadas:

107
245 Aisladas de trigo
Br 14
242 Aislada de maíz

Condiciones de siembra e inoculación:

Dos semillas (pregerminadas 48 horas) se colocaron en un tubo de ensayo de 20 x 3

cm con 50 ml de medio agarizado solidificado en forma horizontal.

Se inoculó cada tubo con 2 ml del cultivo de *Azospirillum* de 10^9 células por ml y la incubación se realizó en invernáculo.

Diagramación del ensayo:

Además de los ensayos así inoculados se trabajó con un testigo con plantas sin *Azospirillum* al que se denominó Control 1 (C₁); otro testigo sin plantas con *Azospirillum* (cepa 245) que constituyó el Control 2 (C₂); y un tercer testigo con plantas pero sin acetileno para detectar la producción de etileno "de novo" (Control 3 o C₃).

De las 4 cepas y de los testigos se hicieron 4 repeticiones y se programó para efectuar los ensayos de reducción de acetileno y las cosechas en 3 períodos de desarrollo de las plantitas: a los 5, 10 y 15 días.

Actividad de la nitrogenasa:

Se midió con el método de reducción de acetileno: el contenido de oxígeno de la atmósfera de los tubos se ajustó a 0,34 por ciento (medido con un cromatógrafo de gases Varian TCD) mediante el gaseado de N₂ por un período de una hora. Se inyectó 10 ml de acetileno, y se volvió a incubar los tubos en el invernáculo. Se tomaron muestras gaseosas a las 2 y 4 horas, y el contenido de etileno se determinó en un cromatógrafo de gases Perkin Elmer con columna Porapak N.

Una vez terminada la incubación, se realizó el ensayo de reducción de TTC.

RESULTADOS Y DISCUSION

La siembra de las semillas pregerminadas de trigo en el medio (a) no dió resultados positivos debido a un deficiente desarrollo radicular.

Se determinó, por modificaciones en los niveles de actidione (agregado anormal de las raíces.

En el medio NFb sin malato y sin acti-

dione, las plántulas de trigo desarrollaron bien pero no llegaban a adquirir una natural lozanía.

Contrariamente, en los ensayos con el medio (b) el desarrollo de las plantas fue excelente. En consecuencia, éste fue el medio empleado en los experimentos.

Los ensayos de nitrogenasa por reducción de acetileno fueron negativos, tanto a los 5 como a los 10 días de desarrollo de las plántulas. Recién a las 2 semanas comenzó a manifestarse la actividad de reducción de acetileno en las raíces. Períodos de inducción más prolongados han sido comunicados en ensayos a campo (Magalhaes *et al.*, 1979).

En el Cuadro 1 se indican los resultados de la actividad nitrogenásica de plantas de 15 días. De su análisis se concluye que las plantas más activas fueron las inoculadas con la cepa 245 (que también fué la más eficiente en un ensayo a campo que se estaba realizando en la Estación Experimental de EM-BRAPA, km 47, Estado de Río de Janeiro), siguiendo en orden decreciente aquellas que tuvieron como inóculo las cepas Br 14 y 107, que habían sido aisladas de trigo lo mismo que las 245.

CUADRO 1: Actividad nitrogenásica de los cultivos de trigo en medio agarizado a los 15 días. Promedio de 4 repeticiones.

Cepas	Reducción de acetileno nmoles C ₂ H ₄ / h / cultivo	
	2 horas	4 horas
245	12,51	14,70
Br 14	9,75	10,25
107	7,13	8,15
242	5,22	5,70
C ₁	5,05	5,10
C ₂ (245)	5,22	5,20
C ₃	—	—

En cuanto a las plantas menos fijadoras resultaron ser las que habían sido inoculadas con la cepa 242, que no había sido aislada de trigo, sino de maíz, lo que corrobora la existencia de un grado de especificidad en las

asociaciones de *Azospirillum* con gramíneas (Baldani, y Döbereiner, 1980).

De los resultados del mencionado Cuadro 1 se observa también que la reducción de acetileno fue lineal a lo largo del período de incubación.

El Control 3 indicó que las plantas no inoculadas no produjeron por sí solas etileno "de novo".

La reducción de acetileno producida en los tubos sin inóculo (Control 1) llevó a averiguar si la semilla contenía en su interior *Azospirillum*.

Para ello se desinfectaron las semillas en la forma ya descrita en Materiales y Métodos, se sembraron en medio NFb semi-sólido (Baldani y Döbereiner, 1980) desintegrándolas con un pinza estéril. A las 48 horas de incubación a 32° C se observó película y alcalinización del medio.

Se estrió este material en agar papa con rojo congo (Baldani y Döbereiner, 1980) y a las 96 horas se observó desarrollo de color rojo (características de *Azospirillum* en este medio) pero no colonias aisladas. También hubo desarrollo incoloro que es común en los contaminantes. Sin embargo, el color rojo en el citado medio no es específico de *Azospirillum*, porque existen contaminantes que pueden tomar el rojo congo casi tan intensamente como aquel, pero la típica colonia pequeña, seca, irregular, que al tocarse con el ansa se adhiere entera, correlaciona con la presencia de *Azospirillum*.

Por otra parte, semillas desinfectadas se hicieron pregerminar 48 horas en agar agua e inmediatamente se sometieron al tratamiento de TTC en la misma forma que las raicillas provenientes de las plántulas. Los resultados de la observación microscópica se describen a continuación.

Acción reductora sobre TTC:

El montaje en agua de los preparados con los cortes histológicos de las raicillas permitió observar vivas a las bacterias. De esta manera, se pudo diferenciar los puntos de reducción propios del tejido vegetal y los

ocasionados por las bacterias. Los primeros son de color rojo vivo y los segundos son de un tono más oscuro, casi violáceo.

Los mejores resultados se obtuvieron a las 4 horas de incubación pues se logró distinguir a las bacterias por su movilidad de las partículas del tejido vegetal con capacidad reductora y de dimensiones semejantes a aquellas. Patriquin, *et al.*, (1978) han obtenido esa diferenciación con incubaciones menores (1 ó 2 horas) pero en plantas de maíz desarrolladas a campo.

En este ensayo, a las 8 a 12 horas de incubación no se pudo distinguir bacterias de partículas vegetales.

Raicillas de semillas pregerminadas:

En las puntas de las raicillas provenientes de las semillas esterilizadas y pregerminadas se observaron bacterias ubicadas en la capa más apical del tejido radicular. Estas podrían ser responsables de la actividad reductora de acetileno (5,05 moles de C₂ H₄/h/cultivo) observada en el Control 1 (sin inóculo).

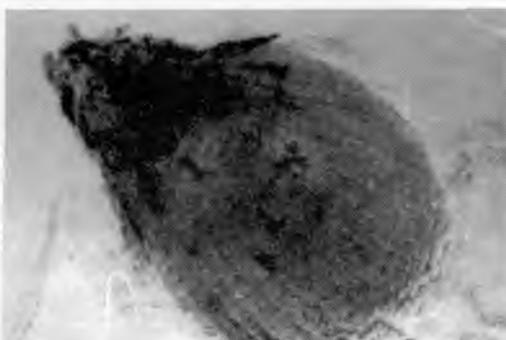


Figura 1: Fotografía de apice de raicilla proveniente de semilla pregerminada. Los puntos oscuros coinciden con la presencia de bacterias reductoras de TTC x 300.

Estos resultados demuestran que el método de esterilización usual no elimina contaminantes bacterianos en las semillas los que aparecen luego infectando las raíces.

Queda así planteado el serio problema con que uno se enfrenta al emplear los llamados cultivos "monoxénicos".

Raíces de plántulas:

En general, las bacterias se observaron en las puntas de raíces, en los sitios de formación de raíces secundarias y en el tejido cortical (Figura 2, 3 y 4). Sólo las plantas inoculadas con las cepas más fijadoras, 245 y Br 14, presentaron sus raíces con bacterias ubicadas en el xilema, especialmente las muestras obtenidas en la cosecha al 15 día (Figura 5).

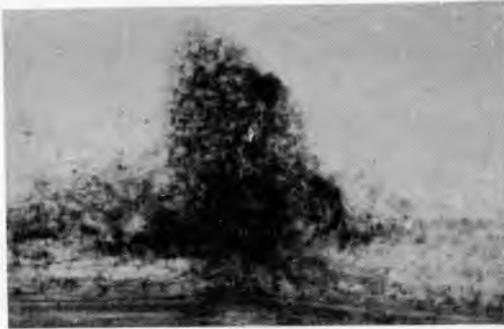


Figura 2: Fotografía de apice de raíz principal (inoculada). Abundancia de bacterias móviles reductoras de TTC x 300.

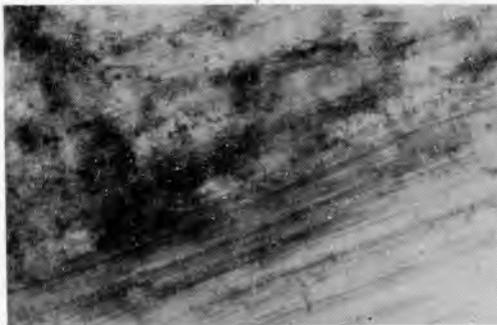


Figura 3: Fotografía de apice de raíz secundaria (inoculada). Elevado número de bacterias reductoras (puntos oscuros). x 300.

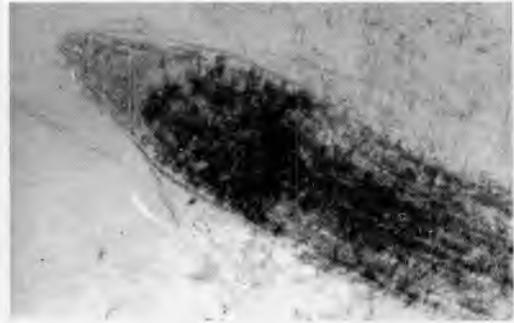


Figura 4: Fotografía de corteza radicular con presencia de bacterias reductoras (planta inoculada). x 675.

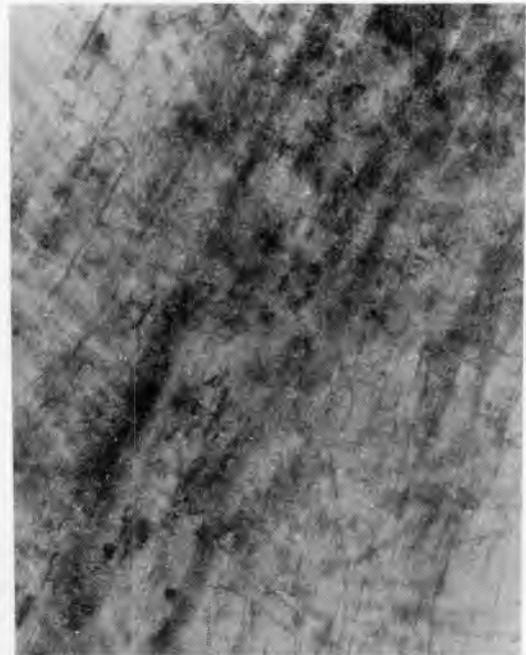


Figura 5: Fotografía de xilema de raíz principal (inoculada) con bacterias reductoras x 675.

Si bien en este tipo de trabajo no existe una identificación positiva sobre *Azospirillum* para lo cual se hubieran requerido procedimientos que no estaban al alcance, se puede decir que hay una llamativa coincidencia en la ausencia o la poca cantidad de bacterias distribuidas en punta de raíces, en

zonas próximas a éstas y en sitios de emergencia de raíces laterales (Figura 6 y 7) en las plantas sin inocular y el número más elevado de aquellas en las plantas inoculadas.

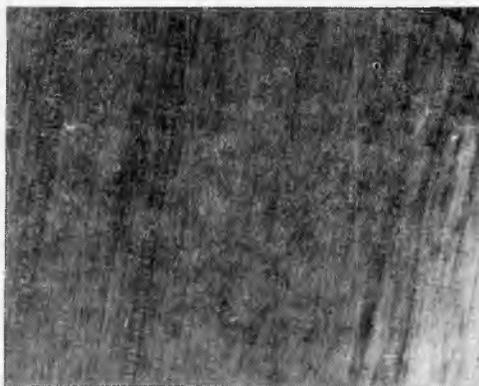


Figura 6: Control 1 - Fotografía de tejido radicular de zona próxima al ápice donde se observa corteza y xilema libre de bacterias. x 975.

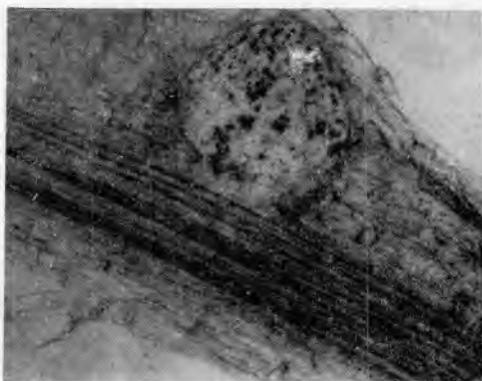


Figura 7: Fotografía de raíz secundaria de planta no inoculada (Control 1). Se observan muy pocas bacterias junto a puntos de reducción del tejido vegetal. x 300.

La concentración bacteriana en este último caso se produjo también en los mismos lugares, pero además en los tejidos de la corteza y del xilema.

Esa preferencia por la zona de alargamiento de la raíz y la de producción de raíces secundarias, se explicaría por la intensa actividad metabólica y elevada secreción de exudados que caracteriza a esos sitios radiculares (Dommergues y Manganot, 1970).

Patriquin *et al.* (1978) trabajando con maíz y empleando el test de TTC, no han detectado bacterias en la región apical de la raíz principal, lo mismo que Magalhaes, *et al.* (1979) en plantas de maíz desarrolladas a campo. Sin embargo, estos últimos investigadores han observado bacterias a 2 cm del ápice radicular pero no les ha sido posible resolver problemas técnicos de observación en la zona terminal de la raíz. No obstante, han supuesto que una posible invasión de la estela de la raíz podría producirse por vía apical pues en sus preparados encontraban infección en el cilindro central sin disrupción de la endodermis.

Además, la alta actividad nitrogenásica en maíces con muchas raíces laterales (Pereira, *et al.*, 1978) apoyaría la idea de invasión del cilindro central por las puntas de raíces, al aumentar el número de éstas (Magalhaes, *et al.*, 1979).

Por otra parte, la detección de actividad pectinolítica (del tipo pectinatrans-eliminasa) en *Azospirillum* (Umali-García, *et al.*, 1978; permite suponer que aquella actuaría facilitando el proceso de invasión.

De acuerdo a los resultados observados con el test de TTC en el presente trabajo, se propone como una interpretación razonable que la entrada de *Azospirillum* spp. en raíces secundarias, distribuyéndose luego por el tejido cortical hasta el momento de la fijación durante el cual se ubica en el xilema.

Esta interpretación, evidentemente requerirá una prueba más fehaciente, como podría ser el empleo de procedimientos que sigan paso a paso el proceso de infección.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Doctora Johanna Döbereiner por sus útiles sugerencias y a la Dra. María José Amstalden Sampaio por su colaboración en la toma de las fotografías en este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Baldani, V. L. D. and J. Döbereiner, 1980. Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. *Soil. Biol. Biochem.* 12: 433-440.
- 2) Berg, R. H.; V. Vasil, and I. K. Vasil, 1979. The biology of *Azospirillum*-sugar cane association. II. Ultrastructure. *Protoplasma* 101: 143-163.
- 3) Döbereiner, J.; I. E. Merriell, and M. Nery, 1976. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Can. J. Microbiol.* 22: 1464-1473.
- 4) Döbereiner, J., 1977. Biological nitrogen fixation in tropical grasses-possibilities for partial replacement of mineral N fertilizers. *Ambio*, Vol. 6, Nº 2-3.
- 5) 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.
- 6) Dommergues, Y., F. Mangenot, 1970. Mycorrhizas. En: *Ecologie Microbienne du Sol*. Masson et Cie (Editores), pág. 561, París.
- 7) Kapulnik, Y., S. Sarig, I. Nur, Y. Okon, J. Kigel, and Y. Henis, 1981. Yield increases in summer cereal crops of Israel in fields inoculated with *Azospirillum*. Faculty of Agriculture, Hebrew University of Jerusalem, Rehovot, P.O. Box 12, Israel.
- 8) Lakshmi-Kumari, M., S. K. Kavimandan, and N. S. Subba Rao, 1977. Occurrence of nitrogen fixing *Spirillum* in roots of rice, sorghum, maize and other plants, *Indian J. Exp. Biol.* 14: 638-639.
- 9) Magalhaes, F. M. M., D. Patriquin, and J. Döbereiner, 1979. Infection of field grown maize with *Azospirillum* spp. *Rev. Brasil. Biol.* 39 (3): 587-596.
- 10) Okon, Y. S. L. Albrecht, and R. H. Burris, 1977. Methods for growing *Spirillum lipoferum* and for counting it in pure culture and in association with plants *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 85-88.
- 11) Patriquin, D., and J. Döbereiner, 1978. Light microscopy observations of tetrazolium-reducing bacteria in the endorhizosphere of maize and other grasses in Brasil. *Can. J. Microbiol.* 24 (6): 734-742.
- 12) Pereira, P. A. A. J. F. W. Büllow; C. A. von e Neyra, 1978. Atividade da nitrogenase, nitrato reductase e acumulação de nitrogenio em milho braquítico *Zea mays* L. (cv. Piranao) em dois niveis de adubacao nitrogenada. *Rev. Bras. Ciencia Solo* 2: 28-33.
- 13) Tarrand, J; N. Krieg and J. Döbereiner, 1978. A taxonomy study of the *Spirillum lipoferum* group, with description 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.
- 14) Umali-García, M.; D. H. Hubell and M. H. Gaskins, 1978. Process of infection of *Panicum maximum* by *Spirillum lipoferum*. Environmental role of nitrogen-fixing blue-green algae and asymbiotic bacteria. *Ecol. Bull.* (Stockholm) 26: 373-379.