

***Azospirillum amazonense*: su presencia en el área cañera de la provincia de Tucumán**

R. O. PEDRAZA¹, J. C. DIAZ RICCI²

¹Facultad de Agronomía y Zootecnia, Universidad Nacional de Tucumán, Av. Roca 1900, 4000 San Miguel de Tucumán,

²Instituto Superior de Investigaciones Biológicas, Chacabuco 461, 4000 San Miguel de Tucumán, Argentina.

*Correspondencia. E-mail: rpedraza@herrera.unt.edu.ar

RESUMEN

Se confirma la presencia de *Azospirillum amazonense* en el área cañera de la Provincia de Tucumán. Distintas cepas fueron aisladas de raíces de caña de azúcar en diferentes localidades. Las características fenotípicas y genotípicas de estos aislamientos coinciden con los caracteres descritos para esta especie, sumándose así a las otras dos, *A. brasilense* y *A. lipoferum*, cuya existencia ya fue informada.

Palabras claves: *Azospirillum amazonense*, fijación de nitrógeno, caña de azúcar, rADN 16S

SUMMARY

***Azospirillum amazonense*: Its presence in the sugar cane area in the Province of Tucumán.** We confirm the presence of *Azospirillum amazonense* in the sugar cane area of the Province of Tucumán. Several strains were isolated from sugar-cane roots in different places. Phenotypic and genotypic characteristics coincided with those described for this species. This new one is being added to the other two species, *A. brasilense* and *A. lipoferum*, already reported.

Key words: *Azospirillum amazonense*, nitrogen fixation, sugar-cane, 16S rDNA.

El género *Azospirillum* pertenece a un grupo de bacterias gram-negativas fijadoras de nitrógeno molecular, de carácter rizosférico por lo cual actualmente se las señala como bacterias promotoras del crecimiento en plantas (8). Dentro de este género, 5 especies fueron descritas: *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*, *A. irakense* y *A. halopraeferans* (6). La asociación entre estas bacterias y las raíces de gramíneas y otras plantas ha sido estudiada ampliamente desde su primer reporte por Döbereiner y Day (3). Investigaciones realizadas en los últimos años, muestran los beneficios obtenidos de la interacción *Azospirillum*-planta, los que se dieron en una gran variedad de ambientes y condiciones de suelo (7). Además de su contribución potencial por la fijación biológica del nitrógeno, los efectos promotores del crecimiento vegetal derivan principalmente de los cambios morfológicos y fisiológicos

inducidos por *Azospirillum* en las raíces de las plantas, lo que mejora la absorción de agua y nutrientes, disminuyendo consecuentemente los requerimientos de fertilizante (13).

Azospirillum amazonense fue aislado inicialmente a partir de suelo y raíces de varias especies de gramíneas, en ecosistemas naturales y en áreas cultivadas de la región amazónica y Río de Janeiro, en Brasil (9, 10), y se asemeja a las especies conocidas del género por su forma de bastón curvo, su típico movimiento ondulatorio y formación de película en medio semi-sólido, diferenciándose de éstas por su diámetro menor, intolerancia al medio alcalino, por la menor tolerancia al oxígeno molecular y por la utilización de sacarosa, entre otras características (9).

En Argentina, se reportó por primera vez la presencia de *A. amazonense* asociado a gramíneas, utilizando técnicas microbiológicas, en la Provin-

cia de Corrientes (11). En Tucumán, se han aislado y caracterizado numerosas cepas de *Azospirillum* de suelo rizosférico y asociadas a raíces de maíz, caña de azúcar, trigo, gramíneas forrajeras, frutilla, etc., todas ellas pertenecientes a las especies *brasilense* y *lipoferum* (1, 12, 15). Con respecto a *A. amazonense*, se informó la presencia de algunas cepas caracterizadas putativamente como tal, basado en análisis morfológicos y propiedades bioquímicas (14), constituyendo esta comunicación el primer informe de la presencia de *A. amazonense*, confirmado con estudios moleculares.

El aislamiento y purificación de las cepas se realizó siguiendo la metodología prescrita por Döbereiner y col (2), a partir de raíces de caña de azúcar, cuyas muestras fueron tomadas de distintos lugares del área cañera de Tucumán. La potencialidad fijadora del nitrógeno molecular se investigó mediante la amplificación por PCR de un fragmento del gen *nif H* (16), que codifica para la subunidad Fe-proteína de la enzima nitrogenasa, observándose una banda de aproximadamente 390 pb para el mencionado gen en los aislamientos y cepas de referencia (Figura 1).

La identificación a nivel de especie se realizó mediante pruebas bioquímicas y moleculares, teniendo en cuenta para lo primero, las condiciones de crecimiento a distinto pH, tipo de colonia formada en medio agar-papa, tamaño celular, motilidad, polimorfismo en medio alcalino, requerimiento de biotina, utilización de sacarosa, fructosa y glucosa, coincidiendo los resultados con los brindados por Magalhães y col (9) y Falk y col (4) para la determinación de esta especie.

La caracterización molecular se realizó por medio de la amplificación del gen 16S del ADN

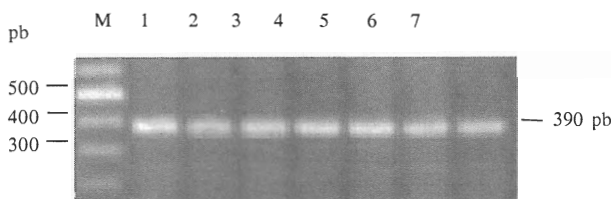


Figura 1. Producto de la amplificación del gen *nif H*. Los números indican: M, marcador de peso molecular (Ladder, 100 pb, Promega); 1, Sp7 (*A. brasilense*); 2, Y1 (*A. amazonense*); 3 - 7, aislamientos locales caracterizados como *A. amazonense*.

ribosomal, a partir de suspensiones celulares lisadas por calor, utilizando los "primers" universales 27f y 1495r (5). Posteriormente, se digirió el producto amplificado con la endonucleasa Alu I (Promega). Tanto los productos de amplificación como los de digestión enzimática fueron analizados por electroforesis horizontal en geles de agarosa 1,2 y 1,5%, respectivamente, en TBE 0,5X, con posterior teñido con bromuro de etidio, lavado con agua destilada y fotografiado sobre transiluminador de luz UV de onda corta.

Entre los aislamientos caracterizados como *A. amazonense*, se diferenciaron cepas por medio de polimorfismos del ADN generados al azar (RAPD) (datos no mostrados).

En todos los análisis realizados, se utilizaron como controles positivos y de referencia las siguientes cepas, obtenidas del cepario de EMBRAPA - CNPAB, Río de Janeiro: Y1T (ATCC 35119) de *A. amazonense*; Sp7 (ATCC 29145) de *A. brasilense*; Sp59 (ATCC 29707) de *A. lipoferum*; Cd de *A. brasilense* y BR 11086 de *A. lipoferum*.

Los resultados presentados en la Figura 2 muestran que los patrones de restricción del producto de la amplificación del gen 16S rADN de las cepas aisladas coinciden con los de la referencia utilizada y difieren con los controles. Esto último se complementa con los resultados obtenidos a partir de técnicas microbiológicas clásicas. La identificación de *A. amazonense* en el área cañera

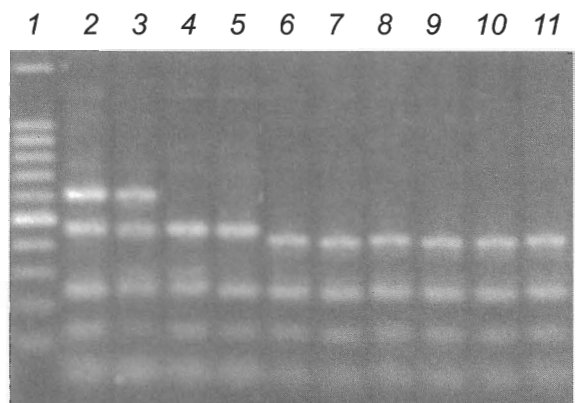


Figura 2. Restricciones del producto de la amplificación del gen 16S rADN con la enzima Alu I (Promega). Los números indican: 1, marcador de peso molecular (Ladder 100 pb, Promega); 2, Sp7; 3, Cd; 4, Sp59; 5, BR11086; 6, Y1; 7 - 11, aislamientos locales, caracterizados como *A. amazonense*.

tucumana, contribuye a la caracterización de la diversidad de diazótrofos asociativos en estos suelos, sumándose así a las otras dos especies presentes. En la actualidad se continúa en nuestro laboratorio con el aislamiento y caracterización de nuevas cepas, las que se utilizarán para estudiar la interacción planta-microorganismo y evaluar su desempeño con fines agronómicos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. Carlos Bellone la revisión del manuscrito. Este trabajo fue financiado por el CIUNT, Programa N° 26/A102, 1998-2000. JCDR es investigador del CONICET.

BIBLIOGRAFIA

- Bellone CH, Bellone SC de, Pedraza RO (1995) Chitinase expression in strawberry root colonized by *Azospirillum brasilense* and VA mycorrhiza. En: Fendrik I, del Gallo M, Vanderleyden J, de Zamaroczy M (Ed), *Azospirillum* VI and related microorganisms, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, NATO ASI Series, Vol. G37, p. 161-165.
- Döbereiner J, Baldani VLD, Baldani JI (1995) Microorganismos diazotróficos aeróbios. En: Como isolar e identificar bacterias diazotróficas de plantas não-leguminosas. EMBRAPA-SPI, Brasilia-DF, p. 11-25.
- Döbereiner J, Day JM (1976) Associative symbioses in tropical grasses: Characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. En: Newton WE, Nyman CJ (Ed), Proceedings of the 1st International Symposium on Nitrogen Fixation. Washington State University Press, Pullman, Washington. p. 518-538.
- Falk EC, Döbereiner J, Jonson JL, Krieg NR (1985) Deoxyribonucleic acid homology of *Azospirillum amazonense* Magalhães *et al.* 1984 and emendation of the description of the genus *Azospirillum*. Int. J. System. Bact. 35: 117-118.
- Grifoni A, Bazzicalupo M, Di Serio C, Fancelli S, Fani R (1995) Identification of *Azospirillum* strains by restriction fragment length polymorphism of the 16S rDNA and of the histidine operon. FEMS Microbiol. Lett. 127: 85-91.
- Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST (1994) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore, p 56.
- Kapulnik Y, Okon Y, Henis Y (1985) Changes in root morphology of wheat caused by *Azospirillum* inoculation. Can. J. Microbiol. 31: 881-887.
- Kloepper JW, Lifshitz R, Zablotowicz RM (1989) Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. Tibtech. 7: 39-44.
- Magalhães FM, Baldani JI, Souto SM, Kuykendall JR, Döbereiner J (1983) A new acid-tolerant *Azospirillum* species. An. Acad. Brasil. Siênc. 55: 417-430.
- Magalhães FMM (1984) Ocorrência de *Azospirillum amazonense* em alguns ecossistemas. Rev. Microbiol., São Paulo 15: 246-252.
- Monzón de Asconegui MA, Siroli NS (1985) Presencia de *Azospirillum amazonense* y micorrizas vesículo-arbusculares en rizósfera de gramíneas de Corrientes (Argentina). IV Congreso Argentino de Microbiología, Resumen N°A49, Buenos Aires, Argentina.
- Moris M, Bellone CH (1994) Nitrogen fixing bacteria associated with roots of 60 natural grasses species. En: Hegazi NA, Fayes M, Monib M (Ed), Nitrogen fixation with non-legumes, The American University in Cairo Press, Egypt. p. 359-360.
- Okon Y, Vanderleyden J (1997) Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. ASM News 63: 366-370.
- Pedraza RO, Bellone CH, Díaz Ricci JC (1997) Variedades de caña de azúcar y *Azospirillum* spp. En: Bellone CH (Ed), Biología del suelo – Fijación biológica del nitrógeno, Facultad de Agronomía y Zootecnia, Universidad Nacional de Tucumán, Argentina, p. 127-130.
- Pedraza RO, Díaz Ricci JC, Bellone CH (1999) Identificación de cepas de *Azospirillum* aisladas de caña de azúcar por análisis de restricción del rADN amplificado. En: Stegmayer AR, Pernasetti DS, Gómez Bello C (Ed), Biología del suelo – Fijación biológica del nitrógeno, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Catamarca, Argentina, p. 177-179.
- Ueda T, Suga Y, Yahiro N, Matsuguchi T (1995) Remarkable N₂-fixing bacterial diversity detected in rice rotos by molecular evolutionary análisis of nif H gene sequences. J. Bacteriol. 177: 1414-1417.