

POBLACIONES NATIVAS DE *Azospirillum* SPP. ASOCIADAS A DOS CULTIVARES DE TRIGO, EN SUELOS AGRICOLAS DEL SUDESTE DE LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES (ARGENTINA)

C C CASTELLARI, A M QUADRELLI DE ESCUDER, Y E ANDREOLI, C M CREUS, C A BARASSI

Unidad Integrada FCA (UNMP)-INTA. Ruta 226, Km. 76.5 - C.C. 276 - 7620 Balcarce, Argentina

AUTOCHTHONOUS *AZOSPIRILLUM* POPULATIONS FROM SOILS OF THE SOUTHEAST OF BUENOS AIRES PROVINCE, ASSOCIATED WITH TWO WHEAT CULTIVARS

Autochthonous *Azospirillum* populations associated with two wheat cultivars, were isolated from soils of the southeast of Buenos Aires Province, Argentina. *Triticum aestivum* cv. Buck Pucará and *T. durum* cv. Balcarceño-INTA plants were collected at different phenological stages from Balcarce, Miramar and La Dulce soils. Roots were surface-sterilized and bacteria were isolated in semisolid NFb medium, and then characterized in congo red agar and glucose and/or malate potato agar media. The most probable number (MPN) of bacteria per g fresh root weight was also determined. *Azospirillum*-like bacteria, with characteristics similar to those reported for *A. brasilense*, were isolated in most cases. The MPN was highest both at wheat tillering and anthesis phenological stages, decreasing at physiological maturity.

Key words. *Azospirillum* - Soils - Wheat

INTRODUCCION

El género *Azospirillum* spp. está constituido por varias especies de bacterias microaerófilas presentes en la rizósfera, habiendo sido primariamente definido como característico de suelos tropicales (Döbereiner 1992). Sin embargo, su distribución geográfica es mundial y se lo ha obtenido a partir de una amplia variedad de plantas en diversos climas, y en regiones desérticas, suelos inundados y suelos salinos (Michiels *et al.* 1989). En la Argentina se han aislado bacterias de este género de la rizósfera de especies vegetales de zonas subtropicales, templadas y templado-frías (Alvarez 1983; Okon, Labandera 1994).

Si bien ha sido reconocido desde hace tiempo que la asociación con *Azospirillum* favorece el crecimiento y rendimiento en gramíneas (Kapulnik *et al.* 1981), aún hoy resulta difícil estimar con precisión a nivel de campo, cuál sería el impacto real de la inoculación sobre la producción vegetal final (Okon, Labandera 1994). En la Argentina, la siembra de trigo se efectúa preponderantemente en zonas templadas y templado-frías. Ahora bien, se ha mostrado en otros países que la colonización de la rizósfera de gramíneas con *Azospirillum* spp. es pobre cuando la introducción del género se realiza en regiones con estas características climáticas (Harris *et al.* 1989). Más aún, las comunidades microbianas particulares de los suelos son quienes parecen controlar a través de su interacción con *Azospirillum* spp., la proliferación y funciones de la bacteria en los mismos (Janzen, McGill 1995). Por otra parte, todavía está vigente la discusión acerca de si la

colonización preferencial de la planta por determinadas cepas de *Azospirillum* spp. influencia significativamente o no el efecto promotor del crecimiento (Bashan, Levany 1990). En este contexto, el aislamiento de poblaciones autóctonas naturalmente asociadas al hospedante es un paso previo a la obtención de inoculantes con mayor capacidad de incrementar el rendimiento del trigo, que los derivados de cepas foráneas. Algunas evidencias en este aspecto ya han sido obtenidas en la Argentina (Okon, Labandera 1994). Estas consideraciones justifican el objetivo general del presente trabajo, de investigar la presencia de poblaciones nativas de *Azospirillum* en las regiones donde posteriormente se realicen experimentos de inoculación de trigo a campo y estudios acerca de sus efectos en la producción vegetal bajo condiciones normales o de estrés.

MATERIALES Y METODOS

La recolección de muestras se realizó en sembradíos de trigo de las localidades del Sudeste Bonaerense de Balcarce, Miramar y La Dulce, sobre los cultivares Buck Pucará (*Triticum aestivum*) y Balcarceño-INTA (*T. durum*) y durante los estadios fenológicos correspondientes a macollaje, antes y madurez fisiológica. De las filas centrales de cada parcela, compuesta a su vez por cinco surcos, se extrajeron al azar en cada caso cinco plantas con sus raíces hasta treinta cm de profundidad, con suelo rizosférico. Las muestras fueron colocadas en bolsas de polietileno herméticas para evitar la pérdida de humedad durante su traslado al laboratorio. El sistema radical de cada planta se lavó con agua corriente, luego con agua destilada, y posteriormente se dividió en dos submuestras homogéneas destinadas una de ellas al aislamiento de los microorganismos y la otra a la cuantificación de los mismos.

Para el aislamiento de microorganismos se cortaron, de la zona inmediatamente superior a la cofia, tres segmentos de 1 cm

de longitud cada uno que fueron esterilizados superficialmente con cloramina-T al 1% durante 1 min, lavados con buffer fosfato 50 mM (pH 7) 1 min y enjuagados tres veces con agua destilada estéril. Cada segmento así tratado fué homogeneizado en mortero con buffer fosfato 50 mM (pH 7) estéril. Cada muestra vegetal se sembró primariamente en medio NFb semisólido (Döbereiner 1980) e incubó a 35°C durante 6 días, efectuándose observaciones iniciales a las 24 y 48 hs. En los casos en que se formó una película subsuperficial blanca con características típicas del género (Baldani, Döbereiner 1980), se realizó un segundo repique en iguales medio y condiciones de cultivo, sembrándose también en medio rojo congo (RC). Este último fué utilizado como criterio complementario, con el fin de identificar colonias de *Azospirillum* por sus características macroscópicas (Rodríguez Cáceres 1982). Luego de lo cual se realizaron observaciones microscópicas bajo contraste de fases, a fin de confirmar la presencia de bacilos curvos con movimientos espiralados, típicos del género (Tarrand *et al.* 1978).

Sobre la segunda submuestra del sistema radical de cada planta se realizó la cuantificación de número más probable de microorganismos por gramo de peso fresco (NMP g⁻¹ peso fresco de raíz), según la técnica descrita por Mc Crady (Postgate 1969). A partir de 1 g de material vegetal desinfectado superficialmente con cloramina-T al 1% y lavado como se indicó en la sección precedente, se realizaron homogenatos en mortero y diluciones seriadas con buffer fosfato 50 mM (pH 7). Cada dilución se sembró por triplicado en medio NFb semisólido e incubó a 35°C durante 6 días. La homogeneización de la raíz se realizó luego de la desinfección superficial de la misma, por lo que sólo fueron cuantificados los diazotrofos microaerófilos de su interior.

A partir de las colonias aisladas en medio RC se realizaron diversas pruebas con el fin de identificar especies dentro del género *Azospirillum*, siguiendo algunos de los criterios descriptos por Tarrand *et al.* (1978): 1) crecimiento en medios con distintas fuentes de carbono, esto es, medio de cultivo agar papa con malato o con glucosa; 2) desarrollo en medio NFb semisólido sin el agregado de biotina; y 3) observación de la motilidad de los bacilos a través del tiempo. Esta última se realizó para cada aislamiento a los días 1, 2, 4 y 7 de cultivo en medio NFb semisólido.

RESULTADOS Y DISCUSION

El género *Azospirillum* se halló asociado al sistema radicular de ambos cultivares de trigo, en las tres localidades relevadas. A partir de los dos primeros muestreos, coincidentes con los estadios fenológicos de macollaje y antesis, se realizaron 33 aislamientos totales de ambos cultivares. Todos ellos produjeron en medio NFb semisólido, una película de crecimiento subsuperficial, densa y blanca, entre las 24 y 72 hs, con alcalinización del medio de cultivo. La observación de la misma, con microscopio bajo contraste de fases, reveló la presencia de espirilos Gram negativos, con gránulos refractivos y desplazamiento en forma de espiral típico de *Azospirillum* spp., mostrando avance y retroceso de las células curvas con rotación radial (Tarrand *et al.* 1978). Todos los aislamientos fueron sembrados en medio RC, donde se desarrollaron colonias pequeñas, de color rojo, forma circular con borde ondulado y apariencia seca, coincidentes con las descriptas para el género *Azospirillum* (Rodríguez Cáceres 1982). Si bien muchos microorganismos absorben el colorante utilizado en dicho medio, la

observación microscópica de las colonias confirmó la presencia de bacilos curvos, con movimientos espiralados. Las pruebas de caracterización, basadas en los criterios de utilización de la fuente carbonada y la pérdida de motilidad en cultivos envejecidos, mostraron que 18 de dichos aislamientos poseían características coincidentes con las de la especie *A. brasilense*. Las mismas correspondieron a la formación de colonias pequeñas, rosado-blanquecinas, con superficie opaca y consistencia seca en medio agar papa malato, sin presentar crecimiento en agar papa glucosa. Además, no perdieron la motilidad al cabo de 7 días de cultivo en medio NFb semisólido. En oposición, *A. lipoferum* desarrolla en medio agar papa glucosa, produciendo colonias blancas de tamaño grande y consistencia mucoide, y pierde su motilidad con el tiempo. Sólo tres aislamientos realizados a partir de raíces del cultivar Buck Pucará, en las tres localidades, coincidieron con estas particularidades reportadas para dicha especie, requiriendo además la presencia de biotina en el medio de cultivo. Los restantes 12 aislamientos presentaron características comunes a ambas especies de *Azospirillum*.

El tercer muestreo, realizado a la madurez fisiológica del trigo, no permitió obtener aislamientos, ya que en el medio de crecimiento NFb semisólido se formó una película difusa de límites no bien definidos, con alcalinización temprana del medio. La observación microscópica de la misma reveló, en un número reducido de repeticiones, la presencia de bacilos curvos con las características antes mencionadas, cualquiera fuese el cultivar y la localidad en estudio.

La Tabla I muestra el NMP g⁻¹ peso fresco de raíz, en los cultivares Balcarceño-INTA y Buck Pucará de trigo, en diferentes estadios de desarrollo y distintos suelos. El NMP fué mayor en el estadio de macollaje en ambos cultivares, independientemente de la localidad de procedencia. Durante el estadio de antesis los valores de NMP g⁻¹ peso fresco de raíz se mantuvieron sin variación en

Tabla I. Número más probable de microorganismos por g de peso fresco de raíces de trigo en diferentes estadios fenológicos, en tres localidades del sudeste de la Provincia de Buenos Aires.

Estadio fenológico	Balcarce		Miramar		La Dulce	
	Cv A	Cv B	Cv A	Cv B	Cv A	Cv B
Macollaje	1,1 10 ⁶	1,1 10 ⁶	1,1 10 ⁶	1,1 10 ⁶	1,1 10 ⁶	1,1 10 ⁶
Antesis	4,5 10 ⁴	1,5 10 ⁶	4,5 10 ⁴	7,5 10 ⁴	1,1 10 ⁶	9,5 10 ⁵
Madurez fisiológica	2,5 10 ³	2,5 10 ³	2,5 10 ³	2,5 10 ³	0,9 10 ²	0,9 10 ²

Cv A y Cv B: cultivares Balcarceño-INTA y Buck Pucará, respectivamente. Cada valor corresponde al promedio de cinco plantas, con desviaciones estándares en el rango $\pm 20\%$ ($P < 0,05$).

ambos cultivares de la localidad de La Dulce y en el cultivar Buck Pucará de la localidad de Balcarce, disminuyendo en las restantes muestras a concentraciones del orden de 10^4 microorganismos por g de raíz. La presencia ubicua de *Azospirillum* es acorde con su significancia ecológica en lo que hace al efecto promotor del crecimiento que provoca su asociación con vegetales. No obstante, se ha sugerido que en la rizósfera de regiones templadas y frías su número puede verse superado por otros microorganismos, minimizándose así su importancia cuantitativa (Michiels et al. 1989). No parece ser éste el caso de nuestro trabajo, ya que al menos en el período correspondiente a los estadios fenológicos de macollaje y antesis, el NMP g⁻¹ peso fresco de raíz de diazotrofos microaerófilos fué de 10^6 en ambos cultivares (Tabla 1). Lo cual podría responder en parte a la necesidad planteada de aislar de la rizósfera bacterias autóctonas promotoras del crecimiento que muestren una fuerte colonización radicular (Michiels et al. 1989).

Es probable que la elevada concentración bacteriana observada en estas etapas fenológicas tenga su correlato en la gran actividad de las células meristemáticas existente en estos estadios, lo cual originaría un alto nivel de metabolitos exportables a la rizósfera y por lo tanto disponibles por los microorganismos para su establecimiento, reproducción y supervivencia (Christiansen-Weniger, Van Veen 1991).

Durante la madurez fisiológica se produjo una disminución del NMP g⁻¹ peso fresco de raíz en ambos cultivares y en las tres localidades, llegándose a los valores más bajos en la localidad de La Dulce.

Los resultados obtenidos en experimentos a campo han mostrado en general un efecto de la inoculación con *Azospirillum* en el rendimiento de diversas especies vegetales variable, del orden del 5-30% (Okon, Labandera 1994). No obstante, a nivel de invernáculo y en suelos pasteurizados, la inoculación de plántulas de trigo con *A. brasilense* Sp. 245 puede revertir en un 50% el efecto del estrés hídrico aplicado en antesis, sobre la producción final de granos (Alvarez, Barassi 1992). Es posible que en el campo este efecto se vea reducido por la competencia con otros microorganismos de la rizósfera o con bacterias del mismo género. Pero por otra parte, en suelos no estériles siempre está presente la posibilidad que cepas de *Azospirillum* spp. autóctonas contrarresten parcialmente en las plantas controles los efectos deletéreos de la sequía, restringiendo así en las experimentales la visualización del efecto de la inoculación con la cepa escogida. Las cepas de *Azospirillum* spp. reportadas en el presente trabajo podrían aportar datos a fin de clarificar este y otros aspectos tendientes a optimizar el uso del género como paliativo del estrés hídrico en vegetales.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de Mar del Plata (Subsidios Trianales de la Secretaría de Ciencia y Técnica números AGR 13 y AGR 36) y al INTA (Programa 05, Plan 0126), por la financiación de este trabajo.

REFERENCIAS

- Alvarez R. 1983. Presencia de *Azospirillum lipoferum* y *Azospirillum brasilense* en rizósfera de algunas plantas cultivadas y silvestres. Rev. Facultad de Agronomía (UBA) 4: 271-276
- Alvarez ML, Barassi CA. 1992. Efecto de la inoculación con *Azospirillum* sobre el estado hídrico y rendimiento de trigo sometido a estrés. XIX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal 65-66
- Baldani VL, Döbereiner J. 1980. Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. Soil Biol. Biochem. 12: 43-439
- Bashan Y, Levanony H. 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. Can. J. Microbiol. 36: 591-608
- Christiansen-Weniger C, Van Veen J. 1991. Nitrogen fixation by *Azospirillum brasilense* in soil and the rhizosphere under controlled environmental conditions. Biol. Fertil. Soils 12: 100-106
- Döbereiner J. 1980. Forage grasses and grain crops. En: Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation. Bergensen FJ (Ed.). Wiley and Sons Ltd. Chichester. Págs. 535-555
- Döbereiner J. 1992. Ch. 109: The Genera *Azospirillum* and *Herbaspirillum*. En: The Prokaryotes, Vol. III. Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer K-H (Eds.). Springer-Verlag Publ. New York. Págs. 2.236-2.253
- Harris JM, Lucas JA, Davey MR, Lethbridge G. 1989. Establishment of *Azospirillum* inoculant in the rhizosphere of winter wheat. Soil Biol. Biochem. 21: 59-64
- Janzen RA, McGill WB. 1995. Community-level interactions control proliferation of *Azospirillum brasilense* Cd in microcosms. Soil Biol. Biochem. 27: 189-196
- Kapulnik Y, Sarig S, Nur I, Okon Y, Kigel J, Henis Y. 1981. Yield increases in summer cereal crops of Israeli fields inoculated with *Azospirillum*. Exp. Agric. 17: 179-187
- Michiels K, Vanderleyden J, Van Gool A. 1989. *Azospirillum*-plant root association: A review. Biol. Fertil. Soils 8: 356-368
- Okon Y, Labandera CA. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. Soil Biol. Biochem. 26: 1591-1601
- Postgate JR. 1969. Viable counts and viability. En: Methods in Microbiology, Norris JR, Ribbons DW (Eds.). Academic Press. New York. Págs. 611-628
- Rodríguez Cáceres E A. 1982. Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. Appl. Environ. Microbiol. 44: 990-991
- Tarrand JJ, Krieg NR, Döbereiner J. 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. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. Can. J. Microbiol. 24: 967-980