

COMUNICACION CORTA

Evaluación de *Acetobacter diazotrophicus* en tallos y meristemos de variedades de caña de azúcar cubanas

Juana Pérez, Rosa García,* Mario Casas, Marcia Medina, Mercedes Veguilla y Zuleika Fernández-Vega.

Grupo de Biofertilizantes, Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar, Avenida Van Troi No. 17203, Boyeros, Ciudad de La Habana, Cuba. *Instituto Nacional de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical, Calle 2, esquina 1, Santiago de las Vegas, Boyeros, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 25 de marzo del 2000. Aceptado: 25 de abril del 2001.

Palabras clave: *Acetobacter diazotrophicus*, fijación de nitrógeno, meristemos.
Key words: *Acetobacter diazotrophicus*, nitrogen fixation, meristems.

A finales de la década de los ochenta fue aislada del tejido de raíces y tallos de caña de azúcar una nueva bacteria ácido tolerante fijadora de nitrógeno clasificada como *Acetobacter diazotrophicus*.¹ La influencia de esta bacteria debe ser estudiada desde las primeras etapas del desarrollo de la planta y las técnicas de cultivo *in vitro* facilitan estos estudios, además de garantizar que las plántulas obtenidas bajo estas condiciones estén libres de patógenos² y sean genotípicamente idénticas a la planta madre.

Este microorganismo ha sido aislado en un gran número de variedades de caña de azúcar en países como Brasil, México, Cuba, Australia y Argentina.^{1,3-7}

La fijación de nitrógeno por *Acetobacter diazotrophicus* puede alcanzar hasta $1\ 530\ \text{nmol de } C_2H_4 \cdot h^{-1} \cdot mg^{-1}$,⁸ sin embargo, esta reducción de acetileno no resulta de la misma magnitud en todas las variedades de caña de azúcar estudiadas. Otra característica importante de la bacteria es la no presencia de la enzima nitrato reductasa, lo cual le da una gran importancia y relevancia tanto en el ámbito ecológico como agronómico, pues ha permitido explicar la elevada fijación de nitrógeno y adecuada complementación planta microorganismo cuando se fertiliza con nitrógeno mineral.⁹

Los fijadores de nitrógeno que se relacionan con la caña de azúcar re-

visten una gran importancia, especialmente aquellos que como *Acetobacter diazotrophicus* viven dentro de la planta,^{1,10} por lo que este trabajo se propuso cuantificar el número de estas bacterias en diferentes variedades caña de azúcar, así como determinar su presencia en meristemos apicales de este cultivo.

Primeramente fueron evaluadas 13 variedades de caña de azúcar del Banco de Semillas Básicas de Nueva Paz, La Habana, después fueron analizadas tres variedades en Areas de producción de Murgas (Complejo Agroindustrial "Martínez Prieto"), Ciudad de La Habana y finalmente, la variedad Ja60-5, Area experimental del Complejo Agroindustrial "Espartaco", Cienfuegos. Las determinaciones se realizaron por el Método del Número Más Probable (NMP) a partir del macerado de los fragmentos centrales del tallo en una disolución de sacarosa 5% para formar diluciones seriadas que fueron sembradas empleando el medio LGI-P semisólido sin nitrógeno,¹ con suplemento de jugo de caña y el mismo medio sólido con extracto de levadura para comprobación y purificación de los aislamientos.

La presencia de *Acetobacter diazotrophicus* en meristemos apicales fue evaluada en la variedad Ja60-5, a través de dos experimentos. Los meristemos fueron extraídos de forma aséptica en el gabinete de seguridad.

El primer experimento consideró meristemos pequeños:

- con tratamiento térmico y sembrados enteros (PCE).
- con tratamiento térmico y macerados (PCM).
- sin tratamiento térmico y sembrados enteros (PSE).
- sin tratamiento térmico y macerados (PSM).
- con tratamiento térmico y macerados (GSM).

y un sexto experimento de meristemos grandes con tratamiento térmico y sembrados enteros (GSE).

El tamaño de los meristemos pequeños osciló entre 2 y 3 mm, los grandes entre 4 y 5 mm. El tratamiento térmico consistió en sumergir los meristemos en agua estéril a 52 °C, se sembraron 10 réplicas por tratamiento en el medio LGI-P semisólido, el control positivo fue la cepa PAL 5 (ATCC 49037) de *Acetobacter diazotrophicus* procedente de Brasil y el negativo el medio sin inocular, el material fue incubado a 30 °C por 10 d.

El segundo experimento se realizó con el objetivo de verificar la presencia del microorganismo en los tallos correspondientes a los meristemos de una misma planta, la siembra de los tallos se efectuó con fragmentos de tejido vegetal en el medio LGI-P semisólido con 10 réplicas para cada tratamiento y se incubó a 30 °C y consideró meristemos pequeños sin tratamiento térmico y:

- sembrados enteros (PSE).
- sin tratamiento térmico y macerados (PSM).

Se realizó además, la caracterización morfofisiológica de las dos cepas aisladas (PR8 y 166) en comparación con la cepa patrón PAL5. Los resultados de ese proceso fueron confrontados con las especificaciones del Manual de Identificación de bacterias Bergey's.¹²

La capacidad dinitro fijadora de las cepas se evaluó por la técnica de reducción del acetileno (ARA)^{13,14} en el medio LGI-P semisólido, las muestras se analizaron por cromatografía gaseosa con los parámetros de corrida siguientes: columna de vidrio (2.7 a 4.0 mm); matriz de columna porapak N80-100 mallas, temperatura inyector 100 °C, columna 90 °C, detector de llama 150 °C, flujo de nitrógeno (gas portador) 30 mL · min⁻¹, hidrógeno (combustible) 32.5 mL · min⁻¹ y aire 32.5 mL · min⁻¹.

Los resultados de los conteos mostraron que para todas las variedades encuestadas, en algún momento fue detectado el crecimiento típico de la bacteria (Tabla 1), considerándose como resultado positivo en el medio LGI-P semisólido el crecimiento en forma de película amarillo-naranja, con una decoloración del medio, los crecimientos dudosos fueron sembrados en placas de agar sólido, donde el crecimiento típico se observa como colonias pequeñas de color naranja.

El valor más elevado encontrado fue para la variedad Ja60-5, con títulos de bacterias que van desde 4,75 · 10⁷ hasta 4,5 · 10⁸ células · mL⁻¹. Los resultados obtenidos están en el intervalo de los reportados en caña de azúcar por Dobereiner J.,¹⁵ con valores que abarcan diluciones desde 10⁷ hasta 10⁷ tanto para las raíces, zonas apicales, la base de los tallos y hojas, así como en la paja de caña.

No se encontró crecimiento típico del microorganismo en los meristemas para ninguna de las variantes estudiadas en el primer experimento, y aunque fue observado un cambio del medio en los tratamientos macerados sin tratamiento térmico (PSM y GSM), esto se debe a la presencia de fenoles provenientes del tejido vegetal. La siembra en placa de los tubos dudosos mostró idénticos resultados negativos. En un experimento realizado por Sevilla *et al.* en vitroplántulas de caña de azúcar, el *Acetobacter diazotrophicus* no fue aislado en las plántulas empleadas como control.¹⁶

En el segundo experimento existieron dudas en la mayoría de los casos y se observó una ligera decoloración del medio, que se hizo más evidente a los 10 d de incubación, todos los frascos fueron sembrados en el medio LGI-P semisólido, confirmando el crecimiento típico de la bacteria en siete tubos que correspondían a los tallos de los meristemas macerados y en cinco de los enteros, lo cual demuestra que aún existiendo la bacteria en el tallo, esta no se desarrolla en el meristemo apical, permitiendo el uso de plantas micropropagadas *in vitro* para estudios en este microorganismo. Las plántulas micropropagadas obtenidas por cultivo de meristemas han sido utilizadas por sus condiciones de esterilidad, en estudios de inoculación de *Acetobacter diazotrophicus* en caña de azúcar,^{2,16} arroz¹⁷ y boniato.¹⁸

Las cepas estudiadas mostraron un comportamiento igual a la patrón PAL 5 (Tabla 2). Resultados similares también han sido reportados anteriormente por otros autores.^{3,4,15}

La capacidad dinitro fijadora de las cepas evaluadas resultó superior a la de la patrón y su magnitud (10⁹ nmol de C₂H₄ · vial⁻¹ · ha⁻¹) fue coincidente con la reportada por James *et al.*¹⁵

CONCLUSIONES

La presencia de *Acetobacter diazotrophicus* en las variedades de

caña de azúcar evaluadas resulta superior a 10² células · (gramo de tejido vegetal)⁻¹.

No se detectó crecimiento de la bacteria en ninguno de los meristemas correspondientes a las variantes estudiadas, a pesar de haberse encontrado en el 60 % de los tallos estudiados.

Fueron caracterizadas dos cepas autóctonas de esa bacteria cuya ubicación dentro del género y especie *Acetobacter diazotrophicus* fue convenientemente confirmada.

Es recomendable emplear para los estudios *in vitro* plántulas obtenidas a partir de meristemas pequeños, sin necesidad de realizar tratamiento térmico.

BIBLIOGRAFIA

1. Cavalcante V. and Dobereiner J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and Soil*, **108**, 23, 1988.
2. Reis V., López Olivares F., Martínez A., Bueno F., Baldani J. and Dobereiner J. Technical approaches to inoculate micropropagated sugar cane plants were *Acetobacter diazotrophicus*. *Plant and Soil*, **206**, 205, 1999.
3. Gillis M., Kersters K., Haste B., Janssens D., Kroppenstedt R., Stephan M., Teixeira K., Dobereiner J. and De Ley J. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov. A nitrogen fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **39**, 361, 1989.
4. Fuentes-Ramírez L., Jimenez-Salgado T., Albarca-Ocarro I. and Caballero-

Tabla 1. Resultados del número de células de *Acetobacter diazotrophicus* presentes en las diferentes variedades.

Lugar	Variedades	NMP
Banco de Sernilla Básica "Nueva Paz", La Habana.	C87-51	15,0
	C757-75	2,2
	J64-19	0,35
	C266-70	0,9
	C323-68	0,2
	C294-70	0,2
	C120-78	0,15
	CP52-43	0,7
	B77-418	0,75
	C568-65	0,6
	B63-118	0,75
	C374-72	1,2
Complejo Agroindustrial "Martínez Prieto", Ciudad de La Habana.	Ja6	
	C87-51	0,0
	C120-78	0,0
Complejo Agroindustrial "Espartaco", Cienfuegos.	Ja60-5	45,0
	Ja60-5	450,0

NMP Número de células · 10² · (gramos de tejido vegetal)⁻¹.

Tabla 2. Resultados de la caracterización morfofisiológica y de la evaluación por ARA de las cepas PR8 y 166 aisladas en tallos de caña de azúcar en comparación con la patrón PAL 5 (ATCC 49037) de *Acetobacter diazotrophicus*.

Prueba	Cepa		
	PAL 5	PR8	166
Crecimiento en medio LGI-P semisólido	Amarillo-naranja en la superficie del medio y decoloración de amarillo a blanco.	Amarillo-naranja en la superficie del medio y decoloración de amarillo a blanco.	Amarillo-naranja en la superficie del medio y decoloración de amarillo a blanco.
Morfología celular	Bastoncillos cortos con extremos redondeados, simples, dobles o formando cadenas.	Bastoncillos cortos con extremos redondeados, simples, dobles o formando cadenas.	Bastoncillos cortos con extremos redondeados, simples, dobles o formando cadenas.
Crecimiento en medio LGI-P semisólido	Colonias pequeñas anaranjadas y decoloración del medio.	Colonias pequeñas anaranjadas y decoloración del medio.	Colonias pequeñas anaranjadas y decoloración del medio.
Gram	-	-	-
Catalasa	+	+	+
Hidrólisis del almidón	-	-	-
Hidrólisis de la gelatina	-	-	-
Redox de glucosa	+	+	+
Redox de etanol	+	+	+
Producción de ácido a partir de glucosa	-	-	-
Producción de pigmento en medio GYC.	+	+	+
Colonias carmelitas en medio Papa-P	+	+	+
Nanomoles de $C_2H_4 \cdot \text{vial}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	194,40	222,16	229,76

Mellado J. *Acetobacter diazotrophicus* an indolacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. **Plant and Soil**, 20, 1993.

5. Li R. and McRae I. Specific identification and enumeration of *Acetobacter diazotrophicus* in sugarcane. **Soil Biochem.**, 24, 413, 1992.

6. Ortega E., Rodés R., Gálvez G. y morales F. *Acetobacter diazotrophicus* y nutrición de la caña de azúcar. X Seminario Científico del Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar, BF-17, 1996.

7. Bellone C., de Bellone S., Pedraza R. and Monzón M. Cell colonization and infection thread formation in sugarcane roots by *Acetobacter diazotrophicus*. **Soil Biology and Biochemistry**, 29, 965, 1997.

8. Reis V. Aspectos ecológicos e fisiológicos da bacteria fixadora de N_2 *Acetobacter diazotrophicus*. Tesis en opción al título de Maestro en Ciencias, Universidad Federal Rural de Río de Janeiro, 1991.

9. Boddey R. Biological nitrogen fixation in Sugarcane. A Key for the energetically viable biofuel production. **Critical Rev. in Plant Sci.**, 14, 263, 1995.

10. Kennedy I., Pereg-Gerk L., Wood C., Deaker R., Gilchrist K. and Katupitiya S. Biological nitrogen fixation in non-leguminous field crops: Facilitating the evolution of an effective association between *Azospirillum* and wheat. **Plant and Soil**, 194, 65, 1997.

11. Kirchhof G., Schloter M., Abmus B. and Hartmann A. Molecular microbial ecology approaches applied to diazotrophs associated with non legumes. **Soil Biol. Biochem.**, 29, 853, 1997.

12. Berguey's Manual of Systematic Bacteriology. Edited By John G. Holt, Noel R. Krieg, Peter H. Sneath, James T. Staley and Staley T. Williams, 9th edition, 1994.

13. Schollhom R. and Burris R. Study of the intermediates in nitrogen fixation. **Fed. Proc.**, 24, 710, 1966.

14. Dirworth M. Acetilene Reduction by nitrogen fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. **Biochim. Biophys. Acta**, 127, 285, 1966.

15. Dobereiner J. Recent changes in concepts of plant-bacteria interaction. Endophytic N_2 bacteria. **Ciencia e Cultura (Journal of the Brazilian Association for the advancement of the Science)**, 44, 310, 1992.

16. Sevilla M., de Oliveira A., Baldani I. and Kennedy C. Contributions of the Bacterial Endophyte *Acetobacter diazotrophicus* to Sugarcane Nutrition: A Preliminary Study. **Symbiosis**, 25, 181, 1998.

17. Granato de Andrade A. y Penteadó Marília. Relatório Relativo ao período de agosto a dezembro. EMBRAPA-VAPNPES, Rio de Janeiro, Brasil, 1988.

18. Rodríguez R y Penteadó M. Relatório Relativo ao período Janeiro-Julho. EMBRAPA-VAPNPES, Rio de Janeiro, 1989.

19. Dong Z., Heydrich M., Bernard K. and McCully M. Further evidence that the N_2 -fixing endophytic bacterium from the intercellular spaces of sugarcane stems is *Acetobacter diazotrophicus*. **Applied and Environmental Microbiology**, 61, 1843, 1995.

20. James E., Reis V., Olivares F, Baldani J. and Dobereiner J. Infection of sugarcane by nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. **J. Exp. Bot.**, 45, 757, 1994.