

ARTÍCULO ORIGINAL

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Azospirillum* sp., *Azotobacter* sp. Y *Pseudomonas* sp. PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL DE CULTIVOS DE *Solanum tuberosum* y *Zea mays***MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Azospirillum* sp., *Azotobacter* sp. and *Pseudomonas* sp. PROMOTING PLANT GROWTH OF CROPS *Solanum tuberosum* and *Zea mays*****Román Cabello*, Mamani Gamarra & D. García Ventocilla***Instituto de Biotecnología e Ingeniería Genética, Universidad Nacional del Centro del Perú**E-mail: nicoromanc@hotmail.com****RESUMEN**

Con el objetivo de generar un banco autóctono con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) y su posterior utilización como inoculantes del suelo que disminuyan la fertilización química, se tomaron muestras de raíces de cultivos de papa (*Solanum tuberosum* Var Canchan) y de maíz (*Zea mays* Var Blanco mejorado) tratados con cinco tipos de abonamiento: estiércol de ovino, cuy y vacuno, fertilización química y sin fertilizante, de las cuales se aislaron cepas de bacterias nitrificantes correspondientes a los géneros *Azospirillum*, *Azotobacter* y *Pseudomonas*. Las bacterias fueron diferenciadas en base a su morfología, poder generador de auxinas, solubilización de fosfatos, reacción a la catalasa, oxidasa y similaridad genética previa amplificación de la región del mRNA 16S. Los resultados muestran una amplia base genética que necesita ser caracterizada e identificada exhaustivamente. La producción de AIA en *Azospirillum* llegó hasta niveles de 120 ppm; 118 ppm para el género *Azotobacter* y 115 ppm en *Pseudomonas fluorescens*. De cepas seleccionadas, el DNA fue secuenciado, comparado con la Base de Datos del GenBank e identificadas hasta especie, tales como *Azospirillum brasilense*; *Azotobacter vinelandii*, *A. choccrococum*, *A. nigricans* y *A. salinestrus*. Las secuencias amplificadas con los primer universales 9-27F y 1542R para las cepas de *Azospirillum*, *Azotobacter* y *Pseudomonas fluorescens* utilizados para este estudio no están reportados en la base de datos del GenBank.

Palabras clave: Bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), *Azospirillum* sp., *Azotobacter* sp., *Pseudomonas fluorescens*, Acido Indol Acético, Solubilización de fosfatos.

ABSTRACT

With the aim of generating a native bank with *Promoting Grow Plant Rhizobacteria* (PGPR) and their later use as inoculates of the soils that diminishes the chemical fertilization, samples were taken from roots of cultures of potato (*Solanum tuberosum* Var Canchan) and of maize (*Zea mays* Var Improved white) dealt with five types of fertilization: ovine, bovine guinea and pig manure, chemical fertilization and without fertilizer, of which strains of nitrogen-fixing bacteria corresponding to the genera *Azospirillum*, *Azotobacter* and *Pseudomonas* were isolated. The bacteria were differentiated on the basis of their morphology, generating power of auxins, phosphate solubilization, reaction to the catalase, oxidasa and genetic similarity previous amplification of the region of rRNA 16S. The results show an ample genetic base that exhaustive need to be characterized and to be identified. The production of AIA in *Azospirillum* arrived until 120 levels of ppm; 118 ppm for the genera *Azotobacter* and 115 ppm in *Pseudomonas fluorescens*. Of selected strains, the DNA was sequenced, compared with Base of Data the GenBank and identified until species, such as *Azospirillum brasilense*; *Azotobacter vinelandii*, *A. choccrococum*, *A. nigricans* and *A. salinestrus*. The sequences amplified with primer universal 9-27F and 1542R for the strains of *Azospirillum*, *Azotobacter* and *Pseudomonas fluorescens* used for this study are not reported in the data base of the GenBank.

Key words: Promoting Grow Plant Rhizobacteria (PGPR), *Azospirillum* sp., *Azotobacter* sp., *Pseudomonas fluorescens*, Acetic Indol Acid, phosphate solubilization.

Recibido: 26 Noviembre 2015.**Aceptado: 15 Marzo 2016.**

INTRODUCCIÓN

La pérdida de calidad del suelo está íntimamente relacionada con la disminución de la biodiversidad y concentración de biomasa presente en el suelo (Collados; 2006). Esto es consecuencia del uso indiscriminado de agroquímicos, monocultivos y la falta de aplicación de tecnologías que actúen en armonía con el medio ambiente. En la actualidad los inoculantes microbianos representan una excelente alternativa para llevar a cabo una agricultura sostenible, mejorando el rendimiento y ofreciendo tecnología que responda al medio ambiente (Jiménez, 2007), cumpliendo el papel de “biofertilizantes”, “bioprotectores” y “fitoestimuladores” (Collados, 2006), sin embargo, estas tecnologías no están dando los resultados esperados debido a que estos inoculantes fueron aislados de suelos con clima y composición de nutrientes diferentes al lugar donde son inoculados (Abril, 2006). Una estrategia para minimizar este efecto es que los inoculantes sean autóctonos de modo que puedan responder a las condiciones climáticas y nutricionales del suelo.

Existe un cúmulo de especies bacterianas con capacidad promotora de crecimiento (PGPR). El género *Azotobacter* se caracteriza por la fijación de nitrógeno atmosférico al suelo; *Azospirillum* por la producción de auxinas y *Pseudomonas fluorescens* destaca como biocontrolador.

MATERIAL Y MÉTODOS

Metodología

Muestreo:

Se consideraron cuatro zonas representativas del Valle del Mantaro: Chupaca (CH), Huayao (H), San Ana (SA) y El Mantaro (M), en las cuales se instalaron cultivos de papa y maíz bajo cuatro tratamientos de fertilización: estiércol de ganado vacuno, ovino y cuy, fertilizante químico; también se consideró un tratamiento control (sin fertilización alguna). Unos días antes de la cosecha, se recolectaron muestras de raíces, las que fueron conducidas bajo condiciones estériles y en frío al laboratorio. En el laboratorio se seleccionaron las raíces, se lavaron con agua corriente y enjuagaron con agua estéril, seguidamente fueron cortadas en trozos de 1-2 cm y depositadas en tubos con solución salina peptonada estéril para su trituración.

Aislamiento de bacterias promotoras del crecimiento vegetal PGPR

Azospirillum

Para el aislamiento de cepas pertenecientes al género *Azospirillum* se empleó la metodología descrita por (Abbas *et. al.*, 2007). Los medios de cultivo empleados fueron NFB (N-free semisolid malate médium) y Agar rojo congo.

Se inoculó 1 ml de la muestra obtenida del tratamiento de las raíces en tubos con 9 ml de medio NFB, y se incubó a 30°C por 72 horas, se consideraron positivos (actividad de la nitrogenasa) aquellos cultivos que formaron un halo blanquesino en la superficie. De los cultivos positivos se sembraron en Agar rojo congo por estriás, siendo incubadas a 30°C por 48 horas, las colonias con coloración roja y con morfología convexa fueron aisladas en viales de 20 ml con 5 ml de agar nutritivo en posición inclinada y conservadas a 4°C.

Azotobacter

Se utilizó el método basado en el recuento de *Azotobacter* propuesto por (Zúñiga, 2008). Se inoculó 1 ml de la muestra obtenida del tratamiento de las raíces en tubos con 9 ml de caldo libre de nitrógeno y se incubó a 30°C por un periodo de 48 horas. La presencia de turbidez y cambio de color del medio (de verde a amarillo) indicó el desarrollo de bacterias del género *Azotobacter*. De

los cultivos positivos se sembraron por estrías en Agar libre de nitrógeno, e incubados por espacio de 48 horas a 30 °C. El desarrollo de colonias mucilaginosas transparentes y de color amarillo fueron consideradas como *Azotobacter* sp., las cuales fueron aislados en viales de 20 ml con 5 ml de agar nutritivo en posición inclinada y conservadas a 4°C.

Pseudomonas fluorescentes

Se siguió la metodología de Pérez *et. al.*, (2000) con algunas modificaciones. Se inoculó 1 ml de la muestra obtenida del tratamiento de las raíces en tubos con caldo King B y se incubó a 30°C por 48 horas. La presencia de turbidez de color marrón con olor característico indicó el desarrollo de cepas pertenecientes a la especie *Pseudomonas fluorescens*. De los cultivos positivos se sembraron por estrías en Agar King B. El desarrollo de colonias pastosas, invasivas y con fluorescencia a emisiones UV fueron consideradas *Pseudomonas fluorescens*, estas colonias fueron aisladas en viales de 20 ml con 5 ml de agar nutritivo en posición inclinada y conservadas a 4°C.

Todas las bacterias aisladas fueron sometidas a la prueba de la catalasa, oxidasa (siguiendo la metodología de Escobar, 2002) y a pruebas de tinción Gram.

Evaluación de la capacidad promotora del crecimiento vegetal

Producción de ácido indol acético (AIA)

Se empleó la metodología reportado por Abbas *et. al.*, (2007). Se preparó una curva estándar con ppm de AIA a partir de concentraciones de 0; 5; 10; 15; 20; 25; 25; 30; 40; 60; 80; 100; 150; 200; 300 ppm de AIA en caldo nutritivo. Para la medición de la absorbancia se mezcló cada concentración de AIA preparada anteriormente con solución de Salper (2% de FeCl₃ 0.5M en 35% de ácido perclórico) en una proporción de 2:1 respectivamente, seguidamente se sometió a oscuridad por 30 min y luego se procedió a realizar la lectura a 535 nm.

Solubilización de fosfatos

Para la determinación cuantitativa se preparó el medio de cultivo NBRIP (National Botanical Research Institute phosphate growth médium) con fosfato tricálcico. Se sembraron las cepas en estudio por estrías y se incubaron las placas a 28°C por 10 días, la evaluación de formación de halos fue interdiaria, debido a que la secreción de los ácidos solubilizadores de fosfato que producen las bacterias, es variable.

Identificación molecular de las bacterias autóctonas promotoras de crecimiento.

Aislamiento del DNA genómico de bacterias promotoras de crecimiento.

Para este fin se empleó la metodología de Torija, (2002) adaptado para bacterias, la cual consiste en sembrar las muestras en estudio en 5 ml de caldo nutritivo por 48 horas a 28°C, seguido de centrifugación, lavado y congelado del pellet obtenido a -20 °C por 24 horas, para ser liofilizados; posteriormente se realizó la lisis con 500 µl de tampón 1(tris 50 mM, EDTA 20 mM pH 7,4 con HCl), se añadió 50 µl de SDS al 10%, se mezcló e incubó a 65°C por 30min, luego se adicionó 200 µl de acetato de potasio 5M se vorteoó y se incubó a -20°C por 2 horas, luego se centrifugó a 12000 rpm por 20 min y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo, se añadió 700 µl de isopropanol e incubó a -20°C por 3horas para precipitar el DNA. El pellet de DNA se lavó con 500 µl de etanol al 70% (v/v) luego se secó al vacío el pellet y se resuspendió con 50 µl de buffer TE. Posteriormente se realizó una corrida electroforética en gel de agarosa al 1% en buffer TBE para comprobar la extracción de DNA. Se utilizó el Marker Lamda DNA/Hind III (Fermentas). Finalmente se determinó la concentración de DNA extraído a 260nm.

Amplificación de la región del rRNA 16S

Se empleó el kit Gotaq DNA Polymerase (cod# M 3005) PROMEGA con las siguientes concentraciones finales: dNTPs 0,2 mM, buffer 5x Green or colorless Go Taq 1X, primers forward 9-27 (5'-GAGTTTGATCTGGCTCAG-3') 0,5 μ M, primer reverse 1542 (5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3') Taq polimerasa 0,025 U/ μ l, DNA \leq 0,01 μ g/ μ l y agua. Para la amplificación de la región 9-27 – 1542 del rRNA 16S se utilizó el siguiente programa: Desnaturalización inicial: 5 min a 94°C; 35 ciclos (Desnaturalización: 30 s a 94°C; alineamiento 50 s a 50°C; extensión 1 min 30 s a 72°C); extensión final 10 min a 72°C. La amplificación se verificó en electroforesis sobre gel de agarosa al 1% en TAE 1X a 90 V por 1h, se utilizó el marcador de peso molecular GeneRuler 100 bp DNA Ladder plus (Fermentas). Las bandas se visualizaron en un transiluminador UV y se fotografiaron. La cuantificación de DNA amplificado se realizó utilizando cantidad estándar de DNA del fago lambda (Invitrogen) para concentraciones de (20 ng, 40 ng y 60 ng).

Análisis de los perfiles de restricción de la región de la región rRNA 16S

Para determinar los perfiles de restricción de la subunidad ribosomal RNA 16S en la región 9-27 – 1542, se procedió a digerir los amplificados con las siguientes enzimas de restricción: Alu I (Promega), Rsa I (Promega) y Hpa II (Promega) se preparó un Mix igual para las tres enzimas con 16,3 μ l de agua, RE 10X buffer 2 μ l, Acetylated BSA, (10 μ g/ μ l) 1 μ l, enzima de restricción (10U/ μ l) 0,5 μ l, DNA producto de PCR 10 μ l, se incubaron a 37°C por 4h. Seguidamente se realizó una corrida electroforética de los digeridos en gel de agarosa al 2,0% en TAE 1X a 80V. Se utilizó como marcador de peso molecular GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas). Las bandas se visualizaron en un transiluminador UV y se fotografiaron.

Los resultados se compararon con la base de datos del National Center for Biotechnology Information realizando un Blast con los primers utilizados y aplicando la herramienta de New cutter V.2.0 (Biolabs). Para el análisis de los polimorfismos y el análisis estadístico de la información obtenida se utilizó el coeficiente de agrupamiento simple (Sokal y Sneath 1963) y el dendograma se construyó con el método de agrupamiento UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages) para ambos casos se utilizó el programa NTSYS pc 2.0 (Rohlf 1997).

Para la confirmación de datos cinco muestras fueron secuenciadas en Macrogen (Korea), cuatro pertenecientes al género *Azotobacter* y una a *Pseudomonas fluorescens* de PCR.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento y caracterización morfológica de cepas PGPR

Azospirillum

Sobre el medio NFb se observó la formación de una biopelícula blanquecina subsuperficial típica del crecimiento del género *Azospirillum* (Reis *et. al.*, 2004). Este crecimiento reveló el comportamiento microaerófilo acompañado del cambio de pH del medio (de 7 a 5) manifestado por el cambio de color de verde a amarillo (Peña *et. al.*, 2007). La morfología adoptada en Agar rojo congo corresponde a colonias con formas circulares e irregulares, con elevación convexa, plana y con superficie lisa, rugosa. La coloración que adoptaron fue de rojo encendido, siendo esta característica ampliamente usada como criterio para el reconocimiento tentativo del género *Azospirillum* (Rodríguez-Cáceres, 1982). Con respecto a la morfología microscópica se observaron bacilos cortos, esta morfología adoptada se debe a la influencia del tipo de cultivo empleado, al respecto Lamm y Neyra (1981) mencionan que en cultivos semigelificados y gelificados con más de 24 h de incubación, la morfología adoptada por cepas de *Azospirillum* corresponde a células refringentes con forma ovoide y de paredes gruesas, similares a quistes.

Todas las cepas fueron en su gran mayoría Gram negativas, catalasa positiva y oxidasa negativo.

Se aislaron en total 200 cepas de las cuatro zonas consideradas en el trabajo. De cada zona se aislaron un total de 50 cepas, 25 cepas por cultivo (papa y maíz) y 5 cepas por cada tratamiento.

La codificación de las cepas corresponde a los códigos asignados durante la preselección de cepas realizada en campo. Descripción de códigos 12135: El primer número corresponde al género (1: *Azospirillum*, 2: *Azotobacter*, 3: *Pseudomonas*), el segundo, al lugar (1: Mantaro, 2: Huayao, 3: Santa Ana, 4: Chupaca), el tercero, al cultivo (1: papa, 2: maíz), el cuarto, al tratamiento (1: ovino, 2: cuy, 3: vacuno, 4: químico, 5: testigo), y el quinto, al número de cepa.

Azotobacter

Las colonias aisladas en agar libre de nitrógeno presentaron aspecto transparente, coloraciones amarillas y cremas, con aspecto mucilaginoso, similares a lo reportado por Jiménez (2007). Las cepas en su mayoría fueron catalasa positiva, oxidasa variable y Gram negativas. Las formas celulares varían desde bacilos hasta cocos, individuales, en pares o formando agregados irregulares, y algunas veces formando cadenas de tamaño variable. El rango de pH en el que crecen es 4.8 a 8.5, sin embargo el pH óptimo para crecer cuando fijan nitrógeno es 7.0 a 7.5 (Espín, 2002). Se aislaron en total 200 cepas de las zonas y tratamientos considerados en el trabajo

Pseudomonas fluorescens

Las colonias aisladas presentaron color pardo rojizo, brillantes, colonias cremosas, redondas y ovaladas con emisión de fluorescencia ante luz UV (Zuno *et.al.*, 2008), todas resultaron Gram-negativas.

Evaluación de la capacidad promotora del crecimiento vegetal

Producción de ácido indol acético (AIA)

De las pruebas realizadas se identificó 34 cepas del género *Azospirillum* sp., 14 cepas de *Azotobacter* sp. y 19 cepas de *Pseudomonas fluorescens* con capacidad apreciable de producción de AIA *in vitro* mayor a 20 ppm, sin embargo para las pruebas moleculares se escogieron las cepas con producción mayor a 80 ppm (*Figura 01*), debido a que el efecto del AIA sobre las raíces depende de la concentración, siendo 80 ppm estimulante para la elongación radicular, a su vez esta hormona también promueve la capacidad de fijar nitrógeno (Christiansen, 1988). La producción de AIA en el género *Azospirillum* llegó hasta niveles de 120 ppm; 118 ppm para el género *Azotobacter* y 115 ppm en *Pseudomonas fluorescens* estos resultados son diferentes a los obtenidos por Torres-Rubio (2000) que trabajo con 40 muestras de diferentes cultivos de cepas de *Pseudomonas*, *Azotobacter vinelandii*, *Azotobacter chroococcum* y otros que dieron concentraciones de 35 ppm en *Azotobacter vinelandii* y *Azotobacter chroococcum* y 32,2 ppm en *Pseudomonas*, cabe destacar que la producción de AIA incide en el desarrollo de las raíces laterales y pelos radicales, contribuyendo a una mejor eficiencia en la toma de nitrógeno y demás nutrientes del suelo (Hafeez *et. al.*, 2004)

Solubilización de fosfatos

En cuanto a la capacidad de solubilización de fosfatos, 72 cepas de *Azospirillum* formaron halos de 0,1cm a 1cm de radio, 82 cepas de *Azotobacter* formaron halos hasta 1,2cm de radio y 98 cepas de *Pseudomonas fluorescens* formaron halos hasta 1cm de radio, esta formación de halos alrededor de las colonias bacterianas, aparece al desarrollarse en el medio sólido con fosfato de calcio (Ferrera, 2007) debido probablemente a la producción de ácidos orgánicos

(Vázquez *et.al* 2000) tales como: acético, isobutírico, isovalérico, láctico, succínico y propiónico (Ferrera- Cerrato 2007).

Para la caracterización molecular se escogieron aquellas cepas que produjeron halos de solubilización mayor a 0,7 cm, los cuales se muestran el Figura 02.

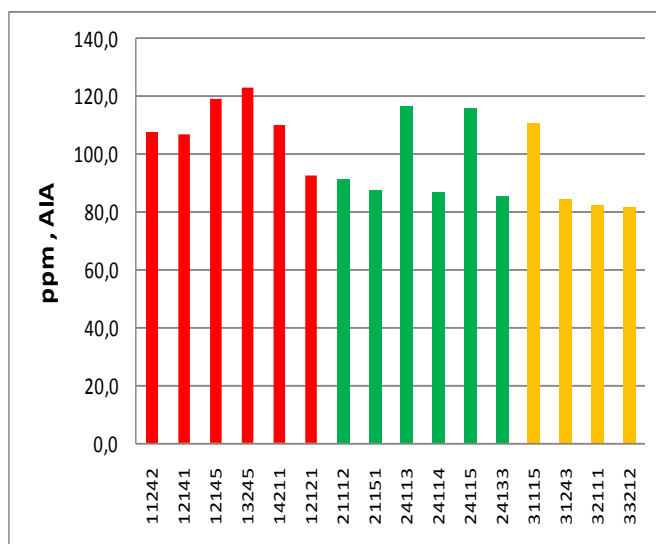


Figura 01. Producción de ácido Indol acético en cepas preseleccionadas del género *Azospirillum*, (inicio con el código 1) *Azotobacter* (inicio con el código 2), *Pseudomonas* (inicio con el código 3), aisladas en las zonas experimentales de El Mantaro, Chupaca, Santa Ana y Huayao.

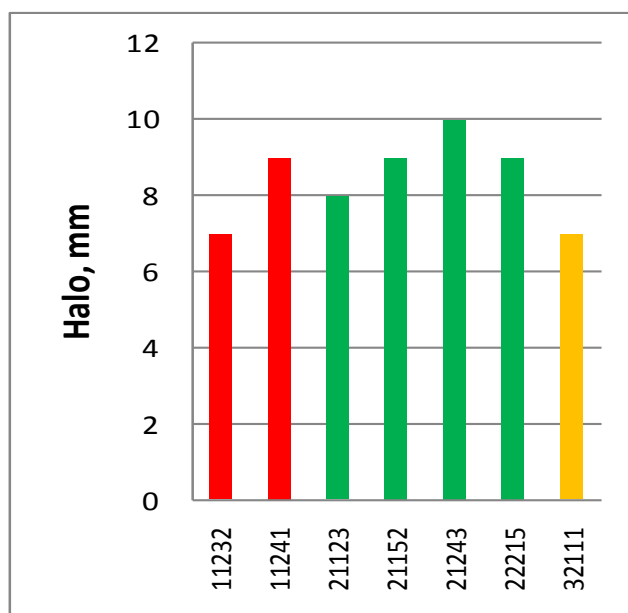


Figura 02. Capacidad solubilizadora de fosfato en cepas del género *Azospirillum* y *Azotobacter* aisladas de las zonas experimentales de El Mantaro, Chupaca, Santa Ana y Huayao con cultivos de papa y maíz.

Identificación molecular de cepas preseleccionadas PGPR

Las concentraciones de DNA obtenidas fueron variables, desde 88 ng/μl a 1500 ng/μl, por ello se hicieron diluciones hasta obtener una concentración 50ng/μl para realizar la PCR.

El producto de PCR fue aproximadamente 1500 pb, y las concentraciones de 40 ng/μl para *Azotobacter* y 60 ng/μl para *Azospirillum* y *Pseudomonas fluorescens* (Figuras 03 y 04).



Figura 03. Productos de PCR de la región 9-27-1542. M Marcador 100bp DNA ladder plus (cada banda representa 100 pb). Carril 1 E. coli, carriles 3,6,9,10,11,13,15,16,18 resultados de *Pseudomonas fluorescens* (60ng/μl) carril 4,5,7,8,12,14,17 resultados de *Azotobacter* (40ng/μl).



Figura 04. Productos de PCR de la región 927-1542. M Marcador 100bp DNA ladder plus, carriles 21,22,25,28,29,30,31,34 resultados de *Azospirillum* (60ng/μl).

La digestión que se realizó a los amplificados de *Azospirillum* sp mostrados en la Figura 05 con las tres enzimas de restricción mostraron elevado polimorfismo. Para evaluar el polimorfismo se usó el servidor BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) y se eligió un tipo de búsqueda especializado con cebadores específicos (*Primer-BLAST*) para hacer una comparación de la secuencia del primer utilizado que anclaría en la secuencia almacenada en la base de datos del NCBI. El resultado mostró la secuencia de *Azospirillum* sp. B510 (NCBI Reference Sequence: NC_013859.1) con un grado de similaridad del 50% y *Azospirillum brasilense* strain Sp7 glycogen phosphorylase (glgP) gene con 570 pb y *Azospirillum brasilense* ipdC, gltX & cysS genes con 1889 pb los cuales no son afines a nuestros resultados porque la PCR obtenida fue de 1500 pb estos resultados indican que los primer universales 9-27 y 1542 utilizados para este estudio no fueron específicos para las cepas de *Azospirillum*; sin embargo se construyó la matriz de similaridad genética utilizando análisis de agrupamiento UPGMA con los resultados de los cortes con las enzimas y se observa alto grado de similaridad genética entre las cepas 11242,12141, 11232, y de otro lado entre las cepas 12121, 12145, 13245 que provienen de suelos de El Mantaro, Huayao, y Santa Ana en cultivos de papa y maíz (Figuras 06, 07 y 08)

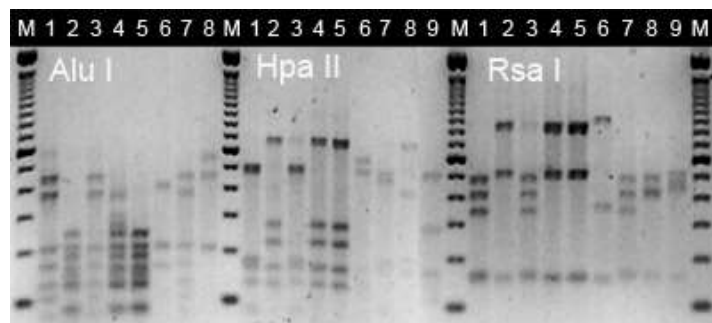


Figura 05. Resultados de los cortes con las enzimas de restricción Alu I, Hpa II y Rsa de los amplificados de *Azospirillum*.

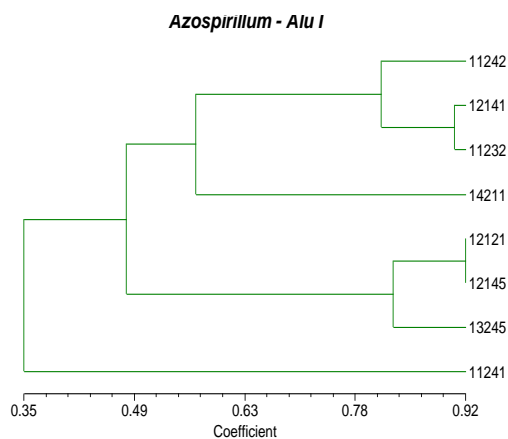


Figura 06. Agrupamiento UPGMA de las cepas de *Azospirillum* en base a los amplificadores escindidos con enzima de restricción Alu I.

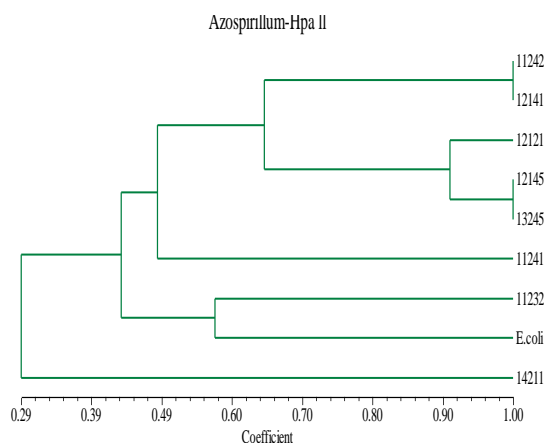


Figura 07. Agrupamiento UPGMA de las cepas de *Azospirillum* en base a los amplificadores escindidos con enzima de restricción Hpa II.

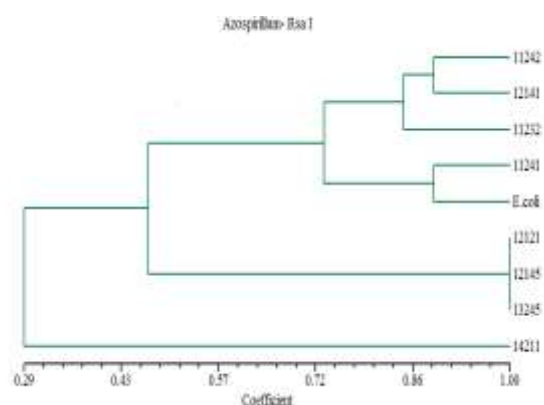


Figura 08. Agrupamiento UPGMA de las cepas de *Azospirillum* en base a los amplificadores escindidos con enzima de restricción Rsa I.

La Figura 09 muestra el resultado de los cortes con enzimas para los amplificadores de las bacterias del género *Azotobacter*. Para evaluar los cortes de restricción se hizo un primer designing con los primers empleados para *Azotobacter* group (taxid:351) sin resultados, pero al realizar un Blast con el primer 9-27F produjeron alineamientos significativos de secuencias de *Azotobacter vinelandii* indicando 44% de probabilidad que es la secuencia de la cepa indicada.

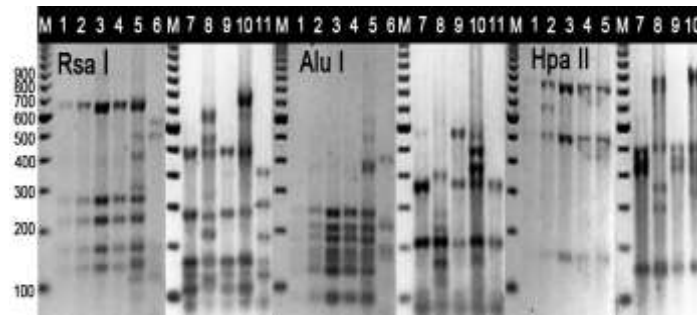


Figura 09. Resultados de los cortes con las enzimas de restricción Alu I, Hpa II y Rsa de los amplificadores de *Azotobacter*.

Los análisis de agrupamiento UPGMA con los resultados de los cortes con las enzimas muestran un alto grado de similitud genética, por un lado entre las cepas 21112, 21151, 24114 y entre 21123 y 21243 provenientes de la zona El Mantaro y Chupaca con cultivo de papa (Figuras 10, 11,12).

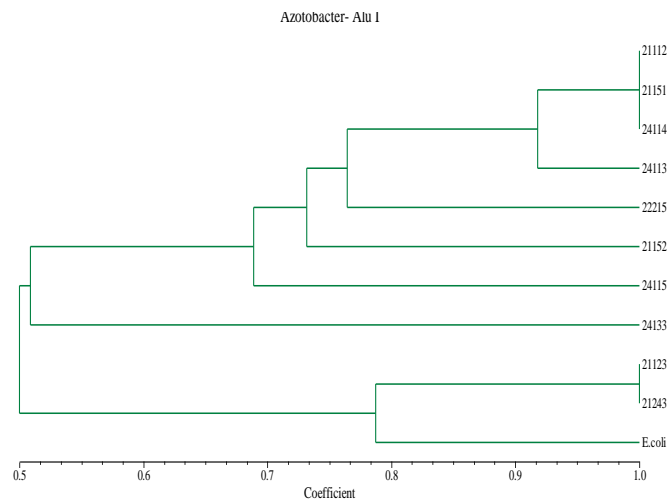


Figura 10. Agrupamiento UPGMA de las cepas de *Azotobacter* en base a los amplificadores escindidos con enzima de restricción Alu I.

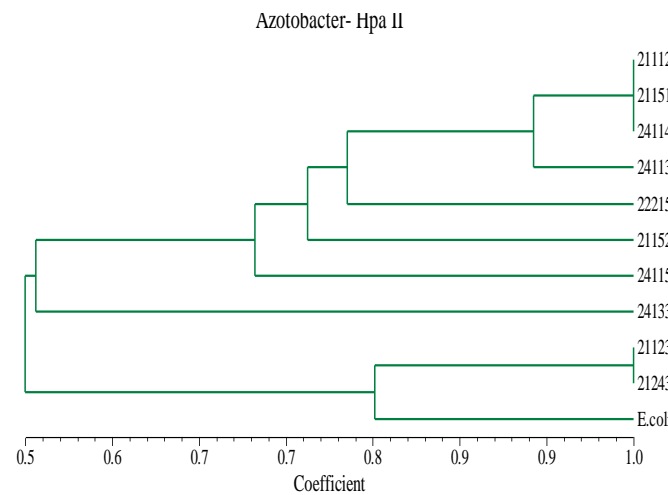


Figura 11. Agrupamiento UPGMA de las cepas de *Azotobacter* en base a los amplificadores escindidos con enzima de restricción Hpa II.

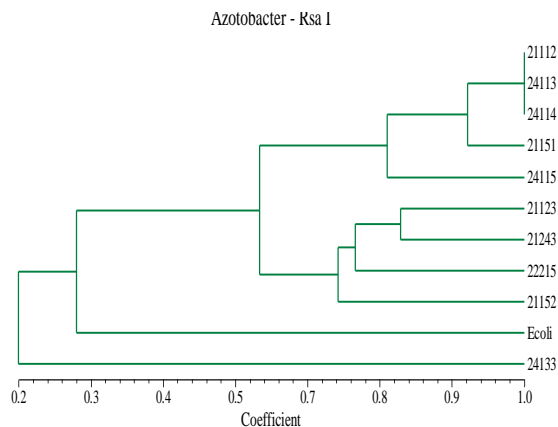


Figura 12. Agrupamiento UPGMA de las cepas de *Azotobacter* en base a los amplificadores escindidos con enzima de restricción Rsa I.

Los resultados para *Pseudomonas fluorescens* indican que las enzimas no encontraron sitios de cortes para la secuencia amplificada (figura 13) al realizar el análisis bioinformático se observó que los primers utilizados no anclaban en la secuencia de *Pseudomonas fluorescens* reportados en la base de datos del Genbank.



Figura 13. Resultados de los cortes con las enzimas de restricción Alu I, Hpa II y Rsa de los amplificadores de *Pseudomonas fluorescens* (resultado negativo).

Los resultados de comparación nucleotídica (Blastn) de las mejores cepas productoras de AIA indican que las cepas 21115 y 21145 con E value 0 y grado de similitud 80% pertenecerían a *Azotobacter choccrococum* y *A. nigricans*, respectivamente; la cepa 24134 con E value de 0, grado de similitud 80,7% pertenecería a *Azotobacter nigricans* sub sp *nigricans* gene for 16S rRNA, la cepa 24215 con E value de 0, grado de similitud de 60,7%, pertenecería a *Azotobacter salinestrus* strain I-A 16 rRNA gene. El secuenciamiento parcial de la cepa 34243 mediante Megablast indica que correspondería a la especie *Erwinia herbicola* insertion sequence ISEhe2 con E value 0 y grado de similitud de 80,7%.

CONCLUSIONES

El estudio mostró que las cepas estudiadas producen ácido indol acético (AIA) y tienen capacidad solubilizadora de fosfatos permitiendo un posterior estudio *in vitro*.

Las secuencias amplificadas con los primers universales 9-27F y 1542R para las cepas de *Azospirillum*, *Azotobacter* y *Pseudomonas fluorescens* utilizados para este estudio no están reportados en la base de datos del Genbank.

Existe alta similitud genética entre las especies de bacterias estudiadas dentro de las zonas muestreadas con cultivos de papa y maíz.

En base al secuenciamiento del DNA, se ha identificado preliminarmente a los siguientes especímenes: *Azospirillum brasilense*; *Azotobacter vinelandii*, *A. choccrococum*, *A. nigricans* y *A. salinestrus*.

RECOMENDACIÓN

Es necesario diseñar primer específicos para las bacterias presentes en nuestros suelos.

AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Ciencia y Tecnología-FINCyT por el financiamiento del presente estudio. Así mismo nuestro agradecimiento a la bióloga Milagros Zavaleta Apésteguí.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas Akbari, Gh.; A. H. Seyyed Mehdi; H.A. Alikhani, I. Allahdadi & M.H. Arzanesh.** 2007. Isolation and Selection of Indigenous *Azospirillum* spp. and the IAA of Superior Strains Effects on Wheat Roots. *World Journal of Agricultural Sciences* 3 (4): 523-529.
- Abril, A.** 2006. Inoculación con *Azospirillum* spp en la región semiárida-central de Argentina: factores que afectan la colonización rizosférica, *Cl. Suelo (Argentina)* 24 (1).
- Caballero, J.** 2000. El género *Azospirillum*. Programa de Ecología Molecular y Microbiana, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, UNAM, Cuernavaca, Mor., México.
- Collados, C.** 2006. Impacto de inoculantes basados en *Azospirillum* modificado genéticamente sobre la diversidad y actividad de los hongos de la micorriza arbuscular en rizósfera de trigo y maíz. Tesis Doctoral. Universidad de Granada, España. p 185.
- Christiansen-Weniger, C.** 1988. An influence of plant growth substances on growth and nitrogenase activity from *Azospirillum brasilense*. In: *Azospirillum IV: Genetics, Physiology, Ecology*, ed. W. Klingmüller, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. pp. 141-149.
- Escobar, M.** 2002. *Fundamentos de Microbiología*. Tercera edición Centro editorial Javeriano. Colombia.
- Ferrera-Cerrato, R.; A. Alarcón.** 2007. *Microbiología agrícola*. Edit Trillas México.
- Espín, Guadalupe.** 2007. *Biología de Azotobacter vinelandii* Instituto de Biotecnología, Cap. 9. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Hafeez, F. Y; M. E. Safdar; A. U. Chaudhry & K. A. Malik.** 2004. Rhizobial inoculation improves seedling emergence, nutrient uptake, and growth and cotton. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 44(6) 617 – 622.
- Jiménez, D.** 2007. Caracterización molecular de cepas nativas colombianas de *Azotobacter spp* mediante el análisis de restricción del DNA ribosomal 16S. Tesis. Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias Básicas. Bogotá, D. C. Colombia. p 105.
- Lamm, R. B. & C. A. Neyra.** 1981. Characterization and cyst production of azospirilla isolated from selected grasses growing in New Jersey and New York. *Can. J. Microbiol.* 27:1320-1325.
- Peña, H. & I. Reyes.** 2007. Aislamiento y evaluación de bacterias fijadoras de nitrógeno y disolventes de fosfatos en la promoción del crecimiento de la lechuga (*Lactuca sativa* L.). *Interciencia* Vol. 32 (8): 560-565
- Sokal, R. R. & P. H. A. Sneath.** 1963. *Principles of numerical taxonomy*. San Francisco: Freeman.
- Reis F.; M. Silva; K. Teixeira; S. Urquiaga & V. Reis.** 2004. Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* asociados a *Brachiaria* spp, em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. *R. Bras. Cie. Solo* 28: 103-113.
- Rodríguez-Cáceres, E.** 1982. Improved medium for isolation of *Azospirillum spp*. *Appl. Environ. Microbiol.* 44:990-991.

- Rohlf, F.J.** 1997. NTSYSpc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Release 2.0 Exeter Software New York.
- Torres-Rubio, M. G.; S. A. Valencia-Plata; J. Bernal-Castillo; P. Martínez-Nieto.** 2000. Isolation of Enterobacteria, *Azotobacter* sp. and *Pseudomonas* sp., producers of Indole-3-Acetic Acid and Siderophores, from Colombian Rice Rhizosphere Revista Latinoamericana de Microbiología 42:171-176.
- Vázquez, P.; G. Holguin; M. E. Puente; A. Lopez-Cortes & Yoav Bashan.** 2000. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. Biology and Fertility of Soils Vol 30: 460-468
- White, B.** 1993. PCR protocols: Current methods and applications. Vol. 15. Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Zuno-Floriano, F. G.; P. Estrada-de los Santos; J. A. Gallegos-Infante; N. E. Rocha-Gúzman; M. L. Aldana-Madrid; G. Virgen-Calleros; M. G. Miller & C. V. Muñoz-Ruiz.** 2009. Producción in vitro de plántula de papa inoculada con *Pseudomonas* sp. Terra Latinoamericana, 27 (3): 207-217.
- Zúñiga, D.** 2008. Manual de Microbiología Agrícola: *Rhizobium*, PGPR, indicadores de fertilidad e inocuidad. Universidad Nacional Agraria La Molina.