

Artículo original

Aislamiento, caracterización y actividad de cepas de *Azospirillum* *brasiliense* asociadas a la caña de azúcar

Dra. María Laura Tortora^{1*}

Lic. Lucia Vera¹

Lic. Noel Grellet Naval²

Dra. Karina Dantur¹

María de los Ángeles Núñez¹

Micaela Alderete¹

Dr. Eduardo Raúl Romero¹

¹Subprograma Agronomía, Sección Caña de Azúcar, Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC), Av. William Cross N°3150, Las Talitas, Tucumán, Argentina.

²Ledesma S.A.A.I, Libertador General San Martín, Jujuy, Argentina. Dirección postal: Av. William Cross N° 3150, Las Talitas, Tucumán Argentina

*Autor para correspondencia. ltortora@eeaoc.org.ar

RESUMEN

En Argentina, la caña de azúcar es uno de los cultivos bioenergéticos de mayor potencial. Por su gran capacidad de producción de biomasa, el cultivo posee altos requerimientos de nitrógeno que pueden suplirse mediante fertilización química. Para asegurar la sostenibilidad de los programas bioenergéticos y reducir los problemas ambientales generados por los fertilizantes sintéticos, es necesario reemplazarlos en un corto plazo. En este sentido, la inoculación con *Azospirillum* constituye la alternativa más utilizada en esta región para incrementar los rendimientos de los cañaverales. El objetivo de este trabajo fue aislar y caracterizar bacterias del género *Azospirillum* a partir de la caña de azúcar, analizar algunas de sus características como bacteria promotora del crecimiento vegetal (PGPB) y evaluar el efecto de bioproductos formulados con los aislados obtenidos, sobre el rebrote del cultivo. Se obtuvieron tres aislados endofíticos (Ls1, Ls2

y Ls3) y dos rizosféricos (Tv1 y Tv2), con capacidad potencial para fijar nitrógeno atmosférico y producir indoles totales. Según restricción y secuenciación del gen *16S*, los aislados se identificaron como *A. brasilense*. La genotipificación por BOX-PCR, confirmó que Ls1, Ls2 y Ls3 son distintas entre sí y a la cepa Az39, a diferencia de lo observado para Tv1 y Tv2, que se corresponden con esta cepa de referencia. Mediante bioensayos en invernáculo, se observó que la inoculación del biopreparado obtenido con Ls1 incrementó, significativamente, el índice de velocidad de brotación de la caña de azúcar, por lo que podría considerarse como un potencial biofertilizante en este cultivo.

Palabras clave: bacterias, biofertilizantes, nitrógeno, gramínea

Recibido: 17/09/2018

Aprobado: 24/01/2019

INTRODUCCIÓN

Azospirillum es considerada como una de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB, por sus siglas en inglés de *Plant Growth Promoting Bacteria*) más importantes ⁽¹⁾. La capacidad de esta bacteria de promover el crecimiento e incrementar la producción de diversas especies vegetales, se debe a la existencia de mecanismos de acción como la producción de fitohormonas, la fijación biológica de nitrógeno (FBN) y la capacidad para limitar el crecimiento de ciertos organismos fitopatógenos, como la antibiosis y la producción de sideróforos ⁽²⁾. *Azospirillum* es capaz de asociarse con 113 especies de plantas, 14 de las cuales son gramíneas y las restantes corresponden a otras 34 familias botánicas ⁽³⁾. En este sentido, existen numerosos trabajos que confirman la capacidad de *Azospirillum* para asociarse, tanto en forma endofítica como rizosférica, al cultivo de la caña de azúcar ⁽⁴⁾.

En Argentina, la producción de caña de azúcar es una de las actividades agroindustriales más importantes. Por sus condiciones climáticas y edáficas, Tucumán es la provincia que presenta mayor producción de caña de azúcar, con una superficie cosechable de 269 530 ha para la zafra 2017 ⁽⁵⁾. La caña de azúcar, es considerada uno de los cultivos bioenergéticos de mayor potencial, ya que permite obtener no sólo azúcar como alimento, sino también bioetanol a partir de su fermentación y cogenerar energía eléctrica a partir de la utilización de sus residuos de cosecha. El cultivo posee elevados requerimientos de nitrógeno (entre 180 y 250 kg ha⁻¹ por año⁻¹), debido a su gran capacidad de producción

de biomasa, asociada a la prolongada duración de su ciclo, parte de este nutriente asimilado por la planta es aportado por la mineralización de la materia orgánica del suelo; sin embargo, no resulta suficiente para satisfacer los requerimientos del cultivo, por lo que la fertilización nitrogenada constituye una práctica agronómica necesaria.

Actualmente, la urea es el fertilizante nitrogenado más utilizado y se aplican aproximadamente 240 kg de urea por ha por año. Sin embargo, sólo entre el 20 y el 50 % del nitrógeno aplicado es utilizado por el cultivo, el resto no asimilado se pierde por lixiviación, denitrificación o volatilización, convirtiendo al fertilizante químico en una fuente importante de contaminación ambiental. Por otro lado, la síntesis de estos fertilizantes demanda altos niveles de energía fósil, por lo que a fin de lograr la sostenibilidad de los programas bioenergéticos, es necesario reemplazarlos totalmente en un corto plazo.

Diferentes estudios han demostrado que la caña de azúcar es capaz de obtener hasta un 70 % de sus requerimientos de nitrógeno a partir de la FBN ⁽⁶⁾, proceso llevado a cabo por diferentes bacterias, rizosféricas y endofíticas, capaces de asociarse y colonizar a la caña de azúcar, entre las que se encuentran las del género *Azospirillum*. La asociación *Azospirillum*-caña de azúcar, constituye el punto de partida de los programas de FBN con plantas no leguminosas a nivel mundial ⁽⁶⁾. Estos antecedentes, junto con el creciente interés por implementar sistemas agronómicos sustentables en el manejo de los cañaverales mediante la utilización de bacterias PGP, ha llevado a que en la actualidad, cerca de 10000 ha de cañaverales de Tucumán, se inoculen con bioproductos comerciales que contienen a la cepa *A. brasilense* Az39 en su composición (resultados no publicados). Esta inoculación permite incrementar la brotación y emergencia de las plántulas, logrando el rápido establecimiento del cañaveral.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, el objetivo de este trabajo fue aislar y caracterizar bacterias del género *Azospirillum*, a partir de caña de azúcar; analizar algunas de sus características promotoras del crecimiento y evaluar el efecto sobre la brotación del cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de bacterias del género *Azospirillum*

Se tomaron muestras de suelo rizosférico y raíces de plantas de caña de azúcar de la variedad LCP 85-384, pertenecientes a cañaverales ubicados en “Los Gómez” y “Las Talitas”, departamento Leales y Tafí Viejo, respectivamente.

Las bacterias del género *Azospirillum* se aislaron siguiendo la técnica descrita por Döbereiner *et al.* ⁽⁷⁾. Para el aislamiento de bacterias rizosféricas, de cada localidad se tomaron tres muestras de suelo rizosférico de 0-15 cm de profundidad. Cada muestra evaluada; a su vez, estaba constituida por cinco submuestras de aproximadamente 500 g cada una. A partir de estas muestras, se realizaron diluciones sucesivas en solución fisiológica estéril (NaCl 0,9 % m v⁻¹) y alícuotas de 100 µL se sembraron en el medio de cultivo semisólido malato libre de nitrógeno (NFb) (ácido málico 5 g L⁻¹; K₂HPO₄ 0,5 g L⁻¹; MgSO₄·7H₂O 0,2 g L⁻¹; NaCl 0,1 g L⁻¹; CaCl₂·2H₂O 0,02 g L⁻¹; KOH 4,5 g L⁻¹; agar 1,75 g L⁻¹; pH 6,8 ajustado con KOH). Para el aislamiento de bacterias endofíticas, de cada localidad se tomaron muestras de raíces de cinco plantas independientes, distanciadas por 3 m aproximadamente y escogidas al azar. De cada planta se tomaron cuidadosamente 10 raíces de 5 a 15 cm, que se desinfectaron de manera superficial con etanol 70 %, 1 min, hipoclorito de sodio al 2 % (v v⁻¹) y cinco lavados con agua destilada estéril. Las raíces desinfectadas se cortaron en fragmentos de 1 cm y se transfirieron al medio de cultivo NFb semisólido. Los frascos se incubaron durante cinco días a 30 °C. Los cultivos que presentaron crecimiento bacteriano en forma de una película blanca sub superficial, típica de *Azospirillum*, se repicaron en el medio de cultivo NFb sólido adicionado con extracto de levadura (5 g L⁻¹) y Rojo Congo (15 mL L⁻¹ de una solución acuosa 1:400 (p v⁻¹), para la identificación de colonias pequeñas, secas, color rojo escarlata ⁽⁸⁾.

Análisis de las características promotoras del crecimiento

La fijación biológica de nitrógeno se analizó según la capacidad de los aislados de crecer en el medio de cultivo NFb libre de nitrógeno y por amplificación mediante PCR de un fragmento de 710 pb del gen *nifD* de la nitrogenasa, enzima involucrada en el proceso de fijación de nitrógeno. Como cebadores se utilizaron *nifDf* y *nifDr* (Sigma-Aldrich, EE.UU) ⁽⁹⁾. La capacidad de los aislados para producir indoles, se evaluó siguiendo la técnica colorimétrica descrita por Glickmann y Dessaux ⁽¹⁰⁾. Para ello, una colonia aislada

en el medio NFb sólido se sembró en el medio de cultivo líquido Luria Bertani (LB) (extracto de levadura 5 g L⁻¹; tripteína 10 g L⁻¹; NaCl 10 g L⁻¹). Los cultivos se incubaron a 30 °C con agitación (45 r.p.m). A las 24, 48, 72 y 96 h se tomaron muestras para evaluar el crecimiento bacteriano por determinación de la densidad óptica a 560 nm (DO_{560nm}). La concentración de índoles totales producidos y excretados al medio de cultivo se determinó a las 96 h de incubación, midiendo la DO_{530nm} y extrapolando los valores obtenidos en una curva de calibración en la que se utilizó ácido indol acético puro (AIA) como estándar. Como referencia se utilizó la cepa Az39 de *A. brasilense*.

Todos los ensayos correspondientes a la determinación de las características promotoras del crecimiento se realizaron por triplicado para cada cepa evaluada. Los datos se analizaron estadísticamente mediante análisis de la varianza (ANOVA) y la Prueba de LSD Fisher, con el programa InfoStat (Software Estadístico, 2010) para Windows.

Caracterización molecular de los aislados

Amplificación por PCR, secuenciación y ARDRA del gen *16S* ADNr

A fin de confirmar que los aislados obtenidos pertenecen al género *Azospirillum*, se realizó su caracterización molecular mediante amplificación por PCR de un fragmento de 1450 pb del gen *16S* ADNr, utilizando los cebadores 27f y 1492r (Biodynamics, Argentina). Los productos amplificados, por un lado, se enviaron al Centro de Referencia para *Lactobacillus* (CERELA) para su secuenciación y se analizaron utilizando el programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Por otro lado, se realizó la digestión de los productos amplificados siguiendo la técnica ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) con la enzima de restricción *AluI* (Thermo Scientific, EE.UU). Los fragmentos obtenidos se colocaron en un gel de agarosa al 1,5 % (p v⁻¹) a fin de comparar los perfiles de restricción.

Genotipificación por BOX-PCR

Finalmente, para identificar los distintos aislados a nivel de cepa, se utilizó la técnica BOX-PCR utilizando el cebador *boxA1r* (Sigma Aldrich, EE.UU) ⁽¹¹⁾. Esta técnica se basa en la amplificación por PCR de secuencias de ADN intergénicas, utilizando un cebador que hibrida de forma específica con secuencias repetitivas (secuencias *rep*) del genoma bacteriano ⁽¹²⁾. Los perfiles de bandas generados son únicos entre especies, incluso entre cepas. Las condiciones para llevar a cabo la amplificación fueron: desnaturalización a 95

°C 2 min, seguido por 35 ciclos de 94 °C 3 s, 92 °C 30 s, 50 °C 1 min, 65 °C 2 min, con una extensión final a 65 °C por 8 min. Los productos amplificados fueron separados por electroforesis en gel de poliacrilamida, con acople a Li-Cor (Biosciences, EE.UU) para su detección. Para realizar la caracterización molecular de los nuevos aislados, se utilizó como referencia la cepa Az39 de *A. brasilense*.

Selección de los aislados y formulación de biofertilizantes

Los aislados de *Azospirillum* que mostraron diferencias en su huella genética luego de realizar la BOX-PCR, se seleccionaron y enviaron a una empresa productora de biofertilizantes para la formulación de diferentes bioproductos.

Bioensayo sobre caña de azúcar

Se evaluó el efecto de cuatro bioproductos (Bio) formulados a partir de los aislados Ls1, 2 y 3 y de la cepa de referencia Az39 (BioLs1, BioLs2, BioLs3 y BioAz39, respectivamente) sobre la velocidad de brotación del cultivo de la caña de azúcar. Para ello, estacas uninodales extraídas a partir del tercio medio de tallos de caña semilla de la variedad LCP 85-384, se inocularon por riego con 5 mL de cada biofertilizante.

Considerando que la concentración óptima para la inoculación con biofertilizantes a base de *Azospirillum* corresponde a 1×10^6 ufc mL⁻¹ (13) y que los bioproductos tenían una concentración promedio de 1×10^9 ufc mL⁻¹ se realizaron las diluciones correspondientes (1:1000 v v⁻¹) de cada bioproducto antes de su aplicación. Por cada tratamiento evaluado, se sembraron 12 estacas uninodales en bandejas de plástico utilizando arena fina estéril como sustrato. Luego de la inoculación, las bandejas se conservaron en invernáculo a 25 °C. Las bandejas se colocaron en un diseño experimental de bloques completamente aleatorizados. Se trabajó con tres repeticiones por tratamiento y como control positivo se utilizó el biofertilizante a base de la cepa Az39 de *A. brasilense* (BioAz39).

Los resultados se expresaron como índice de velocidad de brotación (IVB) (14), calculados a partir de la siguiente fórmula:

$$IVB = (B1/N1 + B2/N2 + \dots + Bn/Nn)$$

donde B es el número de brotes y N los días después de la plantación.

Los datos se analizaron estadísticamente mediante el análisis de la varianza (ANOVA) y la Prueba de LSD Fisher, con el programa InfoStat (Software Estadístico, 2010) para Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

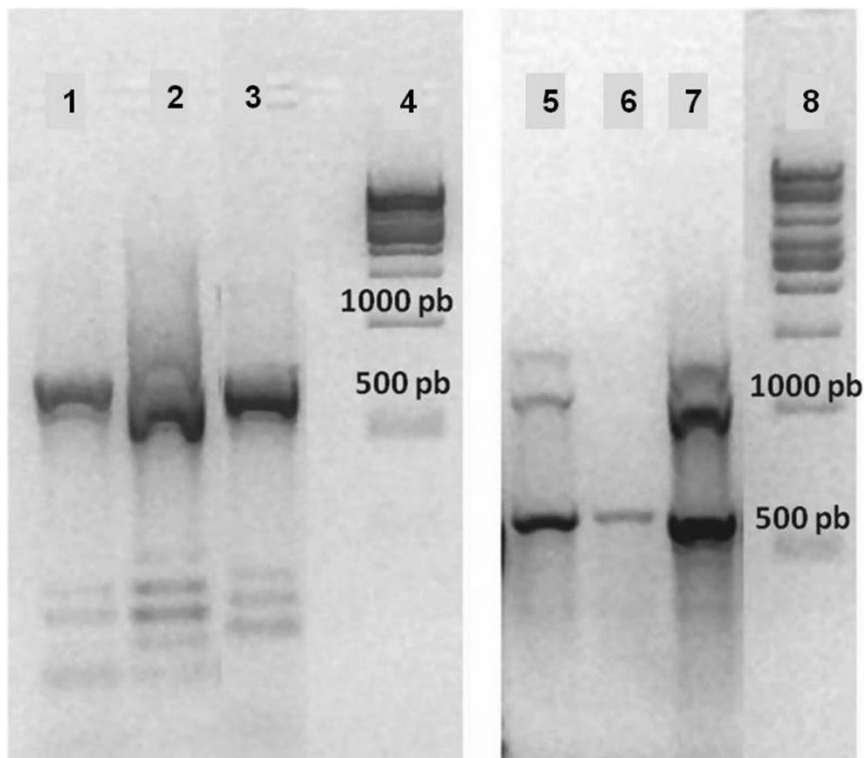
Aislamiento y caracterización

Se obtuvieron tres aislados endofíticos con características típicas del género *Azospirillum* a partir de raíces de caña de azúcar del departamento “Leales”, que se denominaron Ls1, Ls2 y Ls3 y dos rizosféricos del departamento Tafí Viejo, los cuales se denominaron Tv1 y Tv2. La asociación de *Azospirillum* con las raíces de la caña de azúcar sólo puede ser exitosa si la bacteria es capaz de sobrevivir en el suelo y alcanzar poblaciones significativas en el sistema radicular, por lo que estos resultados confirman la capacidad que tiene este género bacteriano de colonizar naturalmente el cultivo de la caña de la azúcar ⁽¹⁵⁾.

Si bien las bacterias del género *Azospirillum* son generalmente consideradas como bacterias de la rizósfera, algunas cepas desarrollan diferencias específicas en la forma de colonizar las raíces. Predominantemente colonizan la superficie de la raíz y sólo unas pocas cepas son capaces de colonizar el interior de las raíces. Estas cepas endofíticas, al encontrarse en un ambiente protegido de las condiciones ambientales, tienen mecanismos específicos para comunicarse e interactuar con la planta de manera mucho más eficiente que las cepas rizosféricas.

Fijación biológica de nitrógeno (FBN)

Todos los aislados fueron capaces de crecer en medio NFb, formando una película blanca subsuperficial ⁽⁷⁾. Además, la presencia del gen *nifD* de la nitrogenasa proporciona evidencia de la capacidad potencial de dichos aislados de fijar nitrógeno atmosférico (Figura 1), en concordancia con lo informado por otros autores ⁽⁹⁾.



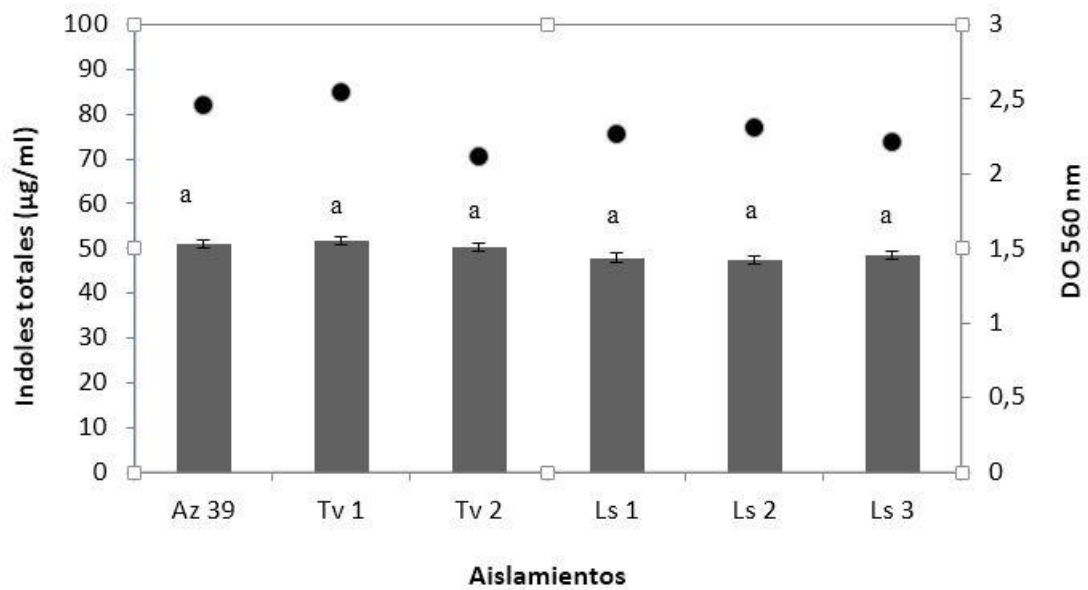
La amplificación corresponde a las cepas rizosféricas de Tafí del Valle Tv1 y Tv2 (líneas 1 y 2), cepa Az39 usada como referencia (línea 3), marcador de peso molecular 1Kb (Promega, EE.UU) (líneas 4 y 8), cepas endofíticas de Leales Ls1, Ls2 y Ls3 (líneas 5, 6 y 7)

Figura 1. Amplificación por PCR del gen *nifD* (710 pb) de los aislados obtenidos

Actualmente, la contribución de *Azospirillum* a los requerimientos de nitrógeno de la caña de azúcar por medio de la FBN, es un tema controversial. Algunos reportes de investigación afirman que el cultivo es capaz de obtener hasta un 70 % de sus requerimientos de nitrógeno a partir de la FBN y que éste constituye el principal mecanismo de promoción del crecimiento de las bacterias de este género ⁽¹⁶⁾, otros suponen que *Azospirillum* utiliza el nitrógeno de la FBN para su propio uso y la contribución de nitrógeno al cultivo está relacionada con la asimilación de nitratos ⁽¹⁷⁾.

Producción de indoles totales

En la Figura 2 se muestra la producción de indoles totales expresada en $\mu\text{g mL}^{-1}$ en función del crecimiento bacteriano, evaluado por medición de la densidad óptica a 560 nm.



Letras iguales indican sin diferencias estadísticamente significativas (LSD, $p \leq 0,05$)

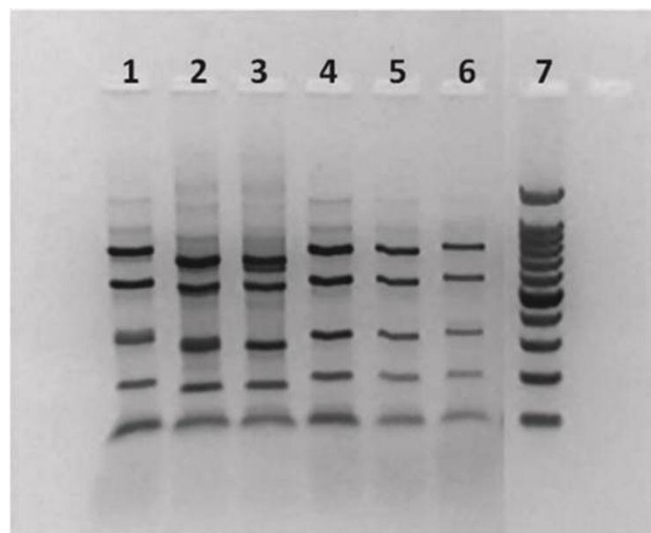
Figura 2. Crecimiento (DO_{560}) (círculos) y producción de indoles totales ($\mu\text{g mL}^{-1}$) (barras) de los distintos aislados a las 96 hs de incubación a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$

Como se puede observar en la Figura 2, todos los aislados sintetizaron y excretaron al medio indoles totales, en cantidades similares a la cepa Az39 de *A. brasilense*. La producción de fitohormonas, es una de las características PGPB más importante del género *Azospirillum* ⁽¹⁸⁾. Estas bacterias producen y liberan al medio de cultivo diferentes fitohormonas, durante la fase estacionaria de crecimiento, entre las cuales se han encontrado auxinas, giberelinas, ácido abscísico, etileno y ácido salicílico. Si bien estas fitohormonas afectan significativamente el crecimiento de la raíz, resultando en una mejor absorción de humedad y nutrientes, también se ha demostrado que participan en el incremento del crecimiento de los cultivos cuando *Azospirillum* se aplica de manera foliar ⁽²⁾. Por esta razón, la producción de fitohormonas es importante, no sólo para la producción de inoculantes a nivel industrial, sino también para la acción de estas bacterias en la filósfera, en la rizósfera e incluso dentro de las plantas. Se ha observado que la inoculación con *Azospirillum* y con las fitohormonas producidas por estas rizobacterias, inducen una mayor respuesta de promoción de crecimiento en semillas y plántulas ⁽²⁾. Los resultados obtenidos con los nuevos aislados, productores de indoles, son importantes para la selección y posterior formulación de posibles biofertilizantes ⁽¹⁹⁾.

Caracterización molecular

Amplificación por PCR, secuenciación y ARDRA del gen *16S* ADNr

En la Figura 3 se muestra la amplificación por PCR del gen *16S* del ADNr de los diferentes aislados obtenidos y su posterior digestión con la enzima de restricción *AluI*. Los perfiles obtenidos se compararon con los de la cepa Az39 de *A. brasilense* utilizada como referencia.



Los patrones corresponden a la cepa Az39 usada como referencia (línea 1), cepas rizosféricas de Tafi del Valle Tv1 y Tv2 (líneas 2 y 3), cepas endofíticas de Leales Ls1, Ls2 y Ls3 (líneas 4, 5 y 6), marcador de peso molecular de 100 pb (Promega, EE.UU) (línea

7)

Figura 3. Perfil de electroforesis de los fragmentos obtenidos luego de la restricción del ADNr 16S con la enzima de restricción *AluI*

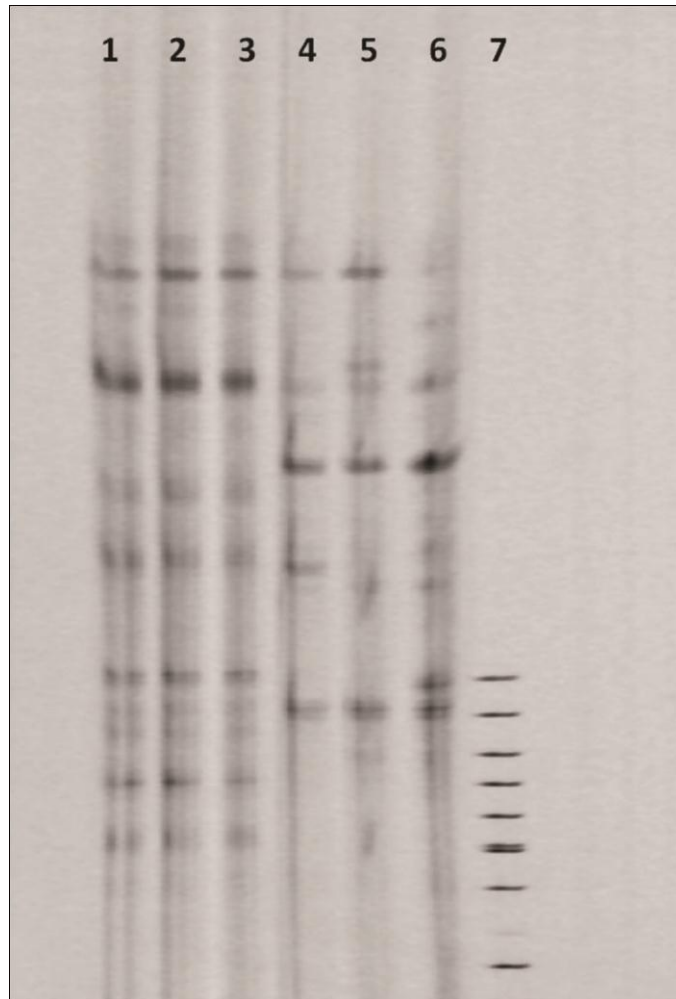
Se observó que los aislados presentaron el mismo perfil de restricción que la cepa de referencia Az39 de *A. brasilense*, por lo que se infiere que los mismos podrían corresponder a dicha especie del género *Azospirillum*. La secuenciación del gen *16S* del ADNr y su posterior análisis utilizando el programa BLAST, permitió confirmarlo (Tabla 1).

Tabla 1. Análisis de secuencias de los aislados obtenidos

Aislamiento	Descripción	Max score	Total score	Query cover	e-value	Ident	Accesion
<i>Tv 1</i>	<i>A. brasilense</i> strain Az39 plasmid AbAZ39	183	362	14%	2,00E-42	99%	CP007797.1
<i>Tv 2</i>	<i>A. brasilense</i> strain Az39 plasmid AbAZ40	547	1032	56%	5,00E-152	93%	CP007797.1
<i>Ls 1</i>	<i>A. brasilense</i> partial 16S rRNA strain Gr54	368	368	35%	4,00E-98	96%	FR667893.1
<i>Ls 2</i>	<i>A. brasilense</i> partial 16S rRNA strain Gr54	723	723	70%	0	96%	FR667893.1
<i>Ls 3</i>	<i>A. brasilense</i> 16S rRNA cole M7	363	363	35%	2,00E-96	95%	HE646772.1

Genotipificación por BOX-PCR

Los patrones de polimorfismo generados por BOX-PCR se han utilizado para la diferenciación de cepas bacterianas del género *Azospirillum* ⁽²⁰⁾. En la Figura 4 se muestran las diferentes huellas genéticas de los aislados, obtenidas por BOX-PCR.



Los patrones corresponden a las cepas rizosféricas de Tafí del Valle Tv1 y Tv2 (líneas 1 y 2), cepa Az39 usada como referencia (línea 3), cepas endofíticas de Leales Ls1, Ls2 y Ls3 (líneas 4, 5 y 6, respectivamente) y línea 7, marcador de peso molecular de 1Kb (Promega, EE.UU)

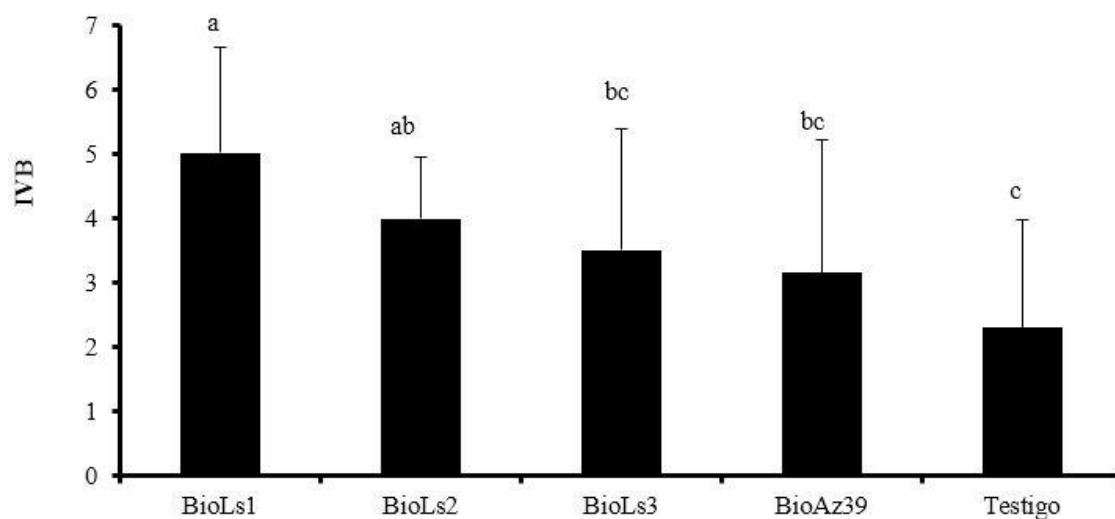
Figura 4. Huella genética de los diferentes aislados obtenida por BOX-PCR

La técnica BOX-PCR mostró que los aislados Tv1 y Tv2 tienen el mismo perfil de bandas que Az39 de *A. brasilense*, por lo que podemos confirmar que se trata de la misma cepa. Por el contrario, los perfiles de Ls1, Ls2 y Ls3 son distintos entre sí y con el perfil de la cepa Az39, por lo que se puede confirmar que son cepas diferentes.

Bioensayo sobre caña de azúcar

Los aislados Ls1, Ls2 y Ls3 fueron seleccionados por ser endófitos y por presentar diferencias en su huella genética respecto a la cepa Az39, para la formulación de bioproductos que se denominaron BioLs1, BioLs2 y BioLs3. Además se utilizó a BioAz39 como control positivo de inducción de crecimiento. El índice de velocidad de

brotación (IVB) de las estacas de caña de azúcar inoculadas con los diferentes biofertilizantes, se muestra en la Figura 5.



Los valores de IVB corresponden al promedio de tres determinaciones y las barras de error indican desvío estándar (DE). Diferentes letras indican diferencias significativas (LSD, $p \leq 0,05$)

Figura 5. Índice de velocidad de brotación (IVB) de las estacas uninodales de caña de azúcar inoculadas con los biofertilizantes formulados a partir de los aislados seleccionados

Entre los bioproductos evaluados, BioLs1 fue el que presentó mayor capacidad para incrementar la brotación de estacas uninodales de caña de azúcar, luego de su aplicación (Figura 5). BioLs1 presentó diferencias estadísticamente significativas en comparación con BioLs3, BioAz39 y con el testigo sin inocular. Por otro lado, los bioproductos BioLs1 y BioLs2 incrementaron de manera significativa el IVB en comparación con el testigo sin inocular. El IVB fue de 2,30 para el testigo, mientras que para BioLs1 y BioLs2 fue de 5,02 y 4,01 respectivamente. Es importante destacar que el bioproducto BioLs1, formulado a partir del aislado residente *A. brasilense* Ls1, presentó mayor capacidad de incrementar el IVB de la caña de azúcar que BioAz39, el cual contiene *A. brasilense* Az39, la cepa más utilizada en nuestra región para la formulación de inoculantes para caña de azúcar. La importancia de la FBN durante el crecimiento inicial de la caña de azúcar, se debe a que el ritmo de absorción de N que tiene el cultivo, es máximo en los primeros meses desde la brotación. En este período el cultivo absorbe más N del que utiliza para su crecimiento y desarrollo, almacenando el exceso como sustancias orgánicas en sus tejidos (vainas y láminas foliares). Luego, ese N es removilizado hacia zonas de activo crecimiento para satisfacer, junto con el N aportado desde el suelo, los elevados requerimientos de la fase de gran crecimiento. Este comportamiento representa

una estrategia de administración biológica de N, que le garantiza no comprometer el crecimiento ⁽²¹⁾. Por esta razón, la utilización de bioproductos a base de bacterias PGP capaces de llevar a cabo la FBN y de producir y excretar fitohormonas permitiendo el rápido establecimiento de la planta en sus estadíos iniciales de crecimiento y desarrollo, resulta de fundamental importancia teniendo en cuenta que emergencias pobres y prolongadas afectan el cumplimiento efectivo de las siguientes fases fenológicas del cultivo, disminuyendo significativamente la producción y el rendimiento del cañaveral ⁽²¹⁾.

CONCLUSIONES

- Se logran aislar y caracterizar diferentes cepas de *A. brasilense* asociadas al cultivo de la caña de azúcar, con capacidad potencial para fijar nitrógeno atmosférico y sintetizar indoles. Los perfiles de bandas obtenidos por BOX-PCR permiten confirmar que las cepas Ls1, Ls2 y Ls3 son cepas diferentes entre sí y a la cepa Az39. Los bioproductos BioLs1 y BioLs2 muestran un efecto positivo sobre el IVB de la caña de azúcar, en comparación con el testigo sin inocular, en bioensayos realizados bajo condiciones controladas. El bioproducto BioLs1 provoca además un incremento en la velocidad de brotación de las plántulas inoculadas, en comparación con BioAz39.
- En este sentido, los aislados *A. brasilense* Ls1 y Ls2 con capacidad potencial para fijar nitrógeno y producir indoles, constituyen cepas promisorias asociadas a la caña de azúcar que podrían ser utilizadas para la formulación de biofertilizantes, a fin de incrementar los rendimientos y la producción del cultivo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cassán F, Diaz-Zorita M. *Azospirillum* sp. in current agriculture: from the laboratory to the field. *Soil Biology and Biochemistry*. 2016;103:117–30. doi:10.1016/j.soilbio.2016.08.020
2. Fukami J, Cerezini P, Hungria M. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. *AMB Express*. 2018;8(1):73. doi:10.1186/s13568-018-0608-1
3. Pereg L, de-Bashan LE, Bashan Y. Assessment of affinity and specificity of *Azospirillum* for plants. *Plant and Soil*. 2016;399(1–2):389–414. doi:10.1007/s11104-015-2778-9

4. Vera L, Grellet Naval N, Nuñ M de los A, Alonso L, Leggio Nem F, Fernández González P, et al. Estudio de la cepa *Azospirillum brasilense* Az39 como biofertilizante en caña de azúcar. *Revista Industrial y Agrícola de Tucumán*. 2017;94(2):1–11.
5. Fandos C, Scandaliaris J, Scandaliaris P, Carreras JI, Soria F. Relevamiento satelital de cultivos en la provincia de Tucumán. *Reporte Agroindustrial*. 2017;138:1–10.
6. Urquiaga S, Cruz KHS, Boddey RM. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: nitrogen-15 and nitrogen-balance estimates. *Soil Science Society of America Journal*. 1992;56(1):105–14. doi:10.2136/sssaj1992.03615995005600010017x
7. Döbereiner J, Baldani VLD, Baldani JI. Microorganismos diazotróficos aerobios. In: *Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas* [Internet]. 1ra ed. Brasília, Brasil: Embrapa SPI; 1995 [cited 2019 Feb 7]. p. 11–25. Available from: [https://www.scrip.org/\(S\(351jmbntvnsjt1aadkposzje\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1508971](https://www.scrip.org/(S(351jmbntvnsjt1aadkposzje))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1508971)
8. Cáceres EAR. Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. 1982;44(4):990–1.
9. Potrich DP, Passaglia LM, Schrank IS. Partial characterization of nif genes from the bacterium *Azospirillum amazonense*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2001;34(9):1105–13.
10. Glickmann E, Dessaux Y. A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 1995;61(2):793–6.
11. Versalovic J, Schneider M, Bruijn FJD, Lupski JR. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*. 1994;5(1):25–40.
12. Sabat AJ, Budimir A, Nashev D, Sá-Leão R, van Dijn J m, Laurent F, et al. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveillance*. 2013;18(4):20380. doi:10.2807/ese.18.04.20380-en
13. Bashan Y. Enhancement of wheat root colonization and plant development by *Azospirillum brasilense* Cd. following temporary depression of rhizosphere microflora. *Applied and Environmental Microbiology*. 1986;51(5):1067–71.
14. Souza RHV de, Villela FA, Aumonde TZ. Methodologies based on seedling performance for vigor assessment of pumpkin seeds. *Journal of Seed Science*. 2013;35(3):374–80. doi:10.1590/S2317-15372013000300015

15. Vejan P, Abdullah R, Khadiran T, Ismail S, Nasrulhaq Boyce A. Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability-A review. *Molecules*. 2016;21(5):573–90. doi:10.3390/molecules21050573
16. Volfson V, Fibach-Paldi S, Paulucci NS, Dardanelli MS, Matan O, Burdman S, et al. Phenotypic variation in *Azospirillum brasilense* Sp7 does not influence plant growth promotion effects. *Soil Biology and Biochemistry*. 2013;67:255–62. doi:10.1016/j.soilbio.2013.09.008
17. Bremer E, Janzen HH, Gilbertson C. Evidence against associative N₂ fixation as a significant N source in long-term wheat plots. *Plant and Soil*. 1995;175(1):13–9. doi:10.1007/BF02413006
18. Castillo P, Molina R, Andrade A, Vigliocco A, Alemano S, Cassán FD. Phytohormones and Other Plant Growth Regulators Produced by PGPR: The Genus *Azospirillum*. In: Cassán F, Okon Y, Creus CM, editors. *Handbook for Azospirillum* [Internet]. Suiza: Springer, Cham; 2015 [cited 2019 Feb 11]. p. 115–38. doi:10.1007/978-3-319-06542-7_7
19. Gouda S, Kerry RG, Das G, Paramithiotis S, Shin H-S, Patra JK. Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiological Research*. 2018;206:131–40. doi:10.1016/j.micres.2017.08.016
20. Reem G, Burdman S, Okon Y. Methods for studying phenotypic variation in *Azospirillum*. In: Cassán F, Okon Y, Creus CM, editors. *Handbook for Azospirillum* [Internet]. Suiza: Springer, Cham; 2015 [cited 2019 Feb 11]. p. 231–9. doi:10.1007/978-3-319-06542-7_12
21. Bassi D, Menossi M, Mattiello L. Nitrogen supply influences photosynthesis establishment along the sugarcane leaf. *Scientific Reports*. 2018;8(1):23–7. doi:10.1038/s41598-018-20653-1

Isolation, characterization and activity of *Azospirillum brasilense* strains associated to sugarcane

Dra. María Laura Tortora^{1*}

Lic. Lucia Vera¹

Lic. Noel Grellet Naval²

Dra. Karina Dantur¹

María de los Ángeles Núñez¹

Micaela Alderete¹

Dr. Eduardo Raúl Romero¹

¹Subprograma Agronomía, Sección Caña de Azúcar, Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC), Av. William Cross N°3150, Las Talitas, Tucumán, Argentina.

²Ledesma S.A.A.I, Libertador General San Martín, Jujuy, Argentina. Dirección postal: Av. William Cross N° 3150, Las Talitas, Tucumán Argentina

*Author for correspondence. ltortora@eeaoc.org.ar

ABSTRACT

Sugarcane is one of the most relevant bioenergy crops in Argentina. Due to its high capacity for biomass production, the crop has a high nitrogen requirement that can be supplied using chemical fertilizers. To ensure the sustainability of bioenergy programs and reduce the environmental issues caused by synthetic fertilizers, it is necessary to replace them in a short term. In this sense, *Azospirillum* inoculation constitutes the most used alternatives in our region to increase sugarcane plantations yields. The objective of this work was to isolate and characterize *Azospirillum* bacteria from sugarcane, analyze some of their PGPB characteristics and evaluate the effect of bioproducts formulated with the obtained isolates on crop sprouting. Three endophytic isolates (Ls1, Ls2 and Ls3) and two from the rhizosphere (Tv1 and Tv2) were obtained, with potential ability to fix atmospheric nitrogen and produce total indoles. Using 16S gene restriction and sequencing, the isolates were identified as *A. brasilense*. Genotyping by BOX-PCR, confirmed that Ls1, Ls2 and Ls3 were different from each other and from Az39 strain,

unlike observations for Tv1 and Tv2. On greenhouse bioassays, it was observed that the inoculation with Ls1 biopreparation significantly increased sugarcane germination rate, so it could be used as a biofertilizer in this crop.

Key words: bacteria, biofertilizers, nitrogen, grass

Received: 17/09/2018

Accepted: 24/01/2019

INTRODUCTION

Azospirillum is considered one of the most important plant growth promoting bacteria (PGPB) ⁽¹⁾. The ability of this bacterium to promote growth and increase the production of various plant species, is due to the existence of mechanisms of action such as the production of phytohormones, the biological fixation of nitrogen (FBN) and the ability to limit the growth of certain phytopathogenic organisms, such as antibiosis and the production of siderophores ⁽²⁾. *Azospirillum* is able to associate with 113 plant species, 14 of which are grasses and the remaining correspond to 34 other botanical families ⁽³⁾. In this sense, there are numerous works that confirm the ability of *Azospirillum* to associate both in endophytic and rhizospheric forms to the cultivation of sugarcane ⁽⁴⁾.

In Argentina, the production of sugarcane is one of the most important agroindustrial activities. Due to its climatic and edaphic conditions, Tucumán is the province with the highest production of sugarcane, with a harvestable area of 269,530 ha for the 2017 harvest ⁽⁵⁾. Sugarcane is considered one of the most potential bioenergy crops, since it allows not only sugar to be obtained as food, but also bioethanol from its fermentation and cogeneration of electricity from the use of its harvest residues. The crop has high nitrogen requirements (between 180 and 250 kg ha⁻¹ per year⁻¹), due to its large biomass production capacity associated with the prolonged duration of its cycle, part of this nutrient assimilated by the plant is provided by the mineralization of soil organic matter; however, it is not enough to satisfy the requirements of the crop, so nitrogen fertilization is a necessary agronomic practice.

Currently, urea is the most used nitrogenous fertilizer and approximately 240 kg of urea per ha per year are applied. However, only between 20 and 50 % of the applied nitrogen is used by the crop, the rest that is not assimilated is lost through leaching, denitrification and volatilization, turning the chemical fertilizer into an important source of

environmental contamination. On the other hand, the synthesis of these fertilizers demands high levels of fossil energy, so in order to achieve the sustainability of bioenergy programs, it is necessary to completely replace them in the short term.

Different studies have shown that sugar cane is able to obtain up to 70 % of its nitrogen requirements from the FBN ⁽⁶⁾, a process carried out by different bacteria, rhizospheric and endophytic, capable of associating and colonizing the sugar cane, among which are those of the genus *Azospirillum*. The *Azospirillum*-sugarcane association is the starting point for FBN programs with non-legume plants worldwide ⁽⁶⁾. This background, together with the growing interest in implementing sustainable agronomic systems in the management of the cane fields through the use of PGP bacteria, has led to the fact that currently, around 10,000 hectares of sugarcane plantations in Tucumán are inoculated with commercial bioproducts containing to strain *A. brasilense* Az39 in its composition (unpublished results). This inoculation allows to increase the sprouting and emergence of the seedlings, achieving the rapid establishment of the cane field.

Taking into account these considerations, the objective of this work was to isolate and characterize bacteria of the genus *Azospirillum* from sugarcane, analyze some of their growth promoting characteristics and evaluate the effect on sprouting of the crop.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of bacteria of the genus *Azospirillum*

Samples were taken of rhizospheric soil and roots of sugarcane plants of the LCP variety 85-384, belonging to reed beds located in “Los Gómez” and “Las Talitas”, department Leales and Tafí Viejo, respectively. Bacteria of the genus *Azospirillum* were isolated following the technique described by Döbereiner et al., for the isolation of rhizospheric bacteria ⁽⁷⁾, three samples of rhizospheric soil 0-15 cm deep were taken from each location. Each sample evaluated, in turn, consisted of five subsamples of approximately 500 g each. From these samples, successive dilutions were made in sterile physiological solution (NaCl 0.9 % m v⁻¹) and aliquots of 100 µL were seeded in the semisolid culture medium free nitrogen malate (NFb) (malic acid 5 g L⁻¹; K₂HPO₄ 0.5 g L⁻¹; MgSO₄·7H₂O 0.2 g L⁻¹; NaCl 0.1 g L⁻¹; CaCl₂·2H₂O 0.02 g L⁻¹; KOH 4.5 g L⁻¹, 1.75 g L⁻¹ agar, pH 6.8 adjusted with KOH). For the isolation of endophytic bacteria, from each locality root samples were taken from five independent plants, spaced approximately 3 m apart and chosen at random. Ten roots of 5 to 15 cm were carefully taken from each plant, which

were superficially disinfected with 70 % ethanol, 1 min, 2 % sodium hypochlorite ($v v^{-1}$) and five washes with sterile distilled water. The disinfected roots were cut into 1 cm fragments and transferred to the semi-solid NFb culture medium. The flasks were incubated for five days at 30 °C. The cultures that showed bacterial growth in the form of a sub-surface white film, typical of *Azospirillum*, were replicated in solid NFb culture medium added with yeast extract ($5 g L^{-1}$) and Congo Red ($15 mL L^{-1}$ an aqueous solution 1: 400 ($p v^{-1}$), for the identification of small, dry colonies, scarlet red color ⁽⁸⁾.

Analysis of the promoting characteristics of growth

Biological nitrogen fixation was analyzed according to the ability of the isolates to grow in the nitrogen-free NFb culture medium and by PCR amplification of a 710 bp fragment of the *nifD* gene of nitrogenase, an enzyme involved in the nitrogen fixation process. As primers, *nifDf* and *nifDr* (Sigma-Aldrich, USA) were used ⁽⁹⁾. The ability of the isolates to produce indoles was evaluated following the colorimetric technique described by Glickmann and Dessaux ⁽¹⁰⁾. For this, a colony isolated in the solid NFb medium was seeded in the liquid culture medium Luria Bertani (LB) (yeast extract $5 g L^{-1}$, triptein $10 g L^{-1}$, NaCl $10 g L^{-1}$). The cultures were incubated at 30 °C with shaking (45 r.p.m.). At 24, 48, 72 and 96 h, samples were taken to evaluate the bacterial growth by determining the optical density at 560 nm (DO_{560nm}). The concentration of total indoles produced and excreted to the culture medium was determined at 96 h of incubation, measuring the DO_{530nm} and extrapolating the values obtained in a calibration curve in which pure indole acetic acid (IAA) was used as standard. The Az39 strain of *A. brasilense* was used as reference.

All the tests corresponding to the determination of the growth promoting characteristics were carried out in triplicate for each evaluated strain. The data were analyzed statistically by analysis of variance (ANOVA) and the Fisher LSD test, with the InfoStat program (Statistical Software, 2010) for Windows.

Molecular characterization of the isolated

Amplification by PCR, sequencing and ARDRA of the 16S rDNA gene

In order to confirm that the isolates obtained belong to the genus *Azospirillum*, their molecular characterization was carried out by means of PCR amplification of a 1450 bp fragment of the 16S rDNA gene, using the primers *27f* and *1492r* (Biodynamics,

Argentina). The amplified products, on the one hand, were sent to the Reference Center for *Lactobacillus* (CERELA) for sequencing, and analyzed using the BLAST program (Basic Local Alignment Search Tool). On the other hand, the digestion of the amplified products was carried out following the ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) technique with the restriction enzyme *AluI* (Thermo Scientific, USA). The obtained fragments were placed on a 1.5 % agarose gel ($p v^{-1}$) in order to compare the restriction profiles.

Genotyping by BOX-PCR

Finally, to identify the different isolates at the strain level, the BOX-PCR technique was used using the *boxA1r* primer (Sigma Aldrich, USA) ⁽¹¹⁾. This technique is based on the PCR amplification of intergenic DNA sequences, using a primer that hybridizes specifically with repetitive sequences (*rep* sequences) of the bacterial genome ⁽¹²⁾. The profiles of bands generated are unique among species, even between strains. The conditions to carry out the amplification were: denaturation at 95 °C 2 min, followed by 35 cycles of 94 °C 3 s, 92 °C 30 s, 50 °C 1 min, 65 °C 2 min, with an extension final at 65 °C for 8 min. The amplified products were separated by polyacrylamide gel electrophoresis, with coupling to Li-Cor (Biosciences, USA) for detection. To perform the molecular characterization of the new isolates, the Az39 strain of *A. brasilense* was used as reference.

Selection of isolates and formulation of biofertilizers

The isolates of *Azospirillum* that showed differences in their genetic fingerprint after carrying out the BOX-PCR, were selected and sent to a biofertilizer producing company for the formulation of different bioproducts.

Bioassay on sugar cane

The effect of four bioproducts (Bio) formulated from the isolates Ls1, 2 and 3 and from the reference strain Az39 (BioLs1, BioLs2, BioLs3 and BioAz39, respectively) was evaluated on the sprouting speed of the sugar cane culture. For this, uninodal stakes extracted from the middle third of stalks of seed cane of the LCP 85-384 variety were inoculated by irrigation with 5 mL of each biofertilizer. Considering that the optimum concentration for inoculation with biofertilizers based on *Azospirillum* corresponds to 1

$\times 10^6$ cfu mL⁻¹ ⁽¹³⁾, and that the bioproducts had an average concentration of 1×10^9 cfu mL⁻¹ the corresponding dilutions were made (1 : 1000 v v⁻¹) of each bioproduct before its application. For each evaluated treatment, 12 uninodal stakes were planted in plastic trays using sterile fine sand as substrate. After the inoculation, the trays were kept in a hothouse at 25 °C. The trays were placed in an experimental design of completely randomized blocks. We worked with three repetitions per treatment, and as a positive control we used the biofertilizer based on the Az39 strain of *A. brasilense* (BioAz39). The results were expressed as sprouting velocity index (IVB) (14), calculated from the following formula:

$$IVB = (B1/N1 + B2/N2 + \dots + Bn/Nn)$$

Where: B is the number of shoots, and N the days after planting.

The data were analyzed statistically by the analysis of variance (ANOVA) and the Fisher LSD test, with the program InfoStat (Statistical Software, 2010) for Windows.

RESULTS AND DISCUSSION

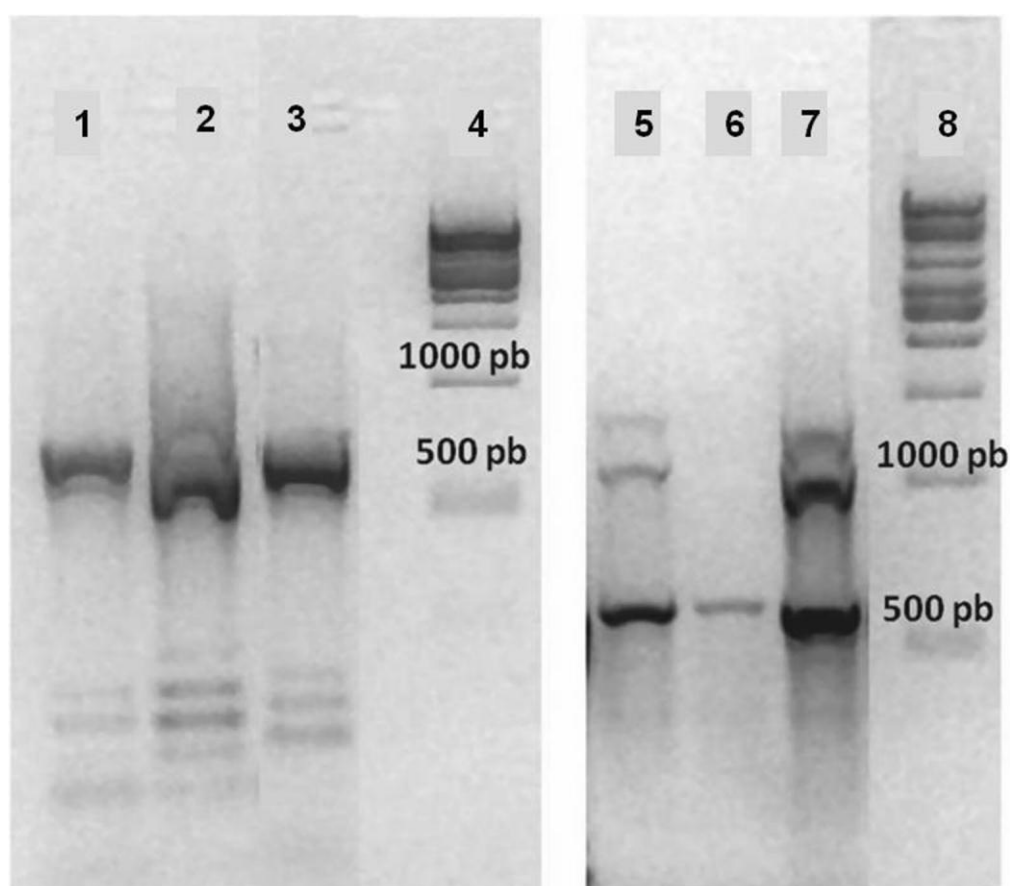
Isolation and Characterization

Three endophytic isolates with typical characteristics of the genus *Azospirillum* were obtained from sugarcane roots of the Leales department, which were denominated Ls1, Ls2 and Ls3, and two rhizospheres from the Tafí Viejo department, which were denominated Tv1 and Tv2. The association of *Azospirillum* with the roots of sugarcane can only be successful if the bacterium is able to survive in the soil and reach significant populations in the root system, so these results confirm the ability of this bacterial genus to colonize naturally the cultivation of sugar cane ⁽¹⁵⁾.

Although bacteria of the genus *Azospirillum* are generally considered rhizosphere bacteria, some strains develop specific differences in the way they colonize the roots. Predominantly they colonize the root surface and only a few strains are able to colonize the inside of the roots. These endophytic strains, being in an environment protected from environmental conditions, have specific mechanisms to communicate and interact with the plant much more efficiently than the rhizospheric strains.

Biological fixation of nitrogen (FBN)

All the isolates were able to grow in NFb medium, forming a white subsurface film ⁽⁷⁾. In addition, the presence of the *nifD* gene of nitrogenase provides evidence of the potential capacity of these isolates to fix atmospheric nitrogen (Figure 1), in agreement with that reported by other authors ⁽⁹⁾.



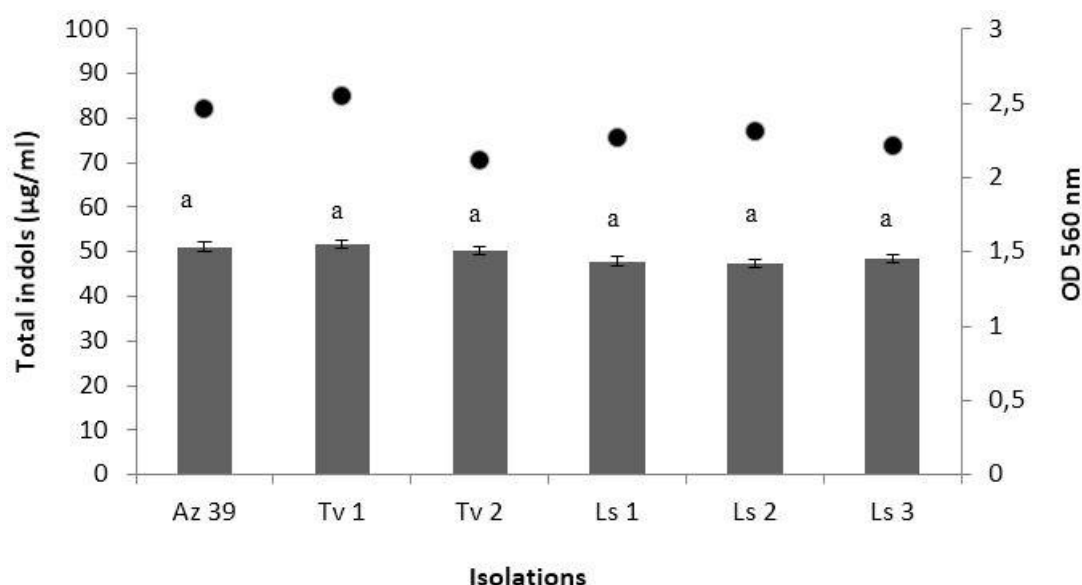
The amplification corresponds to the rhizospheric strains of Tafi del Valle Tv1 and Tv2 (lines 1 and 2), strain Az39 used as reference (line 3), molecular weight marker 1Kb (Promega, USA) (lines 4 and 8), endophytic strains of Loyalists Ls1, Ls2 and Ls3 (lines 5, 6 and 7)

Figure 1. PCR amplification of the *nifD* gene (710 bp) of the isolates obtained

Currently, the contribution of *Azospirillum* to nitrogen requirements of sugarcane through the FBN is a controversial issue. Some research reports claim that the crop is able to obtain up to 70 % of its nitrogen requirements from the FBN and that this is the main mechanism for promoting the growth of bacteria of this genus ⁽¹⁶⁾, others assume that *Azospirillum* it uses nitrogen from the FBN for its own use and the contribution of nitrogen to the crop is related to the assimilation of nitrates ⁽¹⁷⁾.

Producción de indoles totales

Figure 2 shows the production of total indoles expressed in $\mu\text{g mL}^{-1}$ as a function of bacterial growth, evaluated by measuring the optical density at 560 nm.



Equal letters indicate no statistically significant differences (LSD, $p \leq 0.05$)

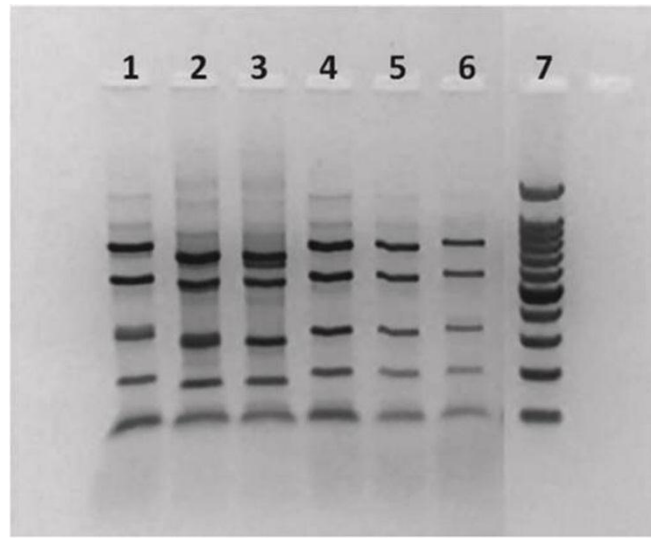
Figure 2. Growth (DO_{560}) (circles) and production of total indoles ($\mu\text{g mL}^{-1}$) (bars) of the different isolates at 96 hs incubation at 30 °C

As can be seen in Figure 2, all the isolates synthesized and excreted total indoles, in amounts similar to the Az39 strain of *A. brasilense*. The production of phytohormones is one of the most important PGPB characteristics of the genus *Azospirillum*⁽¹⁸⁾. These bacteria produce and release to the culture medium different phytohormones, during the stationary phase of growth, among which auxins, gibberellins, abscisic acid, ethylene and salicylic acid have been found. Although these phytohormones significantly affect the growth of the root, resulting in a better absorption of moisture and nutrients, they have also been shown to participate in increasing the growth of the cultures when *Azospirillum* is applied in a foliar manner⁽²⁾. For this reason, the production of phytohormones is important not only for the production of inoculants at an industrial level, but also for the action of these bacteria in the phyllosphere, in the rhizosphere and even within plants. It has been observed that inoculation with *Azospirillum* and the phytohormones produced by these rhizobacteria induce a greater growth promotion response in seeds and seedlings⁽²⁾. The results obtained with the new isolates, producers of indoles, are important for the selection and subsequent formulation of possible biofertilizers⁽¹⁹⁾.

Molecular characterization

Amplification by PCR, sequencing and ARDRA of the *16S* rDNA gene

Figure 3 shows the PCR amplification of the *16S* gene of the rDNA of the different isolates obtained and its subsequent digestion with the restriction enzyme *AluI*. The obtained profiles were compared with those of the Az39 strain of *A. brasilense* used as reference.



The standards correspond to the strain Az39 used as reference (line 1), rhizospheric strains of Tafi del Valle Tv1 and Tv2 (lines 2 and 3), endophytic strains of Loyal Ls1, Ls2 and Ls3 (lines 4, 5 and 6), marker of molecular weight of 100 bp (Promega, USA) (line 7)

Figure 3. Electrophoresis profile of the fragments obtained after restriction of the *16S* rDNA with the *AluI* restriction enzyme

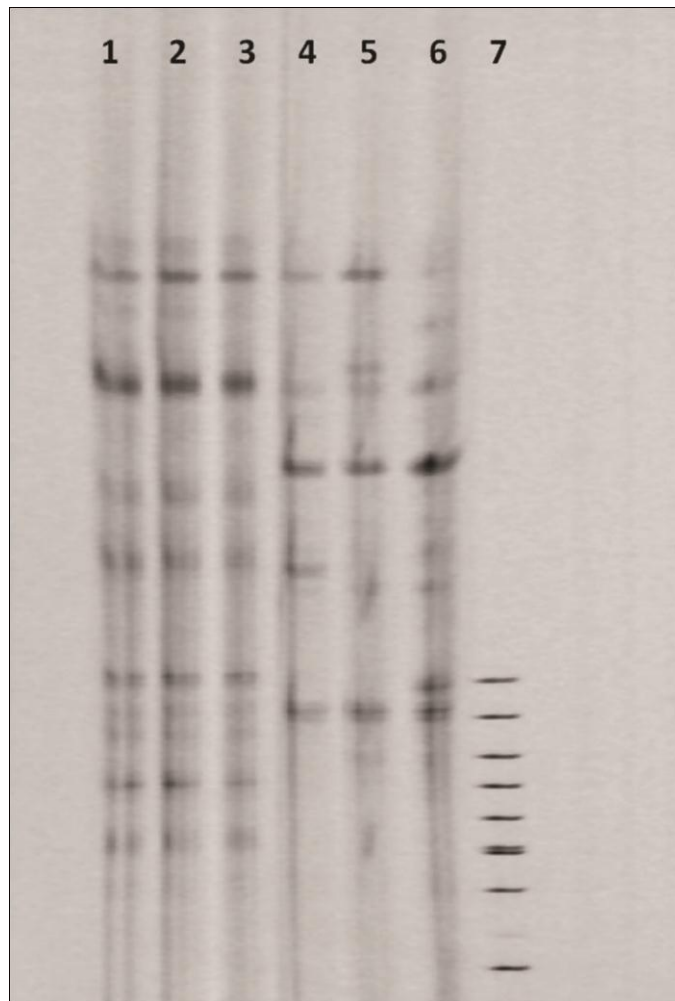
It was observed that the isolates presented the same restriction profile as the Az39 reference strain of *A. brasilense*, so it is inferred that they could correspond to this species of the genus *Azospirillum*. The sequencing of the *16S* gene of the rDNA and its subsequent analysis using the BLAST program allowed confirming it (Table 1).

Table 1. Sequence analysis of the isolates obtained

Isolation	Description	Max score	Total score	Query cover	e-value	Ident	Accession
<i>Tv 1</i>	<i>A. brasilense</i> strain Az39 plasmid AbAZ39	183	362	14%	2,00E-42	99%	CP007797.1
<i>Tv 2</i>	<i>A. brasilense</i> strain Az39 plasmid AbAZ40	547	1032	56%	5,00E-152	93%	CP007797.1
<i>Ls 1</i>	<i>A. brasilense</i> partial 16S rRNA strain Gr54	368	368	35%	4,00E-98	96%	FR667893.1
<i>Ls 2</i>	<i>A. brasilense</i> partial 16S rRNA strain Gr54	723	723	70%	0	96%	FR667893.1
<i>Ls 3</i>	<i>A. brasilense</i> 16S rRNA cole M7	363	363	35%	2,00E-96	95%	HE646772.1

Genotyping by BOX-PCR

The polymorphism patterns generated by BOX-PCR have been used for the differentiation of bacterial strains of the genus *Azospirillum* ⁽²⁰⁾. Figure 4 shows the different genetic fingerprints of the isolates, obtained by BOX-PCR.



The standards correspond to the rhizospheric strains of Tafí del Valle Tv1 and Tv2 (lines 1 and 2), strain Az39 used as reference (line 3), endophytic strains of Loyal Ls1, Ls2 and Ls3 (lines 4, 5 and 6, respectively) and line 7, molecular weight marker of 1Kb (Promega, USA)

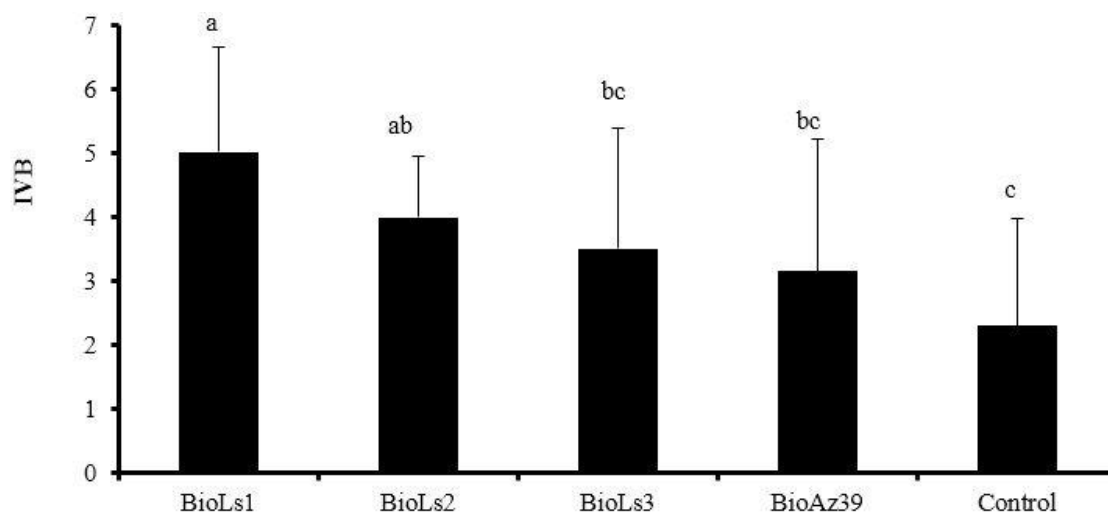
Figure 4. Genetic fingerprint of the different isolates obtained by BOX-PCR

The BOX-PCR technique showed that Tv1 and Tv2 isolates have the same band profile as Az39 from *A. brasilense*, so we can confirm that it is the same strain. On the contrary, the profiles of Ls1, Ls2 and Ls3 are different from each other and with the profile of the Az39 strain, so it can be confirmed that they are different strains.

Bioassay on sugar cane

The isolates Ls1, Ls2 and Ls3 were selected for being endophytes and for presenting differences in their genetic fingerprint with respect to strain Az39, for the formulation of bioproducts that were named BioLs1, BioLs2 and BioLs3. In addition, BioAz39 was used as a positive control for growth induction. The sprouting velocity index (IVB according

its acronyms in Spanish) of the sugar cane stakes inoculated with the different biofertilizers is shown in Figure 5.



The IVB values correspond to the average of three determinations and the error bars indicate standard deviation (SD). Different letters indicate significant differences (LSD, $p \leq 0.05$)

Figure 5. Sprouting velocity index (IVB) of the uninodal sugarcane cuttings inoculated with the biofertilizers formulated from the selected isolates

Among the evaluated bioproducts, BioLs1 was the one that showed the greatest capacity to increase the budding of uninodal stakes of sugarcane, after its application (Figure 5). BioLs1 presented statistically significant differences in comparison with BioLs3, BioAz39 and with the control without inoculation. On the other hand, BioLs1 and BioLs2 bioproducts significantly increased the IVB compared to the uninoculated control. The IVB was 2.30 for the control, while for BioLs1 and BioLs2 it was 5.02 and 4.01 respectively. It is important to point out that the BioLs1 bioproduct, formulated from the resident isolate *A. brasilense* Ls1, showed greater capacity to increase the IVB of sugarcane than BioAz39, which contains *A. brasilense* Az39, the most used strain in our region for the formulation of inoculants for sugar cane. The importance of the FBN during the initial growth of sugarcane, is due to the fact that the N absorption rate of the crop is highest in the first months after sprouting. In this period the crop absorbs more N than it uses for its growth and development, storing the excess as organic substances in its tissues (pods and leaf blades). Then, that N is remobilized to zones of active growth to satisfy, along with the N contributed from the ground, the high requirements of the phase of great growth. This behavior represents a strategy of biological administration of N, which guarantees that it does not compromise growth⁽²¹⁾. For this reason, the use of bioproducts

based on PGP bacteria capable of carrying out the FBN and of producing and excreting phytohormones allowing the rapid establishment of the plant in its initial stages of growth and development, is of fundamental importance considering that poor and prolonged emergencies affect the effective fulfillment of the following phenological phases of the crop, significantly reducing the production and yield of the sugarcane ⁽²¹⁾

CONCLUSIONS

- It is possible to isolate and characterize different strains of *A. brasilense* associated with the cultivation of sugar cane, with potential capacity to fix atmospheric nitrogen and synthesize indoles. The profiles of bands obtained by BOX-PCR confirm that the strains Ls1, Ls2 and Ls3 are strains different from each other and to the strain Az39. The BioLs1 and BioLs2 bioproducts show a positive effect on the IVB of the sugarcane, in comparison with the control without inoculating, in bioassays carried out under controlled conditions. The BioLs1 bioproduct also causes an increase in the sprouting rate of the inoculated seedlings, in comparison with BioAz39.
- In this sense, the isolates *A. brasilense* Ls1 and Ls2 with potential capacity to fix nitrogen and produce indoles, are promising strains associated with sugar cane that could be used for the formulation of biofertilizers, in order to increase yields and production of the crop.