

Primeras observaciones al microscopio electrónico de bacterias fijadoras de N_2 en la raíz de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.)^{1/}_____ OSCAR E. ARIAS**, IRENE M. GATTI***,

_____ DARCY M. SILVA***, ALAIDES P. RUSCHEL***, PETER B. VOSE***

ABSTRACT

The colonization of N-fixing bacteria in sugar cane roots (Saccharum officinarum var NA 56-62) was studied with the transmission electron microscope. Plants obtained by rooting of cuttings were grown in the greenhouse.

The study indicate the presence of bacteria belonging to the genus Azotobacter as well as others which are probably Spirillum. Some bacteria were also found colonizing inside the root's cells.

Acetylene reduction tests carried out with roots incubated in culture gave positive values for nitrogenase activity

Introducción

El fenómeno de interacción de microorganismos en raíces de plantas de la familia Gramineae fue comprobado desde hace varios años (2, 3, 4). El uso del método de reducción de acetileno, que mide la actividad de la nitrogenasa, enzima fijadora de nitrógeno en todos los sistemas biológicos, permitió también reunir una evidencia bioquímica acerca de la fijación biológica de nitrógeno en algunas especies gramíneas (4, 5, 11).

En caña de azúcar, Döbereiner y Col (4) encontraron una actividad positiva de la nitrogenasa, posteriormente Ruschel y Col (8) dieron una evidencia directa de la fijación rápida de nitrógeno atmosférico utilizando $^{15}N_2$.

Tratándose de un campo de investigación nuevo, cada investigación que se realiza, suscita una serie de interrogantes; dentro de estos, existe la inquietud de saber cuál es el grado de asociación que existe entre los microorganismos y la raíz de la planta en caña de azúcar, interrogantes al cual este trabajo trata de aportar algunas evidencias con el reconocimiento al microscopio electrónico de los tipos de bacterias que se encuentran colonizando la rizosfera, así como la presencia de algunas bacterias en el interior de las células de la raíz, fenómeno que fue sospechado precedentemente como muy probable (8).

Materiales y métodos

Se trabajó con raíces de plantas de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) variedad NA 56-62 de dos meses de edad, obtenidas del enraizamiento de esquejes de tallo cultivados en condiciones de invernadero, en un sustrato de vermiculita irrigado por capilaridad con una solución nutritiva de Hoagland y Arnon que contenía únicamente la cuarta parte del nitrógeno normal. Las plantas fueron inoculadas con

* Recibido para su publicación el 10 de agosto de 1978

^{1/} Trabajo efectuado en el Centro de Energía Nuclear en Agricultura, Piracicaba, S. P., Brasil, bajo los auspicios del Organismo Internacional de Energía Atómica.

** Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica

*** Centro de Energía Nuclear na Agricultura, C. P. 96, Piracicaba, S. P., Brasil.

un licuado de raíces provenientes del campo (Fig 1). Algunas secciones de raíz de 1 cm de longitud se incubaron durante 48 h en un medio de cultivo aséptico que poseía la siguiente composición: KH_2PO_4 0,4 g; K_2HPO_4 0,1 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,02 g; NaCl 0,1 g; FeCl_3 0,1 g; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,02 g; solución alcohólica de azul de bromotimol 0,5%; 5 g de sacarosa; 12 g de agar y 1000 ml de agua destilada.

Después de 48 h de incubación se efectuó una prueba de reducción de acetileno (6). Para este fin, se colocaron las colonias en desarrollo en un frasco de 10 ml de capacidad y se incubaron en atmósfera de 10% de acetileno. Una hora después del inicio de la incubación, se recogió muestra de 0,5 ml de gas para el análisis del etileno generado. Las determinaciones de etileno se efectuaron en un cromatógrafo de gas Beckman GC 65.

El estudio del tipo de bacterias que estaban formando las colonias en el medio de cultivo (Fig 2) se efectuó después de 48 h de incubación de las raíces

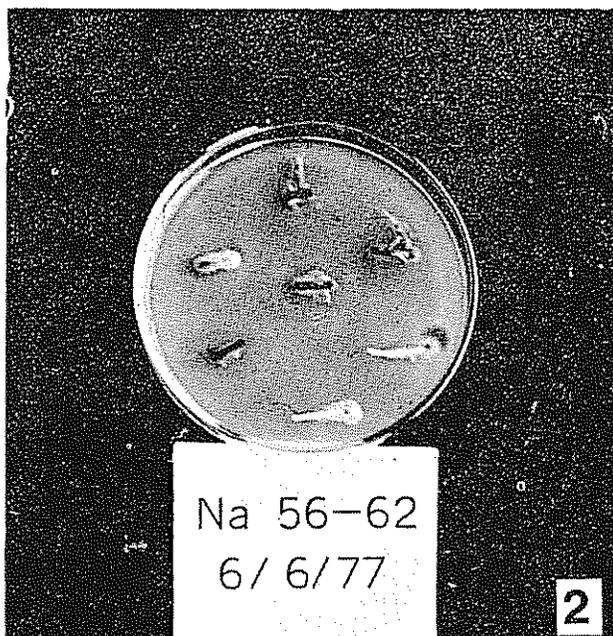


Fig 2—Colonias de bacterias observadas alrededor de las raíces 48 h después del inicio de la incubación.

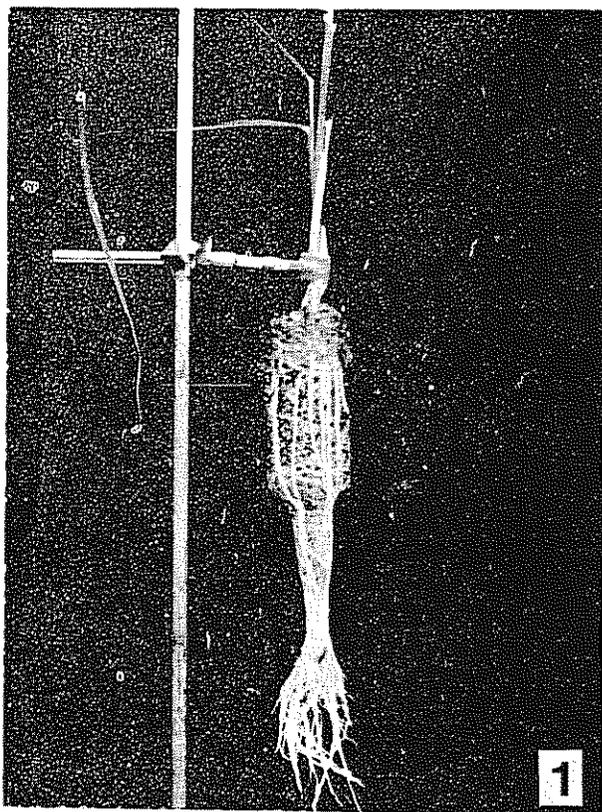


Fig 1—Aspecto del sistema radical de plantas de caña de azúcar variedad Na 56-62 cultivadas en vermiculita con dos meses de edad

Para este fin se trató la colonia con formalina al 10% con el objeto de mantener la estructura de las paredes bacterianas, el lavado se centrifugó durante 10 min a 1500 rpm de esta centrifugación se tomó la parte supernadante que se centrifugó nuevamente durante 10 min a 3000 rpm; en esta segunda centrifugación se descartó el supernadante. El residuo del tubo de centrifugación fue diluido en 2 ml de agua y examinado luego al microscopio electrónico previa coloración negativa con una solución acuosa al 2% del ácido fosfotungstico pH 7,2 (P.T.A.). Usando esta misma técnica de coloración se examinó también un lavado de raíces obtenido directamente de las plantas que estaban creciendo en vermiculita.

Para la observación de los cortes ultrafinos al microscopio electrónico, se fijaron secciones de raíz tomadas directamente de la planta; también se estudiaron raíces incubadas durante 48 h en medio aséptico así como porciones del medio de cultivo donde habían sido colocadas las raíces para su incubación. La técnica de preparación de estos especímenes fue la siguiente:

El material se fijó en glutaraldehído al 6,5% en un amortiguador de cocodilato de sodio 0,125 M, pH 7,0 durante 1,5 h, luego se efectuó una posfijación con tetraóxido de osmio al 2% en el mismo amortiguador durante una hora a 4C. Una vez fijado el material se efectuó una precoloración con acetato de uranilo al 2% en una solución acuosa de acetona al 75%

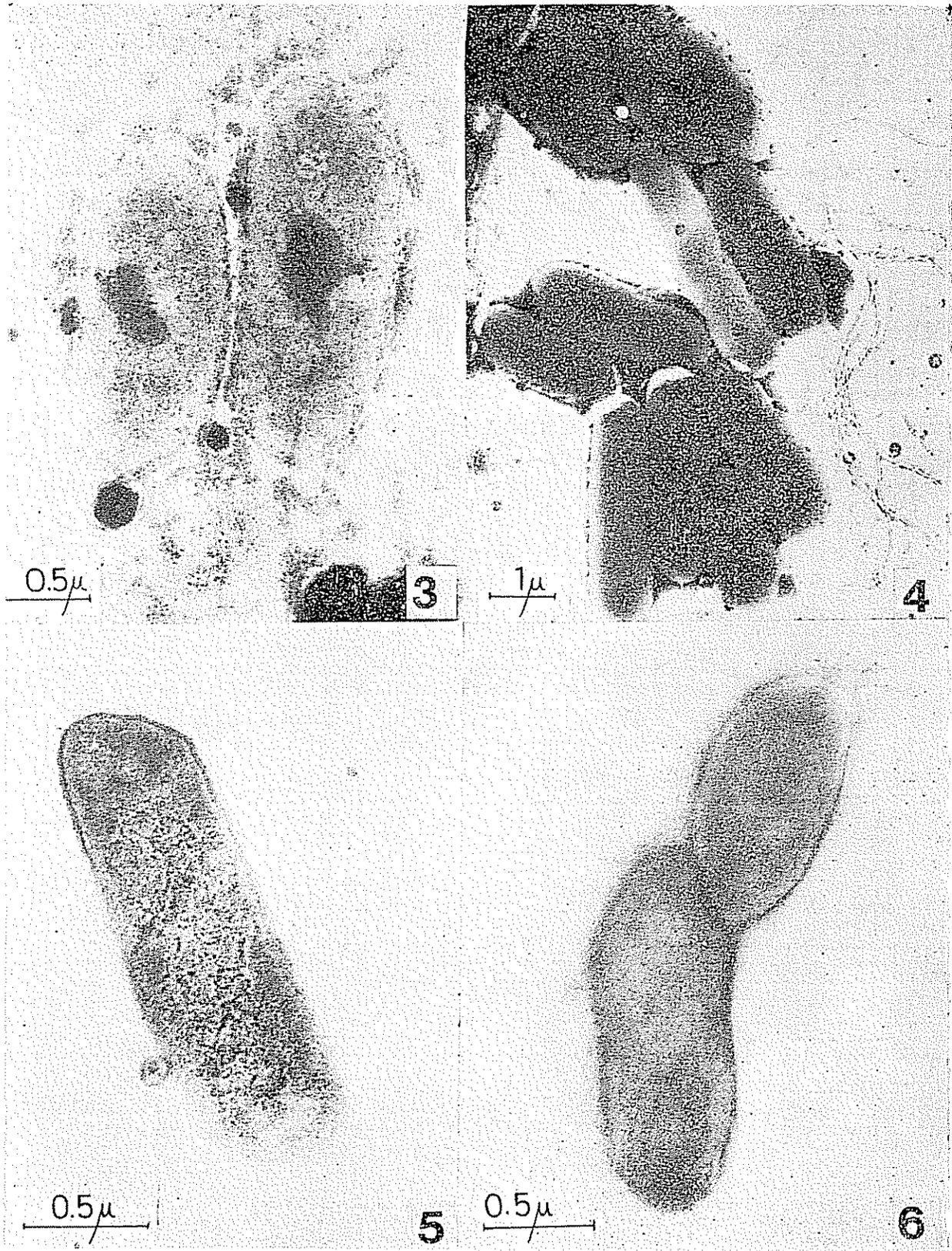


Fig 3—Coloración negativa de una suspensión de bacterias del género *Azotobacter* provenientes de un larado de raíces

Fig 4—Bacterias del género *Spirillum* obtenidas de un medio de cultivo puro, observadas al microscopio electrónico usando la técnica de la coloración negativa

Fig 5—Bacteria del género *Spirillum* encontrada en el medio de cultivo donde fueron colocadas las raíces en incubación, observada al microscopio electrónico usando la técnica de la coloración negativa

Fig 6—Bacterias del género *Azotobacter* obtenidas en un medio de cultivo puro y observadas al microscopio electrónico usando la técnica de la coloración negativa

en un refrigerador ($\pm 5^\circ\text{C}$) 16 h; después de la pre-coloración el material se deshidrató en acetona de 90% y 100%; finalmente se efectuó la inclusión en Epon 812.

Los cortes ultrafinos se obtuvieron en un ultramicrotomo MT-I marca Sorvall y se montaron en soportes de cobre con una membrana de colodión. Seguidamente se procedió a colorear los cortes con acetato de uranilo al 2% y citrato de plomo según la técnica de Reynolds (7). El material fue examinado en un microscopio de transmisión Siemens Elmiskopia

Resultados y discusión

Las pruebas de reducción de acetileno efectuadas con el material de raíz incubado durante 48 h en medio de cultivo dio valores positivos para la actividad de la nitrogenasa (Cuadro 1), la actividad promedio encontrada fue de 66,5 n moles/g de colonia en 1 h de incubación; lo cual es un valor bastante elevado si se compara con lo obtenido por Ruschel (9). La variabilidad encontrada se debe muy probablemente a la heterogeneidad de la microflora que se desarrolló, ya que estas colonias están compuestas por más de un tipo de bacteria fijadora de N

La Figura 2 evidencia que las bacterias se encuentran no sólo en la superficie de la raíz sino que también en el interior ya que las colonias se inician casi siempre en el extremo de la misma, lo que indica una mayor actividad bacteriana en la región apical de la raíz

El examen al microscopio electrónico de los lavados de raíz revela la abundancia de bacterias del género *Azotobacter* (Fig. 3, 6). Con la técnica de la centrifugación de lavados del medio de cultivo, fue posible también identificar la presencia de otras bacterias, probablemente *Spirillum* (Figs. 4, 5)

El examen de los cortes ultrafinos de raíz con incubación previa (Fig. 7) ilustra el caso de una célula colonizada por un gran número de bacterias. El hecho de que el material con el cual se practicó la prueba de reducción acetileno, haya dado positivo, para la prueba de actividad de la nitrogenasa (Cuadro 1), indica que muy probablemente estas bacterias sean fijadoras de nitrógeno. Nótese también la similitud de la bacteria encontrada dentro de una célula de raíz (Fig. 8) en un corte efectuado con material recolectado directamente en el invernadero con la bacteria observada en el medio de cultivo (Fig. 5).

Estas observaciones concuerdan con lo encontrado por Ruschel y Col (8) quienes hallaron microorganismos colonizando las células epidérmicas de la raíz.

En conclusión, de estas primeras observaciones al microscopio electrónico sobre la asociación de microorganismos fijadores de nitrógeno, así como de lo encontrado por otros autores (10), se perfila la hipótesis de que pueden existir varios grados de asociación bac-

Cuadro 1 — Actividad de la nitrogenasa en raíces de caña de azúcar después de 48 horas de incubación en un medio de cultivo en agar

Nº de Muestra	n moles $\text{C}_2\text{H}_4/\text{g/h}$	
1	136,8	
2	49,1	
3	38,5	
4	77,0	
5	31,5	
x	66,5	$S \pm 21,42$ cv 64,4 %

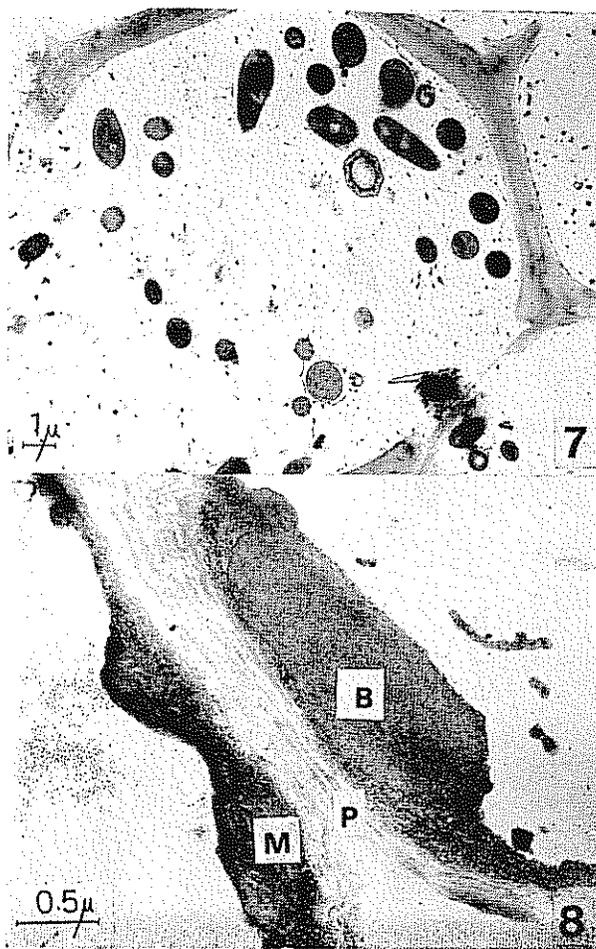


Fig 7 — Corte ultrafino de una sección de raíz que estuvo en incubación durante 48 h en un medio de cultivo en agar

Fig 8 — Corte ultrafino de una sección apical de raíz recolectada directamente en plantas cultivadas en invernadero B = bacteria, P = pared, M = mitocondria

teriana en la raíz de la caña de azúcar, ya que las evidencias experimentales revelan la presencia de éstas en el interior de la raíz, en la superficie y en la rizosfera. Con estas evidencias, conviene ahora encontrar pruebas directas que demuestren que los organismos que se encuentran dentro de la raíz son fijadores de nitrógeno atmosférico.

Resumen

Se estudiaron al microscopio electrónico de transmisión las bacterias que colonizaban la raíz de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* var NA 56-62) en plantas cultivadas en invernadero obtenidas por enraizamiento de esquejes.

El examen al microscopio electrónico reveló la presencia de bacterias del género *Azotobacter* así como de otras que muy probablemente sean *Spirillum*. Se encontraron también algunas bacterias colonizando el interior de las células de la raíz.

Las pruebas de reducción de acetileno efectuadas en el material de raíz incubado en medio de cultivo dieron valores positivos para la actividad de la nitrogenasa.

Agradecimiento

Se agradece al personal auxiliar de las secciones de microscopía electrónica y de microbiología de suelos del Centro de Energía Nuclear en Agricultura, la colaboración brindada en la realización de este trabajo.

Literatura citada

1. BALANDREAU, J. Mesure de l'activité nitrégénasique des microorganismes fixateurs libres d'azote de la rizosphère de quelques graminées. *Revue d'Ecologie et de Biologie du Sol* 12: 259-279 1975.
2. DÖBEREINER, J. Influência da cana-de-açúcar na população de *Beijerinckia* no solo. *Revista Brasileira de Biologia* 19: 251-258 1959.
3. ——— RUSCHEL, A. P. Inoculação de arroz com bactérias fixadoras de nitrogênio do género *Beijerinckia* Derx. *Revista Brasileira de Biologia* 21: 397-407 1961.
4. ——— DAY, J. M. y DART, P. J. Nitrogenase activity in the rhizosphere of sugar cane and some tropical grasses. *Plant and Soil* 37: 191-196 1972.
5. ——— DAY, J. M. y DART, P. J. Rhizosphere associations between grasses and nitrogen-fixing bacteria: effect of O₂ and nitrogenase activity in the rhizosphere of *Paspalum notatum*. *Soil Biology and Biochemistry* 5: 157-159 1972.
6. HARDY, R. W. F., BURNS, R. C., HERBERT, R. R., HOLSIEN, R. D. y JACKSON, E. K. Biological nitrogen fixation: A key to world protein. *Plant and Soil (Special Vol)*: 516-590 1971.
7. REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 17: 208 1963.
8. RUSCHEL, A. P., HENIS, Y., SALATI, E. Nitrogen-15 tracing of N-fixation with soil-grown sugar cane seedlings. *Soil Biology and Biochemistry* 7: 181-182 1975.
9. ——— Fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar. Doctor Thesis. USP. ESAIQ. Piracicaba, S. P. Brasil 73 p 1975.
10. ——— VOSE, P. B. Present situation concerning studies on associative nitrogen-fixation in sugar cane, *Saccharum officinarum* L. CENA Boletín Científico, BC-045 July 1977, 27 p.
11. YOSHIDA, T. y ANCAJADAS, R. R. Nitrogen fixation by bacteria in the root zone of rice. *Soil Science Society of America Proceedings* 35: 156-157 1971.

Notas y Comentarios

Publicaciones

CIDIAT 78 El Centro Interamericano de Desarrollo Integral de Aguas y Tierras (CIDIAT), con sede en Mérida, Venezuela, ha iniciado la publicación de un informativo trimestral, *CIDIAT 78*, destinado a dar a conocer las actividades de la institución, que en su mayor parte son cursos de adiestramiento y capacitación, en categoría de postgrado (Desarrollo de Recursos Hidráulicos), cursos cortos nacionales en Venezuela o en otros países (Ecuador, Nicaragua, Brasil, Honduras, Bolivia, Colombia), cursos interamericanos (en Perú y Colombia), seminarios nacionales, y seminarios internacionales. Tiene un trabajo de "comunicación directa" sobre panorama al sector riego en México, escrito por Enri que Palacios Velez. El director es Germán Uzcátegui y la dirección es Apartado 219, Mérida, Venezuela

Publicaciones

Empirical Economics Una nueva revista trimestral del Instituto de Estudios Avanzados, Viena, dedicada al campo de la investigación económica empírica mediante el uso de métodos estadísticos para atacar los problemas económicos actuales. En el volumen I, número 1, (1976) hay: Un modelo mundial del comercio internacional, por K. Marwah. S. Corradi y G. Gambetta, escriben sobre la estimación de atraso distribuido mediante funciones curvas; y B. K. Lordh y J. S. Lewis tratan de la identificación de complejos industriales a partir de cuadros de insumo-producto. La suscripción anual es de DM 100, y la dirección es Physica-Verlag Subser Dept; P.O. Box 1136, D-8700 Wurzburg 2, Alemania.

Variedad de arroz para cerveza

Una variedad nueva de arroz, 'LA110', desarrollada por la Estación Experimental del Estado de Louisiana, ayudará a cubrir las necesidades de almidón de las cervecerías que prefieren usar arroz en vez de maíz molido (*Agricultural Research* July 1978).

La demanda por fuentes de almidón para la industria cervecera ha creado en los últimos años, lo que ha dado lugar a que crezca la importación del tipo de arroz apropiado.

La variedad 'LA110' es producto de un cruce de dos tipos de arroz recientemente introducidos a los Estados Unidos. Es la primera variedad de arroz semienano que se entrega al cultivo comercial en ese país. Su capacidad para altos rendimientos y resistencia a todas las razas del quemado del arroz (*Pyricularia oryzae*) existentes en los Estados Unidos, hace a esta variedad una excelente fuente de germoplasma para programas de mejoramiento.

Décimo Cuarto Congreso de Ciencia del Pacífico

El XIV Congreso de Ciencia del Pacífico se realizará del 20 de agosto al 5 de setiembre de 1979, en Khabarovsk (Jabarovsk), Unión Soviética. Los programas preliminares anunciados hasta la fecha comprenden a) Ciencias de la Tierra Sólida, b) Entomología, c) Ciencias del Agua Dulce, d) Arrecifes de Coral, e) Ecología y uso racional de Ecosistemas Isleños, f) Comunicación de la Ciencia y Educación, g) Ciencias Sociales y Humanidades; Sección de Problemas Etnoculturales en la investigación sobre el Pacífico. Posteriormente se completarán los demás programas. El Presidente del Certamen es el Académico A. V. Sidorenko, y el Secretario General el Dr. M. A. Drobyshev. La dirección del Comité Organizador de XIV Congreso es: Academia de Ciencias de la URSS, 12 Zhdanov St Moscú 103045.