

DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Azospirillum brasilense* EN SUELOS CULTIVADOS CON MAÍZ CON LABRANZA CONVENCIONAL Y DE CONSERVACIÓN

Genetic Diversity of *Azospirillum brasilense* from Maize Grown under Conventional and Conservation Tillage

D. Espinosa-Victoria^{1†}, L. Hernández-Flores¹ y L. López-Reyes²

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar la diversidad genética de *Azospirillum brasilense* en suelos cultivados con maíz con labranza convencional y de conservación durante las épocas de primavera e invierno. El estudio se realizó en parcelas de dos campos experimentales en Santa Isabel de Ajuno, Michoacán y Pabellón de Arteaga, Aguascalientes, así como en el campo experimental en Villadiego, Guanajuato; que presentan un Andosol, un Calcisol háplico y un Vertisol pélico, respectivamente. El aislamiento de las accesiones de *Azospirillum* se llevó a cabo en medio NFB semigelificado y la selección y purificación de las colonias en medio Agar Rojo Congo. Durante la época de primavera, la localidad de Villadiego presentó la población más alta de *Azospirillum* (10.44×10^3) con labranza convencional. Por otro lado, las localidades de Santa Isabel de Ajuno y Pabellón de Arteaga registraron las poblaciones más altas (5.55×10^3 y 1.94×10^3 , respectivamente) con labranza de conservación. Durante la época de invierno, la población de *Azospirillum* en las tres localidades fue superior con labranza de conservación. Se seleccionaron cinco cepas por sistema de labranza en cada localidad, dando un total de 30 accesiones de *Azospirillum*, las cuales se identificaron como *A. brasilense* de acuerdo con los criterios de Hartmann. Mediante la técnica RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA) y, con el empleo del oligonucleótido NP2, se detectaron cuatro bandas de 100, 250, 300 y 400 kb en el grupo de cepas de *A. brasilense*, determinándose un valor promedio

de la diversidad genética de la población de 0.229, inferior al reportado para *Azospirillum* en otros estudios. Se concluye que los dos sistemas de labranza en los cuales estuvo sometida *A. brasilense*, no modificaron su composición genética pero sí el número de unidades formadoras de colonias.

Palabras clave: *Zea mays* L., RAPDs, diazotrofos, poblaciones, composición genética.

SUMMARY

The objective of this study was to determine the *Azospirillum brasilense* genetic diversity in soils managed under conservation and conventional tillage planted with corn. In México, the study was carried out in two experimental fields at Santa Isabel de Ajuno, Michoacán and Pabellón de Arteaga, Aguascalientes, as well as in an experimental field at Villadiego, Guanajuato. The soil types for each experimental field are Andisols, Haplic calcisols, and Pelic vertisols, respectively. During the spring season, Villadiego plots exhibited the highest *Azospirillum* population (10.44×10^3) under conventional tillage. Instead, the highest *Azospirillum* populations for Santa Isabel de Ajuno and Pabellón de Arteaga plots (5.55×10^3 y 1.94×10^3 , respectively) were found under conservation tillage. On the other hand, during winter the highest *Azospirillum* population was found under conservation tillage in the three experimental fields. Five strains were selected for each tillage system and location, resulting in 30 accessions, which were identified as *A. brasilense*, according to Hartmann *et al.* (1988) criteria. The *A. brasilense* population genetic diversity was analyzed through the Random Amplified Polymorphic DNA (RAPDs) technique using NP2 as primer. Four bands of 100, 250, 300, and 400 kb were detected within this group of strains with an average genetic diversity value of 0.229, which was lower than other studies. The tillage system did not modify the genetic structure of

¹ Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. 56230 Montecillo, estado de México.

² Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Microbiología de Suelos, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, México.

[†] Autor responsable (despinos@colpos.mx)

A. brasilense population, but the colony forming units did.

Index words: *Zea mays L.*, RAPDs, diazotrofs, population, genetic composition.

INTRODUCCIÓN

La labranza es una parte integral en el proceso de producción de los cultivos que crea condiciones óptimas y un ambiente adecuado en el suelo para que la semilla germine, emerja y la plántula a la que da origen obtenga los nutrimentos, agua y aire necesarios para su desarrollo (Figueroa y Morales, 1992).

Villarreal *et al.* (2000) mostraron que, con labranza convencional, la población microbiana es mayor, a diferencia de lo que ocurre con labranza mínima y cero. Los mismos autores indicaron que, con la presencia de ciertas poblaciones microbianas, se podría valorar el estado de la fertilidad del suelo en algunos sistemas de laboreo.

Algunas especies bacterianas del suelo contribuyen con el aporte nutrimental para las plantas, la mejora de las características de agregación de las partículas, el incremento de la retención de agua por el suelo, la porosidad de éste, así como el control de la erosión del mismo (Olalde y Aguilera, 1998).

Así, dentro de las poblaciones microbianas del suelo existen grupos bacterianos de importancia agrícola, como el género *Azospirillum* que fija el nitrógeno atmosférico cuando la tensión parcial de oxígeno es baja, y produce sideróforos y sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal, como auxinas, giberelinas y citocininas (Mascarúa-Esparza *et al.*, 1988; Okon *et al.*, 1988). Aunque los miembros del género *Azospirillum* influyen positivamente en el crecimiento de plantas, como el maíz (Tapia *et al.*, 1990; Marschner, 1995), no se tiene conocimiento acerca de la diversidad genética de estas poblaciones en suelos manejados con labranza convencional y de conservación.

Los avances de la Biología Molecular han aportado una clase nueva de marcadores genéticos que permite visualizar diferencias entre las secuencias homólogas del ADN de los organismos. Para obtener marcadores de ADN, se usan diferentes métodos que, de manera convencional, pueden agruparse en tres categorías. La primera se basa en la técnica conocida como hibridación tipo Southern que incluye el polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (RFLPs) y el número

variable de copias adyacentes (VNTRs); la segunda categoría agrupa las metodologías basadas en la reacción de polimerización en cadena (PCR); y la tercera involucra la combinación de PCR y la hibridación tipo Southern (Valadez y Kahl, 2000).

Recientemente, se ha empleado la técnica de polimorfismos del ADN amplificado arbitrariamente (RAPDs), para el estudio de diversidad genética en microorganismos (Valadez y Kahl, 2000). Este procedimiento es relativamente rápido, ya que sólo emplea pequeñas cantidades de ácido nucleico, no involucra transferencia tipo Southern, ni el uso de radioactividad (Waugh y Powell, 1992).

Debido a que las poblaciones del género *Azospirillum* son influenciadas por los factores físicos, químicos y biológicos del suelo, resulta importante comparar la diversidad genética de este género con diferentes sistemas de labranza empleando RAPDs y la técnica de PCR que involucra iniciadores aleatorios para obtener perfiles de amplificación de la especie.

Dado que se carece de estudios sobre la diversidad genética de bacterias del suelo con diferentes sistemas de labranza, con la presente investigación se inician los estudios sobre diversidad genética *Azospirillum brasilense* con sistemas de labranza convencional y de conservación, empleando la técnica de RAPDs para generar información que permita analizar la composición genética de esta especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en parcelas de dos campos experimentales del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), ubicados en Santa Isabel de Ajuno, Michoacán, y Pabellón de Arteaga, Aguascalientes, y el campo experimental de los Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura (FIRA) en Villadiego, Guanajuato. Santa Isabel de Ajuno se localiza entre 101° 25' y 101° 52' O y 19° 27' y 19° 44' N, a una altitud de 2132 m; Pabellón de Arteaga, se localiza entre 101° 20' y 102° 23' O y entre 20° 10' y 22° 18' N, su altitud media es de 2052 m; y el tercer sitio está ubicado entre 20° 24' N y 101° 07' O, su altitud media es de 1900 m. En el Cuadro 1, se presentan las características edafoclimáticas de cada uno de los sitios de muestreo. Las parcelas con labranza de conservación en Santa Isabel de Ajuno y Villadiego se han mantenido con maíz de temporal por ocho y 13 años, respectivamente; las de

Cuadro 1. Propiedades químicas y físicas de los suelos de las tres localidades donde se realizó el muestreo.

	Santa Isabel de Ajuno (Michoacán)	Pabellón de Arteaga (Aguascalientes)	Villadiego (Guanajuato)
Tipo de suelo [†]	Andosol	Calcisol háplico	Vertisol pélico
pH	5.5	6.73	5.56
Textura	Franco-arenosa	Arcilloso	Arcilloso
Clima	Templado	Semidesértico	Semicálido
Temperatura	5 a 18 °C	12 a 26 °C	11 a 16 °C
Precipitación	1000 a 1300 mm	300 a 604 mm	400 a 700 mm
Cultivo	Maíz de temporal	Maíz (P-V)	Maíz de temporal

[†] Clasificación FAO-UNESCO-ISRIC (1999). P = primavera, V = verano.

Pabellón de Arteaga se han manejado con rotación gramínea-leguminosa con riego y maíz forrajero durante nueve años.

La toma de muestras se realizó en parcelas con labranza de conservación y convencional durante la primavera y el invierno del 2002. El sitio de muestreo se seleccionó al azar, tomando seis muestras de suelo a una profundidad de 10 cm debajo de la superficie por cada sistema de labranza, colocando 100 g de suelo en bolsas de plástico y depositándolas en una hielera para mantenerlas a baja temperatura para su transporte al laboratorio.

Población de *Azospirillum* por la Técnica del Número más Probable (NMP)

La población de *Azospirillum* se determinó con la técnica del número más probable (Valdés, 1990). Se prepararon diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-5} inoculándose 100 μ L en viales con medio Nfb semigelificado (Tarrand *et al.*, 1978). Se consideraron como positivos los viales que presentaron viraje del indicador Azul de bromotimol de neutro a alcalino, y con formación de una película blanca a 2 mm debajo de la superficie del medio. Para verificar la presencia de *Azospirillum*, se realizó el plaqueo de las bacterias de los viales positivos en medio Agar Rojo Congo para observar la formación de colonias pequeñas y secas de color rojo escarlata (Rodríguez-Cáceres, 1982). A los datos generados se les aplicó un análisis de varianza y prueba de medias (Tukey), empleado el programa SAS Versión 6.03 (SAS Institute, 1988).

Aislamiento y Purificación de *Azospirillum*

Se tomaron las colonias que aparecieron en medio Rojo Congo las cuales se inocularon en viales con medio

Nfb (Tarrand *et al.*, 1978). La purificación y selección de las colonias se realizó en medio Agar Rojo Congo confirmando como accesiones de *Azospirillum* aquellas colonias pequeñas y secas de color rojo escarlata (Rodríguez-Cáceres, 1982).

Identificación de Especies

La identificación de especies se hizo con base en las características reportadas por Hartmann *et al.* (1988). Se incluyeron las cepas *A. brasilense* Cd de colección internacional (ATCC29729) y la cepa *A. lipoferum* GH-3 proporcionada gentilmente por el Dr. Yoav Bashan del Departamento de Microbiología del Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste (CIB), La Paz, Baja California Sur, México.

La fijación biológica del nitrógeno se determinó en cada cepa bacteriana a través de la actividad reductora de acetileno, ARA (Baldani *et al.*, 1997). La ARA se llevó a cabo en viales serológicos tipo antibiótico con medio de cultivo Nfb semigelificado libre de nitrógeno combinado, previamente inoculados con un cultivo bacteriano de 10^8 UFC mL⁻¹ crecido durante 24 h a 32 °C en medio líquido Nfb adicionado con NH₄Cl a 0.02%. Los viales se incubaron a 32 °C durante 48 h. Después se reemplazó 12% del volumen de la fase gaseosa de cada vial con gas acetileno permitiendo un periodo de incubación de 24 h. La cantidad de etileno (C₂H₄), formada a partir del acetileno (C₂H₂), se determinó con un cromatógrafo de gases Varian Modelo 3700 con detector de ionización de flama, columna de 2 m x 1/8" y soporte tipo Porapak N de 80 a 100 mallas con un flujo de aire de 300 mL min⁻¹. Se seleccionaron cepas con actividad nitrogenasa mayor que 10 nM de etileno h⁻¹ mL⁻¹ de medio de cultivo (Mascarúa-Esparza *et al.*, 1988). Igualmente, los datos se analizaron con el programa SAS Versión 6.03 (SAS Institute, 1988).

Determinación de la Diversidad Genética

Aislamiento de ADN. Se seleccionaron cinco cepas por sistema de labranza en cada localidad, dando un total de 30 cepas de las que se extrajo el ADN empleando el KIT fast DNA BIO 101 siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante (BIO 101, Joshua Way, California, USA). Para propósitos del presente trabajo se emplearon dos iniciadores: NP2 5'CGGGGGACTGTTGGGCGCCATCT) (Fani *et al.*, 1993) y 1253 (5'-GTTTCCGCC-3') (Fancelli *et al.*, 1998). La reacción de amplificación se formó de 10 mM tris-HCl, 1.5 mM MgCl₂, 100 µM dNTP, 2.6 µM de oligonucleótido, 2.5 U de Taq ADN polimerasa y 50 ng de ADN genómico de *Azospirillum*. Se utilizó un termociclador Thermo Hybaid PCR Express (California, USA) para la amplificación del ADN de cada cepa. Cada muestra de ADN se incubó primero a 90 °C por 60 s y 95 °C por 90 s; posteriormente, la mezcla de reacción se cicló 45 veces siguiendo el perfil de temperaturas de 95 °C por 30 s, 45 °C por 1 min y 75 °C por 2 min. Finalmente, las muestras se incubaron a 60 °C por 10 min y se mantuvieron a 5 °C. La electroforesis del ADN amplificado se llevó a cabo en geles de agarosa a 1%, que contenía una solución amortiguadora TAE 1X y 5 µL de bromuro de etidio en una cámara Thermo EC Classic TM (California, USA). Cada carril del gel se cargó con 20 µL de mezcla amplificada. La electroforesis se realizó a 90 V por 3 h. Los geles se analizaron con el equipo UV Bioimaging Systems Modelo UVP, equipado con White Darkroom (La Vallee Cedex, Francia). El patrón de bandas obtenido con cada iniciador se analizó a través de una matriz de datos para determinar matrices de distancia genética con el programa S-PLUS 2001, Versión 6.0 para Windows (Weir, 1996). Se generó un dendrograma por el método del promedio o UPGMA (Avisé, 1994).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Población de *Azospirillum* por la Técnica del Número más Probable (NMP)

Aunque las localidades de Santa Isabel de Ajuno, Pabellón de Arteaga y Villadiego presentan clima contrastante: templado, semidesértico y semicálido, respectivamente, *A. brasilense* se detectó en los tres sitios de estudio.

Durante la época de primavera, con labranza convencional, se observaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre las poblaciones de *Azospirillum* de las tres localidades (Cuadro 2). Las parcelas de Villadiego presentaron la mayor población (10.44×10^3), superando las poblaciones de Santa Isabel de Ajuno (3.64×10^3) y Pabellón de Arteaga (0.43×10^3) en 65 y 95%, respectivamente. Con labranza de conservación, la población más alta (5.55×10^3) se detectó en Santa Isabel de Ajuno, que superó en 58.9 y 65% las poblaciones de Villadiego (2.28×10^3) y Pabellón de Arteaga (1.94×10^3), respectivamente.

Por otra parte, durante el invierno, la población de *Azospirillum* en parcelas de Villadiego con labranza convencional (6.89×10^3) resultó ser significativamente mayor ($P \leq 0.05$) que las poblaciones de Pabellón de Arteaga (0.56×10^3) y Santa Isabel de Ajuno (0.18×10^3), superándolas en 97 y 110%, respectivamente (Cuadro 3).

Con labranza de conservación, la población más alta se encontró en Pabellón de Arteaga (13.10×10^3) la cual

Cuadro 2. Población de *Azospirillum* durante la época de primavera en tres localidades con dos sistemas de labranza.

Localidad	Labranza convencional	Labranza de conservación
	- - - - UFC g ⁻¹ suelo - - - -	
Villadiego (Guanajuato)	10.44×10^3 a [†]	2.28×10^3 b
Pabellón de Arteaga (Aguascalientes)	0.43×10^3 c	1.94×10^3 c
Santa Isabel de Ajuno (Michoacán)	3.64×10^3 b	5.55×10^3 a

[†] Cifras con la misma letra en cada columna son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha = 0.05$).

Cuadro 3. Población de *Azospirillum* durante la época de invierno en tres localidades con dos sistemas de labranza.

Localidad	Labranza convencional	Labranza de conservación
	- - - - UFC g ⁻¹ suelo - - - -	
Villadiego (Guanajuato)	6.89×10^3 a [†]	11.50×10^3 b
Pabellón de Arteaga (Aguascalientes)	0.56×10^3 b	13.10×10^3 a
Santa Isabel de Ajuno (Michoacán)	0.18×10^3 b	6.51×10^3 c

[†] Cifras con la misma letra en cada columna son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha = 0.05$).

superó a las de Villadiego (11.50×10^3) y Santa Isabel de Ajuno (6.51×10^3) en 12.2 y 50.3%, respectivamente.

Igual que en el presente estudio, Caballero-Mellado y Valdés (1983) reportaron la presencia de *Azospirillum* en regiones geográficas contrastantes, que comprendieron suelos tropicales, subtropicales, templados y desérticos.

La presencia de poblaciones altas de *Azospirillum* en parcelas con labranza de conservación podría explicarse por el alto contenido de carbono, nitrógeno y humedad que resultan de la incorporación en el suelo de los residuos vegetales después de la cosecha. Doran (1980) reportó que algunos de los beneficios de la labranza de conservación son la presencia de poblaciones microbianas y actividad enzimática altas, en contraste con lo que ocurre con labranza convencional. Aunque las poblaciones de *Azospirillum* fueron en particular menores con labranza convencional en los suelos de Pabellón de Arteaga, localizado en la región semiárida del centro-norte de México, la presencia de miembros de este género puede deberse a la estrategia de supervivencia que presenta este grupo. Se ha reportado que *Azospirillum* tiene la capacidad de acumular gránulos de poli- β -hidroxibutirato (PHB), una carbohidrato de reserva, que las bacterias utilizan como fuente de energía cuando se enfrentan a condiciones ambientales adversas, como aridez y escasez de nutrimentos (Bashan *et al.*, 1995).

Existen factores que pueden influir en la presencia de *A. brasilense*. El porcentaje de arcilla, el contenido de materia orgánica, la capacidad de retención de agua y el contenido de nitrógeno afectan positivamente la supervivencia de *A. brasilense*; no obstante, la supervivencia de *A. brasilense* en la rizosfera es independiente de la aridez del suelo (Bashan *et al.*, 1995). Igualmente, el pH del suelo es determinante para la presencia de *Azospirillum*, así *A. brasilense* y *A. lipoferum* se encuentran en mayor abundancia en suelos con pH cercanos a la neutralidad. Aun cuando el pH de Villadiego fue de 5.56 con labranza convencional, *A. brasilense* se encontró en forma esporádica; no obstante, no se ha tenido éxito en su aislamiento en suelos con pH menor que 4.5 (New y Kennedy, 1989).

Aislamiento y Caracterización de *Azospirillum*

Con base en los criterios de Hartmann *et al.* (1988), las 30 accesiones se identificaron como *Azospirillum brasilense*. La actividad reductora de acetileno por accesión, sitio y sistema de labranza se muestra en la Figura 1 y en el Cuadro 4.

Las cepas de *A. brasilense* aisladas en Pabellón de Arteaga y Santa Isabel de Ajuno con labranza convencional presentaron la mayor actividad reductora de acetileno (35.39 y 31.61 nMol C_2H_2 h^{-1} mL^{-1} ,

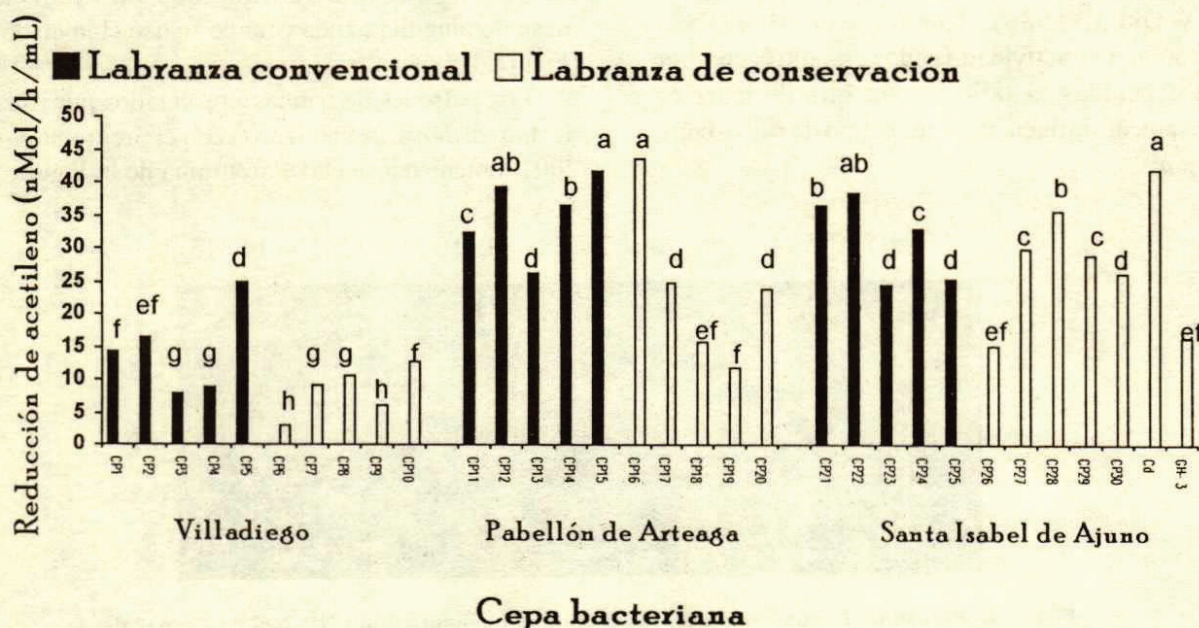


Figura 1. Actividad reductora de acetileno (ARA) de 30 accesiones de *Azospirillum brasilense* aisladas de tres localidades con dos sistemas de labranza. Cd = *A. brasilense* ATCC29729, GH-3 = *A. lipoferum*.

Cuadro 4. Fijación biológica de nitrógeno determinada como actividad reductora de acetileno (ARA) en accesiones de *Azospirillum brasilense* por localidad y por sistema de labranza.

Origen de la cepa	Sistema de labranza	ARA
		nMol C ₂ H ₂ /h/mL
Villadiego	Convencional	14.38 bc
Villadiego	Conservación	8.26 c
Pabellón de Arteaga	Convencional	35.39 a
Pabellón de Arteaga	Conservación	23.89 ab
Santa Isabel de	Convencional	31.61 a
Santa Isabel de	Conservación	27.32 ab
<i>A. brasilense</i> Cd	-	32.24 a

† Cifras con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0.05$).

respectivamente), que fue estadísticamente igual a la actividad de la cepa de referencia Cd (Cuadro 4).

Aunque las cepas aisladas en los mismos sitios, pero en parcelas con labranza de conservación, presentaron valores de ARA menores, ambos grupos resultaron estadísticamente iguales (Cuadro 4). Los valores de ARA de las cepas aisladas en Villadiego, con ambos sistemas de labranza, fueron los más bajos, lo que podría atribuirse a una baja difusión de O₂ debido a la compactación del suelo arcilloso característico de esta zona. La aerotaxis es una característica en especial importante para las células de *Azospirillum*, ya que, de esta forma, tiene acceso a las concentraciones óptimas de oxígeno que permiten la expresión de la actividad fijadora de nitrógeno (Reiner y Okón, 1986). Rennie *et al.* (1982) demostraron que la actividad fijadora de nitrógeno por bacterias asociadas al tallo y a la raíz de maíz es significativamente influenciada por el tipo de suelo, entre otros factores.

Mascarúa-Esparza *et al.* (1988) reportaron valores de ARA entre 11.96 y 59.83 nMol C₂H₂ h⁻¹ mL⁻¹ para cepas aisladas de cactáceas, los cuales son muy similares a los valores obtenidos en este estudio.

Determinación de la Diversidad Genética

El polimorfismo entre individuos se determina por la presencia o ausencia de fragmentos de ADN amplificados en geles de agarosa. Con el uso del oligonucleótido NP2, el grupo de 30 cepas de *A. brasilense*, así como la cepa de referencia Cd, presentaron cuatro bandas: 100, 250, 300 y 400 kb (Figuras 2, 3 y 4). Cada cepa de *Azospirillum* mostró un patrón que varió de 1 a 4 de las bandas de amplificación obtenidas con el oligonucleótido NP2.

Se ha reportado que el oligonucleótido NP2 funciona adecuadamente para *Azospirillum*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces rochei* y también para algunos eucariontes (Fani *et al.*, 1993).

Fani *et al.* (1993) reportaron que el patrón de bandas, obtenido en *Pseudomonas* spp., *Spirulina platensis* y *Rhizobium meliloti* con el iniciador NP2, no mostró bandas en común con el patrón de *Azospirillum*.

Con el empleo del iniciador 1253 (Fancelli *et al.*, 1998) no se observaron bandas en ninguna de las cepas de *A. brasilense*; no obstante, *A. lipoferum* GH-3 presentó un patrón de dos bandas (datos no mostrados). Resulta interesante resaltar que *A. lipoferum* no presentó ninguna banda cuando se usó el iniciador NP2 (Figura 4).

Los patrones de bandas presentados por cada cepa de *A. brasilense* se analizaron con el programa S-PLUS 2001, obteniéndose el dendrograma de la Figura 5.

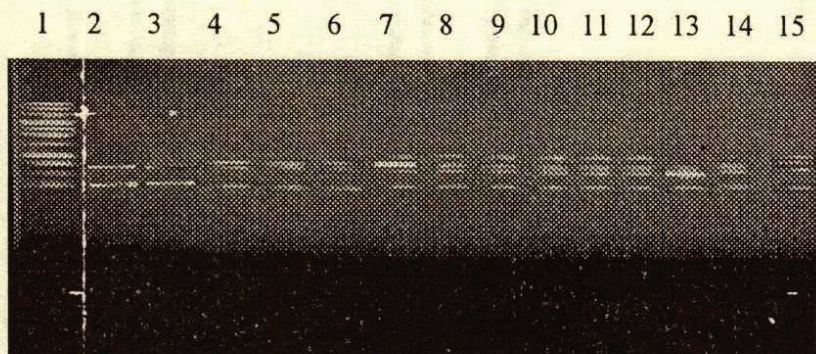


Figura 2. Patrón de bandas amplificadas usando el oligonucleótido NP 2 de 14 cepas de *Azospirillum brasilense*. Carril 1, marcador de peso molecular ADN 100 pb Ladder (1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 y 100 pb). Carriles 2 a 14, cepas CP1 a CP13; Carril 15, cepa de referencia *A. brasilense* Cd (ATCC29729).

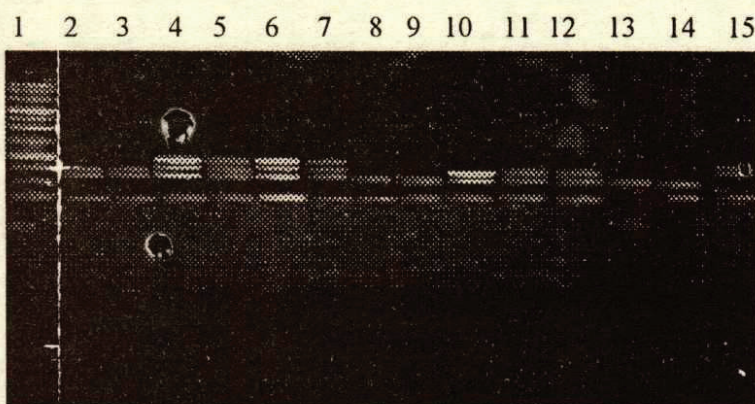


Figura 3. Patrón de bandas amplificadas usando el oligonucleótido NP 2 de 14 cepas de *Azospirillum brasilense*. Carril 1, marcador de peso molecular ADN 100 pb Ladder (1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 y 100 pb). Carriles 2 a 14, cepas CP14 a CP26; Carril 15, cepa de referencia *A. brasilense* Cd (ATCC29729).

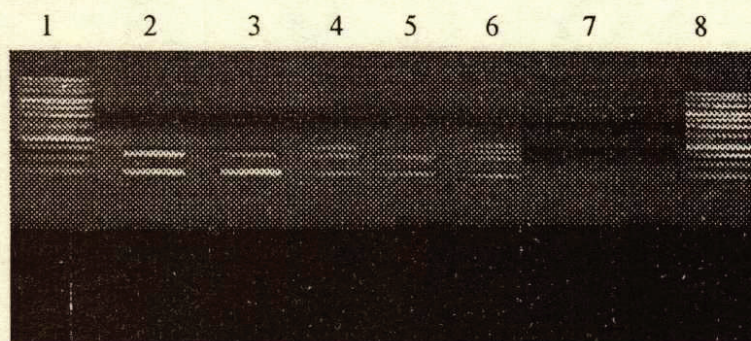


Figura 4. Patrón de bandas amplificadas usando el oligonucleótido NP 2 de 5 cepas de *Azospirillum brasilense*. Carril 1 y 8, marcadores de peso molecular ADN 100 pb Ladder (1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 y 100 pb). Carriles 2 a 5, cepas CP 27 a CP 30; Carril 6, cepa de referencia *A. brasilense* Cd (ATCC29729); y Carril 7, cepa *A. lipoferum* GH-3.

Se observó la presencia de tres grupos bien definidos, a una distancia genética de 0.25. El primer grupo estuvo formado por ocho cepas, dos provenientes de parcelas de Villadiego con labranza convencional, una de Pabellón de Arteaga con labranza de conservación, y cinco de Santa Isabel de Ajuno, cuatro aisladas de parcelas con labranza de conservación y una de parcelas con labranza convencional.

El segundo grupo estuvo constituido por 11 cepas, 10 provenientes de parcelas con labranza convencional de los tres sitios de muestreo, y una aislada de parcelas de Santa Isabel de Ajuno con labranza de conservación.

El tercer grupo estuvo formado por 10 cepas, cinco de Villadiego provenientes de parcelas con labranza de conservación y una de Pabellón de Arteaga de parcelas mantenidas con labranza de convencional; y cuatro con labranza de conservación de Pabellón de Arteaga. En

este mismo grupo quedó ubicada la cepa de referencia Cd, a una distancia genética de 0.25. La cepa CP25, aislada de parcelas de Santa Isabel de Ajuno con labranza convencional, quedó ubicada fuera de los tres grupos anteriores, pero igualmente a una distancia genética de 0.25.

Más de una cepa conformó alguno de los tres grupos, ya que las accesiones compartieron patrones similares de bandeo. Así, las accesiones de *A. brasilense* aisladas de las tres localidades fueron genéticamente iguales.

En el presente estudio, la diversidad genética de *A. brasilense* fue de 0.229, valor que resultó menor que el reportado por Caballero-Mellado *et al.* (1999) para cepas de la misma especie aisladas, tanto de rizosfera (0.311) e interior de tallos de caña de azúcar (0.479), como para bacterias endófitas (0.441) del maíz.

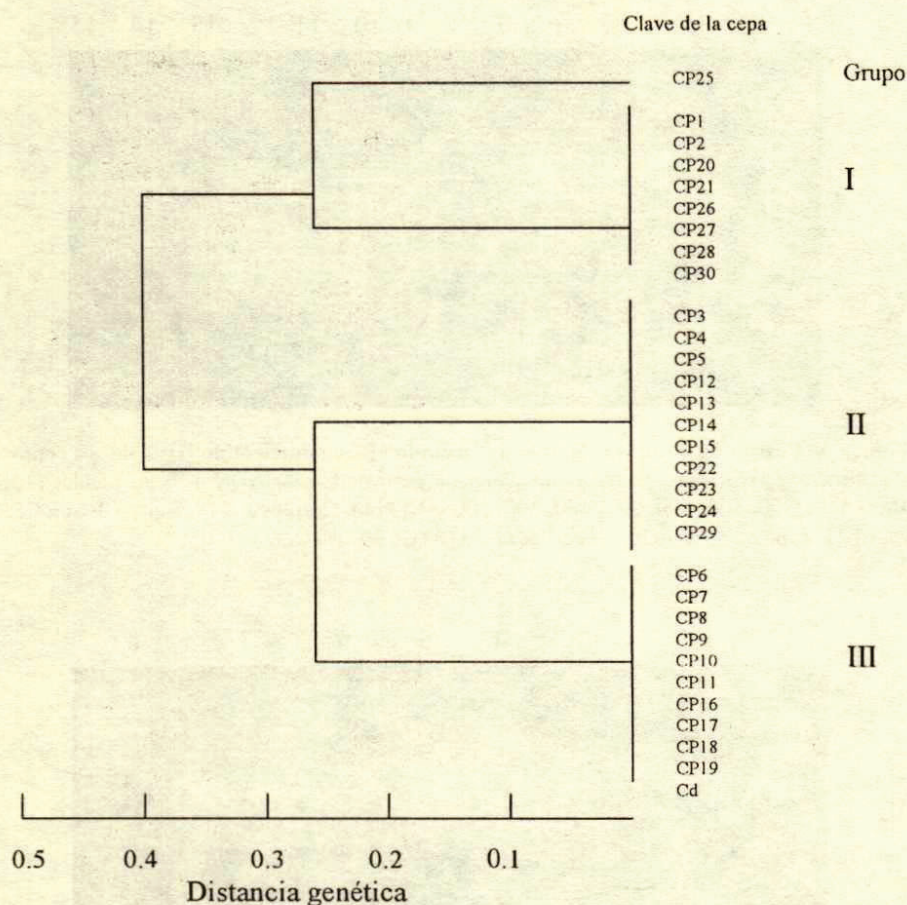


Figura 5. Dendrograma en el que se muestra la relación genética entre cepas de *Azospirillum brasilense* aisladas de 3 tres áreas edafoclimáticas con dos sistemas de labranza.

Aun cuando existen resultados que indican que la técnica de RAPDs muestra un alto grado de discriminación entre cepas, por ejemplo de *Bradyrhizobium japonicum* (Sikora *et al.*, 1997), en el presente estudio no se observó esta situación.

Los resultados del presente estudio muestran que el tipo de suelo y las condiciones edafoclimáticas no han modificado la estructura genética de la especie en estudio, por lo menos en las parcelas de los tres sitios evaluados. De igual modo, 13, nueve y ocho años de labranza de conservación en las parcelas de Villadiego, Pabellón de Arteaga y Santa Isabel de Ajuno, respectivamente, no han modificado genéticamente la población de *A. brasilense*, ya que cepas provenientes de parcelas con uno u otro sistema de labranza quedaron confinadas igualmente en alguno de los tres grupos genéticos obtenidos con el programa S-PLUS 2001.

Con la finalidad de confirmar la similitud de los 30 aislados estudiados, se llevará a cabo

la secuenciación de las cuatro bandas amplificadas, y se realizarán análisis de hibridación dentro de este grupo bacteriano. Para estudios futuros de diversidad genética de esta y otras especies, se ha considerado la inclusión de un mayor número de accesiones.

Finalmente, es importante notar que los estudios sobre diversidad genética son una valiosa herramienta para conocer la estructura de las comunidades microbianas, para hacer un uso más eficiente del recurso suelo y para evaluar el impacto de la actividad humana sobre las poblaciones microbianas, ya que la agricultura moderna con el uso intensivo de agroquímicos es una potencial modificadora de la diversidad microbiana del suelo.

CONCLUSIONES

- Los resultados indican que el tipo de suelo y las condiciones edafoclimáticas no han modificado

la estructura genética de *A. brasilense*, por lo menos en las parcelas de los tres sitios evaluados. Igualmente, 13, nueve y ocho años de labranza de conservación en las parcelas de Villadiego, Pabellón de Arteaga y Santa Isabel de Ajuno, respectivamente, no han influido en la modificación de la estructura genética de *A. brasilense*, desde que accesiones provenientes de los dos sistemas de labranza evaluados quedaron localizados igualmente en alguno de los tres grupos genéticos obtenidos con el programa S-PLUS 2001. Los sistemas de labranza, bajo los cuales ha estado sometida la especie en estudio, han modificado únicamente el número de unidades formadoras de colonias, que disminuyó en particular en las parcelas con labranza convencional.

- Como continuación de la presente investigación, se contemplan la secuenciación de las cuatro bandas amplificadas, estudios de hibridación dentro de este grupo bacteriano, así como la inclusión de un número mayor de accesiones en futuros estudios sobre diversidad genética de esta y otras especies.

LITERATURA CITADA

- Avise, J. C. 1994. Molecular markers, natural history and evolution. Chapman and Hall. New York, NY, USA.
- Baldani, J. I., L. Caruso, V. L. D. Baldani, S. R. Goi y J. Döbereiner. 1997. Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biol. Biochem.* 29: 911-922.
- Bashan, Y., M. E. Puente, M. N. Rodríguez-Mendoza, G. Toledo, G. Holguín, R. Ferrera-Cerrato y S. Pedrin. 1995. Survival of *Azospirillum brasilense* in the bulk soil and rhizosphere of 23 soil types. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1938-1945.
- Caballero-Mellado, J. y M. Valdés. 1983. Incidencia de *Azospirillum* en algunas gramíneas del trópico subhúmedo cálido de México. *Turrialba* 33: 83-88.
- Caballero-Mellado, J., L. López-Reyes y R. Bustillos-Cristales. 1999. Presence of 16S rRNA genes in multiple replicons in *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol.* 178: 283-288.
- Doran, J. W. 1980. Soil microbial and biochemical changes associates with reduce tillage. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 44: 765-771.
- Fancelli, S., M. Castaldini, M. T. Ceccherino, C. di Serio, R. Fani, E. Gallori, M. Marangolo, N. Miclaus y M. Bazzicalupo. 1998. Use of random amplified polymorphic DNA markers for the detection of *Azospirillum* strains in soil microcosms. *Appl. Microbiol. Biotech.* 49: 221-225.
- Fani, R., G. Damián, C. di Serio, E. Gallori, A. Grifoni y M. Bazzicalupo. 1993. Use of random amplified polymorphic DNA probes for microorganisms. *Molecular Ecol.* 2: 243-250.
- FAO-UNESCO-ISRIC. 1999. Base referencia mundial del recurso suelo. Roma, Italia.
- Figuroa-Sandoval, B. y F. F. Morales. 1992. Manual de producción de cultivos con labranza de conservación. Colegio de Postgraduados-Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Montecillo, estado de México.
- Hartmann, A., H. Fu, y H. R. Burris. 1988. Influence of the amino acids on nitrogen fixation ability and growth of *Azospirillum* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 87-93.
- Marschner, H. 1995. Mineral nutrients in higher plants. Academic Press. New York, NY, USA.
- Mascarúa-Esparza, M. A., G. R. Villa y J. Caballero-Mellado. 1988. Acetylene reduction and indoleacetic acid production by *Azospirillum* isolates from cetaceous plants. *Plant Soil* 106: 91-95.
- New, P. B. e I. R. Kennedy. 1989. Regional distribution and pH sensitivity of *Azospirillum* associated with wheat roots in Eastern Australia. *Microb. Ecol.* 17: 299-309.
- Okon, Y., E. Fallik, S. Sarig, E. Yahalom y S. Tal. 1988. Plant growth promoting effects of *Azospirillum*. pp. 741-746. *In: Bothe, H, F. J. de Bruijn y W. E. Newton (eds.) Nitrogen fixation: hundred years after.* Gustav Fischer Verlag. Stuttgart, Germany.
- Olalde-Portugal, V. y L. I. Aguilera-Gómez. 1998. Microorganismos y biodiversidad. *Terra* 16: 289-292.
- Reiner, O., y Y. Okon. 1986. Oxygen recognition in aerotactic behaviour of *Azospirillum brasilense* Cd. *Can. J. Microbiol.* 32: 829-834.
- Rennie, R. J., J. R. de Freitas, A. P. Ruscher y P. B. Vose. 1982. Isolation and identification of N₂-fixing bacteria associated with sugar cane (*Saccharum* sp.). *Can. J. Microbiol.* 28: 462-467.
- Rodríguez-Cáceres, E. A. 1982. Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 990-991.
- SAS Institute. 1988. SAS/STAT User's guide, Release 6.03. pp. 136-170. Cary, NC.
- Sikora, S., I. Redzepovic, I. Pejic y V. Kozumplik. 1997. Genetic diversity of *Bradyrhizobium japonicum* field population revealed by RAPD fingerprinting. *J. Appl. Microbiol.* 82: 527-531.
- Tapia, H. A., M. A. Mascarúa-Esparza y J. Caballero-Mellado. 1990. Production of bacteriocins and siderophore like activity by *Azospirillum brasilense*. *Microbios.* 64: 73-83.
- Tarrand, J. J., N. R. Krieg y J. Döbereiner. 1978. A taxonomic study of *Spirillum lipoferum* group with descriptions of a new genus *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* 24: 967-980.
- Valadez, M. E. y G. Kahl. 2000. Huellas de DNA en genomas de plantas. Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, estado de México.
- Valdés, M. 1990. Manual de prácticas de microbiología agrícola. Instituto Politécnico Nacional. México, D.F.
- Villarreal, A. A., Ch. L. Corlay, S. E. Robledo, H. M. Vargas y N. J. Pérez. 2000. Poblaciones microbianas del suelo en la conversión a labranza de conservación. pp. 429-438. *In: Quintero-Lizaola, R. et al. La edafología y sus perspectivas al siglo XXI.* Colegio de Postgraduados. Montecillo, estado de México.
- Waugh, R. y W. Powell. 1992. Using RAPD markers for crop improvement. *Trends Biotech.* 10: 186-190.
- Weir, B. S. 1996. Genetic Data Analysis II. Sinauer Associates. Sunderland, MA, USA.