

ESTUDIO COMPARATIVO DE *AGROBACTERIUM AZOTOPHILUM* Y *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* EN RELACIÓN A LA CAPACIDAD DE FIJACIÓN DE N_2 Y A SU PATOGENICIDAD EN VEGETALES

TOMÁS H. NORMAN, JAVIER TABOADA*
y TEÓFILO HERRERA

Departamento de Botánica, Instituto de
Biología, UNAM.

RESUMEN

Se hizo un estudio fisiológico comparativo de *Agrobacterium azotophilum* Ulloa y Herrera y *Agrobacterium tumefaciens* (Smith y Townsend) Conn, en relación a su capacidad para fijar nitrógeno del aire y a su acción patógena en vegetales.

Se estudió la reducción de acetileno a etileno, para investigar la posible capacidad de fijación de N_2 por parte de ambas bacterias. Se comprobó que sólo *A. azotophilum* lo fija individualmente y también en presencia de *A. tumefaciens*.

Para estudiar su posible acción patógena en vegetales, las dos bacterias fueron inoculadas en la base del tallo, individual y conjuntamente, en dos variedades de plantas de maíz (*Zea mays* L.) y en una variedad de jitomate *Lycopersicon esculentum* Mill.) para determinar si *A. azotophilum* era una bacteria patógena productora de agallas y tumoraciones y, al mismo tiempo, para saber si era capaz de estimular el crecimiento de las plantas de maíz, como consecuencia de su capacidad para fijar N_2 , que fue máxima cuando la bacteria se dejó crecer en masa de maíz.

Se encontró que *A. azotophilum* no es productora de agallas en ninguna de las variedades de plantas antes indicadas y que no ejerce estímulo alguno en el crecimiento de las mismas. Tampoco se observaron tumoraciones en las plantas de maíz infectadas con *A. tumefaciens*, lo que indica que son resistentes a esta bacteria. Se comprobó la formación de agallas en la base del tallo de las plantas de jitomate inoculadas con este mismo agente patógeno.

SUMMARY

A comparative physiological study was made of *Agrobacterium azotophilum* Ulloa & Herrera and *Agrobacterium tumefaciens* (Smith & Townsend) Conn, in relation to nitrogen fixing capacity and pathogenic action in plants.

Acetylene reduction was studied to find out the possible N_2 fixation capacity by both bacteria. It was found that only *A. azotophilum* fixes individually and also in the presence of *A. tumefaciens*.

For the study of the possible pathogenic action in plants, both bacteria were inoculated at the base of the stem, individually and mixed, in two varieties of corn plants (*Zea mays* L.) and in one variety of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) to know if *A. azotophilum* is a pathogenic crown gall producer bacterium and, at the same time, if it is capable to stimulate the growth of corn plants because of

* Instituto de Química, UNAM.

its N_2 fixation capacity which was best when the bacterium was growing in maize dough.

It was found that *A. azotophilum* is not a crown gall producer in any of the varieties of plants before mentioned, and that does not stimulate their growth. Neither of the corn plants infected with *A. tumefaciens* produced crown galls, which indicates that those plants are resistant to this species. On the contrary, as it is known, it produced crown galls in tomato plants.

INTRODUCCIÓN

Se ha puesto de manifiesto la necesidad de buscar, en forma apremiante, alimentos ricos en compuestos nitrogenados, especialmente proteínas, que puedan estar al alcance de numerosas poblaciones del mundo y, en particular, de la República Mexicana.

Las investigaciones de Cravioto *et al.* (1951, 1955), Massieu *et al.* (1959), Herrera y Ulloa (1970), Ulloa *et al.* (1971), Herrera *et al.* (1972), han motivado el interés del estudio sobre el valor nutritivo de los alimentos fermentados indígenas de México. En realidad, los alimentos fermentados son consumidos, en gran abundancia y de manera rutinaria, por varios cientos de millones de personas, tanto en países de América y África, como en China, Indonesia, Japón, India y Filipinas, entre otros. Por otra parte, los microorganismos que intervienen en la producción de dichos alimentos, podrían tener diversas aplicaciones en la industria, en la agricultura y en la medicina; o bien, sería conveniente que se les conociera en cuanto a su capacidad para provocar estados patológicos en las plantas, en los animales y en el hombre.

El registro como especie nueva de *Agrobacterium azotophilum* (Ulloa y Herrera, 1972), bacteria fijadora de nitrógeno aislada del pozol, que es la masa de maíz fermentada y consumida como alimento básico, por mucha gente del sur y sureste de México, despertó el interés de la presente investigación, en la que se trató de

hacer un estudio comparativo entre la especie mencionada, y otra del mismo género: *A. tumefaciens*, bien conocida por su patogenicidad en vegetales.

A. azotophilum es una bacteria que podría considerarse poco afín a las otras especies del mismo género, principalmente por su capacidad de fijar nitrógeno elemental y por no producir hipertrofia en tejidos vegetales. No obstante, estas características se presentan con gran amplitud y variación circunstancial en muy diversos géneros de bacterias.

Aunque aparentemente las dos especies estudiadas no tienen relación debido a que una fue aislada del pozol y la otra se desarrolla, por lo común, en diversas plantas, en las que produce estados patológicos de tipo tumoral, por una parte, la potencialidad ecológica de ambas puede ser mayor que la conocida y otra posibilidad es que las diversas especies de un mismo género tengan hábitats diferentes.

Por otra parte, aun cuando en una revisión taxonómica posterior se decida que *A. azotophilum* no corresponde al género *Agrobacterium* sino a algún otro género en el que se incluyen típicas bacterias libres fijadoras de nitrógeno, por ejemplo el género *Beijerinckia*, con el cual tiene semejanzas morfológicas y fisiológicas, la comparación de dos especies con características contrastantes por lo que respecta a la capacidad de fijación de nitrógeno elemental y a la patogenicidad en vegeta-

les, abre la puerta en la planeación de investigaciones que permitan obtener cepas de bacterias con características bené-

ficas para la agricultura y la industria, mediante el intercambio de los genes apropiados.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. Material biológico

1. Cepas de bacterias: 1) *Agrobacterium azotophilum* Ulloa y Herrera, adquirida del cultivo tipo (en atole de maíz al 20%) del Laboratorio de Micología y Fitopatología del Departamento de Botánica del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México. 2) *Agrobacterium tumefaciens* (Smith y Townsend) Conn, adquirida en forma liofilizada de la Colección Americana de Cultivos de Tipos (American Type Culture Collection): 12301 Parklawn Drive, Rockville Maryland, Estados Unidos de América.
2. Cultivos de plántulas y de plantas: *Zea mays* L. vars. H366 y H309. 2) *Lycopersicon esculentum* Mill. var. ACE. Ambos obtenidos mediante la siembra de semillas proporcionadas por la Productora Nacional de Semillas, dependiente de la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, México, D. F.

II. Medios de cultivo empleados

1. Extracto de malta agar (Malt extract agar, Difco).
2. Malta agar (Malt agar, Difco).
3. Caldo nutritivo (Nutrient broth, Difco).
4. Agar nutritivo (Nutrient agar, Difco).
5. Jugo de ocho verduras Campbell (V8) tanto líquido como sólido (en

este último caso su composición es: 15 g de Bacto agar, Difco, jugo de ocho verduras 300 ml, CaCO_3 4.5 g, agua destilada 1000 ml).

6. Atole de maíz al 10% (masa de maíz deshidratada marca Minsa 10 g, agua destilada 90 ml).
7. Medio 77 G de Fred y Waksman líquido (Allen, 1951; Ulloa *et al.*, 1971).
8. Medio 77 S líquido (Taboada *et al.*, 1971).
9. Medio 77M líquido (Taboada *et al.*, 1971).
10. Medio selectivo de Patel para el aislamiento de *A. tumefaciens* (taurocolato de sodio 3 g, peptona 10 g, agar 15 g, agua destilada 1000 ml).

III. Material para el estudio de cromatografía en fase de vapor

Cromatógrafo Aerograph Hy-F: modelo 600 D con detector de hidrógeno, acoplado a un registrador Leeds y Northrup modelo H.

IV. Métodos

1. La capacidad de reducción de acetileno por las cepas estudiadas se hizo siguiendo los mismos procedimientos descritos por otros autores (Taboada *et al.*, 1971).
2. El estudio comparativo de la patogenicidad de las cepas estudiadas se hizo empleando la metodología propuesta

por Klein y Tenenbaum (1955) y por Lippincot y Heberlein (1965), para la prueba del disco de la zanahoria, en la que también se investigó la presencia de taninos, según ha sido registrado para *A. tumefaciens* (Sylvester y Countryman, 1933).

Por otra parte, se hicieron inoculaciones de plántulas y de plantas jóvenes de maíz y jitomate, con las bacterias en estudio, siguiendo dos técnicas: 1) la de

escarificación con un bisturí estéril, para provocar una herida de 3 mm de longitud y profundidad variable en la base del tallo de cada una de las plantas usadas en el experimento, seguida por una aplicación, en dicha herida, de una pequeña porción de cultivo bacteriano obtenido en medio V8 agar. 2) el riego directo a las plantas heridas con una cantidad determinada de un cultivo de bacterias en jugo V8 líquido.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. De las dos cepas bacterianas aquí estudiadas, sólo los cultivos de *A. azotophilum* fueron capaces de reducir acetileno a etileno, tanto puros como mezclados con *A. tumefaciens*.

Esto indica, que la primera especie mencionada no es inhibida por la presencia de *A. tumefaciens* en su función fijadora de nitrógeno elemental. Por el contrario, la reducción de acetileno a etileno en los cultivos obtenidos de la mezcla de

las dos especies fue ligeramente mayor; no obstante que esta diferencia no es significativa (Figs. 1 y 2), es posible que estudios posteriores enfocados al aspecto cuantitativo de la fijación de nitrógeno en diversas condiciones, usando mezclas de estas bacterias, indiquen una interacción en su metabolismo, como se ha observado en cultivos mixtos de dos especies de bacterias fijadora de nitrógeno (Taboada *et al.*, 1975). También puede pensarse en la

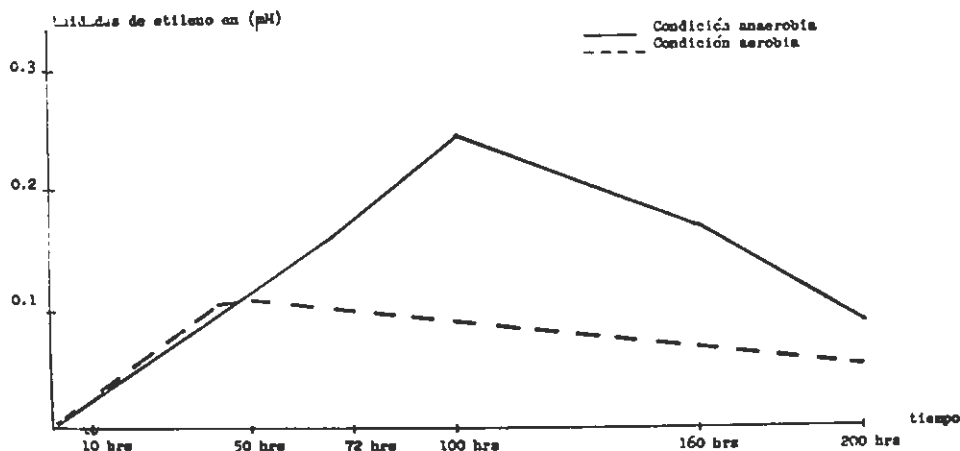


Fig. 1. Etileno acumulado durante la incubación de *A. azotophilum* en atole de masa de maíz en una atmósfera con acetileno.

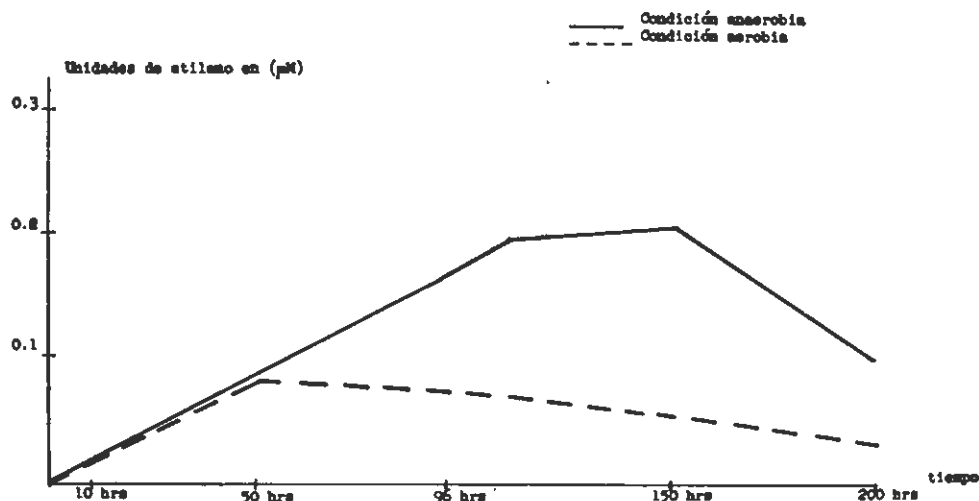


Fig. 2. Etileno acumulado durante la incubación de *A. azotophilum* con *A. tumefaciens* en atole de masa de maíz, en una atmósfera de acetileno.

posibilidad de transferir el gene responsable de la fijación de nitrógeno elemental, de *A. azotophilum* a *A. tumefaciens*, de manera que esta última especie, en vez de ocasionar perjuicios a las plantas que parasita se establezca en ellas en un equilibrio simbiótico como fijadora de nitrógeno. O bien, se podría transferir cierta capacidad patogénica de *A. tumefaciens* a *A. azotophilum* con la misma finalidad de establecer una relación simbiótica entre una bacteria fijadora de nitrógeno libre y determinadas plantas hospederas (Klein y Klein, 1953).

2. La reducción de acetileno a etileno por los cultivos de *A. azotophilum* y de *A. azotophilum* mezclado con *A. tumefaciens* fue óptima en atole de maíz al 10%, y en el medio 77 S de Fred y Waksman.

3. En todos los casos, la actividad del sistema de la nitrogenasa fue mayor en condiciones anaeróbicas que en condiciones aerobias, resultado que concuerda con el registrado por Pengra y Wilson (1958), Kalinskaya (1968), y Taboada *et al.*

(1975), para *Klebsiella pneumoniae* (Schroeter) Trevisan (= *Aerobacter aerogenes* (Kruse) Beijerinck, y para *A. azotophilum* por Taboada *et al.* (1971).

4. Los cultivos monoespecíficos y mixtos de *A. azotophilum* y *A. tumefaciens* no provocaron una inhibición o un incremento notorios en el crecimiento de las plántulas de maíz y de jitomate, cuando fueron adicionados al suelo, estéril o natural, donde se desarrollaron dichas plántulas.

Se pensó que, por la capacidad que tiene la primera especie mencionada para fijar nitrógeno atmosférico elemental, no sólo en masa de maíz sino también en tierra (Taboada *et al.* (1973), pudiera ejercer una acción favorable en el crecimiento de las plantas cultivadas. Esto quizá sea efectivo sólo en condiciones especiales de deficiencia de compuestos nitrogenados en el suelo de cultivo. Según esto, habría que hacer un estudio especial enfocado a conocer el posible papel de *A. azotophilum* como fertilizante. Por otra parte, *A. tumefaciens* parece ser indiferente, en cuanto

a su acción inhibitoria para el desarrollo de las plantas, mientras no ocasiona la formación de tumores (agallas o cecidias), en las mismas.

5. En discos de zanahoria y en plantas de jitomate, de 50 días de crecimiento y de una altura aproximada de 30 cm, sólo *A. tumefaciens* provocó la formación de tumores, tanto en cultivos monoespecíficos, como en cultivos mixtos de esta especie con *A. azotophilum*. En todos los casos se obtuvo el aislamiento de *A. tumefaciens* en el medio selectivo de Patel a partir de las agallas (Patel, 1928). Las bacterias así aisladas fueron reinoculadas en plantas de jitomate en las que se observó nuevamente la formación de agallas. A las agallas se agregó una solución de cloruro férrico al 10% para demostrar la presencia de taninos que son la causa de la coloración oscura que se presenta con el reactivo mencionado en las agallas producidas por *A. tumefaciens* (Klein y Klein, 1953). En plantas de maíz, así como en plántulas de maíz y de jitomate, no se obtuvo, en ningún caso, la formación de agallas.

Esto concuerda con los datos registrados en la bibliografía para *A. tumefaciens* (Hildebrand, 1942; Hohn, 1946; Edmond *et al.*, 1964). Por otra parte, en este trabajo se comprueba, por primera vez, que *A. azotophilum* no es patógeno para el maíz ni para el jitomate (al menos en las variedades aquí utilizadas). Otros autores ya han discutido la posible acción benéfica de esta bacteria, en la alimentación humana, al intervenir como fijadora de nitrógeno elemental, durante la fermentación de la masa de maíz llamada pozol, con el consecuente enriquecimiento de ésta en proteínas y en ciertas vitaminas (Herrera y Ulloa, 1970; Ulloa *et al.*, 1971; Taboada *et al.*, 1973).

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Dr. Miguel Ulloa Sosa por haber hecho la revisión del manuscrito. También se aprecia la ayuda recibida de la Dirección General de Sanidad Vegetal, en relación a las técnicas de inoculación de *A. tumefaciens*.

LITERATURA

- ALLEN, O. N. (1951). *Experiments in soil bacteriology*. Burgess. Minneapolis.
- CRIVIOTO, R. O., MASSIEU-H., G., GUZMÁN, J. CALVO DE LA TORRE, J. (1951). Composición de alimentos mexicanos. *Ciencia. Méx.* 11, 129-155.
- , CRAVIOTO, O. Y., MASSIEU-H., G. y GUZMÁN-G., J. (1955). "El pozol" forma indígena de consumir el maíz en el sureste de México y su aporte de nutrientes a la dieta. *Ciencia, Méx.* 15, 27-30.
- EDMOND, B., SENN, L. y ANDREWS, S. (1964). *Fundamentals of Horticulture*. McGraw-Hill, Nueva York.
- HERRERA, T. y ULLOA, M. (1970). Aspectos generales sobre la microbiología del pozol. *Rev. lat-amer. Microbiol.* 12, 103-108.
- , TABOADA, J. y ULLOA, M. (1972). Fijación de nitrógeno en el tesguino y el pulque. *An. Inst. Biol. Univ. Nal. Autón. México* 43. Ser. Biol. Exp. (1), 77-78.
- HILDEBRAND, E. M. (1942). A micurgical study of crown gall infection in tomato. *Jour. Agric. Res.* 65, 45-69.
- HOHN, K. (1955). Pflanzliche Krebsdisposition, Wuchsstoffspiegel und Blühwilligkeit. *Die Naturwissenschaften* 42, 373-374.
- KALINSKAYA, T. A. (1968). A study of *Bacillus polymyxa* strains isolated from nitrogen fixing microbial associations. *Mikrobiologika* 37, 1086-1090.
- KLEIN, D. T. y KLEIN, R. M. (1953). Transmittance of tumor-inducing ability to aviru-

- lent crown-gall and related bacteria. J. Bact. 66, 220-228.
- KLEIN, R. M. y TENENBAUM, I. D. (1955). A quantitative bioassay for crown-gall tumor formation. Amer. Jour. Bot. 42, 709-712.
- LIPPINCOTT, J. A. y HEBERLEIN, G. T. (1965). The quantitative determination of the infectivity of *Agrobacterium tumefaciens*. Amer. J. Bot. 52, 856-863.
- MASSIEU-H., G., CRAVIOTO, R. O., GUZMÁN-G., J. y OLIVEIRA-B., H. (1959). Contribución adicional al estudio de la composición de alimentos mexicanos. Ciencia, Méx. 19, 53-66.
- PATEL, M. K. (1928). A study of pathogenic and non-pathogenic strains of *Pseudomonas tumefaciens* Sm. and Town. Phytopathology 18, 331-343.
- PENGR, R. M. y WILSON, P. W. (1958) Physiology of nitrogen fixation by *Aerobacter aerogenes*. J. Bact. 75, 71-25.
- SYLWESTER, E. P. y COUNTRYMAN, M. C. (1933). A comparative histological study of crown-gall and wound callus on apple. Amer. J. Bot. 20, 328-340.
- TABOADA, J., HERRERA, T. y ULLOA, M. (1971). Prueba de la reducción del acetileno para la determinación de microorganismos fijadores de nitrógeno aislados del pozol. Rev. lat-amer. Quím. 3, 188-190.
- , ULLOA, M. y HERRERA, T. (1973). Fijación de nitrógeno *in vitro* por *Agrobacterium azotophilum* en diversos sustratos, principalmente tierra y derivados de la industria azucarera. Rev. lat-amer. Microbiol. 15, 143-146.
- , SALINAS, C., ULLOA, M. y HERRERA, T. (1975). Fijación de nitrógeno en cultivos monoespecíficos y mixtos de *Aerobacter aerogenes* y *Agrobacterium azotophilum* usando distintas fuentes de carbono. Rev. lat-amer. Microbiol. 17, 157-159.
- ULLOA, M., HERRERA, T. y DE LA LANZA, G. (1971). Fijación de nitrógeno atmosférico por microorganismos del pozol. Rev. lat-amer. Microbiol. 13, 113-124.
- y HERRERA, T. (1972) Descripción de dos especies de bacterias aisladas del pozol. *Agrobacterium azotophilum* y *Achromobacter pozolis*. Rev. lat-amer. Microbiol. 14, 15-24.