

Azospirillum una rizobacteria con uso potencial en la agricultura

Manuel Méndez Gómez, Elda Castro Mercado, Ernesto García Pineda✉

Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edif. A1', Ciudad Universitaria, Morelia, Michoacán, CP 58040, México.

Resumen

El género *Azospirillum* pertenece al grupo de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. Esta capacidad ha sido atribuida principalmente a la fijación del nitrógeno y producción de fitohormonas. Estas bacterias producen ácido indol-3-acético (AIA), un tipo de auxinas que inducen cambios morfológicos en el sistema radical de las plantas, y además pueden actuar como moléculas de señalización en la interacción planta-bacteria. Sus efectos sobre el crecimiento vegetal han permitido que se utilicen en la formulación de biofertilizantes como una alternativa en la agricultura. Sin embargo, muchos aspectos bioquímicos sobre la interacción de esta bacteria con las plantas son aún desconocidos. Aquí se resumen algunas vías por el cual esta bacteria promueve el crecimiento vegetal así como su importancia en la agricultura.

Palabras clave: *Azospirillum*, rizobacterias, fitohormonas, estrés, biofertilizante.

Abstrac

The genus *Azospirillum* belongs to group of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). These capacities have been attributed to the nitrogen fixation and production of phytohormones. These bacteria produce indole-3-acetic acid (AIA), an auxin that induces morphologic changes in plants root system and besides can act as signaling molecule in bacterium-plant interaction. Their effects on plant growth allowed the formulation of biofertilizers as an alternative in the agriculture. However many biochemical aspects about interaction of these bacterium with plant are still unknown. Here summarized some pathways whereby this bacterium promotes plant growth as well as their relevance in the agriculture.

Key words: *Azospirillum*, rhizobacteria, phytohormones, stress, biofertilizers.

Introducción

El suelo, es el hábitat de una gran variedad de microorganismos. Las plantas alojan en su sistema radical una gran variedad de estos microorganismos interactuando con ellas de manera positiva o negativa. Los grupos dominantes son los hongos, las bacterias y los nematodos (Manoharachary y Mukerji, 2006). La mayoría de estas interacciones se realizan en una zona conocida como rizósfera, un centro de actividades físicas, químicas y biológicas con apenas 1 mm de espesor, que rodea la arquitectura viva del sistema radical de una planta y que es influenciado por los exudados de la raíz (Cardon y Whitbeck, 2007).

A las bacterias que encontramos en esta zona de interacción y que influyen positivamente en el crecimiento de las plantas se les denomina Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR, por sus siglas en ingles). Estas bacterias favorecen el crecimiento de las plantas a través de diferentes mecanismos, que incluyen la secreción de fitohormonas, suplemento de macro y micro elementos, la fijación biológica del nitrógeno (diazotrofos), la solubilización del fosforo, entre otros (Spaepen *et al.*, 2009). También benefician a la planta a través de efectos indirectos, principalmente asociados con la reducción del daño causado por patógenos, funcionando como agentes de control biológico porque pueden actuar directamente sobre el patógeno o inducir la resistencia sistémica en la planta (Van Loon, 2007; Weller, 2007) (Fig. 1). Las PGPR más conocidas pertenecen a géneros bacterianos que incluyen a *Rhizobium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* y *Azospirillum* (de Zelicourt *et al.*, 2013). Estas bacterias pueden estimular el crecimiento de varios

cultivos importantes, tanto en condiciones de invernadero como de campo, bajo varias condiciones climáticas y de suelo (Bashan *et al.*, 2004).

Importancia económica

El interés en el uso de inoculantes que contienen bacterias que promueven el crecimiento de la planta está en incremento debido al alto costo de los fertilizantes, y a la promoción de una agricultura sustentable. En los últimos años, en todo el mundo,

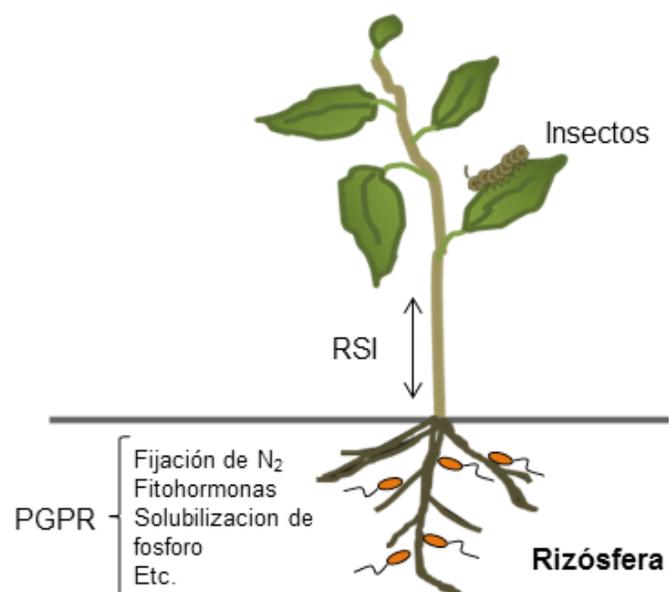


Figura 1. Interacción planta-rizobacteria. RSI, resistencia sistémica inducida; PGPR, rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal.

✉ Autor de correspondencia: D. C. Ernesto García Pineda, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Edif A1', Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México. Email: egpineda@umich.mx

principalmente en Latinoamérica, inoculantes comerciales como el Nitragin, Nitrasoil, Rizobacter en Argentina, ASIA-Biofabrica Siglo XXI en México, así como instituciones de investigación como agrícola-INTA en Argentina, EMBRAPA en Brasil, RENARE-MGAP en Uruguay e INIFAP en México, entre otras, han desarrollado y probado inoculantes comerciales que contienen PGPR, comúnmente conocidos como biofertilizantes (Helman *et al.*, 2011). A diferencia de los fertilizantes químicos que tienen un gran impacto en el medio ambiente, los biofertilizantes son de muy bajo costo, no dañan al medio ambiente y son fáciles de encontrar.

Azospirillum es una de las PGPR mejor estudiadas y es la más ampliamente usada a escala comercial, incrementando de manera significativa la producción de diferentes cultivos de importancia económica. Se ha reportado que los biofertilizantes que contienen esta rizobacteria incrementan en un 9 % aproximadamente la producción de semillas y en un 18% el peso seco de la planta de trigo (Veresoglou y Meneses, 2010). Además, incrementan el rendimiento entre un 5 y 30% en maíz, trigo, sorgo, arroz y leguminosas (Dobbelaere *et al.*, 2001; Diaz-zorita *et al.* 2009; Hungria *et al.*, 2010). De esta manera, la inoculación de cultivos con biofertilizantes puede reducir hasta en un 20 a 50% la aplicación de fertilizantes a base de nitrógeno (Helman *et al.*, 2011). Debido a su uso potencial como biofertilizantes, su aplicación en el campo está en incremento. Tan solo en 2006, México aplicó inoculantes comerciales en 200 000 ha aproximadamente, mientras que Brasil los aplicó a un millón de ha de cultivo aproximadamente (Helman *et al.*, 2011).

Además, biofertilizantes a base de hongos con capacidad de promover el crecimiento vegetal, conocidos como micorrizas, se están empleando junto con *A. brasilense* para tener un mayor efecto en la agricultura. La inoculación de plantas de arroz con *Glomus intraradices* junto con *A. brasilense* mejora el crecimiento de estas plantas bajo condiciones de estrés hídrico. Este incremento fue superior a las inoculadas solamente con *Glomus intraradices* o *A. brasilense* (Ruíz-Sánchez *et al.*, 2011). Recientemente, la triple inoculación de *Eleusine coracana* Gaertn. con *Glomus fasciculatum*, *Azospirillum brasilense* y *Bacillus polymyxa*, mostró claramente un incremento en el crecimiento y consumo de nutrientes de esta planta (Patil *et al.*, 2013). La co-inoculación del género bacteriano *Rhizobium* con *Azospirillum* tiene un mayor efecto en el crecimiento de leguminosas. En esta co-inoculación, *Azospirillum* induce la producción de flavonoides en la raíz de frijol, los que a su vez inducen la expresión genes Nod en *Rhizobium*, mejorando la asociación con la planta (Burdman *et al.*, 1996), la formación de nódulos y la concentración de N₂ (Benintende *et al.*, 2010). Se ha observado un efecto positivo sobre la expresión de genes nod durante la co-inoculación *Azospirillum-Rhizobium* bajo condiciones de estrés salino (Dardanelli *et al.*, 2008). También otras rizobacterias como *Pseudomonas*, *Gluconacetobacter* y *Herbaspirillum*, están siendo analizadas como bioinoculantes. (Rosas *et al.* 2009; Reis *et al.* 2007; Rothballer *et al.* 2009).

Finalmente, estudios más detallados sobre la fisiología de *Azospirillum* que le permitan adaptarse a condiciones adversas daría la pauta para la generación de nuevos bioinoculantes.

El género *Azospirillum*

En particular, el género *Azospirillum* se ha investigado a profundidad por su capacidad promotora del crecimiento vegetal y se ha convertido en un excelente modelo para estudiar la interacción planta-microorganismo. Estas investigaciones han derivado en la fabricación de inoculantes con cepas de *Azospirillum* usadas a escala comercial (Helman *et al.*, 2011). Sin embargo, aún falta mucho por conocer sobre el mecanismo molecular por el cual esta bacteria interactúa con las plantas.

El género *Azospirillum* fue inicialmente estudiado por su capacidad para fijar el nitrógeno. En la actualidad se han descrito 12 especies del género *Azospirillum*: *A. lipoferum* y *A. brasilense* (Tarrand *et al.*, 1978), *A. amazonense* (Magalhães *et al.*, 1983), *A. halopraeferens* (Reinhold *et al.*, 1987), *A. irakense* (Khammas *et al.*, 1989), *A. largimobile* (Ben Dekhil *et al.*, 1997), *A. doebereineriae* (Eckert *et al.*, 2001), *A. oryzae* (Xie y Yokota, 2005), *A. melinis* (Peng *et al.*, 2006), *A. canadense* y *A. zea* (Mehnaz, 2007) y *A. rugosum* (Young *et al.*, 2008). La mayoría de estas especies se han aislado de raíces de plantas silvestres y cultivadas, y de suelos de regiones templadas, subtropicales y tropicales de todo el mundo (Gunarto *et al.*, 1999). Las dos primeras en ser descritas y las más estudiadas son *A. lipoferum* y *A. brasilense*.

Azospirillum pertenece a la subclase α -proteobacteria, que alberga un gran número de bacterias simbiotas asociadas a plantas, y ha sido aislada colonizando la rizósfera de gramíneas, particularmente de cultivos de importancia económica tales como el maíz, el trigo y el arroz, desde climas tropicales hasta templados (Patriquin *et al.*, 1983).

El efecto característico en plantas inoculadas con *Azospirillum* es el incremento en la longitud y número de raíces laterales, un mayor número de pelos radicales, incremento en el peso seco de la raíz, y en la respiración celular, entre otros (Hadas y Okon, 1987). El mecanismo exacto para promover el crecimiento aun es desconocido, pero ha sido atribuido a su capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico, no obstante, estudios extensos sobre la fijación de nitrógeno en condiciones de campo e invernadero indican que este mecanismo no juega un papel importante en la promoción del crecimiento de las plantas (Spaepen *et al.*, 2009).

Por otro lado, *Azospirillum* es capaz de producir y excretar reguladores de crecimiento vegetal (fitohormonas) tales como las auxinas, citocinas, y giberelinas (Tien *et al.*, 1979; Spaepen *et al.*, 2009; Molina-Favero *et al.*, 2008), que son muy importantes para el desarrollo de la planta.

Colonización del sistema radical por *Azospirillum*

La planta secreta hacia la rizósfera exudados que atraen a muchos microorganismos, como las rizobacterias. La movilidad y la quimiotaxis de estas bacterias permiten que se muevan hacia la raíz, donde se benefician de los exudados como fuente de carbono y a su vez benefician el crecimiento de la planta. El establecimiento de *Azospirillum* en la raíz de la planta es una etapa crítica para promover el crecimiento vegetal, y además depende del genotipo de ambos actores. Coloniza la superficie de la raíz, el interior y el exterior del cortex (Patriquin *et al.*, 1983) a través de pelos radicales, de los espacios vacíos creados por la descamación epitelial o por la zona de emergencia de raíces laterales (Umali-

García *et al.*, 1980). Por ejemplo, *A. brasilense* Sp245 coloniza el interior de los pelos radicales de plantas de trigo, mientras que la cepa Sp7 se ubica principalmente en la superficie de la raíz (Van de Broek *et al.*, 1993).

La secuenciación reciente del genoma de *Azospirillum* demuestra que este género codifica un número sustancial de glicosil hidrolasas, enzimas que son esenciales para descomponer la pared celular de la planta. El número de celulasas y hemicelulasas de este género es comparable al encontrado en bacterias que tienen la capacidad de degradar la pared celular, y muchas de estas se cree que fueron adquiridas horizontalmente (Wisniewski-Dye *et al.*, 2011), sugiriendo que *Azospirillum* puede colonizar el interior de la raíz a través de la degradación de componentes de la pared celular de la raíz.

Efectos de *Azospirillum* sobre las plantas

La inoculación de plantas con *Azospirillum* induce cambios significativos en varios parámetros de crecimiento, tales como la aceleración de la germinación, aumento de la biomasa aérea de la planta (Canto *et al.*, 2004; Saubidet, 2002) (Fig. 2), aumento del peso seco de raíz, incremento en la velocidad de respiración de la raíz, desarrollo del sistema radical como las raíces laterales, pelos radicales y diámetro de la raíz (Hadas y Okon, 1987; Jain y Patriquin, 1984) (Fig. 3).

Estos efectos observados en las plantas son dependientes de la concentración del inoculo, ya que plantas inoculadas con altas concentraciones (1×10^9 UFC) causan una inhibición significativa en la longitud del sistema radical sin afectar el desarrollo de raíces laterales y pelos radicales (Kapulnik *et al.*, 1985; Hadas y Okon, 1987). Los efectos descritos en el crecimiento de la raíz resultan en un incremento del consumo de agua y nutrientes del suelo. Estos correlacionan con un mejor rendimiento de las partes aéreas de la planta. Así mismo estos resultados se han observado bajo condiciones de laboratorio y de campo en varios cultivos de importancia como el maíz y el trigo. Además de inducir cambios en la morfología de la planta, estas bacterias también afectan el contenido de proteínas, metabolitos secundarios y la inducción de resistencia a patógenos (Cangahuala-Inocente *et al.*, 2013; Chamam *et al.*, 2013).

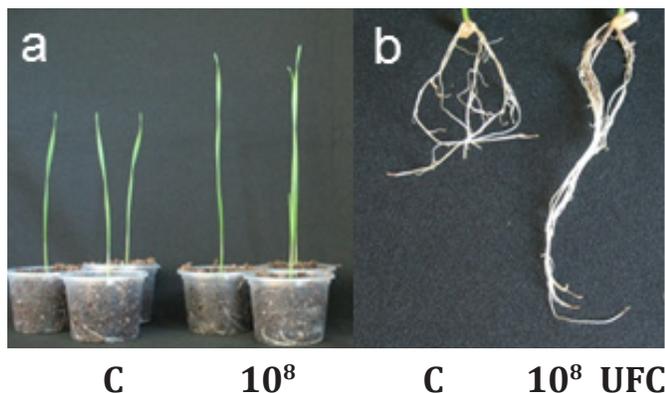


Figura 2. Plántulas de trigo inoculadas con *A. brasilense* Sp245. a) follaje. b) raíz. C, control; UFC, unidades formadoras de colonias (datos personales).

Fijación de nitrógeno

El nitrógeno es un elemento esencial en el desarrollo de las plantas y un factor limitante para su crecimiento. No obstante, las plantas no pueden asimilar directamente el gas nitrógeno, por lo tanto las plantas absorben el nitrógeno disponible en el suelo a través de sus raíces en forma de amonio y nitratos. Solo algunas procariontas son capaces de usar el N_2 a través de un proceso llamado fijación biológica de nitrógeno, que es la conversión del N_2 atmosférico, a una forma que puedan usar las plantas.

El género *Azospirillum* posee la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico tanto como bacteria de vida libre como en asociación con la planta. Sin embargo *Azospirillum* fija nitrógeno solo bajo condiciones microaeróbicas de 0.2 kPa de oxígeno aproximadamente, aunque esta concentración varía entre cepas y especies (Hartmann y Baldani, 2006). Por lo tanto, en la mayoría de los cultivos bajo diferentes condiciones, la contribución en la fijación del nitrógeno por *Azospirillum* se ha estimado en no más de 10 kg de N_2 por hectárea por año, mientras que la fertilización del maíz en la agricultura moderna está en el orden de 200-300 kg de N_2 por hectárea. De acuerdo con este dato, parece que la contribución de la fijación biológica de nitrógeno por *A. brasilense* es baja para los cultivos y que no juega un papel muy importante en la promoción del crecimiento vegetal (Helman *et al.*, 2011).

Producción de fitohormonas

Los cambios morfológicos ocurridos en la planta después de la inoculación con *Azospirillum* se le atribuyen a la producción de sustancias que estimulan el crecimiento vegetal, tales como las auxinas, citoquininas o citocinas, giberelinas, ácido absísico y etileno.

El AIA es la principal auxina en las plantas y controla procesos fisiológicos que incluyen, alargamiento, división celular y diferenciación de tejidos, modificando así diferentes órganos de las plantas, como el sistema radical (Taiz y Zeiger, 2002; Overvoorde *et al.*, 2010). El papel central del AIA que produce *Azospirillum* se ha demostrado usando una cepa mutante que

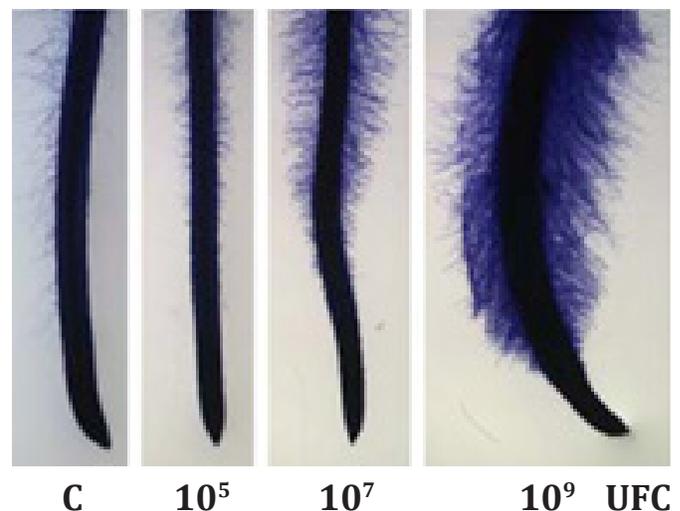


Figura 3. Efecto de *A. brasilense* sobre el desarrollo de la raíz. C, control; UFC, unidades formadoras de colonias. (Tomado de Spaepen *et al.*, 2008).

produce solo el 10% del AIA comparado con la cepa silvestre, y que reduce el efecto estimulador en el crecimiento vegetal (Dobbelaere et al., 1999).

Análisis bioquímicos y genéticos en *A. brasilense* revelaron múltiples vías para la biosíntesis del AIA (Prinsen et al., 1993; Spaepen et al., 2007). La vía indol-3-piruvato dependiente del triptófano se ha descrito en numerosas bacterias tales como la fitopatógena *P. agglomerans*, las benéficas *Bradyrhizobium*, *Azospirillum*, *Rhizobium* y *Enterobacter cloacae*, y cianobacterias (Spaepen et al., 2007). La enzima clave de esta vía es la indol-3-piruvato descarboxilasa (codificada por el gen *ipdC*) (Van de Broek et al., 1999). En *A. brasilense* también se ha descrito una vía independiente de triptófano, esta vía es predominante cuando no se adiciona triptófano al medio de cultivo (Prinsen et al., 1993), sin embargo no se han identificado las enzimas involucradas en esta vía (Fig. 4).

Si bien la producción de AIA en *Azospirillum* es la más documentada de todas las hormonas que promueven el crecimiento vegetal, no existe una evidencia directa de la participación de esta hormona como el principal mecanismo por el que la bacteria promueve el crecimiento de las plantas. Por lo tanto, la promoción del crecimiento puede ser el resultado de múltiples interacciones de mecanismos como la producción de

fitohormonas, la fijación de nitrógeno, entre otros.

Muchas cepas de *Azospirillum* tienen la capacidad de producir otros reguladores de crecimiento (giberelinas, citocinas, ácido absísico y etileno) a una concentración suficiente para provocar cambios morfológicos y fisiológicos en las plantas. Las giberelinas (GA, gibberellic acid) son hormonas que controlan el crecimiento y una gran variedad de procesos de desarrollo similares a las auxinas. Estos reguladores de crecimiento promueven la división, la elongación celular y germinación y son además sintetizadas por las plantas, hongos y otras bacterias. El efecto de promoción de crecimiento vegetal por *Azospirillum* parece ser parcialmente debido a la producción de giberelinas, como ocurre con otras PGPR (Bottini et al., 2004).

En este sentido se ha demostrado la producción de los precursores inmediatos GA9 y GA19 en *A. lipoferum* (Piccoli y Bottini, 1996). Cuando una cepa de *A. lipoferum* que produce GA fue cultivada en presencia de glucosil ester o glucósido de GA A₂₀, ambos conjugados fueron hidrolizados. Estos resultados *in vitro* apoyan la hipótesis de que la promoción del crecimiento vegetal inducido por *Azospirillum* podría deberse a una producción combinada de GA tanto por la bacteria como por la planta (Piccoli et al., 1997). Aunque con estos resultados se demuestra la capacidad del género *Azospirillum* de producir

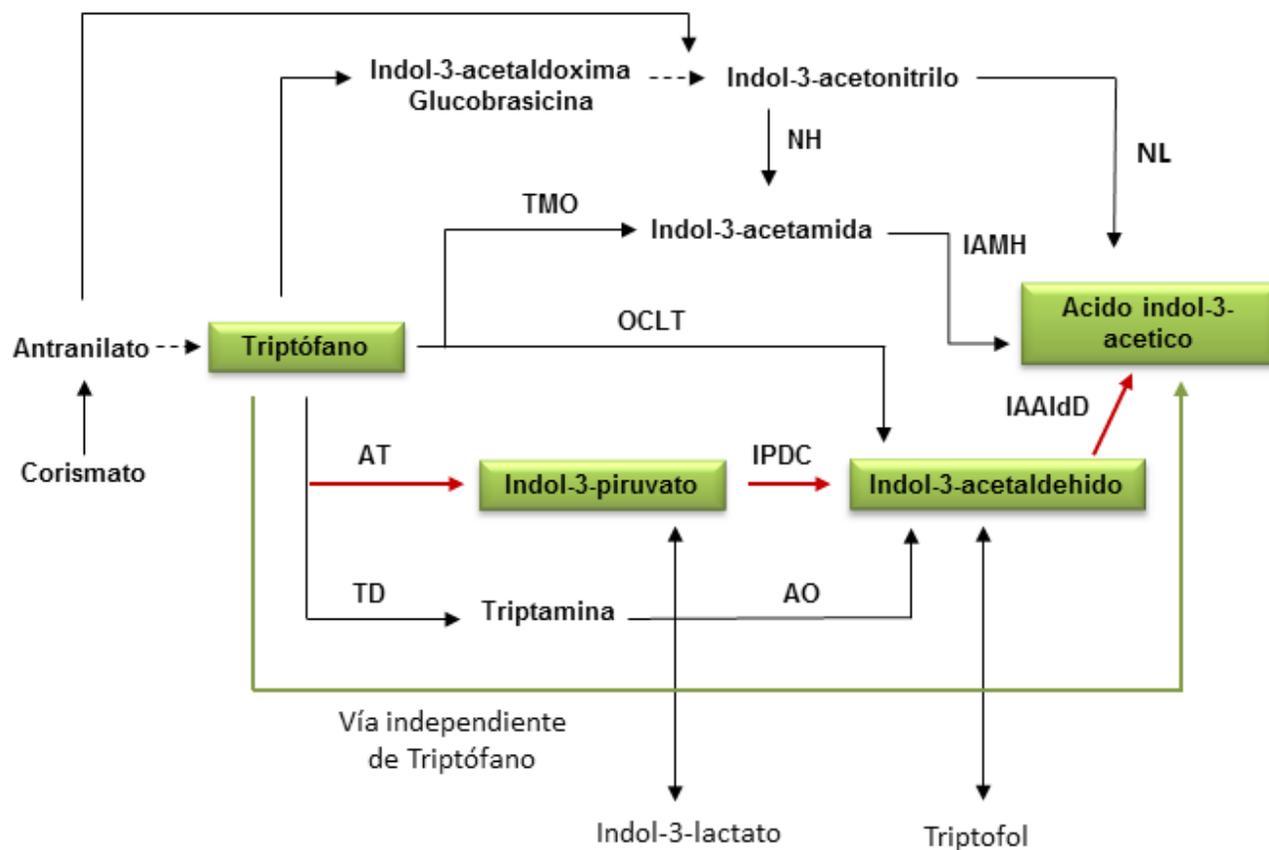


Figura 4. Diferentes vías para la síntesis de AIA en bacterias. TMO, Triptófano oxigenasa; NH, Nitrilo hidratasa; IAMH, Indol-3-acetamida hidrolasa; AT, Amino transferasa; OCLT, Oxidasa de la cadena lateral del triptófano AO, Amino oxidasa; IPDC, Indol-3-piruvato descarboxilasa; IAAIdD, Indol-3-acetaldehído deshidrogenasa; TD, Triptófano descarboxilasa; NL, Nitrilasa. Las flechas rojas y verdes señalan las vías encontrados en *Azospirillum*. Modificado de Spaepen et al., 2007.

GA, aún falta por conocer el efecto que tiene esta hormona en la promoción del crecimiento vegetal y su relación con las demás hormonas.

Otra de las hormonas de interés es el ácido absísico (ABA), esta molécula juega un papel muy importante en las plantas; los niveles de ABA se incrementan cuando las plantas están en estrés abiótico, como el estrés hídrico, por luz, por salinidad, o por herida. Esta molécula es considerada una molécula de estrés y también es importante en condiciones de desarrollo normal de las plantas. En estudios previos se ha reportado que la inoculación con *A. lipoferum* revierte el efecto de fluoridona que afecta la síntesis del ABA en plántulas de maíz, sugiriendo que esta bacteria puede producir este tipo de hormona (Cohen *et al.*, 2001).

Más recientemente se demostró que *A. brasilense* Sp245 produce ABA en medio de cultivo y que esta producción se incrementa cuando el NaCl (100 mM) es incorporado al medio de cultivo (Cohen *et al.*, 2007). En este mismo trabajo, la inoculación de *A. thaliana* con *A. brasilense* Sp245 incrementa dos veces la cantidad de ABA en la planta (Cohen *et al.*, 2007). Estos resultados evidencian que este género poseen la maquinaria para la síntesis de ABA y también pueden explicar los efectos benéficos de *Azospirillum* en plantas bajo condiciones de estrés.

Las citocininas son una clase de fitohormonas tipo purina que promueven la división celular y la morfogénesis de la raíz. La mayoría de los microorganismos rizosféricos son capaces de sintetizar citocininas en cultivos. Sin embargo, son escasos los estudios sobre la síntesis de esta molécula en *Azospirillum*. Esto abre un nuevo campo de investigación para conocer como estas bacterias pueden producir moléculas tipo citocininas y como estas moléculas pueden afectar la arquitectura del sistema radical de las plantas. Igualmente sería de gran interés conocer cómo interactúan con las demás fitohormonas para promover el crecimiento vegetal.

El etileno es una fitohormona que regula varios procesos fisiológicos como la senescencia y la latencia de semillas; es producido por plantas superiores y algunos microorganismos. La enzima clave para la síntesis de esta molécula es la 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico desaminasa (ACC-desaminasa), encontrada en plantas y rizobacterias con capacidad de degradar ACC. A pesar de que *Azospirillum* promueve el crecimiento vegetal, no poseen ACC-desaminasa, por lo que no podría producir etileno. En un reporte de Strzelczyk *et al.* (1994), donde analizaron la capacidad de este género para producir esta molécula, y encontraron que si puede sintetizar etileno bajo diferentes fuentes de carbono y en presencia de metionina en el medio.

En otro estudio, el efecto de la aplicación exógena de etileno a la planta fue similar al efecto de la inoculación, y la aplicación de inhibidores de la actividad o síntesis del etileno bloquea completamente la promoción del crecimiento vegetal inducido por *A. brasilense* (Ribauda *et al.*, 2006). Aunque no haya un estudio concreto sobre la síntesis de etileno por *Azospirillum*, no se descarta la posibilidad de que la promoción de crecimiento vegetal sea también por etileno, junto con las demás fitohormonas. No obstante, puede ser que la contribución de esta molécula en la planta sea mucho menor que las demás hormonas.

Por otro lado, se ha reportado la producción del óxido nítrico (ON) por *A. brasilense* Sp245 (Creus *et al.*, 2005). El ON es un radical libre lipofílico y volátil que participa en varios procesos, como en vías metabólicas, de señalización, de defensa y de desarrollo en plantas. En bacterias, esta molécula puede ser producida por varias vías bajo condiciones aeróbicas (Molina-Favero *et al.*, 2007). La desnitrificación aeróbica catalizada por la enzima nitrato reductasa periplasmica y la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa son algunas de las vías por las que se produce el ON (Steenhoudt *et al.*, 2001; Pothier *et al.*, 2007).

La evidencia actual indica que existe una importante conexión entre el ON y las hormonas vegetales clásicas, particularmente las auxinas, durante el desarrollo del sistema radical. Recientemente se demostró la participación del ON en la formación de raíces laterales en tomate inducidas por *A. brasilense* Sp245, utilizando un sequestrador específico de ON, cuya aplicación resulto en la inhibición de la formación de raíces laterales (Creus *et al.*, 2005; Molina-Favero *et al.*, 2007).

Otra evidencia que apoya esta hipótesis es la utilización de una mutante de *A. brasilense* Sp245, Faj164, que solo produce el 5% del ON comparado con la cepa silvestre, y que fue incapaz de inducir la formación de raíces laterales (Molina-Favero, 2008). Estos resultados muestran que el ON es un componente clave en la promoción del crecimiento inducido por *Azospirillum*, si bien resta por confirmar si el ON es producido por la bacteria, por la planta o por ambas durante la interacción.

Inducción de resistencia a patógenos y estrés abiótico

Otro de los mecanismos para favorecer el crecimiento vegetal, es la inducción de resistencia sistémica en plantas en contra de patógenos. Este mecanismo se ha observado en plantas de tomate inoculadas con *A. brasilense* en contra de la bacteria patógena *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Bashan y de-Bashan, 2002). Plantas de *Oryza sativa* cv. *Nipponbare* inoculadas con *Azospirillum* B510 exhiben un incremento en la resistencia en contra del hongo *Magnaporthe oryzae* y de la bacteria *Xanthomonas oryzae*, a través de la activación de un mecanismo de defensa independiente de la señalización por ácido salicílico (Yasuda *et al.*, 2009). Esto sugiere que la interacción biológica entre células de la planta y células bacterianas activan el sistema de inmunidad innata de las plantas hospedantes.

Aunque *Azospirillum* no es bien conocido como un agente de biocontrol típico, se han descrito algunos posibles mecanismos usados por este género para reducir el daño por patógenos, como la competencia a medioambientes, el desplazamiento de patógenos, y la posible inhibición del crecimiento de hongos vía producción de sustancias tóxicas (Bashan y de-Bashan, 2010). Algunos aislados de *Azospirillum* producen bactericidas que inhiben el crecimiento de varias bacterias (Tapia-Hernández *et al.*, 1990). El ácido fenilacético es una molécula con actividad antibacteriana y antifúngica aislada de un cultivo de *A. brasilense* (Somers *et al.*, 2005). La producción de sideróforos por *Azospirillum* también es un mecanismo de biocontrol que se ha venido estudiando por mucho tiempo (Shah *et al.*, 1992). Bajo condiciones limitadas de hierro, *A. brasilense* tiene la capacidad de producir sideróforos tipo catecol, los cuales tienen actividad antifúngica *in vitro* en contra de *Colletotrichum acutatum* M11,

previniendo las antracnosis provocada por este hongo (Tortora *et al.*, 2011).

Adicionalmente este género tiene la capacidad de mejorar el crecimiento vegetal cuando las plantas son cultivadas en condiciones de sequía, salinidad, metales pesados y pH extremo. Este efecto puede explicarse debido a la capacidad de *Azospirillum* para reducir el efecto del estrés medioambiental. Así, muchas cepas de *Azospirillum* pueden tolerar altos niveles de salinidad como *Azospirillum halopraeferens* (Reinhold *et al.*, 1987), que tolera el 2% de NaCl cuando son co-cultivadas con *Staphylococcus sp* (Holguín y Bashan, 1996).

En otro trabajo se reporta que *Azospirillum lipoferum* JA4::ngfp15 fue capaz de colonizar la raíz de trigo y de reducir los efectos negativos bajo condiciones de 160 mM de NaCl (Bacilio *et al.*, 2004). En este caso, los mecanismos por los cuales inducen la resistencia a altas concentraciones de salinidad son aún desconocidos.

Un factor importante que afecta a las plantas durante su crecimiento es el estrés hídrico. Aparentemente plantas de trigo inoculadas con *Azospirillum* favorecen el crecimiento bajo condiciones de sequía (El-Komy *et al.*, 2003), probablemente mejorando el estatus de agua (Creus *et al.*, 2004), y produciendo cambios en la distribución de ácidos grasos específicos en la raíz (Pereyra *et al.*, 2006). Las poliamidas son consideradas como compuestos que regulan el crecimiento vegetal, entre ellos, la cadaverina se ha correlacionado con el crecimiento del sistema radical o la mitigación del estrés osmótico en algunas especies de plantas. Cassán *et al.* (2009), demostraron que *A. brasilense* Az39 promueve el crecimiento radical y ayuda a contrarrestar el estrés osmótico en plántulas de arroz, debido en gran parte a la producción de cadaverina.

Conclusión

Azospirillum tiene la capacidad de promover el crecimiento vegetal a través de la producción de fitohormonas, la inducción de resistencia sistémica, y la resistencia a diferentes condiciones de estrés medioambiental. Este género es uno de los mejores candidatos para formular biofertilizantes para incrementar el rendimiento de cultivos de importancia económica. La co-inoculación con otras PGPR y micorrizas es otra opción para incrementar los efectos benéficos inducidos por *Azospirillum*. Estudios adicionales son necesarios para conocer los mecanismos moleculares implicados durante la interacción con la planta, sobre la fisiología de las bacterias durante condiciones de estrés y la co-inoculación con otros microorganismos para la generación de mejores biofertilizantes.

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por la Coordinación de la Investigación Científica, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México.

Referencias

- Bacilio M, Rodriguez H, Moreno M, Hernandez JR, Bashan Y.** 2004. Mitigation of salt stress in wheat seedlings by a gfp-tagged *Azospirillum lipoferum*. *Biol. Fertil Soils*. 40:188-193.
- Bashan Y, Holguin G, de-Bashan LE.** 2004. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997– 2003). *Can. J. Microbiol.* 50: 521-77.
- Bashan Y, de-Bashan LE.** 2002. Protection of tomato seedlings against infection by *Pseudomonas syringae* pv. tomato by using the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2637-43.
- Bashan Y, Bashan LE.** 2010. How the Plant Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum* Promotes Plant Growth—A Critical Assessment. In Sparks DL (ed.), *Advances in Agronomy*. pp. 78-122, Volume 108. Elsevier Inc.
- Ben Dekhil S, Cahill M, Stackebrandt E, Sly LI.** (1997). Transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largimobile* comb. nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *parooensis* to the new type species of *Conglomeromonas*, *Conglomeromonas parooensis* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 20: 72-77.
- Benintende S, Urich W, Herrera M, Gangge F, Sterren M y Benintende M.** 2010. Comparación entre coinoculación con *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense* e inoculación simple con *Bradyrhizobium japonicum* en la nodulación, crecimiento y acumulación de N en el cultivo de soja. *AGRISCIENTIA*. vol. xxvii (2): 71-77
- Bottini R, Cassán F, Piccoli P.** 2004. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65:497-503.
- Burdman S, Volpin H, Kigel J, Kapulnik Y, Okon Y.** 1996. Promotion of nod gene inducers and nodulation in common bean (*Phaseolus vulgaris*) roots inoculated with *Azospirillum brasilense* Cd. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3030-33.
- Cangahuala-Inocente GC, do Amaral FP, Faleiro AC, Huergo LF, Arisi ACM.** 2013. Identification of six differentially accumulated proteins of *Zea mays* seedlings (DKB240 variety) inoculated with *Azospirillum brasilense* strain FP2. *Eur. J. Soil Biol.* 58:45-50.
- Canto MJC, Medina PS, Morales AD.** 2004. Efecto de la inoculación con *Azospirillum sp.* en plantas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacquin). *Trop. Subtrop Agroecosys.* 4: 21-27.
- Cardon ZG, Whitbeck JL.** 2007. *The Rhizosphere - An Ecological Perspective*. pp. 31-56. Academic Press, San Diego, CA.
- Cassan F, Maiale S, Masciarelli O, Vidal A, Luna V, Ruiz O.** 2009. Cadaverine production by *Azospirillum brasilense* and its possible role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation. *Eur. J. Soil Biol.* 45: 12-19.
- Chamam A, Sanguin H, Bellvert F, Meiffren G, Comte G, Wisniewski-Dyé FJ, Bertrand C, Prigent-Combaret C.** 2013. Plant secondary metabolite profiling evidences strain-dependent effect in the *Azospirillum*–*Oryza sativa* association. *Phytochemistry*. 87: 65-77.
- Cohen A, Bottini CR, Piccoli PN.** 2007. *Azospirillum brasilense* Sp245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increase ABA content in *Arabidopsis* plants. *Int. J. Plant Growth Regul.* 12: 52-60.

- Cohen A, Travaglia C, Reinoso H, Piccoli P, Bottini R.** 2001. *Azospirillum* inoculation and inhibition of gibberellins and ABA synthesis in maize seedlings under drought. *Proc. Plant Growth Regul. Soc. Am.* 28: 88-93.
- Creus CM, Graziano M, Casanovas EM, Pereyra MA, Simontacchi M, Puntarulo S, Barassi CA, Lamattina L.** 2005. Nitric oxide is involved in the *Azospirillum brasilense*-induced lateral root formation in tomato. *Planta.* 221: 297-303.
- Creus CM, Sueldo RJ, Barassi CA.** 2004. Water relations and yield in *Azospirillum*-inoculated wheat exposed to drought in the field. *Can. J. Bot.* 82: 273-281.
- Dardanelli MS, Fernandez de Cordoba FJ, Rosario Espuny M, Rodriguez Carvajal MA, Soria Diaz ME, Gil Serrano AM, Okon Y, Megias M.** 2008. Effect of *Azospirillum brasilense* coinoculated with *Rhizobium* on *Phaseolus vulgaris* flavonoids and Nod factor production under salt stress. *Soil Biology & Biochemistry.* 40: 2713-2721.
- de Zelicourt A, Al-Yousif M, Hirt H.** 2013. Rhizosphere Microbes as Essential Partners for Plant Stress Tolerance. *Mol. Plant* 6:242-45.
- Diaz-Zorita M, Fernandez-Canigia MV.** 2009 Field performance of a liquid formulation of *Azospirillum brasilense* on dryland wheat productivity. *Eur. J. Soil Biol.* 45: 3-11
- Dobbelaere S, Croonenborghs A, Thys A, Ptacek D, Vanderleyden J, Dutto P, Labandera-Gonzalez C, Caballero-Mellado J, Francisco Aguirre J, Kapulnik Y, Brener S, Burdman S, Kadouri D, Sarig S, Okon Y.** 2001. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Aust J Plant Physiol.* 28: 871-879
- Dobbelaere S, Croonenborghs A, Thys A, van de Broek A, Vanderleyden J.** 1999. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant Soil.* 212: 155-164.
- Eckert B, Weber OB, Kirchof G, Halbritter A, Stoffels M, Hartmann, A.** 2001. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 17-26.
- El-Komy HM, Hamdia MA, El-Baki GKA.** 2003. Nitrate reductase in wheat plants grown under water stress and inoculated with *Azospirillum* spp. *Biol. Plantarum.* 46: 281-87.
- Gunarto I, Adachi K, Senboku T.** 1999. Isolation and selection of indigenous *Azospirillum* spp. from a subtropical island and effect of inoculation on growth of lowland rice under several levels of N application. *Biol. Fertil. Soils* 28: 129-135.
- Hadas R, Okon Y.** 1987. Effect of *Azospirillum brasilense* inoculation on root morphology and respiration in tomato seedlings. *Biol. Fertil. Soils.* 5: 241-247.
- Hartmann A, Baldani JJ.** 2006. The Genus *Azospirillum*. In Dworkin M (ed.), *The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria.* pp. 115-140. Springer Science Business Media, LLC. New York, USA.
- Helman Y, Burdman S, Okon Y.** 2011. Plant growth promotion by rhizosphere bacteria through direct effects. In Rosenberg E, Gophna U (eds.), *Beneficial Microorganisms in Multicellular Life Form.* pp. 89-103. Heidelberg: Springer.
- Holguin G, Bashan Y.** 1996. Nitrogen-fixation by *Azospirillum brasilense* Cd is promoted when co-cultured with a mangrove rhizosphere bacterium (*Staphylococcus* sp.). *Soil Biol. Biochem.* 28:1651-60.
- Hungria M, Campo RJ, Souza EM, Pedrosa FA.** 2010. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant and Soil.* 331: 413-425.
- Jain DK, Patriquin DG.** 1984. Root hair deformation, bacterial attachment, and plant growth in wheat-*Azospirillum* associations. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 1208-13.
- Kapulnik Y, Okon Y, Henis Y.** 1985. Changes in root morphology of wheat caused by *Azospirillum* inoculation. *Can. J. Microbiol.* 31: 881-887.
- Khammas KM, Ageron E, Grimont PAD, Kaiser, P.** 1989. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. *Res. Microbiol.* 140: 679-693.
- Magalhães FM, Baldani JJ, Souto M, Kuykendall JR, Dobereiner J.** 1983. A new acid tolerant *Azospirillum* species. *Ann. Acad. Bras. Cienc.* 55: 417-430.
- Manoharachary C, Mukerji KG.** 2006. Rhizosphere Biology—an Overview. In Mukerji KG, Manoharachary C, Singh J (eds.), *Microbial Activity in the Rhizosphere.* pp. Springer, German.
- Mehnaz S, Weselowski B, Lazarovits G.** 2007. *Azospirillum zeae* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of *Zea mays*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:2805-2809.
- Molina-Favero C, Creus CM, Lanteri ML, Correa-Aragunde N, Lombardo MC, Barassi CA, Lamattina L.** 2007. Nitric oxide and plant growth promoting rhizobacteria: Common features influencing root growth and development. *Adv. Bot. Res.* 46:1-33.
- Molina-Favero C, Creus CM, Simontacchi M, Puntarulo S, Lamattina L.** 2008. Aerobic nitric oxide production by *Azospirillum brasilense* Sp245 and its influence on root architecture in tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21: 1001-9.
- Overvoorde P, Fukaki H, Beekman T.** 2010. Auxin Control of Root Development. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2:a001537.
- Patil GB, Lakshman HC, Mirdhe RM y Agadi BS.** 2013. Effect of co-inoculation of AM fungi and two beneficial microorganisms on growth and nutrient uptake of *Eleusine coracana* Gaertn. (*Finger millet*). *Asian Journal of Plant Science and Research.* 3(1):26-30.
- Patriquin DG, Döbereiner J, Jain DK.** 1983. Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. *Can. J. Microbiol.* 29: 900-15.
- Peng G, Wang H, Zhang G, Hou W, Liu Y, Wang, ET, Tan Z.** 2006. *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses grass. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 1263-1271.
- Pereyra MA, Zalazar CA, Barassi CA.** 2006. Root phospholipids in *Azospirillum* inoculated wheat seedlings exposed to water stress. *Plant Physiol. Biochem.* 44: 873-9.
- Piccoli P, Lucangeli C, Schneider G, Bottini R.** 1997. Hydrolysis of 17,17-³H₂-gibberellin A₂₀-glucoside and 17,17-³H₂-gibberellin A₂₀-glucosyl ester by *Azospirillum lipoferum* cultured in nitrogen-free biotin-based chemically defined medium. *Plant Growth Regul.* 23: 179-182.
- Piccoli P, Bottini R.** 1996. Light enhancement of gibberellin production by *Azospirillum lipoferum* cultures. *Biozell.* 20: 200-207.
- Pothier JF, Wisniewski-Dyé F, Weiss-Gayet M, Moënne-Loccoz Y, Prigent-Combaret C.** 2007. Promoter-trap identification of wheat seed extract-induced genes in the plant-growth-promoting

- rhizobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245. *Microbiology*. 153: 3608-22.
- Prinsen E, Costacurta A, Michiels K, Vanderleyden J, Van Onckelen H.** 1993. *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid biosynthesis: evidence for a non-tryptophan dependent pathway. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6: 609–15.
- Reinhold B, Hurek T, Fendrik I, Pot B, Gillis M, Kersters K, Thielemans S, De Ley J.** 1987. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37:43-51.
- Reis V, Lee S, Kennedy C.** 2007. Biological nitrogen fixation in sugar cane. In: *Elmerich C, Newton WE (eds) Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations.* Springer, Heidelberg, pp 213–232.
- Ribaudó CM, Krumpholz EM, Cassan FD, Bottini R, Cantore ML, Cura JA.** 2006. *Azospirillum* sp. promotes root hair development in tomato plants through a mechanism that involves ethylene. *J. Plant Growth Regul.* 25: 175-85.
- Rosas SB, Avanzini G, Carlier E, Pasluosta C, Pastor N, Rovera M.** 2009. Root colonization and growth promotion of wheat and maize by *Pseudomonas aurantiaca* SR1. *Soil Biol Biochem.* 41:1802–1806.
- Rothballer M, Schmid M, Hartmann A.** 2009. Diazotrophic bacterial endophytes in Gramineae and other plants. In: *Pawlowski K (ed) Prokaryotic symbionts in plants.* Springer, Berlin, pp 273–302.
- Ruíz-Sánchez M, Armada E, Muñoz Y, García de Salamone IE, Aroca R, Ruíz-Lozano JM, Azcón R.** 2011. *Azospirillum* and arbuscular mycorrhizal colonization enhance rice growth and physiological traits under well-watered and drought conditions. *Journal of Plant Physiology.* 168: 1031–1037.
- Saubidet MI, Fatta N, Barneix AJ.** 2002. The effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on growth and nitrogen utilization by wheat plants. *Plant Soil.* 245:215–22.
- Shah S, Karkhanis V, Desai A.** 1992. Isolation and characterization of siderophore with antimicrobial activity from *Azospirillum lipoferum*. *M. Curr. Microbiol.* 25:34–35.
- Somers E, Ptacek D, Gysegom P, Srinivasan M, y Vanderleyden J.** 2005. *Azospirillum brasilense* produces the auxin-like phenylacetic acid by using the key enzyme for indole-3-acetic acid biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:1803-10.
- Spaepen S, Van Derleyden J, Okon Y.** 2009. Plant growth-promoting actions of rhizobacteria. *Adv. Bot. Res.* 51:283–320.
- Spaepen S, Van derleyden J, Remans R.** 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol. Rev.* 31:425–48.
- Spaepen S, Dobbelaere S, Croonenborghs A, Vanderleyden J.** 2008. Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. *Plant Soil.* 312:15-23.
- Steenhoudt O, Keijers V, Okon Y, Vanderleyden J.** 2001. Identification and characterization of a periplasmic nitrate reductase in *Azospirillum brasilense* Sp245. *Arch. Microbiol.* 175:344-52.
- Strzelczyk E, Kamper M, Li C.** 1994. Cytocinin-like-substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. *Microbiol. Res.* 149:55-60.
- Taiz L, Zeiger E,** 2002. *Auxin: the growth hormone.* In *Plant Physiology*, pp. 423–460, Sinauer Associates, Sunderland, Mass, USA.
- Tapia-Hernández A, Mascarua-Esparza MA, Caballero-Mellado J.** 1990. Production of bacteriocins and siderophore-like activity in *Azospirillum brasilense*. *Microbios.* 64: 73–83.
- Tarrand JJ, Krieg NR, Döbereiner J.** 1978. A taxonomic study of the *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: 967-80.
- Tien TM, Gaskins MH, Hubbell DH.** 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 1016-24.
- Tortora ML, Diaz-Ricci JC, Pedraza RO.** 2011. *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. *Arch. Microbiol.* 193:275-86.
- Umali-Garcia M, Hubbell DH, Gaskins H, Dazzo FB.** 1980. Association of *Azospirillum* with grass roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 219–26.
- Van de Broek A, Michiels J, Van Gool A, Vanderleyden J.** 1993. Spatial-temporal colonization patterns of *Azospirillum brasilense* on the wheat root surface and expression of the bacterial nifH-gene during association. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6: 592-600.
- Van de Broek A, Lambrecht M, Eggermont K, Vanderleyden J.** 1999. Auxins upregulate expression of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene in *Azospirillum brasilense*. *J. Bacteriol.* 181: 1338-1342.
- Van Loon L.C.** 2007. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* 119: 243-54.
- Veresoglou SD, Menexes G.** 2010. Impact of inoculation with *Azospirillum* spp. on growth properties and seed yield of wheat: a meta-analysis of studies in the ISI Web of Science from 1981 to 2008. *Plant Soil.* 337: 469-80.
- Weller DM.** 2007. *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years. *Phytopathology.* 97: 250-56.
- Wisniewski-Dyé F, Borziak K, Khalsa-Moyers G, Alexandre G, Sukharnikov IO et al.** 2011. *Azospirillum* Genomes Reveal Transition of Bacteria from Aquatic to Terrestrial Environments. *PLoS Genet* 7(12): e1002430.
- Xie C-H, Yokota A.** 2005. *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 1435-1438.
- Yashuda M, Isawa T, Shinozaki S, Minamisawa K, Nakashita H.** 2009. Effects of colonization of a bacterial endophyte *Azospirillum* sp. B510 on disease resistance in rice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73:2595-99.
- Young CC, Hupfer H, Siering C, Ho M-J, Arun AB, Lai W-A, Rekha PD, Shen F-T, Hung M-H, Chen W-M, Yassin AF.** 2008. *Azospirillum rugosum* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 959-963.