

La interacción *Gluconacetobacter diazotrophicus*-caña de azúcar como modelo para el estudio de la transmisión de bacterias benéficas

Jesús Muñoz Rojas

La transmisión de microorganismos benéficos ha sido poco estudiada, pero se trata de un fenómeno importante que podría proveer el éxito competitivo de los miembros involucrados en una interacción benéfica (ej. bacteria-planta) en un ambiente determinado. Muchas bacterias endófitas son capaces de estimular el crecimiento de las plantas, pudiendo otorgar un efecto más directo sobre ellas comparado con el que ofrecen las bacterias rizosféricas. En el presente trabajo se propone a la interacción de *G. diazotrophicus*-caña de azúcar (endófito-planta) como modelo para el estudio de la transmisión de bacterias benéficas. Se discuten cuales son las formas de transmisión conocidas para *G. diazotrophicus* en sus diferentes hospederos, así como el efecto que ejercen las prácticas agrícolas actuales y algunos factores ambientales sobre la transmisión y establecimiento de ésta bacteria en la caña de azúcar.

LAS BACTERIAS BENÉFICAS

Cuando se habla de transmisión de microorganismos, podemos imaginar bacterias, virus u hongos patogénicos que amenazan la vida del hombre o la productividad de cultivos, pero pocas veces nos detenemos a pensar en la existencia de microorganismos benéficos para los diferentes hospederos.

La transmisión de microbios—desde un hospedero infectado hasta uno susceptible— es una manera de asegurar la vida de la progenie. Sin embargo, la vía para alcanzar el hospedero correcto es variable. En algunos casos es por contacto directo entre hospederos; en otros, es a través de vectores, o del suelo, donde los microorganismos yacen bajo formas resistentes, y en casos extremos, explorando nuevos hospederos (hospederos alternativos). La transmisión de microorganismos benéficos ha sido poco estudiada. Se trata de un fenómeno importante porque podría proveer el éxito competitivo tanto del microorganismo como del hospedero en un ambiente determinado. Por ejemplo, algunas bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Frankia* son capaces de fijar nitrógeno de la at-

mósfera cuando se encuentran en simbiosis con leguminosas y árboles actinorrízicos, respectivamente. En estas simbiosis, las bacterias transfieren el nitrógeno fijado (combinado) a las plantas y a cambio reciben de ellas fotosintato (fuente de carbono), que utilizan para generar energía. Algunas bacterias benéficas del género *Pseudomonas* (por ejemplo, *P. fluorescens*) que viven en la zona influenciada por los exudados de la raíz de las plantas (rizósfera), son capaces de inducir una respuesta de defensa en las plantas, que sirve de protección contra microorganismos patógenos. Bacterias de los géneros *Burkholderia* y *Azospirillum*, entre muchas otras, producen sustancias secuestradoras de hierro (sideróforos), con lo cual privan de hierro a otros microorganismos patógenos.

Las bacterias que viven en tejidos internos de las plantas sin causar un daño aparente (endófitas) son capaces de estimular el crecimiento de las plantas. Se piensa que las bacterias endófitas, al estar en una asociación íntima con las plantas, podrían tener efectos benéficos de mayor trascendencia en

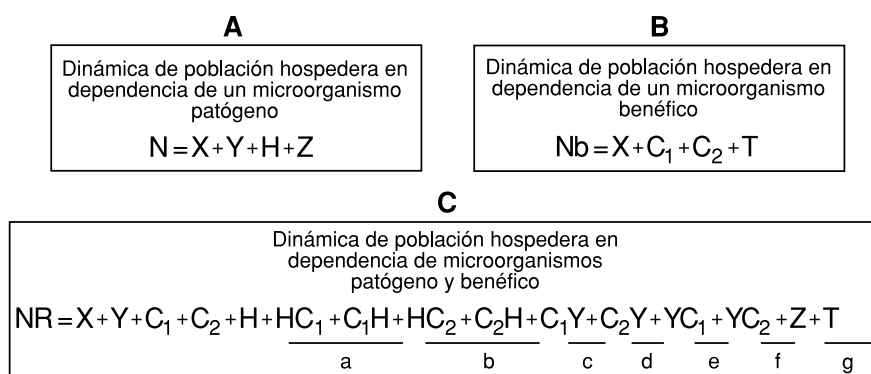


FIGURA 1. Descripción hipotética de la dinámica de población hospedera en función de una bacteria patógena y/o una bacteria benéfica. X = Población de hospederos no infectados (susceptibles); Y = Población de hospederos infectados por un patógeno; H = Población en donde las bacterias patógenas están en estado de latencia (bacterias patógenas no activas); Z = Población de hospederos que están inmunes y son resistentes a infecciones futuras; C₁ = Población de hospederos colonizados por una bacteria benéfica activa; C₂ = Población de hospederos colonizados por bacterias benéficas que han entrado en estado de dormancia; T = Hospedero

comparación con las bacterias que viven en la zona influenciada por la raíz (rizosféricas). Las bacterias endófitas tienen menor competencia que las bacterias rizosféricas para tomar sus nutrientes y por lo tanto podrían brindar cualquier beneficio directamente a la planta hospedera.

LA CAÑA DE AZÚCAR Y LAS BACTERIAS ENDÓFITAS

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) es una planta de gran interés agrícola que se cultiva ampliamente en los países tropicales. La mayor parte se destina a la producción de azúcar. Sin embargo, pueden obtenerse diversos productos a partir de esta planta, entre los que destaca el alcohol etílico que es muy usado en Brasil como combustible renovable. Uno de los principales problemas en el cultivo de caña de azúcar, es el elevado nivel de nitrógeno combinado que la planta requiere para su desarrollo. A pesar de esto, la caña de azúcar cultivada en Brasil ha sido tradicionalmente fertilizada con bajas cantidades de nitrógeno, lográndose rendimientos similares a los obtenidos en otros países donde los cultivos son fertilizados con altas cantidades de nitrógeno. Además, en Brasil no se ha detectado disminución de las reservas de nitrógeno del suelo donde se cultiva caña de azúcar a pesar de décadas de cultivo. Esto sugirió que el proceso de fijación biológica de nitrógeno (FBN) está ocurriendo en las plantas de caña de azúcar cultivadas en Brasil. En diversos trabajos se ha demostrado que la FBN se lleva a cabo en gramíneas

y particularmente en la caña de azúcar. Se ha observado que algunas variedades de caña de azúcar obtienen hasta el 70% de nitrógeno a través de la FBN. Aunque se han aislado muchas bacterias fijadoras de nitrógeno tanto de la rizósfera como endófitas de la caña de azúcar, no se conoce cual de ellas podría contribuir con la mayor tasa de FBN. Se ha sugerido que *Gluconacetobacter diazotrophicus* podría ser una de las especies que más contribuye con la tasa de FBN debido a sus características fisiológicas poco comunes entre los diazotófos, como son su capacidad de fijar nitrógeno y producir fitohormonas bajo condiciones similares a las encontradas en los fluidos de la caña de azúcar (pH ácido y concentraciones de sacarosa elevadas), lugar donde se establece la bacteria.

G. diazotrophicus es una bacteria que fue aislada por primera vez por Cavalcante y Döbereiner (1988), a partir de tejidos de caña de azúcar. Esta bacteria posteriormente ha sido aislada como endófito de distintas variedades de caña de azúcar localizadas en zonas geográficas muy distantes, además de que también ha sido encontrada asociada a diversos hospederos como el camote (*Ipomoea batatas*), algunos pastos de variedad Cameroon (*Pennisetum purpureum*), el café (*Coffea arabica*), la piña (*Ananas comosus*), y la chinche harinosa (*Saccharococcus sacchari*). En la planta se ha encontrado que la bacteria prefiere los espacios intercelulares y tejido vascular como el xilema.

En experimentos recientes se ha demostrado que cuando se inocula *G. diazotrophicus* en plantas de caña de azúcar, la bacteria es capaz de fijar ciertas proporciones de nitrógeno y de

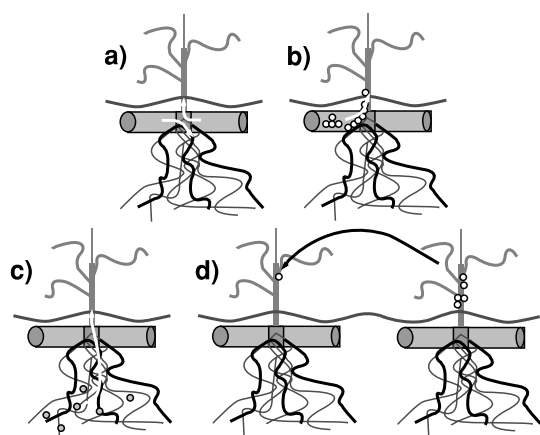


FIGURA 2. Representación de las formas de transmisión sugeridas para *G. diazotrophicus* en caña de azúcar. Las flechas indican la dirección de transmisión de *G. diazotrophicus*. a) *G. diazotrophicus* asciende desde los esquejes y coloniza a las nuevas plantas de caña de azúcar derivadas de la planta madre (propagación vegetativa). b) La chinche harinosa portadora de la bacteria benéfica puede colonizar a las nuevas plantas de caña de azúcar y favorecer la transmisión de *G. diazotrophicus*. c) Las esporas VAM pueden ayudar a *G. diazotrophicus* a colonizar a la caña de azúcar, funcionando como un sistema alternativo de transmisión de bacterias benéficas. d) Bajo condiciones óptimas de medio ambiente una chinche harinosa macho, portadora de *G. diazotrophicus*, podría volar y pasar a una nueva planta de caña de azúcar, favoreciendo la transmisión de la bacteria.

promover el crecimiento de las plantas predominantemente a través de mecanismos de tipo hormonal, dependiendo de la variedad de caña de azúcar y del genotipo de bacteria inoculado.

DINÁMICA DE POBLACIÓN HOSPEDERO-MICROORGANISMO

Para entender la dinámica de infecciones bacterianas, la población hospedera en estudio puede ser dividida en susceptibles (X), infectados (Y), latentes (H) e inmunes o resistentes (Z), donde el número total de la población (N) es la suma de todas las categorías (Figura 1A). La descripción de la dinámica de la población hospedera en función de una bacteria benéfica puede realizarse en una forma muy semejante, cambiando algunos términos, así el número total de la población (N_b) sería la suma de hospederos susceptibles (X), colonizados (C) y resistentes (T) (Figura 1B). La descripción de una población a través de una asociación benéfica sustituye a los hospederos infectados y latentes de la descripción patogénica por la población de hospederos colonizados por la bacteria benéfica (C). Sin embargo, hay que aclarar que esta categoría se tiene que subdividir en dos: la población de hospederos colonizados por una bacteria benéfica activa (C_1), cuando el hospedero se está beneficiando de la interacción; y la población de hospederos colonizados por una población benéfica no activa (C_2), cuando por alguna razón la bacteria está presente en el hospedero, pero no lo está beneficiando en ese momento (similar a un estado latente en la asociación patogénica). Sin embargo, la realidad es que los hospederos siempre están en interacción tanto con microorganismos patógenos como con benéficos, por lo que la dinámica de población debe ser representada en términos de las combinatorias posibles, de las cuales se da un ejemplo en la Figura 1C.

Para describir la dinámica poblacional también es muy importante conocer la tasa neta reproductiva de la infección, que es proporcional al número de encuentros entre hospederos susceptibles e infectados y al coeficiente de transmisión (estas son categorías dependientes de los factores del ambiente sobre la asociación). El conocimiento de la forma de transmisión de un microorganismo patógeno (enfermedad de la población) o benéfica (éxito de la población) en una población hospedera nos ayudará a entender su dinámica en ese medio.

TRANSMISIÓN DE *G. DIAZOTROPHICUS* EN CAÑA DE AZÚCAR

Se han sugerido tres formas de transmisión para *G. diazotrophicus* en caña de azúcar: directa, en la que una nueva planta de caña de azúcar crece a partir de la yema germinal localizada en el tallo (propagación vegetativa), mecanismo mediante el cual las bacterias infectan a las plantas emergentes. Se ha observado que cuando se cultiva esquejes (partes del tallo que contienen yemas germinales) de caña de azúcar esterilizados por fuego o por métodos químicos, las plántulas nuevas resultantes portan una población de *G. diazotrophicus* idéntica a la encontrada en el tallo de la planta usada para plantilla (planta madre) (Figura 2a).

Se ha propuesto que una segunda forma de transmisión de *G. diazotrophicus* en la caña de azúcar podría ser a través del homóptero *Saccharicoccus sacchari*, conocido también como chinche harinosa; dicho homóptero podría succionar el jugo de una planta que contiene bacterias y transmitir las a plantas no infectadas. La forma de propagación de este homóptero a plantas nuevas de caña de azúcar se realiza

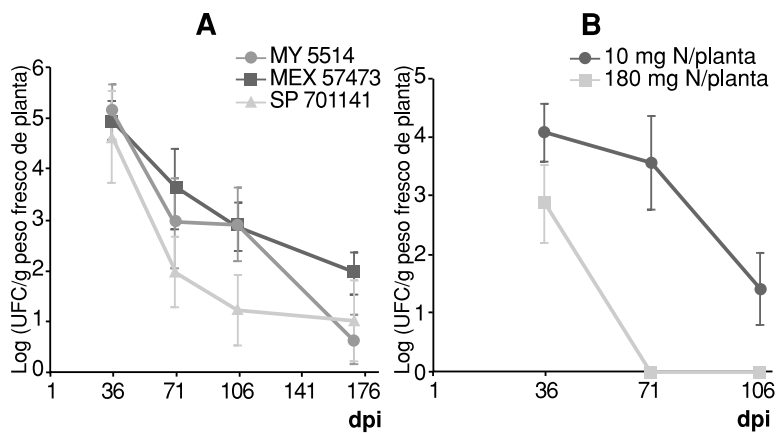


FIGURA 3. Comportamiento de la población de *G. diazotrophicus* (Cepa UAP 5560) en asociación endófito con la raíz de caña de azúcar. UFC = Unidades formadoras de colonia bacterianas. Efecto del nitrógeno (NH_4NO_3) sobre la población de *G. diazotrophicus* en caña de azúcar (ej. variedad MY 5514). Cuando se adicionan niveles altos de nitrógeno a las plantas (180 mg N/planta) la población de *G. diazotrophicus* es afectada drásticamente comparada con la que se observa en plantas adicionadas con niveles bajos de nitrógeno (10 mg N/planta).

aprovechando la forma vegetativa de reproducción de la planta, así que las nuevas poblaciones de chinche harinosa infestan a los tallos de caña de azúcar por simple migración desde los esquejes plantillas a las plantas nuevas (Figura 2b); además se sabe que los machos son capaces de volar, por lo que podrían llegar a otras plantas de caña de azúcar no infectadas (Figura 2d). Como hemos mencionado *G. diazotrophicus* ha sido aislada de las chinches harinosas que viven en asociación íntima con la caña de azúcar, pero no ha sido determinado del todo quién es el hospedero definitivo de la bacteria.

Una tercera forma de transmisión podría ser a través de esporas de hongos micorrízicos del tipo vesículo-arbuscular (VAM) (Figura 2c). *G. diazotrophicus* ha sido aislado de esporas de hongos micorrízicos y en laboratorio ha sido demostrado que es posible la inoculación de plántulas de caña de azúcar usando a las esporas de éstos hongos como vectores de transmisión. De hecho se ha observado que la coinoculación de esporas VAM con *G. diazotrophicus* es mas benéfica para las plantas hospederas que la inoculación independiente. Así se sugiere que las esporas VAM desempeñan un papel importante como vectores de transmisión de *G. diazotrophicus* en la naturaleza.

Es posible que existan otras alternativas de transmisión. En México se ha descrito que existen más de cien insectos asociados a la caña de azúcar y aún no ha sido explorada la posibilidad de que éstos funcionen como vectores de transmisión. Además, algunos organismos superiores, como las aves, podrían también estar implicados en la transmisión de microorganismos benéficos.

FACTORES QUE AFECTAN A LA TRANSMISIÓN DE *G. DIAZOTROPHICUS* EN CAÑA DE AZÚCAR

La transmisión de un microorganismo es afectada por diversos factores ambientales. Se ha observado que en los periodos del año de poca lluvia o en periodos prolongados de sequía, la población de *G. diazotrophicus* disminuye fuertemente. Bajo condiciones de laboratorio se ha observado que algunas bacterias benéficas como es el caso de *Pseudomonas putida* y *G. diazotrophicus* son sensibles a procesos de desecación. De hecho, estas bacterias se aíslan con mayor éxito en épocas cuando el agua no es escasa. Será importante realizar trabajos para entender los mecanismos mediante los cuales las bacterias benéficas pueden sobrevivir a estas condiciones de desecación y potenciar de alguna forma esos mecanismos. Las estaciones del año, y específicamente la humedad, son factores que también afectan a la chinche harinosa; estos homópteros prefieren temperaturas calurosas para su reproducción y aunque la caña de azúcar es un cultivo perenne, se piensa que la transmisión de *G. diazotrophicus* podría ser favorecida cuando las condiciones climáticas son las adecuadas para la reproducción de la chinche harinosa. Dado que este homóptero coloniza las plantas nuevas de caña de azúcar aprovechando la forma vegetativa de reproducción de la planta, los enemigos naturales de la chinche harinosa también podrían interferir en la transmisión de *G. diazotrophicus*.

Sin duda alguna, muchas de las prácticas agrícolas que el hombre ha desarrollado para aumentar la productividad de caña de azúcar son los factores que mayor influencia negativa pueden ejercer sobre las asociaciones benéficas. Para cosechar la caña de azúcar, generalmente los cultivos son quemados y aunque no sabemos cuánto afecta esta práctica agrícola, podemos inferir que influye sobre la población de

chinche harinosa y consecuentemente a una forma de transmisión de *G. diazotrophicus*. Por otro lado, la quema de caña de azúcar, previa a su cosecha, ocasiona la pérdida de materia orgánica, empobreciendo a la tierra para nuevos cultivos y para bacterias que podrían usar esa materia orgánica. De hecho *G. diazotrophicus* puede aislarse de la rizósfera de los cultivos de café pero no de los cultivos de caña de azúcar, y esta diferencia se atribuye a la presencia de materia orgánica en los cultivos de café.

Después de la revolución verde y para tener mayor productividad, la caña de azúcar y otros cultivos de interés agronómico han sido adicionados con elevadas cantidades de fertilizantes nitrogenados. Sin embargo, sólo del 30 al 50% del fertilizante adicionado es aprovechado por las plantas, el restante se pierde por lixiviación o desnitrificación provocando efectos nocivos sobre el medio ambiente. Además, la asociación de caña de azúcar con *G. diazotrophicus* está influenciada por los niveles de fertilización nitrogenada; se sabe que el aislamiento de esta bacteria a partir de plantas de caña de azúcar adicionadas con elevados niveles de fertilización nitrogenada (250-300 kg N/ha) resulta muy difícil. En cambio, cuando los cultivos son adicionados con niveles bajos o medios de fertilizante nitrogenado (50-60 kg N/ha), el aislamiento de *G. diazotrophicus* es más abundante. En el laboratorio hemos observado que el nitrógeno combinado es capaz de disminuir la capacidad de distintas cepas de *G. diazotrophicus* para establecerse en caña de azúcar cuando las plantas crecen en condiciones de elevada fertilización nitrogenada (Figura 3). Estos experimentos han sido desarrollados con plántulas provenientes de cultivo de tejidos que están libres de bacterias, que son inoculadas con *G. diazotrophicus* y crecidas en condiciones de invernadero. Además hemos observado un efecto negativo sobre la población de *G. diazotrophicus* con relación a la edad de la caña de azúcar; plantas de 35 días de edad mantienen la asociación con *G. diazotrophicus* en condiciones óptimas, pero a los 75 días posteriores a la inoculación (dpi) (Figura 3), el número de bacterias disminuye drásticamente, dependiendo del genotipo bacteriano. Así, la edad de la caña de azúcar se convierte en otro factor limitante que tiene que tomarse en cuenta en la asociación.

Aún no sabemos cómo la edad de la planta o los niveles de fertilización nitrogenada influyen sobre la disminución de la población de *G. diazotrophicus* en los tejidos de la caña de azúcar. No obstante, es conocido que ocurren cambios en las relaciones de agua y de las concentraciones de sacarosa durante su crecimiento, lo cual sugiere que alguno de los cam-

bios fisiológicos puede activar una regulación de las bacterias endófitas por parte de la planta. Esto no debe sorprendernos, ya que las plantas deben ser capaces de frenar el crecimiento de las bacterias benéficas, de otra forma ellas terminarían convirtiéndose en patógenas. Además, también han sido reportados cambios en las actividades enzimáticas de las plantas de caña de azúcar cuando ellas son fertilizadas con nitrógeno. Estos cambios fisiológicos y metabólicos podrían modificar las condiciones para el establecimiento y aun la permanencia endófitica de *G. diazotrophicus* en la caña de azúcar.

El efecto del nitrógeno combinado sobre la asociación de bacterias endófitas ha sido reportado en diferentes trabajos, y ahora se sabe que éste es un factor limitante para dichas asociaciones. Actualmente los cultivos de interés agronómico son fertilizados con elevadas dosis de nitrógeno; de hecho, se seleccionan variedades que son resistentes a enfermedades y que son capaces de usar eficientemente el fertilizante nitrogenado. Posiblemente estas plantas han perdido también la capacidad de interactuar con bacterias de tipo benéfico y tal pérdida se acentúa cuando las plantas se fertilizan con elevadas dosis de nitrógeno, como se ha observado en plantas de caña de azúcar, de piña y de café cuando se asocian con *G. diazotrophicus*. Llama la atención el hecho de que *G. diazotrophicus* se aísla con mayor facilidad en variedades de caña de azúcar que han sido cultivadas con baja fertilización nitrogenada.

En lo que toca a los factores ambientales que afectan a la transmisión de microorganismos benéficos, será importante, en un futuro, entender cómo las bacterias benéficas pueden sobrevivir a condiciones adversas y, más aún, seguir activas. Las prácticas humanas deben ser cuestionadas y evaluar si realmente es necesario llevarlas a cabo; por ejemplo, pensamos que los niveles de fertilizante nitrogenado adicionado a los cultivos de caña de azúcar son excesivos y que el disminuirlos no afecta a la productividad, pero sí podría tener un impacto medioambiental positivo, incluyendo la recuperación de asociaciones benéficas bacteria-caña de azúcar. Experimentos piloto en plantas inoculadas con *G. diazotrophicus* en campos de Cuernavaca (México) realizados por Caballero Mellado y colaboradores indican que aun cuando ellos fertilizan con dosis bajas de nitrógeno (50 Kg N/ha) los rendimientos son muy similares a los observados con elevadas dosis de fertilización (300 Kg N/ha). Además, Brasil es un ejemplo de que incluso fertilizando con niveles bajos de nitrógeno su rendimiento por hectárea es muy semejante al que se obtiene en países donde

los cultivos de caña de azúcar se fertilizan con altas dosis de nitrógeno, como es el caso de Hawai y México.

En la actualidad hemos determinado la dinámica de población de *G. diazotrophicus* asociada a la caña de azúcar; será de gran relevancia conocer la dinámica poblacional de otras bacterias endófitas cuando sus hospederos sean fertilizados con diferentes dosis de nitrógeno combinado, lo cual seguramente aumentará nuestro conocimiento sobre las fluctuaciones de las poblaciones bacterianas asociadas con las plantas. Esto podría conducir a encontrar relaciones estables planta-bacteria con potencial de aprovechamiento agronómico.

R E F E R E N C I A S

Muñoz Rojas, J. y Caballero Mellado, J., *Gluconacetobacter diazotrophicus*, modelo de bacteria endófito, en Martínez Romero, E. y Martínez Romero, J.

(editores), *Microbios en línea* <http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/>, UNAM, México, 2001, pp. 157-176.

Muñoz Rojas, J. y Caballero Mellado, J., Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and its effect on plant growth, *Microbial Ecology*, 46, 2003, pp. 454-464.

Muthukumarasamy, R., Revathi, G., Seshadri, S., y Lakshminarasimham, C., *Gluconacetobacter diazotrophicus* (syn. *Acetobacter diazotrophicus*), a promising diazotrophic endophyte in tropics, *Current Science*, 83, 2002, pp. 137-145 (<http://www.iisc.ernet.in/~currsci/jul252002/137.pdf>).

Pieterse, C.M. y van Loon, L.C., Salicylic acid-independent plant defense pathways, *Trends in Plant Science*, 41, 1999, pp. 52-58.

A G R A D E C I M I E N T O S

Agradezco al Banco Central Santander Hispano y a J.L. Ramos por darme la oportunidad de realizar mis estudios posdoctorales en España.

Jesús Muñoz Rojas actualmente realiza una estancia posdoctoral en el Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas del csic (Granada, España). jmrojas@eez.csic.es



© Patricia Aridjis, de la serie *Las horas negras*, México, D.F., 2000-2004.