



IMAGEN MICROBIOLÓGICA

## *Azospirillum brasilense* Az39 marcado con GFP en raíces de *Arabidopsis thaliana*

### *Azospirillum brasilense* Az39 labeled with GFP in *Arabidopsis thaliana* roots



Silvana M. Díaz Herrera<sup>a,b</sup>, Florencia J. Rossello<sup>c</sup>, María P. Benavides<sup>a,b</sup>,  
María D. Groppa<sup>a,b</sup> y Myriam S. Zawoznik<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Facultad de Farmacia y Bioquímica, Cátedra de Química Biológica Vegetal, Departamento de Química Biológica, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

<sup>b</sup> IQUIFIB, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

<sup>c</sup> Universidad Nacional de Quilmes, Buenos Aires, Argentina

Recibido el 27 de octubre de 2016; aceptado el 19 de diciembre de 2016

Disponible en Internet el 23 de marzo de 2017

La cepa Az39 de *Azospirillum brasilense* fue aislada de rizosfera de trigo en la localidad de Marcos Juárez, Córdoba. Esta cepa fue seleccionada por su eficiencia para promover el crecimiento de este cultivo<sup>1</sup>; se encuentra depositada en el Laboratorio de Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV) del IMYZA, INTA-Castelar, y forma parte de numerosos inoculantes comerciales recomendados en cultivos de cereales y otros. Su capacidad para estimular el crecimiento de las raíces e incrementar los rindes en especies como maíz, trigo, arroz y diversas hortalizas ha sido bien documentada mediante ensayos de invernáculo y de campo<sup>4</sup>. También se ha informado su capacidad para mitigar los efectos adversos del estrés hídrico o salino en maíz y cebada<sup>2,3,5</sup>.

En nuestro laboratorio se ha logrado el marcado de esta bacteria con la proteína fluorescente verde (*green fluorescent protein* [GFP]) mediante un procedimiento de

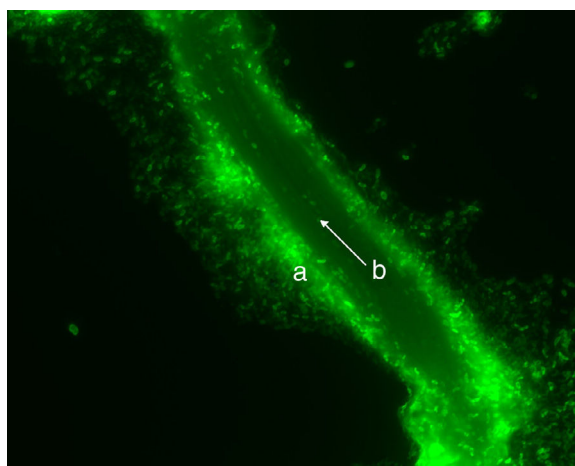
conjugación biparental, empleando como organismo dador *Escherichia coli* S17-1 previamente transformada con el plásmido pHRGFGUS y como agente de selección kanamicina (25 µg/ml). También se ha comprobado su expresión en interacción con la planta, como lo demuestra la *figura 1*, en la que se observa una gran cantidad de células fluorescentes sobre un segmento de raíz secundaria de *Arabidopsis thaliana* previamente inoculada con esta cepa marcada (a), y cierta cantidad de células fluorescentes dispuestas en hilera en el interior de dicho segmento (b), aparentemente colonizando un haz vascular.

La fluorescencia que estas bacterias le confieren a todo el sistema radical de *A. thaliana* puede ser advertida incluso sin aumento con un transiluminador bajo luz UV, tal como lo ilustra la *figura 2*.

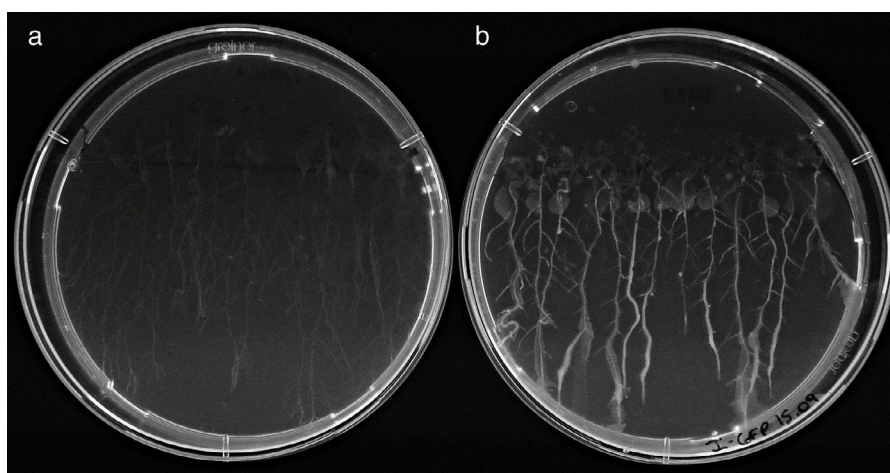
Contar con esta cepa marcada, que ha demostrado ser capaz de colonizar profusamente las raíces de la planta modelo *A. thaliana*, permitirá avanzar en el conocimiento de la interacción establecida entre *A. brasilense* Az39 —importante BPCV en Argentina— y diversos cultivos de alto impacto económico para nuestro país.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: myriamz@ffyub.uba.ar (M.S. Zawoznik).



**Figura 1** Segmento de raíz de *Arabidopsis thaliana* intensamente colonizado por *Azospirillum brasilense* Az39 marcado con GFP. a) Aglomeración de células fluorescentes en la superficie. b) Células fluorescentes en el interior de la raíz. Imagen obtenida con un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse Ti, equipado con objetivo de inmersión 60 $\times$ , apertura numérica 1,40, filtro Nikon G-2A. Se empleó una cámara DS-QI1MC Nikon Digital Sight, acoplada al software analizador de imágenes NIS-Element F.



**Figura 2** Plántulas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0 de 13 días crecidas en placas con Hoagland agarizado (1% sacarosa) sin kanamicina. a) Sin inocular. b) Inoculadas con 5  $\mu$ l de una suspensión celular ( $1 \times 10^6$  UFC/semilla) de *A. brasilense* Az39 marcado con GFP, aplicada en forma de punto a los 6 días. Imagen capturada con cámara Sony Cyber-shot bajo luz UV.

## Responsabilidades éticas

**Protección de personas y animales.** Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

**Confidencialidad de los datos.** Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

**Derecho a la privacidad y consentimiento informado.** Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

## Financiación

UBACYT 2014-2017 20020130200052BA.

## Agradecimientos

Al Ing. Agr. Alejandro Peticari (IMYZA, INTA-Castelar), por la provisión de la cepa Az39 de *A. brasilense*; al Dr. Claudio Valverde (Universidad de Quilmes), por la provisión de las cepas de *E. coli* y del plásmido empleados en el proceso de conjugación; al Dr. Nicolás Favale (Cátedra de Biología, FFyB, UBA), por la toma de imágenes con el microscopio de epifluorescencia. M.D Groppa y M.P. Benavides son miembros de la carrera de investigador de CONICET; S.M. Díaz Herrera es becaria doctoral de CONICET.

## Bibliografía

1. Diaz-Zorita M, Fernández-Canigia MV. Field performance of a liquid formulation of *Azospirillum brasilense* in dryland wheat productivity. *Eur J Soil Biol.* 2009;45:3–11.

2. García J, Creus C, Suárez Rodríguez R, Ramírez-Trujillo JA, Peticari A, Groppa MD. Respuesta temprana al estrés hídrico de plantas de maíz inoculadas con diferentes cepas de *Azospirillum brasilense*. X Reunión Nacional Científico-Técnica de Biología del Suelo y Fijación Biológica de Nitrógeno. II Congreso Nacional de Biología Molecular de Suelos, 2015, San Salvador de Jujuy, Jujuy, Argentina.
3. Leotta ED, García J, Peticari A, Bianchi DA. Tolerancia a condiciones de estrés hídrico en diferentes etapas de crecimiento de plantas de maíz (*Zea mays*) inoculadas con dos cepas de *Azospirillum brasilense*. Rev Fac Agronomía y Sc Agroalim UM. 2012;3:29–56.
4. Rodríguez Cáceres EA, di Ciocco CA, Carletti SM. 25 años de investigación de *Azospirillum brasilense* Az39 en Argentina. En: Cassán FD, García de Salamone I, editores. *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología; 2008.
5. Zawoznik MS, Ameneiros M, Benavides MP, Vázquez S, Groppa MD. Response to saline stress and aquaporins expression in *Azospirillum*-inoculated barley seedlings. Appl Microbiol Biotech. 2011;90:1389–97.