

Artículo original

Respuesta de soya (*Glycine max* (L) Merr) a la inoculación con *Azospirillum* y *Bradyrhizobium*

Mario Alberto-Casas^{1*}

Juana Pérez¹

Francisco Jerez¹

Susana Fajardo-Molina²

Cesar Morcillo- Blanco²

Mercedes Fernández-Pascual²

¹Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA), carretera CUJAE Km 1½, Rancho Boyeros, CP 19390, La Habana, Cuba

²Instituto de Ciencias Agrarias (ICA-CSIC), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Serrano 115, dpdo., CP 28006 Madrid, España

* Autor para correspondencia: mario.casas@inca.azcuba.cu; marioalbertocasas@gmail.com

RESUMEN

Azospirillum brasilense es una bacteria fijadora de nitrógeno y promotora del crecimiento vegetal con potencial como biofertilizante para plantas leguminosas y no leguminosas. Cultivos de importancia como la caña de azúcar han sido inoculados con *A. brasilense* produciendo incrementos en el crecimiento y el rendimiento de las cosechas en diferentes suelos y regiones climáticas. Experimentos en campo realizados en Cuba, de intercalamiento con caña de azúcar, inoculada con *A. brasilense* y soya, produjeron un incremento en la mayoría de los parámetros de crecimiento de la caña de azúcar, pero se desconocen los efectos de *A. brasilense* sobre soya. Este trabajo analiza las alteraciones en el desarrollo de planta y nódulos, actividad nitrogenasa y colonización por *A. brasilense* de raíces de soya inoculadas con *A. brasilense* 8-INICA y *Bradyrhizobium japonicum* USDA-110. *A. brasilense* no produjo modificaciones en la biomasa de la parte aérea de la planta ni en la actividad nitrogenasa en

nódulos. Sin embargo, se produjeron incrementos en la biomasa de raíces y nódulos con su inoculación. *A. brasilense* coloniza la superficie de la raíz de soya mediante adhesión a la capa mucilaginosa y tiene la capacidad de proliferar y formar microcolonias en ella. La ruptura causada por la emergencia de raíces secundarias permitió a la bacteria entrar en los espacios intercelulares y las diferentes capas del parénquima radicular, produciéndose la colonización. Estos resultados sugieren que *A. brasilense* 8-INICA puede vivir como endófito en raíces de soya y podría ser un candidato a inoculante de leguminosas con fines agrícolas.

Palabras clave: leguminosas, PGPRs, inoculantes bacterianos, endófitos

Recibido: 08/05/2018

Aceptado: 16/01/2019

INTRODUCCIÓN

La importancia de aumentar los rendimientos de los cultivos en los sistemas de agricultura de subsistencia, caracterizados por un uso mínimo de fertilizantes minerales pasa por mejorar las interacciones de microorganismos beneficiosos-raíz-suelo que conducen a rendimientos más altos de los cultivos ⁽¹⁾. El efecto en las leguminosas de coinoculación con simbióticos fijadores de nitrógeno y los géneros no simbióticos que promueven el crecimiento de plantas (PGPRs), están ganando cada vez más interés dentro de la fijación biológica de nitrógeno actual y se han propuesto como una nueva herramienta biotecnológica para mejorar el rendimiento y la sostenibilidad ⁽²⁾.

A. brasilense es una rizobacteria promotora del crecimiento de plantas fijadoras de nitrógeno (PGPR), con un potencial importante como biofertilizante para plantas leguminosas y no leguminosas. Cultivos de importancia agrícola, especialmente la caña de azúcar, se han inoculado a menudo con *A. brasilense*, lo que produce un aumento en los parámetros de crecimiento y rendimiento en diferentes suelos y regiones climáticas ⁽³⁾. Se han propuesto diferentes mecanismos de acción para explicar la mejora del crecimiento de las plantas, como la proliferación del sistema radical ⁽⁴⁾. La estimulación del crecimiento, generalmente se debe a la producción de fitohormonas como las auxinas, citoquininas, giberelinas ^(5,6). Además, se ha descrito la inducción de la tolerancia al estrés de las plantas y los genes de defensa ⁽⁷⁾.

La aplicación combinada de bacterias del género *Rhizobium* o *Bradyrhizobium* con *Azospirillum*, produjo un efecto positivo en las leguminosas ⁽⁸⁾. El efecto positivo da como resultado nodulación temprana, aumento en el número de nódulos, actividad de la nitrogenasa y la respiración de la raíz, así como una mejora general en la absorción de agua y nutrientes por parte de las raíces. Las características de PGPR de *Azospirillum* pueden ser la razón de su efecto sobre las coinoculaciones de leguminosas, que se relacionarían con la inducción de un mayor número de pelos radicales infectantes, diferenciados de las células epidérmicas y un aumento en la secreción de flavonoides que inducen genes *nod* ⁽⁹⁾.

El intercalamiento de cultivos es un método sostenible que se utiliza para maximizar la utilización de los recursos disponibles y podría mejorar la biodiversidad de los suelos. En suelos tropicales se ha comprobado que el cultivo intercalado de gramíneas con leguminosas representa un conjunto de ventajas, entre las cuales podemos destacar, la contribución del nitrógeno al suelo y la obtención de producciones adicionales de fibra, grasa y alimentos ⁽¹⁰⁾. Además, el intercalamiento de cultivos mejora la resiliencia, la seguridad alimentaria ⁽¹¹⁾ y la nutrición.

En experimentos de campo, en suelos cubanos de intercalamiento de caña de azúcar inoculada con *A. brasilense* y soya no inoculada ⁽¹⁰⁾, se han observado aumentos en la mayoría de los parámetros de crecimiento de la caña de azúcar, pero no se conocen los efectos producidos por la inoculación de *Azospirillum* en la otra planta intercalada. El objetivo de este trabajo fue evaluar, bajo condiciones controladas, el efecto de *A. brasilense* 8-INICA y *B. japonicum* USDA-110 por separado y la coinoculación de los dos microorganismos sobre la altura de la planta, peso fresco de tallo y raíces, peso seco de nódulos, así como actividad nitrogenasa en nódulos de las raíces de soya (*Glycine max* (L) Merr), con énfasis en la colonización de la raíz de soya por *Azospirillum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas

A. brasilense cepa 8-INICA aislada de rizosfera de caña de azúcar cv. Ja 60-5 en la provincia de Ciego de Ávila, Cuba ⁽¹²⁾ cultivada en medio NFb a 28 °C, 100 rpm y mantenida en caldo BMS ⁽¹³⁾ con glicerol al 20 % (v/v) a -80 °C. *B. japonicum* cepa USDA-110 ⁽¹⁴⁾ donada por el

Centro de Investigación y Formación Agraria Las Torres-Tomejil (Sevilla, España), cultivada y mantenida en medio Vincent ⁽¹⁵⁾.

Crecimiento de las plantas y actividad nitrogenasa

Las semillas de soya (*Glycine max* cv. Williams) se esterilizaron superficialmente en HgCl₂ al 0,1 % durante 5 min y luego se lavaron varias veces con agua destilada estéril. Las semillas se sembraron en frascos Leonard de 1 L pasados por autoclave llenos de vermiculita estéril y se inocularon con 1 mL de *A. brasilense* 8-INICA o *B. japonicum* USDA-110 en suspensiones con concentraciones del orden 10⁸ unidades formadoras de colonias (UFC. mL⁻¹). Los tratamientos fueron: plantas no inoculadas regadas con una solución de nitrato de potasio conteniendo 35 ppm de nitrógeno (tratamiento control); plantas inoculadas solo con *A. brasilense* 8-INICA; plantas inoculadas solo con *B. japonicum* USDA-110 y plantas inoculadas con los dos microorganismos. Los tratamientos de inoculación se regaron con una solución nutritiva libre de nitrógeno. Las soluciones nutritivas fueron reemplazadas tres veces por semana. Las condiciones de la cámara de crecimiento fueron: un fotoperíodo de 16 h de luz/8h de oscuridad, 25 °C día/15 °C de temperatura nocturna, 58 % de humedad relativa y un nivel de irradiación de 200 μm m⁻² s⁻¹. Se usaron tres réplicas para plantas inoculadas y no inoculadas. Después de cinco semanas, las plantas se recolectaron para determinaciones de parámetros de crecimiento de plantas y para microscopía. Se determinó la altura de la planta, el peso fresco de los tallos y las raíces, el peso seco de los nódulos y la actividad nitrogenasa en los nódulos. La actividad nitrogenasa se midió mediante el ensayo de reducción de acetileno (ARA) en raíces noduladas de plantas inoculadas con *Bradyrhizobium* y coinoculadas con *Bradyrhizobium* + *Azospirillum* respectivamente siguiendo el método descrito por otros autores ⁽¹⁶⁾.

Anticuerpos contra *Azospirillum*

Se obtuvieron anticuerpos contra *Azospirillum* para confirmar que la cepa de *Azospirillum* inoculada fue la misma que la que se encontró en las raíces de soya. La cepa *A. brasilense* 8-INICA se cultivó como se indicó anteriormente durante 24 h, en un volumen conocido de medio BMS. Se concentraron las células y se añadió formaldehído estéril al sedimento para lograr una concentración final de 5 por 1000 y se dejó durante la noche a 27 °C. Posteriormente

se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 min. El sedimento se lavó con solución salina tamponada con fosfato estéril pH 7,2 (PBS) y se suspendió en PBS estéril pH 7 hasta alcanzar 10^9 cel.mL⁻¹, medida por densidad óptica a 680 nm. Los sedimentos finales se suspendieron en cantidades iguales de adyuvante completo de Freund. Se obtuvo antisuero en conejos blancos por vía de inmunización intravenosa, una inyección cada ocho días durante cinco semanas. La sangre se recogió ocho días después de la última inyección. El suero de purga final de cada conejo se recogió mediante centrifugación de la sangre coagulada a 2.000 g y se almacenó a -20 °C. Se obtuvieron sueros de preinmunización de cada conejo.

Procesamiento de muestreo para microscopía

Solamente las plantas inoculadas con *Azospirillum* fueron procesadas para microscopía. Para probar la especificidad del antisuero, los cultivos *in vitro* de *Azospirillum* se incluyeron primero en agar ⁽¹⁷⁾. Las piezas de agar se procesaron como muestras de raíces para embeberse en resina LR-White ⁽¹⁸⁾. Se seleccionaron pequeños trozos de raíces frescas para una etapa de desarrollo comparable. Las muestras se tomaron en el momento de la cosecha, se cortaron con una cuchilla de afeitar, se fijaron en glutaraldehído al 2,5 % (v/v) en 50 mM de cacodilato de Na, pH 7,4 y se infiltraron al vacío para mejorar la penetración del fijador. La deshidratación se realizó utilizando una serie de etanol y los nódulos se infiltraron y finalmente se incluyeron en LR-White Resin (London Resin Corporation) mediante polimerización por calor a 60 °C durante 24 h en cápsulas de gelatina ⁽¹⁹⁾. Se cortaron secciones semi-gruesas (1 µm) y ultrafinas (70 nm-espesor) en un ultramicrotomo Reichert Ultracut S para microscopía óptica y microscopía electrónica, respectivamente. Las secciones semi-gruesas se tiñeron con azul de toluidina al 1% (p/v) en borato de sodio acuoso (1 %) para examen directo utilizando un fotomicroscopio Zeiss Axiophot

Microscopía óptica y electrónica: inmunocitoquímica y *silver enhancement*

Para la inmunocitoquímica y el *silver enhancement*, se colocaron portaobjetos de vidrio con secciones de 1 µm de espesor a 37 °C, durante la noche para asegurar la adhesión de las secciones. Las secciones se lavaron a fondo en PBS, pH 7,2, que contenía gelatina pura al 0,01 %, BSA al 0,1 % y azida sódica al 0,05 %. El bloqueo de los sitios de unión inespecíficos se logró mediante la incubación de secciones en la solución anterior que contenía 20 mg de

albúmina de suero bovino (BSA) por mL, durante 20 minutos a temperatura ambiente. La incubación en anticuerpos primarios (anti-*A. Brasilense* 8-INICA) diluidos 1: 500 en el mismo tampón, se llevó a cabo durante 1 h en horno a 37 °C. Las secciones se enjuagaron luego en PBS y el exceso de tampón se eliminó suavemente. La incubación con conjugado de oro anti-conejo de cabra (GAR 15 nm; BioCell, Cardiff, U.K.) diluido 1:40 en PBS se realizó durante 1 hora a temperatura ambiente. Las secciones se enjuagaron luego en PBS y agua destilada. El *silver enhancement* se llevó a cabo con el kit IntenSE M (Amersham, Buckinghamshire, U.K.) y se permitió que progresara mientras se controlaba bajo el microscopio ⁽¹⁹⁾. Las secciones se enjuagaron luego enérgicamente con agua del grifo y agua destilada, se tiñeron con 0,05 % (w/v) de fucsina básica (Carlo Erba, Milano, Italia) en etanol acuoso al 5 % (v/v), se enjuagaron y se dejaron secar. Las secciones fueron montadas y fotografiadas bajo un fotomicroscopio Zeiss Axiophot. Para microscopía electrónica, se recogieron secciones (de 70 nm de espesor) en rejillas de níquel e inmunorotuladas ⁽¹⁸⁾. La contracción de las secciones se obtuvo con acetato de uranilo acuoso al 2 % (5 min) y citrato de plomo durante 2 min. Después de enjuagar y secar al aire, se examinaron las secciones utilizando un microscopio electrónico STEM LEO 910 a un voltaje de aceleración de 80 kV.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La capacidad de *A. brasilense* para estimular el crecimiento de las plantas ha sido ampliamente demostrada ^(5,7). Informes anteriores han demostrado que la coinoculación de *Rhizobium* y *Azospirillum* mejoró la nodulación y el rendimiento de las plantas leguminosas ⁽²⁾. En nuestros resultados, la inoculación de *A. brasilense* 8-INICA no produjo cambios en la altura y la biomasa de las partes aéreas de la planta, ni en la actividad nitrogenasa (Tabla 1). Sin embargo, se observó un aumento del 61,8 % en el peso de la raíz, con respecto al control, en plantas inoculadas solamente con *Azospirillum*, mientras que se observó un aumento de solo el 6 % en plantas inoculadas sólo con *Bradyrhizobium*; no obstante, la coinoculación produjo un aumento del 11 % en este parámetro. Se observó un aumento en el peso de los nódulos del 78,9 % en plantas inoculadas, conjuntamente con plantas inoculadas solamente con *Bradyrhizobium*. Dado que el aumento en el peso de los nódulos no se tradujo en un aumento en la actividad nitrogenasa, este aumento no puede entenderse como un aumento en el número de bacteroides, sino en el tejido vegetal del nódulo. Las plantas tratadas sólo con nitrógeno o

A. brasilense 8-INICA, respectivamente, no produjeron nódulos. El aumento en el peso de la raíz y los nódulos con la inoculación de *Azospirillum* fue consistente con otros resultados en *Phaseolus vulgaris* ⁽⁹⁾ inoculado con *Rhizobium tropici* y *R. etli* y la misma especie de *Azospirillum*. El incremento del crecimiento de la raíz se puede producir mediante una mayor captación de minerales y agua ⁽²⁰⁾, por lo que las inoculaciones de soya con *Azospirillum* podrían representar una ventaja en el rendimiento del cultivo.

Tabla 1. Efectos de *A. brasilense* 8-INICA y *B. japonicum* USDA-110 y coinoculación de los dos microorganismos en los parámetros de crecimiento de la soya y la actividad nitrogenasa

Tratamiento	Altura (cm)	Brote FW (g)	Raíz FW (g)	Nódulos DW (g)	Actividad nitrogenasa ($\mu\text{mol etileno g nódulo}^{-1} \text{ h}^{-1}$)
Nitrogeno	38,55±0,96a	1,48±0,13a	3,82±0,54b	nn	-
<i>A. brasilense</i> 8-INICA	38,94±3,03a	1,40±0,16a	6,18±0,32a	nn	-
<i>B. japonicum</i> USDA-110	41,29±2,59a	1,45±0,15a	4,05±0,58b	0,019±0,003b	8,81±1,053a
<i>A.b+B.j</i>	42,40±1,73a	1,13±0,19a	4,26±0,54b	0,034±0,006a	7,96±1,19a

Leyenda: FW (peso fresco), DW (peso seco) y nn (no nódulos)

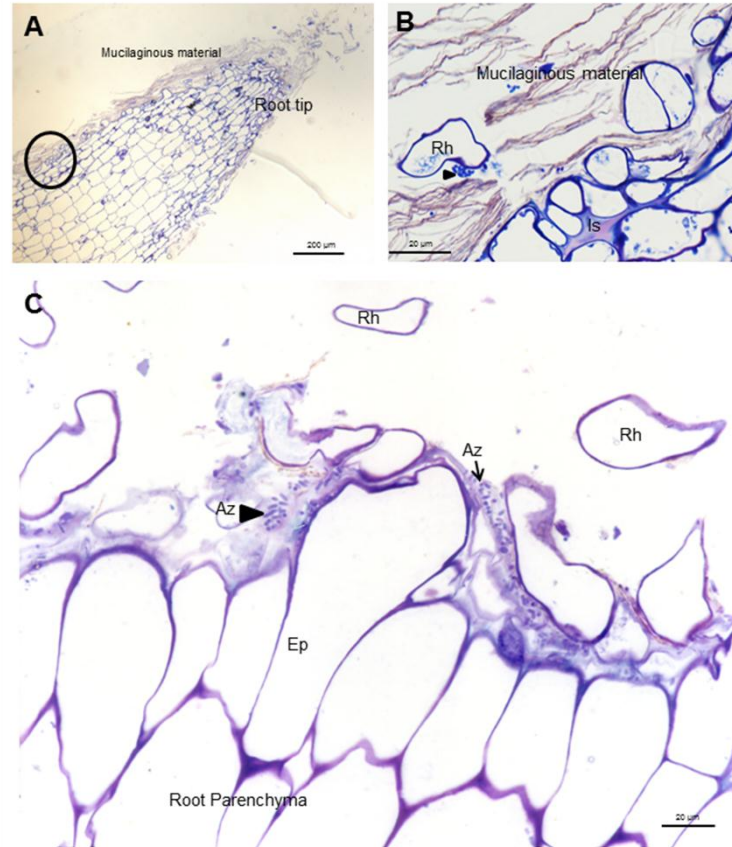
A.b+B.j: co-inoculación de *Azospirillum* y *Bradyrhizobium*

Los tratamientos con *Azospirillum* y *Bradyrhizobium* se regaron con una solución nutritiva libre de nitrógeno y con una solución que contenía 35 ppm en el tratamiento con nitrógeno. Los datos son medias seguidas de error estándar de tres repeticiones. Las medias seguidas por la misma letra dentro de una columna no son significativamente diferentes. Los datos estadísticos fueron obtenidos por SPSS.

Colonización de raíces de soya por *Azospirillum*

El establecimiento de poblaciones bacterianas eficientes en la rizosfera es esencial para mejorar la colonización de las raíces y la productividad de las plantas ⁽²¹⁾. La colonización de la raíz de soya se estudió al final del cultivo de plantas, en plantas inoculadas sólo con *Azospirillum*, utilizando microscopía óptica y electrónica e inmunocitoquímica. *A. brasilense*

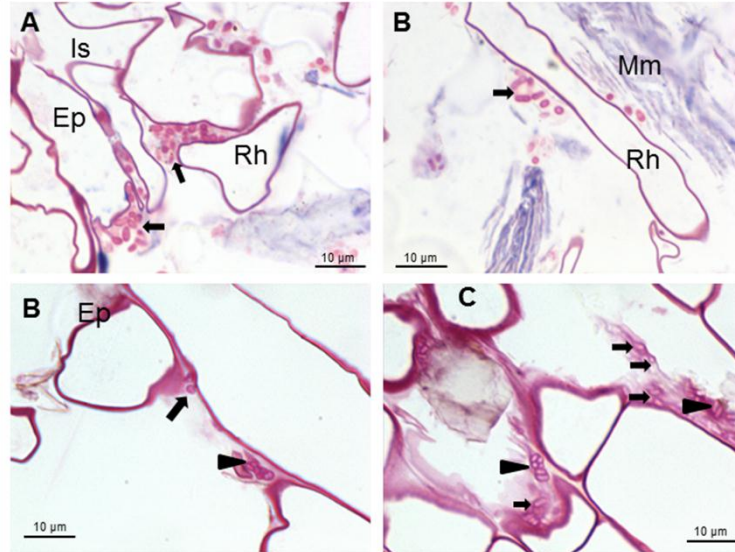
8-INICA colonizó la superficie de la raíz por adhesión al material mucilaginoso, producido por la planta donde proliferan las bacterias (Figura 1 y Figura 2A y B).



A, ápice radical B, área enmarcada de A. *Azospirillum* aislado (Az y flechas) o formando microcolonias (cabezas de flechas) dentro del material mucilaginoso Ep (epidermis), Is (intercelular) y Rh (pelo radical)

Figura 1. Micrografías ópticas de cortes longitudinales y transversales que muestran colonización de la superficie por *A. Brasilense* 8-INICA, cinco semanas después de la inoculación, teñidas con azul de toluidina

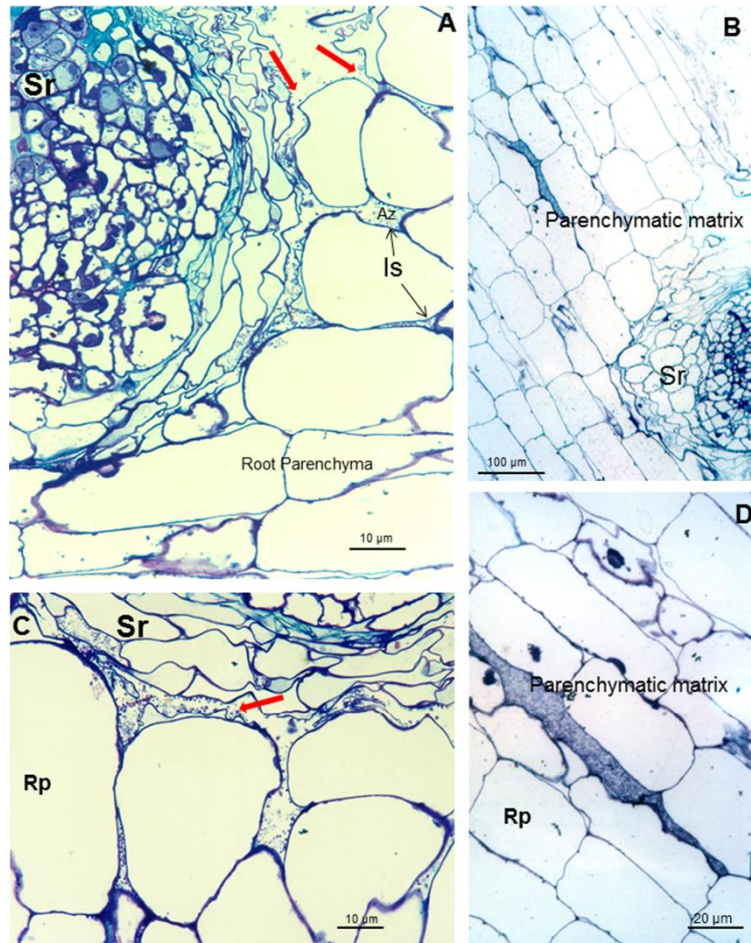
Además, se pueden observar los carbohidratos producidos por las bacterias. Los carbohidratos se detectaron mediante tinción con fucsina ⁽¹⁹⁾. (Figura 1C y Figura 2B y C).



Las flechas indican las bacterias de *Azospirillum* aisladas alrededor de los pelos radicales o formando microcolonias rodeadas por carbohidratos producidos por las bacterias (cabezas de flechas) Ep (epidermis), Is (intercelular), Rh (pelo radical) y Mm (material mucilaginoso)

Figura 2. Micrografías ópticas de cortes longitudinales que muestran la colonización de la superficie por *A brasilense* 8-INICA cinco semanas después de la inoculación, teñidas con fucsina

Estos carbohidratos podrían conferir protección a la raíz contra condiciones externas y podrían favorecer la colonización de la bacteria en su hábitat natural ⁽²²⁾. Los resultados muestran bacterias muy cerca de los pelos radicales cerca de la punta radical (Figura 1A y B). Se observan microcolonias en la superficie de la raíz embebidas en una matriz de polímero de carbohidratos de producción propia que fue consistente ⁽²³⁾, como se muestra en las figuras 2B y C (puntas de flecha) y bajo protección del pelo radical (Figuras 2A y C). Esto da lugar a la biopelícula, que es un mecanismo que permite a las bacterias vivir en condiciones extremas o cambiantes y uno de los más utilizados en la colonización competitiva de raíces por bacterias eficientes. Después de la colonización de la raíz superficial, se produce la colonización parenquimática intercelular. *Azospirillum* pudo tomar la ruptura causada por la emergencia de una raíz secundaria (Figuras 3A y B) e ingresar en los espacios intercelulares del parénquima de la raíz de la planta (Figuras 3A y C) y entre las células epidermis radical, permitiendo la colonización. La morfología de la raíz cambió como consecuencia de esta colonización, produciendo una matriz entre dos capas de células del parénquima de la raíz (Figuras 3B y D).

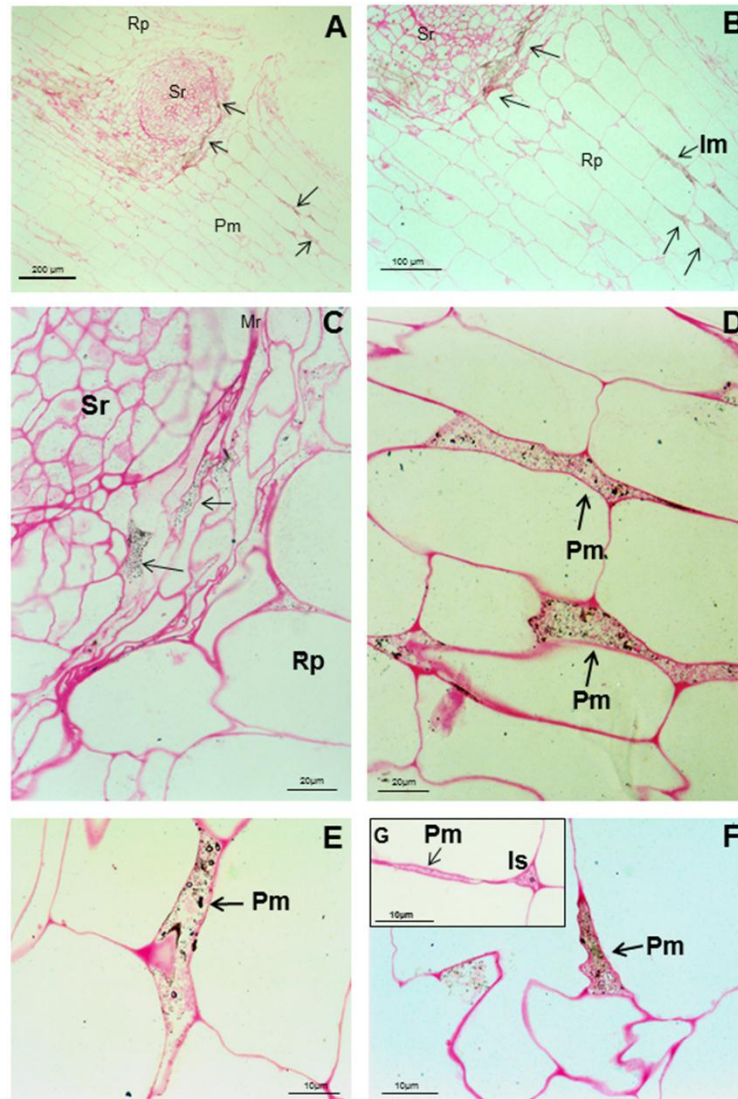


Las flechas rojas indican el espacio donde la matriz parenquimática (B) comienza a formarse entre dos capas de células. Es (espacio intercelular), Pm (matriz parenquimática), Rp (parénquima de la raíz) y Sr (raíz secundaria)

Figura 3. Micrografías ópticas de cortes longitudinales y transversales de raíces de soja inoculadas con *A. brasilense* 8-INICA que muestran colonización de las raíces después de cinco semanas de inoculación (A-C); colonización de las raíces de la soja a través de los orificios producidos por la aparición de una raíz secundaria y D los espacios intercelulares de las capas internas de las células corticales

Esta matriz parenquimática facilita el crecimiento bacteriano y las bajas presiones parciales de oxígeno para la expresión de la nitrogenasa y puede contribuir directamente al nitrógeno de la planta y asegura el intercambio de nutrientes entre las bacterias y la planta. Las bacterias del suelo y de la rizosfera pueden afectar la nutrición mineral de las plantas al cambiar las características de absorción de la raíz, debido a una modificación de la morfología de la raíz o la alteración de los mecanismos de absorción, la tasa de crecimiento relativa o la composición interna de las plantas ⁽²⁴⁾. El hecho de sobrevivir dentro de la raíz y no producir ninguna lesión

confirma este microorganismo como una bacteria endofítica ⁽²⁵⁾. Los endófitos pueden ser útiles para proteger a la planta del estrés ambiental, así como para suministrar nitrógeno y otras sustancias que promueven el crecimiento ⁽²⁶⁾.

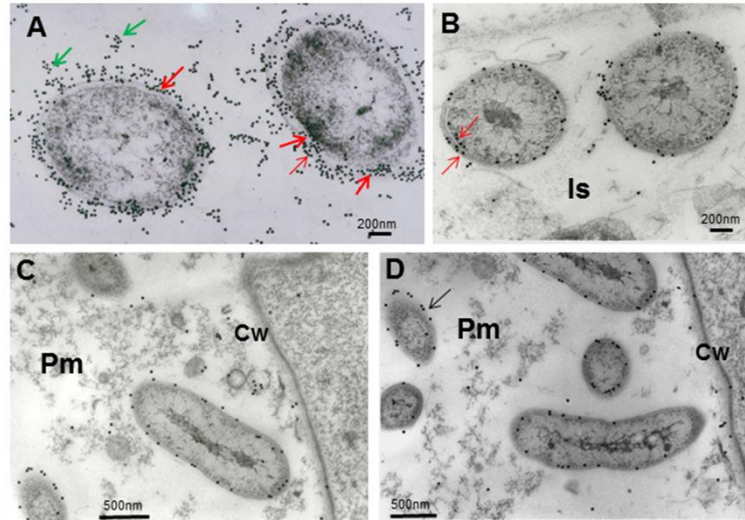


Las bacterias pueden verse como cuerpos negros y cuerpos rodeados por un círculo negro en la ruptura producida por el surgimiento de una raíz secundaria (AC), en los espacios intercelulares, el parénquima de las raíces de soja y dentro de la matriz parenquimática (D, E y F), señaladas como flechas negras. G es la ampliación del espacio intercelular y la conexión de la matriz parenquimática. Es (espacio intercelular), Pm (matriz parenquimática), Rp (parénquima de la raíz) y Sr (raíz secundaria)

Figura 4. Micrografías ópticas de cortes longitudinales y transversales a través de la raíz de soja cinco semanas después de la inoculación de semillas con *A. brasilense* 8-INICA

Las reacciones del anti-*A. brasilense* 8-INICA con el microorganismo mostraron, en el microscopio óptico, las bacterias rodeadas de partículas de oro (Figura 4). La inmunolocalización y el *silver enhancement* demuestran que se logra la colonización por *A. brasilense* 8-INICA, conociendo que las bacterias están marcadas en la ruptura causada por la aparición de una raíz secundaria (Figura 4A-C), en los espacios intercelulares (Figura 4D) y en la matriz parenquimática producida por la colonización de *Azospirillum* del parénquima de la raíz (Figura 4D-F). Con el gran aumento en la microscopía óptica (Figura 4G) se puede observar que los espacios intercelulares y la matriz parenquimática están conectados, y *Azospirillum* identificado por el anticuerpo puede verse como cuerpos rodeados por un círculo negro. Estos resultados en experimentos de inoculación en soya muestran firmemente la colonización por *Azospirillum*, lo cual es consistente con informes similares sobre arroz ⁽²⁷⁾, tabaco ⁽²⁸⁾, tomate ⁽²⁹⁾ y cebada ⁽³⁰⁾. En el caso de la caña de azúcar, la controversia de si es solo una bacteria rizosférica o asociada a la raíz o un endófito, requiere estudios adicionales que permitan aclarar este aspecto, que podría verse influido por manifestación de *quorum sensing* ⁽³⁾ y otros factores. La inmunolocalización en portaobjetos ultrafinos de células de *Azospirillum*, embebidas en agar con el anticuerpo anti-*A. brasilense* 8-INICA, muestra una enorme afinidad del anticuerpo al antígeno (Figura 5A). Hay un marcaje intenso de las bacterias con partículas de oro de 15 nm. El número de partículas de oro es elevado y marcó las diferentes capas de las envolturas celulares (Figura 5A, flechas).

La cantidad de partículas de oro disminuye considerablemente cuando el marcaje se realiza en los espacios intercelulares, como si las bacterias perdieran algunas de las capas con la colonización del parénquima de la raíz (Figura 5B), aunque también se puede observar el marcaje en diferentes capas (flechas). Dentro de la matriz parenquimática solo una capa aparece marcada (Figura 5C y D) y no se detectan partículas de oro en el interior de las bacterias. Se puede observar un marcaje inespecífico en las vesículas de la matriz parenquimática, probablemente formadas por la degradación de las membranas bacterianas (Figura 5C).



Note el intenso marcaje de las bacterias con partículas de oro de 15 nm (flechas)

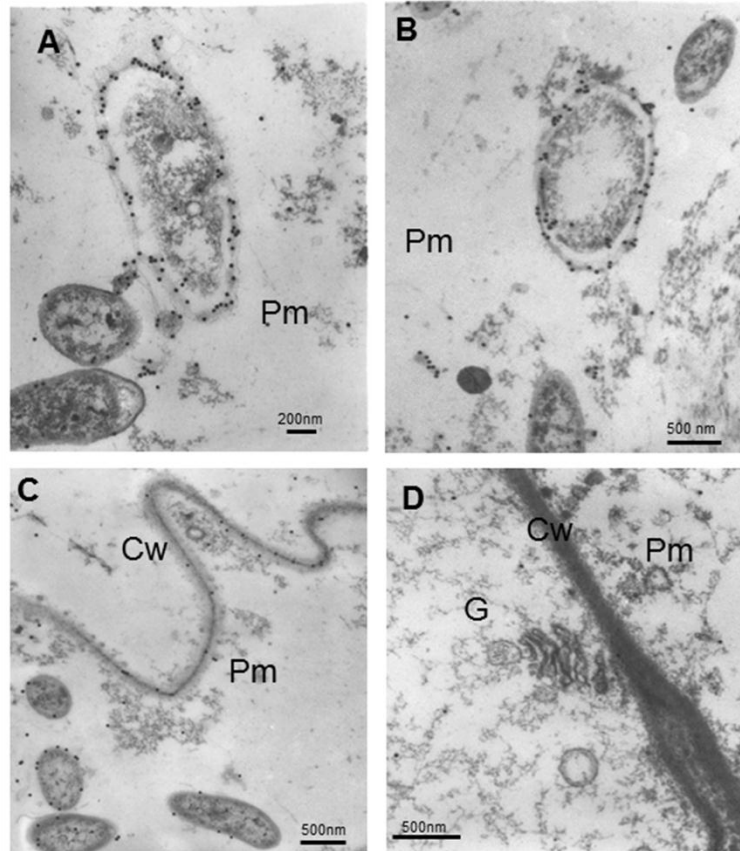
B, note la gran disminución de partículas de oro cuando las bacterias están colonizando la raíz y llegan a la matriz parenquimática

(B-D), *A. brasilense* 8-INICA dentro de la matriz parenquimática

Cw (pared celular), Is (intercelular), Pm (matriz parenquimática)

Figura 5. Micrografías electrónicas que muestran la inmunolocalización de los epítopes de *A. brasilense* 8-INICA que crecen en el medio de cultivo (A) y colonizan los espacios intercelulares y el parénquima de las raíces de soya (B-D). (A), células incluidas primero en agar y en resina LR-White

Cuando la bacteria envejece, el citoplasma se retrae y las partículas de oro permanecen en la capa más externa de las envolturas de la bacteria (Figura 6A y B). Aunque no es normal, en algunas áreas aparecen partículas de oro en la pared celular (Figura 6C). Muy pocas partículas de oro aparecen en el citoplasma de las células adyacentes a la matriz. No hay localización de partículas de oro en orgánulos envejecidos (Figura 6D).



A y B note que cuando la bacteria envejece el citoplasma se retrae y el marcaje permanece en la capa más externa de la bacteria

C y D Matriz parenquimática y células adyacentes

Cw (pared celular), G (Golgi), Pm (matriz parenquimática)

Figura 6. Micrografías electrónicas que muestran la inmunolocalización de *A. brasilense* 8-INICA colonizando los espacios intercelulares y el parénquima de las raíces de soya embebidas en la resina LR-White

Azospirillum generalmente se asocia con raíces de pastos como la caña de azúcar, el arroz y el maíz ⁽⁴⁾, lo que se traduce en beneficios para las plantas por su contribución a la nutrición. Las técnicas de microscopía e inmunolocalización permitieron confirmar en este trabajo que *A. brasilense* 8-INICA puede actuar como un endófito en las raíces de soya. Los endófitos pueden ser útiles para proteger a la planta del estrés ambiental, así como para suministrar nitrógeno y otras sustancias que promueven el crecimiento ⁽²⁶⁾. Este trabajo enfatiza que *Azospirillum* no sólo es interesante para la inoculación en caña de azúcar, sino también en la soya y, por lo tanto, funcionaría muy bien en el intercalamiento de la soya y la caña de azúcar, con la ventaja de no tener que introducir cepas extrañas en los suelos cubanos.

CONCLUSIONES

A. brasilense 8-INICA es capaz de colonizar las raíces de la soja, no sólo de forma superficial, sino también intercelular, formando una matriz parenquimática que favorece el intercambio entre la bacteria y la planta, demostrando a *A. brasilense* 8-INICA como un endófito de las raíces de soja. Además de sus efectos mejorados sobre el peso de las raíces y los nódulos en comparación con especies nodulares como *B. japonicum* USDA-110, que confirman los informes de otros investigadores, este resultado de ser un endófito en las raíces de soja es importante para lograr la sostenibilidad en la agricultura, considerando que las inoculaciones de campo son amigables con el medio ambiente y una forma económica y viable de obtener buenas producciones mediante prácticas agrícolas orgánicas. Se deben realizar estudios de campo adicionales en condiciones no controladas con esta cepa para explorar su potencial como biofertilizante en las prácticas de cultivo intercalado con esta leguminosa y caña de azúcar. Es importante destacar que *A. brasilense* 8-INICA está adaptado a las condiciones de los suelos cubanos, lo que evita que se introduzcan cepas extrañas en los ambientes de los suelos cubanos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó gracias a los proyectos AECID, A / 8500/07 y A / 019119/08 y el Ministerio de Economía y Competitividad AGL2013-40758-R, desarrollado entre el ICA-CSIC (Madrid, España) y el INICA (La Habana), Cuba).

BIBLIOGRAFÍA

1. Souza R de, Ambrosini A, Passaglia LMP. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology*. 2015;38(4):401–19. doi:10.1590/S1415-475738420150053
2. Marks BB, Megías M, Nogueira MA, Hungria M. Biotechnological potential of rhizobial metabolites to enhance the performance of *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense* inoculants with soybean and maize. *AMB Express*. 2013;3(1):21. doi:10.1186/2191-0855-3-21

3. Fukami J, Abrantes JLF, del Cerro P, Nogueira MA, Ollero FJ, Megías M, et al. Revealing strategies of quorum sensing in *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6. *Archives of Microbiology*. 2018;200(1):47–56. doi:10.1007/s00203-017-1422-x
4. Vital L, Mendoza HA. *Azospirillum*: Habitante de las Gramíneas. *Revista: La ciencia y el hombre*. 2014;XXVII(2):24.
5. Cassán F, Vanderleyden J, Spaepen S. Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. *Journal of Plant Growth Regulation*. 2014;33(2):440–59. doi:10.1007/s00344-013-9362-4
6. Spaepen S, Bossuyt S, Engelen K, Marchal K, Vanderleyden J. Phenotypical and molecular responses of *Arabidopsis thaliana* roots as a result of inoculation with the auxin-producing bacterium *Azospirillum brasilense*. *New Phytologist*. 2014;201(3):850–61. doi:10.1111/nph.12590
7. Fukami J, Ollero FJ, Megías M, Hungria M. Phytohormones and induction of plant-stress tolerance and defense genes by seed and foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* cells and metabolites promote maize growth. *AMB Express*. 2017;7(1):153. doi:10.1186/s13568-017-0453-7
8. Hungria M, Nogueira MA, Araujo RS. Soybean seed co-inoculation with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense*: a new biotechnological tool to improve yield and sustainability. *American Journal of Plant Sciences*. 2015;06(06):811–7. doi:10.4236/ajps.2015.66087
9. Burdman S, Kigel J, Okon Y. Effects of *Azospirillum brasilense* on nodulation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Soil Biology and Biochemistry*. 1997;29(5–6):923–9. doi:10.1016/S0038-0717(96)00222-2
10. Casas M, de Felipe M, Roldós J, Fernández-Pascual M, Guasch L. Co-inoculaciones de plantas de soja con bacterias de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azospirillum* y *Bacillus*. In: Arrese-Igor C, Hernando MR, Tejo PMA, editors. *Perspectivas de la fijación biológica de nitrógeno en el umbral del siglo XXI*. España: Universidad Pública de Navarra; 1998. p. 193–4.

11. Chimonyo VGP, Modi AT, Mabhaudhi T. Perspective on crop modelling in the management of intercropping systems. *Archives of Agronomy and Soil Science*. 2015;61(11):1511–29. doi:10.1080/03650340.2015.1017816
12. Pérez J, Casas M. Estudio de la interacción planta-*Azospirillum* en el cultivo caña de azúcar (*Saccharum* sp.). *Cultivos Tropicales*. 2005;26(4):13–9.
13. Baldani JI, Reis VM, Videira SS, Boddey LH, Baldani VLD. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant and Soil*. 2014;384(1–2):413–31. doi:10.1007/s11104-014-2186-6
14. Chibeba AM, Kyei-Boahen S, Guimarães M de F, Nogueira MA, Hungria M. Feasibility of transference of inoculation-related technologies: A case study of evaluation of soybean rhizobial strains under the agro-climatic conditions of Brazil and Mozambique. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 2018;261:230–40. doi:10.1016/j.agee.2017.06.037
15. Vincent JM. A manual for the practical study of root-nodule bacteria [Internet]. Edimburgo, Escocia: Oxford: [Published for the] International Biological Programme [by] Blackwell Scientific; 1970 [cited 2019 Jan 30]. 164 p. Available from: <https://trove.nla.gov.au/version/45249216>
16. Fernández-Pascual M, Pozuelo JM, Serra MT, De Felipe MR. Effects of cyanazine and linuron on chloroplast development, nodule activity and protein metabolism in *Lupinus albus* L. *Journal of plant physiology*. 1988;133(3):288–94.
17. Lucas MM, Vivo A, Pozuelo JM. Application of immunolabelling techniques to *Bradyrhizobium* dual occupation in *Lupinus nodules*. *Journal of Plant Physiology*. 1992;140(1):84–91. doi:10.1016/S0176-1617(11)81062-X
18. de María N, de Felipe MR, Fernández-Pascual M. Alterations induced by glyphosate on lupin photosynthetic apparatus and nodule ultrastructure and some oxygen diffusion related proteins. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2005;43(10–11):985–96. doi:10.1016/j.plaphy.2005.09.001
19. de Lorenzo CA, Fernández-Pascual MM, de Felipe MR. Subcellular localization of glycoprotein epitopes during the development of lupin root nodules. *Protoplasma*. 1998;201(1–2):71–84. doi:10.1007/BF01280713

20. Bashan Y, de-Bashan LE. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—a critical assessment. *Advances in Agronomy*. 2010;108:77–136. doi:10.1016/S0065-2113(10)08002-8
21. Jha PN, Gupta G, Jha P, Mehrotra R. Association of rhizospheric/endophytic bacteria with plants: a potential gateway to sustainable agriculture. *Greener Journal of Agricultural Sciences*. 2013;3(2):73–84. doi:10.15580/GJAS.2013.2.010313354
22. Zivkovic M, Miljkovic M, Ruas-Madiedo P, Strahinic I, Tolinacki M, Golic N, et al. Exopolysaccharide production and ropy phenotype are determined by two gene clusters in putative probiotic strain *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11. *Applied and Environmental Microbiology*. 2015;81(4):1387–96. doi:10.1128/AEM.03028-14
23. Flemming H-C, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*. 2016;14(9):563–75. doi:10.1038/nrmicro.2016.94
24. Xiaohui FAN, Zhang S, Xiaodan MO, Yuncong LI, Yuqing FU, Zhiguang LIU. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria and N source on plant growth and N and P uptake by tomato grown on calcareous soils. *Pedosphere*. 2017;27(6):1027–36. doi:10.1016/s1002-0160(17)60379-5
25. Reinhold-Hurek B, Hurek T. Life in grasses: diazotrophic endophytes. *Trends in Microbiology*. 1998;6(4):139–44. doi:10.1016/S0966-842X(98)01229-3
26. Waqas M, Kim Y-H, Khan AL, Shahzad R, Asaf S, Hamayun M, et al. Additive effects due to biochar and endophyte application enable soybean to enhance nutrient uptake and modulate nutritional parameters. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*. 2017;18(2):109–24. doi:10.1631/jzus.B1500262
27. Rariz Mollo G, Ferrando L, Fernandez Scavino A. Aislamiento de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno en plantas de arroz cultivadas en diferentes suelos. In: VII Congreso de Medio Ambiente [Internet]. La Plata, Argentina: Asociación de Universidades Grupo Montevideo; 2012 [cited 2019 Jan 31]. p. 20. Available from: <http://hdl.handle.net/10915/26387>
28. Chi F, Shen S-H, Chen S-F, Jing Y-X. Migration of *Azospirillum brasilense* Yu62 from root to stem and leaves inside rice and tobacco plants. *ACTA BOTANICA SINICA*. 2004;46(9):1065–70.

29. Fujita M, Kusajima M, Okumura Y, Nakajima M, Minamisawa K, Nakashita H. Effects of colonization of a bacterial endophyte, *Azospirillum* sp. B510, on disease resistance in tomato. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2017;81(8):1657–62. doi:10.1080/09168451.2017.1329621
30. Zawoznik M, Vázquez S, Díaz Herrera SM, D. Groppa M. Search for endophytic diazotrophs in barley seeds. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2014;45(2):621–5. doi:10.1590/S1517-83822014000200033

Response of soybean (*Glycine max* (L) Merr) to inoculation with *Azospirillum* and *Bradyrhizobium*

Mario Alberto-Casas^{1*}

Juana Pérez¹

Francisco Jerez¹

Susana Fajardo-Molina²

Cesar Morcillo-Blanco²

Mercedes Fernández-Pascual²

¹Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA), carretera CUJAE Km 1½, Rancho Boyeros, CP 19390, La Habana, Cuba

²Instituto de Ciencias Agrarias (ICA-CSIC), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Serrano 115, dpdo., CP 28006 Madrid, España

*Author for correspondence. mario.casas@inica.azcuba.cu; marioalbertocasas@gmail.com

ABSTRACT

Azospirillum brasilense is a nitrogen-fixing plant growth promoting rhizobacterium with potential as biofertiliser for leguminous and non-leguminous plants. Agriculturally important crops, especially sugar cane, have been often inoculated with *A. brasilense* producing increases in growth parameters and yield in different soils and climatic regions. Sugar cane inoculated with *A. brasilense* has been grown in intercropping with legumes like beans and soybean. In field experiments of intercropping of sugarcane inoculated with *A. brasilense* and soybean carried out in Cuban soils, an increase in most of the growth parameters of sugarcane have been observed, but it is not known the effects produced on the other intercropped plant. This work analyzes the alterations in plant and nodule development, nitrogenase activity and colonization of roots by *Azospirillum*, in soybean inoculated with *A. brasilense* 8-INICA and *Bradyrhizobium japonicum* USDA-110. *A. brasilense* inoculation did not produced changes in the height and biomass of aerial parts of the plant or in nitrogenase activity in nodules.

However increases in root and nodule biomass were detected with its inoculation. *A. brasilense* colonized root surface by adhesion to mucilaginous material where bacteria proliferate and are able to form microcolonies inside. The break caused by the emergence of a secondary root allowed the bacterium to enter in the intercellular spaces of plant root parenchyma and between epidermal root cells, allowing soybean root colonization. These results suggested that *A. brasilense* 8-INICA can live as an endophyte in soybean roots and could be a suitable candidate like inoculant of leguminous with agricultural purposes.

Key words: leguminous, PGPRs, bacterial inoculants, endophytes

INTRODUCTION

The importance of increasing crop yields in subsistence farming systems characterized by a minimal use of mineral fertilizers goes through improve beneficial microorganisms-root-soil interactions leading to higher crop yields ⁽¹⁾. The effect on legumes of co-inoculation with nitrogen-fixing symbiotic bacteria and non-symbiotic plant growth promoting genera (PGPRs) is gaining increasing interest within the current biological nitrogen fixation and has been proposed like a new biotechnological tool to improve yield and sustainability ⁽²⁾.

A. brasilense is a nitrogen-fixing plant growth promoting rhizobacterium (PGPR) with a substantial potential as biofertilizer for leguminous and non-leguminous plants. Agriculturally important crops, especially sugar cane, have been often inoculated with *A. brasilense* producing increase in growth parameters and yield in different soils and climatic regions ⁽³⁾. Different mechanisms of action have been proposed to explain the enhancement of plant growth, like proliferation of the root system ⁽⁴⁾. The stimulation of growth is usually due to the production of phytohormones such as auxins, cytokinins, gibberellins ^(5,6). Furthermore induction of plant-stress tolerance and defense genes has been described ⁽⁷⁾.

The combined application of bacteria of the genus *Rhizobium* or *Bradyrhizobium* with *Azospirillum*, produced a positive effect on legumes ⁽⁸⁾. The positive effect results in early nodulation, increase in nodule numbers, nitrogenase activity and root respiration, as well as an overall improvement in the uptake of water and nutrients by the roots. *Azospirillum* PGPR characteristics may be the reason for its effect on legume co-inoculations, which would be related to the induction of a greater number of infective root hairs, differentiated from epidermal cells and an increase in the secretion of flavonoids inducing *nod* genes ⁽⁹⁾.

Intercropping is a sustainable method for crop production used to maximize utilization of available resources and could improve biodiversity of soils. In tropical soils it has been proven that the intercropping of grasses with legumes, represents a group of advantages among which we can point out the contribution of nitrogen to the soil and the obtaining of additional productions of fiber, fat and food ⁽¹⁰⁾. Furthermore, intercropping improves resilience, food security ⁽¹¹⁾ and nutrition.

In field experiments of intercropping of sugarcane inoculated with *A. brasilense* and not-inoculated soybean, carried out in Cuban soils ⁽¹⁰⁾, increases in most of the growth parameters of sugarcane have been observed, but it is not known the effects produced by *Azospirillum* inoculation on the other intercropped plant. The aim of this work was to evaluate, under controlled conditions, the effect of *A. brasilense* 8-INICA and *B. japonicum* USDA-110 by separated and co-inoculation of the two microorganisms in plant height, shoot and root fresh weight, nodule dry weight and nitrogenase activity in nodules of soybean roots (*Glycine max* (L) Merr), emphasizing in soybean root colonization by *Azospirillum*.

MATERIALS AND METHODS

Strains

A. brasilense 8-INICA strain isolated from sugarcane cv. Ja 60-5 rhizosphere in Ciego de Ávila province, Cuba ⁽¹²⁾ cultured in NFb medium at 28 °C, 100 rpm and maintained in BMS broth ⁽¹³⁾ containing 20 % (v/v) glycerol at -80 °C. *B. japonicum* USDA-110 ⁽¹⁴⁾ donated by Centro de Investigación y Formación Agraria Las Torres-Tomejil (Sevilla, Spain), grown and maintained in Vincent medium ⁽¹⁵⁾.

Plant growth and nitrogenase activity

Soybean (*Glycine max* cv. Williams) seeds were surface sterilized in 0.1 % HgCl₂ for 5 min and then washed several times with sterile distilled water. Seeds were sown in 1 L autoclaved Leonard jars filled with sterile vermiculite and inoculated with 1 mL of *A. brasilense* 8-INICA or *B. japonicum* USDA-110 suspension containing 10⁸ colony forming units (CFU mL⁻¹). Treatments were: Nitrogen (control treatment) non-inoculated plants and watered with a solution containing 35 ppm of nitrogen in form of potassium nitrate, plants inoculated only with *A. brasilense* 8-INICA, plants inoculated only with *B. japonicum* USDA-110 and plants

inoculated with the two microorganisms. The inoculations treatments were watered with a free nitrogen nutritive solution. Nutrive solutions were replaced three times per week. The conditions of the growth chamber were: a 16-h-light/8-h-dark photoperiod, 25 °C day/15 °C night temperature, 58 % relative humidity and an irradiance level of 200 $\mu\text{m m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Three replicates were used for inoculated and non-inoculated plants. After five weeks plants were harvested for plant growth parameter determinations and microscopy purposes. It was determined plant height, shoot and root fresh weight, nodule dry weight and nitrogenase activity in nodules. Nitrogenase activity was measured by the acetylene reduction assay (ARA) on nodulated roots from plants inoculated with *Bradyrhizobium* and co-inoculated with *Bradyrhizobium* + *Azospirillum*, following the method described by other authors ⁽¹⁶⁾.

Antibody against *Azospirillum*

Antibodies against *Azospirillum* were obtained in order to confirm that the strain of *Azospirillum* inoculated was the same that those that was found in soy roots. *A. brasilense* 8-INICA strain was cultivated as indicated above for 24 h, in a known volume of BMS medium. Cells were harvested and sterile formaldehyde was added to the pellet to achieve a final concentration of 5 per 1000 and left overnight at 27 °C. Cells were centrifuged at 5000 rpm for 5 min. The pellet was washed with sterile phosphate buffer saline pH 7.2 (PBS) and suspended in sterile PBS pH 7 until reaching 10^9 cell mL^{-1} , measured by optical density at 680 nm. The final pellets were suspended in equal quantities of Freund's complete adjuvant. Antiserum was obtained in white rabbits by intravenous immunization route, one injection every eight days for five weeks. Blood was collected eight days after the last injection. The final bleed-out serum from each rabbit was collected by centrifuging clotted blood at 2.000 g and stored at -20 °C. Preimmunization sera were obtained from each rabbit.

Processing of sampling for microscopy

Only plants inoculated with *Azospirillum* were processed for microscopy. In order to prove the specificity of the antiserum, *Azospirillum* *in vitro* cultures were embedded first in agar ⁽¹⁷⁾. The agar pieces were processed as root samples to be embedded in LR-White resin ⁽¹⁸⁾. Small pieces of fresh roots were selected for a comparable stage of development. Samples were taken at harvest time, cut with a razor blade, fixed in 2.5 % (v/v) glutaraldehyde in 50

mM Na-cacodylate, pH 7.4 and vacuum-infiltrated to enhance penetration of the fixative. Dehydration was performed using an ethanol series and nodules pieces were infiltrated and finally embedded in LR-White Resin (London Resin Corporation) by heat polymerization at 60 °C for 24 h in gelatin capsules ⁽¹⁹⁾. Semi-thick (1 µm) and ultrathin (70 nm-thick) sections were cut in a Reichert Ultracut S ultramicrotome for light microscopy, and electron microscopy, respectively. The semi-thick sections were stained with 1 % (w/v) toluidine blue in aqueous sodium borate (1 %) for direct examination using a Zeiss Axiophot photomicroscope.

Light and electron microscopy: immunocytochemistry and silver enhancement

For immunocytochemistry and silver enhancement, glass slides with 1 µm thick sections were placed at 37 °C, overnight to ensure adhesion of sections. Sections were thoroughly washed in PBS, pH 7.2, containing 0.01 % pure gelatin, 0.1 % BSA, and 0.05 % sodium azide. Blocking of unspecific binding sites was achieved by incubation of sections in the above solution containing 20 mg of Bovine Serum Albumine (BSA) per mL, for 20 min at room temperature. Incubation in primary antibodies (anti-*A. brasiliense* 8-INICA) diluted 1:500 in the same buffer, was carried out for 1 h in oven at 37 °C. Sections were then rinsed in PBS and the excess of buffer gently removed. Incubation with goat anti-rabbit gold conjugate (GAR 15 nm; BioCell, Cardiff, U.K.) diluted 1:40 in PBS was performed for 1 h at room temperature. Sections were then rinsed in PBS and distilled water. Silver enhancement was carried out with IntenSE M Silver Enhancement Kit (Amersham, Buckinghamshire, U.K.) and allowed to progress while monitored under the microscope ⁽¹⁹⁾. Sections were then energetically rinsed in tap and distilled water, counterstained with 0.05 % (w/v) basic fuchsine (Carlo Erba, Milano, Italy) in 5 % (v/v) aqueous ethanol, rinsed and let to dry. Sections were then mounted and photographed under a Zeiss Axiophot photomicroscope. For electron microscopy, sections (70 nm thick) were collected on nickel grids and immunolabelled ⁽¹⁸⁾. Counterstaining of sections was obtained with 2 % aqueous uranyl acetate (5 min) and lead citrate for 2 min. After rinsing and air-drying, sections were examined using a STEM LEO 910 electron microscope at an accelerating voltage of 80 kV.

RESULTS AND DISCUSSION

The ability of *A. brasilense* to stimulate plant growth has been extensively demonstrated ^(5,7). Previous reports have shown that co-inoculation of *Rhizobium* and *Azospirillum* enhanced the nodulation and yield of leguminous plants ⁽²⁾. In our results, *A. brasilense* 8-INICA inoculation did not produced changes in the height and biomass of aerial parts of the plant nor in nitrogenase activity (Table 1). However an increase of 61.8 % in root weight with respect to control was observed in plants inoculated only with *Azospirillum*, while an increase of only 6 % was observed in plants inoculated only with *Bradyrhizobium*. Nevertheless co-inoculation produced an increase of 11 % in this parameter. An increase in nodule weight of 78.9 % was observed in co-inoculated plants with respect to plants inoculated only with *Bradyrhizobium*. Since the increase in the weight of the nodules did not translate into an increase in nitrogenase activity, this increase cannot be understood as an increase in the number of bacteroids, but rather in the vegetable tissue of the nodule. Plants treated only with nitrogen or *A. brasilense* 8-INICA respectively did not produce nodules. The increase in root and nodule weight with *Azospirillum* inoculation was consistent with others results in *Phaseolus vulgaris* ⁽⁹⁾ inoculated with *Rhizobium tropici* and *R. etli* and the same species of *Azospirillum*. Improvement of root growth can be produced by enhanced uptake of minerals and water ⁽²⁰⁾, thus, *Azospirillum* inoculations of soybean could represent an advantage in crop yield.

Table 1. Effects of *A. brasilense* 8-INICA and *B. japonicum* USDA-110 and co-inoculation of the two microorganisms on soybean growth parameters and nitrogenase activity

Treatments	Height (cm)	Shoot FW (g)	Root FW (g)	Nodules DW (g)	Nitrogenase activity ($\mu\text{mol ethylene g nodule}^{-1} \text{ h}^{-1}$)
Nitrogen	38.55±0.96a	1.48±0.13a	3.82±0.54b	nn	-
<i>A. brasilense</i> 8-INICA	38.94±3.03a	1.40±0.16a	6.18±0.32a	nn	-
<i>B. japonicum</i> USDA-110	41.29±2.59a	1.45±0.15a	4.05±0.58b	0.019±0.003b	8.81±1.053a

<i>A.b+B.j</i>	42.40±1.73a	1.13±0.19a	4.26±0.54b	0.034±0.006a	7.96±1.19a
----------------	-------------	------------	------------	--------------	------------

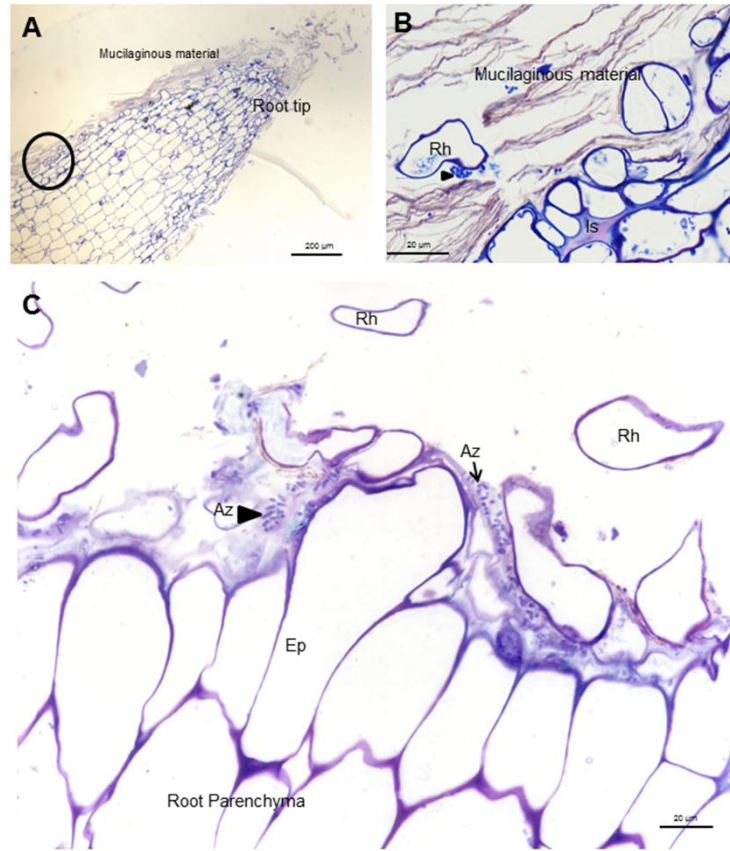
Legend: FW (Fresh Weight), DW (Dry Weight) and nn (no nodules)

A.b+B.j: co-inoculation of *Azospirillum* and *Bradyrhizobium*

Azospirillum and *Bradyrhizobium* treatments were watered with a nitrogen free nutritive solution and with a solution containing 35 ppm in the nitrogen treatment. Data are means followed by standard error of three repetitions. Means followed by the same letter within a column are not significantly different. Statistical data were obtained by SPSS.

Soybean roots colonization by *Azospirillum*

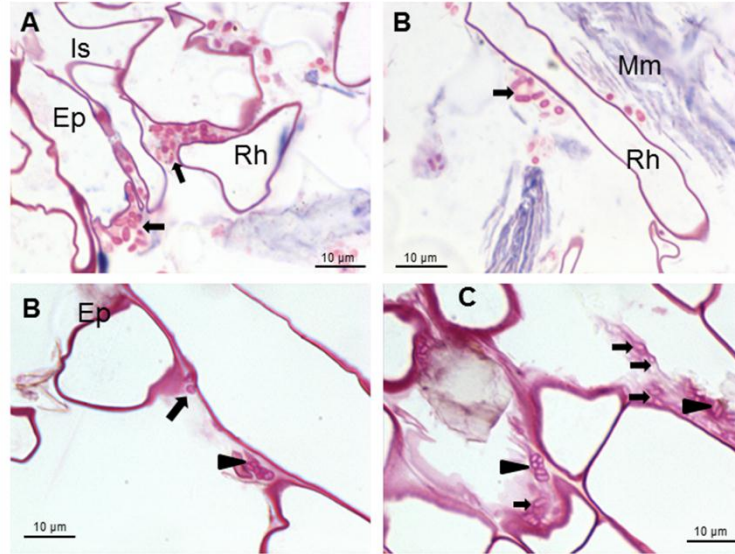
The establishment of efficient bacterial populations in the rhizosphere is essential to improve root colonization and plant productivity ⁽²¹⁾. Soybean root colonization was studied at the end of plant culture in plants inoculated only with *Azospirillum*, using light and electron microscopy and immunocytochemistry. *A. brasilense*8-INICA colonized root surface by adhesion to mucilaginous material produced by the plant where bacteria proliferate (Figure 1 and Figure 2A and B).



A, root apice B, framed area of A. *Azospirillum* isolated (Az and arrows) or forming microcolonies (arrows heads) inside the mucilaginous material Ep (Epidermis), Is (intercellular) and Rh (root hair)

Figure 1. Light micrographs of longitudinal and transverse sections showing *A. Brasilense* 8-INICA, surface colonization five weeks after inoculation, stained with toluidine blue

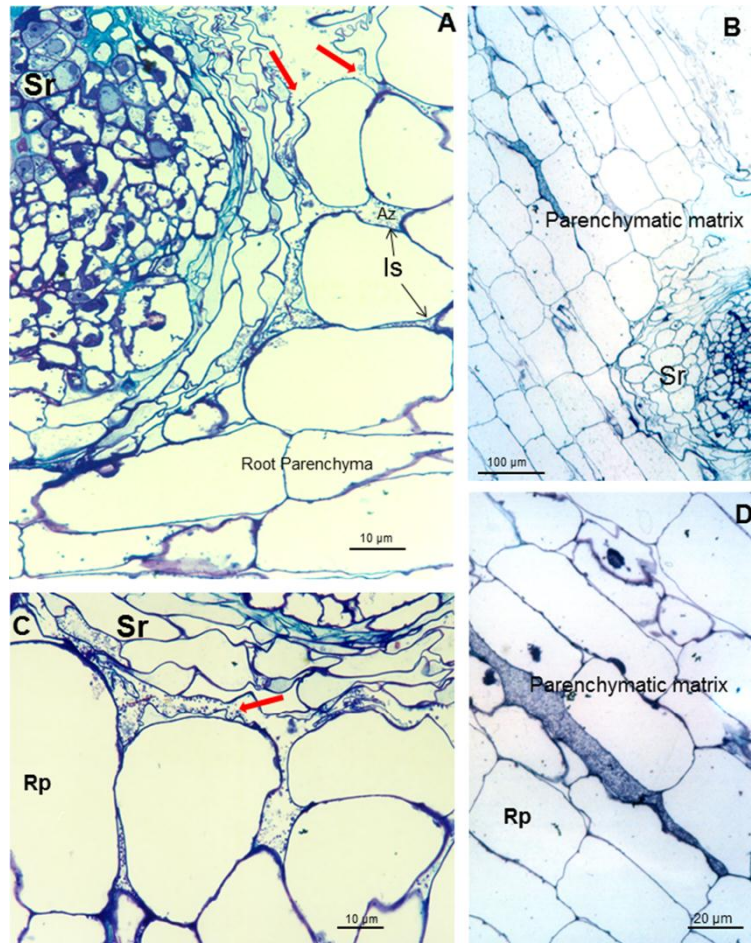
Furthermore, carbohydrates produced by the bacteria can be observed. Carbohydrates were detected by fuchsine staining ⁽¹⁹⁾. (Figure 1C and Figure 2B and C).



Arrows indicate *Azospirillum* bacteria isolated around the root hairs or forming microcolonies surrounded by carbohydrates produced by the bacteria (arrows heads) Ep (Epidermis), Is (Intercellular), Rh (Root hair) and Mm (Mucilaginous material)

Figure 2. Light micrographs of longitudinal sections showing *Azospirillum brasilense* 8-INICA surface colonization five weeks after inoculation, stained with fuchsin

These carbohydrates could be able to confer protection to the root against external conditions and may favor colonization of the bacterium in its natural habitat ⁽²²⁾. Results show bacteria very close to root hairs near the radicular tip (Figure 1A and B). Microcolonies are observed on the root surface embedded in a self-produced carbohydrate polymer matrix which was consistent ⁽²³⁾, as shown in figures 2B and C (arrowheads) and under protection of the root hair (Figures 2A and C). This gives rise to biofilm, which is a mechanism that allows bacteria to live in extreme or changing conditions and one of the most widespread used in competitive root colonization of efficient bacteria. After surface root colonization, the intercellular parenchymatic colonization is produced. *Azospirillum* was able to take the break caused by the emergence of a secondary root (Figures 3A and B) and enter in the intercellular spaces of plant root parenchyma (Figures 3A and C) and between epidermal root cells allowing the colonization. Root morphology changed as a consequence of this colonization, producing a matrix between two layers of parenchyma root cells (Figures 3B and D).

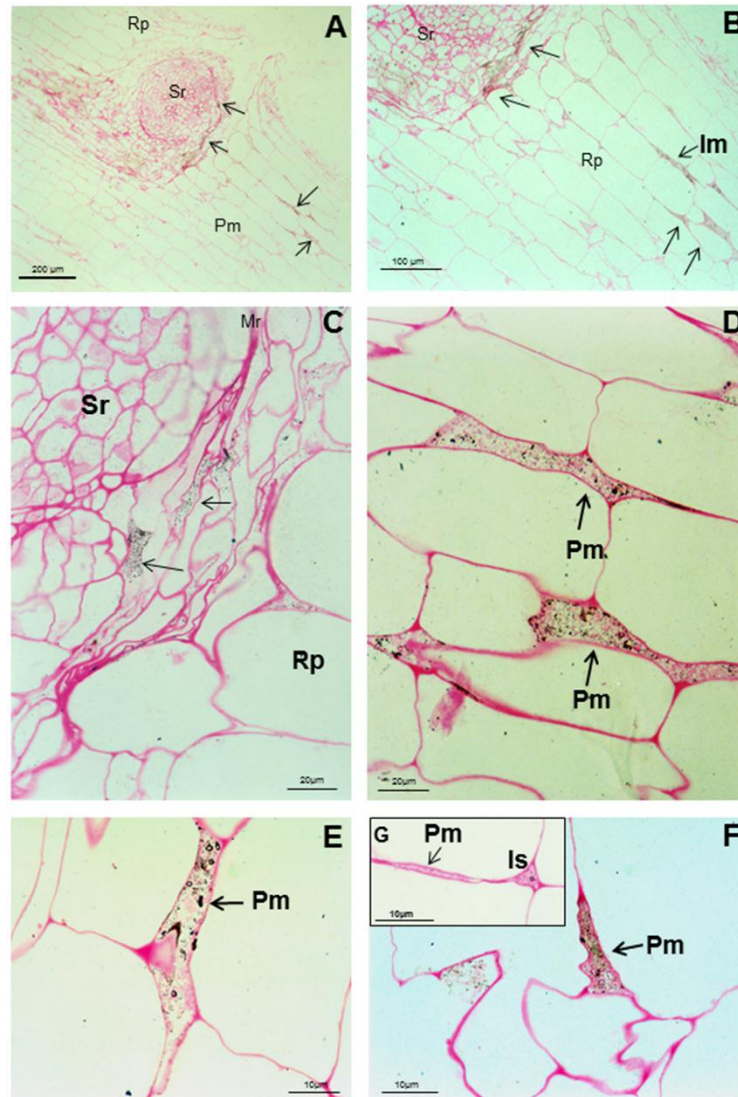


Red arrows indicate the gap where the parenchymatic matrix (B) starts to be formed between two layers of cells. Is (Intercellular space), Pm (Parenchymatic matrix), Rp (root parenchyma) and Sr (Secondary root)

Figure 3. Light micrographs of longitudinal and transverse sections of soybean roots inoculated with *A. brasilense* 8-INICA showing root colonization after five weeks of inoculation (A-C); colonization of soybean roots through the gaps produced by the emergence of a secondary root and D the intercellular spaces of inner layers of cortical cells

This parenchymatic matrix facilitates bacterial growth and the low oxygen partial pressures for the expression of nitrogenase and can directly contribute to nitrogen to the plant and the exchange of nutrients between the bacteria and the plant is assured. Soil and rhizosphere bacteria can affect the mineral nutrition of plants by changing root-uptake characteristics, due to a modification of root morphology or alteration of uptake mechanisms, relative growth rate or internal composition of plants ⁽²⁴⁾. The fact to survive inside the root and not producing any injuries confirm this microorganism as an endophytic bacterium ⁽²⁵⁾. Endophytes can be helpful

in protecting the plant from environmental stress as well as in supplying the plant with nitrogen and other growth promoting substances ⁽²⁶⁾.



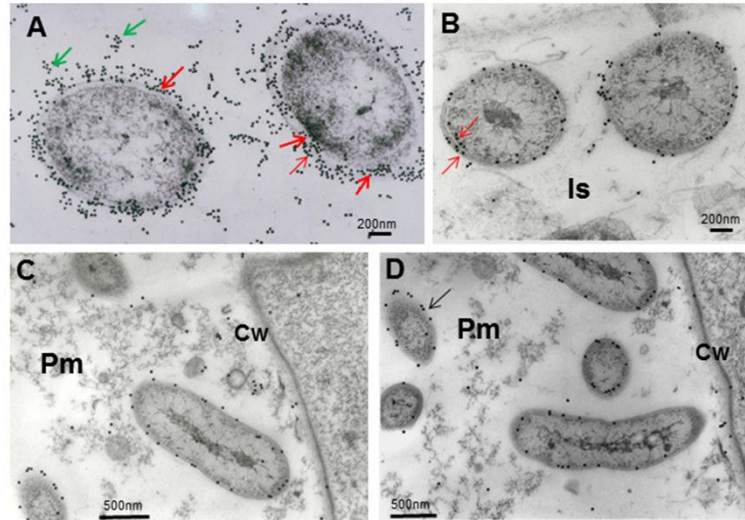
The bacteria can be seen as black bodies and bodies surrounded by a black circle in the rupture produced by the emergence of a secondary root (CA), in the intercellular spaces, the parenchyma of the roots of soybean and within the parenchyma matrix (D, E and F), marked as black arrows. G is the expansion of the intercellular space and the connection of the parenchymal matrix. It is (intercellular space), Pm (parenchymal matrix), Rp (parenchyma of the root) and Sr (secondary root)

Figure 4. Light micrographs of longitudinal and transverse sections through soybean root five weeks after seed inoculation with *A. brasilense* 8-INICA

Anti-*A. brasilense* 8-INICA reactions with the microorganism, showed, at light microscopy, the bacteria surrounded by gold particles (Figure 4). Immunolocalization and silver

enhancement demonstrates that colonization by *A. brasilense* 8-INICA is achieved, knowing that the bacteria are labelled in the break caused by the emergence of a secondary root (Figure 4A-C), in the intercellular spaces (Figure 4D) and in the parenchyma matrix produced by *Azospirillum* colonization of plant root parenchyma (Figure 4D-F). With the high magnification at light microscopy (Figure 4G) it can be observed that the intercellular spaces and the parenchymatic matrix are connected, and *Azospirillum* identified by the antibody can be seen as bodies surrounded by a black circle. These results in inoculation experiments in soybean firmly show colonization by *Azospirillum* which is consistent with similar reports on rice ⁽²⁷⁾, tobacco ⁽²⁸⁾, tomato ⁽²⁹⁾ and barley ⁽³⁰⁾. In the case of sugarcane, the controversy of whether it is only a rhizospheric or a root associated bacterium or an endophyte requires further studies leading to clarify this aspect which could be influenced by *quorum sensing* ⁽³⁾ and other factors. Immunolocalization in ultrathin slides of *Azospirillum* cells embedded in agar with the antibody anti-*A. brasilense* 8-INICA shows an enormous affinity of the antibody to the antigen (Figure 5A). There is intense labeling of the bacteria with 15 nm gold particles. The number of gold particles is elevated and marked the different layers of the cellular envelopes (Figure 5A, arrows).

The number of gold particles decreases considerably when the marking is done in the intercellular spaces, as if the bacteria would lose some of the layers with the colonization of the root parenchyma (Figure 5B), although still labeling in different layers can also be observed (arrows). Inside the parenchymatic matrix only one layer is labeled (Figure 5C and D) and no gold particles are detected inside the bacteria. Unspecific labeling can be observed in vesicles of the parenchymatic matrix, probably formed by bacterium membranes degradation (Figure 5C).



(A), cells embedded first in agar and in LR-White resin

Note the intense labeling of the bacteria with 15 nm gold particles (arrows)

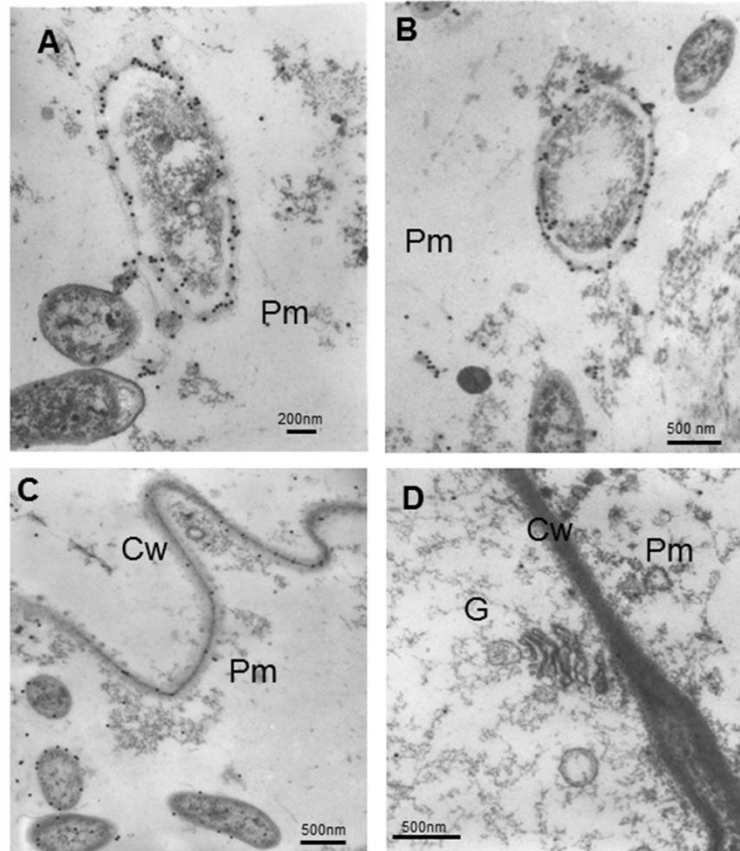
B, note the big decrease of gold particles when the bacteria are colonizing the root and arrive to parenchymatic matrix

(B-D), *A. brasilense* 8-INICA inside the parenchymatic matrix

Cw (Cell wall), Is (Intercellular), Pm (Parenchymatic matrix)

Figure 5. Electron micrographs showing immunolocalization of *A. brasilense* 8-INICA epitopes growing in culture medium (A) and colonizing the intercellular spaces and the parenchyma of soybean roots (B-D)

When the bacterium ages, the cytoplasm is retracted and the gold particle remains on the outermost layer of the bacterium envelopes (Figure 6A and B). Although not normal, in some areas appear gold particles on the cell wall (Figure 6C). Very few gold particles appear in the cytoplasm of adjacent cells to the matrix. There is no localization of gold particles in aged organelles (Figure 6D).



A and B note that when the bacteria age, the cytoplasm retracts and the label remains on the outermost layer of the bacteria

C and D Parenchymatic matrix and adjacent cells. Cw (Cell wall), G (Golgi), Pm (Parenchymatic matrix)

Figure 6. Electron micrographs showing immunolocalization of *A. brasilense* 8-INICA, colonizing the intercellular spaces and the parenchyma of soybean roots embedded in LR-White resin

Azospirillum is usually associated with roots of grasses such as sugar cane, rice and maize ⁽⁴⁾, translating benefits to the plants for its contribution to nutrition. Microscopy techniques and immunolocalization allowed to confirm in this work that *A. brasilense* 8-INICA can act as an endophyte in soybean roots. Endophytes can be helpful in protecting the plant from environmental stress as well as in supplying the plant with nitrogen and other growth promoting substances ⁽²⁶⁾. This work emphasizes that *Azospirillum* is not only interesting for sugarcane inoculation, but also for soybean and therefore would work very well in intercropping of soybean and sugarcane, with the advantage of not having to introduce foreign strains in Cuban soils.

CONCLUSIONS

A. brasilense 8-INICA is able to colonize soybean roots, not only superficially but also intercellularly forming a parenchymatic matrix which favors the exchange between the bacterium and the plant, making *A. brasilense* 8-INICA an endophyte of soybean roots. Besides its enhanced effects on root and nodule weight in comparison with nodulating species like *B. japonicum* USDA-110, which confirm reports of other researchers, this result of being an endophyte in soybean roots is important in order to accomplish sustainability in agriculture, considering that field inoculations are environmental friendly and an economical feasible way to obtain good productions by means of organic agricultural practices. Further field studies under non-controlled conditions must be carried out with this strain in order to explore its potential as a biofertilizer in intercropping practices with this leguminous and sugarcane. Is important to emphasize that *A. brasilense* 8-INICA is fit to Cuban soils conditions which avoids foreign strains to be introduced in Cuban soil environments.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was done thanks to the AECID projects, A / 8500/07 and A / 019119/08, and Ministerio de Economía y Competitividad AGL2013-40758-R, developed between ICA-CSIC (Madrid, Spain) and INICA (Havana, Cuba).