

T. Rev. 16/67

T
16
97

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL



UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha ... 31.07.97 ...
ENTRADA NUM. ... 308 ...

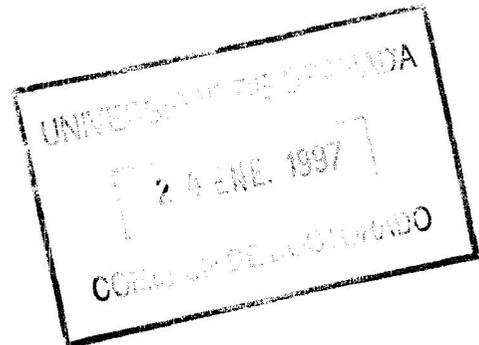
**CONTRIBUCIÓN RELATIVA DE LOS
SIMBIOTES EN LA FIJACIÓN DE
NITRÓGENO POR *Phaseolus vulgaris* EN
CONDICIONES DE ESTRÉS SALINO**

Doris Zúñiga Dávila

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
Nº Documento <u>619688131</u>
Nº Copia <u>121240383</u>

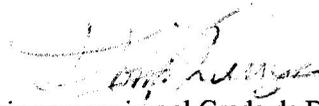
TESIS DOCTORAL

1997



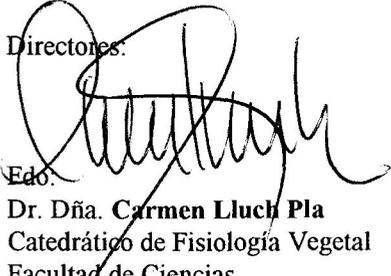
**CONTRIBUCIÓN RELATIVA DE LOS
SIMBIOTES EN LA FIJACIÓN DE
NITRÓGENO POR *Phaseolus vulgaris* EN
CONDICIONES DE ESTRÉS SALINO**

**Departamento de Biología Vegetal
Facultad de Ciencias
Universidad de Granada**



Memoria para aspirar al Grado de Doctora
por la Licenciada en Ciencias Biológicas
Dña. Doris Zúñiga Dávila

Directores:



Edo.

Dr. Dña. Carmen Lluçh Pla
Catedrático de Fisiología Vegetal
Facultad de Ciencias
Universidad de Granada



Fdo:

Dr. D. Juan Sanjuan Pinilla
Colaborador Científico
Departamento de Microbiología
Estación Experimental del Zaidín (CSIC)

ÍNDICE

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
1. FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO	6
2. LEGUMINOSAS: ORDEN LEGUMINALES	7
2.1. <i>Phaseolus vulgaris</i> L.....	8
2.1.1. Aspectos botánicos.....	8
2.1.2. Origen y domesticación	8
2.1.3. Aspectos fisiológicos: crecimiento.	11
2.1.3.1. Fotosíntesis.....	11
2.1.3.2. Metabolismo del nitrógeno.....	12
2.1.4. Aspectos fisiológicos: Desarrollo.....	12
2.1.4.1. Germinación.....	12
2.1.4.2. Contenido proteico y de carbohidratos de las semillas.....	13
2.1.4.3. Crecimiento vegetativo.....	13
2.1.4.4. Crecimiento reproductor.....	14
2.1.4.5. Senescencia y abscisión.....	14
2.1.5. Aspectos agronómicos.....	15
3. FAMILIA RHIZOBIACEAE	16
3.1. Taxonomía del <i>Rhizobium</i>	16
4. SIMBIOSIS <i>Rhizobium</i>-LEGUMINOSA	19
4.1. Organización de los genes nod, nif y fix.....	19
4.2. Componentes de superficie de la bacteria necesarios para el desarrollo de los nódulos.....	20
4.2.1. Exopolisacaridos.....	20
4.2.2. Lipopolisacáridos.....	21
4.2.3. β -Glucanos periplásmicos	22
4.3. Formación del nódulo	22
4.4. Bioquímica de la fijación de nitrógeno: actividad nitrogenasa.....	24
4.5. Nodulinas	25
5. FIJACIÓN DE NITRÓGENO EN <i>PHASEOLUS VULGARIS</i>	27

6. SALINIDAD	29
6.1. Aspectos salinos del suelo	29
6.2 Efecto de la salinidad en la planta	30
6.2.1. En la germinación	30
6.2.2. En el crecimiento	32
6.2.3. Mecanismos de respuesta al estrés salino	33
6.3. Respuesta al estrés salino de <i>Phaseolus vulgaris</i>	35
6.4. Respuesta al estrés salino en la bacteria	36
6.4.1. Efecto del estrés salino en el crecimiento y metabolismo de la bacteria	36
6.4.2. Efecto del estrés salino en los perfiles de LPS y proteínas	38
6.4.3. Osmoregulación en bacterias	39
6.5. Efecto del estrés salino en la nodulación y fijación de nitrógeno	41
7. NUTRICIÓN INORGÁNICA	44
MATERIAL Y MÉTODOS	51
1. MATERIAL BIOLÓGICO	52
1.1. Material vegetal	52
1.2. Microorganismos	52
2. MEDIOS DE CULTIVO	53
2.1. Solución nutritiva para plantas	53
2.2. Medios de cultivo para las bacterias	54
2.2.1. Medio YEM	54
2.2.2. Medio TY	54
2.2.3. Medio Mínimo (MM)	55
2.2.4. Medio LB	55
2.3. Conservación de las cepas bacterianas	55
3. TOLERANCIA AL NaCl DE DIFERENTES CEPAS DE <i>Rhizobium</i>	56
3.1. Tolerancia a la sal en medio YEM	56
3.2. Curvas de crecimiento en medio mínimo en función de la salinidad	56
4. OBTENCION DE CEPAS MUTANTES TOLERANTES A LA SALINIDAD	57
4.1. Determinación de la resistencia a la kanamicina de las cepas a mutagenizar	57
4.2. Conjugación bacteriana	57
5. EXTRACCIÓN, MANIPULACIÓN Y MODIFICACIÓN DE ADN	58
5.1. Extracción de ADN genómico de <i>Rhizobium</i>	58
5.2. Extracción de plásmidos de bajo peso molecular (minipreparación de plásmidos)	59
5.3. Electroforesis de ADN en gel de agarosa	60
5.4. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción	60
5.5. Aislamiento y purificación de fragmentos de restricción	60
5.5.1. Elución del ADN del Tn5 por el procedimiento GENECLEAN	60

5.6. Hibridaciones de ADN-ADN.....	61
5.6.1. Transferencia de ADN a membrana de nylon (Southern blot).....	61
5.6.2. Marcaje no radiactivo de sondas de ADN.....	62
5.6.3. Hibridación.....	62
5.6.4. Detección quimioluminiscente de bandas de hibridación.....	63
6. MÉTODOS MOLECULARES DE CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE	
<i>Rhizobium</i>	64
6.1. Determinación del contenido de plásmidos.....	64
6.2. Perfil de proteínas.....	64
6.2.1 Tinción con Azul de Comassie.....	66
6.2.2 Tinción con nitrato de plata.....	66
6.3. Determinación del tamaño molecular de las proteínas.....	66
6.4. Perfil de lipopolisacáridos.....	67
7. GERMINACIÓN DE DIFERENTES VARIEDADES DE <i>Phaseolus vulgaris</i> EN	
CONDICIONES DE ESTRÉS SALINO	68
8. EXPERIENCIAS CON PLANTAS DE JUDIA	69
8.1. Cultivo hidropónico.....	69
8.2. Esterilización y germinación de las semillas.....	69
8.3. Preparación del inóculo.....	69
8.4. Siembra e inoculación.....	69
8.5. Condiciones de la cámara de cultivo.....	70
8.6. Riegos.....	70
8.7. Tipos de experimentos.....	70
8.7.1. Tolerancia al estrés salino en un modelo de interacción cepa x variedad.....	72
8.7.2. Absorción y/o consumo de agua en cultivos de <i>Phaseolus vulgaris</i> bajo condiciones de estrés salino.....	73
8.7.3. Estudio de la simbiosis <i>Phaseolus vulgaris</i> var. Contender inoculada con una cepa silvestre de <i>Rhizobium</i> y tres de sus mutantes.....	74
8.7.3.1. Efecto del NaCl en la simbiosis de <i>Phaseolus vulgaris</i> : aplicado al inicio del cultivo.....	74
8.7.3.2. Efecto del NaCl en la simbiosis de <i>Phaseolus vulgaris</i> : aplicado en el crecimiento vegetativo avanzado.....	74
9. METODOLOGÍA EMPLEADA	75
9.1. Análisis del crecimiento.....	75
9.2. Actividad de la nitrogenasa: test de la actividad de la reducción de acetileno (ARA).....	76
9.3. Actividades enzimáticas del metabolismo carbonado en nódulos.....	77
9.3.1. Preparación de los extractos libres de células.....	77
9.3.2. Actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa.....	77
9.3.3. Actividad malato deshidrogenasa.....	78
9.4. Determinaciones bioquímicas en parte aérea.....	79
9.4.1. Preparación de los extractos libre de células.....	79
9.4.2. Determinación de prolina.....	79

9.4.3. Determinación de pigmentos fotosintéticos.....	79
9.4.3.1. Clorofila a.....	79
9.4.3.2. Clorofila b.....	80
9.4.3.4. Carotenoides.....	80
9.5. Determinación bioquímicas en nódulos.....	80
9.5.1. Preparación de extractos libres de células.....	80
9.5.2. Determinación de azúcares solubles totales.....	80
9.5.3. Determinación de fructosa total.....	80
9.5.4. Determinación de almidón.....	80
9.5.5. Determinación de prolina.....	81
9.6. Determinación de proteína soluble.....	82
9.6.1. Determinación de proteína soluble en nódulos de <i>P. vulgaris</i>	82
9.6.2. Determinación de proteína soluble en bacterias.....	82
9.7. Determinaciones analíticas.....	82
9.7.1. Determinación de nitrógeno y fósforo.....	83
9.7.2. Determinación de calcio, magnesio, potasio y sodio.....	83
9.8. Presentación y estudio estadístico de los resultados.....	83
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	84
1. TOLERANCIA AL NaCl DE DIFERENTES CEPAS DE RHIZOBIUM.....	85
1.1. Tolerancia al NaCl de diferentes cepas de <i>Rhizobium</i> en medio sólido YEM.....	85
1.2. Curvas de crecimiento en función de la salinidad.....	86
2. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS MUTANTES TOLERANTES A LA SAL.....	93
2.1. Obtención de mutantes tolerante a la sal.....	93
2.2. Hibridación con Tn5.....	93
2.3. Perfil de plásmidos.....	94
2.4. Curvas de crecimiento en función de la salinidad.....	97
2.5. Efecto de la salinidad en el contenido de proteínas.....	100
2.5.1. Contenido de proteínas totales.....	100
2.5.2. Perfil de proteínas a la mitad de la fase logarítmica.....	100
2.6. Perfil de lipopolisacáridos.....	112
3. GERMINACIÓN DE DIFERENTES VARIEDADES DE PHASEOLUS VULGARIS EN CONDICIONES DE ESTRÉS SALINO.....	116
3.1. Tolerancia al NaCl de diferentes variedades de <i>Phaseolus vulgaris</i>	116
3.2. Niveles críticos de salinidad.....	124
4. EFECTIVIDAD DE LA FIJACIÓN SIMBIÓTICA DE NITRÓGENO DE CUATRO VARIEDADES DE PHASEOLUS VULGARIS INOCULADAS CON DOS CEPAS DE RHIZOBIUM, EN CONDICIONES DE ESTRÉS SALINO.....	127
4.1. Crecimiento y nodulación.....	127
4.2. Actividad nitrogenasa.....	135
4.3. Contenido de azúcares solubles totales, fructosa, almidón y prolina.....	136
4.4. Contenido de nutrientes.....	137

5. ABSORCION DE AGUA EN CULTIVOS DE <i>PHASEOLUS VULGARIS</i> BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS SALINO	148
5.1 Consumo de agua, y tasa de absorción de agua a través del tiempo, en condiciones no salinas	148
5.2 Consumo y tasa de absorción de agua a través del tiempo, en condiciones de estrés salino	151
5.3 Eficiencia de absorción de agua y consumo de agua en relación al peso fresco, peso seco y %humedad de la parte aérea de la planta	155
ESTUDIO COMPARATIVO DE CEPAS ISOGÉNICAS DE <i>RHIZOBIUM</i> TOLERANTES Y NO TOLERANTES A LA SAL EN SIMBIOSIS CON <i>PHASEOLUS VULGARIS</i> EN CONDICIONES DE ESTRÉS SALINO	158
6. EFECTO DEL NaCl EN LA SIMBIOSIS DE <i>P. VULGARIS</i>: APLICADO AL INICIO DEL CULTIVO	158
6.1. Crecimiento y nodulación	158
6.2. Actividad nitrogenasa	162
6.3. Actividades enzimáticas del metabolismo carbonado de la fracción vegetal de los nódulos.	162
6.4. Contenido de azúcares solubles totales, fructosa y almidón de la fracción vegetal de los nódulos	166
6.5. Contenido de clorofila a, b, carotenoides y prolina de la parte aérea de la planta.....	171
6.6. Efecto de la sal en el contenido de nutrientes.....	173
6.6.1. Contenido de nutrientes en la parte aérea de la planta	173
6.6.2. Contenido de nutrientes en la raíz.....	175
7. EFECTO DEL NaCl EN LA SIMBIOSIS DE <i>PHASEOLUS VULGARIS</i>: APLICADO A LOS 16 DÍAS DE CRECIMIENTO	181
7.1. Crecimiento y nodulación.....	181
7.2. Actividad nitrogenasa	185
7.3. Actividades enzimáticas del metabolismo carbonado de la fracción vegetal de los nódulos.	186
7.4. Contenido de azúcares solubles totales, fructosa y almidón de la fracción vegetal de los nódulos	191
7.5. Contenido de clorofila a, b carotenoides y prolina de la parte aérea de la planta.....	196
7.6. Efecto de la sal en el contenido de nutrientes.....	200
7.6.1. Contenido de nutrientes en la parte aérea de la planta	200
7.6.2. Contenido de nutrientes en la raíz.....	204
7.7. Producción de vainas a los 45 días de crecimiento	204
CONCLUSIONES	209
BIBLIOGRAFÍA	210

PARTE 1

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Los suelos cultivables afectados por la salinidad están poco definidos, puesto que sólo de algunas áreas se dispone de mapas detallados, en consecuencia la estimación global varía ampliamente. Sin embargo, se considera que un 40% de suelos agrícolas son áreas con potenciales problemas de salinidad y la mayor parte de estas áreas están confinadas en la región mediterránea. La dependencia de recuperar estas tierras para desarrollar una agricultura intensiva eficiente parece inevitable.

El efecto de los suelos salinos en el crecimiento de las plantas ha constituido un foco de investigación importante en este siglo puesto que la salinidad es el mayor estrés limitante de la productividad de los cultivos. Desarrollar cultivos tolerantes a la salinidad es objeto prioritario en todo programa de mejora, puesto que existen especies de cultivo o genotipos con distintos rangos de tolerancia a la sal. Esta tolerancia se puede definir como el rango multigénico que permite a la planta crecer y mantener un desarrollo normal en presencia de niveles constantes y elevados de sal.

Al describir el grado de tolerancia al estrés salino de numerosos cultivos, las leguminosas se encuentran entre las más sensibles, pudiendo establecerse, según su resistencia o tolerancia distintos grupos de respuesta. Las leguminosas son consideradas actualmente en la "agricultura sostenible" cultivos de gran importancia tanto en el sistema de rotación como por su independencia o reducción de la fertilización nitrogenada debido a su capacidad de formar simbiosis con bacterias del género (*Brady*)*Rhizobium*. Por todo ello, es necesario tener en cuenta, la identificación de combinaciones *Rhizobium*-leguminosa capaces de formar nódulos efectivos bajo condiciones de estrés salino.

Los efectos identificados en las plantas como consecuencia del estrés salino son el **efecto osmótico**, alteración del potencial hídrico y del ajuste osmótico y el **efecto iónico**, toxicidad de un ión, deficiencias nutricionales y desequilibrio iónico. Otros procesos que se afectan negativamente por niveles de sal en el suelo son la capacidad fotosintética de la planta, la germinación y maduración de las semillas, la senescencia y la productividad de la planta, y la alteración de diferentes actividades enzimáticas.

La respuesta al estrés salino por parte de la planta depende del tiempo de exposición a la sal (short-time y long-time), de la dosis de sal externa (baja moderada y alta), de la presencia de otros iones, del estado de desarrollo de la planta, del balance hormonal y de los ritmos diurnos.

Entre las diferentes estrategias adoptadas frente al estrés salino una de ellas consiste en llevar a cabo una selección del germoplasma autóctono del cultivo con objeto de identificar el cultivar más tolerante. Realmente no sólo los cultivares difieren en su tolerancia a la sal sino también los genotipos de una misma especie. Además la tolerancia de la planta huésped no es la única que determina la formación de una simbiosis efectiva con la cepa de *Rhizobium* específica en condiciones de salinidad, también es necesario identificar o seleccionar cepas tolerantes efectivas en la simbiosis. Las bacterias muestran también marcada variación en la tolerancia a la sal en vida libre y los procesos de nodulación son más sensibles a la sal que el *Rhizobium*.

Por todo ello al abordar el estudio del estrés salino en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, y la contribución relativa de cada simbiote en el proceso de fijación de nitrógeno bajo estas condiciones, nos propusimos como objetivo estudiar el efecto del NaCl en la bacteria y en la planta de forma separada y conjuntamente.

La judía (*Phaseolus vulgaris*), leguminosa de gran importancia en la alimentación humana, de elevado contenido proteico y de amplia implantación en el mundo, ha sido seleccionada para llevar a cabo el siguiente plan de trabajo:

1. A nivel de *Rhizobium*

- a) Estudiar la tolerancia al NaCl de distintas cepas de *Rhizobium*.: Curvas de crecimiento.
- b) Obtención de cepas mutantes tolerantes a la sal a partir de una cepa sensible, para comparar el comportamiento de las cepas isogénicas de *Rhizobium* en condiciones de estrés salino.
- c) Caracterización de la cepa silvestre y las mutantes obtenidas de la cepa silvestre mediante hibridaciones, perfil de plásmidos, lipopolisacáridos, proteínas y curvas de crecimiento.

2. A nivel de *Phaseolus vulgaris*

a) Germinación de diferentes variedades de *Phaseolus vulgaris* en condiciones de estrés salino.

3. Simbiosis *Rhizobium*-leguminosa

a) Tolerancia al estrés salino en un modelo de interacción cepa x variedad:

b) Absorción y/o consumo de agua en cultivos de *Phaseolus vulgaris* bajo condiciones de estrés salino.

c) Estudio comparativo de cepas isogénicas de *Rhizobium* tolerantes y no tolerantes a la sal en simbiosis con *Phaseolus vulgaris* en condiciones de estrés salino.

PARTE 2

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO

En la naturaleza, el nitrógeno se presenta de diferentes formas, y las plantas constituyen el vehículo por el cual el nitrógeno inorgánico es convertido en formas orgánicas que posteriormente son utilizadas por el hombre y animales. Así mismo, la materia orgánica del suelo se mineraliza por los procesos de nitrificación y amonificación produciéndose la acumulación de nitrato o amonio en el suelo que son asimilados por la planta en la síntesis de aminoácidos y proteínas. El nitrógeno de la atmósfera ingresa en el ciclo de nitrógeno por el proceso de fijación biológica reduciéndose a amonio, este proceso es de gran importancia cualitativa y cuantitativa para la producción agrícola, sobre todo si se considera la crisis energética en el cual los fertilizantes nitrogenados resultan cada vez más costosos y alteran el equilibrio de los suelos.

El proceso de reducción del dinitrógeno requiere de la presencia del complejo enzimático nitrogenasa, y está limitado estrictamente a los organismos procaríoticos. Dentro de este grupo, se observa que un gran número de especies pertenecientes a las Archaeobacterias y Eubacteria son fijadoras de nitrógeno. Los diazotrofos de vida libre (*Klebsiella*, *Azotobacter* y *Rhodobacter*), las bacterias asociadas a las raíces (*Azospirillum*) y las bacterias simbióticas (*Rhizobium*, *BradyRhizobium* y *AzoRhizobium*) pueden fijar nitrógeno (Young, 1992)

La cantidad de nitrógeno fijado es muy variable dependiendo de las asociaciones, sin embargo las simbiosis de (*Brady*)*Rhizobium* con leguminosas son las más significativas desde el punto de vista agrícola. Peoples *et al.* (1995) presentan datos sobre la contribución de algunas especies de leguminosas en la fijación de nitrógeno, así *Vicia faba* fija 53-330 kg N ha⁻¹, *Lupinus angustifolius* entre 32-288 kg N ha⁻¹, *Lens culinaris* oscila de 10 a 192 kg N ha⁻¹, *Glycine max* establece el máximo en 450 kg N ha⁻¹, *Arachis hypogaea* desde 37 a 206 kg N ha⁻¹, *Cajanus cajan* 7-235 kg N ha⁻¹, *Phaseolus vulgaris* junto con *Vigna radiata* y *Vigna unguiculata* son las simbiosis menos eficientes detectándose rangos muy semejantes de 0 a 125, de 9 a 112 y de 9 a 209 kg N ha⁻¹ respectivamente. Sin embargo, no hay duda que la actividad de muchas asociaciones simbióticas fijadoras de nitrógeno benefician los ecosistemas agrícolas.

El establecimiento de una secuencia de cultivos leguminosa-cereal favorece la economía del nitrógeno de los suelos más que la secuencia cereal-cereal. El nitrógeno

procedente de las leguminosas puede ser menos susceptible a ser eliminado por lavado y lixiviación que el fertilizante nitrogenado, por tanto, el uso prolongado de estos materiales orgánicos favorece el aumento de la reserva de N orgánico realmente mineralizable. El uso de la bacterias fijadoras de nitrógeno en sistemas agrícolas puede ser muy útil para equilibrar la deficiencia de nitrógeno en el suelo que inevitablemente acompaña una agricultura intensiva (Vandermeer, 1995).

2. LEGUMINOSAS: ORDEN LEGUMINALES

Este enorme orden botánico sólo es superado en tamaño por las orquídeas y las compuestas y en importancia económica sólo es superado por las gramíneas.

Se divide en tres familias: *Mimosoidea*, *Caesalpinoideae* y *Papilionoideae*, las cuales contienen más de 750 géneros y entre 16.000 a 19.000 especies (Allen y Allen, 1981; Yakovlev, 1991).

Según Provorov (1994), los análisis de las propiedades simbióticas en los diferentes géneros permite las siguientes conclusiones: (a) La capacidad de nodulación está distribuída en más del 90% en las familias *Papilionoideae* y *Mimosoideae*, mientras que en *Caesalpinoideae* sólo está en menos del 30%. (b) Las especies de leguminosas varían grandemente en la especificidad y su interacción con los rizobios. La alta especificidad simbiótica es típica para las leguminosas de regiones templadas: ellas generalmente forman nódulos con un grupo restringido de cepas, pertenecientes a la misma especie o biovariedades. Algunas leguminosas tropicales también se caracterizan por su estrecha especificidad simbiótica, mientras que para otras existe alta promiscuidad de interacción con diferentes rizobios (Provorov, 1985); (c) La nodulación es más característica para géneros especializados en todas las subfamilias, mientras que en los más ancestrales esta propiedad frecuentemente esta ausente (Young y Johnston, 1989).

2.1. *Phaseolus vulgaris* L

2.1.1. Aspectos botánicos

Es una planta anual, que muestra una gran variación en los caracteres vegetativos como color de las flores, forma y color de las vainas, tamaño de las semillas etc. Hay diferentes tipos de plantas, trepadoras, erguidas, arbustivas enanas, incluso algunas desarrollan estolones débiles. Las plantas de tipo trepador pueden alcanzar los 2 ó 3 m de altura y las enanas 20-60 cm.

Todas ellas tienen una raíz central bien desarrollada, que crece rápidamente, alcanzando algunas veces una profundidad de 90 cm o más, con las raíces secundarias limitadas principalmente a la zona superior (15 cm) del suelo, donde se localizan los nódulos esféricos o irregulares, de unos 6 mm de diámetro. Los tallos son delgados, retorcidos, angulosos y nerviados. Las hojas son alternas, trifoliadas, a menudo con pelos y tricomas, con pecíolos largos o estriados en la zona superior y con una notable pulvínula en la base. Los folíolos son ovalados, enteros o acuminados. Las flores nacen sobre racimos axilares pocas flores; los pedicelos son cortos (5 a 8 mm), la corola puede ser blanca, amarillo-cremosa, rosa o violeta. Normalmente la autofecundación puede ocurrir durante la apertura de la flor. Las vainas de las semillas son muy variadas, finas, glabras, rectas, ligeramente curvadas, de bordes redondeados o convexos, extremos prominentes, su color puede variar desde amarillo hasta verde oscuro, teniendo a veces manchas rosa o púrpura. El número de semillas puede oscilar entre 1 y 12 mostrando variación importante en su color, tamaño y medida (Allen y Allen, 1981).

Es una especie polimórfica, por lo que se ha intentado dividirla en subespecies, basados en características de altura, forma y color de la semilla. Sin embargo, la variación dentro de la especie puede ser atribuida a la existencia de varios cientos de cultivos; y esta variación no se corresponde satisfactoriamente con la creación de subespecies (Kay, 1979).

2.1.2. Origen y domesticación

Las judías comunes han evolucionado en un período de 7000 a 8000 años. Su origen se sitúa en Oeste de México-Guatemala, aún cuando existen pruebas que sugieren su aclimatación en Centroamérica, a partir de especies ancestrales, polimórficas y muy extendidas. Actualmente esta especie vegetal está muy distribuida en distintas parte de

los trópicos, subtropicos y regiones templadas , siendo la legumbre alimenticia más importante en Latino-América y parte de Africa. Wittmack (1880), basado en observaciones arqueologicas, concluyó que las judías comunes se han originado en América, muy al contrario que Linnaeus (1753) que sugirió la India como origen de *P. vulgaris*. Posteriores evidencias se han acumulado en favor del origen americano de las judías teniendo en cuenta, datos arqueológicos, botánicos, históricos y lingüísticos (Schoonhoven y Voysesst, 1993).

Según aspectos arqueológicos *P. vulgaris* se originó en los Andes y en Centro América. Kaplan *et al.*(1973) presentan datos de hace 8000 años en zonas de Perú (Guitarrero Cave, Callejón de Huaylas), mientras que Kaplan (1967) recoge datos de hace 6000 años de la zona de Centro América (Puebla y Tehacán). Varios de los hallazgos arqueológicos son fenotípicamente similares a los cultivares actuales crecidos en el mismo lugar. Estos datos arqueológicos presentan dos características: todos están localizados en regiones secas y sólo incluyen judías comunes domesticadas. Esta sequedad de las regiones podrían haber contribuido a la conservación de los materiales durante mucho tiempo (van Schoonhoven y Voysesst, 1993)

Según los datos botánicos, las poblaciones de judías fueron descritas por primera vez en los Andes por Burkart (1941) y en Guatemala por MacBryde (1947), existen otras descripciones de Berglund-Brücher y Brücher (1976) y Delgado Salinas (1988) para las poblaciones andinas de *P. vulgaris* var. *aborigineus* y de *P. vulgaris* var. *mexicanus* en Centro América, respectivamente.

Los aspectos de particular relevancia en la discusión de los procesos de domesticación de la judía común son las características morfológicas, la distribución geográfica y las relaciones genéticas entre formas silvestres y cultivadas. En los aspectos morfológicos existen cambios de las partes vegetativas (raíz, tallo, hojas, internodos) y de las reproductoras (inflorescencia, flores, vainas y semillas) de la planta. También, durante el proceso de selección se produce el acortamiento del ciclo de crecimiento, que permitio un habito de crecimiento más compacto, caracterizado por una reducción del número de tallos, nudos y ramas trepadoras y dio como resultado una menor competencia por la luz. En la última etapa de desarrollo de la planta, el proceso de selección determinó la formación de plantas arbustivas (de crecimiento determinado o indeterminado) con tallo robusto, menor número de nudos, entrenudos cortos y pocas

ramas retorcidas o ausentes y además la transformación de plantas trepadoras a pequeñas o enanas, con distintos hábitos de crecimiento (I, II, III y IV) según CIAT (1980).

En el proceso de domesticación también se alteró el comportamiento reproductor, así, se incrementó la frecuencia de genes que codifican la reducción de la dehiscencia en la población, se modificó el contenido de fibras en las vainas y se alteró el color de las semillas, negra, marrón o crema con manchas (Geps y Bliss, 1986). Estas características implican mecanismos de defensa frente a depredadores (Willson, 1983). La domesticación y evolución subsecuente también permitió que los cultivares formaran semillas grandes (20-100 g/100 semillas), además con una gran variedad de colores, algunos de los cuales no se observan en las judías silvestres tal como el rojo y/o el blanco. El tamaño grande de las semillas redujo el número de las mismas por planta como consecuencia del hábito de crecimiento más compacto o reducido mencionado anteriormente.

En cuanto a los cambios fisiológicos, se tiene información sobre la germinación y la sensibilidad al fotoperíodo, los cuales son significativamente esenciales para la adaptación de las judías silvestres a su ambiente. Las judías silvestres muestran dormancia en las semillas debido a la impermeabilidad de la cubierta seminal. Esta dormancia evita una germinación prematura durante las primeras lluvias de la estación húmeda o al final del crecimiento; en cambio las semillas cultivadas germinan prontamente y uniformemente cuando son colocadas en buenas condiciones de germinación. Las judías silvestres son generalmente sensibles al fotoperíodo, y por ello pueden florecer solo en días cortos (Adams y Pipoly, 1980).

De acuerdo a Debouck (1994), mediante marcadores moleculares y bioquímicos, se ha confirmado la existencia de cinco especies domesticadas en el género *Phaseolus*. Cada una de estas especies ha sido domesticada a partir de varias poblaciones de formas ancestrales silvestres, que crecen aún en diferentes partes del neotrópico. Así, para *P. vulgaris* han sido identificados tres lugares en América Central y tres en los Andes, mientras que en *P. lunatus*, la domesticación se lleva a cabo en Sud Este de Ecuador y Norte del Perú (Debouck, 1992). Sin embargo, *P. polyanthus* se transporta desde Guatemala Central a otras partes de Centro América y Norte de los Andes.

La estructura de la diversidad genética está de acuerdo al gradiente geográfico y a la comunidad biótica asociada a la planta. Toda la información sobre la diversidad genética debido a la coevolución, podría explotarse mejor en vista del concepto de la agricultura sostenible y conservación integrada (Debouck, 1994).

2.1.3. Aspectos fisiológicos: crecimiento

La acumulación de la materia seca en plantas de judía es el resultado directo de un balance entre la fotosíntesis, respiración, y las pérdidas causadas por la senescencia y abscisión. Por otro lado, el reparto establece un equilibrio entre el crecimiento vegetativo y reproductor integrado durante el desarrollo de las judías, dando como resultado final la productividad del cultivo (Beaver y Kellg, 1994; Sexton *et al.*, 1994).

2.1.3.1. Fotosíntesis

Las leguminosas tienen la vía fotosintética C₃, y los valores estimados de máxima tasa fotosintética de hojas están en los límites establecidos para este tipo de plantas (White e Izquierdo, 1993). Dicho parámetro varía con la edad de la hoja y condiciones ambientales, las hojas incrementan su capacidad fotosintética cuando se expanden, y mantienen su máximo por un período muy variable dependiendo del cultivar y la posición de la hoja, y declina cuando la hoja senece (Fraser y Bidwell, 1974). Burga (1978) encontró que la tasa fotosintética alcanza su máximo valor al inicio del llenado de vainas y Laing *et al.* (1984) que la temperatura óptima para este parámetro está entre 21 y 31° C. Tanaka y Fujita (1979) encontraron una correlación positiva entre el contenido de N y el AP en hojas, sugiriendo que la pérdida de la capacidad fotosintética está relacionada a la removilización del N.

El almidón parece cumplir una función importante en los cloroplastos, así el almidón de las hojas en soja correlaciona negativamente con la actividad de la sacarosa-P sintetasa (Huber e Israel, 1982), y esta enzima es clave en la regulación fotosintética para formar sacarosa y almidón, también está relacionada significativamente con el contenido de N.

De acuerdo a Shadchina y Dmitrieva (1995), la clorofila se correlaciona con la concentración total de nitrógeno y la materia seca total de la planta. Por otro lado, Lopez-Cantarero *et al.* (1994) indicaron que la clorofila a es un buen indicador de la

medida del N total, y la clorofila b puede reflejar los niveles de formas solubles de nitrógeno tales como nitrato y amonio.

2.1.3.2. Metabolismo del nitrógeno

El contenido alto de proteínas en semillas de leguminosas explica la importancia del metabolismo de nitrógeno en estos cultivos. Cuando ocurre la fijación de nitrógeno en los nódulos de las judías, el amonio pasa a formar parte de los aminoácidos. Sin embargo, cuando el nitrógeno es absorbido como nitrato, este es convertido a nitrito por la nitrato reductasa, y el nitrito a amonio por la nitrito reductasa. Estas formas diferentes de adquirir el nitrógeno puede influir en la eficiencia del reparto de este elemento en la planta (George y Singleton, 1992). Los mayores requerimientos de nitrógeno se dan en la fase vegetativa temprana y en la fase reproductiva. La fijación simbiótica en las leguminosas grano alcanza un pico generalmente durante la formación de las vainas y declina durante la última fase reproductiva (Imsande, 1988). Por lo tanto el nitrógeno mineral puede ser crítico para la nutrición de la leguminosa durante las fases de mayor demanda de este elemento. Las contribuciones relativas de ambas formas de adquisición del nitrógeno puede depender de la eficiencia de su utilización por la planta, de la ontogenia y del requerimiento de este nutriente.

Aun teniendo en cuenta los altos requerimientos energéticos para el desarrollo, mantenimiento y funcionamiento del sistema simbiótico en comparación a la asimilación de N mineral (Pate *et al.*, 1979; Finke *et al.*, 1982), se ha sugerido que tanto el N mineral como el N₂ fijado son esenciales para las leguminosas (Bhangoo y Albritton, 1976; Franco *et al.*, 1979).

2.1.4. Aspectos fisiológicos: Desarrollo

2.1.4.1. Germinación

Durante la formación de la semilla, en la maduración, la fase de deshidratación condiciona la entrada de la semilla de judía en un estado de actividad metabólica reducida caracterizada por cambios en la deshidratación de membranas celulares y en la reducción severa en la tasa de respiración; este estado de dormancia se mantiene mientras el contenido de humedad de la semilla perdura. La semilla embebe agua cuando está en contacto con un medio con suficiente agua disponible, incrementándose significativamente la tasa de respiración. Los cultivares pueden variar en la proporción de

utilización de agua a través del micropilo, mientras que la absorción de agua a través de la cubierta de la semilla no es diferente. Austin y MacLean (1972) informaron que bajo condiciones de frío (12°C), los cultivares de semillas grandes germinan más rápidamente que las semillas pequeñas.

2.1.4.2. Contenido proteico y de carbohidratos de las semillas.

Cuantificando y estudiando el alto contenido de proteínas de reserva de las semillas (Baudoin y Camarena, 1995) se comprueba que el porcentaje de proteínas varía de 17 a 35% e incluye 5 fracciones principales: globulina-1 (G-1) o faseolina (36-46%), globulina-2 (5-12%), albúmina (12%-16%), prolamina (2-4%) y una fracción soluble (20-30%). La expresión del fenotipo de faseolina no está influenciada por el ambiente (Brown *et al.*, 1981), en cambio sus variaciones son causadas en parte por glicosilación diferencial de los polipéptidos y ARNm de diferentes pesos moleculares (Lioi y Bollini, 1984). Del mapeo de péptidos separados de cada uno de los tres subunidades de G-1 por electroforesis con polyacrilamida, concluye que las tres subunidades de la G-1 son homólogas en secuencias de aminoácidos, en aproximadamente 61% de su longitud (van Schoonhoven y Voysest, 1993).

El contenido total de carbohidratos varía de 24 a 42% en las diferentes leguminosas. Estos carbohidratos incluyen mono y oligosacáridos, almidón y otros polisacáridos. El almidón es el carbohidrato más abundante y varía de 24 a 56%, las diferencias observadas son debidas a los diferentes cultivares y procedimientos analíticos (Reddy y Pierson, 1984).

2.1.4.3. Crecimiento vegetativo.

Después del establecimiento de la plántula, bajo condiciones normales, la judía generalmente sigue una fase de crecimiento exponencial hasta el inicio del crecimiento rápido de la semilla. Entonces, el crecimiento baja en algunos cultivares llegando a estabilizarse, mientras que otros obtienen su peso máximo muy cerca de la madurez. La máxima tasa de crecimiento en judías arbustivas varía de 14 a 18 g m⁻² día⁻¹ mientras que para trepadoras alcanzan hasta 21 g m⁻² día⁻¹. Estos valores son más bajos que otros cultivos C₃ (Monteith, 1978).

La tasa neta de asimilación fotosintética generalmente declinan con la edad del cultivo. Los valores elevados de la tasa neta de asimilación puede reflejar una

compensación del área foliar restringida (por causa del crecimiento determinado) más que una alta eficiencia fotosintética. El área foliar también aumenta hasta la floración y luego decrece con la madurez, sin embargo, existen diferencias entre diferentes genotipos. El inicio de la floración es aproximadamente a los 10 días después de la siembra (Wallace, 1985).

2.1.4.4. Crecimiento reproductor

Las judías se autofertilizan. El patrón de crecimiento de las vainas pueden resumirse en tres fases: a) crecimiento de la pared de la vaina, b) crecimiento de la semilla y c) desecación o deshidratación. Normalmente la madurez de las semillas se alcanzan a los 48 días después de la floración, la longitud máxima de la vaina es a los 24 días y el peso fresco disminuye en los 6 u 8 últimos días, aunque el peso de la semilla sigue incrementándose durante la última fase. La tasa de desarrollo de las vainas y los cambios temporales de su composición varían significativamente entre los genotipos y cultivares (van Schoonhoven y Voysest, 1993)

2.1.4.5. Senescencia y abscisión

Después de la fotosíntesis y la respiración, los procesos de senescencia y abscisión juegan el papel más importante en la determinación del crecimiento de la planta. Estudios realizados por Izquierdo y Hosfield (1981), mostraron que la abscisión de vainas puede continuar hasta los 45 días después de la antesis. Las vainas más viejas pueden caer si el nivel de carbono asimilado adecuado no está disponible (Tanaka y Fujita, 1979). Según Leopold (1980) la senescencia es un proceso programado de deterioro conducente a la muerte de la planta y que ocurre inevitablemente por un desequilibrio de nutrientes en la planta. Otro grupo de investigaciones consideran la senescencia como un desorden fisiológico provocado por un desequilibrio endógeno de reguladores de crecimiento. Cantidades elevadas de ácido abscísico (ABA) durante la senescencia condicionan a esta hormona como un candidato atractivo como inductor general de la senescencia, pero no todos los estudios sostienen esta hipótesis, en el caso de las judías, los niveles de ABA varían ampliamente antes y durante de la senescencia de las hojas (Colquhoun y Hillman, 1975).



2.1.5. Aspectos agronómicos

Cuando se clasifica una serie de genotipos se separan en variedades de crecimiento determinado e indeterminado. En el primer caso las ramas laterales y el tallo principal termina en inflorescencias e incluye el tipo I, y en el segundo terminan en un meristemo capaz de continuar la organogénesis e incluye los tipos II, III y IV (CIAT, 1980). En las variedades indeterminadas, las inflorescencias están localizadas lateralmente, directamente insertadas en los nudos del tallo principal y ramas laterales. Esta diferencia es heredada genéticamente y aparentemente controlada por algunos genes (Voyses y Dessert, 1991).

En cuanto a la caracterización y evaluación del germoplasma de *P. vulgaris* los descriptores siguen las pautas dadas por el " Bean Advisory Committee" en el año 1976, aunque la lista sugirió más tarde considerar lo dado por IBPGR (International Board for Plant Genetic Resources), que incluye más de 60 descriptores (IBPGR, 1982). El número de descriptores mínimos usados por el CIAT ha sido reducido a 25 para plantas y 6 para semillas. La caracterización y evaluación describe fenotipos individuales en términos de rasgos morfoagronómicos y también suministran información sobre la composición comparativa del germoplasma. Los datos de caracterización y evaluación son combinados con la información anterior para indicar la variabilidad y el origen del germoplasma.

El tipo de semilla (color y tamaño) y hábito de crecimiento ilustra la variabilidad de *P. vulgaris*, por lo tanto ellos son descriptores necesarios en términos de mercado y producción agronómica. Los colores de la cubierta de la semilla de estas especies en la colección de CIAT han sido agrupadas en 9 clases, correspondiendo los mayores porcentajes al color negro (20), blanco (21) y crema (19); el resto son amarillo, rojo, púrpura, rosado, marrón y otros. En cubiertas de semillas multicoloreadas, el color crema presenta el número más alto de combinaciones con otros colores (12%), seguido por el rojo (3.5%). Con respecto al tamaño de la semilla, las semillas pequeñas (menos de 25 g/100 semillas) representan el 38% de la colección, las medianas (entre 25 y 40 g/100 s) el 38% y las grandes (más de 40 g/100 s) el 25%. En cuanto a los hábitos de crecimiento, los tipos I, II, III y IV representa el 23, 11, 33 y 3 % respectivamente.

Si se considera las condiciones óptimas de crecimiento y desarrollo del cultivo, clima, fertilidad del suelo, disponibilidad de agua, temperatura, irradiación etc., los valores estimados de potencial de producción de judías, pueden estar entre 4000 y 6000

Kg ha⁻¹ (Saxena, 1984), sin embargo, la International Bean Yield and Adaptation Nurseries indica una producción de 5 T ha⁻¹. Si uno de los factores se altera, puede traer como consecuencia una reducción del potencial de producción en un 19%, es decir bajaría de 6 a 4.9 T ha⁻¹. Sin embargo, los datos presentados anteriormente están lejos de la realidad, en la práctica la producción de judías es baja (entre 0,6 y 2,0 T ha⁻¹), debido principalmente a las enfermedades, condiciones adversas de crecimiento o falta de líneas mejoradas (Manrique *et al.*, 1993).

3. FAMILIA RHIZOBIACEAE

3.1. Taxonomía del *Rhizobium*

La clásica catalogación de las bacterias fijadoras de nitrógeno (Gallon y Chaplin, 1987) no refleja la verdadera evolución genética de las bacterias, sin embargo de los últimos años se dispone de datos moleculares y genéticos que han contribuido a reestructurar esta clasificación. Young (1992) ha elaborado un catálogo de fijadores de nitrógeno en el que se engloban cerca de un centenar de géneros en ocho categorías. Esta recopilación es consecuencia de estudios a nivel molecular por hibridación, catalogación de oligonucleótidos y secuenciación de genes ribosomales, siendo la clave del proceso la biomolécula 16s de ARN ribosómico que es universal y conserva su función (Woese, 1987).

El manual Bergey de Bacteriología Sistemática (1994) establece que la familia *Rhizobiaceae* tiene cinco géneros: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Phyllobacterium* y *Agrobacterium*.

El género *Rhizobium* incluye distintas especies :

a) *Rhizobium leguminosarum* cuyas funciones simbióticas están codificadas en un plásmido y la misma cepa puede nodular tres leguminosas dependiendo de la especificidad del plásmido. La especificidad por el hospedador determina la biovariedad. Hay tres grupos de hospedadores: a) *Trifolium* para la biovariedad *trifolii* b) *Phaseolus* para la biovariedad *phaseoli* c) *Pisum*, *Lathyrus*, *Vicia* y *Lens* para la biovariedad *viciae*.

b) *Rhizobium meliloti* nodula a especies del género *Melilotus*, *Medicago* y *Trigonella*. Actualmente existen razones filogenéticas para transferir esta especie al género *SinoRhizobium* como *S. meliloti* (Lindström *et al.*, 1995).

c) *Rhizobium loti* agrupa a microorganismos capaces de nodular un amplio rango de hospedadores entre los que se encuentran *Lotus*, *Cicer*, *Robinia pseudoacacia*, *Mimosa*, *Lupinus*, *Onobrychis* y *Leucaena*. Nour *et al.* (1994) proponen que las bacterias que infectan a *Cicer arietinum* deben ser incluidas en la nueva especie *Rhizobium ciceri*, aunque estos mismos autores en 1995 proponen que esta especie puede ser también infectada por *R. mediterraneum*.

d) *Rhizobium galegae* (Lindström, 1989) infecta a especies del género *Galega*.

e) *Rhizobium huakuii* (Chen *et al.*, 1991) infecta a especies del género *Astragalus*, una leguminosa forrajera de invierno que presenta una homología distinta de las descritas para otras especies de *Rhizobium* y *BradyRhizobium*.

f) Existen dos especies del género *Rhizobium* relacionadas con *Rhizobium leguminosarum* biovar. *phaseoli*. Cuando esta bacteria se aísla de nódulos procedentes de especies de *Phaseolus* de zonas de América Central o Sudamérica, presenta dos grupos distintos, cepas de tipo I considerada actualmente nueva especie *R. etli* (Segovia *et al.*, 1993) y cepas de tipo II denominada *R. tropici* (Martínez *et al.*, 1991) que infecta a *Phaseolus vulgaris*, *Leucaena* spp. y *Macroptilium* spp. *Rhizobium etli* presenta alta homología con el DNA de *R. leguminosarum* bv. *viciae* y bv. *trifolii* (Martínez-Romero, 1994).

Género *BradyRhizobium*. Se consideran especies de crecimiento lento y clásicamente se reconoce una única especie *BradyRhizobium japonicum* que nodula a *Glycine*. Cuando se aíslan de otras especies vegetales como *Lupinus* y otras leguminosas tropicales se denominan *BradyRhizobium* spp. Sin embargo, en base a la homología de ADN se le atribuyen a este género dos subgrupos (Schola *et al.*, 1990) habiéndose descrito *BradyRhizobium elkanii* (Kuykendall *et al.*, 1992) que algunos lo consideran otra especie de *Rhizobium* (Van Rhijn y Vanderleyden, 1995) y *BradyRhizobium liaoningense* (Xu *et al.*, 1995).

Chen *et al.* (1995) propusieron en el Simposium Internacional de Taxonomía de *Rhizobium*, celebrado en Wuham (China, 1994) a *B. hainanensis* y *B. tianshanense*

como especies nuevas de *Rhizobium*. Sin embargo, se requieren evidencias más sólidas para obtener el estatus de especie en este grupo taxonómico (Lindström, 1995) según el Subcomité de Taxonomía de *Agrobacterium* y *Rhizobium*.

Género *SinoRhizobium*. Género propuesto para la antigua especie *Rhizobium fredii* que agrupa a bacterias de crecimiento rápido capaces de nodular a *Glycine*. Este nuevo género incluye cuatro especies: *SinoRhizobium fredii* y *SinoRhizobium xingianensis* (Chen *et al.*, 1988), y *SinoRhizobium saheli* y *SinoRhizobium teranga* que nodulan a *Acacia* (De Lajudie *et al.*, 1994).

Género *AzoRhizobium* (Dreyfus *et al.*, 1988) Incluye la especie *AzoRhizobium caulinodans* que forma nódulos fijadores en raíz y tallo de *Sesbania rostrata*. Recientemente se han aislado bacterias de nódulos procedentes de tallos fotosintéticos de distintas especies de *Aeschynomene* que pertenecen a este género (Eaglesham *et al.*, 1990), sin embargo, filogenéticamente estas bacterias se parecen más a *BradyRhizobium* que a *AzoRhizobium* (Young, 1992),

Género *Phyllobacterium*. Forma nódulos en hojas de especies de la familia *Myrsinaceae* y *Rubiaceae* (Lambert *et al.*, 1990). La fijación de nitrógeno en estos nódulos no está confirmada.

Género *Agrobacterium* origina la aparición de tumores en plantas y recientemente se ha demostrado la fijación de nitrógeno en *Agrobacterium tumefaciens* (Kanvinde y Sastry, 1990).

En un estudio realizado por Ladha y So (1994) proponen un nuevo género y especie *PhotoRhizobium thompsonianum*. Estas bacterias producen bacterioclorofila *a* tanto fuera como dentro de los nódulos, habiéndose realizado estudios filogenéticos entre diversas cepas formadoras de bacterioclorofila en nódulos caulinares (Wong *et al.*, 1994).

En la revisión de van Rhijn y Vanderleyden (1995) solo considera que existen tres géneros: *Rhizobium* con 10 especies, *BradyRhizobium* con 3-5 especies y *AzoRhizobium* con una.

Los estudios de homología de ADN y análisis del ARN ribosómico (5S, 16S y 23S) demuestran que *Rhizobium* y *BradyRhizobium* no están relacionados entre sí, en

cambio entre *Rhizobium* y *Agrobacterium* se presenta una estrecha correlación al igual que sucede entre *BradyRhizobium* y *Rhodopseudomonas* (Young, 1992). Los datos de homología de genomas del r-RNA indican que *AzoRhizobium* está más relacionado con *Xantobacter* y *Agrobacterium* que con *BradyRhizobium* y *Rhizobium* (Dreyfus *et al.*, 1988).

4. SIMBIOSIS *Rhizobium*-LEGUMINOSA

Las bacterias pertenecientes al género *Rhizobium*, *BradyRhizobium* y *AzoRhizobium* tienen capacidad de establecer simbiosis fijadora de N₂ en raíces y tallos de las leguminosas, a excepción del género *Parasponia* perteneciente a la familia Ulmacea (Olivares *et al.*, 1996). Dichas bacterias poseen toda la información genética necesaria para desarrollar en conjunción con la planta estructuras especializadas denominadas nódulos (Toro y Olivares, 1994).

La interacción *Rhizobium*-leguminosa es específica, cada cepa posee su propio rango de hospedador definible, si bien la amplitud del rango puede ser enormemente variable. Todas las plantas susceptibles de ser infectadas por una misma especie o biovariedad de rizobio pertenecen al mismo grupo de inoculación cruzada (Vincent, 1974).

4.1. Organización de los genes *nod*, *nif* y *fix*.

Los genes de la fijación simbiótica de nitrógeno pueden ser divididos en genes *nod*, *nif* y *fix*. Los genes *nod* son requeridos para las primeras etapas en la formación del nódulo (Kondorosi *et al.*, 1991). Los genes *nif* son estructuralmente homólogos a los 20 genes *nif* de *K. pneumoniae* (Arnold *et al.*, 1988) cuyas funciones son similares. Al menos 9 genes *nif* rizobiales diferentes han sido identificados en *R. meliloti*, *B. japonicum* y *A. caulinodans*. El término "*fix*" es usado para los genes que son esenciales para la fijación de nitrógeno pero no tienen su contraparte homóloga en *K. pneumoniae*.

R. meliloti lleva dos plásmidos muy grandes, el megaplásmido 1 o pSym-a de aproximadamente 1,400 kb en el que se encuentran los genes *nif*, *fix* y *nod* distribuidos en tres regiones (Honeycutt *et al.*, 1993; Sobral *et al.*, 1991) y el megaplásmido 2 o pSym-b de 1,700 kb en la que se encuentran genes adicionales requeridos para una simbiosis efectiva (Leigh, 1994).

B. japonicum y aparentemente *A. caulinodans* no tienen plásmidos, por consiguiente, los genes *nif* y *fix* (y *nod*) están localizados en el cromosoma y se encuentran distribuidos en

tres regiones (Künding *et al.*, 1993). Sin embargo, Stacey (1995) indica que en *B. japonicum*, los genes simbióticos *nod*, *nif* y *fix* están en dos grandes clusters separados por aproximadamente 200 kb. Fischer (1994) señala que la región simbiótica de *B. japonicum* estuvo localizada originalmente en un plásmido similar a los plásmidos Sym de *R. meliloti* y se vuelve entonces parte del cromosoma por integración en una etapa durante la evolución. Alternativamente, los plásmidos simbióticos de *R. meliloti* (y otros rizobios) pueden haberse generado por excisión de una región del cromosoma. En *A. caulinodans* 4 grupos de genes *nif* o *fix* han sido caracterizados; sin embargo, su posición relativa en los cromosomas no es conocida (Fisher, 1994).

4.2. Componentes de superficie de la bacteria necesarios para el desarrollo de los nódulos

4.2.1. Exopolisacáridos

El exopolisacárido (EPS) de *R. meliloti* es un heteropolisacárido de gran tamaño constituido por una unidad de glucosa y galactosa con sustituciones de piruvato, acetato y succinato. Existen dos tipos: una de alto y otra de bajo peso molecular. Sus posibles funciones son: actuar como mecanismo de defensa de la planta a modo de protección; actuar como señal para la planta en el reconocimiento de los pelos radicales susceptibles de ser infectados; actuar como transportadores de enzimas extracelulares; y formar parte de la matriz del cordón de infección.

Generalmente las especies del género *Rhizobium* producen exopolisacáridos que son importantes en el desarrollo de los nódulos fijadores de nitrógeno (Long, 1989), sin embargo, Chen *et al.* (1996) demostraron que cepas mutante Exo⁻ que nodulan *Astragalus* indujeron nódulos fijadores de nitrógeno normales, en comparación a la cepa silvestre. Stacey *et al.* (1991) señalan que tanto los EPS como los lipopolisacáridos (LPS) tienen diferentes funciones en la formación de nódulos determinados e indeterminados. Sin embargo, López-Lara *et al.* (1993) sugiere que los EPS sólo son requeridos por los nódulos indeterminados y no por los determinados. Putnoki *et al.* (1990) señalan que ambos polisacáridos (EPS y LPS) juegan el mismo papel en la interacción planta-bacteria.

4.2.2. Lipopolisacáridos

Los lipopolisacáridos (LPS) son compuestos químicos fundamentales de la membrana externa de las bacterias gram (-) (Yokota, 1996). Los LPS presenta dos estructuras, el lípido A y el polisacárido que a su vez presenta dos partes, polisacárido central y polisacárido lateral o también denominado antígeno O.

El polisacárido lateral presenta unidades repetitivas de oligosacáridos de 3 a 5 unidades cada una, estas unidades repetitivas cambian según la especie y el serogrupo. La pérdida del antígeno-O provoca una alteración de la carga de superficie que altera el carácter hidrofóbico de las bacterias gram (-) (Palomar *et al.* 1995, Making y Beveridge, 1996). Cuando los LPS de *Rhizobium leguminosarum* se analiza mediante electroforesis de SDS-PAGE, aparecen dos bandas, una que migra lentamente y se denomina LPS I y corresponde a la molécula de LPS completa, y una segunda banda de migración más rápida, llamada LPS II y corresponde a la molécula de LPS que carece de antígeno-O (Carlson *et al.*, 1987).

En *R. loti* se ha observado, que la estructura de las cadenas de polisacárido-O está implicada en la especificidad serológica y en el proceso de reconocimiento, lo que permite una nodulación efectiva con *Lotus temis* y *L. corniculatus* var. *cree* (Hotter y Scott, 1991).

Se ha demostrado la importancia del antígeno-O de los LPS en la simbiosis que establecen distintas cepas de *R. leguminosarum*, *R. etli* y *BradyRhizobium japonicum* demostrada (Stacey *et al.* 1991; Noel *et al.* 1996). Las mutantes de *R. etli* deficientes en antígeno-O que infectan a *P. vulgaris* producen pseudonódulos o nódulos anormales con pocos bacteroides que no fijan nitrógeno (Noel *et al.* 1996). Sin embargo, mutantes de *R. leguminosarum* bv. *viciae* y *R. leguminosarum* bv. *trifolii* que tienen el polisacárido O alterado, son capaces de nodular normalmente (Brink *et al.* 1990). Las mutantes con sus LPS severamente alterados, pierden su capacidad de infección (Perotto *et al.* 1994). Incluso, se ha descrito que cuando estas mutantes forman nódulos, las células presentan una gran desorganización citoplasmática, que provoca en etapas iniciales del desarrollo del nódulo su envejecimiento. Los exudados de *P. vulgaris* pueden provocar cambios en los LPS de *R. etli* CFN42 (Noel *et al.* 1996), los cuales pueden ser importantes en la capacidad de infección en la planta. En otros casos se ha descrito que ciertas mutantes en LPS pueden establecer simbiosis efectiva en la fijación de nitrógeno aunque existe un retraso en la nodulación (Pühler, 1993).

4.2.3. β -Glucanos periplásmicos

Este polisacárido es un homopolímero formado por 17 a 24 restos de glucosa unidos mediante enlaces β -1,2, que generalmente no lleva sustituciones. De este tipo se encuentran en *Rhizobium* y *Agrobacterium*, sin embargo *BradyRhizobium japonicum* produce oligómeros más pequeños con uniones β -1,3 y β -1,6. Su función está relacionada con la adaptación a baja osmolaridad y por ello puede jugar un papel fundamental en la nodulación y en el mantenimiento de la integridad celular de la bacteria, también pueden actuar como protectores frente a las reacciones de defensa de la planta (Gray *et al.* 1992).

4.3. Formación del nódulo

Los nódulos radicales son estructuras altamente organizados, con un tejido hiperplástico derivado de un meristemo de localización cortical (Hirsch, 1992). Los nódulos se dividen en dos grandes grupos caracterizados por su forma, su actividad meristemática y los productos de la fijación de nitrógeno transportados: nódulos que son elongados-cilíndricos con actividad meristemática apical indeterminada y que transportan el nitrógeno fijado como amidas tal como los de alfalfa, guisante y trébol; y nódulos que son esféricos con actividad meristemática determinada que transporta el nitrógeno fijado en forma de ureidos tal como soja y judías (Vance 1996). La iniciación de la formación de ambos tipos de nódulos es muy similar.

Las etapas morfológicas del desarrollo del nódulo y diferenciación de las bacterias en bacteroides han sido descritas ampliamente por Vance (1983), Sprent (1989), Hirsch (1992), Schultze *et al.* (1994) y Taté *et al.* (1994).

Los mecanismos de infección varían e incluye la entrada a través de espacios intercelulares en la epidermis, por heridas, o a través de los pelos radicales. En este caso la bacteria induce la curvatura del pelo radical, la formación de un foco de infección y el desarrollo de un canal de infección, que crece a lo largo del pelo radical en dirección al cortex, donde se ramifica. Simultáneamente a la infección se produce la inducción de división celular en el cortex y la formación del llamado primordio nodular, que dará lugar al nódulo maduro. Las bacterias se multiplican en los canales de infección y son finalmente liberadas en el interior de las células vegetales, rodeadas de una membrana derivada de la plasmática de las células vegetales, formando lo que se denomina simbiosoma (Olivares *et al.* 1996).

El reconocimiento de la leguminosa por *Rhizobium* y la nodulación es un proceso muy complejo, que implica un intercambio de señales entre los dos organismos. La planta secreta una serie de flavonoides e isoflavonoides que activan específicamente a la proteína NodD, un activador transcripcional de los llamados genes de la nodulación bacterianos (*nod*, *nod*) (Györgypal, *et al.*, 1991), responsables de la síntesis de nuevas moléculas señal (los llamados factores de nodulación) que serán reconocidos por la planta. Las moléculas sintetizadas por las bacterias en respuesta a los flavonoides de la planta son oligómeros de N-acetilglucosamina (de 2 a 5 residuos), N-acilados en su extremo no reductor por un ácido graso de diferente longitud y grado de insaturación. Dependiendo de la asociación específica de que se trate, este oligómero puede presentar distintas sustituciones (sulfato, metilfucosa, arabinosa) en su extremo reductor así como en el extremo no reductor (O-carbamilo, O-acetilo, N-metilo). Tanto estas sustituciones, así como el tipo de ácido graso presente en la molécula, parecen ser responsables de la especificidad del compuesto para inducir en la planta la formación localizada de meristemos, cuya proliferación dará origen al nódulo (Denarie *et al.*, 1992; Sequeira, (1993). El primer compuesto (NodRm-1), aislado de *R. meliloti*, fue identificado como un tetrasacarido N-acyl tri N-acetil B-1,4-D-glucosamina (Denarie y Cullimore, 1993). Moléculas señales similares han sido aisladas de *R. leguminosarum* bv. *viceae*, *Rhizobium* sp. NGR234, *R. tropici*, *R. etli*, *A. caulinodans*, *B. japonicum* y *B. elkanii* (Stacey, 1995).

Los nódulos maduros tienen tres regiones , (1) una zona blanca que incluye el meristemo del nódulo y la zona de infección a través de la invasión, (2) una zona roja, debido a la presencia de leghemoglobina , en la que se localiza el sitio activo de la fijación de nitrógeno y contiene los bacteroides (bacterias que presentan actividad nitrogenasa) en varias fases de desarrollo; y (3) una zona verde, en los nódulos más viejos, que indican la senescencia en la base (Vance, 1990). En la zona de invasión, los rizobios son liberados en el citoplasma de la célula. Las bacterias son englobadas en sacos membranosos (membrana peribacteroidea) diferenciándose en bacteroides, los cuales aumentan de tamaño (1.5x4.0 μm), e induciéndose la actividad nitrogenasa, mientras que los componentes de la pared celular se alteran. Las células que contienen bacteroides crecen más mientras progresa el desarrollo de la simbiosis. En los nódulos determinados, los bacteroides varían de tamaño y pueden encontrarse varios dentro de la membrana peribacteroidea, pero tienden a ser más pequeños que aquellos de los nódulos indeterminados, los cuales solo contienen un bacteroide. Los nódulos senescentes se caracterizan por ser de color verde o marrón y por la desintegración de bacteroides y del tejido nodular. En una planta madura puede encontrarse nódulos en todas las fases de desarrollo (Cook, 1995; Brown y Wolsh, 1996).

El bacteroide funciona en un ambiente microaeróbico necesario para, la transcripción de los genes *nif* y *fix*, que codifican la enzima nitrogenasa, su regulación y una serie de proteínas implicadas en el aporte electrónico requerido para su funcionamiento. (Olivares *et al.* 1996).

4.4. Bioquímica de la fijación de nitrógeno: actividad nitrogenasa

La capacidad de fijar nitrógeno se debe al complejo enzimático nitrogenasa purificado y aislado por primera vez por Carnaham *et al.* (1960) en *Clostridium pasteurianum*. La estructura, función y mecanismo de acción de esta enzima, ha sido objeto de estudio durante los últimos treinta años (Yates, 1992).

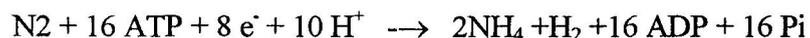
Actualmente se conocen tres formas de nitrogenasa genéticamente diferenciada: el sistema convencional o molibdo-nitrogenasa cuyo centro activo es el FeMoco (Imperial *et al.*, 1989), y dos sistemas alternativos descubiertos mas recientemente, la vanadio-nitrogenasa o nitrogenasa-2 cuyo centro activo es el FeVaco (Robson *et al.*, 1986; Bishop, 1988), y la nitrogenasa-3, dependiente del hierro como único metal en el centro activo de la enzima, FeFeco (Bishop, 1990; Bishop y Premakumar, 1992). Las nitrogenasas alternativas, se expresan cuando existe deficiencia de molibdeno y su componente I es un proteína hexamérica ($\alpha_2\beta_2d_2$) (Luch y Ligeró, 1992). No todas las especies fijadoras de N_2 poseen los tres sistemas, no habiendo sido descritos estos sistemas alternativos de la nitrogenasa convencional en ninguna especie de *Rhizobium* (Newton, 1993).

El complejo enzimático de las nitrogenasas convencionales consta de dos componentes: el componente I, una molibdo-ferro proteína denominada nitrogenasa, que contiene el lugar de union del sustrato y es específicamente reducida por el componente II, que es una ferroproteína denominada nitrogenasa reductasa.

El componente I de la nitrogenasa posee una estructura tetramérica $\alpha_2\beta_2$, con un PM aproximado de 220KDa. Cada molécula de la MoFe-proteína posee seis centros metálicos: cuatro centros diamagnéticos, portadores de átomos de Fe y S (4Fe:4S) y dos centros paramagnéticos que contienen Mo, Fe y S (1Mo:7Fe:9S) denominado FeMoco. El componente II o Fe-proteína es un dímero con dos subunidades idénticas de 32 Kda cada una. Este dímero se une simétricamente a un centro 4Fe-4S (Dean *et al.*, 1993).

La actividad viene determinada por la existencia de los dos componentes, ATP-Mg²⁺, donadores de electrones y un sistema de protección frente al oxígeno (Postgate, 1987).

Normalmente como donador de electrones para la enzima *in vivo* actúa la ferredoxina y flavodoxina (Gallon y Chaplin, 1987), que proporcionan los equivalentes de reducción necesarios para reducir al nitrógeno. El mecanismo de transferencia de electrones ha sido recientemente descrito por Lowe *et al.* (1995) mediante un proceso endergónico que requiere un mínimo de energía de 960 kJ por unidad de nitrógeno fijado. De ahí que se requieran 16 moléculas de ATP hidrolizadas por los 8 electrones transportados a través del complejo nitrogenasa (Pate y Layzell, 1990).



La nitrogenasa de todos los diazotrofos en los que se ha estudiado reduce protones a hidrógeno, concomitantemente con la reducción de nitrógeno a amonio. Bulen y LeCompte (1966) describieron este hecho por primera vez en extractos de *Azotobacter* y demostraron que el proceso es dependiente del ATP. El mecanismo más aceptado para explicar esta producción de hidrógeno fue propuesto inicialmente por Chatt (1980) y revisado posteriormente por Bothe *et al.* (1995). El modelo predice una estequiometría de un mol de hidrógeno producido por mol de nitrógeno fijado, lo que implica que el 25% de los electrones que pasan a través de la nitrogenasa se desvían y en consecuencia es una fuente de ineficiencia de esta actividad (Schubert y Evans, 1976; Dixon *et al.*, 1981).

4.5. Nodulinas

Las nodulinas son proteínas cuyos genes que la codifican, se expresan diferencialmente durante el desarrollo del nódulo, por lo que se dividen en dos grupos: nodulinas tempranas expresadas durante las primeras etapas de formación y desarrollo del nódulo, y nodulinas tardías que se expresan justo antes o durante el proceso de fijación de nitrógeno (Govers *et al.* 1987).

En el estado de preinfección se han detectado proteínas que están implicadas en la diferenciación y encurvamiento del pelo radical (Nap y Bisseling, 1990). En el proceso de infección se han identificado dos nodulinas en *Pisum sativum*, PsENOD-12 y PsENOD-5. La primera está implicada en la formación del primordio nodular (Scheres *et al.*, 1990). La segunda sólo se expresa en las células que contiene el cordón de infección (Knox *et al.*, 1989), aunque está presente en las células infectadas iniciales del nódulo (Scheres *et al.*, 1990).

Las nodulinas tardías han sido detectadas en nódulos de diferentes leguminosas. Verma *et al.* (1992) sugieren que la inducción de las nodulinas tardías requiere una liberación endocitótica de la bacteria y además proponen, debido a la semejanza estructural encontrada entre ellas, que derivan de un ancestro común.

Entre las nodulinas tardías identificadas hasta el momento, las hay con función metabólica y con función estructural. Entre las nodulinas metabólicas, la más abundante es la leghemoglobina que funciona como hemoproteína portadora de oxígeno, facilitando su difusión hacia los bacteroides (O'Brian, 1996). La leghemoglobina consta de un grupo hemo (protoporfirina IX) y de un único polipéptido (globina), de 16 Kd. En condiciones fisiológicas, el grupo hemo es sintetizado por los bacteroides y la globina por los ribosomas de las células infectadas, ambos se ensamblan en el citoplasma vegetal. Pero todavía queda mucho por conocer sobre el mecanismo molecular de la síntesis de la leghemoglobina (Becana, 1995). Existen varios tipos de leghemoglobina, que se expresan diferencialmente en nódulos en soja (Jun *et al.*, 1995). También las moléculas de leghemoglobina difieren unas de otras en la secuencia de aminoácidos; lo que implica la presencia de isoproteínas, que pueden separarse por técnicas de cromatografía y electroforesis. Las leghemoglobinas de *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, *Sesbania rostrata* y *Glycine max* poseen dos, cinco, siete y ocho isoproteínas, respectivamente. Todas ellas parecen exhibir una afinidad similar por el oxígeno, sin embargo se desconoce el significado biológico de la variación de las proporciones relativas de los componentes con el grado de desarrollo del nódulo (Topunov, 1995).

Otras dos nodulinas tardías han sido descritas en el proceso de asimilación del amonio en nódulo de leguminosas. El amonio se metaboliza prioritariamente por las enzimas del ciclo glutamato sintasa: glutamina sintasa (GS) y glutamato sintasa (GOGAT). Ambas proteínas se expresan específicamente en el nódulo. Respecto a la GS se distinguen dos formas, siendo la forma Gsn la que incrementa su expresión con la simbiosis (Forde y Cullimore, 1989). Sin embargo, los resultados encontrados con la GOGAT son más contradictorios (Chen *et al.* 1990; Cordovilla *et al.* 1996).

Entre las isoenzimas de la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) nodular también podría detectarse otra nodulina tardía. De hecho, se ha identificado una pico de actividad en raíz y dos en nódulos de alfalfa y guisante. En judía se identifican dos picos en raíz y tres en nódulos, lo que implica que el pico adicional observado de actividad PEPC nodular puede ser una nodulina (Deroche y Carrayol, 1989). Sin embargo, Shuller *et al.* (1990) y Ocaña *et al.* (1996) estudiando nódulos de *Glycine max* y de *Vicia faba*, respectivamente, en ambos casos

usando métodos cromatográficos obtienen solo un pico de actividad. La actividad de la PEPC aumenta 10-15 veces en los nódulos (Vance *et al.* 1994), esta respuesta proporciona suficiente carbono para la biosíntesis de malato y ácidos orgánicos necesarios para la asimilación del amonio.

También se describen nodulinas tardías en el metabolismo del carbono, Thummler y Verme (1987) describen a la sacarosa sintasa nodular como la nodulina Ngm-100. Otras nodulinas intervienen en la síntesis de los fotoasimilados nitrogenados exportados del nódulo. Así, la uricasa II caracterizada en nódulos de judía (Padilla *et al.* 1987) y soja (Nguyen *et al.* 1987).

5. FIJACIÓN DE NITRÓGENO EN *Phaseolus vulgaris*

El aumento de la fijación de nitrógeno en judía ha sido objeto de un programa de investigación coordinado entre la FAO (Organización de Alimentos y Agricultura) y la IAEA (Agencia Internacional de Energía Atómica) mantenidos durante cinco años (1986-1991) en el cual participaron diversos países.

Algunos resultados demostraron que las variaciones en la fijación de nitrógeno son muy amplias, dependiendo de las líneas o cultivares, y de las condiciones ambientales. Así, en Austria se encontraron líneas que fijan de 25 a 165 Kg ha⁻¹, en Brazil los valores fueron muy bajos desde 11 a 12 Kg ha⁻¹ a valores muy altos de 35 y 45 Kg ha⁻¹. En Mexico el rango se mantuvo entre 7 y 108 Kg ha⁻¹, en Perú de 20 líneas ensayadas los niveles oscilaron entre 19 y 59 Kg ha⁻¹ y en Chile demostraron que las judías de crecimiento indeterminado fijan mas nitrógeno que aquellas de crecimiento determinado (Handarson *et al.*, 1993)

Las tasas más altas de fijación fueron observados en cultivares adaptados, cuando las condiciones ambientales eran favorables. Según Maroto y Noguera (1994), la judía se desarrolla bien en climas cálidos, siendo su óptimo de temperatura entre 16 y 24°C. Temperaturas muy altas, causan la caída de las flores y temperaturas muy bajas de noche pueden ocasionan deformaciones de las vainas. La planta requiere agua principalmente entre la floración y la formación de las vainas, requiriendo entre 25 y 30 mm de lluvia, para que el grano alcance la madurez fisiológica y poder obtener buenos rendimientos. El cultivo requiere de suelos bien drenados con niveles de pH entre 5.5 y 7.0, pH mayores de 7.0 puede provocar problemas de clorosis

Según Bliss (1993) y Epping *et al.* (1994) *P. vulgaris* en simbiosis con *R. leguminosarum* bv *phaseoli* es considerada como una leguminosa grano pobre en la fijación de nitrógeno. Según Bliss (1993), en cultivares que se desarrollan normalmente a expensas de la fijación de nitrógeno, la cantidad total de nitrógeno derivado de la atmósfera (Ndfa total) y la proporción del nitrógeno de la planta de la atmósfera (% Ndfa) es insuficiente para producir semillas económicamente rentables (1000-2000 Kg ha⁻¹). Sin embargo, las investigaciones en selección de cultivares han producido algunos capaces de fijar elevados niveles de nitrógeno que pueden sostener la producción de semillas, cuando los rizobios nativos o inoculados efectivos están presentes. También se han realizado hibridaciones de un cultivar adaptado con un parental altamente fijador de nitrógeno obteniéndose resultados positivos (Kipe-Nolte, 1993). Una de las formas de mejorar este proceso de *P. vulgaris* es seleccionando líneas con gran capacidad fotosintética ya que son las que fijan mayor cantidad de N₂, otra característica importante en la selección es el hábito de crecimiento (Micke, 1993).

Según Micke (1993) señala que la fijación de nitrógeno puede mejorar utilizando plantas mutantes, dichas mutaciones pueden ser inducidas o espontáneas. De acuerdo a los estudios de Manrique *et al.* (1993) con siete mutantes de *P. vulgaris* una de ellas mostró un rendimiento y fijación de nitrógeno mejor que la silvestre. Clair y Bliss (1991) y Pereira (1992) demostraron la posibilidad de que el proceso de fijación y la producción de judías pueda mejorarse mediante selección de genotipos. Además Kipe-Nolte *et al.* (1993) resaltaron ciertas características del genotipo de la planta que pueden ser importantes en la eficiencia de la fijación de nitrógeno en la simbiosis: el ciclo de crecimiento de la planta, el vigor, la nodulación, la eficiencia del uso del carbono, la actividad específica de la nitrogenasa de nódulos, el transporte de carbono y nitrógeno, y la capacidad de tomar el nitrógeno del fertilizante.

Epping *et al.* (1994) estudiaron la interacción entre cepas de *Rhizobium* y genotipos de *P. vulgaris* en condiciones controladas con objeto de comparar la fijación simbiótica de nitrógeno y la producción de biomasa. Las respuestas en los parámetros estudiados fueron variables dependiendo de la combinación planta-*Rhizobium*. El valor de la actividad nitrogenasa por peso seco de nódulo y la tasa relativa de acumulación de nitrógeno durante las fases tempranas de desarrollo simbiótico mostrados en una de las combinaciones, pueden ser, parámetros a considerar como prerequisite de la simbiosis para que pueda cubrir la demanda total de este elemento en *P. vulgaris* durante las últimas etapas de desarrollo.

Se han propuesto diversas formas de evaluar la efectividad de la fijación simbiótica de nitrógeno: N total planta, Ndfa en % y total en planta, Ndfa en semilla y producción de semillas (Danso, *et al.*, 1993, Henson, 1993). Existen otros métodos conocidos en los que se incluyen la dilución isotópica por ^{15}N (Fried y Middlibre, 1977), la diferencia del N total de la planta nodulada y no nodulada (Legg y Sloger, 1975), el peso seco y/o el número de nódulos (Arora y Luthra, 1971), cosecha total, o bien la reducción de acetileno (Hardy *et al.*, 1968; Wessey, 1944) aun cuando no es un método aconsejable en experimentos de campo (Minchin *et al.* 1994).

6. SALINIDAD

6.1. Aspectos salinos del suelo

La salinidad es reconocida como el mayor problema agrícola en regiones áridas y semiáridas (Dudley, 1994). Se ha estimado que más de 40×10^6 Ha de suelo de las 220×10^6 cultivables están afectadas por la salinidad. Los desiertos ocupan una extensión aproximada de 1600×10^6 Ha de suelo, por lo tanto se puede suponer que un 40% del suelo son áreas con potenciales problemas salinos. La mayor parte de éstas áreas están confinadas en la región mediterránea (World Resources, 1987). Los diferentes suelos afectados por sales no solo se distribuyen en los desiertos y semidesiertos sino que también frecuentemente se presentan en suelos de sedimento fértiles, valles, zonas costeras y en sistemas irrigados (Szabolcs, 1994). A pesar de que los suelos salinos están ampliamente distribuidos, el efecto de la salinidad en cultivos de leguminosas y en el proceso de fijación de nitrógeno ha sido poco estudiado.

La formación de suelos salinos requiere dos condiciones, la existencia de una fuente de sales solubles y la acumulación de estas sales, evitando que se eliminen por lavado vertical o lateral, o por algún factor edáfico, climático o geomorfológico. La naturaleza de las sales acumuladas y su posterior distribución, tanto en el paisaje como en el perfil del suelo, estarán condicionadas fundamentalmente por su solubilidad, por la dinámica de las aguas superficiales y por la lixiviación (Simón *et al.*, 1993).

Los suelos afectados por sales se dividen en varios grupos de acuerdo al tipo de sal que prevalece:

1. Suelos con sulfato y cloruro sodico. Presentan reacción neutra y constituyen la mayoría de los suelos afectados por sales en el mundo. El estrés producido es osmótico, además presentan problemas de toxicidad provocados por el ion cloro.
2. Suelos alcalinos o sódicos que presentan reacción alcalina y contienen carbonato y bicarbonato sodico. En general su contenido de sales es más bajo que en otros suelos salinos. Se extienden en todas las regiones climáticas. El estrés producido es debido al pH alcalino.
3. Suelos salinos con sulfato o raramente cloruro calcico. El pH ácido y alto contenido de yeso constituyen el factor estrés.
4. Suelos salinos influenciado por sales de magnesio. El efecto tóxico y la deficiencia de calcio condicionan el factor estrés.
5. Suelos sulfato ácidos que son ricos en sulfato de aluminio y de hierro. La acidez extrema de estos suelos y el efecto tóxico del aluminio es el factor tóxico. Todos estos suelos son comparables por su alto contenido de electrolitos, y limitan grandemente el desarrollo de los cultivos.

La alta concentración de sales provoca 1) una reducción del potencial osmótico de la solución del suelo que reduce la disponibilidad del agua en la planta, 2) deterioro en la estructura física del suelo que disminuye la permeabilidad del agua y limita la fase gaseosa y 3) toxicidad del ión específico. La salinidad también puede afectar indirectamente el crecimiento de la planta a través de la inhibición de los procesos biológicos del suelo, tales como mineralización de nitrógeno y nitrificación. Los cationes frecuentemente asociados a la salinidad son el calcio, magnesio y sodio y los aniones, cloruro, sulfato y bicarbonato. En ocasiones el potasio y el nitrato pueden favorecer el estrés salino, y cuando el pH es superior a 9, el bicarbonato se convierte en un anión importante (Dudley, 1994).

6.2 Efecto de la salinidad en la planta

6.2.1. En la germinación

El proceso de germinación ha sido estudiado bajo distintas condiciones adversas como: deficiencia de agua (Huc, 1992) en diferentes genotipos de *Phaseolus vulgaris*, temperaturas bajas (Rowland y Gusta, 1977; Zaiter *et al.*, 1994), sin embargo, en condiciones de salinidad no son muchos los estudios realizados.

En general la germinación y el establecimiento de la plántula se consideran fases críticas del ciclo de vida (Berry, 1989). En ambientes salinos, las plantas presentan un elevado riesgo de mortalidad, fracasando frecuentemente la revegetación y colonización tan necesarias en estos ambientes (Ungar, 1987). El parámetro utilizado por Maas y Hoffman (1977) para comparar la tolerancia a la sal durante distintas etapas del crecimiento en diferentes especies vegetales es el nivel de salinidad por debajo del cual el crecimiento no se afecta y por encima de él, el crecimiento decae linealmente. Este parámetro también ha sido utilizado por Noble (1985) y Marcar (1987) en ensayos de tolerancia a la sal en experiencias de germinación. Un parámetro significativo a tener en cuenta es el tiempo de germinación (Badger y Ungar, 1989). Otro parámetro usado para comparar diferentes genotipos tolerantes a la salinidad es la concentración de sal que reduce la germinación en un 50% (G_{50}) en comparación al control.

Lovato *et al.*, (1994) analizó los efectos del NaCl sobre la germinación de seis poblaciones de *Sesbania humilis* de tres regiones del noreste de Brazil, sus resultados demostraron diferencias en la tolerancia a la sal en términos de porcentaje de germinación. Diferentes resultados en *S. humilis* (Lovato *et al.*, 1994) demuestran que la tasa de germinación se afecta más que el porcentaje de germinación, resultados similares fueron encontrados para *Trifolium subterraneum*, *Vigna unguiculata* y *Lycopersicon esculentum* (West y Taylor, 1981; West y Francois, 1982 y Torres-Shuman *et al.* 1989). West y Francois (1982) indicaron que a bajas concentraciones de sal, donde sólo la tasa de germinación es afectada, la influencia de la sal puede ser puramente osmótica, pero que a concentraciones más altas, en la cual se afecta los porcentajes de germinación, la sal puede producir un efecto osmótico y/o tóxico.

La sensibilidad al NaCl de varias especies vegetales como, girasol, judía, trébol, guisante durante la madurez es mayor que en la fase de germinación siendo esto el resultado de una evolución no adaptativa (Guerrier, 1983a). Inversamente, una evolución adaptativa puede ser observada en halofitas, trigo, tomate y soja, las cuales son más sensibles al NaCl durante la germinación que durante el desarrollo de la planta (Guerrier, 1983b; Bourgeais-Chaillou *et al.*, 1992).

La sensibilidad a la sal durante la germinación en soja se relacionó principalmente con el uso heterotrófico del carbono (Bourgeais-Chaillou *et al.*, 1992). En estudios previos se había detectado incrementos de los niveles de ácidos orgánicos (citrato, malato, succinato) como respuesta a la adición de NaCl (Hubac *et al.*, 1986; Bourgeais-

Chaillou y Guerrier, 1992). Esta respuesta osmótica ha sido encontrada en diferentes genotipos de algodón (Timpa *et al.*, 1986) y en tomate (Bourgeais-Chaillou y Guerrier, 1992). La acumulación de ácidos orgánicos va acompañada de una caída de pH en el citosol, lo que podría afectar negativamente a las actividades fisiológicas. Krackhardt y Guerrier (1995) encontraron que los ácidos orgánicos incrementan a partir de la segunda hora de imbibición en semillas de soja tratadas con NaCl, KCl o manitol, mientras que la prolina lo hizo a partir de la séptima hora. Ellos sugieren que los niveles altos de prolina y de ácidos orgánicos están relacionados con el crecimiento activo y la tolerancia a la sal.

En arroz (*Oryza sativa* L) se han determinado diferencias en el perfil de proteínas de la radícula que emerge a las 48 h de iniciarse el proceso de germinación (Rhada-Rani y Reddy, 1994). Estos perfiles reflejan cambios significativos en la síntesis de polipéptidos, que está en función del ajuste osmótico. Claes *et al.*, (1990) ha identificado el gen sal T inducido por la sal que codifica un polipeptido de 15 Kda que puede jugar un papel importante en la respuesta al estrés salino.

6.2.2. En el crecimiento

Las plantas en general reducen el crecimiento bajo condiciones de estrés salino, lo cual puede ser atribuido a la acumulación de iones tóxicos de sodio y cloro en los tejidos, alterando la nutrición, el metabolismo y las actividades enzimáticas.

En cultivares de soja sensibles a la sal, la mayor acumulación de cloruros y potasio en las hojas y menores niveles de estos elementos en las raíces es característico, mientras que en cultivares tolerantes fue menor la acumulación de estos elementos en las hojas, además de existir una distribución uniforme de cloro y potasio en tallos, hojas y raíces con nódulos (Velagaleti y Schweitzer, 1994). Por tanto en especies tolerantes existe una exclusión parcial del cloro en las hojas. En cuanto al sodio, las especies tolerantes presentan mayor contenido de este elemento en hojas, tallos y raíces que las sensibles a la sal, mientras que el tallo presenta mayor concentración de este elemento, lo que indica que el sodio se absorbe por las raíces, llegan a las células del parenquima xilemático y también se distribuye a las hojas (Laüchli 1984).

Además Velagaleti y Schweitzer (1994) encontraron que el contenido de clorofilas (a+b), en los cultivares sensibles de soja disminuyó con la salinidad, el cual fue más drástico a las cuatro semanas que a las dos semanas. En cambio en cultivares tolerantes las reducciones en el contenido de clorofilas no fueron tan acusadas.

6.2.3. Mecanismos de respuesta al estrés salino

En general, las plantas que toleran ambientes salinos han desarrollado básicamente dos tipos de estrategias, la estrategia glicofítica, basada predominantemente en la exclusión de iones de la raíz y/o parte aérea, en combinación con la síntesis de solutos orgánicos para su ajuste osmótico; y la estrategia halofítica, basada en la alta velocidad de absorción y transporte de iones, y cuya acumulación en determinados tejidos y su compartimentación subcelular evita la toxicidad iónica, al tiempo que contribuye significativamente al ajuste osmótico. La mayoría de las especies cultivadas suelen presentar una estrategia glicofítica aunque algunas de estas puedan exhibir rasgos halofíticos (Shannon, 1984).

A nivel celular coexiste un control de absorción de iones y su compartimentación intracelular (vacuolas), para mantener las concentraciones de iones en el citoplasma en un rango de 100 a 200 mM. Por tanto se requiere una gran selectividad del K^+ sobre el Na^+ ; del Mg^{2+} sobre el Ca^{2+} ; y del fosfato sobre el Cl^- y el NO_3^- , para lograr un equilibrio osmótico entre el tonoplasto y el medio externo, además se requiere la síntesis de solutos orgánicos compatibles (prolina, sacarosa, azúcares, etc) en el citoplasma (Gorham *et al.*, 1985).

La captación de grandes cantidades de iones Na^+ y Cl^- por la raíz, provoca la alteración de la absorción y por tanto del contenido de otros iones, tales como K^+ y Ca^{2+} (Cramer *et al.*, 1987). La especificidad del sistema de absorción de K^+ varía grandemente en plantas halófitas y glicofitas que difieren a su vez con el grado de tolerancia (Serrano y Gaxiola, 1994). En glicofitas, la membrana se despolariza en respuesta a altas concentraciones salinas, esta despolarización abre los canales de cationes, permitiendo al Na^+ moverse hacia el interior celular a una velocidad gobernada por el gradiente electroquímico de este catión y por la permeabilidad de los canales de Na^+ (Schachtman *et al.*, 1991). La selectividad K^+/Na^+ debe estar controlada a nivel de tres membranas: plasmalema de las células epidérmicas y corticales de la raíz, tonoplasto de la raíz y plasmalema de las células parenquimáticas del xilema, la primera de ellas debe ser altamente selectiva para el K^+ , bien por un influjo selectivo de K^+ y/o por una extrusión activa de Na^+ (Binzel, 1995; Nakamura *et al.*, 1996).

La estructura y funcionalidad de las membranas celulares pueden verse alteradas por factores ambientales que afectan la fluidéz y la permeabilidad de las mismas (Kuiper, 1985). La modificación de la composición lipídica inducible por condiciones ambientales adversas, como la salinidad puede tener carácter adaptativo o ser el reflejo de proceso degradativos provocados por el estrés (Kuiper, 1985). En especies sensibles a la sal, los cambios pueden

alterar la funcionalidad de la membrana, reduciendo su permeabilidad selectiva de iones (Mansour *et al.*, 1993), mientras que en especies tolerantes se observa una correlación de la disminución del contenido de esteroides con la tolerancia (Kuiper, 1984). También se ha comprobado que la salinidad incrementa el grado de insaturación de los lípidos de raíces de judías (Cachorro *et al.*, 1993) y provoca una disminución en el contenido de fosfolípidos totales.

Según Samaras *et al.* (1994), los solutos compatibles u osmoreguladores de las células incluyen:

- 1) varios aminoácidos: prolina, alanina, B-alanina y taurina.
- 2) compuestos cuaternarios de amonio: glicina betaina, prolinabetaina, β -alaninabetaina, glicerofosforilcolina y colina-O-sulfato.
- 3) ciertos carbohidratos: trealosa, glicerol, manitol sorbitol y pinitol (Yancey 1994).

Estos compuestos no tienen carga a pH neutro y son altamente solubles en agua. Así mismo, Jacoby (1994) describe a la prolina, glicina-betaina, algunos azúcares, polioles y malato como osmolitos compatibles de bajo peso molecular y Tarczynski *et al.* (1993) demostraron que el manitol incrementa la tolerancia a la salinidad en plantas de tabaco transgénicas.

La acumulación de prolina es una respuesta metabólica de plantas superiores a determinados tipos de estrés (Csonka y Baich, 1983; Delauney y Verma, 1993). En general, el contenido de prolina es directamente proporcional al nivel de salinidad o a la intensidad del estrés hídrico. Así, en hojas de plantas halofitas adaptadas a ambientes salinos, el nivel de prolina acumulado en ellas es elevado (Briens y Larher, 1982). En raíces de maíz bajo condiciones de estrés hídrico, puede alcanzar concentraciones de 120 mM (Voetberg y Sharp, 1991). En hojas de tabaco en condiciones de estrés salino, la prolina representa el 80% de nivel de aminoácidos libres (Binzel *et al.*, 1987). Tanto la prolina como la glicina-betaina se acumulan prioritariamente en el citosol (Ketchum *et al.* 1991) para equilibrar el potencial osmótico de la vacuola donde se acumulan los iones. La producción de prolina conlleva en ocasiones una reducción de solutos (glutamato, trehalosa) y un aumento del agua citosólica (Yancey, 1994). Heuer (1994) indicó que la prolina afecta a la solubilidad de varias proteínas protegiéndolas contra la desnaturalización bajo condiciones de estrés. Además señaló que un aumento en el contenido de prolina puede estar asociado al incremento de su biosíntesis, o una síntesis alterada de las proteínas.

A pesar de numerosos trabajos sobre la acumulación de prolina en planta, bajo condiciones de estrés, algunos otros demuestran una respuesta negativa (Heuer, 1994). Así, una correlación positiva no siempre es encontrada entre el contenido de prolina y tolerancia relativa o susceptibilidad de la planta al estrés salino en maíz y caña de azúcar existe poca acumulación de prolina en condiciones de salinidad lo cual explica la falta de tolerancia a la sal de estos cultivos.

Según Espartero *et al.* (1994), el proceso de adaptación a la sal está condicionado por numerosos ajustes fisiológicos que pueden ser controlados a través de cambios en algunas proteínas y en los ARNm. Han sido aislados diversos genes cuya expresión resulta modificada por el estrés salino. Algunos de estos genes se identifican con proteínas que son aparentemente requeridas para funciones protectoras, tales como las proteínas-LEA o -RAB (Godoy *et al.*, 1990) y la osmotina.

6.3. Respuesta al estrés salino de *Phaseolus vulgaris*

Las judías son consideradas como leguminosas-grano sensibles a la sal (Läuchli, 1984; Delgado *et al.*, 1995) en comparación a otros cultivos de leguminosas. Los problemas asociados con la salinidad en esta especie son generalmente más dramáticos en regiones áridas con irrigación. El efecto inmediato del exceso de la salinidad viene condicionado por la disminución o detención del crecimiento, especialmente, reducción del área foliar y necrosis en el borde de las hojas, esto puede reflejar que coexisten tres procesos: la sequedad fisiológica, debido a un potencial osmótico muy negativo (concentración alta de soluto), el desequilibrio de nutrientes producido por elevadas concentraciones de elementos específicos, especialmente sodio, con la consiguiente inhibición de la utilización de otros elementos y el efecto tóxico de iones específicos, particularmente cloro y sodio.

Según Ayoub e Ishag (1974) detectaron reducciones de calcio y potasio bajo condiciones de alta sodicidad. Altos niveles de cloruro en hojas de judía fueron asociadas con fotosíntesis, conductancia estomatal y eficiencia de la ribulosa difosfato carboxilasa reducida (Seemann y Critchley, 1985). Estos datos sugieren que los efectos de la salinidad son probablemente múltiples y el querer enfatizar en un sólo mecanismo, podría no ser correcto.

Estudios de variación genética en respuesta a la tolerancia a la sal entre cultivares de *P. vulgaris* son escasos. Según White e Izquierdo (1993) detectaron diferencias

varietales bajo condiciones de campo, sin embargo dicha variabilidad en respuesta a la salinidad bajo estas condiciones hace difícil la selección a gran escala. Varios investigadores han seleccionado líneas celulares tolerantes a la sal en pimienta dulce, caña de azúcar, café, arroz, taro pero no en judía sin embargo, las respectivas regeneraciones de plantas a partir de estas células tolerantes a la sal, ha sido muy limitada (van Schoonhoven y Voyses, 1993).

Pessarakli (1994), estudió el efecto de la sal en varios cultivares de *P. vulgaris*, encontrando que la producción de materia seca decrece, la parte aérea aunque tuvo mayor contenido de proteína total que la raíz, fue severamente más afectado por la sal que las raíces. Además dicho autor encontró que bajo condiciones normales las judías verdes absorben y utilizan más nitrógeno procedente del nitrato que del amonio para la síntesis de proteínas, pero en condiciones de estrés salino ocurre lo contrario, lo que implica que en condiciones de estrés salino modifican su régimen de nutrición nitrogenada.

Pessarakli (1992) encontró que el consumo de agua decrece substancialmente con la sal en diferentes cultivares de judías, sin embargo, existen diferentes respuestas a la salinidad dependiendo de los cultivares y del nivel de salinidad, lo cual puede ser un buen parámetro para seleccionar cultivares tolerantes a la sal.

6.4. Respuesta al estrés salino en la bacteria.

6.4.1. Efecto del estrés salino en el crecimiento y metabolismo de la bacteria

Diferentes autores han aislado cepas de *Rhizobium* tolerantes y no tolerantes a la salinidad. Así, Lai y Khanna (1994) encontraron dos cepas (de 35) aisladas de *Acacia nilotica* que toleran hasta 850 mM NaCl, las curvas de crecimiento de las cepas tolerantes crecidas en medio con NaCl se diferenciaron de las crecidas en medio sin sal en la fase lag, la cual se prolongaba en el tiempo.

Zahran *et al.* (1995) detectaron diazotrofos halofilas en suelos salinos de Egipto, las cuales se caracterizaron por tener una tasa de crecimiento más baja en condiciones de salinidad (5%) respecto al control. Ellos concluyen que las bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas corresponden al género *Bacillus* y bacterias gram negativas las cuales juegan un papel importante en la fertilidad y productividad de suelos salinos; en cuanto a sus actividades enzimáticas, las bacterias presentaron actividad amilasa a 0 y 5% NaCl,

pero la actividad celulasa y pectinasa desapareció en algunos aislados en condiciones de estrés.

Diversas cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* muestran una marcada variación en su tolerancia a la sal. Algunas son inhibidas con 100 mM NaCl (Yelton *et al.* 1983; Zhang *et al.* 1991), otras lo son a 300 mM como el caso de *R. meliloti* (Graham y Parker 1964; Sauvage *et al.* 1983), *R. fredii* (Yelton *et al.* 1983) y *R. tropici* junto con algunos rizobios que infectan a *Medicago*, *Acacia*, *Prosopis* y *Leucaena* pueden tolerar hasta 500 mM NaCl (Sauvage *et al.* 1983; Zhang *et al.* 1991).

Por otro lado, Nair *et al.* (1993) aislaron cepas de *Rhizobium* de diferentes leguminosas y encontraron cepas sensibles y tolerantes a la salinidad, solo algunas de ellas crecieron hasta 1.88 M NaCl, pero la gran mayoría lo hizo hasta 0.85 mM; también observaron cepas que a concentraciones elevadas de sal modificaron su crecimiento produciendo colonias amarillas, con bordes irregulares y con menor producción de mucopolisacáridos. Cordovilla *et al.* (1996) evaluaron diferentes cepas de *R. leguminosarum* bv. *viciae* y determinaron que en la mayoría de ellas, el crecimiento se redujo a 75 mM NaCl respecto al control, mientras que el tiempo generación aumenta en presencia de sal. Ghittoni y Bueno (1995), encontraron que la fase lag de crecimiento en *Rhizobium* sp. ATCC 51466 aumentaba tres veces y su tiempo de generación dos veces cuando creció en un medio con 400 mM NaCl.

Generalmente, los rizobios son más tolerantes al estrés osmótico que sus leguminosas hospedadora, aunque algunas especies de *Prosopis* toleran salinidades equivalentes al agua de mar (Felker *et al.*, 1981). El comportamiento de diferentes especies de rizobios es muy variable en su tolerancia a la sal. Así, mientras *R. meliloti* es tolerante a la sal y su óptimo de crecimiento es a altas temperaturas, algunas cepas de *R. leguminosarum* son sensibles a la sal (Zhang *et al.*, 1991; Chien *et al.*, 1992), y su crecimiento máximo es a bajas temperaturas (Lindstron y Lehtomäki, 1988).

Diferentes cepas de *Rhizobium* pueden presentar cambios metabólicos frente al estrés salino. Así, Craig *et al.* (1991) detectaron incrementos significativos en la concentración total de aminoácidos en tres cepas de *Rhizobium* cuando crece a 300 mM NaCl respecto al control sin sal. Además observaron que el glutamato y la alanina fueron los aminoácidos que se presentaron en mayor proporción. En cuanto a los azúcares, estos disminuyeron con la salinidad en las tres cepas, solo en una de ellas aumentó la glucosa en gran proporción. De los cationes determinados, el sodio incrementó

significativamente en todas las cepas, mientras que el nivel de potasio varió dependiendo de las cepas. Sin embargo, Yap y Lim (1983) han descrito que el potasio incrementó hasta cuatro veces con 0.4 M NaCl en cultivos de *Rhizobium* sp.

González-Gonzales *et al.* (1990) describen las enzimas involucradas en la síntesis del glutamato por considerar que la sobreproducción de este compuesto constituye una respuesta al estrés osmótico del *Rhizobium* en vida libre. Ellos observaron que una elevada osmolaridad (400 mM NaCl) no afecta significativamente la actividad específica de las enzimas glutamato sintasa (GOGAT), glutamato deshidrogenasa (GDH) y glutamina sintetasa (GS) en *R. meliloti*, en cambio Yap y Lim (1983) encontraron un efecto depresivo con la sal. La adición de potasio al medio (10 y 500 mM) inhibe las actividades enzimáticas de GOGAT y GDH pero estimularon las actividades de la GS.

La adición de glicina-betaina al medio con NaCl, reduce el tiempo de crecimiento de *R. meliloti*, en cambio no afecta a otras cepas sensibles a la sal de *Rhizobium*. También las cepas sal-tolerantes sintetizan más rápidamente dicha sustancia a partir de la colina, mientras que su catabolismo se reduce (Le Rudulier y Bernard, 1986; Tombras-Smith *et al.*, 1988). La superproducción de prolina en bacterias causada por una inhibición feedback alterada de la biosíntesis de la prolina puede incrementar la osmotolerancia (Smith, 1985).

6.4.2. Efecto del estrés salino en los perfiles de LPS y proteínas.

La búsqueda bibliográfica del efecto que el estrés salino ejerce sobre los LPS ha sido poco fructífera aunque otras formas de estrés indica una alteración en su composición (Sindhu *et al.*, 1990; Bhat y Carlson, 1992 y Tao *et al.*, 1992).

En general, los ambientes extremos pueden inducir cambios en los LPS, a nivel de su síntesis pudiendo alterar los procesos de infección y nodulación en simbiontes adaptados a estos ambientes (Zahran *et al.*, 1994). Estos autores han estudiado los efectos del NaCl, la sacarosa y el estrés térmico sobre los perfiles de LPS y proteínas de cepas de *R. leguminosarum* y *Rhizobium* sp. (*Lupinus*) aisladas de suelos salinos de Egipto y encontraron que dichas cepas toleran 3% de NaCl en medio YEM, además encontraron que no siempre se correlaciona la tolerancia a la sal con la tolerancia a la sacarosa. Entre las cepas que podían crecer con 3% NaCl se apreció una movilidad más baja de la región I de los LPS, en otras cepas también se observó que la movilidad de la región II decreció, esto sugiere que la mayoría de las cepas tolerantes a la sal sintetizan

LPS con mayor cantidad de oligosacáridos en respuesta a la sal. No existe un tipo de LPS producido como resultado del estrés pero los LPS de las cepas tolerantes sí difieren de los producidos por las cepas sensibles. Las modificaciones de LPS, comparado con los controles sin sal, indicarían que las cadenas largas de los LPS producidos en las cepas crecidas al 3% de NaCl podrían proteger a las células del estrés.

Lloret *et al.* (1995) estudiaron los cambios en la estructura de los LPS de *R. meliloti* EFB1 en presencia de sal y observaron cambios en el perfil de LPS con 300 mM NaCl respecto al control, alteración en la movilidad de los LPS-I y aparición de nuevas bandas en el antígeno-O. Además señalaron que los cambios fueron evidentes a 100 mM NaCl, a pesar que tal concentración no inhibe el crecimiento de la bacteria, sin embargo, en la cepa de *R. leguminosarum* 3841 no se observaron cambios a 75 mM considerando como su límite de tolerancia al estrés salino. Cambios similares fueron evidenciados en los perfiles de LPS con KCl y Na₂SO₄. Finalmente Lloret *et al.* (1995) demostraron que los cambios en los LPS debido a la sal era por efecto iónico y no por efecto osmótico.

De acuerdo con Zahran *et al.* (1994), el NaCl modifica el perfil de proteínas solubles totales de cepas de *Rhizobium*, observando que algunas bandas de polipéptidos desaparecen y otras nuevas aparecen, estas diferencias se mostraron al azar en diferentes cepas. También el estrés térmico induce la alteración del perfil de proteínas en *Rhizobium*. Cloutier *et al.* (1990) detectaron hasta siete proteínas inducidas por este estrés en cepas árticas de *Rhizobium* y Zahran *et al.*, (1994) incluso logran determinar el pM de una proteína (65 kDa) que la sobreproducen cuatro cepas de *Rhizobium* bajo esas condiciones.

6.4.3. Osmoregulación en bacterias

Un mecanismo común de osmoregulación en las bacterias así como en otros organismos es la acumulación de solutos orgánicos y/o inorgánicos en el citosol para restaurar la turgencia en plantas y microorganismos (Yancey *et al.*, 1982 y LeRudulier *et al.*, 1984). Entre los solutos orgánicos osmoticamente activos (osmolitos) están: polioles (azúcares, azúcares alcoholes y glicerol), aminoácidos y aminoácidos derivados (glutamato, prolina, betaínas ácido α -aminobutírico y taurina), y urea y metilaminas (trimetilamina-N-óxido).

Diferentes bacterias producen distintos osmolitos en condiciones de estrés salino, así se tiene que *B. subtilis* sintetiza glicina betaína a partir de colina (Boch *et al.* 1994),

E. coli produce trehalosa como osmolito prioritario (Larsen *et al.*, 1987); *R. meliloti* acumula glutamato (Botsford, 1984) o glicina betaina (Bernard *et al.*, 1986) y *Rhizobium* sp. trehalosa (Ghittoni y Bueno, 1995). *Synechococcus* sp produce glucosilglicerol (Borowitzka *et al.*, 1980) pero una transformación de esta cyanobacteria con *E. coli*, concretamente *Synechococcus* sp PCC7945 es capaz de producir glicina-betaina y adquirir rango de tolerancia a la sal (Larsen *et al.*, 1987).

Talibart *et al.* (1994) demostraron que la ectoína protege a varias especies de rizobios (*R. leguminosarum*, *B. japonicum* y *Rhizobium* sp.) en condiciones de estrés salino y proponen que existe dos clases de osmoprotectores: aquellos como la glicina betaina o glutamato, que actúan como verdaderos osmolitos y la ectoína, que actúa como mediador químico.

Otro osmolito descrito por Smith y Smith (1989), que se acumula en cultivos de *R. meliloti* en condiciones de estrés salino es N-acetilglutaminil-glutamina (NAGGN), siendo la concentración intracelular de este compuesto proporcional al NaCl del medio. Sin embargo, dicha acumulación no ocurre cuando se añade al medio sacarosa, tal vez porque esta se acumula en la célula como un osmolito, reduciendo la concentración del glutamato y NAGGN. Este metabolito también ha sido detectado en *R. meliloti* y en *P. fluorescens*, sin embargo no se encontraron en especies de rizobios menos tolerantes (*R. trifolii*, *R. fredii*, *R. sp.* de *Acacia*) ni en bacterias entéricas (*E. coli*, *K. pneumoniae*).

Smith *et al.* (1994) obtuvieron 39 colonias mutantes (mutagénesis química) sensibles osmóticamente que crecen bien en medio con niveles bajos de sal pero no con 0.5 M NaCl como su parental *R. meliloti* 102F34. En los mutantes se analizaron la producción de NAGGN y la actividad de la enzima NAGG sintetasa que se incrementa en medio estresado. Comparando los resultados con la cepa silvestre, 14 mutantes presentaron una concentración dos veces menor de NAGGN, y 7 una concentración 10 veces menor, lo mismo ocurrió con la actividad NAGG sintetasa. esto indicaría que el NAGGN es parcialmente responsable de la tolerancia osmótica de *R. meliloti*. ya que se conoce que dicha cepa también acumula K^+ , glutamato y trehalosa en respuesta a la presión osmótica.

La trehalosa es un osmolito poco abundante en el metabolismo de *R. meliloti*, pero parece ser importante tanto en medios con potencial osmótico negativo como en medios deficientes en fuentes de carbono (Breedveld *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1994). Ghittoni y Bueno (1995) en un estudio realizado con una especie de *Rhizobium* sp. que

infecta *Arachis hypogea* en condiciones de estrés salino (400 mM NaCl), concluyeron que los cambios en el crecimiento del *Rhizobium* van acompañados de una disminución en oligoglucanos y una acumulación de trehalosa que prioritariamente se produce en la fase logarítmica y estacionaria del crecimiento. Es interesante señalar los cambios observados cuando se adiciona al medio de cultivo prolina y glicina-betaína. En el primer caso (prolina), las bacterias producen menos trehalosa (50% menos) y acumulan más oligoglucanos. Cuando se adiciona glicina-betaína, se continúan acumulando los oligoglucanos pero el contenido de trehalosa no se afecta. esto sugiere que la prolina actuaría como un osmolito preferencial sobre la trehalosa.

La acumulación intracelular de osmolitos podría ser considerado en un contexto más amplio ya que constituyen moléculas que aparecen como respuesta a diferentes tipos de estrés, así, en *E.coli*, la concentración intracelular de la trehalosa es controlado por la alta osmolaridad, por la elevada temperatura y por la fase estacionaria (Hengge-Aronis *et al.*, 1991. Otros genes regulados osmóticamente son controlados por la temperatura y la concentración de oxígeno (Eshoo, 1988).

Por otro lado, Fujihara y Yoneyama (1994) evaluaron en cepas muy tolerantes a la sal como *R. fredii* P220 la acumulación de magnesio, potasio, glutamato y homoespermidina (poliamina). La homoespermidina es un policatión orgánico detectado en los suelos (Fujihara y Harada, 1989a) y su presencia ha sido demostrada en una amplia variedad de microorganismos (Tait, 1985). De hecho, Fujihara y Harada, (1989b) la describen en diferentes rizobios y bradyrizobios en condiciones normales de crecimiento.

Fujihara y Yoneyama, (1993) indicaron que el potasio y glutamato intracelular pueden estar asociados con el cambio en las concentraciones intracelulares de H^+ causado por el intercambio K^+-H^+ durante el shock osmótico y que la homoespermidina que es un compuesto altamente alcalino pueda mantener el pH intracelular o restaurar el desbalance iónico causado por el transporte rápido de K^+ .

6.5. Efecto del estrés salino en la nodulación y fijación de nitrógeno.

La osmolaridad del tejido radicular es suficiente para inducir estrés osmótico (Botsford, 1984), de tal forma que la bacteria también sufre dicho estrés cuando se establece la simbiosis.

Los suelos salinos pueden ser utilizados para el crecimiento de plantas fijadoras de nitrógeno, sin embargo es necesario conocer el efecto de la salinidad en la fijación de nitrógeno, identificar genotipos tolerantes a dichas condiciones, conocer la tolerancia de las bacterias y la combinación leguminosa-*Rhizobium* que se desarrollen bien en condiciones de estrés salino (Velagaleti y Schweitzer, 1994). Estos trabajaron con cultivares de soja, dos sensibles y dos tolerantes a la sal con 0 y 80 mM NaCl. Los cultivares sensibles redujeron su materia seca de parte aérea en más del 60% en condiciones salinas y más del 50% en la raíz, la necrosis, clorosis y muerte de hojas fueron evidentes a las cuatro semanas del tratamiento con NaCl, la masa nodular y el ARA disminuyeron drásticamente. En los cultivares tolerantes a la sal, disminuyó algo más del 30 % el peso seco de parte aérea, el 60% de la masa nodular y sólo un 25% el ARA, sin embargo no se modificó el peso seco de raíz.

Según Berdeleau y Prévost (1994), la alfalfa, haba y trébol producen nódulos meristemáticos indeterminados los cuales son más tolerantes a la sal que los nódulos determinados producidos en soja y judías. Sólo los nódulos indeterminados tienen la capacidad de regenerar su actividad en aquellas estructuras afectadas por el estrés salino. Los niveles de salinidad que inhiben la simbiosis leguminosa-*Rhizobium* suelen ser más bajos que aquellos que afectan el crecimiento de ambos simbiosis en vida libre. En general las leguminosas son más sensibles al potencial osmótico que su microsimbionte. Los rizobios aislados de suelos áridos son capaces de nodular leguminosas más eficientemente en condiciones de estrés salino u otro estrés.

Rai y Prasad (1983) identificaron dos cepas mutantes con nitrosoguanadina de la cepa sensible a la sal y estas aumentaron significativamente la nodulación y la fijación de nitrógeno en condiciones de estrés.

El proceso de iniciación del nódulo en soja es extremadamente sensible al NaCl. Una reducción en el número y peso seco de nódulo del 50% ocurre con 34.2 mM NaCl (Elsheikh y Wood 1995). Estos autores indicaron que la inoculación en cultivo de soja incrementó significativamente la producción de nitrógeno total tanto en parte aérea como en raíz, sin embargo, la salinidad afectó negativamente este parámetro en ambos órganos de la planta. La cepa de *BradyRhizobium* sensible a la sal acumula más nitrógeno en la parte aérea y raíces que las de *Rhizobium* tolerantes bajo condiciones no salinas, pero en condiciones de estrés salino no hubo diferencias. También encontraron que la fijación de nitrógeno fue más sensible a la sal que el crecimiento, lo que puede ser debido a la reducción del número de nódulos y del nitrógeno fijado por estos. Finalmente, indican que aunque la salinidad reduce la

nodulación y fijación en soja, el uso de cepas tolerantes bajo condiciones salinas puede producir un incremento en la fijación biológica en comparación con las cepas sensibles.

La sal puede influir en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa afectando, el crecimiento y supervivencia del *Rhizobium* en el suelo, restringiendo la colonización radical (Zahran y Sprent, 1986), el proceso de infección (Singleton y Bohlool, 1984), la iniciación nodular (Elsheikh y Wood, 1995), el desarrollo del nódulo (Craig *et al.*, 1991), el número y peso de nódulos por planta (Hafeez *et al.*, 1988), el funcionamiento del nódulo (Hopmans *et al.*, 1984) y por último, reduciendo la actividad nitrogenasa (Wilson, 1985). Tu (1981) encontró la total inhibición de formación de nódulos a 210 mM NaCl en cultivos de soja.

La producción de acetileno por bacteroides aislados de nódulos de *Medicago sativa* inoculada con cepas de *Rhizobium meliloti* tolerantes y no tolerantes a la sal, fue inhibida con distinta intensidad en presencia de NaCl en el medio de incubación (Bekki *et al.*, 1987). Estos autores sugirieron que la inhibición de la actividad reductora de acetileno por la sal podría estar directamente relacionada con la inhibición de la capacidad respiratoria de los bacteroides causada también por el estrés salino. Sin embargo, existen otros procesos implicados en la inhibición de la capacidad fijadora de nitrógeno causada por el estrés salino en diferentes especies de leguminosas (Delgado *et al.* 1994).

Craig *et al.* (1991) encontraron que el número y masa de nódulos de diferentes cepas de *Rhizobium* en cultivos de *Acacia* se redujeron con la salinidad, con alguna de ellas el nivel crítico de NaCl fue de 80 mM mientras que con otras fue de 120. La reducción de la fijación de nitrógeno y el contenido de nitrógeno total por planta también fue evidente en condiciones de estrés salino. Zou *et al.* (1995) describieron diferentes respuestas en la nodulación y fijación de nitrógeno de *Acacia ampliceps* cuando fueron inoculadas con una cepa de *Rhizobium* sensible a la sal y otra tolerante, las plantas inoculadas (número de nódulos, masa nodular y fijación de nitrógeno) con la cepa tolerante fue menos afectada a 200 mM NaCl que las inoculadas con la cepa sensible. Además encontraron que la actividad nitrogenasa fue más sensible a la salinidad que la nodulación.

7. NUTRICIÓN INORGÁNICA

La absorción de nutrientes en las leguminosas puede depender del genotipo de la planta (Drossopoulos *et al.*, 1994), de las prácticas de cultivo empleadas y de los cambios ambientales aéreos y terrestres (Pañuelas y Matamala, 1993). En consecuencia, los tejidos vegetales acumulan peso seco y nutrientes minerales durante el crecimiento vegetativo que posteriormente serán transportados a las semillas durante el llenado de la vaina. Las hojas reciben los iones procedentes de la solución nutritiva a través de la corriente transpiratoria que a su vez estaría relacionada con el crecimiento y con la edad del cultivo (Murty y Ladhe, 1988).

Los nódulos radicales, al igual que otros órganos vegetales, utilizan los nutrientes inorgánicos durante la fase de infección hasta el establecimiento de la fijación de nitrógeno. Diferentes nutrientes están involucrados en el metabolismo necesario para el mantenimiento del nódulo, sin estar directamente relacionados con el proceso de fijación de nitrógeno (O'Hara *et al.*, 1988; Rosendahl *et al.*, 1991).

En el suelo o medio de cultivo se encuentran los nutrientes requeridos por la planta y la bacteria. Para determinar si los nódulos disponen de los nutrientes inorgánicos adecuados para su desarrollo es necesario desarrollar criterios de respuesta de la bacteria a la deficiencia de nutrientes. Tales criterios pueden ser indicadores de exceso (síntesis de polifosfato de reserva) o de limitación (disminución de enzimas extra o intracelulares, sistemas de transporte, etc). Las medidas de tales parámetros en el nódulo pueden ayudar a definir el estado nutricional del proceso simbiótico.

Los nutrientes minerales esenciales para la fijación simbiótica de nitrógeno de leguminosas son aquellos requeridos para el establecimiento y funcionamiento normal de la simbiosis. Se considera esencial, al elemento que tienen una función directa en la nutrición de la leguminosa y/o *Rhizobium*, o como constituyente de un cofactor o metabolito esencial que es requerido para la actividad de un sistema enzimático. La función de un elemento esencial no debe ser sustituido por otro elemento (Marschner, 1986). Por consiguiente, los nutrientes esenciales en la simbiosis leguminosa-*Rhizobium* son: C, H, O, N, P, S, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn, Mo, B, Ni y Co (O'Hara *et al.* 1988). Cada uno de ellos tiene una función fisiológica y bioquímica específica que son requeridos en tales concentraciones para el buen crecimiento de la planta, del rizobio y el funcionamiento adecuado del nódulo.

1. Fósforo

De acuerdo a Beck y Munns (1984) un gran número de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* con capaces de crecer con niveles menos de 0.06 μM de fósforo, sin embargo para obtener el máximo crecimiento se requiere de 0.5 μM (O'Hara *et al.*, 1988).

Israel (1993) y Cassman *et al.* (1993) demostraron que el ARA total y específica y el peso de nódulos incrementa en *Glycine max* con el aumento del fósforo en el medio, así también, Israel (1993) indica que estos cambios favorecen el crecimiento de la planta y el incremento de la concentración de N en sus tejidos, por el contrario, bajos niveles de fósforo en los nódulos pueden disminuir la utilización de carbohidratos dentro de los mismos. También indicaron que la deficiencia de este elemento impide la fosforilación oxidativa en las células de los nódulos de soja, y si esta deficiencia es intensa se incrementa el contenido de almidón en un 30%, mientras que la sacarosa y hexosas decrecen en 30 y 25% respectivamente en los nódulos. Yang (1995) sugiere que el efecto del fósforo en la fijación de nitrógeno opera indirectamente via crecimiento de la planta.

Por otro lado, la capacidad de extraer fósforo de las formas no disponibles de los diferentes compuestos fosforilados, han sido descrito como uno de los mecanismos de tolerancia del cultivo en condiciones ácidas del suelo (Ae *et al.*, 1990). Las diferencias interespecíficas y genotipos que se encuentran de tolerancia a la deficiencia de fosforo se deben principalmente a la alta eficiencia de su absorción por las raíces, su translocación desde las raíces a las hojas y su asimilación en compuestos orgánicos (Adu-Gyamfi *et al.*, 1991).

2. Azufre

O'Hara *et al.* (1988), determinaron que los niveles óptimos de azufre para el crecimiento de cepas de *Bradyrhizoum* fue de 20 μM . Niveles menores afectaría el sistema de utilización de este elemento y la actividad de la enzima sulfatasa alcalina.

3. Potasio

La concentración requerida de potasio para algunos rizobios es de 0.006 mM en el medio de cultivo (Vincent, 1977).

4. Calcio

Los requerimientos de Ca son muy variables en las diferentes cepas de *Rhizobium*, en medios de cultivo puede ser entre 16 y 31 μM (Vincent, 1962). En medios deficientes en este elemento, las bacterias presentan una pérdida de la integridad de la pared celular tornándose esféricas y rugosas y son más susceptibles a la lisis celular (Vincent, 1965). Sin embargo, se ha encontrado una fuerte interacción entre el Ca y el P en la nutrición de diferentes *Rhizobium* (Beck y Munns, 1985) de tal manera que se requiere concentraciones muy altas de calcio cuando los niveles son bajos en fósforo.

El calcio es un nutriente cuya influencia en la nodulación y en la fijación de nitrógeno se viene estudiando desde hace más de 60 años (Albrecht y Davis, 1929). Se requiere durante la infección y formación del nódulo que a su vez favorece el crecimiento de la planta (Brockwell *et al.*, 1995)

5. Magnesio

De acuerdo a Vincent (1962), se requiere 100 μM de magnesio en solución para obtener el máximo de crecimiento en *R. trifolii*, menores niveles provocan elongación y/o ramificación de las células.

6. Hierro

Los cultivos de *Rhizobium* requieren concentraciones óptimas de hierro pueden ser muy variables de 5 a 200 μM . Un nivel de 1.0 μM Fe es limitante para la división celular, sin embargo las células pueden elongarse y cambiar de forma (O'Hara *et al.* 1988). La concentración de Fe disponible a pH 7 es más baja que la requerida para el crecimiento microbiano (Gill *et al.*, 1991). Por tanto, estos microorganismos sintetizan sideróforos (agentes quelantes específicos de Fe, de bajo PM) capaces de solubilizarlo, y además presentan sistemas de transporte de membrana que específicamente reconoce al complejo férrico de los sideróforos (Braun *et al.*, 1987; Wittenberg *et al.*, 1996). Así, *Rhizobium meliloti* 1021 sintetiza un sideróforo que es requerida para el crecimiento bajo condiciones limitantes de hierro. Moreau *et al.* (1995) caracterizaron el sistema de transporte de hierro a través de la membrana peribacteroidea, la cual permite un flujo adecuado de este nutriente en la síntesis de moléculas necesarias para el metabolismo del microsimbionte, este transporte se realiza como citrato férrico.

El hierro se requiere para la síntesis de muchos compuestos: ferredoxinas, hidrogenasas, citocromos, nitrogenasa y leghemoglobina. Esta última representa del 25 al 30% de las proteínas solubles totales en el nódulo (Guerinot, 1991); por consiguiente el flujo de hierro en los bacteroides es esencial en la fijación simbiótica de nitrógeno (Nadler *et al.*, 1990).

Se ha demostrado, que la deficiencia de hierro específicamente inhibe la iniciación del nódulo, detiene el desarrollo del nódulo, disminuye la producción de leghemoglobina y la acumulación de nitrógeno en parte aérea de la planta (O'Hara *et al.*, 1988; Tang *et al.*, 1992), y que cepas mutantes defectivas en la producción de sideróforos están afectadas fuertemente en la fijación de nitrógeno y en el peso seco de la planta. (Gill *et al.*, 1991) respecto a su cepa silvestre.

7. Manganeso

El crecimiento máximo de diferentes *Rhizobium* se obtienen con niveles de 0.1 a 10 μM de manganeso (Wilson y Reisenauer, 1970).

8. Zinc

Wilson y Reisenauer (1970) establecieron rangos óptimos entre 0.1 y 1.0 μM de zinc para el crecimiento de los rizobios, sin embargo O'Hara *et al.* (1988) indicaron niveles diferentes dependiendo de la cepa, así distintas cepas de *Bradyrhizobium* pueden ser sensibles a 10 nM y otras alcanzar su crecimiento máximo a 100 nM. Hernández *et al.* (1995) comprobaron que altos niveles de zinc reducen significativamente el desarrollo de la parte aérea, el peso seco de los nódulos e inhiben la actividad de la nitrogenasa.

9. Cobalto

Dependiendo de las especies de *Rhizobium*, los requerimientos de cobalto son variables, así *B. japonicum* requiere de 0.1 μM y *R. meliloti* de 0.002 μM . Este elemento se requiere en la síntesis de vitamina B12 (Lowe y Evans, 1962). La iniciación del nódulo es afectada por una deficiencia de este elemento (O'Hara *et al.* 1988). Además, cerca del 90% de este nutriente en el nódulo no está disponible para los bacteroides (Dilworth, 1985) en condiciones de deficiencia.

10. Molibdeno

Segun Evans y Russell, 1971, la necesidad de molibdeno y cobalto para la actividad nitrogenasa es mayor que para la planta (Brockwell *et al.*, 1995). El molibdeno es requerido en la síntesis del cofactor FeMoCo de la nitrogenasa. Su absorción no esta afectada por los inhibidores respiratorios pero sí por los ionóforos (Maier y Graham, 1988) y su transporte en forma aniónica a través de la membrana peribacteroidea depende del incremento del pH. Jongruaysup *et al.* (1993) concluyeron que niveles bajos de este elemento en semillas de *Vigna mungo* no perjudica la iniciación temprana de los nódulos pero si la formación de los nódulos siguientes, asi como, su maduración.

Brockwell *et al.*(1995) indicaron el cuidado que hay que tener con los compuestos que se añaden a los inoculantes, asi Gault y Brockwell (1980) encontraron que el molibdato de sodio en las semillas de alfalfa y trebol fueron perjudiciales para la supervivencia de *R. meliloti* y *R. leguminosarum* bv. *trifolii* respectivamente, mientras que el molibdato de amonio y el trióxido de molibdato no lo fueron.

11. Cobre

La deficiencia decobre limita la fijación de nitrógeno, asi, los nódulos presentan mayor contenido de almidón y menor citocromo c oxidasa, respecto a nódulos de plantas con niveles adecuados de cobre (O'Hara *et al.* 1988; Weryszko, 1992). Según Seliga (1993), en plantas de *Lupinus luteus* deficientesen cobre, se alteró el transporte de hierro que fue prioritariamente a la parte aérea y no a los nódulos radicales, lo que provocó una disminución en el contenido de leghemoglobina. Además, de demostrar esta interacción Fe-Cu en el nódulo, este autor observó que la deficiencia de cobre disminuye la actividad de la polifenol-oxidasa nodular, sugiriendo una acumulación excesiva de los o-difenoles en nódulos.

12. Boro

O'Hara *et al.*(1988) señalaron que el boro es esencial en el crecimiento de algunos rizobios. Dependiendo de la deficiencia en este elemento se puede inhibir totalmente la nodulación o limitar su desarrollo. La deficiencia de este nutriente afecta más severamente a nódulos en desarrollo que a los maduros (Yamagishi y Yamamoto, 1994). Bonilla y Bolaños (1996) establecen que el boro es esencial en: a) el ensamblaje de los principales componentes de la pared celular y en la estabilidad de la misma; b) en

las interacciones entre la planta y *Rhizobium* como moderador de señales de reconocimiento y c) en el proceso de diferenciación del glucocálix de la membrana peribacteroidea.

Según Munns, 1977, los requerimientos de boro son similares en el desarrollo nodular como en el crecimiento de la planta. (Brockwell *et al.*, 1995)

13. Níquel

El níquel se requiere para la síntesis de la hidrogenasa (Partridge y Yates, 1982), importante en el reciclaje del hidrógeno y mejora la fijación de nitrógeno y el crecimiento en soja (B, 1995). Este elemento puede atravesar el bacteroide por un gradiente de concentración, según Brito *et al.* (1994) actuando a nivel del "processing" de la proteína estructural de la nitrogenasa.

14. Cadmio

Un nivel alto de cadmio decrece el número de nódulos, el peso de los mismos y los pesos secos de parte aérea y de raíz, así como la fijación de nitrógeno en *Pisum sativum* (Hernandez *et al.*, 1995). Ellos también observaron una interacción iónica entre el Mn y el Cd, ya que el manganeso disminuye por efecto de la acumulación de cadmio en los tejidos de la planta, lo que podría ser causa de la reducción de la fijación de nitrógeno.

15. Aluminio

El aluminio inhibe la división celular y elongación de la raíz (Horst *et al.* 1983). Las diferencias entre las especies de leguminosas a la tolerancia y a la toxicidad del aluminio ha sido estudiado por Andrew *et al.* (1973), Ogata *et al.* (1988) y Fujita *et al.* (1995); Estos últimos autores encontraron que la tolerancia al aluminio de ciertas especies podría deberse a la capacidad de absorber mayor cantidad de fósforo en condiciones de acidéz. Por otro lado, Cumming *et al.* (1992) encontraron que la tolerancia a este elemento es debido a una mayor tasa de respiración que presentan los cultivares tolerantes, frente a la menor tasa de los sensibles. El crecimiento, nodulación, inicio de la formación del nódulo y formación de pelos radicales junto con el crecimiento y supervivencia de bacterias simbióticas de nitrógeno son procesos todas ellas alteradas por la presencia de aluminio (Coventry y Evans, 1989; Hecht-Budholz *et al.*, 1990 y Flis *et al.*, 1993) Carvalho *et al.* (1981) encontraron que la fijación de nitrógeno no fue tan

afectada como la nodulación y que las especies de *Stylosantes* dependientes de la fijación de nitrógeno fueron más susceptibles a la toxicidad del aluminio que las especies dependientes del N-combinado. Zulkifli *et al.* (1992) encontraron que una elevada concentración de aluminio en el medio interfiere con la absorción de magnesio.

La capacidad diferente de las cepas de *Rhizobium* en obtener nutrientes minerales de su ambiente para el desarrollo de sus sistemas simbióticos pueden tener una gran significancia en la contribución de la fijación de nitrógeno en los distintos ecosistemas agrícolas.

PARTE 3

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO

1.1. Material vegetal

Se ha utilizado la especie vegetal *Phaseolus vulgaris* L., leguminosa grano de elevado interés agrícola por su alto contenido proteico. En los ensayos de germinación, se han utilizado 10 variedades de judía procedentes de España y de Perú (Tabla 1)

Tabla 1. Denominación y características de las variedades de *P. vulgaris* utilizados en el presente trabajo.

Variedades	Característica	Color semilla	Procedencia	País
Contender	Mata baja	Marrón	S. Bolivar (a)	España
F-15	Mata baja	blanco	Arnedo (b)	España
Nerina	Cilíndrica	Hueso	Arnedo	España
Xera	Cilíndrica	Hueso	Arnedo	España
Niki	Cilíndrica	Hueso	Arnedo	España
Rubona	Mata baja	Marrón	S. Bolivar	España
Striker	Mata baja	Hueso	S. Bolivar	España
PF-210	Mata baja	Amarillo	UNALM (c)	Perú
Blanco larán		Blanco	UNALM	Perú
Bayo	Trapadora	Marrón hueso	UNALM	Perú

(a) Granada

(b) Zaragoza

(c) Universidad Nacional Agraria, La Molina, Lima. Perú.

1.2. Microorganismos

En la tabla 2 se recogen la descripción y procedencia de las cepas bacterianas y plásmidos utilizados en este trabajo.

Tabla 2. Denominación característica y procedencia de las cepas de *Rhizobium* y plásmidos utilizados.

Cepa	Característica	Colección	País
<i>Rhizobium</i>			
9A	Cepa silvestre Nod ⁺ Fix ⁺	UNALM	Perú
C15	Cepa silvestre Nod ⁺ Fix ⁺	UNALM	Perú
B16	Cepa silvestre Nod ⁺ Fix ⁺	UNALM	Perú
PA25	Cepa silvestre Nod ⁺ Fix ⁺	UNALM	Perú
997	Cepa silvestre Nod ⁺ Fix ⁺	M. Mejias	Mexico
980	Cepa silvestre Nod ⁺ Fix ⁺	M. Mejias	Mexico
CFN42	Cepa silvestre Nod ⁺ Fix ⁺	Quinto	Mexico
CIAT 899	Cepa silvestre Nod ⁺ Fix ⁺	CIAT	Colombia
Rp7	Cepa silvestre Nod ⁺ Fix ⁺	A. Jamel	Marruecos
Rp8	Cepa silvestre Nod ⁺ Fix ⁺	A. Jamel	Marruecos
8002	Cepa silvestre Nod ⁺ Fix ⁺	Quinto	U.K.
GR12	Cepa silvestre Nod ⁺ Fix ⁺	Est.Exp.del Zaidín	España
GRO12	Cepa silvestre Nod ⁺ Fix ⁺	Est.Exp.del Zaidín	España
Rp5	Cepa silvestre Nod ⁺ Fix ⁺	Est.Exp.del Zaidín	España
Rp93	Cepa silvestre Nod ⁺ Fix ⁺	Est.Exp.del Zaidín	España
<i>E. coli</i> S17-1	<i>Thi, pro, recA, hsdR, hsdM</i>		Simon <i>et al.</i> , (1983)
pSUP2021	Km ^r , Ap ^r , Tn5		Simon <i>et al.</i> , (1983)

2. MEDIOS DE CULTIVO

2.1. Solución nutritiva para plantas

Para el cultivo de plantas se ha utilizado la solución nutritiva de Rigaud y Puppo (1975), cuya composición es la que sigue:

Macronutrientes:

KH ₂ PO ₄	0.200 g
MgSO ₄ × 7H ₂ O	0.200 g
KCl	0.200 g
CaSO ₄ × 2H ₂ O	0.120 g
Na ₂ FeEDTA (Secuestrene)	0.025 g

Micronutrientes:

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0.004 g
$\text{MnSO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0.002 g
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0.002 g
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0.003 g
H_3BO_3	0.018 g
$\text{CoCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	0.12 mg
Agua ..	1000 ml

Se ajusta el pH a 7.0 ± 0.2 con KOH y se esteriliza en autoclave a 117°C durante 30 min.

2.2. Medios de cultivo para las bacterias**2.2.1. Medio YEM.**

K_2HPO_4	0.5 g
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	2.0 g
NaCl ...	0.1 g
Manitol	10.0 g
Extracto de levadura ..	1.0 g
Agar (medio sólido) ...	15.0 g
Agua destilada.	1000 ml

Se ajusta el pH a 7.0-7.2 y se esteriliza a 115°C durante 30 min

2.2.2. Medio TY.

Triptona	5.0 g
Extracto de levadura ..	3.0 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$..	0.9 g
Agar (medio sólido) ...	15.0 g
Agua destilada.	1000 ml

Se ajusta el pH a 7.0 y se esteriliza a 115°C durante 30 min

2.2.3. Medio Mínimo (MM).

K ₂ HPO ₄	0.30 g
KH ₂ PO ₄	0.30 g
MgSO ₄ × 7H ₂ O	0.15 g
CaCl ₃	0.05 g
NaCl	0.05 g
Manitol	10.0 g
Glutamato sódio	1.10 g
FeCl ₃	6.0 mg.
Tiamina.....	0.1 mg
Biotina.....	0.2 mg
Pantotenato cálcico	0.1 mg
Agar purificado (medio sólido)	17.00 g
Agua destilada.....	1000 ml

Se ajusta el pH a 6.8-7.0 y se esteriliza a 115°C durante 30 min.

2.2.4. Medio LB.

Triptona.....	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl.....	5 g
Agar.(medio sólido).....	15 g
Agua destilada	1000 ml

Se ajustarel pH a 6.8-7.0 y se esteriliza a 115°C durante 30 min.

2.3. Conservación de la cepa bacteriana.

Los medios de cultivo bacteriano YEM fueron distribuidos en tubos Roux inclinados en pico de flauta. En ellos se conservaron las cepas de uso rutinario manteniéndose a 4°C y resemebrándose cada 2 ó 3 meses. Para evitar la pérdida de caracteres genéticos por sucesivas resiembras, los cultivos líquidos microbianos en fase logarítmica de crecimiento en medio TY se conservaron adicionados de glicerol al 20% (v/v) a -80°C.

3. TOLERANCIA AL NaCl DE DIFERENTES CEPAS DE *Rhizobium*

3.1. Tolerancia a la sal en medio YEM

La determinación del crecimiento en condiciones salinas, de las distintas cepas de *Rhizobium* expuestas en la tabla 2, se llevó a cabo adicionando al medio de cultivo YEM, diferentes concentraciones de NaCl, 0, 50, 100, 200, 300, 400, 500 y 600 mM. Las medidas de crecimiento (aparición de colonias sobre las placas de agar) se determinaron a las 24, 48 y 72 h. Se realizaron dos repeticiones por tratamiento.

3.2. Curvas de crecimiento en medio mínimo en función de la salinidad

En este experimento se utilizaron sólo 10 cepas: 9A, GRO12, PA25, B16, C15, 997, CFN 42, CIAT 899, Rp5 y Rp93, las otras fueron eliminadas como resultado de estudios previos realizados. Los cultivos se incubaron a 28°C, en agitación (225 rpm), en tubos de ensayo (2 tubos/tratamiento) que contenían 5 ml de MM, inoculados al 1% a partir de preinóculos crecidos durante 48 h. El estudio del efecto de la sal sobre el crecimiento bacteriano se realizó añadiendo 100, 200, 300, 400, 500 y 600 mM de NaCl al MM. Así mismo, se consideró un control para cada cepa (0 mM NaCl). El crecimiento fue determinado mediante la lectura de la absorbancia (D.O.) a 600 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro Pharmacia LKB-Novaspec II. Las lecturas fueron hechas durante 96 h con intervalos de 6 y 12 h.

Simultáneamente, se retiraron alícuotas de cada tubo para determinar el número de células viables en cada momento. Esto se hizo mediante la preparación de diluciones seriadas al décimo y siembra de 0.1 ml de las diluciones adecuadas en placas (2 placas/dilución) de medio TY. Las placas se incubaron a 28°C. Tras el recuento de las colonias aparecidas se calculó el valor medio.

Para describir la fase logarítmica de crecimiento, en función del número de células viables/ml, se determinó el tiempo de generación (G), definido como el tiempo necesario para duplicar la población. La fórmula utilizada es la que sigue:

$$G = \frac{t \times \log 2}{\log b - \log a}$$

donde,

t = tiempo en horas transcurrido desde el inicio hasta el final de la fase logarítmica de crecimiento.

2 = representa la multiplicación por escisión de las bacterias

b = número de células viables/ml al final de la fase logarítmica

a = número de células viables /ml al inicio de la fase logarítmica

4. OBTENCION DE CEPAS MUTANTES TOLERANTES A LA SALINIDAD

4.1. Determinación de la resistencia a la kanamicina de las cepas a mutagenizar

Las células de *Rhizobium* crecen en medio TY durante 24 h a 28°C hasta obtener 10⁹ cel/ml. Se lavan las células con MM y luego se inoculan con 100 µl de las células suspendidas en MM, en placas con MM que contienen diferentes concentraciones de kanamicina (0, 25, 50, 100, 150 y 200 µg/ml). Se incuban a 28°C durante 5 días y se realizan lecturas cada 24 h, contabilizando el número de colonias (ufc) resistentes/ml de inóculo. Paralelamente, se realiza el recuento de células viables en medio de TY, a partir de los inóculos utilizados.

4.2. Conjugación bacteriana

Donador: *Escherichia coli* S17-1 (pSUP 2021), Km^R Ap^R

Receptor: *Rhizobium sp.* cepa 9A

Se tiene un cultivo en fase logarítmica del donador, para lo cual se hace un precultivo O N (toda la noche) en medio LB con Km (50 µg/ml) y Ap (200 µg/ml) a 37°C y agitación (225 rpm). A la mañana siguiente se diluye 1:100 y se incuba a 37°C hasta su uso (10⁹ cel/ml).

En cuanto al receptor debe estar en fase exponencial tardía o inicio de la fase estacionaria (10⁹ cel/ml) a 28°C y en agitación (225 rpm).

Se mezcla el donador y receptor en proporción 1:1. para lo cual primero se toma 1 ml del donador en un tubo eppendorf, se centrifuga a 12,000 rpm y se separa el sobrenadante. Se resuspende las células en medio LB sin antibióticos, se centrifuga

nuevamente y se retira el sobrenadante. Al mismo tubo se le añade 1 ml del receptor, se centrifuga y se elimina el sobrenadante. Se resuspende la mezcla de células en 100 μ l de TY, se deposita sobre filtro millipore (0.2 μ m de \varnothing de poro) en una placa de TY y se incuba durante 24 h a 28°C.

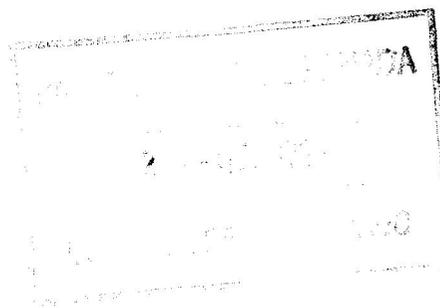
A continuación se recoge el filtro con una pinza estéril y se resuspenden las células en 1 ml de MM, se lavan, se centrifugan y se resuspenden una vez más en 1 ml de MM. Luego se siembran en placas selectivas las diluciones adecuadas. En el caso de búsqueda de mutantes tolerantes a la sal, a partir de una cepa no tolerante, el medio selectivo fue MM+kanamicina+NaCl a una concentración no tolerada por la cepa silvestre. Si se pretende obtener cepas no tolerantes a partir de una tolerante, el medio selectivo es MM+kanamicina. En el primer caso la selección de mutantes es directa, mientras que en el segundo caso, las colonias Km^R aparecidas son ensayadas mediante réplica en placas, en MM+kanamicina+diferentes concentraciones de sal, seleccionando aquéllas incapaces de crecer a concentraciones normalmente toleradas por la cepa silvestre. En ambos casos, a las posibles mutantes seleccionadas se les comprueba la estabilidad del fenotipo mediante ensayos repetidos del mismo a las concentraciones de NaCl correspondientes.

Paralelamente se debe realizar el recuento del número viable de células en MM ó en TY con Km (100 μ g/ml) para tener la frecuencia de transposición en cada una de las cepas estudiadas.

5. EXTRACCIÓN, MANIPULACIÓN Y MODIFICACIÓN DE ADN

5.1. Extracción de ADN genómico de *Rhizobium*

Lisis celular: Las células crecen en 6 ml de medio TY a 28°C y en agitación (250 rpm) hasta una densidad de aproximadamente 10^9 células/ml. Se centrifuga el cultivo (12000 rpm durante 4 min) y se lavan las células con 300 μ l de sarcosil en TE 8 (Tris 10 mM, EDTA-Na 1mM, pH 8.0 con HCl). El sedimento de células se resuspende en 300 μ l de TE 8, al cual se le adicionan 100 μ l de pronasa (2,5 mg/ml en TE 8, predigerida a 37°C durante 90 min) y 100 μ l de SDS al 5% en TE 8 y se incuba a 37°C durante 1-2 h. Al cabo de ese tiempo se observa la muestra transparente debido a la lisis celular, se adiciona 125 μ l de NaCl 5M en TE 8 (autoclavado), se mezcla por inversión y se incuba en hielo durante 30 min.



Fenolización: Se añade 625 μ l de fenol (saturado en tamón) a 4°C, se homogeniza en vortex dos veces durante 1 min y se centrifuga a 12000 rpm durante 5 min; se toma la fase acuosa y se pasa a un tubo nuevo; se fenoliza una vez más y se pasa el sobrenadante a otro tubo. Se extrae con fenol:cloroformo (500 μ l), se homogeniza en vortex dos veces durante 15 s y se centrifuga a 12000 rpm durante 5 min; se recupera el sobrenadante en un tubo nuevo y se extrae una vez más con 400 μ l de fenol:cloroformo. Por último, extraer el sobrenadante con 300 μ l de cloroformo mediante vortex, mezclar durante 15 s hasta volverse blanco, centrifugar a 12000 rpm, 3 min y retirar el cloroformo del fondo del tubo para recuperar el sobrenadante.

Precipitación del ADN con etanol: Adicionar 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío a -20°C y dejar a -20°C 2 h ó a -70°C 30 min; transcurrido ese tiempo se centrifuga a 12000 rpm 12 min, se elimina el sobrenadante y se escurre sobre un papel filtro, se observará un pequeño sedimento en el fondo del tubo. Posteriormente, se adiciona 200 μ l de etanol al 70% frío a -20°C y sin remover, se centrifuga a 12000 rpm 3 min; se separa el sobrenadante y se seca en campana de vacío durante 10-15 min.

Tratamiento del ADN con RNAsa: El sedimento de ADN se resuspende en 25 μ l de TE 8 y se le adiciona 1 μ l de RNAsa (1mg/ml). Se da un pulso de centrifuga y se incuba a 37°C, 30 min. El ADN se conserva a -20°C hasta su uso.

5.2. Extracción de plásmidos de bajo peso molecular (minipreparación de plásmidos).

Se ha seguido el procedimiento de lisis alcalina descrito por Sambrook *et al* (1989). *E.coli* pSUP 2021 se deja crecer a 37°C en 6 ml de medio LB con 200 μ g/ml de ampicilina y 50 μ g/ml de kanamicina toda la noche. Se centrifuga en dos tubos eppendorf a 12000 rpm durante 4 min, se retira el sobrenadante, el sedimento se resuspende en 100 μ l de tampón lisozima y se deja 5 min a T^a ambiente. Luego se añade 200 μ l de solución SDS, se mezcla por inversión y se deja en hielo 5 min; se añade 200 μ l de acetato potásico, se agita por inversión y de nuevo en hielo 5 min; se centrifuga a 12000 rpm 5 min y se recupera el sobrenadante (aproximadamente 400 μ l) en un nuevo tubo.

Se añade un volumen de fenol:cloroformo, se agita por inversión 10 veces y se centrifuga a 12000 rpm 4 min. Se pasa el sobrenadante a un tubo nuevo (alrededor de 400 μ l). y se añade 2,5 volúmenes de etanol 100% frío a -20°C (1000 μ l), se deja a -70°C de 30 a 45 min, se centrifuga a 12000 rpm 12 min, se descarta el sobrenadante y se seca en papel filtro. El sedimento se lava con 200 μ l de etanol al 70% (no agitar), se

centrifugar 3min, se retira el sobrenadante y se seca al vacío 15 min. Se puede guardar a -20°C .

5.3. Electroforesis de ADN en gel de agarosa

Se prepara un gel pequeño de agarosa al 0.7%. Adicionar 3 μl de TE 8, 1 μl de tampón de carga (sacarosa 4% p/v y azul de bromofenol 0,25%) y 1 μl de muestra de ADN a un tubo, dar un pulso en la centrífuga y cargar el gel con 5 μl de muestra. El gel se sumerge en tampón TBE (TBE 10x: tris HCl 108/l, EDTA-Na 9,3 g/l, ácido bórico 55 g/l) y se corre a 90 mv durante 2 h y media aproximadamente. Se retira el gel y se revela con bromuro de etidio durante 15 a 20 min, se observa con UV y se toma una fotografía. Como marcador de peso molecular se utilizó ADN del fago λ digerido con *Hind* III.

5.4. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción

Las enzimas de restricción utilizadas fueron suministradas por Boehringer (Mannheim, Alemania). El volumen de la digestión debe ser aproximadamente el triple del volumen del DNA. Las sustancias se adicionan en el siguiente orden: 28 μl de agua bidestilada, 5 μl de tampón H 10x (el tampón depende del tipo de enzima y se usa 1 μl de tampón por cada 10 μl de digestión), 15 μl de ADN y 2 μl de Eco RI (20 U/ μl), en total son 50 μl ; dar un pulso en la centrífuga e incubar a 37°C , 2 h.

Control de la digestión: Para comprobar la eficacia de la digestión de ADN, una pequeña alícuota de la misma se somete a electroforesis en gel de agarosa al 0,7%.

5.5. Aislamiento y purificación de fragmentos de restricción

5.5.1. Elución del ADN del Tn5 por el procedimiento GENE-CLEAN

El plásmido pSUP 2021 fue digerido con *Hpa* I y sometido a electroforesis en gel de agarosa. El gel de agarosa fue recortado alrededor de la banda de ADN correspondiente al trasposón Tn 5. La recuperación del ADN se realiza por el procedimiento GENE-CLEAN (Bio101, La Jolla, California). Se calcula el peso de agarosa, se da un pulso en la centrífuga (se obtiene aproximadamente 250 μl en cada tubo de eppendorf), se añade 125 μl de TBE (1/2 volumen) y 1125 μl de INa (4.5 volúmenes), se mezcla por inversión y se incuba a $45-55^{\circ}\text{C}$, 5 min. Se adiciona 5 μl de glassmilk (sílice, que debe resuspenderse muy bien en el vortex de 1 a 2 min) a cada eppendorf, se agita por inversión, se coloca en hielo 10 min agitando de vez en cuando para que la sílice esté en suspensión, se centrifuga a 12000 rpm 6 segundos y se elimina el sobrenadante, luego se centrifuga 5 min más y se separa el resto de sobrenadante con

pipeta. Se lava el sedimento con 500 μ l de tampón de lavado 8 s, se centrifuga 5 s y se elimina el sobrenadante, repetir el lavado una vez más. Por último dar un pulso en la centrifuga y quitar el sobrenadante con la pipeta para dejar seco el sedimento.

El ADN se eluye resuspendiendo el precipitado en 10 μ l de agua bidestilada o tampón TE, y calentando a 55°C durante 2 min. Después de una centrifugación de 30 s, se pasa el sobrenadante a otro tubo. La operación se puede repetir una vez más para aumentar la eficiencia de la elución.

5.6. Hibridaciones ADN-ADN

Los fragmentos de restricción se separan por electroforesis en gel de agarosa 0.7% de 0,7 cm de espesor. Se utiliza un eppendorf para cada ADN, se adiciona 10 μ l de TC (tampón de carga) y 49 μ l de ADN digerido, se mezcla bien, se da un pulso en la centrifuga y se carga el gel con 60 μ l de muestra en cada pocillo. Como marcador de peso molecular se utiliza ADN del fago λ digerido con *Hind* III y marcado con digoxigenina (Boehringer, Mannheim, Alemania), además se usa un control positivo de la propia sonda (1 μ l de pSUP 2021 digerido, 3 μ l de TC y 11 μ l de TE 8). La electroforesis se realiza en tampón TBE a 50 V 2 h y luego a 90 V 2 h más, una vez revelado con bromuro de etidio se observa los resultados en UV y se toma una foto. El negativo debe lavarse bien con agua de grifo y luego con agua destilada, a continuación se seca y se guarda cuidadosamente.

5.6.1. Transferencia de ADN a membrana de nylon (Southern blot)

La transferencia de fragmentos de restricción de ADN a filtros de nylon se realiza según la técnica de Southern (1975). Se prepara un filtro de nylon con las mismas dimensiones del gel, se coloca en una bandeja y se satura con agua destilada durante 3 min. Se retira el agua con cuidado y se adiciona tampón 20xSSC (SSC: NaCl 175.3 g, citrato sódico 88.2 g, agua 88ml, ajustar el pH a 7.0, llevar a 1l y autoclavar). Así mismo, se corta el plástico con dimensiones menores que el gel.

En la bandeja de transferencia, se coloca la esponja previamente saturada con agua destilada, la membrana de nylon, el plástico, el gel de agarosa y un marco ajustable; de inmediato se adiciona NaOH 1N cuidadosamente sobre el sistema el cual debe alcanzar 2 cm de altura sobre el gel aproximadamente, y se aplica el vacío durante 60 min. Transcurrido el tiempo, se retira la membrana de nylon con cuidado, se lava dos veces con solución 2xSSC para quitar los restos de agarosa y se seca dos veces entre dos papeles Whatmann n° 3. A continuación, entre otros 2 papeles Whatman se cuece a

120°C, 20 min al vacío. De inmediato se envuelve en papel aluminio y se guarda hasta su utilización.

Control de la transferencia de ADN: Terminado el proceso de transferencia, se revela nuevamente el gel de agarosa con bromuro de etidio 20 min, luego se expone a la UV, si no se observa nada nos indica una transferencia total del ADN desde el gel a la membrana de nylon.

5.6.2. Marcaje no radiactivo de sondas de ADN

La preparación de sondas de ADN no radioactivas se llevó a cabo según la técnica comercializada por Boehringer (Mannheim, Alemania) que consiste en la síntesis parcial de ADN, a partir del ADN molde que se quiere usar como sonda. utilizando una mezcla de hexanucleótidos como cebador, ADN polimerasa I (Fragmento Klenow) y la incorporación de digoxigenina-UTP como nucleótido marcado. El ADN se desnatura en agua a 95°, 10 min y se enfria rápidamente en hielo. Entonces se adiciona al tubo con ADN, 4 µl de la mezcla de hexanucleotido, 10x; 4 µl DIG ADN (mezcla de marcaje), 10x y 2 µl de enzima Klenow grado marcaje; se centrifuga y se incuba a 37°C durante toda la noche. La reacción se detiene por adición de 4 µl EDTA, 0.2 mol/l pH 8. Luego se precipita el ADN marcado con 5 µl LiCl, 4 mol/l y 150 µl de etanol al 100 % enfriado a -20°C durante 30 min a -70°C ó 2 h a -20°C. Se centrifuga a 12000 rpm, 3 min y el sedimento se lava con 100 µl de etanol al 70% enfriado a -20°C, se seca al vacío durante 15 min y después se resuspende en 100 µl de tampón TE a 37°C, 30 min.

5.6.3. Hibridación

El filtro de nylon se incuba en un cilindro de vidrio cerrado con tapón de rosca con solución de prehibridación a 42°C (20 ml de solución de hibridación/100 cm², la cual debe estar a 42°C) 2 h. La solución de prehibridación está compuesta de 5xSSC, laurylsarcosina 0.1%, SDS 0.02%, reactivo de bloqueo 2% y formamida 50%.

Se reemplazó la solución anterior por 10 ml de solución de prehibridación al cual se le añade 40 µl del ADN sonda (previamente desnaturizado a 100°C por 10 min) y se incuba toda la noche a 42°C.

Al día siguiente, el filtro de nylon se lava dos veces, 5 min a T^a ambiente con 50 ml de 2xSSC; SDS, 0.1% (w/v) en agitación, después se lava otras dos veces durante 15 min a 68°C con 50 ml 0.1xSSC; SDS, 0.1% (p/v) en agitación.

5.6.4. Detección quimioluminiscente de bandas de hibridación.

Esta se lleva a cabo usando anticuerpos específicos para la digoxigenina, estos anticuerpos están conjugados con fosfatasa alcalina, que en presencia del sustrato CSPD produce la emisión de luz. Se procede a lavar el filtro 5 min a T^a ambiente en tampón de lavado (tabla 3) y en agitación, después se incuba 30 min con 100 ml de tampón 2 (tabla 3), nuevamente se incuba 30 min con 20 ml de la solución diluída de anti-digoxigenina-AP en agitación (la sustancia se diluye 1:10000 en tampón 2, y puede conservarse sólo a 4°C durante 12 h). Después de lavar 15 min con 100 ml de tampón de lavado, el filtro es equilibrado dos veces 5 min en 20 ml de tampón 3 (tabla 3), entonces se le adiciona 10 ml de solución sustrato (CSPD ó luminigen diluído 1:100 en tampón 3, que puede mantenerse a 4°C y reutilizarse hasta cinco veces), se incuba 5 min a T^a ambiente y se agita manualmente. Se retira el filtro, se seca rápidamente en papel Whatman 3MM, se envuelve en plástico evitando la formación de arrugas y se incuba 15 min a 37°C.

Transcurrido este tiempo, se procede a exponer la membrana sobre película autorradiográfica KODAK X-OMAT entre 1 h y media y 3 h en oscuridad, luego se revela, se fija, se lava primero con agua de grifo y luego con agua destilada y se seca.

Tabla 3. Composición de los tampones 1, 2, 3, de lavado y de hibridación.

Tampón 1	Tampón 2	Tampón 3	T. lavado
Acido maléico 0.1 M	Tampón 1	Tris Hcl 0.1 M	Tampón 1
NaCl 0.15 M	Reactivo de bloqueo 1%	NaCl 0.1 M	Tween 20
pH 7.5 ajustado con NaOH	Se disuelve en caliente	MgCl ₂ 50 mM	(0.3%)
		pH 9.5	

6. METODOS MOLECULARES DE CARACTERIZACION DE CEPAS DE *Rhizobium*

6.1. Determinación del contenido en plásmidos

Para la identificación rápida de los plásmidos albergados en las diferentes cepas de *Rhizobium*, se ha seguido el método de Eckhardt (1978) modificado por Rosenberg *et al.* (1982) y Wheatcroft *et al.* (1990).

A partir de una colonia de *Rhizobium*, se siembra en 2 ml de medio TY y se incuba de 18 a 24 h en agitación a 28°C. Se toma 1 ml del cultivo ($D.O_{600} = 0.2$) y se centrifuga a 12000 rpm, 4 min, se retira el sobrenadante y las células se lavan con 150 a 200 μ l de sarcosil 0,1% en TE 8 frío. Se centrifuga a 12000 rpm, 4 min y se retira el sobrenadante.

Una vez lavada con sarcosil, se le adicionan 40 μ l de Sol I (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, ficol 20 % (w/v)) se mezcla bien y luego se añade 10 μ l de Sol II (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, Ribonucleasa A 0,4 mg/nl, lisozima 1 mg/ml, azul de bromofenol 1 mg/ml), se homogeniza con la punta de la pipeta y se carga 25 μ l de la muestra en cada pozo del gel de agarosa al 0.7% (w/v) de 5 mm de espesor (previamente al gel sumergido parcialmente en TBE se le adiciona 25 μ l de SDS en cada pozo y se hace correr con polaridad invertida a 100 v durante 20 min, hasta que corra 1 cm a partir de la línea de origen) y cubierto totalmente con TBE. La electroforesis se realiza a 40 v, 30 min y luego a 100 v, 3 h. El gel se tiñe con bromuro de etidio (0,5 μ g/ml) durante 20 min, se destiñe 1 h en 1 l de agua, se coloca en un transiluminador UV de 260 nm. Se toma la fotografía con cámara Polaroid MP-4 y película Polaroid tipo 667 con filtro rojo y se analizan los resultados.

6.2. Perfil de proteínas

El estudio de perfil de proteínas, se realizó utilizando geles de poli(acrilamida)-SDS según Laemmli (1970), con algunas modificaciones.

Se centrifugan 3 ml de bacteria crecida en medio MM hasta la mitad y hasta el final de la fase logarítmica; el sedimento se lava con 1 ml de 50 mM Tris HCl pH 7,5 y se resuspende en 200 μ l de la misma solución 0 mM NaCl, las células se rompen por sonicación (Sonicador) aplicando 3 pulsos de 15 s con intervalos de 15 s. Luego se le adiciona 20 μ l de PMSF (fluoruro de fenil metil sulfonato), inhibidor de proteasas, se

mezcla por inversión y se desnaturaliza a 100°C durante 5 min en tampón de lisis: Tris-HCl 125 mM, 0,6% SDS (p/v) pH 6,8, 5% 2-mercaptoetanol (v/v), 10% glicerol (p/v) y 0,02% azul de bromofenol (p/v).

Las tinciones con azul de comassie se realizaron con 40 µl de la muestra (equivalente a 25 µg proteína/ml), medido previamente por el método de Lowry modificado por Markwell *et al.* (1978), en geles de poliacrilamida al 5% (gel concentrador) y al 15% (gel de resolución) (tabla 4). Para las tinciones con nitrato de plata los geles se cargan con 15 µl de muestra (equivalente a 5 µg proteína/ml). La electroforesis se realiza empleando una cubeta vertical Bio-Rad Miniprotean II. La electroforesis se lleva a cabo en tampón Tris-glicina (0.025 M tris, 0.19 M glicina, 0.1% SDS, pH 8.3) a 200 v /2 geles durante 45 min. Se utilizó 3 µl de marcador de proteínas de bajo peso molecular de Pharmacia (diluído 1/25 en H₂O destilada) que contiene: fosforilasa b (94 kDa), albúmina de suero bovino (67 kDa), ovoalbúmina (43 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), inhibidor de tripsina de soja (20,1 kDa), α-lactalbúmina (14,4 kDa). El gel se retira del sistema y se lava con agua destilada.

Tabla 3. Composición de los geles para SDS-PAGE

Reactivos	Gel de Concentració	
	4 %	5 %
Acilamida 10%-BisAcil 0,5	0,784 ml	0,983 ml
Tris-HCl 240 mM pH 6,8	0,982 ml	0,982 ml
SDS 10 %	0,019 ml	0,019 ml
Temed	1 µl	1 µl
Persulfato amónico 10 %	0,016 ml	0,016 ml
H ₂ O	0,199 ml	-
Volúmen final	2 ml	2 ml

Reactivos	Gel de Resolución	
	15 %	18 %
Acilamida 30%-BisAc. 0,15%	2,500 ml	3,000 ml
Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8	1,300 ml	1,300 ml
SDS 10 %	0,050 ml	0,050 ml
Temed	2 µl	2 µl
Persulfato amónico 10 %	0,025 m	0,025 ml
H ₂ O	1,125 ml	0,625 ml
	5 ml	5 ml

6.2.1 Tinción con Azul de Comassie

El gel se tiñe con azul de comassie R-250 al 0,25% (preparado en 50 % metanol y 10 % ácido acético glacial) durante 30 min y luego se destiñe en una solución de 5 % metanol y 15 % ácido acético glacial durante 60 min, manteniendo ligera agitación durante ambos procesos. Se coloca el gel sobre un transiluminador de luz blanca, se toma fotografía para el posterior análisis de los resultados.

6.2.2 Tinción con nitrato de plata

Se siguió la metodología de Blum *et al.* (1978). Todo el proceso de tinción se realiza en agitación y todas las soluciones deben prepararse al momento de usarlas y consta de varias etapas: (1) fijación durante 2 h en 100 ml de una solución 50% metanol, 12% ácido acético glacial y 50 μ l de formaldehído al 37 %; (2) tres lavados de 20 min en 100 ml de 50 % etanol; (3) oxidación durante 1 min en 100 ml de tiosulfato sódico 0,8 mM (0.02 g/100 ml agua); (4) cuatro lavados de 20 s cada uno en 100 ml de agua destilada; (5) tinción durante 20 min en 100 ml de solución de nitrato de plata 2 g/l y formaldehído al 37% 0,75 ml/l, este paso se realiza protegido de la luz; (6) dos lavados de 20 s en 100 ml de agua destilada; (7) revelado de 3 a 8 min en 100 ml de una solución de carbonato de sodio (60 g/l), 0,5 ml/l de formaldehído al 37 % y 4 mg/l de tiosulfato sódico; (8) dos lavados de 1 min en 100 ml agua destilada; (9) las bandas de proteínas se fijan en una solución de 50% metanol y 12% ácido acético glacial. durante 15 min. El gel se conserva en metanol al 50% a 4°C.

Los geles fueron analizados en un densitómetro Shimadzu CS-9000 donde se registran los picos máximos y mínimos de las proteínas presentes, así como la integración de los mismos expresados en porcentaje.

La conservación de los geles en seco se consigue sumergiéndolos en una solución de metanol al 30 % y glicerol al 3% durante 30 min. Se deben colocar los geles bien extendidos entre dos hojas de papel celofán previamente mojado en glicerol al 3% y se acomodan en una cámara de desecación al vacío durante 2 h a 80°C.

6.3. Determinación del tamaño molecular de las proteínas

El peso molecular de las proteínas se determinó según su movilidad relativa (Rf) en geles de poliacrilamida después de la electroforésis. El Rf se calculó mediante la fórmula: $R_f = \text{distancia de migración de la proteína desde el origen al punto de referencia}$

(frente de electroforésis con azul de bromofenol, extremo del gel o la proteína patrón que más haya migrado).

El cálculo del M_r se basó en las rectas de calibrado construidas representando en el eje de ordenadas el logaritmo decimal del tamaño molecular de las proteínas patrón y en el eje de las abscisas el valor correspondiente de R_f .

6.4. Perfil de lipopolisacáridos

Para estudiar el perfil de LPS de las distintas cepas, se utilizaron geles de poliacrilamida siguiendo el método descrito por Hitchcock y Brown (1983).

Se toman 1,5 ml de bacterias crecidas en medio MM hasta la mitad y hasta el final de la fase logarítmica, se centrifuga a 12000 rpm, 4 min, a continuación se lavan en 500 μ l de tampón tris-HCl 50 mM pH 7,5 (0,50 y 100 mM de NaCl según el tratamiento de sal en la bacteria). Se centrifuga a 12000 rpm, 4 min, el sedimento se resuspende en 50 μ l del tampón de lisis (Tris-HCl 1M pH 6.8; 2% SDS; 4% 2-mercaptoetanol; 10% glicerol; 0.02% azul de bromofenol) y se hierve durante 10 min. A continuación, para eliminar proteínas, cada muestra se digiere con 25 μ g de pronasa (Boehringer) disuelta en 10 μ l de tampón de lisis y se incuba durante 60 min a 60°C. Por último, se centrifuga la muestra 1,5 min a 12000 rpm. Las muestras pueden conservarse a -20°C.

La electroforésis de las muestras se realizó en gel de poliacrilamida (4% gel concentrador y 18% gel separador) con SDS siguiendo el sistema de Laemmli (1970). Cada carril se cargó con 7 y 20 μ l del sobrenadante de la muestra. La electroforésis se llevó a cabo en el mismo sistema que para proteínas, la corrida se hizo a 30 mA/gel, 250 v y 50 w, con tampón Tris-glicina pH 8,3 con 0,1% SDS durante 50 min.

Seguidamente se procede a la tinción del gel, el cual se mantiene en agitación durante todo este proceso. Se realiza en varias etapas: (1) fijación durante toda la noche en 100 ml de 25% (v/v) isopropanol en 7% (v/v) ácido acético; (2) oxidación durante 10 min en 100 ml de agua con 0.7% metaperiodato de sodio 0,35 g/50 ml agua (esta debe prepararse justo antes de usarse); (3) seis lavados de 10 min cada uno en 200 ml de agua destilada; (4) tinción durante 10 min en la siguiente solución: 28 ml NaOH 0,1N; 1 ml NH_4OH (29.4%); 5 ml AgNO_3 20%(p/v) y 115 ml agua destilada (ésta solución debe prepararse justo antes de usarse y si se forma un precipitado marrón se añade más NH_4OH hasta que se disuelva el precipitado); (5) cuatro lavados de 10 min en 200 ml de agua destilada; (6) revelado de 10 min a 25°C (para teñir sólo LPS y no proteínas) en 250 ml de una solución preparada en el momento de usar: 12,5 mg ácido cítrico, 0,125

