SELECCION DE RAZAS DE RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM Y SU TOLERANCIA AL NITROGENO COMBINADO EN LA SIMBIOSIS RHIZOBIUM-LEGUMINOSA.

ANA HERVAS VARGAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL
FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE GRANADA
1988

UNIVERSIDAD DE GRANADA

ACTA DEL GRADO DE DOCTOR EN FARMACIA

Curso de 1988 a 1989 Folio ..... Número .....

Reunido en el día de la fecha el Tribunal nombrado para el Grado de Doctor de D.ña Ana Hervás Vargas, el aspirante leyó un discurso sobre el siguiente tema, que libremente había elegido: "SELECCION DE RAZAS DE RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM Y SU TOLERANCIA AL NITROGENO COMBINADO EN LA SIMBIOSIS RHIZOBIUM-LEGUMINOSA"

Terminada la lectura y contestadas las objeciones formuladas por los jueces del Tribunal, éste le calificó de APTO "cum laude".

Granada, 16 de DICIEMBRE de 1988

El Secretario del Tribunal,

L. Recalde

LUIS RECALDE MANRIQUE

EL PRESIDENTE,

El Vocal,

El Vocal,

El Vocal,

Firma del Graduado,

Ana Hervás

INVESTIDURA . . En el día de la fecha se ha conferido a D. ..... el Grado de Doctor en la Facultad de ....., conforme a lo prevenido en las disposiciones vigentes.

Granada, ... de ..... de 19.....

EL DECANO,

CERTIFICO: Que el Acta que antecede concuerda con la del expediente del interesado remitida a la Secretaría de la Universidad.

Granada, ... de ..... de 19.....

El Catedrático Secretario,

V.º B.º
EL DECANO,

UNIVERSIDAD DE GRANADA **FACULTAD DE FARMACIA**

SECRETARIA

INSCRIPCION PARA EL GRADO DE DOCTOR

Curso 1988 a 19 89

D.ª ANA HERVAS VARGAS

natural de Belmez de la Moraleda provincia de Jaén, ha satisfecho los derechos correspondientes para el Grado de Doctor y en virtud de lo que resulta de su expediente académico, el Iltmo. Sr. Decano le ha admitido al ejercicio del mencionado grado, pudiendo con esta papeleta, y previa citación, presentarse ante el Tribunal examinador.

Para la identificación personal, el alumno exhibirá la CARTA DE IDENTIDAD ESCOLAR.

Granada, 15 de diciembre de 1988

El Secretario de la Facultad,

Reunido el Tribunal examinador, fue leída la Tesis por el graduando y después de contestar a las objeciones formuladas por los señores Jueces del Tribunal, éste calificó dicho trabajo con la nota de

APTO "CUM LAUDE"

Granada, 16 de Diciembre de 1988

El Secretario del Tribunal,

REPETICION DEL EJERCICIO

Reunido nuevamente el Tribunal y verificado el ejercicio, fue calificado con la nota [redacted]

Granada, ... de ..... de 19.....

El Secretario del Tribunal,

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL. FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE GRANADA.

"SELECCION DE RAZAS DE RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM Y SU TOLERANCIA AL NITROGENO COMBINADO EN LA SIMBIOSIS RHIZOBIUM-LEGUMINOSA".

Memoria presentada para aspirar al grado de Doctor por la Licenciada en Farmacia Ana Hervás Vargas.

DIRECTOR

Fdo.:
Dra. Dña. Carmen Lluch Plá.
Catedrático de Fisiología Vegetal. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada.

CODIRECTOR

Fdo.:
Dr. D. Francisco Ligero Ligero.
Profesor Titular de Fisiología Vegetal. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.

Vº Bº

Fdo. Dr. D. Joaquín Molero Mesa.
Director del Dpto. de Biología Vegetal.

Este trabajo ha sido subvencionado por la Caja de Ahorros y Monte de Piedad de Granada. "VIII Convocatoria de Premios para Proyectos de Investigación". Título del Proyecto: "Estudios sobre la selección de razas de Rhizobium y nutrición mineral de leguminosas, dirigidos a potenciar estos cultivos en la provincia de Granada".

Al finalizar este trabajo quiero expresar mi más sincero agradecimiento a las personas que de alguna forma me ayudaron y que, en suma, han contribuido a la realización de esta memoria.

En primer lugar a los doctores Carmen Lluch Plá y Francisco Ligero Ligero, Directores de este trabajo. Ellos me brindaron su valiosa dirección y ayuda, tanto dentro como fuera del laboratorio.

También tengo que agradecer su ayuda a mis compañeros de trabajo, Julio Muñoz Bernal, Antonio Ocaña Cabrera y especialmente a Juan Manuel Caba Barrientos. Juntos hemos compartido muchas horas en el laboratorio y siempre me ofrecieron su colaboración y amistad.

A todos los miembros del Departamento de Biología Vegetal, por el constante apoyo y camaradería mostrada hacia mí durante todos estos años. Sin ellos, este periodo de tiempo hubiera sido mucho menos provechoso.

A todos, gracias.

A mis padres, por su confianza y generosidad.

A Juan Luis.

INDICE

INTRODUCCION.....21

1. Fijación biológica de nitrógeno.....26

1.1. Fijadores asimbióticos.....27

1.2. Fijadores simbióticos.....30

2. Asociación Rhizobium-leguminosa.....34

2.1. Taxonomía de Rhizobium.....35

2.2. Proceso de nodulación.....39

2.2.1. Colonización de la rizosfera y especificidad.....40

2.2.2. Quimiotaxis y movilidad.....43

2.2.3. Adhesión a la superficie radicular.....44

2.2.4. Competitividad en la adhesión e iniciación del nódulo.....47

2.2.5. Primeros eventos de la nodulación y desarrollo de los nódulos.....49

3. Ecología de Rhizobium en el suelo.....57

3.1. Técnicas utilizadas para estudios de ecología.....58

3.2. Factores ecológicos que afectan a Rhizobium.....61

3.3. Efecto de la desnitrificación rizobiana en la agricultura.....70

4. Nutrición nitrogenada de las leguminosas.....74

4.1. Aspectos bioquímicos.....74

4.2. Efecto del nitrógeno combinado en la

simbiosis Rhizobium-leguminosa.....78
4.3. Integración entre el metabolismo del nitrógeno y del carbono en la planta.....89
5. Producción y control de calidad de inoculantes.....93
5.1. Aislamiento y selección de razas de Rhizobium.....94
5.2. Preparación e inoculantes.....96
5.2.1. Medios de cultivo.....99
5.2.2. Soportes para inoculantes.....101
5.2.3. Inoculantes a base de turba.....103
5.2.4. Control de calidad.....107
5.2.4.1. Control del caldo de cultivo.....108
5.2.4.2. Control del inoculante.....109
OBJETO DEL TRABAJO.....113
MATERIAL Y METODOS.....121
1. Material biológico.....123
2. Suelos.....123
3. Medios de cultivo.....126
4. Esterilización y germinación de las semillas.....128
5. Condiciones ambientales.....129
6. Experimentos realizados.....130
6.1. Aislamiento de razas de Rhizobium.....130
6.1.1. Cultivo de plantas en macetas con suelo.....130
6.1.2. Aislamiento de Rhizobium a partir

de nódulos radicales.....131
6.2. Ensayo de infectividad y efectividad.....133
6.2.1. Preparación de las jarras Leonard.....133
6.2.2. Preparación de los inóculos.....134
6.2.3. Siembra e inoculación de las semillas.....134
6.2.4. Recogida de las plantas y determinaciones realizadas.....135
6.3. Ensayo de competitividad.....137
6.3.1. Preparación de los inóculos.....137
6.3.2. Cultivo de plantas en macetas.....139
6.3.3. Determinación del grado de competitividad.....139
6.4. Ensayo de tolerancia al nitrógeno combinado de la simbiosis Rhizobium leguminosarum-Pisum sativum.....140
6.4.1. Cultivo hidropónico de plantas.....140
6.4.2. Determinaciones realizadas.....141
6.5. Ensayo de campo.....142
6.5.1. Preparación de inoculantes a base de turba.....142
6.5.2. Aplicación del inoculante.....143
6.5.3. Suelo.....144
6.5.4. Diseño experimental.....144
6.5.5. Recolección y determinaciones realizadas.....145

7. Metodología utilizada.....145
7.1. Actividad nitrogenasa específica.
Test de reducción de acetileno.....145
7.2. Determinación de la actividad
nitrato reductasa.....148
7.3. Determinación de azúcares totales en
diferentes órganos vegetales.....152
7.4. Determinación de proteínas solubles.....155
7.5. Determinación de nitratos.....156
7.6. Determinación de macronutrientes:
N, P, K, Ca y Mg.....158
7.6.1. Determinación de nitrógeno.....159
7.6.2. Determinación de fósforo.....159
7.6.3. Determinación de potasio.....160
7.6.4. Determinación de calcio y magnesio....160
8. Elaboración de los datos y estudio
estadístico de los resultados.....160
RESULTADOS Y DISCUSION.....163
1. Selección de razas de Rhizobium. Ensayo
de infectividad y efectividad.....165
2. Ensayo de competitividad.....173
3. Estudio de la interacción entre la
fertilización nitrogenada y la simbiosis
Rhizobium-leguminosa.....181
3.1. Análisis de crecimiento.....181
3.2. Desarrollo de la nodulación y

actividad nitrogenasa.....193
3.3. Determinaciones bioquímicas.....196
3.4. Determinaciones analíticas.....209
3.4.1. Nitratos.....209
3.4.2. Azúcares.....219
3.4.3. Proteína soluble.....224
3.4.4. Macronutrientes.....226
4. Ensayo de campo.....251
CONCLUSIONES.....257
BIBLIOGRAFIA.....263
APENDICE.....305

INTRODUCCION

Resulta paradógico que mientras el 78% de la atmósfera terrestre está constituida por dinitrógeno, la demanda de nitrógeno fijado por la biosfera excede su disponibilidad. Esto es debido a que sólo un número muy limitado de organismos, denominados "fijadores de N_2" o "diazotrofos", son capaces de reducir el dinitrógeno hasta formas que puedan ser utilizadas y asimiladas por los organismos vivos (Gallon y Chaplin, 1987).

El nitrógeno es esencial para los organismos vivos, siendo el elemento más abundante en la materia viva después del hidrógeno, carbono y oxígeno. Forma parte de numerosas biomoléculas, ácidos nucleicos, proteínas y aminoácidos, así como de compuestos cuantitativamente menos significativos, como coenzimas, vitaminas y pigmentos. Para que los organismos vivos puedan crecer, multiplicarse y sobrevivir necesitan una fuente de nitrógeno fijado. En orden a satisfacer estas necesidades, la cantidad limitada de nitrógeno disponible es intercambiada entre los diversos componentes de la biosfera, siendo continuamente incrementada por los organismos que fijan nitrógeno y simultáneamente disminuida por los procesos que transforman el nitrógeno reducido en dinitrógeno. Así, existe un ciclo continuo de nitrógeno desde el atmosférico hasta el fijado en la biosfera, intercambio entre los distintos componentes de la biosfera y finalmente, desde estas formas reducidas hasta dinitrógeno.

El nitrógeno es un componente importante de este planeta, pudiendo encontrarse en forma libre o formando parte de compuestos orgánicos e inorgánicos. En la atmósfera se halla en forma de dinitrógeno y representa alrededor del 78% de ella, cantidad que equivale a 3.8×10^{13} toneladas métricas (Mengel y Kirby, 1982). No obstante, la litosfera es el mayor reservorio de nitrógeno y la cantidad de este elemento existente en ella es más de cincuenta veces la de la atmósfera (Subba Rao, 1977). Sin embargo, y debido a encontrarse en forma muy estable en rocas primarias y sedimentarias, tiene una baja participación en el ciclo del nitrógeno de la biosfera.

En el suelo, este elemento es fácilmente perdido debido a los procesos de nitrificación, desnitrificación y lixiviación. A diferencia de otros nutrientes de las plantas, no puede ser sustituido por el nitrógeno de las rocas o partículas del suelo, y ha de ser repuesto por las pequeñas cantidades de nitrógeno presente en el agua de lluvia, por los restos de materia viva, o bien artificialmente a través del uso de fertilizantes nitrogenados. En suelos pobres en nitrógeno, como suelos volcánicos y suelos forestales deteriorados, la recolonización por fijadores de nitrógeno, podría restaurar gradualmente la fertilidad. El desarrollo de especies de cultivo de altos rendimientos y la utilización de fertilizantes diseñados para maximizar el rendimiento de los cultivos, han

impuesto demandas adicionales de nitrógeno superiores en las últimas décadas, las cuales han sido suplidas ampliamente por el incremento en la producción y utilización de fertilizantes nitrogenados. Según las estimaciones realizadas, los requerimientos de fertilizantes nitrogenados, que en el año 1980 supusieron una utilización global de 5-6 millones de toneladas, aumentarán para el año 2000 según un factor de 2.5 (Subba Rao, 1980).

Aunque el gran aumento en la demanda de fuentes nitrogenadas puede ser suplido por el incremento de la capacidad de producción de fertilizantes, al menos en los países desarrollados, esta solución exigiría un alto precio tanto económico como ecológico para la sociedad. A diferencia de la fijación biológica de nitrógeno, la mayor producción de fertilizantes conlleva un incremento en la utilización de fuentes de energía no recuperable, tales como el carbón y el petróleo. Además, su utilización lleva consigo una serie de problemas debido al aumento de la concentración de nitratos tóxicos en el agua de bebida, así como eutrofización de lagos y ríos (Dixon y Wheeler, 1986).

Con la tecnología utilizada en la actualidad para la producción de fertilizantes y los ineficientes métodos empleados para su aplicación, esta práctica presenta serias desventajas frente a la fijación biológica

de dinitrógeno, bajo el punto de vista económico y ecológico. En el futuro, cabe esperar que la productividad agrícola sea más dependiente de los procesos naturales de fijación de nitrógeno que en el presente.

1. FIJACION BIOLOGICA DE NITROGENO.

La capacidad para reducir el N_2 atmosférico hasta amonio reside en un amplio y heterogéneo grupo de microorganismos, todos ellos procariotas, denominados "fijadores de nitrógeno" o "diazotrofos". En base a análisis del RNA ribosomal, los procariotas se han dividido en dos grupos (Stackebrandt y Woese, 1981), las eubacterias y archaebacterias, existiendo en ambos grupos organismos fijadores de nitrógeno representativos.

Según Postgate (1982), estos microorganismos se distribuyen en 54 géneros dentro de más de 12 familias de procariotas. En una reciente revisión, Dixon y Wheeler (1986) señalan que han sido identificados alrededor de 87 especies agrupadas en 2 géneros de archaebacterias, 38 géneros de bacterias y 20 géneros de cyanobacterias, como diazotrofos u organismos capaces de fijar el nitrógeno atmosférico.

Se pueden establecer dos grandes grupos de fijadores de nitrógeno: los fijadores en vida libre o asimbióticos y los fijadores simbióticos. La mayoría son

capaces de fijar nitrógeno en vida libre, aunque la investigación ha prestado mayor atención a los fijadores simbióticos, entre los que se pueden citar los microorganismos pertenecientes a los géneros Rhizobium, Bradyrhizobium y Frankia.

Hasta hace poco tiempo se consideraba que sólo las leguminosas noduladas contribuían de forma significativa a la fijación biológica de nitrógeno. Recientemente, se ha demostrado que las cyanobacterias, en forma libre o en asociación con una gran variedad de vegetales, juegan un importante papel en la productividad agrícola, especialmente en sistemas acuáticos como los cultivos de arroz (Sprent, 1986). Los altos requerimientos energéticos de este proceso, constituyen la razón fundamental del predominio de los sistemas simbióticos y fotosintéticos: asociación Rhizobium-leguminosa y las cyanobacterias.

1.1. Fijadores asimbióticos.

Los diazotrofos asimbióticos constituyen un grupo muy heterogéneo que incluye microorganismos anaerobios estrictos, anaerobios facultativos, microaerófilos, aerobios estrictos, bacterias fotosintéticas y cyanobacterias.

Entre los anaerobios estrictos se puede citar

el género Clostridium, así como bacterias reductoras de sulfato tales como Desulfovibrio y Desulfotomaculum, siendo precisamente en una especie de este grupo, C. pasteurianum, en la que se demostró por primera vez actividad fijadora de nitrógeno en extractos libres de células por Carnahan et al. (1960). En términos generales, la contribución de este grupo al nitrógeno total fijado biológicamente es muy escasa, salvo en áreas muy localizadas. Por ejemplo, Mishustin y Yemstev (1975) calcularon que en zonas pantanosas y cultivos de arroz, Clostridium puede contribuir por encima de 33 Kg/Ha/año al nitrógeno fijado del suelo. Por otra parte, Watanabe y Roger (1984) afirman que Clostridium contribuye muy poco a la provisión de nitrógeno fijado en los cultivos de arroz.

También son anaerobios estrictos las especies Methanosarcina barkeri y Methanococcus termolithotrophicus pertenecientes al grupo de archaebacterias, en las que se ha descubierto recientemente su capacidad para fijar nitrógeno (Murray y Zinder, 1984; Belay et al., 1984). Sin embargo, la contribución de estos organismos a la economía global de nitrógeno es desconocida, pero es probablemente poco significativa.

Los fijadores anaerobios facultativos y microaerófilos agrupan microorganismos que son tolerantes al oxígeno pero que fijan nitrógeno bajo condiciones anae-

robias o microaerófilas. De forma similar a Clostridium, la fijación de nitrógeno en vida libre de este grupo, probablemente tiene muy poco impacto en la economía global de nitrógeno, pero en algunos casos su importancia aumenta, particularmente cuando se asocian a otros organismos. Por ejemplo, recientemente ha resurgido un interés en las asociaciones entre Azospirillum spp y las raíces de algunas plantas herbáceas y cereales (Boddey y Döbereiner, 1984; Okon, 1984), en las cuales se producen beneficios en uno o ambos asociados pero en las que no se produce ningún cambio anatómico ni fisiológico importante. En diversos trabajos se ha señalado que la inoculación de suelos con Azospirillum puede incrementar de forma notable la contribución de nitrógeno fijado en la fertilidad del suelo (Salem et al., 1985; Sarig et al., 1985).

En 1983, Okon et al. indicaron que el nitrógeno fijado por Azospirillum no es utilizado por la planta hospedadora que sólo aprovecha un 5% y no de forma directa. El paso de nitrógeno fijado hacia el vegetal no se realiza por medio de un sistema directo de transporte bacteria-planta, sino que se produce como consecuencia de la muerte gradual de la bacteria, que de esta forma libera nitrógeno orgánico que posteriormente debe mineralizarse para poder ser metabolizado por la planta.

Otros experimentos indican que la inoculación

con Azospirillum puede mejorar la eficiencia de los nutrientes minerales al incrementarse la capacidad de absorción de iones por la raíz. A pesar de no conocerse exactamente cómo las plantas inoculadas con Azospirillum aumentan su potencial de absorción de iones, se sugiere que esto podría deberse a un aumento de la superficie radical que se produciría por la multiplicación de pelos radicales y raíces laterales como consecuencia de la producción de fitohormonas por la bacteria (Lin et al., 1983). Sprent (1986) sugiere que en Azospirillum y Azotobacter, la producción de sustancias de crecimiento por las bacterias puede tener la misma importancia que la fijación de nitrógeno en el efecto beneficioso que se obtiene con la inoculación.

De forma similar a Azospirillum, Azotobacter, diazotrofo en vida libre, aerobio estricto, es capaz de formar asociaciones no simbióticas con las raíces de plantas. Así, A. paspali se asocia de forma específica con las raíces de una planta tropical, Paspalum notatum (Döbereiner et al., 1972).

1.2. Fijadores simbióticos.

Según la clasificación de Dixon y Wheeler (1986), los sistemas fijadores de nitrógeno en asociación simbiótica se pueden clasificar en cuatro grupos:

a) Asociaciones entre raíces de leguminosas y

bacterias de los géneros Rhizobium y Bradyrhizobium.

b) Asociaciones entre plantas no leguminosas pertenecientes al género Parasponia y bacterias del género Rhizobium.

c) Asociaciones entre plantas no leguminosas angiospermas y el actinomiceto Frankia spp.

d) Asociaciones de cyanobacterias o algas verde azuladas con angiospermas, gimnospermas, pteridofitas, briofitas y líquenes.

Hasta 1973, el género Rhizobium se definía como aquellas bacterias que eran capaces de formar nódulos radicales con plantas pertenecientes a la familia Leguminosae, y así permaneció hasta que Trinick (1973) comprobó que plantas arbóreas, ahora conocidas como el género Parasponia de la familia Ulmaceae, eran capaces de ser noduladas por Rhizobium. Esta asociación es interesante ya que los nódulos fijadores de nitrógeno comparten algunas características con los nódulos de leguminosas y con los nódulos de actinorrizas. Aunque poco se conoce acerca de los procesos de infección y nodulación, parece ser que la invasión de las bacterias en el sistema radical de la planta huésped, ocurre a través de los pelos radicales, como en leguminosas, y se forman filamentos de infección (Gresshoff et al., 1984). Sin embargo, recientemente Ditta (1985) ha sugerido que la infección puede ocurrir mediante una "entrada por rotura" más que a través

de los pelos radicales.

En un principio se pensaba que los nódulos de Parasponia carecían de leghemoglobina, pero Appleby (1983) demostró su presencia en nódulos de P. andersonii. Los nódulos de Parasponia no tienen el color rojizo típico de los nódulos de leguminosas, y se ha sugerido que la leghemoglobina está confinada dentro de los filamentos de fijación (Lancelle y Torrey, 1984; Price et al., 1984).

Aunque en la mayoría de los casos Rhizobium forma nódulos en el sistema radical de las leguminosas y Parasponia, ciertas especies de leguminosas desarrollan nódulos en sus tallos en asociación con Rhizobium. En los trabajos de Subba Rao y Yatazawa (1984) se ha puesto de manifiesto que estos nódulos son capaces de presentar elevadas tasas de reducción de acetileno.

Durante muchos años se ha pensado que Rhizobium sólo era capaz de fijar nitrógeno en asociación simbiótica con plantas leguminosas y que no era posible que este proceso ocurriera en vida libre de las bacterias. Sin embargo, aunque la fijación de N_2 por Rhizobium en estado de vida libre en el suelo no es probable que ocurra, en el laboratorio, cultivos de Bradyrhizobium japonicum y otros rizobios de lento crecimiento (Child, 1980) y de R. meliloti (Bedmar y Olivares, 1979) pueden fijar nitrógeno bajo condiciones de microaerofilia, siendo la mayor parte

excretado como amoniaco (Bergersen y Turner, 1978). Se ha evidenciado que Rhizobium contiene la dotación genética necesaria para la fijación, interviniendo la planta en el sentido de crear las condiciones que permitan su expresión.

Desde hace aproximadamente una centuria, se conoce que muchas plantas arbóreas y arbustivas no leguminosas, forman nódulos radicales fijadores de nitrógeno en asociación con actinomicetos. Alrededor de 200 especies leñosas, dicotiledóneas arbóreas y arbustivas, distribuidas en climas templados y tropicales, son capaces de desarrollar nódulos radicales (Torrey, 1985). Los microorganismos localizados en dichas estructuras especializadas pertenecen al género Frankia del orden de los Actinomicetales. A dichas asociaciones simbióticas se les ha denominado actinorrizas por semejanza con micorrizas.

A pesar de que los estudios sobre actinorrizas quedaron rezagados en el pasado en comparación con la investigación acerca de la asociación Rhizobium-leguminosa, en la última década ha resurgido su interés debido principalmente a dos razones. Primero, el éxito en el aislamiento y cultivo de Frankia por Callaham et al. (1978), lo que hizo posible estudiar al microsimbionte fuera de la planta huésped. Un gran avance fue la subsiguiente demostración de que Frankia, en cultivo puro,

podía reducir acetileno (Tjepkema et al., 1980). Segundo, ha habido una creciente conciencia de la potencial importancia de estas asociaciones en los sistemas forestales. La tradicional tendencia a incrementar la superficie agrícola y obtención masiva de madera, continúa causando una rápida deforestación de gran parte de la superficie del mundo. Debido a que las actinorrizas son buenos colonizadores, pueden ser utilizadas para regenerar los suelos pobres. En relación con esto, Dommergues et al. (1984) han puesto de manifiesto que las tasas de fijación de nitrógeno pueden alcanzar valores de 260 Kg/Ha/año para Casuarina equisitifolia. No obstante, los resultados obtenidos con inóculos de Frankia para nodular las plantas huésped, son contradictorios a tenor de la bibliografía consultada (Rodríguez-Barrueco y Subramanian, 1988). En un reciente trabajo, Cervantes et al. (1988) han observado que son necesarios algunos compuestos, presentes en filtrados de extractos nodulares, para la infección de Coriaria por razas de Frankia aisladas de otros hospedadores.

2. ASOCIACION RHIZOBIUM-LEGUMINOSA.

La fijación simbiótica de nitrógeno alcanza su culminación en eficiencia y magnitud en los nódulos radicales de las leguminosas, que han sido objeto amplio de estudio, tanto a nivel fisiológico como bioquímico.

La familia Leguminosae comprende alrededor de 750 géneros y 20.000 especies. Sin embargo, no todas las especies o géneros se asocian con Rhizobium y forman nódulos radicales, mientras que la mayoría de las bacterias del género Rhizobium muestran un alto grado de selectividad hacia su planta huésped (Gallon y Chaplin, 1987).

Las leguminosas son importantes en la agricultura no sólo por el hecho de que son capaces de fijar nitrógeno en simbiosis con Rhizobium, sino también porque las plantas y semillas tienen un elevado contenido en proteínas. Las semillas de leguminosas grano juegan un importante papel en la nutrición humana, y las leguminosas forrajeras también aportan un elevado contenido proteico a la dieta del ganado. Asimismo, las leguminosas tienen un significado ecológico puesto que aportan nitrógeno a los hábitats naturales tales como los bosques tropicales (Dixon y Wheeler, 1986).

2.1. Taxonomía de Rhizobium.

Las primeras descripciones acerca de nódulos en leguminosas son realizadas en 1587 por Dalechamps, cuando hace mención a la presencia de numerosos nódulos en raíces de Ornithopodium (actualmente Ornithopus). Sin embargo, haría falta más de tres siglos para poder asociar estos nódulos con la fijación de nitrógeno y con los microorga-

nismos que la inducen.

En 1888, Beijerinck, siguiendo los postulados de Koch, es capaz de confirmar que los nódulos de diferentes leguminosas son producidos por una bacteria. Dos años antes Hellriegel y Wilforth (1886, 1888) habían demostrado que las leguminosas podían fijar nitrógeno atmosférico.

En el Manual de Bergey (Buchanan y Gibbons, 1974) se describe la familia Rhizobiaceae con dos géneros: Agrobacterium, cuyas especies con excepción de A. radiobacter, estimulan la formación de hipertrofias corticales en plantas; Rhizobium, cuyas especies forman nódulos en las raíces de plantas pertenecientes a la familia Leguminosae. Las bacterias pertenecientes a la familia Rhizobiaceae son bacilos Gram negativos, aerobios, no esporulados y móviles por flagelos.

Clásicamente, las bacterias del género Rhizobium se han clasificado en dos grupos, de crecimiento rápido y de crecimiento lento, basándose en la velocidad de crecimiento (tiempo de generación) en medio de manitol-extracto de levadura. Aparte de su tasa de crecimiento, estos dos grupos difieren en la utilización de varios compuestos carbonados. Así, mientras las especies de rápido crecimiento pueden utilizar una amplia gama de carbohidratos y ácidos orgánicos para su crecimiento, los de lento

crecimiento pueden utilizar un número más restringido de sustratos para crecer (Graham, 1964).

El sistema de clasificación de Rhizobium en especies se ha basado en la especificidad de infección que presenta. De esta forma, tradicionalmente se han reconocido y distinguido, por pruebas bioquímicas y de infectividad seis especies diferentes (Graham, 1976). Esta clasificación asume que cada especie de Rhizobium nodula sólo las plantas de su grupo de inoculación cruzada y dentro de cada grupo un Rhizobium que se aisle de él será capaz de nodular cualquier planta del mismo.

Dado que hay una gran cantidad de bacterias aisladas de nódulos de distintas especies vegetales que no es posible clasificarlas bajo este marco patrón, se creó un séptimo grupo al que se le ha dado el nombre de Rhizobium del grupo cowpea o Rhizobium cowpea debido a la nodulación de estas leguminosas (Vigna spp) por una amplia gama de razas de Rhizobium. Actualmente se considera al grupo cowpea o misceláneo como una gran colección de especies de leguminosas tropicales y subtropicales que son infectadas y noduladas por bacterias de lento crecimiento que pueden actuar inespecíficamente (Allen y Allen, 1981).

A pesar de la incorporación del último grupo a la clasificación de Rhizobium, existen suficientes antecedentes que hacen que ésta pierda credibilidad, especial-

mente por las simbiosis promiscuas, por nodulaciones no recíprocas y por presencia de Rhizobium que no cubre la presente clasificación (Trinick, 1980). Recientemente, Herrera (1984) estudiando diversas asociaciones simbióticas entre Rhizobium y leguminosas leñosas, observó que existía una marcada inespecificidad que se manifestaba a dos niveles. Por una parte, las plantas pueden ser noduladas por distintas razas de Rhizobium de otros hospedadores y, por otra, las razas de Rhizobium aisladas de los nódulos de sus raíces pueden nodular diversas leguminosas herbáceas de los grupos de inoculación cruzada tradicionales, pudiendo incrementarse el nivel de infección al agregarse al medio de crecimiento de la planta polisacáridos de su bacteria homóloga.

Recientemente, Jordan (1984) propone en la novena edición del Manual de Bergey reunir las especies de rápido crecimiento (R. leguminosarum, R. phaseoli y R. trifolii) en una sola especie, R. leguminosarum la que presentaría tres biovariedades: biovar. vicieae que infecta a las leguminosas de los géneros Pisum, Vicia y Lens; biovar. phaseoli que infecta a Phaseolus y biovar. trifolii que infecta a especies de Trifolium. R. meliloti permanece como especie independiente en el género Rhizobium, que infecta a las especies del género Melilotus, Medicago entre otras. Este mismo autor acepta lo sugerido por Jarvis et al. (1982) quienes proponen la

creación de una nueva especie de Rhizobium, R. loti, que agruparía a los microorganismos de rápido crecimiento que son capaces de nodular un amplio rango de hospedadores entre los que se encuentran Lotus, Leucaena, Cicer, Onobrychis, Robinia pseudoacacia etc. Por último hay un último grupo, Rhizobium sp que infecta a Macroptilum y otras leguminosas.

La decisión de agrupar R. leguminosarum, R. phaseoli y R. trifolii en una sola especie, la de mantener R. meliloti como especie aparte y la creación de la nueva especie R. loti, ha estado basada en resultados de análisis taxonómicos numéricos (Graham, 1964; Moffet y Colwell, 1968), homología de ADN (Jarvis et al., 1980), relaciones serológicas (Vincent, 1977) y electroforesis de proteínas solubles (Roberts et al., 1980).

Respecto a las especies de lento crecimiento, R. japonicum y R. lupini, la novena edición del Manual de Bergey (Jordan, 1984) está de acuerdo con lo propuesto por Jordan (1982), quien agrupa a estas especies en un nuevo género, Bradyrhizobium, con la especie B. japonicum que infecta a Glycine y Bradyrhizobium sp que infecta a Vigna, Lupinus y otras leguminosas.

2.2. Proceso de nodulación.

El resultante final de la simbiosis Rhizobium-

leguminosa es la fijación de nitrógeno atmosférico, sin embargo, para que esto ocurra se deben cumplir una serie de etapas desde la invasión de la rizosfera de las leguminosas por la bacteria específica o no, hasta la actuación de la nitrogenasa reduciendo el N_2 a amonio. Estos pasos o etapas pueden resumirse en las tres clásicas características simbióticas de esta asociación: especificidad, infectividad y efectividad, que se refieren al reconocimiento de un hospedador determinado y a la capacidad de infectar y fijar nitrógeno, respectivamente.

2.2.1. Colonización de la rizosfera y especificidad.

Para que el proceso de infección ocurra es necesario que los rizobios del suelo alcancen la zona próxima a la raíz en desarrollo o rizosfera de la planta huésped, que se extiende aproximadamente 2 mm desde la superficie de la raíz. Parece ser que la transmisión de bacterias desde el suelo hasta la rizosfera ocurre con facilidad y no es particularmente específica para Rhizobium (Moawad et al., 1984). De esta forma, Rhizobium muchas veces se encuentra asociado a la rizosfera de leguminosas no homólogas e incluso en la rizosfera de plantas no leguminosas. Como consecuencia, la rizosfera de una leguminosa en particular puede ser colonizada por una mezcla de razas, algunas de las cuales son capaces de invadir el sistema radical de la planta y formar nódulos y

otras no (Gallon y Chaplin, 1987).

Según la relación R/S (rizosfera/suelo) que representa el número de microorganismos en la rizosfera en comparación con el resto del suelo no rizosférico, los valores normales para los organismos del suelo, en general, están entre 5 a 10 (Rovira y Davey, 1971). En Rhizobium, el efecto de la rizosfera es positivo y fácilmente perceptible alcanzándose valores de R/S que varían de 10 a 200. Bajo condiciones excepcionales, las poblaciones rizosféricas de Rhizobium pueden incluso llegar a ser 10.000 veces superiores a las del suelo (Schmidt, 1979; Moawad et al., 1984).

No cabe duda que la rizosfera de las plantas proporciona un ambiente más favorable que el suelo para soportar el crecimiento bacteriano, debido probablemente a que las raíces en desarrollo excretan una gran variedad de compuestos fácilmente utilizables para el crecimiento de microorganismos heterotróficos. Se trata de una zona rica en nutrientes, particularmente carbohidratos, aminoácidos y vitaminas (van Egeraat, 1975) por los cuales compiten las poblaciones de microorganismos, incluyendo rizobios. Moawad et al. (1984) estudiaron el efecto competitivo entre tres serogrupos de B. japonicum para nodular a la planta huésped, en la rizosfera y suelo no rizosférico. Observaron que la población de cada serogrupo incrementaba

gradualmente desde 10^4 a 10^6 rizobios/g de suelo en la rizosfera, durante la primera semana después de la siembra de Glycine max, mientras que el número de rizobios en el suelo no rizosférico permanecía en 10^4 rizobios/g de suelo. Asímismo, evidenciaron que no había predominio entre serogrupos en la colonización de la rizosfera. Sin embargo, el serogrupo 123, presentaba una clara ventaja en la nodulación, formando el 60-100% de los nódulos. Estos autores concluyeron que el éxito en la nodulación del serogrupo 123 no era debido a una colonización superior de la rizosfera. Bushby (1984) comparó la colonización de la rizosfera con la subsiguiente nodulación de Vigna por dos razas de Bradyrhizobium. Observaron que las poblaciones de rizobios aumentaban en la rizosfera pero la distribución de las razas en ella no se reflejaba en la nodulación. Aunque el efecto positivo de la rizosfera es mayor para unas razas que para otras, no se puede hablar de especificidad en esta etapa inicial de colonización de la rizosfera (Pueppke, 1986).

Otros autores han mostrado que la proporción de nódulos formados por una raza podría estar correlacionada con su representación relativa en la superficie radical del huésped (Franco y Vincent, 1976). Trinick et al. (1983) concluyeron que resulta muy difícil predecir el éxito de la nodulación a partir de la información obtenida en estudios de colonización de la rizosfera y la represen-

tación de las razas de Rhizobium en ella.

2.2.2. Quimiotaxis y movilidad.

Quispel et al. (1984) sugieren colocar como un evento previo a la infección la quimiotaxis de razas móviles. Puesto que la mayoría de los rizobios poseen flagelos y pueden moverse hacia sustancias atrayentes (azúcares) o alejarse de irritantes (antibióticos, bacteriocinas), la movilidad se ha investigado como un posible factor en el proceso de nodulación.

En muchos trabajos se ha intentado estudiar qué sustancias son mejores agentes atrayentes para Rhizobium. R. meliloti exhibe una quimiotaxis mayor hacia aminoácidos que hacia azúcares, con excepción del gluconato (Burg et al., 1982). R. meliloti y R. lupini fueron atraídos óptimamente por diferentes aminoácidos, no obstante, R. lupini exhibió mayor quimiotaxis hacia carbohidratos (Goetz et al., 1982). R. leguminosarum es atraído por un gran número de azúcares, pero no por la sacarosa (Bowra y Dilworth, 1981). Además, se ha observado que la movilidad también depende del pH, siendo favorecida por la presencia de iones calcio y disminuida por los iones de cobre. Gaworzewska y Carlile (1982) observaron que R. leguminosarum presentaba quimiotaxis hacia exudados radicales de Pisum sativum. La caracterización de estos exudados mostró que un gran número de fracciones eran

atrayentes, incluyendo las de bajo peso molecular. Sin embargo, este efecto no era específico para R. leguminosarum pudiendo ser ampliado a otras bacterias como Escherichia coli. Además, también la presentaban exudados radicales de otras leguminosas así como de plantas no leguminosas. Sin embargo, la quimiotaxis, a pesar de no ser específica ni esencial en condiciones axénicas, representa una ventaja para aquellas razas móviles frente a las no móviles (Bowra y Dilworth, 1981; Gaworzewska y Carlile, 1982).

Madsen y Alexander (1982) detectaron movimientos de Rhizobium en el suelo debidos solamente a la percolación de agua a través de los canales creados por gusanos y raíces de plantas.

2.2.3. Adhesión a la superficie radicular.

Las bacterias del género Rhizobium pueden ser rápidamente adsorbidas sobre muchos sustratos, incluyendo otros microorganismos, partículas del suelo y raíces de plantas (Pueppke, 1984a). La adhesión de Rhizobium a la superficie radical de la planta huésped ha recibido una particular atención en los últimos años debido a su posible participación en la especificidad de la simbiosis e iniciación del nódulo (Dazzo, 1980; Pueppke, 1984a; Matthysse, 1985).

Diversos mecanismos funcionan en la unión de Rhizobium a la superficie radical de su huésped (Pueppke, 1986). Durante muchos años se ha sugerido que las lectinas pueden estar involucradas en la interacción específica entre la bacteria y la planta. Las lectinas son proteínas, o glicoproteínas, localizadas en la superficie radical de la planta, que son capaces de reconocer específicamente y unirse de forma reversible a los carbohidratos complementarios de la superficie celular de Rhizobium compatibles y como resultado de aquello se produce la unión de la bacteria a la raíz. Pueden ser producidas por una amplia variedad de especies de plantas que representan casi todas las clases taxonómicas (Etzler, 1985). De acuerdo con Dazzo et al. (1984; 1985), la adhesión de R. leguminosarum biovar. trifolii a los pelos radicales de Trifolium es bifásica. La adhesión bacteriana inicial es reversible y en ella interaccionan el polisacárido capsular que rodea las células de Rhizobium y las lectinas (trifoliin A), localizadas en la superficie de pelos radicales, mientras que en la segunda fase, la interacción es irreversible.

El modelo de adhesión descrito por Dazzo et al. (1984; 1985) no excluye la posibilidad de que existan otros mecanismos de interacción entre la bacteria y el huésped. Así, en otros casos, la adhesión parece ser independiente de los polisacáridos capsulares de Rhizobium y

las lectinas (Pueppke, 1984a; 1984b; Matthysse, 1985). Stacey y Brill (1982) sugieren que la función de las lectinas puede ir encaminada a incrementar la afinidad en el proceso de reconocimiento pero que no son imprescindibles. Esto se basa en el hecho de que hay lectinas específicas para sus bacterias compatibles pero no son esenciales para la infección. Lo anterior se demuestra fácilmente en los casos en que a pesar de no haber lectinas en las raíces, hay nodulación y por el contrario, en los casos que aún habiendo aglutinación por lectinas no se produce nodulación.

También se ha sugerido la posible participación de sustancias de crecimiento liberadas por Rhizobium que pueden ejercer su influencia sobre las raíces de la planta. A este respecto, los trabajos de Bauer et al. (1985) sugieren que inoculantes de Bradyrhizobium japonicum pueden inducir la división celular en el córtex de raíces de soja incluso antes de la adhesión de la bacteria a las raíces. Estos autores indican que las sustancias que inducen la división celular podrían ser citoquininas liberadas por la bacteria.

Pueppke (1986) concluye que el proceso de adhesión inicial de Rhizobium a la superficie del pelo radical no es específico. Trabajando con mutantes de Rhizobium que han perdido la capacidad de nodular, se ha

evidenciado que pueden adherirse a la superficie radicular de Trifolium repens, Pisum sativum, Glycine max y Vigna, e incluso, en algunos casos la capacidad de adhesión de estos mutantes fue superior a la de las razas con capacidad de nodular. Asumir que la especificidad de la simbiosis está dada sólo por la adhesión de la bacteria a la raíz del hospedador es sólo simplificar este proceso (Stacey y Brill, 1982).

Recientemente se ha señalado (Olivares et al., 1984) que los polisacáridos extracelulares producidos por Rhizobium pueden constituir un posible puente entre la bacteria y las células radicales de las leguminosas. Estos mismos autores resaltan la especificidad e importancia que tendrían los polisacáridos extracelulares en el proceso de infección.

2.2.4. Competitividad en la adhesión e iniciación del nódulo.

La gran diversidad existente en las características intrínsecas de Rhizobium sugieren un enorme potencial de competición para la adhesión e iniciación del nódulo. Algunas razas pueden tener receptores de mayor afinidad que otras, por ejemplo para las lectinas, o mayor competencia para la adhesión y/o iniciación del nódulo (Dowling y Broughton, 1986). Los genes involucrados en la especificidad para la planta huésped también pueden estar

implicados en la competitividad entre razas de R. trifolii (Djordjevic et al., 1985). También se ha sugerido que aquellas razas de Rhizobium que pueden iniciar la infección y nodulación rápida y eficientemente, tendrán una ventaja competitiva sobre aquellas que lo hacen de forma más lenta (Dowling y Broughton, 1986).

Se ha comprobado que la capacidad competitiva de una raza de Rhizobium puede ser modificada si previamente se inocula con otras razas de Rhizobium, aunque éstas sean poco competitivas para la formación de nódulos, cuando se inoculan conjuntamente. Así, Kosslak et al. (1983) observaron que la formación de nódulos por razas poco competitivas era mayor si primero se inoculaba con éstas y posteriormente con razas más competitivas. Por otra parte, Diatloff y Brockwell (1976) encontraron que una raza de Bradyrhizobium japonicum que nodulaba escasamente un cultivar de Glycine max podía inhibir la nodulación por otras razas, cuando eran utilizadas en inóculos mixtos. La supresión de la nodulación también se ha observado en cultivares de guisante (Pisum sativum cv. Afganista..) inoculados con razas de R. leguminosarum. La raza bloqueante de la nodulación no era capaz de formar nódulos en dicho cultivar, sin embargo, podía inducir el "curling" del pelo radical y formar el filamento de infección. Por otra parte, dicha raza de R. leguminosarum puede nodular efectivamente otros cultivares de P.

sativum.

2.2.5. Primeros eventos de la nodulación y desarrollo de los nódulos.

Aunque se conoce muy bien la secuencia de eventos que ocurren tras la penetración de la bacteria en el sistema radical de la planta, el eslabón que une estos procesos con la adhesión de la bacteria a la superficie radical, constituye en muchos casos un misterio. Presumiblemente, la unión específica de la bacteria al pelo radical, mediada o no por lectinas, genera una señal que resulta en la infección. Sin embargo, la naturaleza de esta señal ha de ser dilucidada (Gallon y Chaplin, 1987).

En la secuencia de procesos que ocurren en el establecimiento de la simbiosis, se producen diversas interacciones específicas en las que siempre se encuentra presente algún elemento de reconocimiento. Si este reconocimiento no se produce el proceso aborta (Quispel et al., 1984).

La primera señal visible del proceso de infección es la deformación o "curling" del pelo radical (Bauer, 1981). Dicha deformación puede adoptar tres formas diferentes, ramificación, "curling" moderado y marcado "curling" del pelo radical. Aunque es posible que Rhizobium infecte pelos radicales relativamente erguidos,

la mayor parte de las infecciones se originan cuando la bacteria queda atrapada por un marcado curvamiento del pelo radical (Callaham y Torrey, 1981; Turgeon y Bauer, 1985).

No se conoce con seguridad si el proceso de curvamiento del pelo radical es un requisito necesario para la iniciación del filamento de infección o si sólo ocurre como consecuencia de una infección localizada de Rhizobium en el sitio de crecimiento del pelo radical. Downie et al. (1984) trabajando con mutantes de Rhizobium que han perdido la capacidad de nodular, observaron que pueden inducir el "curling" sin aparente formación del filamento de infección. Estos autores sugieren que el "curling" puede preceder o no el proceso de infección. Por otra parte, en algunos casos se ha demostrado la formación de filamentos de infección sin previo curvamiento del pelo radical (Callaham y Torrey, 1981), aunque en estos casos es posible que la infección se localice en el punto de contacto entre dos pelos radicales.

En la mayoría de las leguminosas importantes agronómicamente, incluyendo alfalfa (Medicago sativa), trébol (Trifolium spp), soja (Glycine max), guisante (Pisum sativum) y judía (Phaseolus vulgaris), se ha observado que la infección ocurre a través de los pelos radicales (Robertson et al., 1985). En todos los casos

estudiados, los filamentos de infección se iniciaron en un punto próximo al extremo en crecimiento del pelo radical (Turgeon y Bauer, 1985), siendo los pelos radicales más jóvenes los más susceptibles para el proceso de infección (Bhuvaneswari et al., 1981). Este proceso ha sido revisado por Bhuvaneswari (1984) quien sugiere que es posible que los oligosacáridos liberados cuando se degradan los polisacáridos capsulares provoquen la ramificación del pelo radical.

La forma de penetración de Rhizobium en los pelos radicales ha sido, desde hace mucho tiempo, motivo de estudio. Así, se han formulado varias hipótesis para explicar dicho proceso. Nutman (1956) propuso que la infección ocurre por medio de un proceso de invaginación. De acuerdo con este planteamiento, en el pelo radical se produce una inversión en la dirección de crecimiento provocando el englobamiento de la bacteria con el posterior inicio del canal de infección.

La segunda hipótesis es más reciente e implica la penetración directa de la pared celular del pelo radical por Rhizobium (Callaham y Torrey, 1981; Turgeon y Bauer, 1985), debido a la degradación de la pared celular en el sitio de penetración.

Una vez que la bacteria ha penetrado en el interior del pelo radical, se divide en el interior

formándose el denominado "filamento de infección" que crece progresivamente hacia la base del pelo radical. Aunque esta estructura se localiza en el interior de la raíz, como está rodeado por la pared celular de la planta, las bacterias en esta etapa son extracelulares.

No todas las leguminosas son infectadas a través de los pelos radicales. Así, se ha descrito que en Arachis hypogea y diversas especies de Stylosanthes, ambas de origen tropical y pertenecientes a la tribu Papilionoideae, la bacteria produce "curling" y ramificación de los pelos radicales, sin embargo, la penetración se produce en las axilas formadas por el pelo radical y las células epidérmicas y corticales (Chandler, 1978; Chandler et al., 1982). Por otra parte, se ha evidenciado que especies de los géneros Aeschenomene y Sesbania, pueden formar nódulos en zonas aéreas de sus tallos, siendo estos nódulos particularmente abundantes cuando las plantas crecen bajo condiciones de encharcamiento (Dreyfus y Dommergues, 1981).

Como los rizobios de origen tropical se consideran más primitivos que los de clima templado (Norris, 1965) y las leguminosas tropicales más antiguas, en la escala evolutiva, es posible que la infección a través del pelo radical sea un evento relativamente reciente en la evolución (Sprent, 1984).

Se han descrito básicamente dos tipos de nódulos atendiendo al tipo de crecimiento: nódulos de crecimiento determinado y nódulos de crecimiento indeterminado, cuyas características morfológicas y estructurales han sido ampliamente estudiadas (Newcomb, 1976; Newcomb et al., 1979) utilizando Glycine max y Pisum sativum respectivamente, exponiéndose en el siguiente esquema (Sprent, 1984):

INFECCION VIA PELO RADICAL.

Determinado.	Indeterminado.
Mitosis en la zona externa del córtex.	Mitosis en la zona interna del córtex.
Infección aleatoria de algunas células recientemente formadas.	Infección de células recientemente formadas próximas a la estela, iniciando un meristemo nodular.
División de células infectadas y bacterias. Limitado crecimiento celular.	División del meristemo y subsiguiente infección de las nuevas células mediante ramificación del filamento de infección original.
Aumento de tamaño de las células, división bacteriana y liberación en los sacos envolventes. Inducción de la nitrogenasa y síntesis de leghemoglobina.	Aumento de tamaño de las célula ya infectadas, las bacterias aumentan de tamaño y pueden hacerse pleomórficas. Inducción de la nitrogenasa y síntesis de leghemoglobina.

Generalmente se ha asumido que en la iniciación

y desarrollo del nódulo están involucradas sustancias de crecimiento y hormonas producidas por ambos simbiontes. La compleja interacción que se establece entre la bacteria y la planta, cuyo resultado es la formación de nódulos fijadores de nitrógeno, exige una gran coordinación metabólica entre los dos simbiontes. Los nódulos radicales de las leguminosas son estructuras altamente organizadas y metabólicamente muy activas. Parece, por tanto, razonable que los reguladores del crecimiento vegetal, las fitohormonas, tengan un papel crítico en el establecimiento de estas estructuras (Ligero y Lluch, 1986). Un hecho que fundamenta dicho control hormonal, es la observación de que la división celular en el córtex de la raíz puede iniciarse incluso antes de que se haya formado el filamento de infección (Calvert et al., 1984; Bauer et al., 1985). De esta forma, se han implicado auxinas, giberelinas, citoquininas, etileno y ácido abcísico, junto con otros "factores" no identificados (Sprent, 1984). No obstante, la situación parece ser bastante confusa, y la relación exacta puede variar entre especies lo que explica la amplia variación existente en la forma de los nódulos (Corby, 1981) y el hecho de que en algunas plantas, tales como la soja, la actividad meristemática cesa en una etapa temprana del desarrollo del nódulo, mientras que en otras, tales como el guisante, la actividad meristemática persiste incluso después de que haya comenzado la

actividad fijadora de nitrógeno. Por otra parte, la forma final del nódulo y la forma activa de Rhizobium en la fijación de nitrógeno, denominado bacteroide, están controlados, al menos parcialmente, por el genotipo de la planta huésped. Por ejemplo, Kidby y Goodchild (1966) inocularon plantas de Lupinus luteus y Ornithopus sativus con la misma raza de R. lupini, sin embargo, la forma de los nódulos fue diferente en ambas plantas. Cuando la raza 32HI es inoculada en plantas de Arachis hypogea, los bacteroides son casi esféricos, sin embargo, la misma raza de Rhizobium produce bacteroides alargados en Vigna unguiculata (Sen y Weaver, 1980). De forma similar, la raza de Rhizobium puede modificar la morfología de la planta como se evidencia por las diferencias existentes en la longitud de entrenudos en Phaseolus lunatus cuando se inoculan con razas de Rhizobium cuyos bacteroides producen diferentes cantidades de giberelinas (Evensen y Blevins, 1981).

Truchet et al. (1980) estudiaron las interacciones fisiológicas entre la planta hospedadora y el endosimbionte en la simbiosis Medicago sativa-Rhizobium meliloti y concluyeron: a) que la bacteria puede inducir la formación del meristemo produciendo algunos agentes que pueden atravesar la pared celular y el plasmalema y b) que la diferenciación de las células activas fijadoras de nitrógeno depende de otro agente que no puede pasar de una

célula a otra y requiere que la bacteria sea primero liberada del filamento de infección.

El tamaño final de los nódulos puede depender de la división celular y del aumento de tamaño de la célula. En los nódulos determinados del tipo de la soja, el número de células parece ser que está determinado en una etapa temprana del desarrollo del nódulo (Bergersen, 1982). Por otra parte, existen una serie de evidencias que indican que el tamaño de las células es controlado independientemente, de tal forma que la adaptación a los cambios ambientales puede ocurrir a través del aumento del tamaño celular (Sprent, 1984). En los nódulos indeterminados, el tamaño final está gobernado por la longevidad del meristemo así como por el tamaño de las células individuales.

Aunque se conoce desde hace muchos años que los nódulos tienen un periodo de vida limitado, que puede ser prolongado para mejorar la fijación de nitrógeno, se han realizado pocos estudios para conocer el proceso de senescencia nodular. El cambio de color desde rojo a pardo verdoso es el primer signo visible de senescencia en el nódulo (Sutton, 1983). En los nódulos determinados del tipo de la soja, esto ocurre primero en la zona central y se extiende rápidamente a través de toda la región infectada. Bajo algunas circunstancias puede ser

reversible (Sprent, 1984). En los nódulos indeterminados, la senescencia comienza en la base del nódulo y al avanzar la edad del nódulo se va incrementando la proporción de tejido senescente en dirección al ápice, aunque los nódulos pueden permanecer siendo activos durante semanas, meses, e incluso años.

3. ECOLOGIA DE RHIZOBIUM EN EL SUELO.

La incapacidad para predecir por qué las leguminosas se desarrollan pobremente y fijan poco nitrógeno en suelos fértiles que contienen razas efectivas de Rhizobium, frecuentemente deriva de la carencia de conocimientos acerca de la ecología de las bacterias formadoras de nódulos radicales. Si en un suelo fértil están presentes una planta huésped apropiada y razas de Rhizobium efectivas, debería producirse una activa fijación de nitrógeno. Sin embargo, con frecuencia no llega a establecerse una asociación simbiótica o bien la fijación es insuficiente para satisfacer la demanda del cultivo para este nutriente. Ello puede ser debido a factores genéticos de los simbiontes, pero a veces se debe a la incapacidad de las bacterias para sobrevivir, crecer en el suelo, colonizar las raíces o formar nódulos (Alexander, 1984).

3.1. Técnicas utilizadas para estudios de ecología.

Para el estudio de la ecología de Rhizobium y Bradyrhizobium en el suelo se require que las razas puedan ser reconocidas e identificadas. En las investigaciones realizadas acerca de la competitividad entre rizobios, es necesario disponer de técnicas adecuadas que permitan la identificación de las razas inoculadas, así como determinar la proporción de nódulos ocupados por las bacterias indígenas del suelo.

El método más antiguo utilizado para determinar las poblaciones de rizobios en el suelo, fue la técnica del número más probable, en el cual se empleaban muestras diluidas de suelo para inocular plantas (Wilson, 1926). Aunque el método se ha modificado repetidas veces, esta metodología es poco utilizada en la actualidad debido a la cantidad de trabajo que requiere y la necesidad de utilizar un gran número de plantas.

El aspecto externo de los nódulos puede ser indicativo de la ocupación del nódulo, pudiendo ser utilizada esta característica para distinguir distintos tipos de razas: las razas inefectivas, con frecuencia forman nódulos más pequeños, de color blanco o verdoso y algunas razas de Bradyrhizobium originan nódulos de color poco usual debido a la síntesis de un pigmento adicional (Eaglesham et al., 1982; Eaglesham, 1985). El aspecto de

las colonias crecidas en medio con agar, es otra característica útil (Stowers y Eaglesham, 1984). El grado de absorción del colorante rojo-congo incorporado en un medio de agar puede variar entre razas (Kneen y LaRue, 1983) y se ha utilizado como un marcador sencillo (Bromfield y Jones, 1979).

Recientemente, los avances tecnológicos en la identificación y diferenciación de razas bacterianas han contribuido a incrementar el interés en el estudio de la ecología de los rizobios en el suelo. Especial importancia presenta la utilización de marcadores resistentes a antibióticos y las técnicas de inmunofluorescencia (Schmidt y Robert, 1985).

El primero de ellos ha sido ampliamente utilizado (Schwinghamer y Dudman, 1980) e implica la obtención de mutantes resistentes a uno o varios antibióticos, presentes en un medio de agar, a concentraciones tales que inhiben el crecimiento de otras bacterias y nongos. La raza marcada, una vez introducida en el suelo, puede ser fácilmente reconocida incluso cuando la población es inferior a 30 células/g de suelo. De forma similar, se han obtenido mutantes auxotróficos (Johnston y Beringer, 1975). No obstante, estas técnicas presentan ciertas limitaciones y sólo pueden ser utilizadas para estudios ecológicos de bacterias que se

inoculan en el suelo, no pudiendo ser aplicadas para estudiar las poblaciones naturales de microorganismos. Por otra parte, es necesario comprobar las diferencias que puedan existir entre el mutante resistente y el tipo silvestre, en términos de efectividad y/o competitividad (Bromfield y Jones, 1979).

Las técnicas serológicas probablemente son las más utilizadas para la identificación, clasificación y caracterización de los rizobios, y después de la técnica de eletroforesis en gel, las que presentan mayor poder de diferenciación (Dughri y Bottomley, 1984; Kamicker y Brill, 1986). Durante muchos años se ha utilizado el test de aglutinación en el estudio antigénico de los rizobios, y las técnicas de inmunodifusión en gel e inmunofluorescencia han sido extensivamente aplicadas a estudios de ecología de Rhizobium. Kishinevsky y Bar-Joseph (1978) mostraron la adaptación del ensayo ELISA para la identificación de Rhizobium en cultivo y en nódulos. Se ha evidenciado que presenta grandes ventajas por lo que en la actualidad es muy utilizada en este tipo de investigaciones. Estas ventajas son rapidez, sensibilidad (se requiere menos antígeno y antisuero), es relativamente simple y no requiere un gran equipamiento (Eaglesham y Sinclair, 1988).

3.2. Factores ecologicos que afectan a Rhizobium.

Las especies de Rhizobium son microorganismos del suelo qu se comportan como saprofitos facultativos, que pueden persistir asociados especialmente a desechos orgánicos de sus hospedadores muertos. Se han realizado numerosas investigaciones para conocer estas poblaciones bacterianas bajo condiciones de campo. Los datos disponibles indican que el número de rizobios por gramo de suelo puede ser inferior pero a veces excede a 10^6 (Moawad et al., 1984).

Desde hace mucho tiempo se sabe que las poblaciones bacterianas de Rhizobium son generalmente más numerosas en suelos con cultivos rotacionales en los que interviene la leguminosa homóloga que en aquellos en los que el cultivo de esta leguminosa está ausente. También se conocía que la adición de restos vegetales y estiércol favorece el desarrollo de Rhizobium en el suelo (Alexander 1984). Por otra parte, el crecimiento bacteriano puede ser notablemente estimulado por la adición al suelo de compuestos orgánicos sencillos, fácilmente utilizables como el manitol. No obstante, mediante la adición de grandes cantidades de azúcar al suelo, se consiguen pequeños incrementos en la tasa de crecimiento de Rhizobium, debido a la competición con bacterias de rápido crecimiento del mismo hábitat (Pena-Cabriales y Alexander,

1983).

Obviamente, los factores ambientales pueden influir sobre el crecimiento de la planta así como sobre la bacteria. Como las plantas pueden desarrollar una rizosfera apropiada para el crecimiento de los rizobios, así como estructuras morfológicamente especializadas, nódulos, que albergan al microsimbionte, se puede asumir que cualquier factor que incida negativamente sobre el crecimiento de la planta, también afectará indirectamente la capacidad de nodulación de Rhizobium (Dowling y Broughton, 1986). Entre los factores ambientales que pueden influenciar la viabilidad y capacidad de nodulación de las poblaciones indígenas de Rhizobium en el suelo, se pueden citar el tipo de suelo, pH, humedad, temperatura, salinidad, factores biológicos, pesticidas y herbicidas.

a) Tipo de suelo: El suelo es un reservorio de razas de Rhizobium y las características intrínsecas de éste condicionarán las poblaciones nativas de rizobios presentes en él. Bowen y Rovira (1976) mostraron que la tasa de crecimiento de Rhizobium en un suelo carente de plantas es pequeña, con un tiempo de generación de 200 horas mientras que en la rizosfera de leguminosas es de 12 horas.

Los niveles de fosfato en el suelo con frecuencia, son limitantes para el crecimiento de las

plantas en suelos tropicales ácidos. Beck y Munns (1984) han puesto de manifiesto que el crecimiento de Rhizobium en cultivo puro puede verse limitado por bajos niveles de fosfato, existiendo diferencias notables entre distintas razas. En experimentos de campo, los resultados obtenidos por Almendras y Bottomley (1985) sugieren que la limitación de fósforo en el suelo es exacerbada por el pH bajo y que la combinación de ambos factores puede tener una fuerte influencia sobre la competición entre razas para la nodulación.

b) pH: Numerosos estudios han puesto de manifiesto la variabilidad existente entre las razas de Rhizobium respecto a la tolerancia del pH del medio (Copper, 1982; Ayanaba et al., 1983; Whelan y Alexander, 1986). Algunas no sobreviven a pH 5, otras toleran pH 4.5 e incluso ciertas razas de lento crecimiento sobreviven a pH inferior a 4. Vincent (1970) señala como óptimo el margen de pH entre 6 y 7 para el crecimiento en medio de cultivo.

La acidez del suelo, así como diversos factores asociados a la acidez, afectan negativamente el crecimiento de la leguminosa huésped y la capacidad de nodulación de Rhizobium (Franco y Munns, 1982), sin embargo, ejerce poco efecto sobre la supervivencia de los rizobio en el suelo (Hartel y Alexander, 1983). La

elevada concentración de iones H^+ presente en suelos ácidos, incrementa la solubilidad del Al, Mn y Fe induciendo su toxicidad (Whelan y Alexander, 1986).

Muchas razas de Rhizobium de crecimiento rápido producen ácidos a partir de azúcares cuando crecen en un medio de cultivo (Tan y Broughton, 1981). Norris (1956) sugirió que la supervivencia de rizobios en suelos ácidos está inversamente relacionada con la cantidad de ácido producido. Sin embargo, la producción de ácido depende de los sustratos disponibles, incluso entre razas de lento crecimiento, que normalmente elevan el pH del medio (Franco y Munns, 1982).

El pH del suelo puede ser incrementado mediante encalado, mejorando de esta forma la nodulación y fijación de nitrógeno de las leguminosas (Bromfield y Jones, 1980). Sin embargo, no siempre se consiguen resultados satisfactorios mediante la manipulación del pH. Russell y Jones (1975) observaron que cuando modificaban el pH de ácido a neutro-alcalino mediante la adición de carbonato cálcico, se favorecía la formación de nódulos por razas poco efectivas, mientras que las razas de gran efectividad, adaptadas a las condiciones naturales del suelo, presentaban una nodulación óptima a pH ácido.

c) Temperatura: La temperatura del suelo se ha considerado el factor más importante en la capacidad de

Rhizobium para persistir y competir en el suelo, existiendo diferencias entre distintas razas en su capacidad de supervivencia y nodulación, según el intervalo de temperaturas (Hartel y Alexander, 1984). En inoculaciones mixtas, una raza aislada de Vigna fue más competitiva a elevadas temperaturas (36°C) que una raza de Bradyrhizobium japonicum, la cual compite mejor a temperaturas más bajas (24-30°C) (Roughley et al., 1980). En experimentos realizados con plantas de trébol inoculadas con distintas razas de R. leguminosarum biovar. trifolii, Hardarson y Jones (1979) observaron que una raza formaba mas nódulos a 12°C mientras que otra era más competitiva a 25°C.

Obviamente, la temperatura también influye sobre la tasa óptima de fijación de nitrógeno en los nódulos radicales, dependiendo de la estirpe de Rhizobium responsable de la nodulación. De esta forma, plantas de Lotus noduladas por rizobios de rápido crecimiento alcanzaban su tasa óptima de fijación de nitrógeno a temperaturas inferiores (12°C) que las plantas de Lotus noduladas por bacterias de lento crecimiento (Pankhurst y Layzell, 1984). Este factor puede incidir en diferentes etapas de la simbiosis, como por ejemplo en la precocidad de la infección e intensidad de la misma. También la actividad fijadora de nitrógeno puede verse afectada por este parámetro (Gibson, 1971; 1976; Lie, 1974).

Aunque la temperatura no es un factor que pueda ser fácilmente controlado bajo condiciones de campo, las bacterias pueden ser seleccionadas para una óptima fijación de nitrógeno y capacidad de competir bajo las condiciones dominantes. Por otra parte, los rizobios con un metabolismo adaptado a una temperatura determinada, pueden competir mejor con los microorganismos nativos del suelo a dicha temperatura.

d) Humedad del suelo: Osa-Afiana y Alexander (1982) señalan los bajos niveles de humedad del suelo, frecuentemente asociados con el "stress" de salinidad, como uno de los factores de mayor importancia en la distribución de Rhizobium en el suelo. Utilizando la técnica del número más probable, se observó que el número de rizobios en el suelo descendía considerablemente cuando éste era desecado, aunque el grado y extensión de esta reducción variaba según el tipo de suelo y de bacteria ensayados. Así, razas de Bradyrhizobium aisladas de zonas áridas, resultaron ser más tolerantes a la desecación y altas temperaturas que las aisladas en regiones templadas y húmedas (Hartel y Alexander, 1984). En un estudio realizado con rizobios aislados de nódulos radicales de Vigna y Arachis, se evidenció que la capacidad de supervivencia era mínima cuando se combinaban altas temperaturas con valores extremos, máximos o mínimos, de humedad (Boonkerd y Weaver, 1982).

Bushby y Marshall (1977a; 1977b) comprobaron que la viabilidad de ciertas razas de Rhizobium era favorecida si se adicionaban al suelo montmorillonita o ciertos materiales orgánicos que actuaban como protectores de la desecación. Propusieron que las diferencias existentes entre razas en la susceptibilidad a la desecación, se relacionaba con la cantidad de agua retenida por las células durante el proceso de desecación del suelo. Por otra parte, Chao y Alexander (1982) observaron que el pH y contenido de materia órganica del suelo, influyen en la capacidad de supervivencia de los rizobios durante el proceso de desecación, existiendo una relación directa entre el número de células que permanecen viables y el contenido de materia orgánica del suelo.

El déficit hídrico produce una fuerte disminución en la actividad nitrogenasa. Sin embargo, si esta condición de baja humedad nodular no es permanente, la actividad fijadora de nitrógeno puede volver a alcanzar sus valores normales una vez hidratados los nódulos (Albrecht et al., 1984). Aparicio-Tejo y Sánchez Díaz (1982) señalan que condiciones de baja humedad inducen, además, en la fijación simbiótica de nitrógeno, una mayor sensibilidad a la presencia de nitratos, lo que reduce su actividad. Excesos de agua en el suelo también reducen la fijación de nitrógeno debido a las limitaciones en la disponibilidad de oxígeno de los nódulos (Sprent, 1976).

e) Salinidad. La salinidad incide en el proceso de infección de las leguminosas por Rnizobium y en su persistencia en el suelo. Elevados niveles de cloruro sódico alteran el metabolismo celular bacteriano, contribuyendo a incrementar los niveles intracelulares de glutamato, posiblemente para mantener el balance iónico entre la célula y el medio (Yap y Lim, 1983). En consecuencia, el "stress" de salinidad altera la fijación de nitrógeno y síntesis de glutamina.

Rai (1983) trabajando con razas de Rhizobium aisladas de nódulos radicales de Lens y Pisum encontraron que existen considerables diferencias entre distintas razas en la tolerancia a la salinidad. Singleton et al. (1982) señalan que muchas razas de Rhizobium pueden multiplicarse y sobrevivir a concentraciones salinas tales, que son inhibitorias para la mayoría de las leguminosas de cultivo. Sin embargo, Steinborn y Roughley (1975) señalan este factor como una de las causas de la baja persistencia de Rhizobium en los inóculos comerciales. Doura et al. (1984) aislaron una raza de R. meliloti tolerante a una concentración 1.2% de cloruro sódico, que era capaz de nodular a Medicago sativa y fijar nitrógeno bajo condiciones de "stress" de salinidad. Sin embargo, como se ha detectado que concentraciones muy bajas de sal pueden inhibir la iniciación del nódulo en raíces aisladas de soja (Singleton, 1983), parece ser que las leguminosas

son más sensibles que los rizobios a las condiciones de salinidad del suelo.

f) Herbicidas y pesticidas: Los herbicidas y pesticidas se usan con frecuencia en la práctica agrícola, y en determinadas condiciones pueden afectar el resultado de la inoculación. Por ejemplo, los herbicidas retrasaron la nodulación en Pisum sativum (Magu y Bhowmik, 1984), no obstante, fue restaurada durante las posteriores fases de crecimiento de la planta. Kao y Wang (1981) estudiaron el efecto de cuatro herbicidas sobre la simbiosis Rhizobium-leguminosa y observaron que no inhibían la infección, pero la nodulación era retrasada debido al daño producido por los herbicidas en la planta. Estos autores concluyeron que los herbicidas ejercen su efecto directamente sobre la planta, no influyendo de forma directa sobre la capacidad de supervivencia de los rizobios en el suelo.

En diversas investigaciones se ha puesto de manifiesto que Rhizobium es sensible a bajas concentraciones de fungicidas, y el tratamiento de semillas con estas sustancias, con frecuencia provoca una escasa nodulación (Curley y Burton, 1975; Graham et al., 1980).

Se han observado diferentes grados de resistencia a fungicidas entre razas de Rhizobium, y algunos autores (Faizah et al., 1980) sugieren que esto podría ser

aprovechado para seleccionar razas resistentes a fungicidas y ser utilizadas como inoculantes. Ruiz-Sainz et al. (1984) seleccionaron mutantes de R. lequminosarum biovar. trifolii que eran resistentes al fungicida captafol. La obtención de razas mutantes de Rhizobium resistentes a otros fungicidas, de aplicación a semillas o plántulas, para la preparación de inoculantes, presenta ventajas competitivas de los mutantes frente a las poblaciones nativas de Rhizobium sensibles del suelo.

3.3. Efecto de la desnitrificación rizobiana en la agricultura.

El proceso de desnitrificación, también denominado respiración o desasimilación del nitrato, consiste en la reducción, llevada a cabo por bacterias aerobias facultativas, de las formas oxidadas de nitrógeno (nitrato y nitrito) hasta óxidos gaseosos, óxido nitrico (NO) y óxido nitroso (N_2O), o bien hasta dinitrógeno (N_2) (O`Hara y Daniel, 1985). Desde el punto de vista ecológico, este proceso presenta gran interés por diversas razones: a) es el mecanismo más importante de pérdida de los fertilizantes nitrogenados, lo que disminuye la eficacia de su empleo en los sistemas agrícolas; b) contribuye de forma sustancial al aporte de óxidos de nitrógeno a la atmósfera, con efectos perjudiales sobre el ambiente ya que el

óxido nítrico contribuye de forma significativa a la lluvia ácida; c) constituye una etapa muy importante en el ciclo del nitrógeno (Knowles, 1982).

Los primeros eventos que atribuyeron a Rhizobium la capacidad de desnitrificación consistieron en la observación de que dichas bacterias podían reducir el nitrato sin incorporar nitrógeno en la célula, con la consiguiente liberación de óxidos de nitrógeno y dinitrógeno (Rajagopalan, 1938; Ishizawa, 1939; Wilson, 1947).

El proceso de desnitrificación en Rhizobium tiene potencialmente dos funciones. Es un proceso capaz de producir energía, generándose ATP mediante la translocación de protones durante la reducción del nitrato a nitrito, facilitando de esta forma el crecimiento en anaerobiosis (Daniel y Appleby, 1972; Daniel et al., 1980), y posiblemente aumenta la capacidad de supervivencia de las bacterias bajo condiciones anaeróbicas. La desnitrificación también puede jugar un papel de detoxificación del nitrito (O'Hara y Daniel, 1985).

En los sistemas agrícolas donde es frecuente el cultivo de leguminosas, la colonización y persistencia de poblaciones efectivas de rizobios es esencial para asegurar una adecuada nodulación en las plantas. Alternativamente, existen otras situaciones en las cuales

resulta conveniente la selección y uso de razas de Rhizobium poco persistentes en el suelo, por ejemplo, en zonas agrícolas donde se cultivan más de un tipo de leguminosa y no todas ellas forman asociaciones efectivas con la bacteria introducida (Parker et al., 1977). En ambos casos es esencial conocer si la capacidad de desnitrificación contribuye a la supervivencia de los rizobios.

El principal factor limitante para el crecimiento bacteriano en el suelo, es la escasez de fuentes de energía disponible y se ha postulado que la mayoría de los microorganismos del suelo permanecen en estado latente con la capacidad respiratoria muy disminuida (Clark, 1967). El concepto de "latencia temporal" puede ser importante, ya que los organismos que poseen esta propiedad podrían afrontar mejor las condiciones de economía del suelo. Los rizobios de lento crecimiento son mejores colonizadores de suelos infértiles que los de crecimiento rápido (Chatel et al., 1968), lo cual puede ser atribuido a la capacidad de desnitrificación así como al crecimiento lento, metabolismo lento y capacidad para permanecer en estado latente (Daniel et al., 1982) y esta capacidad puede jugar un importante papel en la persistencia de estos rizobios en el suelo (Crozat et al., 1982).

Aunque se ha considerado que numéricamente los rizobios no son importantes desnitrificadores del suelo (Payne, 1981), es posible que debido a su amplia distribución, tanto en zonas agrícolas como vírgenes, contribuyan de forma significativa a las pérdidas de nitrógeno fijado. Recientemente, O`Hara et al. (1984), han sugerido que la desnitrificación rizobiana puede eliminar el nitrógeno fijado del suelo en una proporción similar a la contribución del nitrógeno del suelo debida a la fijación simbiótica. Este nuevo hallazgo supone graves consecuencias para la agricultura. Está claro que la desnitrificación rizobiana ocurre en los sistemas agrícolas y que puede llegar a ser tan importante como la fijación de nitrógeno (O`Hara y Daniel, 1985).

Los sistemas enzimáticos responsables de la desnitrificación están presentes en los bacteroides de los nódulos radicales, tanto en ausencia de nitrógeno combinado en el medio externo (O`Hara et al., 1983), como cuando está presente (Zablotowicz y Focht, 1979). En el nódulo el proceso de desnitrificación puede estar controlado por la velocidad de entrada del nitrato a su interior, y debido a su superficie pequeña, parece ser que dicho proceso no es muy significativo.

4. NUTRICION NITROGENADA DE LAS LEGUMINOSAS.

4.1. Aspectos bioquímicos.

Las leguminosas, asociadas simbióticamente con Rhizobium, pueden utilizar tanto el nitrógeno atmosférico como el nitrógeno inorgánico presente en la solución nutritiva del suelo, para su crecimiento y desarrollo, ya que poseen los sistemas enzimáticos necesarios para la utilización de ambas fuentes nitrogenadas.

La reducción del nitrógeno atmósferico a amonio está catalizada por un complejo enzimático denominado nitrogenasa, sintetizada y localizada en los bacteroides de los nódulos radicales. Está constituida por dos componentes: I o molibdoferroproteína y II o ferroproteína y su estructura varía poco entre los distintos organismos fijadores de nitrógeno. La fijación de nitrógeno y todas las otras reacciones que cataliza la nitrogenasa requieren de la presencia de los componentes I y II, de poder reductor, MgATP, protones y de ambiente anaerobio (Burgess, 1984). En la secuencia de eventos en la fijación de nitrógeno, la Fe-proteína es primero reducida, uniéndose luego al MgATP con el que forma el complejo Fe-proteína MgATP. Este complejo es capaz de reducir la MoFe-proteína que, por último, dona electrones al sustrato al que se ha unido, quedando en condiciones de ser reducida nuevamente (Dixon y Wheeler, 1983).

Además del dinitrógeno, la nitrogenasa también reduce otros sustratos, lo cual ha ayudado a dilucidar el mecanismo de acción del enzima. El más ampliamente conocido es el acetileno, lo que constituye la base de la técnica de reducción de acetileno para la determinación de la actividad nitrogenasa. Cuando el acetileno es usado como sustrato por el enzima, todos los electrones disponibles son utilizados para la reducción de acetileno a etileno, sin embargo, concomitante con la reducción de nitrógeno, hay siempre reducción de protones liberándose H_2. En condiciones naturales, se reduce un mínimo de dos protones por cada molécula de nitrógeno (Eisbrenner y Evans, 1983). Revisiones de este tema han sido realizadas recientemente por Appleby (1985), Burgess (1985), Jensen Burris (1986).

La reducción del nitrato a amonio ocurre en dos etapas, catalizadas por dos enzimas diferentes: nitrato reductasa y nitrito reductasa.

El complejo enzimático de la nitrato reductasa, que se encuentra en forma soluble en el citoplasma o asociado a la membrana del cloroplasto, lleva a cabo la reducción del nitrato a nitrito. Esto implica la transferencia a través del enzima de dos electrones, desde un donador específico NADH o NADPH, según los casos, hasta el sustrato. Se trata de una flavomolibdoproteína que

contiene un grupo hemo. Es un enzima inducible por el sustrato (Somers et al., 1983) y experimenta un gran "turnover" (Oaks, 1979).

El enzima puede ser dividido en tres subclases (Guerrero et al., 1981) según sea específico del NADH, presente en la mayoría de las plantas superiores, del NADH y/o NADPH indistintamente con la misma actividad, que es el que se encuentra en algas verdes y por último la nitrato reductasa específica del NADPH. Se ha demostrado la presencia simultánea de dos diferentes enzimas reductores, el dependiente del NADH y del NADPH, tanto en hojas de soja (Campell, 1976), como en plántulas de arroz (Shen et al., 1976).

La nitrito reductasa media la reducción de nitrito a amonio, mediante la transferencia de seis electrones. Es inducida por la adición de nitratos y nitritos. Ambas enzimas, a diferencia de la nitrogenasa que sólo se encuentra en organismos procarióticos, se localizan en las raíces, tallos y hojas de la mayoría de las plantas, incluyendo las leguminosas.

Tanto la asimilación de nitratos como la fijación de nitrógeno son fuertemente dependientes del cultivar de planta, la raza bacteriana, la ontogenia y de los factores ambientales, como por ejemplo la concentración de nitratos del suelo, disponibilidad de carbono

y agua y la temperatura (Becana y Sprent, 1987).

Mientras la asimilación del amonio, primer producto estable resultante de la fijación de nitrógeno, ocurre siempre en raíz, la del nitrato puede variar dependiendo de la especie de leguminosa y de la concentración de este ion en el medio (Andrews, 1986). Las leguminosas de origen templado (Pisum, Vicia, Trifolium, etc.), asimilan la mayoría del nitrato en la raíz y a medida que la concentración del mismo aumenta, su asimilación en la parte aérea incrementa de forma progresiva. En las leguminosas de origen tropical (Phaseolus, Glycine, Cajanus, Vigna) la mayor parte del nitrato incorporado es asimilado en la parte aérea y la relación entre el nitrato asimilado en la parte aérea y en la raíz permanece constante al aumentar la concentración de nitrato en el medio (Andrews, 1986). Recientemente, los trabajos de Andrews et al. (1984) han puesto de manifiesto que el tallo puede contribuir de forma sustancial a la reducción de nitratos en la planta. Una alta proporción de la actividad nitrato reductasa total de la planta está localizada en el tallo, en un gran número de leguminosas grano, tanto de origen tropical como de origen templado.

Aunque la asimilación de nitrato ocurre fundamentalmente en las hojas, tallo y raíces (Andrews, 1986), parte del nitrato puede ser reducido en los nódulos. La

contribución de la asimilación de nitrato a nivel de los nódulos se ha estimado entre 1.5% y el 3% del total de la fracción de nitrógeno reducido en plantas de alfalfa (Vance y Heichel, 1981). Se ha sugerido además, que la asimilación de nitratos por los nódulos puede ser importante en plantas de soja durante la última fase del periodo reproductivo (Randall et al., 1978), cuando la actividad nitrato reductasa foliar ha decaído (Thibodeau y Jaworski, 1975).

4.2. Efecto del nitrógeno combinado en la simbiosis Rhizobium-leguminosa.

El nitrato es la forma predominante de nitrógeno inorgánico capaz de ser asimilado por las plantas cultivadas que crecen en condiciones normales de campo. En suelos agrícolamente fértiles, la cantidad de nitrato puede alcanzar la concentración de 20 mM (280 ppm) (Russell, 1973). Aunque los fertilizantes amoniacales son también muy usados, el amoníaco es oxidado a nitrato por los microorganismos del suelo. Además, la acumulación de amonio en el interior de la planta es perjudicial para la misma, ya que estos compuestos desacoplan los sistemas transportadores de electrones, promueven la oxidación de los nucleótidos de piridina e inhiben ciertos enzimas. En contraste, el nitrato es relativamente inocuo, su asimilación está regulada por la oxidación de carbohidratos

asociada con la producción de ácidos orgánicos y puede acumularse hasta elevadas concentraciones sin detrimento para la planta (Beevers y Hageman, 1983).

Cuando se suministran elevados niveles de nitrógeno combinado a las leguminosas, la infección de las raíces por Rhizobium, medida como número de nódulos por planta, el crecimiento de los nódulos y la fijación de nitrógeno pueden ser inhibidos. Sin embargo, pequeños niveles pueden inhibir, estimular o no presentar efecto alguno en este proceso. Este tema ya fue estudiado en 1940 por Wilson y desde entonces se ha profundizado para conocer el mecanismo metabólico del efecto de los nitratos sobre la simbiosis Rhizobium-leguminosa.

El nitrato puede actuar en distintas etapas del proceso de nodulación: a)disminuyendo la síntesis de lectinas y como consecuencia bloquea el proceso de reconocimiento y adhesión de la bacteria a los pelos radicales (Dazzo y Brill, 1978); b) interfiriendo en el proceso de infección impidiendo el "curling" del pelo radical y la formación del filamento de infección (Munns, 1968); c) actuando sobre la liberación de las bacterias desde el filamento de infección hasta el citoplasma de la célula huésped y sobre la conversión de la forma vegetativa de la bacteria en bacteroide (Truchet y Dazzo, 1982); d) inhibiendo la actividad nitrogenasa en el nódulo (Wong, 1977;

Houwaard, 1980); e) disminuyendo los niveles de leghemoglobina (Chen y Phillips, 1977); g) afectando la descarga de aminoácidos, aminas y ureidos en el xilema (Streeter, 1985).

El nitrógeno combinado del suelo puede considerarse como el factor limitante del ambiente más importante de la fijación de nitrógeno (Sprent, 1986). Aunque las razones por las que este fenómeno ocurre no se conocen todavía con exactitud, es posible que, en términos generales, sea debido a que la fijación de nitrógeno requiere más energía que la asimilación de nitrato (Sprent y Raven, 1985). Además del alto consumo energético que supone la fijación de nitrógeno, existe un consumo adicional derivado de la formación y mantenimiento del tejido nodular. Sin embargo, en la asimilación de nitrógeno combinado, se ha cuestionado si existen o no cambios morfológicos asociados con este proceso (Sprent, 1984). Existen algunas evidencias que sugieren que el nitrato estimula la formación de raíces laterales, lo cual podría aumentar el área de absorción del ion. Por otra parte, plantas noduladas de trébol presentan una relación raíz/parte aérea mayor que plantas que crecen en medio con nitrato (Ryle et al., 1981).

Se han formulado varias hipótesis con objeto de explicar el efecto negativo del nitrato sobre la actividad

nitrogenasa. Una ha sido denominada hipótesis de la privación de fotosintato, que atribuye la disminución de la actividad fijadora de nitrógeno a una disminución en el suministro de fotosintato a los nódulos, como consecuencia de la reducción de nitratos en hojas, tallos y raíces (Small y Leonard, 1969; Oghoghorie y Pate, 1971).

Una segunda hipótesis implica un efecto más directo de los nitratos, atribuyéndose la inhibición a los nitritos formados en el bacteroide por la nitrato reductasa (Gibson, 1976). El nitrato por sí mismo no afecta a la actividad nitrogenasa, pero el nitrito inhibe tal actividad en suspensiones de bacteroides de B. japonicum (Rigaud et al., 1973; Pagan et al., 1977; Trinchant y Rigaud, 1980) y en preparaciones de nitrogenasa purificada (Kennedy et al., 1975). Trinchant y Rigaud (1981) han indicado que este efecto se ejerce disminuyendo la capacidad respiratoria de los bacteroides. Además, los nitratos pueden formar compuestos nítricos con la leghemoglobina (Virtanen, 1950) y así evita la unión de la leghemoglobina con el oxígeno, lo cual interfiere con el proceso de fijación de nitrógeno.

El nitrito es un potente inhibidor de la nitrogenasa in vitro (Trinchant y Rigaud, 1980). Los nitritos se acumulan en nódulos de cowpea, altramuz (Manhart y Wong, 1980) y soja (Stephens y Neyra, 1983)

cuando los nódulos se forman con razas que expresan actividad nitrato reductasa. Sin embargo, cuando los nódulos proceden de razas de Rhizobium deficientes en esta actividad, no se encontraron nitritos y la actividad reductora de acetileno en estos nódulos todavía fue inhibida, probablemente por los nitratos (Manhart y Wong, 1980; Stephens y Neyra, 1983).

Finalmente, otra hipótesis indica que la presencia de nitrato aumenta la resistencia a la difusión de oxígeno hacia los bacteroides, disminuyéndose de esta forma la energía necesaria para llevarse a cabo el proceso de fijación (Pankhurst y Sprent, 1975; Ralston e Imsade, 1982).

Utilizando un sistema de flujo continuo que permite la medida simultánea de la actividad nitrogenasa y del consumo de oxígeno, se ha podido demostrar en Trifolium repens en presencia de 20 mM de nitrato que la disminución de la actividad nitrogenasa fue acompañada de un incremento en la resistencia a la difusión de oxígeno hacia el interior del nódulo (Minchin et al., 1986). Además, el incremento en la presión parcial de oxígeno puede eliminar la inhibición de la nitrogenasa por el nitrato (Witty et al., 1984; Carrol et al., 1986). Incrementos similares en la resistencia a la difusión de oxígeno se observaron cuando los nódulos se exponen a la

presencia de acetileno o las plantas se someten a condiciones de oscuridad que pueden causar una disminución en el suministro de fotosintato (Witty et al., 1984; Minchin et al., 1985; 1986). Estos requerimientos han conducido al concepto de que los nódulos pueden controlar y ajustar la difusión de oxígeno en respuesta a las variaciones en las condiciones ambientales. Por el momento se desconoce la ubicación física de la barrera a la difusión de oxígeno, aunque se ha indicado que podría estar formada por conductos de longitud variable llenos de agua (Tjepkema, 1984; Sheehy et al., 1985).

Un estudio sobre la distribución de nitrato y actividad nitrato reductasa en nódulo de soja, cowpea y haba, ha demostrado que el nitrato no tiene acceso a la región infectada de los nódulos, quedando su localización restringida a los tejidos corticales de los mismos (Sprent et al., 1987). En soja se ha indicado que los bacteroides aislados de nódulos de plantas crecidas en presencia y en ausencia de nitrato presentan valores similares de actividad nitrato reductasa (Giannakis et al., 1988). Estos autores han obtenido evidencias experimentales que sugieren que se puede inducir la actividad nitrato reductasa en bacteroides de B. japonicum cultivados en un medio con nitrato (Giannakis et al., 1988). Considerando en conjunto estos resultados se puede argumentar que el efecto inhibidor del nitrato sobre la actividad nitroge-

nasa se ejerce a nivel del córtex de los nódulos, probablemente donde podría localizarse la hipotética barrera de difusión al oxígeno, y que se debe a un incremento en la resistencia a la difusión de este elemento hacia la zona donde se encuentran los bacteroides.

Si bien, elevadas concentraciones de nitrógeno combinado pueden afectar negativamente la fijación biológica de nitrógeno, en repetidas ocasiones se han descrito efectos positivos obtenidos con pequeñas dosis de nitrógeno combinado. Aunque la capacidad de las leguminosas para formar simbiosis efectivas con bacterias de los géneros Rhizobium y Bradyrhizobium reducen sus requerimientos por el nitrógeno del suelo, el máximo desarrollo y rendimiento de las mismas no puede alcanzarse en ausencia de nitrógeno combinado (Hageman, 1979). De hecho, se ha demostrado tanto en soja (Thibodeau y Jaworski, 1975), como en judía (Franco et al., 1979) y en guisante (DeJong et al., 1982) que estas plantas pueden beneficiarse del efecto complementario de los procesos de fijación de nitrógeno y reducción de nitrato. Tras la germinación de las semillas, transcurridos unos pocos días, las plántulas pueden absorber el nitrógeno combinado del medio, sin embargo, la formación de nódulos efectivos requiere varias semanas. Esto es de especial importancia en los casos en que la cantidad de proteína almacenada en la semilla es pequeña (Beusichem y Langelaan, 1984). Así, en las plantas

que solamente dependen de la fijación de nitrógeno como fuente nitrogenada, generalmente la productividad de los cultivos es menor que en las plantas crecidas en medio con nitratos. La aplicación de pequeñas cantidades de nitrógeno combinado artes del establecimiento de nódulos efectivos, puede ser beneficiosa para el crecimiento de los cultivos puesto que supliría la deficiencia de nitrógeno en los primeros estadíos de crecimiento (Beusichem, 1982; Sprent et al., 1983).

Los efectos del nitrógeno combinado sobre la fijación simbiótica de nitrógeno depende de diversos factores entre los que se incluyen el cultivar de planta huésped y raza Rhizobium utilizados, la etapa de desarrollo en la que es aplicado el fertilizante nitrogenado, la forma y nivel de nitrógeno suministrado, la temperatura, humedad y tipo de suelo y si la leguminosa es cultivada en monocultivo o en asociación con plantas no leguminosas (Abdel-Ghaffar, 1988). En general, al estudiar el efecto de los fertilizantes nitrogenados en la fijación de nitrógeno, se le ha prestado poca atención al nitrógeno disponible presente en el suelo, sin embargo, dicho nitrógeno puede influenciar el efecto global obtenido. Esto puede explicar los resultados tan contradictorios que se han obtenido al estudiar el efecto del nitrógeno combinado sobre la nodulación y fijación de nitrógeno en condiciones de campo (Abdel-Ghaffar, 1988).

En suelos que presentan un bajo nivel de nitrato o bien cuando las plantas crecen en solución nutritiva, el crecimiento de leguminosas grano puede estar limitado por la deficiencia de nitrógeno, especialmente en las primeras etapas de desarrollo. En este caso, el aporte de bajos niveles de nitrógeno combinado podría mejorar la producción y fijación de nitrógeno, como observó Jessop et al. (1984) y Rawstorne et al. (1985).

La deficiencia de nitrógeno en las etapas iniciales de desarrollo de la planta, durante la iniciación de la nodulación, pueden provocar una grave depresión en el crecimiento de las plantas que no puede ser recuperada cuando el nitrógeno fijado simbióticamente es disponible para la planta. La adición de pequeñas cantidades de nitrógeno combinado durante la siembra o bien durante las etapas iniciales del crecimiento, previene la deficiencia de nitrogéno. De esta forma, la nodulación puede ser retardada, pero a largo plazo se obtienen beneficios de la adición de nitrógeno mineral debido a que se desarrolla mejor el sistema radical, proporcionando mayor superficie para la formación de nódulos (Abdel-Ghaffar, 1988).

Por otra parte, también se ha observado que en las leguminosas grano, la adición de fertilizante nitrogenado durante la floración puede mejorar notablemente el

rendimiento de la cosecha (Olivares et al., 1982). En experimentos de soja sin inocular, Streeter (1978) observó que una falta de nitrógeno durante la formación de la semilla no afectó al número de vainas y semillas por planta, sólo al peso seco de semilla y a su contenido en nitrógeno, mientras que una falta de nitrógeno en floración o durante la formación de la vaina, provoca una reducción en el número de semillas, peso seco de semilla y contenido en nitrógeno de semillas y órganos vegetativos. Durante la formación y llenado de la vaina, ésta se convierte en un sumidero muy activo hacia el cual se desvía la casi totalidad de los fotoasimilados procedentes de las hojas. Como resultado, dejan de llegar carbohidratos a la raíz y a sus nódulos cesando rápidamente la fijación de nitrógeno, al tiempo que empieza la senescencia de los mismos. También se detiene el crecimiento de la planta. Por eso, la aplicación de nitrógeno en floración y fructificación permite a la planta continuar creciendo y mantener una adecuada tasa de asimilación.

Según Vasilas et al. (1980), en leguminosas grano, el momento más adecuado para la aplicación del nitrógeno es durante la implantación del fruto. Mientras que en leguminosas forrajeras, el nitrógeno se debe aplicar al inicio, cuando la planta no posee aún nódulos, con objeto de provocar un mejor establecimiento de la

planta.

4.3. Integración entre el metabolismo del nitrógeno y del carbono en la planta.

El metabolismo del nitrógeno y el carbono están íntimamente ligados. Tanto la fijación simbiótica del nitrógeno atmosférico como la asimilación de nitrógeno combinado, están estrechamente relacionadas con la fotosíntesis ya que ésta constituye la fuente de energía (ATP), poder reductor y esqueletos carbonados necesarios para la asimilación de nitrógeno por la planta (Deroche, 1983).

En las leguminosas, el sistema radical y los nódulos representan un fuerte sumidero de fotoasimilados para la planta, habiéndose estimado que aproximadamente el 15-30% o más del fotosintato neto es desviado hacia el sistema radical, vía floema, donde es usado como fuente de energía y esqueletos carbonados para: a) crecimiento y mantenimiento de los tejidos nodulares; b) suministro de la energía necesaria para la reducción de nitrógeno en el endofito y la asimilación del amonio producido en el citosol, y c) síntesis de compuestos orgánicos nitrogenados que son exportados desde el nódulo al sistema radical, vía xilema (Schubert, 1986).

Se han realizado una serie de ensayos con objeto

de relacionar la fotosíntesis y la fijación de nitrógeno. De esta forma, incrementando la intensidad de la luz (Bethlenfalvay y Phillips, 1978), la concentración de dióxido de carbono alrededor de los ápices (Hardy y Havelka, 1975) o el áera foliar (Streeter, 1974), la fijación de nitrógeno y el peso seco de los nódulos aumentó. Por otra parte, disminuyendo la fotosíntesis a través de la defoliación o sombreado (Bethlenfalvay y Phillips, 1978) o por la aplicación de inhibidores (Bethlenfalvay et al., 1979) se producen bajos niveles en las tasas de reducción de acetileno. Resultados análogos han encontrado Bedmar y Olivares (1980), quienes, utilizando inhibidores químicos de la fotorrespiración, que reducen las pérdidas energéticas de este proceso, han observado aumentos en la fijación simbiótica de nitrógeno.

Bruscas reducciones en fotosintato producidas por defoliación o por eliminación de fuente luminosa pueden inducir la senescencia prematura de los nódulos (Sutton, 1983). Esta situación en la naturaleza se produce en el periodo en el que la planta llega a la floración y comienza la fructificación. En este momento el fotosintato es desviado al llenado del fruto, por lo que comienza la senescencia del nódulo como consecuencia de la falta de sustrato carbonado, cesando la fijación de nitrógeno e iniciándose su degeneración.

La interacción entre la asimilación de nitratos y el metabolismo carbonado coexiste en varios aspectos fisiológicos. La absorción y reducción de nitratos y por tanto la producción de aminoácidos, se relaciona con el metabolismo del carbono vía malato (Champigny y Talouizte, 1985). La compartimentación del nitrato en la vacuola está influenciada por el "stress" de carbohidratos. En contraste, la fotosíntesis (Fritsch y Jung, 1984), la glucolisis (Aslam et al., 1979), el flujo de carbono y transporte de la raíz al tallo (Lambers et al., 1981) están condicionados por el nitrato.

En plantas superiores, el nitrato está presente en al menos dos compartimentos: uno metabólico, probablemente el citoplasma, y otro de almacenamiento, la vacuola (Aslam et al., 1979). Los carbohidratos pueden modificar ambos compartimentos; de hecho, la adición de glucosa aumenta el "pool" metabólico de nitratos (Aslam y Oaks, 1975). Incluso bajo ciertas condiciones, el nitrato vacuolar puede ser reemplazado por azúcares (Lambers et al., 1981).

La glucosa tiene diversos efectos en el metabolismo de la raíz y uno de ellos es una profunda influencia en el metabolismo de los nitratos. Saglio y Pradet (1980) observaron que cuando decae el nivel de azúcares solubles, también decae el proceso de

respiración. Cuando se restaura el nivel de glucosa, se restaura la respiración y la sensibilidad a los inhibidores, lo que indicaría que la glucosa es un factor limitante para el sistema de transporte de electrones en la mitocondria. Esto está apoyado por las investigaciones de Lambers (1982), que estudia la vía resistente al cianuro o vía sensible al SHAM (ácido salicil hidroxámico) en raíces. Las raíces que fijan nitrógeno atmosférico tienen un bajo nivel de SHAM, mientras que las que crecen con amonio como fuente de nitrógeno, tienen una alta actividad del flujo de electrones resistentes al cianuro (vía SHAM), mayor que cuando crecen con nitrógeno en forma de nitrato (Lambers et al., 1980). Ellos postulan que la vía SHAM es un mecanismo que permite el flujo de electrones y el consumo de glucosa en sistemas donde hay poca demanda de ATP. Sin embargo, la glucosa parece tener efectos más específicos a nivel de los "pools" de nitrato, favoreciendo que el nitrato sea más accesible para la inducción de nitrato reductasa y su actividad.

La reducción de nitratos es más sensible a los niveles de azúcares solubles que su absorción (Aslam y Huffaker, 1984) o transporte a larga distancia (Deane-Drummon et al., 1980). Se puede considerar que la inducción de la nitrato reductasa por los azúcares es algo específica y no un fenómeno general. La inducción de otros enzimas, como la glutamato deshidrogenasa o la asparragina

sintetasa, es inhibida por la adición de glucosa (Oaks, 1983).

La asimilación de CO_2 está relacionada con la cantidad de nitrógeno total en hoja (Evans, 1983). Los nutrientes pueden limitar la fotosíntesis y la utilización de asimilados (Fritsch y Jung, 1984). El reparto de los fotoasimilados entre la asimilación de carbono y nitrógeno parece estar bien regulada. El amonio exógeno incrementa el flujo del carbono en el ciclo de ácidos tricarboxílicos, debido a la estimulación de la piruvato kinasa (Paltt y Bassham, 1978) y de la fosfoenol piruvato carboxilasa, que favorecen el flujo de cetoglutarato del ciclo de Krebs a la glutamina (Paul et al., 1978). El amonio endógeno de la fotorrespiración produce unos efectos semejantes, por lo que Lawyer et al. (1981) concluyen que la adición exógena de amonio durante la fotosíntesis permite llevar a cabo una regulación normal.

Aslam y Huffaker (1984) examinaron la relación entre los niveles de carbohidratos endógenos y la capacidad de la hoja de reducir nitratos. Determinaron que cuando el nivel de carbohidratos es elevado por acción de la luz o la adición de glucosa al medio, la nitrato reductasa y la reducción de nitratos es también relativamente alta. Algo similar ocurre en el tejido radical (Talouise et al., 1984). Cuando el tallo se

elimina, hay una pérdida rápida de carbohidratos solubles en la raíz y la correspondiente reducción en la capacidad de la raíz de reducir el nitrógeno exógeno.

5. PRODUCCION Y CONTROL DE CALIDAD DE INOCULANTES.

En determinados hábitats, el establecimiento de leguminosas noduladas de forma efectiva requiere la adición de rizobios específicos y efectivos mediante un proceso conocido como inoculación de leguminosas. Para establecer efectivamente la nodulación de una leguminosa, el inoculante debe tener una elevada población de células viables de Rhizobium. Los inoculantes de alta calidad son esenciales, en suelos carentes de rizobios específicos para una leguminosa huésped, así como en suelos que tienen una población indígena poco efectiva. En el primer caso, se requiere una elevada población para alcanzar una nodulación satisfactoria, y en el segundo, se requieren poblaciones mayores para poder competir con los rizobios indígenas del suelo (Smith, 1987).

La producción de inoculantes de alta calidad implica la selección de razas efectivas en la fijación de nitrógeno, así como la selección y preparación de soportes óptimos para su elaboración, producción de cultivos, mezclado de inoculante, maduración y empaquetamiento. Así mismo, se requieren controles de calidad para garantizar la producción de inoculantes de alta calidad.

5.1. Aislamiento y selección de razas de Rhizobium.

Como apuntaba Dye (1979), el conocimiento de las bacterias de la familia Rhizobiaceae y la asociación simbiótica de Rhizobium con las leguminosas, ha dependido de la disponibilidad de colecciones de razas bien caracterizadas. La importancia biotecnológica de las colecciones de cultivos sólo puede ser explotada si se dispone de la información necesaria acerca de sus características y son fácilmente accesibles (Keyser, 1987) Desafortunadamente, con frecuencia resulta difícil hallar dicha información. Los criterios sugeridos para la adquisición de colecciones de razas seleccionadas son muy diversos, entre los que se incluyen razas autóctonas (Jones et al., 1978); razas con características importantes para la agricultura (Jones et al., 1978); razas con propiedades poco usuales, como resistencia a pH ácido (Date y Halliday, 1979); razas para especies de plantas huésped poco frecuentes (Trinick, 1973; Dreyfus y Dommergues, 1981); especies raras (Keyser et al., 1982; Dowdle y Bohlool, 1985); razas tipo (Jordan, 1984); razas que infectan a diferentes especies de planta huésped (Keyser y Cregan, 1984).

Cuando se introduce por primera vez una especie de leguminosa, puede ocurrir que ésta no sea nodulada por las razas de Rhizobium nativas del suelo o bien por las

razas utilizadas en los inoculantes. Estos problemas podrían ser solventados utilizando en el inoculante razas de Rhizobium genéticamente y geográficamente adaptadas con la planta huésped (Date y Halliday, 1987). Existen dos vías principales para la obtención de nuevas razas de Rhizobium: a) razas aisladas a partir de nódulos obtenidos en la región de procedencia de la leguminosa, y b) colecciones de Rhizobium.

En diversas publicaciones (Vincent, 1977; Norris y Date, 1976; Brockwell, 1980; Brockwell et al., 1988; Thompson, 1988) se han descrito exhaustivamente los criterios y metodología para condiciones ambientales controladas, invernadero y condiciones de campo, que deben considerarse en un programa de selección de razas de Rhizobium. El éxito del método con frecuencia depende de la escala de operaciones. La selección previa de razas en experimentos bajo condiciones ambientales controladas, facilita el ensayo final de campo, ya que puede reducirse considerablemente el número de razas ensayadas.

Los criterios utilizados para la evaluación de razas puede variar de acuerdo con el programa específico de selección. Entre los criterios utilizados se pueden citar (Date y Halliday, 1987):

1.-Efectividad en la fijación de nitrógeno.

2.-Competitividad o capacidad para formar

nódulos en una planta huésped en presencia de otros rizobios; capacidad para colonizar la rizosfera y sobrevivir en el suelo.

3.-Características especiales, por ejemplo, capacidad para nodular un leguminosa específica en suelos ácidos, tolerancia a fungicidas aplicados a las semillas, capacidad para fijar nitrógeno a altas (>30°C) o bajas (<10°C) temperaturas del suelo y capacidad para fijar nitrógeno en presencia de altos niveles de nitrógeno combinado en el suelo.

4.-Características relacionadas con la producción de inoculantes: supervivencia en la semilla, en turba, etc.

5.2. Preparación de inoculantes.

En 1895 Nobbe y Hiltner (Fred et al., 1932) patentaron en Inglaterra y Estados Unidos la comercialización de cultivos puros de Rhizobium, bajo el nombre de "Nitragin". Los primeros inoculantes comerciales consistían en un cultivo puro de la estirpe de Rhizobium deseada, crecida en frascos de vidrio sobre un soporte sólido a base de sacarosa, asparigina, gelatina y un extracto acuoso de la leguminosa para la cual iba destinado el cultivo.

En la actualidad, la mayoría de las empresas productoras de inoculantes ponen a la venta inoculantes a

base de una sola estirpe bacteriana. No obstante, Nitragín Co. comercializa en Estados Unidos un inoculante con estirpes de R. meliloti y R. leguminosarum biovar. trifolii y otro producto comercial destinado a varias leguminosas pertenecientes al grupo de inoculación de R. leguminosarum.

Actualmente, los inoculantes para leguminosas se emplean con dos objetivos. En primer lugar, la inoculación es requerida para el establecimiento de cultivos de leguminosas en nuevos hábitats donde no existen poblaciones de rizobios específicos. En estos casos, el incremento en los rendimientos del cultivo es muy importante si se logra una buena nodulación y el contenido de nitrógeno del suelo es bajo. Hickey et al. (1974) obtuvieron incrementos del 92% en comparación con los controles sin inocular, en la producción de cacahuete (Arachis hypogea L.) cuando se inoculó el Rhizobium específico en suelos donde nunca se había cultivado esta leguminosa. Otros estudios con soja (Okon et al., 1979) y cacahuete (Reddy y Tanner, 1980) confirman la necesidad de inocular cuando no existe en el suelo el microsimbionte específico.

Un segundo objetivo de la inoculación es desplazar una población de rizobios inefectiva por otra de mayor eficiencia simbiótica. En este caso, el éxito de la inoculación depende de un conocimiento previo de las

características de la población natural, en términos de competitividad, efectividad y tamaño (Robert y Schmidt, 1983). Por ejemplo, en un estudio sobre nodulación en soja fue necesario emplear una dosis de inoculación 1000 veces superior al tamaño de la población indígena para conseguir el establecimiento del inóculo (Weaber y Frederick, 1974). Sin embargo, Meade et al. (1985) trabajando con R. leguminosarum no lograron introducir la estirpe deseada en un suelo que contenía aproximadamente 3 x 10^4 rizobios por gramo de suelo, e incluso empleando dosis de 1 x 10^8 bacterias por semilla, sólo se logró un 33% de ocupación de los nódulos. Los rizobios del suelo, aún siendo poco efectivos, pueden ser altamente competitivos en la formación de nódulos, precisamente por estar mejor adaptados a las condiciones ambientales y edáficas locales (Dowling y Broughton, 1986).

En otras circunstancias, la efectividad simbiótica de la población natural puede ser muy variable y la inoculación de las semillas puede contribuir a estabilizar las tasas de fijación de nitrógeno e incrementar los rendimientos del cultivo. No obstante, existen numerosos informes que señalan la ausencia de una respuesta significativa a la inoculación con estirpes mejoradas de Rhizobium (Dunigan et al., 1980). Para afrontar estas situaciones se realizan estudios de competitividad durante el proceso de selección de estirpes

y se diseñan distintas estrategias de inoculación y manejo de suelos (Brockwell, 1981).

5.2.1. Medios de cultivo.

Los medios de cultivo utilizados para la preparación de inoculantes, deben cubrir todos los requerimientos nutricionales de Rhizobium, y los nutrientes deben ser suministrados de forma fácilmente disponible para una rápida multiplicación celular (Smith, 1987).

A pesar de la gran variabilidad en las necesidades nutricionales y requerimientos energéticos de las estirpes de Rhizobium (Elkan, 1984), en general, para la multiplicación industrial se emplea un medio base de sales minerales, extracto de levadura y una fuente de carbono. La mayoría de las bacterias de crecimiento rápido pueden utilizar disacáridos como sustratos, siendo la sacarosa la fuente de carbono más habitual, mientras que los de crecimiento lento, no crecen bien con estos sustratos. El manitol es la fuente de carbono y energía tradicionalmente empleada, y puede ser utilizada por todos los rizobios, aunque algunos de crecimiento lento prefieren una pentosa, por ejemplo la arabinosa. Se ha descrito (Arias y Martínez-Drets, 1976) que el glicerol puede ser utilizado por Bradyrhizobium japonicum, constituyendo una fuente de carbono barata y adecuada para la producción de inoculantes a gran escala. Asimismo, se ha

sugerido que el extracto de malta y las melazas (Smith, 1987) también pueden ser empleadas como fuente de carbono de forma eficiente y barata para la producción industrial. No obstante, la sacarosa y el manitol constituyen las fuentes de carbono más utilizadas a escala industrial. El mayor crecimiento que pueda obtenerse utilizando una fuente de C específica para cada especie, no compensa los costes económicos a nivel industrial (Rodríguez Navarro, 1986).

El extracto de levadura es casi universalmente utilizado como fuente de nitrógeno orgánico y factores de crecimiento. La concentración de extracto de levadura debe ser baja ya que concentraciones superiores al 0.35% pueden provocar deformaciones celulares (Skinner et al., 1977), reducir el número de células y pérdida de la efectividad simbiótica (Date y Halliday, 1987). Un adecuado suministro de extracto de levadura es necesario para el aporte de factores de crecimiento tales como biotina, piridoxina, riboflavina y tiamina.

Además de las sales inorgánicas suministradas por el extracto de levadura, la mayoría de los medios de cultivo para Rhizobium incluyen tampón fosfato, sulfato de magnesio, cloruro sódico y compuestos de calcio.

5.2.2. Soportes para inoculantes.

Uno de los problemas para la elaboración de inoculantes, es la escasa disponibilidad de materiales aptos para ser usados como soportes para rizobios (Mora de González et al., 1986). En determinadas circunstancias, se emplean inoculantes líquidos consistentes en suspensiones acuosas de inoculantes a base de turba o cultivos líquidos de Rhizobium (Brockwell et al., 1980). También se han preparado, con buenos resultados, inoculantes a base de suspensiones oleosas de cultivos liofilizados (Kremer y Peterson, 1982a; 1983). Sin embargo, el método más generalizado de preparar inoculantes para leguminosas consiste en la adsorción de cultivos líquidos de Rhizobium sobre soportes sólidos de naturaleza orgánica o inorgánica. Dado que estas bacterias no presentan formas de resistencia, el empleo de un soporte garantiza una mejor supervivencia del inóculo hasta el momento de su aplicación. Por otra parte, el soporte constituye la mayor fracción del inoculante facilitando de esta forma el empaquetamiento y uso final del producto. El soporte puede absorber y retener humedad, que es esencial para la supervivencia de los rizobios y proporciona una superficie para el crecimiento de las bacterias.

Entre las características que debe reunir un soporte adecuado, se pueden citar: alta capacidad de

retención de agua, fácil esterilización, uniformidad química y física, no tóxico, biodegradable y no contaminante, que tenga un pH próximo a la neutralidad o fácilmente neutralizable, que permita el crecimiento de los rizobios y su rápida liberación en el suelo, de fácil manejo en las operaciones de mezcla, curación y empaquetamiento, utilizable para todos los rizobios, bajo costo etc. (Smith, 1987).

El material más recomendado y utilizado como soporte ha sido la turba, sin embargo, en muchos países, especialmente en los trópicos, no se dispone de turberas adecuadas y además no todas ellas brindan turbas de buena calidad (Mora de González et al, 1986). Por esta razón, se hace necesario buscar otros materiales que puedan servir como soportes para inoculantes. Muchos son los materiales sólidos que se han evaluado como posibles soportes, pudiendo ser agrupados en distintas categorías: a) turba y carbón mineral con y sin aditivos (Crawford y Berryhill, 1983) y suelos inorgánicos; b) restos de cosecha y otros tipos de material vegetal tales como el bagazo de caña, subproducto de la industria azucarera (Munevar y Graham, 1977), cascarilla de arroz, algodón y ajonjoli (Mora de González et al, 1986), estiércol de plantas, restos de cereales, estiércol de granja, harina de soja, fibra de coco y celulosa (Tilak y Subba Rao, 1978; Sparrow y Ham, 1983); y c) materiales inertes tales como vermiculita

(Sparrow y Ham, 1983), perlita, fosfato, sulfato de calcio y gel de poliacrilamida (Dommergues et al., 1979).

Algunos de estos soportes resultan difíciles de manejar ya que requieren un proceso previo de adecuación, y la falta de homogeneidad fisicoquímica de muchos de ellos puede dar lugar a inoculantes de dudosa calidad. Unicamente en aquellos países donde no se pueda disponer de turba de buena calidad, se justifica el empleo de materiales alternativos (Strijdom, 1981). No obstante, los inoculantes a base de suspensiones oleosas de cultivos liofilizados han dado, en ocasiones, mejores resultados que los inoculantes a base de turba (Kremer y Peterson, 1983), no sólo en cuanto al porcentaje de ocupación de los nódulos, sino en términos de rendimiento de cosecha y supervivencia a altas temperaturas. Dommergues et al. (1979) demostraron que los inoculantes a base de geles de poliacrilamida permiten una mayor supervivencia de estirpes de B. japonicum a 4°C y 30°C que los correspondientes a base de turba.

5.2.3. Inoculantes a base de turba.

Resulta difícil establecer la idoneidad de una turba como soporte para la fabricación de inoculantes, puesto que se trata de un sustrato orgánico de naturaleza compleja, que puede afectar a la multiplicación de Rhizobium y a su viabilidad. El único modo de selección de

una turba consiste en realizar ensayos previos con las estirpes que se van a emplear, siguiendo la evolución de la población microbiana bajo distintas condiciones de esterilidad y almacenamiento, durante el tiempo que se estime que pueda estar en vigor el uso del producto.

Cuando se extrae de las turberas, la turba presenta un alto contenido de agua (70-90%). La primera manipulación consiste en desecarla. En ocasiones, también es necesario eliminar restos vegetales groseros o disgregar grumos. La temperatura de desecación no debe exceder los 90°C, ya que se puede producir una degradación de la turba con liberación de sustancias tóxicas que podrían afectar el crecimiento y supervivencia de Rhizobium.

La mayoría de los depósitos de turba son de naturaleza ácida, por lo cual es necesario hacer una neutralización. El carbonato cálcico es el agente neutralizante más apropiado y se añade en proporción variable según la acidez de la turba, hasta obtener un pH de 6.5-7.0. Otros productos como el NH_4OH, CO_3K_2 y CO_3Na_2 limitan el crecimiento y la posterior supervivencia de Rhizobium. El neutralizante se adiciona normalmente a la turba antes de molerla hasta un tamaño de partícula inferior a 80 nm (200 mesh).

Un problema adicional que pueden presentar

algunas turbas es un alto contenido en ClNa, que puede provocar pérdidas de viabilidad de los rizobios. La cantidad de sal puede variar de un año a otro y a lo largo del año, dependiendo del régimen de lluvias. En otros casos, el lavado de la turba con agua de bajo contenido en sales, puede reducir el contenido de cloruro sódico a niveles satisfactorios.

Los inoculantes obtenidos con turbas previamente esterilizadas garantizan una mayor población de rizobios ya que Rhizobium sobrevive más satisfactoriamente en turba estéril que no estéril. No obstante, el uso de soportes esterilizados también presenta una serie de desventajas entre las que se puede citar el mayor costo en la producción, disponer de unidades de esterilización de capacidad suficiente para cubrir las necesidades, condiciones asépticas durante la manipulación y mezcla con el caldo de cultivo etc. Estos problemas pueden ser solventados para la producción a pequeña escala, sin embargo, en la industria incrementan considerablemente el coste (Somasegaran y Halliday, 1982).

Los inoculantes a base de turba estéril generalmente se almacenan durante un periodo de 4-5 semanas después de la inoculación a 20°-27°C, para permitir un aumento de la población de rizobios (maduración o curación del inoculante) (Burton, 1976;

1981). Según Burton (1976), este proceso permite la adaptación de Rhizobium al soporte.

Se han empleado diversos métodos para la esterilización de soportes para inoculantes. La elección del método depende del tipo de envase que se emplee para distribuir el inoculante, del número de cultivos que se preparen y de la tecnología disponible.

Cuando las condiciones lo permiten, la esterilización con radiaciones gamma (5-7 mrad) es el mejor método de esterilizar, más apropiado que el autoclavado, obteniéndose un producto final de mayor calidad y uniformidad (Strijdom y Van Rensburg, 1981). El nivel de radiación empleado no asegura una esterilidad total, pero el número de contaminantes que sobreviven es muy bajo frente a elevadas concentraciones de Rhizobium (superiores a 10^9 células por gramo) después de 12 meses.

La utilización del óxido de etileno o bromuro de metilo (Deschodt y Strijdom, 1975) como agentes esterilizantes proporciona peores resultados que el autoclavado en la supervivencia de Rhizobium en el inoculante, aunque el efecto perjudicial no se debe a residuos de gas. Los resultados obtenidos con este método son muy variables, debido a dificultades de penetración y posterior eliminación del gas, lo que resulta difícil de lograr si el soporte está embolsado o se trata de grandes

volúmenes.

La irradiación con microondas constituye un método muy efectivo para reducir las poblaciones de microorganismos patógenos en suelos minerales (Ferriss, 1984), sin embargo, no se ha investigado suficientemente en suelos orgánicos (turba).

El autoclavado proporciona una esterilidad absoluta del soporte, pero tiene un inconveniente derivado del tipo de material que debe emplearse en el envasado: vidrio o bolsas autoclavables. En el primer caso, los costes de producción aumentan; en el segundo, las bolsas de propileno o polietileno de alta densidad pueden limitar la difusión de oxígeno al inoculante.

5.2.4. Control de calidad.

La calidad de un inoculante está determinada por la concentración de rizobios y su efectividad en la fijación de nitrógeno en el cultivo al que va destinado. No obstante, las diferentes situaciones ambientales condicionan el comportamiento de un inoculante o la respuesta a la inoculación, de modo que sería irreal establecer "a priori" unos parámetros rígidos de calidad. La experiencia en diferentes países en la práctica de la inoculación sugiere que, cuando no existe una población natural de Rhizobium en el suelo, 100 bacterias por

semilla constituyen un inóculo satisfactorio. Pero cuando las condiciones del suelo son desfavorables para la supervivencia del inóculo o existe un gran número de rizobios inefectivos, son necesarios niveles superiores a 10^6 células por semilla (Meade et al., 1985). En este sentido, pueden hacerse algunas modificaciones en la inoculación, como la humectación de las semillas y el empleo de sustancias adhesivas (goma arábiga, carboximetilcelulosa, sacarosa etc.). En suelos ácidos, la adición de yeso, carbonato o fosfato de calcio, realizando una pildoración de la semilla, favorece el establecimiento y persistencia de la estirpe que se pretenda introducir.

5.2.4.1. Control del caldo de cultivo.

Antes de utilizar el caldo en la impregnación de la turba, hay que comprobar que la pureza y concentración del caldo alcanzan unos niveles mínimos. Normalmente, es suficiente la observación en fresco al microscopio de contraste de fase y la tinción de Gram.

Una primera aproximación de la concentración del caldo se obtiene por turbidimetría y recuento total de células al microscopio. La concentración real del caldo se mide por recuento de viables en placa.

Para la impregnación de la turba deben utilizarse caldos con 5×10^8 - 100×10^8 o más células

viables por ml, sobre todo cuando se emplea turba sin esterilizar, pues el número de bacterias en el momento de la aplicación del inoculante va a depender exclusivamente de la supervivencia de Rhizobium en la turba.

5.2.4.2. Control del inoculante.

Los controles cuantitativos, previos a la distribución, habrán de determinar las poblaciones rizobianas de los inoculantes de modo que superen unos niveles establecidos. Estos niveles dependen de varios factores, como son las cepas utilizadas, la esterilidad del soporte, la temperatura de almacenamiento y, en general, de las condiciones de empleo del inoculante.

Se suelen dar dos concentraciones mínimas de la población rizobiana del inoculante: una para el momento de la fabricación y otra después de distribuirlo y antes de usarlo. En España, los criterios de calidad exigen 10^9 rizobios por gramo de inoculante en la fecha de fabricación y 10^8 en el momento de su utilización. El nivel de contaminación no debe superar el 0.1% de la población microbiana. En la mayoría de los países, el control de calidad de los inoculantes lo realizan agencias gubernamentales, sin embargo, en USA, al no existir una normativa federal que regule la calidad de los inoculantes, cada industria regula y controla sus

productos y oscilan entre 10^7 - 10^8 rizobios/g. En Australia, donde el soporte utilizado es turba estéril, los criterios establecidos exigen 10^9 células/g, excepto para Lotononis que es 5 x 10^8 células/g. También se requiere que el soporte esté libre de contaminantes para una dilución de 10^{-6} (Thompson, 1980). Similares criterios se han establecido en Nueva Zelanda (Anon., 1979), Sudáfrica (Van Rensburg y Strijdom, 1974) y Canadá (Anon., 1980).

Para la determinación del número de rizobios viables en el inoculante, se puede utilizar el método de recuento de colonias en placa o bien por la estimación del número más probable (NMP), mediante la inoculación en plantas. El primero es útil para productos obtenidos con soportes estériles. También se puede utilizar para inoculantes de alta calidad obtenidos con soportes no estériles, pero sólo será aceptable si el inoculante posee una elevada población de rizobios viables y la población de contaminantes es muy pequeña, de tal forma que no interfiera con el crecimiento e identificación de las colonias de Rhizobium. Cuando el recuento de colonias en placa no es posible utilizarlo, se recomienda el método de estimación del NMP (Smith, 1987). Este último requiere un periodo mayor de ensayo, sin embargo, presenta la ventaja de que se puede estudiar tanto la infectividad como la

capacidad de fijar nitrógeno. Asimismo, permite realizar ensayos serológicos para la identificación de los rizobios ensayados.

OBJETO

El encarecimiento de los fertilizantes nitrogenados, la creciente demanda de alimentos para la humanidad y los problemas ecológicos derivados del uso masivo de fertilizantes químicos, han estimulado las investigaciones encaminadas a potenciar la fijación biológica del nitrógeno atmosférico. Estas investigaciones tienen su expresión más significativa en los ensayos de campo, mediante la inoculación de leguminosas de interés agrícola (Pisum, Lens, Vicia, Phaseolus, Glycine etc.), con razas de Rhizobium y Bradyrhizobium específicos, bien adaptados al cultivar de planta huésped al que van destinados los inoculantes y a las condiciones ambientales locales.

Los inoculantes para leguminosas son requeridos para el establecimiento de estos cultivos en nuevos hábitats donde no existen los rizobios específicos y/o para desplazar una población de rizobios inefectiva por otra de mayor eficiencia simbiótica. En este caso, el éxito de la inoculación depende de un conocimiento previo de las características de la población natural en términos de competitividad, efectividad y tamaño. La efectividad simbiótica de la población natural puede ser muy variable y la inoculación de las semillas puede contribuir a estabilizar las tasas de fijación de nitrógeno e incrementar

los rendimientos del cultivo. No obstante, existen informes que señalan la ausencia de una respuesta significativa a la inoculación con razas mejoradas de Rhizobium. Para afrontar estas situaciones se deben realizar estudios de competitividad durante el proceso de selección y se diseñar distintas estrategias de inoculación y manejo de suelos.

La credibilidad de un inoculante es un aspecto importante para potenciar su utilización, si el inoculante no está optimizado y no se obtienen incrementos de cosecha, o no son buenos sustitutos de los fertilizantes, no se puede aconsejar con fines prácticos. Es por ello que los estudios relacionados con la ecología de Rhizobium son interesantes, habiéndose encontrado una amplia variabilidad de los resultados.

Las bacterias del género Rhizobium, aunque son capaces de permanecer en el suelo durante largos periodos de tiempo, normalmente se encuentran asociados a la rizosfera de plantas. Sin embargo, cuando los inoculantes bacterianos se aplican a las semillas, se introducen formas vegetativas en un ambiente no rizosférico que deberán sobrevivir en condiciones atípicas hasta el establecimiento de las plántulas. Debido a esto, los rizobios autóctonos del suelo, generalmente adaptados a sobrevivir en ausencia de su planta huésped, tendrán una ventaja

competitiva frente a los inoculantes. Este hecho constituye un problema de competición para la nodulación de leguminosas, y puesto que en él están involucrados la planta, la bacteria y el ambiente, resulta bastante difícil su regulación. No obstante, existen razones para el optimismo, debido a la posibilidad de seleccionar razas de Rhizobium, autóctonas y competitivas, resistentes a condiciones ambientales adversas y poco usuales, tales como, elevados niveles de nitrógeno combinado, suelos ácidos etc. Por otra parte, también sería posible obtener asociaciones Rhizobium-leguminosa altamente específicas mediante ensayos diversos o a través de la manipulación genética de ambos simbiontes, la planta huésped y bacteria, con objeto de reducir así la probabilidad de infecciones por rizobios poco efectivos en la fijación de nitrógeno y con capacidad para formar un gran número de nódulos. Sin embargo, es de gran interés en este tipo de estudios, realizar ensayos previos, bajo condiciones controladas en el laboratorio, para la selección de razas en base a las características simbióticas infectividad, efectividad y competitividad.

La nutrición nitrogenada es un aspecto clave, controvertido y complejo en las investigaciones sobre cultivos de leguminosas. La capacidad de estas plantas para establecer simbiosis fijadoras de nitrógeno con las bacterias de los géneros Rhizobium y Bradyrhizobium les

permite utilizar el nitrógeno atmosférico para su nutrición. También pueden utilizar el nitrógeno inorgánico presente en la solución del suelo. Sin embargo, es conocida la conflictiva interacción que presentan ambos tipos de nutrición nitrogenada, condicionada por los requerimientos energéticos, por las diferentes vías de asimilación y por otros factores. No obstante, el máximo desarrollo y rendimiento de los cultivos de leguminosas no puede alcanzarse en ausencia de nitrógeno combinado, amonio o nitrato, siendo este último la forma de nitrógeno inorgánico más abundante en el suelo. Se considera clave en este tipo de estudios encontrar el equilibrio que permita el máximo aprovechamiento de ambas fuentes de nitrógeno para la planta.

Por ello los objetivos de este trabajo han sido principalmente:

1. Selección de razas de Rhizobium leguminosarum con una gran infectividad (capacidad para formar nódulos), efectividad (capacidad de fijar nitrógeno) y competitividad (capacidad de formar nódulos ventajosamente frente al resto de microorganismos del suelo).

2. Estudiar la tolerancia de la simbiosis al nitrógeno combinado y determinar el nivel de fertilización nitrogenada que puede interaccionar positivamente con la simbiosis mejorando la nodulación, productividad y rendi-

miento de los cultivos.

El Plan de Trabajo propuesto para cumplir los objetivos sería:

1. Obtener una colección de razas de Rhizobium procedentes de 5 suelos de la provincia de Granada. La elección se basó en trabajos previos donde se muestrearon hasta 12 localidades, desestimándose aquellas que se consideraron aptas para cultivos de leguminosas.

2. Selección de las razas de R. leguminosarum para formar la colección de trabajo, con vista a la producción de inoculantes.

3. Ensayar estas razas frente a diferentes dosis de nitrógeno combinado y detectar la tolerancia de la simbiosis a este nutriente.

4. Estudiar el comportamiento de diversos parámetros bioquímicos y fisiológicos de P. sativum frente a diversas razas seleccionadas y dosis de nitrógeno combinado.

5. Experimentación de inoculantes en condiciones de campo.

MATERIAL Y METODOS

1. MATERIAL BIOLOGICO.

Material vegetal.

En el presente trabajo se han utilizado dos leguminosas grano: Pisum sativum cv. Lincoln y Vicia faba minor cv. Alameda, variedades comerciales ampliamente utilizadas en la alimentación humana y animal, con buena aclimatación y expectativas de cultivo en numerosas zonas agrícolas de nuestro país.

Microorganismos.

Se ha utilizado como microorganismo testigo la raza 300 de Rhizobium leguminosarum biovar. vicieae (Brewin et al., 1980), que es una raza silvestre Hup- infectiva y efectiva aislada de Pisum sativum. Los restantes microorganismos utilizados han sido bacterias aisladas de nódulos radicales de plantas de haba, Vicia faba minor cv. Alameda, crecidas en diversos suelos de la provincia de Granada.

2. SUELOS.

Recogida de suelos.

En los experimentos que lo han requerido, se han empleado suelos procedentes de distintas zonas agrícolas de la provincia de Granada. Para la recogida del suelo, se

seleccionaron parcelas donde previamente se habían cultivado leguminosas y se tomaron muestras de la capa arable, un perfil de aproximadamente 30 cm de profundidad. Una vez homogeneizadas las muestras de suelo, se pusieron a secar a temperatura ambiente hasta humedad uniforme, tamizándose a continuación por una criba de 2 mm de luz de malla. En la tabla 1 se exponen los distintos suelos empleados, así como el tipo de suelo según la clasificación de la FAO-UNESCO (Aguilar, J. comunicación personal).

Tabla 1. Suelos de provincia de Granada empleados en este estudio.

Zona agrícola	Nº suelo	Tipo de suelo
Atarfe	1	Luvisol calcáreo
Iznalloz	2	Luvisol calcáreo
Alhama de Granada	3	Cambisol calcáreo
Loja	4	Cambisol calcáreo
La Malá	5	Regosol calcáreo
Purchil	6	Fluvisol calcáreo

Análisis de suelos.

De cada suelo se tomó una muestra representativa que fue analizada en el laboratorio de suelos de la Estación Experimental del Zaidín (C.S.I.C.), determinándose las características fisicoquímicas y granulométricas de los mismos, cuyos resultados se exponen en las tablas 2

y 3 respectivamente.

Tabla 2. Resultados correspondientes al análisis granulométrico de los suelos utilizados, expresados en %

Suelos	Arena	Limo	Arcilla
1	34.58	46.73	18.69
2	51.99	35.65	12.35
3	9.02	50.85	40.13
4	16.95	50.91	32.14
5	32.70	65.57	1.73
6	40.60	56.30	3.05

Tabla 3. Resultados correspondientes al análisis químico de los suelos empleados.

	SUELOS					
	1	2	3	4	5	6
pH (pasta saturada)	7.76	7.73	7.78	7.81	7.57	7.90
Mat. org. %	2.14	2.02	1.55	2.09	1.52	1.38
N total %	0.34	0.24	0.30	0.33	0.28	0.12
P_2O_5 ppm	27.95	15.57	10.99	10.99	16.95	48.00
K_2O mq/100g	27.50	26.25	38.75	28.75	22.50	85.00
CO_3Ca equivalente%	55.48	32.50	49.20	53.26	28.81	16.40
CO_3Ca activo %	18.30	15.26	14.63	15.26	14.75	12.63

3. MEDIOS DE CULTIVO.

Medios de cultivo para Rhizobium.

El medio de cultivo base para el aislamiento y conservación de las razas de Rhizobium utilizadas ha sido el 79 de Allen (1957), cuya composición se detalla a continuación:

PO_4HK_2	0.6g
$SO_4Mg.7H_2O$	0.2g
CO_3Ca	1.0g
*$Cl_2Ca.2H_2O$	0.2g
ClNa	0.2g
Manita	7.6g
Glucosa	2.4g
Extracto de levadura	0.5g
Agua	1000ml
Agar (para medio sólido)	15.0g

Se ajusta el pH a 7.0-7.2 y se esteriliza en autoclave a 115°C durante 30 minutos.

*El medio original no incluye Cl_2Ca. La cantidad agregada de este producto sustituye a 2 g de CO_3Ca, que se suele añadir cuando se prepara medio para conservar las bacterias y no se requiere una total transparencia.

Para la obtención de los caldos de cultivo en la

preparación de inoculantes, se ha utilizado un medio líquido que contiene manitol como fuente de carbono, seleccionado en un trabajo previo (Muñoz, 1987) para la preparación de inoculantes destinados a semillas de Vicia faba, y cuya composición se detalla a continuación:

PO_4HK_2.....0.8g

PO_4H_2K.....0.2g

ClNa.....0.2g

$SO_4Mg.7H_2O$.....0.18g

Cl_2Ca.....0.1g

NO_3K.....1.0g

Extracto de levadura.....0.5g

Manitol.....10.0g

Agua.....1000ml

Se ajusta el pH a 7.0-7.2 y se esteriliza en autoclave a 115°C durante 30 minutos.

Antibióticos.

Los antibióticos utilizados en los medios selectivos se disuelven en agua y se esterilizan por filtración (0,45 µ de tamaño de poro). Las concentraciones finales de antibióticos han sido:

Estreptomicina, sulfato (CEPA).....375mg/ml

Rifampicina (SIGMA).....20mg/ml.

Solución nutritiva.

Los experimentos de cultivos hidropónicos se llevaron a cabo en jarras Leonard y como fertilización complementaria en los cultivos con suelo, se ha utilizado la solución nutritiva libre de nitrógeno descrita por Rigaud y Puppo (1975) que tiene la siguiente composición:

PO_4H_2K.....200mg

$SO_4Mg.7H_2O$.....200mg

ClK.....200mg

$SO_4Ca.2H_2O$.....120mg

$EDTAFeNa_2$.....25mg

$MoO_4Na_2.2H_2O$.....4mg

$SO_4Mn.4H_2O$.....2mg

$SO_4Cu.5H_2O$.....2mg

$SO_4Zn.7H_2O$.....3mg

BO_3H_3.....18mg

Agua destilada.....1000ml

Antes de esterilizar a 115°C durante 30 minutos, se ajusta el pH a 7,0 con KOH.

4. ESTERILIZACION Y GERMINACION DE LAS SEMILLAS.

En los distintos experimentos realizados en este estudio, antes de proceder a la siembra de las semillas, éstas han sido esterilizadas en superficie con alcohol del

90% . Para ello se sumergen en alcohol durante dos minutos y medio, lavando después varias veces con agua estéril, con objeto de eliminar los restos de alcohol.

Una vez que las semillas han sido esterilizadas, se dejan en imbibición en agua estéril de dos a tres horas. Posteriormente se prepararon semilleros en bateas de polietileno con vermiculita estéril y convenientemente lavada, como sustrato. La preparación de semilleros se llevó a cabo en cámara de flujo laminar (Telstar-S.A.) para evitar las posibles contaminaciones. Las bateas se cubrieron con bolsas de plástico y se llevaron a estufa a 26°C durante 48 horas, reponiendo el agua cuando era necesario. Transcurrido este periodo, la semillas presentan una radícula de 1 cm aproximadamente, tamaño adecuado para transplantarlas a las macetas.

5. CONDICIONES AMBIENTALES.

Todos los experimentos se llevaron a cabo en cámara de cultivo con las condiciones de luz, humedad y temperatura que se exponen a continuación:

-Fotoperiodo: 16 horas luz/8 horas oscuridad.

-Humedad relativa: día 65 ± 2%

noche 80 ± 2%

-Temperatura: día 23 ± 1°C.

noche 16 ± 1°C.

-Fuente luminosa: Fluorescentes Sylvania Cool

white life line.

Lámparas incandescentes (28% del total de watios).

La intensidad luminosa en la superficie de las macetas era de 450 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$ (400-700 nm).

6. EXPERIMENTOS REALIZADOS.

6.1. Aislamiento de razas de Rhizobium.

En estudios previos a este trabajo (Hervás, 1985), se estudió la productividad y rendimiento de cultivos de varias leguminosas grano en nueve suelos procedentes de diversas zonas agrícolas de la provincia de Granada. De los nueve suelos ensayados, se seleccionaron aquellos en los cuales el rendimiento era más bajo (suelos expuestos en la tabla 1), ya que es en este tipo de suelos donde la inoculación bacteriana puede tener mayor interés.

El objetivo de este experimento ha sido la obtención de un stock de razas silvestres de Rhizobium autóctonas de los suelos mencionados, efectivas y competitivas con el fin de preparar inoculantes bacterianos capaces de incrementar el rendimiento de las leguminosas en estas zonas agrícolas.

6.1.1. Cultivo de plantas en macetas con suelo.

Para la obtención de razas autóctonas de

Rhizobium, se ha llevado a cabo un experimento con plantas de Vicia faba minor cv. Alameda en macetas con suelo, bajo condiciones ambientales controladas en cámara de cultivo. Se emplearon cinco lotes de macetas de polietileno con orificio de drenaje en la parte inferior. Se llenaron con 3 Kg de una mezcla de suelo y arena de cuarzo en la proporción 3:1 (v/v). La arena de cuarzo previamente había sido lavada con ácido clorhídrico y agua abundante para eliminar totalmente los restos de ácido.

En cada maceta, convenientemente rotulada según el suelo empleado y repeticiones (cuatro macetas por suelo ensayado), se sembraron tres semillas de haba previamente esterilizadas en superficie y pregerminadas, como se ha indicado en el apartado 4 de Material y Métodos. Una vez dispuestas así las macetas, se colocaron en su lugar en la cámara de cultivo, bajo condiciones ambientales controladas.

Los cultivos se llevaron hasta floración y en este momento se procedió al aislamiento de razas de Rhizobium a partir de los nódulos radicales.

6.1.2. Aislamiento de Rhizobium a partir de nódulos radicales.

Para el aislamiento de los nódulos del sistema radical, se realiza previamente un lavado exhaustivo con

agua de grifo, de la raíz de la planta correspondiente, para separar el suelo adherido. Posteriormente se separan los nódulos de la raíz y se depositan en un tubo de tapón de rosca de 16 x 180 mm, donde nuevamente se procede a su lavado con el fin de eliminar todos los restos que queden de suelo y se esterilizan en superficie con cloruro mercúrico. Para ello, se sumergen en una solución de Cl_2Hg al 2,5 por mil durante 5 minutos, después de este tiempo, se lavan varias veces con agua estéril para eliminar los restos de Cl_2Hg.

Cuando se ha finalizado el lavado, se colocan los nódulos en una placa Petri estéril y se machacan con una barilla flameada y fría. Con esta misma barilla , se disemina sobre medio 79 de Allen (1957) una muestra del jugo resultante del nódulo machacado. Al medio de cultivo, contenido en placas Petri, se le adiciona cristal violeta al 1:80.000 para facilitar la identificación de las colonias de Rhizobium que aparecen a las 48 horas e inhibir el desarrollo de contaminantes Gram positivos.

Se emplearon 60 nódulos de cada suelo que se numeraron del 1 al 60. A partir de colonias perfectamente aisladas, se sembraron 300 tubos de ensayo (60 de cada suelo) que contenían medio de cultivo de Allen sólido. Se llevaron a incubación en estufa a 28ºC durante 72 horas.

Las bacterias aisladas se compararon, según

diferentes criterios, para seleccionar 12 razas por suelo ensayado y posteriormente se llevaron a cámara fría a 4ºC para su conservación.

6.2. Ensayo de infectividad y efectividad.

Se ha utilizado el sistema de cultivo hidropónico en jarras Leonard (Leonard, 1943), que permite mantener unas condiciones adecuadas de esterilidad, siguiendo la técnica de Vincent (1970).

6.2.1. Preparación de las jarras Leonard.

Dicho sistema está formado por 2 partes, la inferior que contiene la solución nutritiva (solución libre de nitrógeno de Rigaud y Puppo, 1975). La parte superior consiste en una botella invertida a la que se le ha cortado la base, que porta el sustrato, que es humedecido continuamente por una "mecha" de material absorbente que se mantiene permanentemente en contacto con la solución mineral.

Se ha utilizado la vermiculita como sustrato inerte, la cual tiene una elevada porosidad permitiendo que el desarrollo radical sea satisfactorio. Como material de "mecha" se han empleado tiras de papel de celulosa.

Una vez preparadas las jarras Leonard se tapa su superficie con papel de aluminio y se esterilizan en auto-

clave a 115°C durante 2 horas.

6.2.2. Preparación de los inóculos.

Las bacterias empleadas para la inoculación de las plantas de guisante, han sido las razas de Rhizobium aisladas según el apartado anterior (12 de cada suelo) y una raza testigo, la raza 300 de Rhizobium leguminosarum.

Para la obtención de cultivos bacterianos frescos, se sembraron cinco tubos de ensayo con medio Allen sólido para cada microorganismo ensayado. Tras incubar en estufa a 28°C durante 72 horas, se adicionó a cada tubo un volumen determinado de agua estéril. Se agitaron convenientemente para obtener una suspensión bacteriana homogénea que contenía aproximadamente 10^9 células/ml.

6.2.3. Siembra e inoculación de las semillas.

Una vez preparadas las jarras Leonard y esterilizadas, se sembraron dos semillas de guisante por jarra, previamente esterilizadas en superficie y germinadas, inoculándose posteriormente con 1 ml/semilla de la suspensión bacteriana correspondiente. Se emplearon tres jarras (seis plantas) por cada raza de Rhizobium ensayada.

En este experimento se incluyeron tres tipos de controles, usualmente utilizados según la bibliografía

consultada (Vincent, 1977; Kremer y Peterson, 1982a; Thompson, 1988):

-Plantas inoculadas con una raza testigo, la raza 300 de Rhizobium leguminosarum.

-Control N: plantas no inoculadas a las que se les suministró nitrógeno combinado en forma de nitrato potásico 8 mM, que se le adicionó a la solución nutritiva, previamente a su esterilización.

-Control de esterilidad: plantas no inoculadas y sin aporte de nitrógeno combinado. La ausencia de nódulos en el sistema radical de estas plantas, es un índice del control de esterilidad mantenido durante el periodo de cultivo.

Las jarras así dispuestas, se llevaron a la cámara de cultivo bajo condiciones ambientales controladas, y se distribuyeron al azar, cambiándolas de lugar cada siete días. Cada cinco días, se cambiaba la parte inferior de la jarra por otra con solución nutritiva estéril. De esta forma se mantuvieron las plantas durante siete semanas. Transcurrido dicho tiempo, las plantas habían alcanzado el periodo de floración.

6.2.4. Recogida de las plantas y determinaciones realizadas.

En el periodo de floración de los cultivos se procedió a la recogida de las plantas, separando la parte

aérea de la raíz. Los parámetros determinados han sido los siguientes:

1. Medida de la actividad nitrogenasa específica mediante la técnica de reducción de acetileno a etileno (Hardy et al., 1968).

2. Parámetros de crecimiento.

Una vez determinada la actividad nitrogenasa, se procedió a separar los nódulos de la raíz. Posteriormente se determinaron los siguientes parámetros de crecimiento:

-Peso fresco de parte aérea (hojas y tallos)

-Peso fresco de raíz

-Número de nódulos por planta

-Peso fresco de los nódulos.

Cada uno de los órganos citados, se colocó en bateas de papel convenientemente rotuladas y se llevaron a estufa con corriente forzada de aire a 60°C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se sacan de la estufa y se dejan enfriar en el desecador para estabilizar el peso seco, determinándose éste en cada uno de los órganos vegetativos citados.

Obtenido el peso seco de dichos órganos, se procedió a moler la parte aérea y la raíz, separadamente, con un molinillo Moulinex de acero inoxidable, obteniéndose un polvo fino y homogéneo que se guardó en bolsas de plástico convenientemente etiquetadas para el posterior aná-

lisis químico de dicho material, determinándose el contenido en nitrógeno reducido de parte aérea y raíz.

6.3. Ensayo de competitividad.

En este tipo de experimento se ha ensayado el efecto competitivo que puede existir entre las poblaciones nativas de Rhizobium del suelo respecto a las razas estudiadas en este trabajo, inoculadas en plantas de guisante y haba en macetas con suelo. Las razas de Rhizobium ensayadas son aquellas que han mostrado una mayor efectividad en simbiosis con Pisum sativum.

6.3.1. Preparación de los inóculos.

Con objeto de asegurar la identificación de las bacterias inoculadas, las razas ensayadas fueron marcadas con resistencia a antibióticos (estreptomicina y rifampicina), seleccionando mutantes espontáneos aparecidos en placas Petri con medio Allen 79 sólido que contenía estos antibióticos. Se han obtenido tres tipos de mutantes resistentes:

1. Razas resistentes a estreptomicina: GRC20, GRI7, GRI24, GRL22, GRL8 y GRA19.

2. Razas resistentes a rifampicina: GRL16, GRL19, GRLM25, GRC37, GRI3 y 300 (raza testigo).

3. Razas resistentes a estreptomicina y rifampicina: GRI32, GRC17, GRL11, GRC38, GRLM40 y GRL10.

Para la obtención de mutantes resistentes, se utilizaron cultivos frescos de Rhizobium a partir de los cuales se prepararon suspensiones bacterianas de 10^9 células/ml, diseminando 1 ml por placa con el antibiótico respectivo. Las placas sembradas se llevaron a incubar en estufa a 28°C durante 72 horas. A partir de una colonia resistente se vuelve a sembrar en placa que contiene el antibiótico para tener la seguridad que las bacterias son resistentes. Finalmente, de una colonia perfectamente aislada, se siembra en tubo de ensayo con medio sólido que contiene el antibiótico y tras incubar en estufa se lleva a cámara fría para su conservación.

Para llevar a cabo el ensayo de competitividad, las bacterias marcadas se distribuyeron en seis grupos, cada uno de los cuales estaba compuesto por una raza resistente a estreptomicina, otra resistente a rifampicina y otra resistente a los dos antibióticos:

GRUPO	Strep$^+$	Rif$^+$	Strep$^+$Rif$^+$
1	GRC20	GRL16	GRI32
2	GRI7	GRL19	GRC17
3	GRI24	300	GRL11
4	GRL22	GRLM25	GRC38
5	GRL8	GRC37	GRLM40
6	GRA19	GRI3	GRL19

Se prepararon seis inóculos diferentes, cada uno de los cuales estaba compuesto por la mezcla de las tres

razas correspondientes a cada uno de los grupos expuestos. Dichos inóculos se ensayaron en dos suelos (procedentes de Iznalloz y Alhama de Granada), separadamente, utilizando cultivos de guisante y haba como plantas huésped.

6.3.2. Cultivos de plantas en macetas.

Cada uno de los suelos, convenientemente preparados como se indica en el apartado 2 de Material y Métodos, se distribuyó en macetas de polietileno de 3 Kg de capacidad, en cada una de las cuales se sembraron ocho semillas, siendo posteriormente inoculadas con el inóculo correspondiente. Se emplearon dos macetas por cada inóculo ensayado. Una semana después de la emergencia, las plantas se entresacaron dejando cuatro plantas uniformes por maceta.

Después de 40 días de cultivo, las plantas fueron examinadas analizándose la aparición de nódulos formados por las razas de Rhizobium objeto de estudio. Los nódulos de las ocho plantas de cada grupo de inoculación fueron convenientemente esterilizados de acuerdo con el apartado 6.1 de Material y Métodos, tomándose 100 nódulos, escogidos al azar, para la determinación del grado de competitividad.

6.3.3. Determinación del grado de competitividad.

Los nódulos se colocan en una placa Petri esté-

ril y se machacan con una barilla de vidrio flameada. El jugo resultante de cada nódulo se siembra en cuatro placas Petri que contienen respectivamente estreptomicina, rifampicina, ambas estreptomicina y rifampicina y medio sin antibiótico. En todos los casos, al medio de cultivo se le adiciona cristal violeta al 1:80.000 para facilitar la identificación de las colonias de Rhizobium.

Una vez sembradas las placas, se llevan a estufa a incubar a 28ºC durante 72 horas. Posteriormente se procede a la identificación de las razas resistentes a los antibióticos respectivos para la determinación del grado de competitividad, definido como el % de nódulos crecidos en presencia del antibiótico respectivo.

6.4. Ensayo de tolerancia al nitrógeno combinado de la simbiosis Rhizobium leguminosarum-Pisum sativum.

Se han realizado una serie de experimentos cuyo objetivo ha sido estudiar la respuesta de la simbiosis R. leguminosarum-P. sativum al nitrógeno combinado, utilizando cuatro razas seleccionadas en los apartados anteriores (GRL19, GRC37, GRA19 y GRL22) frente a cuatro niveles de nitrógeno combinado en forma de nitrato potásico.

6.4.1. Cultivo hidropónico de plantas.

Para el cultivo de las plantas se han utilizado jarras Leonard que contenían vermiculita como soporte

inerte y solución nutritiva de Rigaud y Puppo (1975). Las jarras se dividieron en cuatro grupos recibiendo cada uno de ellos 2, 4, 6 y 8 mM de nitrato potásico que se adicionó a la solución nutritiva previamente a su esterilización en autoclave a 115°C durante 2 horas.

En cada jarra se sembraron dos semillas de guisante pregerminadas y se inocularon con 1 ml/semilla de la suspensión bacteriana correspondiente, obtenidas a partir de cultivos frescos (72 horas de incubación) de las razas de Rhizobium ensayadas. Se han incluido plantas controles no inoculadas y fertilizadas con las distintas dosis de nitrato estudiadas. En total se disponía de cuatro controles, uno por cada nivel de nitrógeno combinado ensayado. De cada tratamiento (combinación raza-dosis de nitrato), se pusieron nueve repeticiones, así como de cada nivel de nitrato sin inoculación.

Se realizaron tres recogidas de plantas coincidiendo con tres estadíos de crecimiento bien diferenciados: etapa juvenil (35 días a partir de la germinación de las semillas), floración (50 días) y maduración (70 días). En cada una de ellas se utilizaron seis plantas por tratamiento.

6.4.2. Determinaciones realizadas.

-Análisis de crecimiento, determinado por el

peso seco de los distintos órganos de la planta.

-Parámetros de nodulación: número y peso seco de nódulos por planta.

-Actividades enzimáticas: actividad nitrogenasa específica en el sistema radical de plantas noduladas y actividad nitrato reductasa en los distintos órganos vegetativos de la planta.

-Otras determinaciones: bioquímicas y analíticas.

Contenido en proteína soluble en hoja.

Contenido en azúcares totales solubles en hoja y raíz.

Contenido en nitratos en hoja, tallo y raíz.

Contenido en macronutrientes (N, P, K, Ca y Mg) en parte aérea y raíz.

6.5. Ensayo de campo.

6.5.1. Preparación de inoculantes a base de turba.

Para la preparación de inoculantes a base de turba se ha seguido la metodología descrita por Rodríguez-Navarro (1986) y Muñoz (1987).

En este estudio se han ensayado dos tipos de inoculantes, uno que contenía la raza GRA19 (R1) y otro compuesto por la mezcla de tres razas de Rhizobium, GRL8, GRI7 y GRL22 (R2), marcadas con resistencia a antibió-

ticos. Para la obtención de los caldos de cultivo, las bacterias se multiplicaron en medio líquido, descrito en el apartado 3, durante 72 horas en agitación a 28°C.

El soporte sólido utilizado ha sido turba, procedente de El Padul (Granada), neutra, finamente molida (malla 200 mesh) y seca.

El inoculante se preparó mezclando turba y el cultivo bacteriano en la proporción 40-60% (p/p) respectivamente, masajeando vigorosamente hasta que la impregnación de la turba es homogénea. Una vez terminado, el inoculante se almacenó en cámara fría a 4°C, dispuesto en bolsas de polietileno hasta el momento de su utilización. En el momento de su aplicación se realizó un recuento del número de células viables en placa, estimándose su concentración en 3 x 10^9 células viables/g de inoculante.

6.5.2. Aplicación del inoculante.

La aplicación del inoculante a las semillas de haba se llevó a cabo mediante el sistema descrito por Cubero y Moreno (1983) para leguminosas con semillas de tamaño grande.

La planta utilizada ha sido Vicia faba minor cv. Alameda. Para 100 Kg de semillas de habas, se adicionaban 0.5 Kg de inoculante disuelto en 1 litro de una solución acuosa de sacarosa al 10% que sirve como adherente y como

fuente de carbono para Rhizobium. Una vez mezcladas las semillas lo más uniformemente posible, se dejan imbibir durante 2-3 horas antes de efectuar la siembra.

6.5.3. Suelo.

El ensayo de campo se ha llevado a cabo en la finca experimental del Centro de Investigación y Desarrollo Agrario (CIDA), situada en la Vega de Granada a 4 Km de la ciudad, en el término municipal de Purchil. Las características granulométricas y fisicoquímicas de dicho suelo se exponen en las tablas 2 y 3 del apartado 2.

6.5.4. Diseño experimental.

La disposición del experimento fue la de "bloques de parcelas al azar", con 4 repeticiones (4 parcelas/tratamiento). Las parcelas fueron de 50 m² con separaciones de 2 m entre bloques y 1 m entre las parcelas de cada bloque. Cada parcela tenía 12 surcos separados entre sí 40 cm.

Los tratamientos consistieron en dos tipos de inoculantes (R1 y R2) y un testigo sin inocular. En combinación con esto, se han ensayado dos niveles de fertilización nitrogenada, en forma de urea amoniacal al 46%, N0 (0 Kg de N/Ha) y N1 (30 Kg de N/Ha), aplicados en el inicio de la floración, lo que correspondería a un factorial de 2 x 3.

La densidad de siembra fue de 30 plantas/m^2. Como abonado de fondo se aplicaron 90 Kg/Ha de P_2O_5 y 135 Kg/Ha de K_2O. A lo largo del cultivo se realizaron las labores culturales normales recomendadas por el CIDA.

6.5.5. Recolección y determinaciones realizadas.

La recolección de las plantas se llevó a cabo en el mes de julio para la determinación de la cosecha. Exceptuando las plantas que formaban el borde de las parcelas, la recogida se realizó al azar. De cada parcela se recolectaron tres muestras de cinco plantas cada una. Para el estudio de la cosecha se ha determinado el peso seco de frutos y semillas por planta.

7. METODOLOGIA UTILIZADA.

7.1. Actividad nitrogenasa específica. Test de reducción de acetileno.

Para la medida de la actividad nitrogena se ha seguido, salvo ligeras modificaciones para adaptar el método a nuestros requerimientos, la técnica descrita por Koch y Evans (1966) y Hardy et al., (1968), usando cromatografía gaseosa (Burris, 1972).

Determinación de la actividad nitrogenasa específica.

Las raíces noduladas de las plantas, se ponen en un bote de 126 cc de capacidad con tapón de rosca perfo-

rado y provisto de un disco de silicona que permite el cierre hermético y la extracción, con jeringa de muestras, de su atmósfera interna. A los botes así preparados se les extrae el 10% de la atmósfera interna con una jeringa y se les inyecta un volumen igual de acetileno. A tiempos determinados, 10, 20 y 30 minutos desde que se inyecta el acetileno, se extraen muestras para inyectar en el cromatógrafo de gases y conocer el nivel de reducción, es decir, la actividad nitrogenasa específica. Los picos de acetileno y etileno fueron identificados previamente por comparación de los tiempos de retención de los correspondientes patrones. La actividad enzimática se obtiene por referencia a la curva patrón construida con los valores de los picos de los diferentes volúmenes de etileno inyectado.

El volumen inyectado de las muestras problema, ha sido de 0,2 ml. La actividad nitrogenasa específica ha sido expresada en µmol de C_2H_4 . g^{-1} PS . h^{-1}.

Características del cromatógrafo.

La reducción de acetileno fue valorada utilizando un cromatógrafo de gases Carlo Erba FTV-2350, equipado con un detector de ionización de llama y una columna de vidrio de 2 mm x 4 m rellena con Porapak tipo R de 80-100 mesh. La temperatura del horno era de 74°C. El nitrógeno fue utilizado como gas portador con un flujo de 75

ml . min^{-1}. El flujo de hidrógeno y aire se mantuvo a 30 y 300 ml . $min.^{-1}$ respectivamente.

Preparación de acetileno.

El acetileno se obtiene directamente a partir de carburo cálcico y agua. En un frasco de vidrio de 1000 ml de capacidad y provisto de tapón de rosca perforado y con un disco de silicona, para cerrar herméticamente, se pone la cantidad de agua y carburo cálcico adecuada para obtener una atmósfera saturada de acetileno. Cuando el gas empieza a salir se cierra herméticamente con lo que la atmósfera interna será siempre de acetileno puro.

Patrón de etileno.

El patrón de etileno se prepara a partir de etileno puro, por dilución hasta la concentración adecuada. Se utiliza un frasco de vidrio de 1 l, volumen suficiente para que no se altere la concentración durante el tiempo que dura el experimento. El tapón del frasco va horadado y provisto de un doble disco de silicona, la superficie interna del tapón y el borde externo de la boca del frasco de vidrio, además sobre los discos de silicona se deposita una fina capa de mercurio, con todo esto se asegura que no va a haber pérdida de etileno en el patrón.

El frasco así preparado e invertido, se sujeta a un pie de hierro y se mantiene siempre en las mismas

condiciones de presión y temperatura que las muestras a medir, con lo cual, las variaciones del patrón son nulas, siempre que se mantengan rigurosamente las mismas condiciones del cromatógrafo.

7.2 Determinación de la actividad nitrato reductasa.

Actualmente se dispone de dos tipos de ensayos para estudiar la actividad nitrato reductasa: el ensayo "in vivo" y el ensayo "in vitro". Tras valorar los aspectos positivos y negativos de ambos tipos de ensayo (Ligero, 1984), se seleccionó para investigar la actividad nitrato reductasa en todos los órganos vegetativos (hoja, tallo, raíz y nódulos) de las plantas, un ensayo "in vivo" basado en los descritos por Heuer y Plaut (1978) y por Crafts-Brandner y Harper (1982), utilizando la infiltración al vacío, con modificaciones para adaptarlo a nuestro material y condiciones de trabajo (Caba, 1987).

Se han ensayado dos tipos de metodología para la valoración de la actividad nirato reductasa "in vivo": una basada en la desaparición de nitratos en el tejido durante el tiempo de incubación (Soares et al., 19[illegible]) y otra basada en la aparición de nitritos. Tras comparar los resultados obtenidos, se ha seleccionado ésta última por su mayor sensibilidad para detectar la actividad nitrato reductasa en los tejidos ensayados, puesto que, en el rango de niveles de actividad detectados, los actuales

métodos para valorar la desaparición de nitratos, no son suficientemente sensibles.

Descripción del ensayo "in vivo".

El medio de incubación empleado para el ensayo "in vivo" de la nitrato reductasa en los órganos aéreos (hojas y tallos) fue el siguiente: tampón fosfato-K 0.1 M, pH 7.5, que contiene EDTA 1 mM, n-propanol 1% (v/v) y tritón X-100 0.01% (v/v). El empleo del disolvente orgánico n-propanol y del surfactante tritón X-100 a las concentraciones indicadas, incrementa la permeabilidad de las membranas celulares facilitando la infiltración de los tejidos y la salida de nitritos.

El material vegetal fue fina y homogéneamente troceado (3-4 mm). Se tomaron cinco muestras de hoja de toda la planta, a razón de 0.25 g y 0.5 g de muestra de tallo procedente de la mitad superior de la planta. El material vegetal se dispuso en tubos de ensayo de 15 x 150 mm que contenían 5 ml del medio de incubación.

Al utilizar como material vegetal a ensayar raíz y nódulos, el medio de incubación fue esencialmente el mismo, excepto que el pH final fue de 7.0 y el n-propanol se adicionó en la proporción 2% (v/v) (Crafts-Brandner y Harper, 1982). Las muestras de raíz (1 g), procedentes de la región media del sistema radical y desprovistas de

nódulos, se colocaron en tubos de ensayo de 20 x 150 mm que contenían 10 ml del medio de incubación.

En el caso de los nódulos, se utilizaron muestras de 0.25 g de nódulos enteros bien desarrollados, que se colocaron en los tubos de ensayo con 4 ml del medio de incubación. Dado el tamaño de los nódulos radicales y por tratarse de un tejido más blando que los demás, no es necesario trocearlos.

En todas las determinaciones realizadas, se prepararon cinco repeticiones y los ensayos se repitieron dos veces.

Los tubos así preparados, se introducen en un recipiente de vidrio con cierre hermético. Se sometieron a un vacío de 50 cm de mercurio durante 5 minutos. Tras interrumpir bruscamente el vacío, se agitan ligeramente y se repite la operación.

Todas estas operaciones se realizan en cámara fría, sobre un baño de hielo picado y dentro de las dos horas siguientes al corte de las plantas, con lo que se evitan alteraciones del material vegetal y pérdidas de actividad.

Tras la infiltración, los tubos se llevaron a incubación en baño termostatizado a 30°C, en oscuridad, durante 60 minutos. La elección del tiempo de incubación

se hizo en base a una serie de ensayos previos en los que se estudió la evolución de la actividad nitrato reductasa en función del tiempo de incubación, 15, 30, 40, 60 y 70 minutos. Los controles a tiempo 0 se obtuvieron tomando alícuotas inmediatamente antes de la incubación.

Finalizada la incubación se trasladaron los tubos rápidamente a un baño maría hirviendo durante 5 minutos. Con esto se logra parar la reacción enzimática inmediatamente y facilita la salida de todo el nitrito formado (Soares et al., 1985). Una vez fríos, se agitaron los tubos vigorosamente y se tomaron alícuotas para valorar el nitrito formado.

Valoración del los nitritos.

Para la valoración de los nitritos se utilizó la reacción de diazotación de Griess-Ylosway, según el método de Snell y Snell (1949) y Hageman y Hucklesby (1971).

A alícuotas de 0.5 ml del medio de incubación, completadas hasta 1 ml con el medio de incubación, se les añade 1 ml de reactivo de sulfanilamida y 1 ml de reactivo de N-1-naftil-etilendiamina diclorhidrato. La mezcla se completa con agua destilada hasta un volumen de 5 ml y tras agitar vigorosamente, se deja desarrollar el color durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se mide la absorbancia, debida al color, a 540 nm en un

espectrofotómetro (Hitachi 100-80). Para la cuantificación del nitrito formado se confecciona una curva patrón con concentraciones conocidas de nitrito, obtenidas a partir de una solución de NO_2K en tampón fosfato 0.1 M. La actividad nitrato reductasa se expresa en µmol NO_2^- . g^{-1} PF . h^{-1}.

Reactivo de sulfanilamida: se disuelven 5 g de sulfanilamida, MercK calidad análitica, en 100 ml de ClH concentrado y se diluyen hasta 500 ml con agua destilada.

Reactivo de N-1-naftil-etilendiamina diclorhidrato (NNEDA): se disuelven 100 mg de NNEDA, Merck calidad analítica, en 500 ml de agua destilada, conservándose en frasco topacio.

7.3. Determinación de azúcares totales en diferentes órganos vegetales.

Obtención de extractos vegetales de hojas y tallos.

Se utilizó 2 g de material vegetal fresco, a los que se les adicionó 10 ml de tampón tris-ClH, pH 7.5. La homogeneización de la muestra se llevó a cabo en un poter procurándose que la homogeneización fuera perfecta. Toda esta operación fue llevada a cabo con el homogeneizador sumergido en hielo picado para evitar el calentamiento. El homogeneizado se recogió en un tubo de centrífuga junto con 2 ml de tampón utilizados para lavar el poter y

arrastrar así los restos vegetales que pueden quedar adheridos a las paredes de éste. Se filtró con una gasa de nylon y se centrifugó a 30.000 x g durante 10 minutos. La centrífuga utilizada era Sorvall modelo RC-5B, refrigerada (Du Pont Instruments).

En el sobrenadante se procedió a precipitar las proteínas para determinar posteriormente azúcares totales solubles.

Obtención de extractos de raíz.

Utilizamos el método de Bligh y Dyer (1959), modificado por Donaire (comunicación personal). Una muestra de 2 g de la zona subapical de la raíz se coloca en la cámara del poter y se le añaden 15 ml de metanol puro. Tanto la adición de metanol como la homogeneización se realiza en dos etapas, adicionando 7.5 ml en cada una de ellas. A continuación se adicionan 15 ml de cloroformo puro, homogeneizándose nuevamente. Finalmente se adicionan 7.5 ml de agua salada al 0.88% (p/v) y se homogeneiza hasta obtener un homogeneizado perfecto. Todas estas operaciones se hacen en cámara fría con el poter sumergido en baño de hielo picado.

El dispositivo utilizado se lava con 2 ml de cloroformo que se recogen con el homogeneizado y se centrifuga a 3000 x g durante 10 minutos. Las fracciones

se separan, quedando la metanólica en la parte superior y la clorofórmica en la parte inferior. La fracción metanólica se vierte en tubo de ensayo y tomando un volumen determinado, p.e. 10 ml, se reduce a la mitad en el rotavapor, con objeto de eliminar los posibles restos de cloroformo que pudieran acompañar a esta fracción. A continuación, el volumen perdido en el rotavapor se restituye con agua destilada, se agita bien y se toman alícuotas para la determinación de azúcares totales solubles.

Precipitación de proteínas.

Se transfiere 1 ml de sobrenadante a un tubo de centrífuga y se agregan 5 ml de ácido tricloroacético al 15% (v/v) enfriado a 4°C. Se deja una hora a 0°C y se centrifuga a 12.000 x g durante 10 minutos. Del sobrenadante se toman alícuotas para determinar azúcares totales solubles.

Valoración por colorimetría de azúcares totales.

Se ha utilizado el método propuesto por Trevellian y Harrison (1951), utilizando el reactivo de antrona. De cada uno de los extractos preparados como se indicó en los apartados precedentes, se toman 4 alícuotas de 1 ml y se colocan en tubos de ensayo de 16 x 180 mm. En el caso de que la concentración de azúcares fuera muy

alta, la alícuota puede ser diluida. Esta serie de tubos, así preparada con las distintas muestras problema, utiliza como blanco un tubo que contiene 1 ml del medio en el que están disueltos los azúcares.

La curva patrón se prepara a partir de una serie de concentraciones conocidas de glucosa y un blanco con 1 ml de agua. Todos los tubos, problemas y curva, se llevan a un baño de hielo picado y se les adiciona, dejando resbalar por las paredes, 5 ml de reactivo de antrona. A continuación, se agitan vigorosamente y se llevan a baño maría en ebullición durante 10 minutos exactamente, transcurridos los cuales, se enfrían inmediatamente sumergiéndolos en un baño de hielo picado. La coloración producida se mide en un espectrofotómetro (Hitachi 100-80) a 620 nm.

Reactivo de antrona: En el momento de usar se disuelven 0.2 g de antrona (Merck) en 100 ml de una mezcla sulfúrico-agua (5:1).

7.4. Determinación de proteínas solubles.

Para la determinación de proteínas solubles en los órganos vegetales, se ha seguido el método descrito por Bradford (1976) basado en la unión del azul brillante de Coomassie G-250 a las proteínas.

Obtención de los extractos.

Los extractos problema se obtuvieron mediante homogeneización de 2 g de material vegetal fresco y 10 ml de tampón tris-ClH utilizando un poter. Los homogeneizados así obtenidos se diluyeron posteriormente con volúmenes conocidos de tampón tris-ClH debido a la alta concentración de proteínas que presentaban.

Reactivo: Se disuelven 100 mg de azul brillante de Coomassie G-250 en 50 ml de etanol 95% . Posteriormente se añaden 100 ml de ácido fosfórico del 85% y se diluye con agua destilada hasta un volumen final de 1 l, guardándolo en frasco topacio a temperatura ambiente.

Procedimiento.

A alícuotas de 0,1 ml de extracto, conteniendo entre 10 y 100 µg de proteína (diluyendo si es necesario), se añadieron 5 ml de reactivo Bradford y, tras agitar los tubos, se midió la absorbancia a 595 nm después de dos minutos y antes de una hora. Para construir la curva patrón o estándar, se utilizó seroalbúmina bovina (Sigma, fracción V) (20-300 µg de proteína).

7.5. Determinación de nitratos.

Para la determinación de la concentración de nitratos en los tejidos vegetales, se llevaron a cabo una

serie de ensayos previos utilizando tres metodologías diferentes: 1) Método del ácido salicílico de Cataldo et al., (1975); 2) Método de la brucina (Standar Methods, 1975; AOAC Method, 1975); 3) Análisis espectofotométrico en el ultravioleta (Cawse, 1967). Según los resultados obtenidos al comparar los tres métodos, se ha seleccionado la metodología descrita por Cawse (1967) por su elevada sensibilidad además de su facilidad y rapidez en el manejo. Está basada en la medida en el ultravioleta de la absorbancia debida al nitrato, después de eliminar las posibles interferencias por causa de otros iones (sobre todo el nitrito) por tratamiento de las muestras con ácido perclórico y ácido amidosulfónico.

Extracción de nitratos.

La extracción se llevó a cabo en tubos de ensayo de 16 x 180 mm con 10 ml de agua destilada, donde se introdujeron muestras (1 g PF) de material vegetal de los diferentes órganos vegetativos de la planta y se llevaron a baño maría en ebullición durante 10 minutos. A continuación, se dejaron enfriar a temperatura ambiente. De esta forma se extrajo todo el nitrato presente en el tejido (Soares et al., 1985).

Para la elección del tiempo de extracción, se realizaron una serie de ensayos previos en los que se estudió la liberación de nitratos al medio en función del

tiempo de ebullición, 5, 10, 15, 20 y 25 minutos. A partir de 10 minutos de extracción no se detectaron incrementos sustanciales en la valoración de nitratos.

Valoración de nitratos.

Una vez fríos los tubos, se agitaron vigorosamente para homogeneizar y evitar gradientes de concentración, filtrando y centrifugándose posteriormente para eliminar los restos vegetales. A partir del filtrado se toman alícuotas, diluyendo si es necesario, para la valoración de nitratos, siguiendo la técnica de espectrofotometría en el UV (Cawse, 1967).

A alícuotas de 1 ml de filtrado se añade 1 ml de ácido amidosulfónico al 2% (p/v). Tras incubar dos minutos a temperatura ambiente y agitar luego vigorosamente, se añaden 3 ml de ácido perclórico al 6.65% (v/v). Transcurridos 25-30 minutos a temperatura ambiente, se midió la absorbancia de la solución a 210 nm. Para la cuantificación del nitrato presente, se prepara de igual forma a la descrita, una curva patrón con concentraciones conocidas de nitrato empleando como blanco, tanto para la curva de calibrado como para los tubos problema, un tubo con 1 ml de agua destilada.

7.6. Determinación de macronutrientes N, P, K, Ca y Mg.

Para la determinación de macronutrientes en

materia seca, el material vegetal seco y molido (polvo fino y homogéneo) se sometió a un proceso de mineralización por vía húmeda, según la técnica propuesta por Peach y Tracey (1956) y descrita por La Chica et al., (1965; 1973).

7.6.1. Determinación de nitrógeno.

Se valoró el nitrógeno por el método Kjeldahl, utilizando el aparato de Bouat (Bouat y Crouzet, 1965), que permite efectuar simultáneamente la destilación y valoración del amoníaco formado, al reaccionar el mineralizado con NaOH. El arrastre del vapor de amoníaco se efectúa por corriente de aire, lo que permite además vaciar el contenido del matraz colector una vez finalizada la valoración de cada muestra; esto confiere una notable velocidad en el análisis de numerosas muestras.

7.6.2. Determinación de fósforo.

Se basa en la medida colorimétrica del azul de molibdeno obtenido a partir de un complejo fosfomolíbdico, utilizando amidol y sulfito sódico como reductores, siguiendo la técnica descrita por Capitán y Martínez (1954). Al matraz de reacción se le añade una pequeña cantidad de reactivo de Morgan, que contribuye a la estabilidad del color (La Chica et al., 1965).

7.6.3. Determinación de potasio.

Se empleó la técnica de fotometría de llama. La lectura de cada muestra se interpola en la curva patrón construida con las lecturas correspondientes a unos patrones de concentración de potasio conocida.

7.6.4. Determinación de calcio y magnesio.

Se ha empleado la técnica de espectrofotometría de absorción atómica, utilizando la línea 4224 Å (Ca) y 2852 Å (Mg), con llama oxidante aire-acetileno.

El calcio puede formar compuestos difícilmente atomizables en la llama, pudiendo estar sujeta su determinación a errores por la formación de compuestos refractarios. La adición de lantano, usando una llama de aire-acetileno, subsana este inconveniente y permite una medida exacta del calcio (De Waele, 1970).

La determinación de magnesio por espectrofotometría de absorción atómica, no presenta los problemas de interferencias que existen en el caso del calcio y puede determinarse directamente en el mineralizado.

8. ELABORACION DE LOS DATOS Y ESTUDIO ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS.

En el capítulo de resultados, los datos se muestran en diagramas de barras, gráficos y tablas de

medias. En todos los casos, son resúmenes de las tablas que se encuentran en el apéndice y en las que se muestran los datos originales y el análisis estadístico. Dicho análisis estadístico consistió en:

-Análisis de la varianza de una entrada, en aquellos casos en los que sólo se consideró una variable, raza de Rhizobium empleada en la inoculación.

-Análisis de la varianza de doble entrada (ANOVA2), cuando se consideraron dos variables, inoculación con Rhizobium y dosis de nitrato suministrado a la solución nutritiva.

-Test de Duncan para comparar entre sí tratamientos.

-Coeficientes de correlación simple entre variables.

RESULTADOS Y DISCUSION

1. SELECCION DE RAZAS DE RHIZOBIUM. ENSAYO DE INFECTIVIDAD Y EFECTIVIDAD.

La selección de razas de Rhizobium se ha llevado a cabo aislando Rhizobium procedentes de nódulos radicales formados por R. leguminosarum, en plantas de guisante, Pisum sativum cv. Lincoln, abordándose el estudio de la infectividad, o capacidad de formar nódulos, así como de la efectividad, o capacidad de fijar nitrógeno en asociación simbiótica.

Los parámetros determinados han sido la actividad nitrogenasa específica (en µmol C_2H_4 . g^{-1} PS . h^{-1}), número y peso seco de nódulos por planta, peso seco de planta y contenido en nitrógeno orgánico total en planta, cuyos resultados se exponen en la tabla 4. En ella se hallan recopilados los datos correspondientes a cinco tablas del apéndice, de la I a la V, ambas inclusive, en las que se exponen los datos primarios así como el análisis estadístico realizado. Asimismo, se incluyen los resultados correspondientes a los testigos usualmente empleados en este tipo de ensayo: plantas inoculadas con la raza 300 de R. leguminosarum (T-300) y plantas no inoculadas a las que se les suministró nitrógeno combinado (8 mM de NO_3K) (T-N).

Los parámetros determinados en este ensayo, se

Tabla 4. Resultados correspondientes a la actividad nitrogenasa (en µmol C_2H_4 . g^{-1}PS . h^{-1}), número y peso seco de nódulos por planta (en gramos), peso seco de planta (en gramos) y contenido en nitrógeno orgánico (en mg) de plantas de Pisum sativum inoculadas con distintas razas de Rhizobium.

RAZAS	ARA	Nº Nódulos	PS Nódulos	PS Planta	N total
GRC20	165.31	71.83	73.83	3.23	121.47
GRC13	66.08	137.17	156.50	2.67	87.13
GRC17	157.91	138.83	132.67	3.67	142.49
GRC28	251.97	138.83	59.33	1.88	77.88
GRC15	144.49	104.83	85.00	2.24	82.75
GRC16	76.56	159.33	56.33	0.88	19.04
GRC37	129.90	96.33	131.50	4.43	178.74
GRC38	144.33	278.00	181.33	2.96	94.40
GRI7	171.22	68.33	107.67	3.77	163.98
GRI3	172.87	72.67	127.00	3.35	134.34
GRI35	112.24	133.50	49.83	2.86	118.90
GRI20	109.02	80.00	128.17	2.87	121.41
GRI9	212.50	54.17	67.00	2.57	92.08
GRI32	129.56	96.00	95.00	3.16	140.13
GRI24	77.37	81.67	116.00	3.16	134.93
GRI28	204.87	180.83	85.00	2.32	95.82
GRLM25	153.81	134.17	81.83	2.55	109.77
GRLM40	68.80	141.67	92.67	2.82	107.99
GRL2	64.63	280.00	148.00	3.07	118.25
GRL16	74.38	194.67	90.50	3.28	126.68
GRL3	66.79	167.50	119.00	2.91	117.58
GRL11	119 31	229.50	137.50	3.27	132.14
GRL22	70.28	250.00	172.83	4.24	180.85
GRL8	94.82	109.67	123.00	3.62	141.57
GRL25	61.30	136.50	137.33	2.81	112.01
GRL10	82.20	120.33	95.83	3.32	124.25
GRL19	77.44	176.50	95.50	4.65	181.20
GRA19	92.43	164.67	157.00	4.50	188.63
T-300	131.74	232.67	124.17	3.33	130.33
T-N	-	-	-	4.21	148.18
M.D.S.					
0.05	30.11	37.03	32.28	0.63	17.42
0.01	39.80	48.95	42.66	0.83	23.17
0.001	51.29	63.09	54.99	1.08	30.14
N.P.	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001

han relacionado entre sí mediante la determinación de los coeficientes de correlación simple que se exponen en la tabla 5.

El grado de infectividad se ha determinado por el número de nódulos formados por planta. De los 60 cultivos bacterianos ensayados, 28 (expuestos en la Tabla 4) formaron nódulos efectivos, fijadores de nitrógeno, en el cultivar de planta huésped utilizada, mientras que con los 32 restantes la nodulación fue prácticamente nula o bien los nódulos formados eran inefectivos, no fijadores de nitrógeno. Estos nódulos se caracterizan por ser de tamaño pequeño, blanco verdosos y no rosados, características consideradas según Eaglesham et al (1982) y Eaglesham (1985) para nódulos no efectivos. Una elevada proporción de las bacterias aisladas del suelo de Atarfe (66%), Iznalloz (66%) y Loja (75%) formaron nódulos efectivos en Pisum sativum. Sin embargo, de las bacterias aisladas de los suelos de La Malá y Alhama de Granada, sólo el 16% y 8% respectivamente, fueron infectivas para el cultivar de guisante utilizado.

La raza de Rhizobium utilizada como testigo, tipificada y caracterizada (Brewin et al., 1980), presentó valores de nodulación elevados. Sólo las razas GRC38 y GRL2 formaron mayor número de nódulos por planta que la raza testigo (T-300) con diferencias significativas

Tabla 5. Matriz de coeficientes de correlación simple entre variables.

	ARA	Nº Nódulos	PS Nódulos	PS Planta	N total
ARA	1.000				
Nº Nódulos	-0.312	1.000			
PS Nódulos	-0.372	0.458	1.000		
PS Planta	-0.223	0.069	0.512	1.000	
N total	-0.173	0.003	0.442	0.971	1.000

VALOR CRITICO		
0.05	0.01	0.001
0.367	0.470	0.579

(P=0.05). Asimismo, la masa nodular, expresada en mg . planta^{-1}, de las razas ensayadas, fue en general inferior a la obtenida con la raza 300 de R. leguminosarum, con excepción de las razas GRC38, GRL22 y GRA19 que mostraron valores del 146, 139 y 126 % respectivamente respecto a la raza testigo.

El número y peso seco de nódulos por planta están positivamente correlacionados (P=0.05) (Tabla 5). Por otra parte, al comparar los parámetros de nodulación con el peso seco de planta y contenido de nitrógeno orgánico, se observa que la masa nodular se correlaciona con

ambos parámetros (P=0.05) y no el número de nódulos, tal como se señala en un amplio estudio realizado por Kremer y Peterson (1982b) utilizando plantas de judía, lenteja y cacahuete.

Para evaluar la efectividad de la simbiosis en la fijación de nitrógeno, se han considerado básicamente dos parámetros: el peso seco de la planta y el contenido total de nitrógeno reducido.

Las leguminosas noduladas que crecen en un medio sin aporte de nitrógeno combinado, sólo pueden utilizar el nitrógeno fijado en simbiosis con Rhizobium. Así, el nitrógeno orgánico acumulado en la planta, puede ser considerado como el mejor criterio para evaluar la efectividad de las razas de Rhizobium en la fijación de nitrógeno atmosférico (Halliday, 1984). Por otra parte, diversos investigadores (Vincent, 1970; Kremer y Peterson, 1982b; Halliday, 1984; Bedmar et al., 1984), han sugerido que el peso seco de la planta constituye un parámetro adecuado para la medida de la efectividad de una raza de Rhizobium, debido a la correlación altamente significativa de este parámetro con el nitrógeno total acumulado en la planta. Este hecho se observa en los resultados obtenidos en este trabajo, ya que el índice de correlación obtenido entre estos dos parámetros mostró un valor muy elevado (Tabla 5), con una alta significación estadística

(P=0.00[illegible]).

Otros autores, consideran que otro parámetro fisiológico, la superficie foliar, es el más representativo de la capacidad de fijar nitrógeno en la asociación Rhizobium leguminosarum-Pisum sativum (Sadykov et al., 1983; De Jong et al., 1981). Resultados similares encontraron Ligero et al. (1981) en la simbiosis Rhizobium phaseoli-Phaseolus vulgaris. El aumento de superficie foliar implicaría una mayor producción de fotoasimilados que serán transportados, bien a los órganos de reserva, como parece ser que ocurre con los tratamientos con nitrógeno, o bien a órganos reproductores, flores y frutos (Lluch et al., 1983).

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que existe una gran variabilidad en la efectividad de la simbiosis R. leguminosarum-P. sativum en función de la raza utilizada para la inoculación. El peso seco de planta varió desde 0.88 g . planta^{-1} (plantas inoculadas con la raza GRC16), hasta valores superiores a 4 g . planta^{-1}, obtenidos con la inoculación de las razas GRC37, GRL22, GRL19 y GRA19, significativamente superiores a los obtenidos con la raza testigo y similares a las plantas no inoculadas y suministradas con nitrato potásico 8 mM (T-N). Asimismo, las plantas inoculadas con cada una de las cuatro razas anteriormente mencionadas presentaron los

valores máximos de acumulación de nitrógeno reducido, con diferencias altamente significativas (P=0.001) respecto a los dos testigos considerados. Streeter y Hannaway (1988) obtuvieron resultados similares estudiando diversas asociaciones simbióticas Rhizobium-leguminosa. Estos autores encontraron que la efectividad simbiótica en la fijación de nitrógeno varía significativamente en función de la asociación específica Rhizobium-leguminosa, y sugieren que las razas de Rhizobium que se mostraron más efectivas en este tipo de ensayo en cámara de cultivo, son buenos candidatos para posteriores ensayos en condiciones de campo.

En los últimos años se ha generalizado el empleo de la técnica de reducción de acetileno (ARA) como medida de la actividad fijadora de nitrógeno. Maier y Brill (1978) sugirieron el empleo de esta técnica como criterio de efectividad en los ensayos de selección de razas de Rhizobium. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo, ponen de manifiesto que la actividad nitrogenasa, medida mediante el test de reducción de acetileno, no se correlaciona con la efectividad de la simbiosis, determinada por el contenido total de nitrógeno y peso seco de la planta (Tabla 5). Las razas GRC28, GRI9 y GRI28, que presentaron elevados valores de ARA, se mostraron poco efectivas en la fijación de nitrógeno. Inversamente, razas muy efectivas como la GRL22, GRL19 y GRA19, presentaron

valores de ARA bajos. Pacovsky et al. (1984) estudiando diversas asociaciones simbióticas Rhizobium phaseoli-Phaseolus vulgaris obtuvieron resultados similares y concluyeron que la evaluación de la efectividad simbiótica de razas de Rhizobium, basada en la técnica de reducción de acetileno, sólo será significativa en conjunto con la determinación del nitrógeno asimilado.

Viands et al. (1981) y Bedmar et al. (1984) comprobaron la existencia de una gran variabilidad en los valores de reducción de acetileno entre cultivares, poblaciones y clones. Estos autores sugieren que la medida de la actividad nitrogenasa sólo podría ser útil, y con limitaciones, en casos de medida puntual de esta actividad o en investigaciones con bacterias fijadoras de nitrógeno en vida libre, no siendo un criterio válido en la selección de razas de Rhizobium. En el caso del crecimiento de las plantas (peso seco de planta), se mide un efecto acumulado a lo largo del tiempo, mientras que la técnica de reducción de acetileno es puntual y se realiza en un momento determinado del desarrollo de la asociación bacteria-planta. Incluso cuando los resultados obtenidos con la técnica de reducción de acetileno se correlacionen con el peso de planta y acumulación de nitrógeno orgánico, es necesario estudiar estos dos últimos parámetros para obtener resultados concluyentes en el estudio de la efectividad de la simbiosis Rhizobium-leguminosa

(Thompson, 1988).

En un reciente trabajo, Smith y Hume (1987) consideran que el factor de conversión C_2H_4/N_2, que se usa para calcular la cantidad de nitrógeno fijado a partir de las medidas de reducción de acetileno a etileno, puede verse modificado por diversos factores: a) producción de H_2 concomitante con la fijación de nitrógeno (Postgate, 1982; Simpson y Burris, 1984); b) la incubación de las raíces noduladas en presencia de acetileno deprime la actividad nitrogenasa en algunas leguminosas (Minchin et al., 1983); c) la extracción de las raíces del suelo y su separación de la parte aérea, probablemente afecta de forma adversa al funcionamiento del nódulo, contribuyendo a una subestimación de la actividad nitrogenasa (Smith y Hume, 1987).

2. ENSAYO DE COMPETITIVIDAD.

La utilización de inoculantes bacterianos en la práctica agrícola para mejorar la producción de los cultivos de leguminosas, justifica la selección de razas de Rhizobium bien adaptadas a cultivares específicos de planta húesped y condiciones ambientales locales. El éxito de un inoculante bacteriano en el suelo va a depender, entre otros factores, de la capacidad competitiva del inoculante frente a la población de Rhizobium en el suelo (Smith, 1987). Recientemente, Dowling et al. (1988) han

indicado que la competición entre razas de Rhizobium para formar nódulos radicales en leguminosas, puede considerarse como el factor más importante que limita el éxito de la aplicación de inoculantes bacterianos en la práctica agrícola.

La finalidad de este tipo de ensayo ha sido estudiar la capacidad competitiva para la formación de nódulos, de las razas de Rhizobium que mostraron mayor efectividad en la fijación de nitrógeno (ensayo anterior), frente a las poblaciones autóctonas de Rhizobium presentes en el suelo. El ensayo se ha realizado utilizando como planta huésped Vicia faba minor cv. Alameda (Tabla 6) y Pisum sativum cv. Lincoln (Tabla 7), cultivadas en dos suelos diferentes, uno procedente de la zona agrícola de Iznalloz y otro de Alhama de Granada.

El diseño experimental de grupos de inoculación utilizado (apartado 6.3.1 de Material y Métodos) permite comparar, al menos parcialmente, la capacidad competitiva entre las distintas razas de Rhizobium ensayadas. Los resultados se expresan mediante el coeficiente de competitividad, definido como el % de nódulos formados por una raza.

La capacidad competitiva de las razas de Rhizobium ensayadas varió notablemente en función del suelo y especie de leguminosa utilizada como planta

Tabla 6. Coeficiente de competitividad, expresado en % de nódulos formados en plantas de haba (Vicia faba minor cv. Alameda), para las razas dentro de cada grupo de inoculación (GI, GII, GIII, GIV, GV y GVI) en los suelos correspondientes a las zonas agrícolas de Alhama de Granada e Iznalloz. El ensayo de competitividad se llevó a cabo en condiciones de invernadero.

		SUELOS	
GRUPOS	RAZAS	ALHAMA	IZNALLOZ
GI	GRC20	36.6	5.4
	GRL16	3.3	-
	GRI32	10.0	5.4
GII	GRI7	62.7	52.3
	GRL19	-	-
	GRC17	-	-
GIII	GRI24	2.1	21.9
	300	5.3	2.4
	GRL11	2.1	19.5
GIV	GRL22	42.5	10.0
	GRLM25	-	-
	GRC38	4.2	-
GV	GRL8	58.5	35.7
	GRC37	-	2.3
	GRLM40	14.6	7.1
GVI	GRA19	77.5	71.7
	GRI3	-	-
	GRL10	7.5	2.5

huésped. En los experimentos realizados con guisante (Tabla 7), los rizobios autóctonos del suelo formaron la mayoría o todos los nódulos en ambos suelos. De las 18 razas ensayadas, sólo el 28% formaron nódulos en plantas de guisante cuando se inocularon en el suelo de Alhama y el 33% en el suelo de Iznalloz, oscilando los valores del coeficiente de competitividad entre el 2-27% y 2-19%, en los dos suelos respectivamente. Sin embargo, en haba, los resultados obtenidos de competitividad son considerablemente superiores a los de guisante. El 72% de las razas utilizadas formaron nódulos en el suelo de Alhama de Granada y el 67% en el suelo de Iznalloz, estando los valores del coeficiente de competitividad comprendidos entre 2-77% y 2-71% en los dos suelos respectivamente.

Las razas de Rhizobium que presentaron mayor coeficiente de competitividad, cuando se inocularon en plantas de haba (Tabla 6), son la GRI7 (62.7%), GRI8 (58.5%) y GRA19 (77.5%) que formaron más del 50% de los nódulos en el suelo de Alhama de Granada, mientras que en el suelo de Iznalloz, sólo las razas GRI7 y GRA19 superaron este porcentaje. Valores próximos se obtuvo con las razas GRC20 (36.6%) y GRL22 (42.5%) en el suelo de Alhama de Granada y GRL8 (35.7%) en el suelo de Iznalloz.

Un hecho a destacar, es que razas que se mostraron muy efectivas en la fijación de nitrógeno en simbiosis

Tabla 7. Coeficiente de competitividad, expresado en % de nódulos formados en plantas de guisante (Pisum sativum cv. Lincoln), para las razas de cada grupo de inoculación (GI, GII, GIII, GIV, GV y GVI) en los suelos correspondientes a las zonas agrícolas de Alhama de Granada e Iznalloz. El ensayo de competitividad se llevó a cabo en condiciones de invernadero.

		SUELOS	
GRUPOS	RAZAS	ALHAMA	IZNALLOZ
GI	GRC20	3.8	4.6
	GRL16	-	-
	GRI32	-	-
GII	GRI7	-	19.5
	GRL19	-	-
	GRC17	-	-
GIII	GRI24	5.4	2.2
	300	27.0	-
	GRL11	-	-
GIV	GRL22	-	-
	GRLM25	-	-
	GRC38	-	-
GV	GRL8	-	2.9
	GRC37	-	-
	GRLM40	-	-
GVI	GRA19	10.0	16.2
	GRI3	2.4	2.3
	GRL10	-	-

con Pisum sativum (p.e. GRL19), son muy poco competitivas cuando se inoculan en el suelo, tanto en plantas de haba como en guisante. Aunque algunos autores (Marques Pinto et al., 1974; Labandera y Vincent, 1975) han indicado que las razas más efectivas pueden ser también las más competitivas, de forma que la planta huésped puede ejercer un efecto preferencial para la infección por razas más efectivas, sin embargo, también se ha descrito que en algunos casos, razas inefectivas eran más competitivas que razas muy efectivas (Franco y Vincent, 1976; Johnston y Beringer, 1976). Amarger (1981), en un estudio realizado con mutantes de Rhizobium que habían perdido la capacidad de fijar nitrógeno, concluyó que la propiedad simbiótica competitividad, es totalmente independiente de la efectividad y que puede permanecer inalterada tras la mutación provocada para perder la capacidad de fijar nitrógeno.

Según la actual clasificación de Rhizobium (Jordan, 1984), R. leguminosarum biovar. vicieae agrupa aquellos rizobios que infectan a Pisum, Vicia y Lens. Las razas de Rhizobium ensayadas han sido aisladas de nódulos radicales de Vicia faba minor cv. Alameda, excepto la raza 300 de Rhizobium leguminosarum (Brewin et al., 1980), obtenida de una colección y aislada de nódulos radicales de Pisum sativum. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el origen de las razas, es decir, la planta

huésped de la cual han sido aisladas, puede influir notablemente en la capacidad competitiva de éstas cuando se inoculan en el suelo. En general, las razas aisladas de nódulos radicales de haba fueron más competitivas cuando se utilizó esta leguminosa como planta huésped. Por otra parte, la raza 300 fue poco competitiva cuando se inoculó en plantas de haba, en los dos suelos utilizados, mientras que en guisante alcanzó el valor más alto de coeficiente de competitividad (27%) en el suelo de Alhama de Granada.

En diversas investigaciones se ha puesto de manifiesto que pueden existir diferencias en la competitividad de razas de Rhizobium en función del cultivar de planta huésped empleado (McLoughlin y Dunican, 1985; Arsac y Cleyet-Marel, 1986), de tal forma que una planta determinada puede seleccionar preferentemente una raza específica presente en una población bacteriana compleja. En este trabajo se observa este efecto utilizando plantas de guisante y plantas de haba, frete a las cuales las razas bacterianas ensayadas presentan diferente coeficiente de competitividad. Aunque no se conoce con exactitud cómo puede afectar la planta hospedadora sobre la competitividad de las razas de Rhizobium, Djordjevic et al. (1985) evidenciaron que los genes que determinan la especificidad para la planta huésped, también afectan a la competitividad.

Los datos recogidos en este trabajo y reflejados en las tablas 6 y 7 comparten lo concluido por Dowling y Broughton (1986) que consideran que la competitividad entre razas de Rhizobium para la formación de nódulos en plantas leguminosas, constituye un proceso complejo en el que interaccionan tres factores principalmente: el genoma del procariota, el genoma del eucariota y el ambiente. De la interacción de estos tres factores dependerá el éxito de la inoculación en condiciones de campo. En un estudio sobre la competitividad de tres razas de Rhizobium para la formación de nódulos en Cicer arietinum cuando eran inoculadas en dos suelos diferentes, Somasegaran et al. (1988) demostraron que la capacidad competitiva estaba influenciada por el medio de cultivo utilizado para el crecimiento de Rhizobium, el genotipo de planta huésped, las diferencias intrínsecas entre distintas razas de Rhizobium y el tipo de suelo utilizado.

Los estudios realizados por Martensson et al (1988) sobre competición entre las razas inoculadas y las autóctonas del suelo, usando el ensayo ELISA (Enzyme-linked inmunosorbent assay), concluyen que, aunque es útil incrementar los niveles de inoculantes, no es obligatorio que todos los nódulos deban proceder de las razas inoculadas para obtener mejoras en la cosecha. Por tanto, los resultados de nodulación obtenidos en los ensayos de competitividad realizados en este trabajo, podrían estar

entre los límites permitidos para conseguir optimizar la cosecha.

Las poblaciones de rizobios del suelo, incluyendo las razas inefectivas, pueden ser altamente competitivas para la formación de nódulos, principalmente debido a su adaptación a las condiciones ambientales locales (Meade et al., 1985). Esta puede ser la causa, en muchos casos, del poco éxito obtenido con el empleo de inoculantes bacterianos. Debido a esto, es conveniente la utilización de inoculantes obtenidos con razas autóctonas de Rhizobium bien adaptadas a un ambiente determinado y para una planta específica (Dowling et al., 1988).

3. ESTUDIO DE LA INTERACCION ENTRE LA FERTILIZACION NITROGENADA Y LA SIMBIOSIS RHIZOBIUM-LEGUMINOSA.

3.1. Análisis de crecimiento.

En la figura 1 se exponen los resultados correspondientes al crecimiento, determinado por el peso seco de parte aérea y frutos, de plantas de guisante (Pisum sativum cv. Lincoln) inoculadas con razas silvestres de Rhizobium (GRL19, GRC37, GRA19 y GRL22), para todos los tratamientos (2, 4, 6 y 8 mM de NO_3K) y recogidas ensayadas (primera recogida = diagrama A; segunda recogida = diagrama B; tercera recogida = diagrama C). En ella se recopilan los datos correspondientes a cinco

tablas del apéndice, de la VI a la X, ambas inclusive, en las que se exponen los datos primarios, así como el análisis estadístico realizado.

Según este estudio estadístico, las tres fuentes de variación consideradas, nivel de nitrato (N), inoculación con Rhizobium (R) e interacción N x R, presentan un alto grado de significación, en los tres estadíos de crecimiento estudiados.

En las plantas que sólo disponen del nitrógeno combinado del medio (Testigos no inoculados), la producción vegetal aumenta progresivamente al incrementar el nivel de nitrato del medio desde 2 a 8 mM, en los tres estadíos de crecimiento. Sin embargo, en las plantas inoculadas, la respuesta a la fertilización nitrogenada sigue un comportamiento distinto, variando en función de la raza empleada en la inoculación y del estadío de crecimiento.

En la primera recogida, las diferencias observadas en la producción vegetal se deben fundamentalmente al nivel de nitrato del medio, con un 92% del efecto sobre el peso seco de parte aérea, mientras que la inoculación con razas de Rhizobium representó sólo un 6% del efecto. En la etapa juvenil, las diferencias apreciadas en el peso seco de parte aérea, entre plantas inoculadas y no inoculadas, no son muy notables, probablemente debido a que las plántulas pueden absorber el nitrógeno combinado del medio

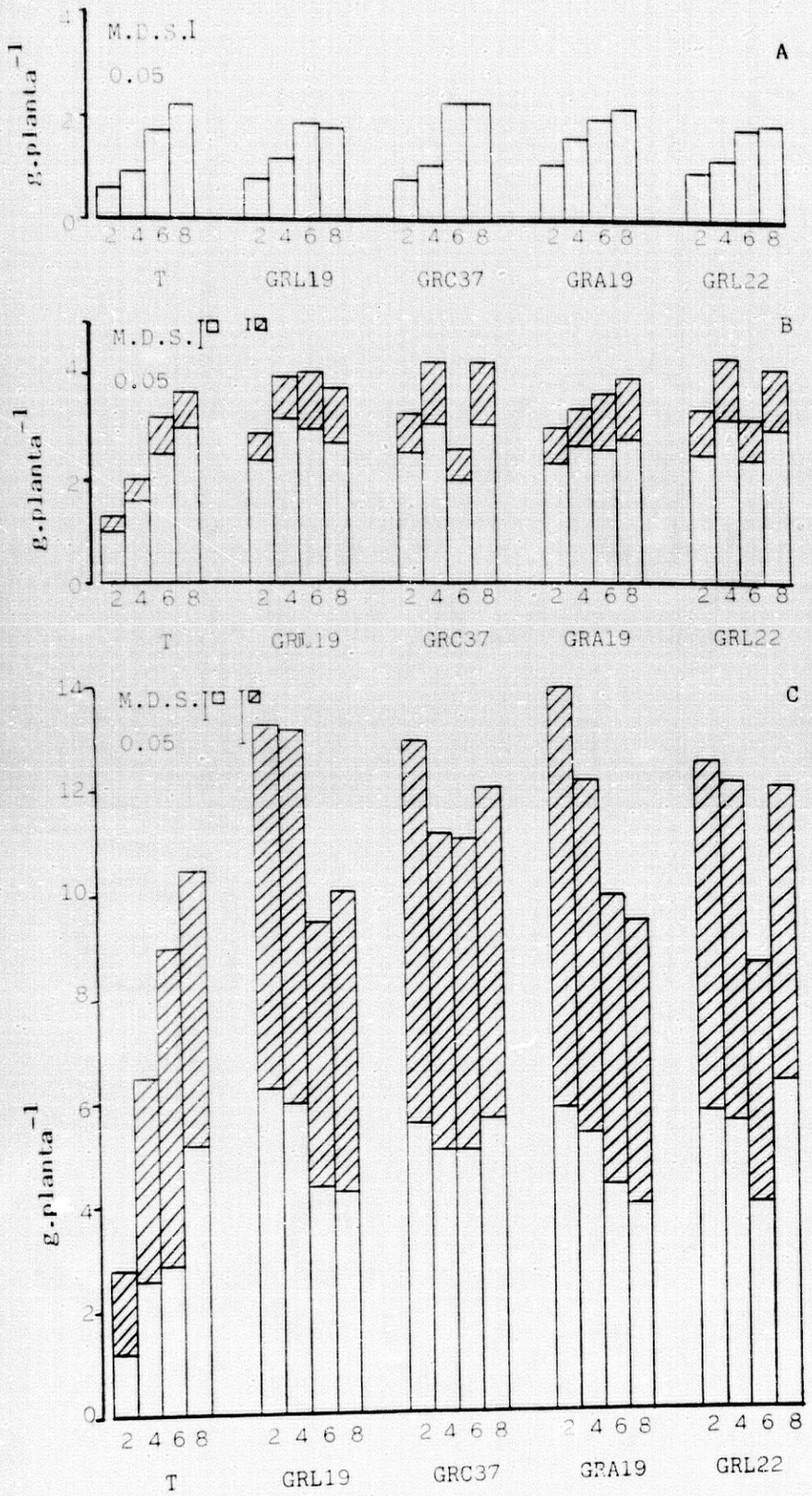

Fig. 1. Peso seco de parte aérea (barra en blanco) y frutos (barra rayada) de plantas de guisante, inoculadas con razas de Rhizobium (GRL19, GRC37, GRA19 y GRL22) y testigos no inoculados (T), fertilizadas con cuatro niveles de nitrato (2, 4, 6 y 8 mM de NO_3K). Primera recogida (A), segunda recogida (B) y tercera recogida (C).

pocos días después de la germinación de las semillas, mientras que la formación de nódulos radicales efectivos para fijar el nitrógeno atmosférico, requiere varias semanas (Beusichem y Langelan, 1984).

Al avanzar la edad del cultivo, se observa un aumento progresivo del efecto de la inoculación con Rhizobium sobre la producción vegetal (34% y 66% en la segunda y tercera recogida respectivamente) y una menor incidencia de la fertilización nitrogenada (46% y 13% en la segunda y tercera recogida respectivamente). Asimismo, el efecto de la tercera variable considerada, interacción N x R, sobre la producción vegetal también aumentó desde un 2% en la primera recogida hasta un 20% en la tercera.

Los resultados observados en la figura 1 ponen de manifiesto que los niveles de nitrato 2 y 4 mM son limitantes para el crecimiento cuando las plantas no forman una simbiosis efectiva. Resultados similares encontraron Vance y Heichel (1981) y Lluch et al (1987) utilizando leguminosas forrajeras.

En la segunda recogida, realizada en floración e inicio de fructificación, se observa que la inoculación con las cuatro razas de Rhizobium empleadas, incrementó considerablemente el peso seco de parte aérea respecto a los testigos no inoculados, aproximadamente el 240% con el nivel 2 mM de nitrato y el 185% con el nivel 4 mM. Cuando

las plantas disponen de nitrato 6 mM, sólo la inoculación con la raza GRL19 incrementó el peso seco de parte aérea respecto al testigo no inoculado, mientras que a 8 mM de nitrato no se observan diferencias significativas entre plantas inoculadas y testigos no inoculados. Estas dosis de nitrógeno pueden ser consideradas como una colaboración de lujo en la nutrición nitrogenada de leguminosas inoculadas (Beusichem, 1982).

En la tercera recogida, el efecto de la inoculación con Rhizobium sobre la producción vegetal alcanza el nivel máximo, acentuándose las diferencias existentes entre plantas inoculadas y testigos no inoculados, así como las diferencias entre las distintas razas empleadas. Por tanto, se puede suponer que la actividad fijadora de nitrógeno depende de la etapa de crecimiento de la planta (Hardy y Havelka, 1975). Con las dosis de nitrato 2, 4 y 6 mM, la inoculación con las cuatro razas de Rhizobium ensayadas incrementó el rendimiento en materia seca respecto a los testigos no inoculados, siendo estos incrementos máximos en el nivel 2 mM (>450%) y mínimos en el nivel 6 mM (>140%). Cuando la dosis de nitrato en el medio fue 8 mM, las plantas inoculadas con las razas GRC37 y GRL22 no presentaron diferencias significativas en el peso de parte aérea frente al testigo 8 mM no inoculado. Sin embargo, la inoculación con las razas GRL19 y GRA19 disminuye la producción vegetal frente al testigo

no inoculado 8 mM.

El efecto negativo de la inoculación en el rendimiento de los cultivos puede ser explicada teniendo en cuenta los altos requerimientos energéticos de los sistemas fijadores de nitrógeno en comparación con la reducción de nitratos (Pate et al., 1979). En las plantas fijadoras de nitrógeno se requiere energía para la formación y mantenimiento de los nódulos. Como a elevados niveles de nitrógeno combinado la fijación está prácticamente inhibida mientras que la nodulación está parcial, pero no totalmente inhibida (Figura 3), puede existir un consumo inútil de energía en la formación y mantenimiento de nódulos inefectivos (Oghoghorie y Pate, 1971).

Como parámetro de cosecha, se ha determinado el peso seco de semillas, expresado en g . planta^{-1}, para todos los tratamientos ensayados y en la tercera recogida efectuada, que coincide con el periodo de maduración fisiológica y senescencia del cultivo, cuyos resultados se exponen en la figura 2. Los datos primarios relativos a esta figura, sometidos a un análisis estadístico adecuado, se hayan expuestos en la tabla XI del apéndice.

Las diferencias observadas en la cosecha se deben principalmente a la interacción N x R, así como a la inoculación con razas de Rhizobium, que fueron responsables respectivamente del 48% y 27% del efecto sobre el

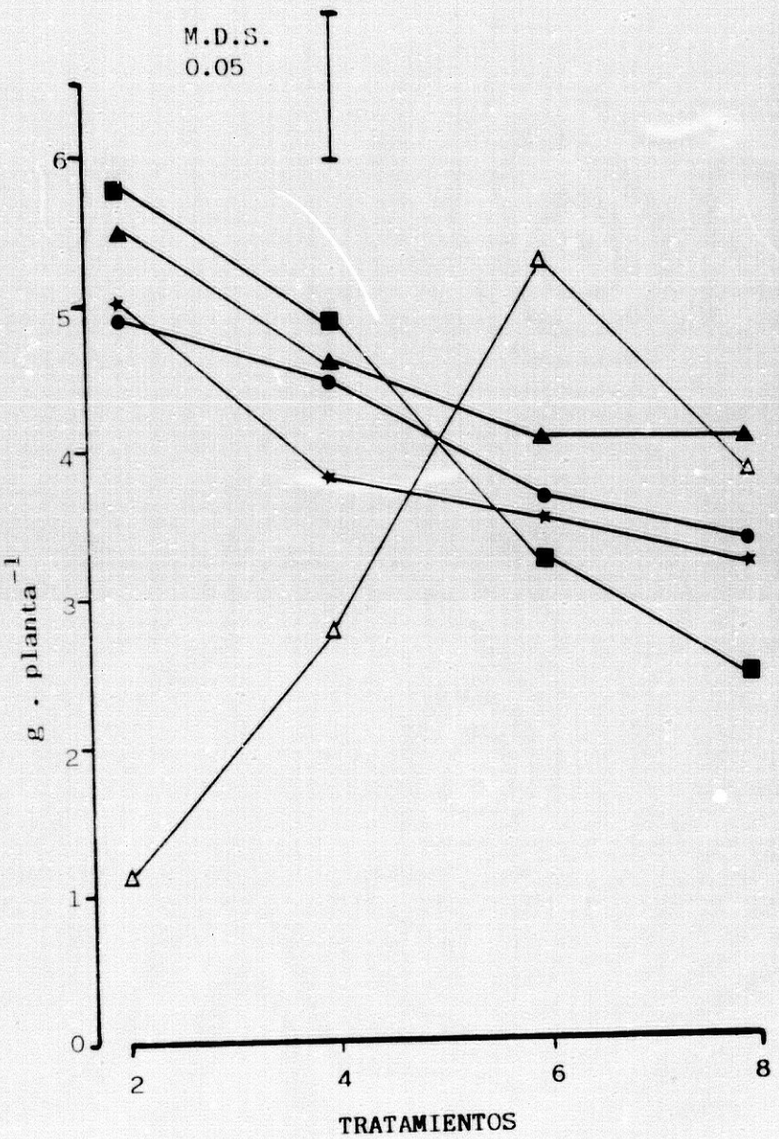

Fig. 2. Peso seco de semillas de plantas de Pisum sativum inoculadas con distintas razas de Rhizobium, GRL19 (●), GRC37 (▲), GRA19 (■) y GRL22 (★), testigos no inoculados (Δ) y fertilizadas con cuatro niveles de nitrato (2, 4, 6 y 8 mM de NO_3K). Tercera recogida.

peso seco de semillas/planta. Estos resultados indican que en cualquier programa de mejora de la simbiosis Rhizobium-leguminosa, el estudio de la interacción entre la fertilización nitrogenada y las razas de Rhizobium a utilizar, es de capital importancia.

Los resultados de cosecha obtenidos sugieren que existe una interacción positiva entre pequeños niveles de nitrógeno combinado e inoculación con razas efectivas de Rhizobium. Con niveles bajos de nitrato (2 y 4 mM), la inoculación con cada una de las cuatro razas de Rhizobium ensayadas, incrementó significativamente la cosecha respecto a las plantas no inoculadas, obteniéndose los resultados máximos con la dosis más baja de nitrógeno combinado (2 mM), incluso superiores o similares a los alcanzados en las plantas no inoculadas y fertilizadas con niveles altos de nitrato (6 y 8 mM).

Se ha demostrado que las leguminosas grano, soja (Thibodeau y Jaworski, 1975), judía (Franco et al., 1979), guisante (De Jong et al., 1982) y garbanzo (Rawstorne et al., 1985), pueden beneficiarse del efecto complementario de los procesos de fijación de nitrógeno y reducción de nitratos. De hecho, aunque la capacidad de las leguminosas para formar simbiosis efectivas con Rhizobium reducen sus requerimientos por el nitrógeno del suelo, el máximo rendimiento no puede alcanzarse en ausencia de nitrógeno

combinado (Hageman, 1979).

De forma similar a lo observado en el peso seco de parte aérea (Figura 1), con elevados niveles de nitrato (6 y 8 mM), no se aprecia un efecto positivo de la inoculación, obteniéndose valores de cosecha similares o inferiores a los alcanzados con los testigos no inoculados. En general, al incrementar el nivel de nitrato en el medio, las plantas inoculadas y testigos no inoculados siguen un comportamiento totalmente diferente, mientras en las primeras la cosecha disminuye progresivamente al aumentar el nivel de nitrato en el medio, en las segundas aumenta.

En la tabla 8 se hayan expuestos los resultados relativos a la relación peso seco de raíz/parte aérea (R/PA), de plantas de guisante para los distintos tratamientos y recogidas ensayadas. Dichos resultados se han obtenido a partir de los datos expuestos en las tablas VI, VII, VIII (peso seco de parte aérea), XII, XIII y XIV (peso seco de la raíz) del apéndice.

El tamaño del sistema radical puede condicionar la capacidad de absorción de la raíz, estando influenciado por el tipo de fertilización y por la fijación de nitrógeno (Thornley, 1972). En las leguminosas, la presencia de nódulos en las raíces añade una complicación al problema; de hecho, los sistemas radicales nodulados parecen ser metabólicamente más activos (Ryle et al., 1978) que los

Tabla 8. Relación peso seco de raíz/parte aérea de plantas de Pisum sativum cv. Lincoln inoculadas con razas de Rhizobium y testigos no inoculados (T), para los cuatro tratamientos (2, 4, 6 y 8 mM de NO_3K) y recogidas ensayadas.

			RAZAS			
RECOG.	Tratam.	T	GRL19	GRC37	GRA19	GRL22
1ª	2	0.78	0.55	0.49	0.39	0.46
	4	0.69	0.41	0.43	0.36	0.42
	6	0.56	0.27	0.24	0.28	0.32
	8	0.44	0.30	0.23	0.21	0.26
2ª	2	0.55	0.29	0.35	0.37	0.28
	4	0.65	0.30	0.34	0.28	0.35
	6	0.46	0.37	0.38	0.40	0.37
	8	0.41	0.30	0.36	0.33	0.40
3ª	2	0.98	0.34	0.32	0.42	0.37
	4	0.66	0.43	0.47	0.35	0.39
	6	0.50	0.27	0.32	0.26	0.31
	8	0.27	0.32	0.28	0.46	0.31

sistemas radicales que carecen de nódulos y utilizan el nitrógeno combinado. Esto indica que las leguminosas noduladas poseen generalmente un sistema radical distinto cualitativa y cuantitativamente, con una relación R/PA mayor que en plantas que crecen en medio con nitrato (Ryle et al., 1981).

En los resultados expuestos en la tabla 8, se observa que la relación R/PA se ve modificada con el nivel de nitrato presente en la solución nutritiva y con la ino-

culación de razas efectivas de Rhizobium. Al incrementar la dosis de nitrato, disminuye dicha relación, alcanzándose los valores máximos a 2 y 4 mM y mínimos a 6 y 8 mM. Este efecto se pone de manifiesto claramente en los testigos no inoculados durante las tres recogidas efectuadas. Sin embargo, en las plantas inoculadas, sólo se observa este comportamiento durante la etapa juvenil del cultivo, cuando las plantas utilizan principalmente el nitrógeno combinado del medio.

Al observar la relación R/PA se evidencia que cuando en el medio existen niveles limitantes de nitrógeno combinado, el sistema radical responde aumentando de tamaño, probablemente para incrementar la superficie de absorción. Sin duda, esto se va a traducir en un mayor consumo de fotosintato (Schubert, 1986) que no podrá ser utilizado para el crecimiento de los órganos aéreos, tal como se pone de manifiesto en el peso seco obtenido en estas plantas (Figura 1). De esta forma, el valor máximo (0.98) de la relación R/PA se alcanzó en las plantas no inoculadas suministradas con 2 mM de nitrato y en el periodo final del cultivo, cuando la demanda por este nutriente es máxima, debido a la formación de los frutos.

La relación R/PA parece reflejar el equilibrio entre las diversas actividades de raíz y parte aérea en el ambiente en el cual crecen las plantas. Una deficiencia de

nitrógeno incrementa la relación R/PA, mientras que cuando las plantas reciben altos niveles de nitrógeno, esta relación puede disminuir (Clement et al., 1978). La inoculación bacteriana puede afectar el desarrollo radical que modificaría la relación R/PA, efecto descrito en bibliografía por Goodlass y Smith (1979).

En general, las plantas noduladas presentan una relación R/PA menor que sus respectivos testigos no inoculados. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Ligero (1984) estudiando la simbiosis Rhizobium meliloti-Medicago sativa, pudiendo estar esto relacionado con la mayor liberación de etileno endógeno por parte del sistema radical nodulado, que inhibe el desarrollo radical (Ligero et al., 1986).

Se ha cuestionado si existen o no cambios morfológicos en el sistema radical asociados con la asimilación de nitrógeno combinado del suelo (Sprent, 1984). Existen algunas evidencias que sugieren que el nitrato estimula la formación de raíces laterales, lo cual podría aumentar el área de absorción del ion, de forma que las plantas noduladas presentan un menor desarrollo del sistema radical que las que sólo disponen del nitrato del medio, efecto evidenciado en este trabajo. Sin embargo, también se han obtenido resultados contrarios en plantas noduladas de trébol que presentaban una relación R/PA mayor que plantas

que crecen en medio con nitrato (Ryle et al., 1981).

3.2. Desarrollo de la nodulación y actividad nitrogenasa.

Para estudiar el efecto de los cuatro niveles de nitrato ensayados (2, 4, 6 y 8 mM de NO_3K) sobre la nodulación, se ha determinado el peso seco de nódulos cuyos resultados se exponen en la figura 3 (Diagramas A y B). Asimismo, se ha estudiado el efecto del nitrato sobre la actividad nitrogenasa (Diagrama C), medida mediante la técnica de reducción de acetileno (ARA). En dicha figura se recogen los datos originales que están expuestos en las tablas XV, XVI y XVII del apéndice.

En esta figura se observa que tanto el peso seco de nódulos (Diagramas A y B) como la actividad nitrogenasa (Diagrama C), disminuyen progresivamente al aumentar el nivel de nitrato presente en la solución nutritiva desde 2 a 8 mM.

Si se comparan los resultados de nodulación obtenidos cuando las plantas disponen de nitrato en el medio, con los expuestos en la tabla 1 (plantas crecidas con solución nutritiva libre de nitrógeno), se puede apreciar que existe un efecto beneficioso de la adición de bajos niveles de nitrato sobre la masa nodular obtenida con la inoculación de las razas GRL19 y GRC37. Sin embargo, la raza GRL22 se muestra más sensible al

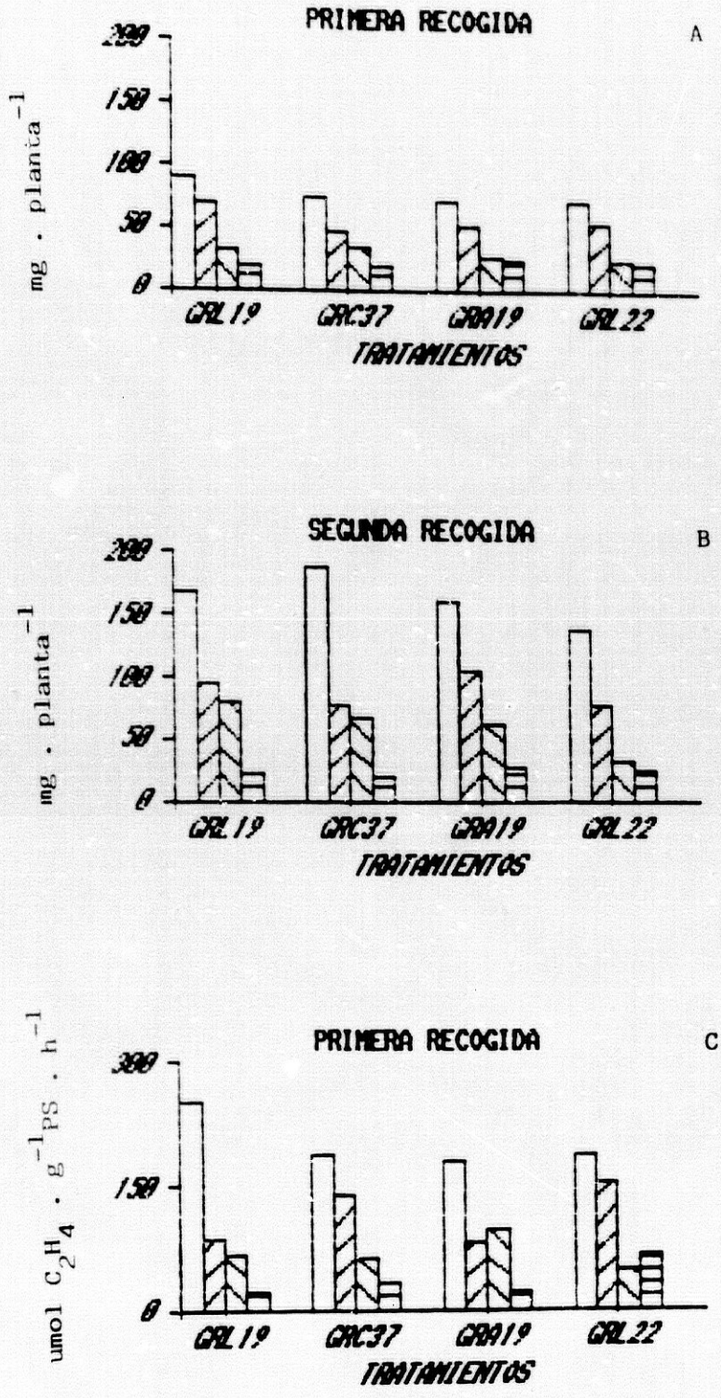

Fig. 3. Peso seco de nódulos (A y B) y actividad nitrogenasa específica (C) de plantas de guisante inoculadas con razas de Rhizobium (GRL19, GRC37, GRA19 y GRL22), en los cuatro tratamientos ensayados, 2 (□), 4 (▨), 6 (▧) y 8 (▤) mM de NO_3K.

nitrógeno combinado, apreciándose un descenso en la nodulación, incluso con 2 mM de nitrato. Al incrementar la dosis de nitrógeno en el medio de cultivo desde 2 a 4 mM, se observa un brusco descenso en el peso seco de nódulos, en general en las cuatro razas de Rhizobium ensayadas, siendo las razas GRL19 y GRA19 las que obtuvieron mayor peso seco de nódulos, probablemente debido a una mayor tolerancia al nitrógeno combinado.

En numerosas investigaciones se ha estudiado el efecto negativo del nitrógeno combinado sobre la simbiosis Rhizobium-leguminosa. Así, se ha descrito que puede inhibir el proceso de nodulación actuando en distintas etapas de ésta (Munns, 1968; Chen y Phillips, 1977; Wong, 1977; Dazzo y Brill, 1978; Houwaard, 1980; Truchet y Dazzo, 1982; Streeter, 1985) y la actividad nitrogenasa (Oghoghorie y Pate, 1971; Rigaud et al., 1973; Pagan et al., 1977; Trinchant y Rigaud, 1980; 1981). Sin embargo, también se ha descrito que pequeños niveles de nitrógeno combinado, amonio y nitrato, pueden tener un efecto positivo sobre la nodulación y fijación de nitrógeno en la simbiosis Rhizobium leguminosarum-Pisum sativum (Bethlenfalvay et al., 1978).

Mientras bajas concentraciones de nitrato pueden estimular la formación, crecimiento y/o actividad nitrogenasa, concentraciones superiores a 2 mM, aproximadamente,

deprimen la formación y crecimiento nodulares así como la actividad nitrogenasa, en proporción a la cantidad de nitrato suministrado (Streeter, 1986). Sin embargo, en este estudio se observa que la sensibilidad al nitrato presente en el medio, varía según la raza de Rhizobium utilizada en la inoculación, presentando las razas GRL19 y GRA19 una tendencia a ser más tolerantes a niveles medios de nitrato (4 y 6 mM), mientras la raza GRL22 se muestra muy sensible, resultando inhibida incluso en presencia de nitrato 2 mM.

3.3. Determinaciones bioquímicas.

Para la determinación de la actividad nitrato reductasa (NRA), se pueden utilizar dos tipos de ensayo in vivo a fin de determinar la actividad potencial (ensayo + NO_3^-) y la real (ensayo - NO_3^-). El ensayo in vivo + NO_3^- puede considerarse como un indicador de la actividad nitrato reductasa en el tejido cuando el nitrato y el poder reductor no son limitantes (Radin, 1978). Sin embargo, el ensayo in vivo - NO_3^- es considerado como el mejor método de estimación de la actividad nitrato reductasa in situ del tejido (Andrews et al., 1984).

En el presente trabajo se ha utilizado el ensayo in vivo - NO_3^- para determinar la actividad in situ del tejido. Dicho ensayo se ha llevado a cabo en dos etapas de crecimiento del cultivo, etapa juvenil y etapa de flo-

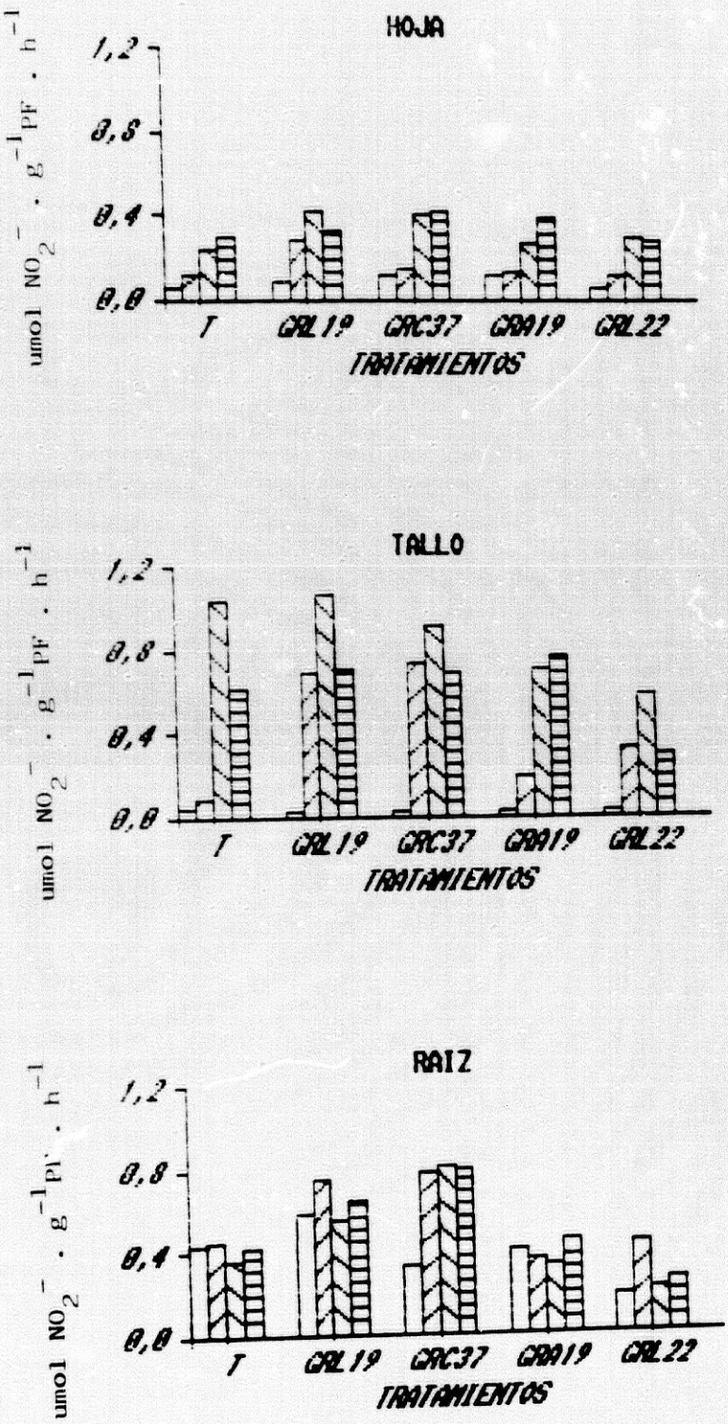

Fig. 4. Actividad nitrato reductasa, ensayo in vivo - NO_3^-, en hoja, tallo y raíz de plantas de guisante inoculadas con razas de Rhizobium (GRL19, GRC37, GRA19 y GRL22) y testigos no inoculados (T), para los cuatro niveles de nitrato ensayados, 2 (□), 4 (▨), 6 (▧) y 8 (▤) mM de NO_3K. Primera recogida.

ración. Los datos correspondientes a estas determinaciones se muestran en los diagramas de barras de las figuras 4 y 5 respectivamente, en las que se exponen los resultados de actividad nitrato reductasa en hoja, tallo y raíz, expresados en µmol NO_2^- . g^{-1} PF . h^{-1}. Estos datos proceden de 6 tablas del apéndice, de la XVIII a la XXIII, ambas inclusive, en las que se puede observar, además de los datos primarios, la media de las 4 repeticiones, el análisis de la varianza y las mínimas diferencias significativas entre medias.

Las diferencias observadas para la actividad nitrato reductasa en los órganos aéreos, hoja y tallo, son debidas fundamentalmente al efecto del nivel de nitrato presente en la solución nutritiva. Así, en hoja dicho efecto es de un 88% y 98% y en tallo un 86% y 96%, respectivamente para los dos estadíos de crecimiento considerados (primera y segunda recogida). Sin embargo, en raíz el efecto de la inoculación con Rhizobium fue más notable, con un 65% y 13% del efecto sobre la actividad nitrato reductasa radical, en la primera y segunda recogida respectivamente.

En los órganos aéreos, tallo y hoja, se observa que la actividad nitrato reductasa varió notablemente en función del nitrato suministrado en la solución nutritiva (Andrews, 1986). Cuando el nivel de nitrato en el medio es

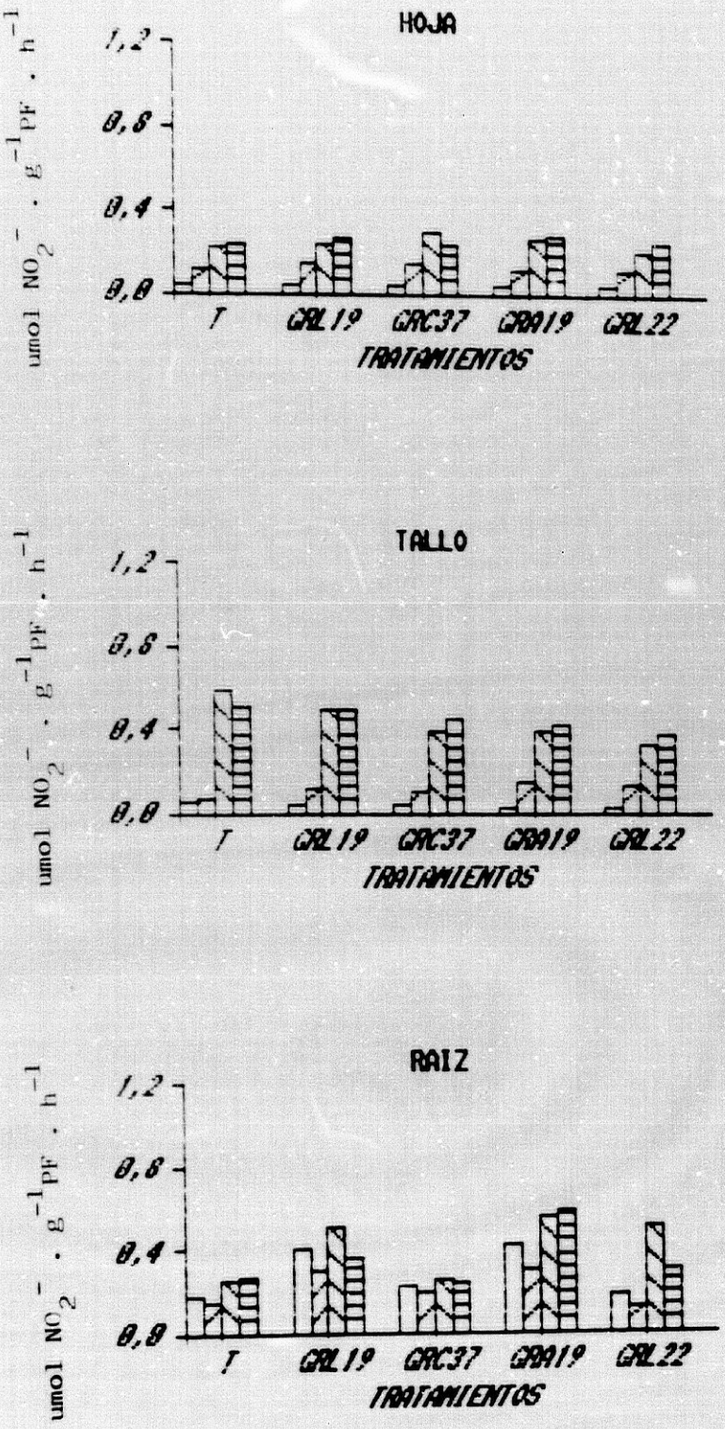

Fig. 5. Actividad nitrato reductasa, ensayo in vivo - NO_3^-, en hoja, tallo y raíz de plantas de guisante inoculadas con razas de Rhizobium (GRL19, GRC37, GRA19 y GRL22) y testigos no inoculados (T), para los cuatro niveles de nitrato ensayados, 2 (□), 4 (▨), 6 (▧) y 8 (▤) mM de NO_3K. Segunda recogida.

bajo (2 mM), la actividad nitrato reductasa detectada en hoja y tallo es prácticamente nula y la reducción de nitratos tiene lugar principalmente en la raíz, resultados semejantes a los obtenidos por Wallace (1986). Sin embargo, al incrementar el nivel de nitrato suministrado, aumenta considerablemente la actividad nitrato reductasa en los órganos aéreos (Figuras 4 y 5).

Se ha descrito ampliamente que el nitrato inhibe la nodulación y fijación de nitrógeno en Pisum sativum. Sin embargo, se conoce muy poco acerca del efecto de la nodulación y fijación de nitrógeno sobre la reducción y asimilación de nitratos. Conejero et al. (1986) observaron que la nodulación en plantas de soja deprimía la actividad nitrato reductasa en hoja (ensayo in vitro), en comparación con plantas no noduladas. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la actividad nitrato reductasa (ensayo in vivo) en hoja de guisante no es deprimida por la inoculación con Rhizobium, obteniéndose incluso valores superiores, en algunos casos, en plantas inoculadas respecto a los testigos no inoculados. En general, en la primera recogida se observa que la inoculación con las razas GRL19, GRC37 y GRA19 incrementa la actividad nitrato reductasa en hoja, no observándose diferencias significativas con la raza GRL22 respecto a los testigos no inoculados. Por otra parte, la inoculación con razas efectivas de Rhizobium provocó un aumento signifi-

cativo de la actividad nitrato reductasa en tallo respecto a las plantas testigo no inoculadas, apreciándose dicho efecto principalmente en la primera recogida y cuando en el medio el nivel de nitrato era 4 mM. Resultados similares encontraron Ligero et al. (1987b) estudiando diversas asociaciones Pisum sativum-Rhizobium leguminosarum.

Un hecho a destacar es la importancia del tallo en la reducción de nitratos, ya evidenciada por Andrews et al. (1984). Según los resultados obtenidos, cuando las plantas de guisante crecen con niveles de nitrato superiores a 2 mM, el tallo se comporta como un órgano muy activo en la reducción de nitratos. La importancia del tallo en la economía del nitrógeno en la planta también se pone de manifiesto al observar la correlacion existente entre este parámetro y el peso seco de la planta así como el contenido de nitrógeno orgánico de la misma (Tablas 19 y 20).

Los resultados obtenidos de actividad nitrato reductasa en hoja, tallo y raíz en la primera y segunda recogida, se han relacionado entre sí mediante la determinación de los coeficientes de correlación simple, expuestos en la tabla 9.

Se observa que la actividad nitrato reductasa en hoja y tallo están estrechamente correlacionadas, con un