

T. Prov. 22/32

T  
17  
4

**CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS DEL  
GÉNERO *(SINO)RHIZOBIUM* QUE NODULAN  
ALFALFA EN SUELOS ÁCIDOS DE  
ARGENTINA Y URUGUAY**

**TESIS DOCTORAL**  
Universidad de Granada  
*Facultad de Ciencias*

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
Facultad de Ciencias  
Fecha ...16-7-98...  
ENTRADA NUM. ...2340...



BIBLIOTECA UNIVERSITARIA  
GRANADA  
Nº Documento 619627321  
Nº Copia 21239085

**Eduardo Segundo López**

**GRANADA 1998**

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
16 JUL 1998

**CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS DEL  
GÉNERO *(SINO)RHIZOBIUM* QUE NODULAN  
ALFALFA EN SUELOS ÁCIDOS DE  
ARGENTINA Y URUGUAY**

Memoria presentada por  
el licenciado en Ciencias Biológicas  
don Eduardo Segundo López  
para optar al grado de Doctor



Fdo.: Eduardo Segundo López

V.ºB.º

El Director



FDO.: DR. D. NICOLÁS TORO GARCÍA  
Investigador Científico del C.S.I.C.



Este trabajo se ha realizado en el Departamento de Microbiología de Suelos y Sistemas Simbióticos de la Estación Experimental del Zaidín (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, C.S.I.C.) y ha sido financiado mediante una beca del C.S.I.C. con cargo al Proyecto de Investigación de la Unión Europea intitulado "*Improvement of symbiosis between Rhizobium meliloti and alfalfa in acid soils from Argentina and Uruguay*", ref.: TS\*-CT94-0265.

*A mis padres*

## Agradecimientos

Este libro no puede comenzar sin expresar mi más sincero agradecimiento a una serie de personas que han contribuido a que este trabajo salga a flote:

Al Dr. Nicolás Toro, director de esta tesis doctoral, por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo, y por su atento seguimiento de la investigación.

Al Dr. Francisco Ligeró por soportar la tutoría de esta tesis doctoral en la Universidad de Granada y su interés en la creación de nuevas familias vegetales.

A la Dra. Carmen Lluch, directora del programa de doctorado de Biología Vegetal, que me ha salvado en numerosas ocasiones de intrincados mecanismos burocráticos.

A los miembros de los grupos de investigación de Argentina, Uruguay y Alemania que han trabajado en este proyecto, muy especialmente a Dña. Florencia del Papa por nuestros intercambios de impresiones vía correo electrónico.

Al Dr. Juan de Dios Arche sin el cual hubiese sido imposible realizar el trabajo de microscopía óptica ya que ha llevado a cabo integra e impecablemente todos los aspectos técnicos de dicho capítulo. Igualmente he de expresar mis agradecimientos a todos los miembros del grupo de microscopía por cederme el uso de sus materiales y mantener un ambiente agradable de trabajo.

A Mr. Pieter van Dillewing por colaborar en los estudios de competitividad por la nodulación y nuestra camaradería como compañeros de poyata.

A la Dra. M<sup>a</sup> Dolores Mingorance por los análisis de nitrógeno, consejos en estadística, y múltiples momentos de diversión.

A Dña. Olga Garrido y D. Alfonso Rodríguez Coto por los análisis de materia orgánica y mecánicos del suelo de Uruguay.

A Dña. Rosita Quesada, Ms. Ulli Busse, Ms. Justine Kozo y Dña. Susana S. Mesas por la tediosa transcripción del capítulo de bibliografía de esta memoria de tesis y, por supuesto, por tantos días de alegría.

A Dña. Ana M<sup>a</sup> de la Fuente y a D. José M<sup>a</sup> García, bibliotecarios de la EEZ, por su pronta ayuda en la ardua búsqueda bibliográfica.

A D. Luis Collados por su diligente apoyo desde el servicio de informática de la EEZ.

A Dña. Ana Peña por el dibujo de la portada y por catorce años de ininterrumpida amistad.

A D. Celerino Robles por las lecciones de estadística y agronomía, las charlas científico-marxistas y continua disposición para ayudar haciendo fotografías, poniendo a punto técnicas de microcosmos, etc.

Al Dr. José Olivares por sus comentarios científicos, importantes para salir de encrucijadas y por su prestancia en la búsqueda de gran cantidad de bibliografía.

A la Dra. Mariam Saharawy por su amistad y por su amable disposición a colaborar durante la redacción de esta tesis.

Al insigne Dr. José Ignacio Jiménez Zurdo que me desveló los secretos de innumerables técnicas de biología molecular.

A la Dra. Ana Chueca por ser una fuente de vitalidad y saber ofrecer estímulos y consejos adecuados ante las eventualidades.

A la Dra. M<sup>a</sup> Angeles Ferro culpable de mi inicio en la investigación cuando era un tierno estudiante de cuarto de carrera.

A las doctoras Bori Segovia, Carmen Marco y M<sup>a</sup> Paz Carrasco con las que di mis primeros pasos en investigación en la rama de bioquímica y cultivos celulares. También he de expresar mis agradecimientos a todos los compañeros del departamento de bioquímica de la Universidad de Granada, especialmente a Angel Carazo.

A Conchi Martínez por animarme y ayudarme a iniciar esta tesis doctoral.

A mis compañeros y amigos durante la carrera por todas las situaciones entrañables que vivimos: Antonio Romero, M<sup>a</sup> Kurra, Esmeralda, Toñi, Irene, Pedro, Angel Romero, Angel Rodríguez, Romina, M<sup>a</sup> Angeles, Mammen, Arancha, etc.

A mis compañeros y amigos en la EEZ por hacer que el trabajo fuese tan llevadero: Galdino, Tara, Ikram, Fernando, Pablo, Ester, Coral, Rosarillo, Salomé, Julia, Víctor, Enrique, Owen, Roland y en general todo el personal de bioquímica, microbiología, de la asociación la Urraca y de la EEZ. Especial agradecimiento merecen los que estuvieron siempre conmigo en los momentos más difíciles: Leonardo Velasco, Mariam Vázquez y M<sup>a</sup> José Pozo.

A mis compañeros y amigos de fuera del laboratorio por nuestras diversiones y filosofía de vida. En Granada: Fran, Loli, Paqui, Goyo, M<sup>a</sup> Angeles, Ramón, Cortés, Maribel, Meli, Doñas, Ana Godoy, Isilla, Mónica, Pili, Iván, etc. En Adra: Domingo, Antoñillo, Mellis, Avilés, Jaime, Piqueras, Encarni, Ricardo, Sole, Isa, Peña, Robles y en general todos los colegas del grupo Gaviota y del pueblo. Especial mención de Paco Toledano y Feli Capilla.

A toda mi familia por su continuo apoyo y estímulo especialmente a mis padres, a la tía Maruja y a mis hermanos Isaac y Chari.

*ÍNDICE*

ÍNDICE .....	i
ABREVIATURAS .....	vii
I. INTERÉS Y OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	1
1 Interés.....	3
2 Objetivos.....	4
II. RESUMEN DE LA INVESTIGACIÓN.....	5
III. INTRODUCCIÓN.....	11
1 Simbiosis rizobio-leguminosa.....	13
2 Leguminosas .....	14
2.1 Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> L.).....	14
2.1.1 Origen e historia.....	14
2.1.2 Morfología .....	14
2.1.3 Adaptabilidad.....	15
2.1.4 Aprovechamiento de la alfalfa.....	15
2.1.5 Otras Medicagos .....	15
3 Familia Rizobiaceae.....	16
3.1 Taxonomía.....	16
3.2 Rango de huésped de los géneros <i>Rhizobium</i> y <i>Sinorhizobium</i> .....	16
4 Ciclo simbiótico de rizobios.....	17
4.1 Especificidad .....	17
4.1.1 Diálogo molecular.....	17
4.1.2 Quimiotaxis y colonización de la raíz.....	18
4.1.3 Curvatura del pelo radical.....	18
4.2 Infectividad.....	19
4.3 Efectividad.....	19
5 Acidez .....	20
5.1 Efecto de la acidez en la planta .....	21
5.2 Efecto de la acidez en la bacteria .....	21
5.2.1 Población de rizobios en suelos ácidos.....	21
5.2.2 Rizobios tolerantes a la acidez en cultivo <i>in vitro</i> y tolerantes a la acidez en suelo .....	21
5.2.3 Tolerancia a la acidez y pH interno .....	22

5.2.4 Estado fisiológico bacteriano durante la acidez.....	23
5.2.5 Bases genéticas de la tolerancia a la acidez de rizobios .....	23
5.3 Efecto de la acidez en nodulación y eficiencia simbiótica .....	23
5.3.1 Diálogo molecular.....	23
5.3.2 Adhesión .....	24
5.3.3 Nodulación.....	24
IV MATERIAL Y MÉTODOS.....	25
1 Cepas bacterianas y plásmidos.....	27
2 Medios de cultivo y de conservación de microorganismos.....	29
2.1 Medios para Rhizobiaceae.....	29
2.2 Medio para <i>E. coli</i> .....	30
2.3 Medios de conservación .....	30
3 Antibióticos.....	31
4 Control del pH.....	31
5 Estudios <i>in vitro</i> de tolerancia a la acidez de ( <i>Sino</i> ) <i>Rhizobium</i> .....	31
5.1 Tolerancia a la acidez en placa.....	31
5.2 Curvas de crecimiento en medio mínimo en función de la acidez .....	31
6 Extracción de ADN total de ( <i>Sino</i> ) <i>Rhizobium</i> .....	32
7 Determinación de la concentración de ADN y oligonucleótidos.....	32
8 Preparación de lisados celulares.....	33
9 Tratamiento enzimático del ADN .....	33
10 Electroforesis de ADN .....	33
10.1 Separación e identificación de fragmentos de restricción o de amplificación por PCR mediante electroforesis en gel de agarosa.....	33
10.2 Revelado de geles y fotografía .....	33
10.3 Estimación de los pesos moleculares de fragmentos de restricción por electroforesis en gel de agarosa .....	34
11 Experimentos de hibridación ADN-ADN. "IS-fingerprint" .....	34
11.1 Sonda no radiactiva .....	34
11.2 Transferencia de ADN a filtros de nylon.....	34
11.3 Hibridación y revelado .....	35
11.4 Análisis informatizado de los datos del "IS-fingerprint" .....	35
12 Análisis del ADNr 16S .....	35
12.1 Oligonucleótidos .....	35
12.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	35
12.3 Purificación de fragmentos de PCR.....	36
12.4 Secuenciación de ADNr 16S .....	36
12.4.1 Secuenciación automática.....	36
12.4.2 Programas de ordenador utilizados para análisis de secuencias .....	36
13 Métodos de conjugación .....	37
13.1 Cruces triparentales .....	37
14 Ensayos con planta.....	37
14.1 Plantas, esterilización en superficie y germinación de semillas.....	37
14.1.1 –alfalfa .....	37
14.1.2 –judía .....	37
14.2 Condiciones de cultivo .....	38

14.3 Cultivo axénico de plantas.....	38
14.3.1 –alfalfa .....	38
14.3.2 –judía .....	38
14.3.3 Solución nutritiva.....	38
14.3.4 Inoculación de los cultivos.....	39
14.3.5 Determinaciones realizadas .....	39
14.3.5.1 Determinación de la cinética de nodulación de alfalfa.....	39
14.3.5.2 Peso seco de parte aérea de alfalfa .....	39
14.3.5.3 Determinación analítica de N de parte aérea de alfalfa.....	39
14.3.5.4 Microscopía.....	40
14.3.6 Medida de la competitividad para la nodulación .....	40
14.3.7 Determinación del número más probable de bacterias en suelo (NMP).....	40
14.3.8 Reaislamiento de ( <i>Sino</i> ) <i>Rhizobium</i> de los nódulos .....	41
14.4 Ensayos de microcosmos.....	41
14.4.1 Preparación del suelo .....	41
14.4.2 Ensayos de microcosmos sin planta. Estudio de la persistencia bacteriana.....	42
14.4.2.1 Diseño experimental.....	42
14.4.3 Ensayos de microcosmos con plantas .....	42
14.4.3.1 Diseño experimental.....	42
15 Análisis estadístico.....	43
V. <i>CAPÍTULO 1: Crecimiento de rizobios que nodulan alfalfa en medios de cultivo definidos a distintos pHs</i> .....	45
1 Introducción .....	47
2 Resultados .....	49
2.1 Tolerancia a la acidez de diferentes rizobios que nodulan alfalfa .....	49
2.2 Curvas de crecimiento en función del pH de las cepas MAT.....	50
2.3 Curvas de crecimiento en función del Calcio y pH de las cepas MAT .....	52
2.4 Curvas de crecimiento en función del pH de las cepas AT .....	54
2.5 Curvas de crecimiento en función del Calcio y pH de las cepas AT.....	55
3 Discusión.....	56
VI. <i>CAPÍTULO 2: Estudio de la diversidad genética de rizobios que nodulan alfalfa en suelos ácidos de Argentina y Uruguay. Efecto del pH en la selección de la población infectiva</i> .....	59
1 Introducción .....	61
2 Resultados y discusión .....	63
2.1 "IS-fingerprint" de rizobios aislados de suelos ácidos de Argentina y Uruguay.....	63
2.2 Secuenciación parcial de ADNr 16S de rizobios aislados de suelos de Argentina y Uruguay .....	66
2.3 "IS-fingerprint" de rizobios aislados de suelos neutros de Granada.....	68
VII. <i>CAPÍTULO 3: Estudios de nodulación de alfalfa y eficiencia simbiótica en cultivo hidropónico a distintos pHs</i> .....	73
1 Introducción .....	75



2 Resultados .....	76
2.1 Nodulación .....	76
2.1.1 Porcentaje de plantas noduladas .....	76
2.1.2 Número de nódulos .....	76
2.2 Eficiencia simbiótica: Peso Seco y contenido de N .....	79
2.3 Competitividad .....	81
3 Discusión.....	82
VIII. <i>CAPÍTULO 4: Estudio de microscopía óptica comparativa de nódulos de alfalfa (pH neutro y ácido) y judía formados por S. meliloti y R. spp. tipo Oregón</i> .....	85
1 Introducción .....	87
2 Resultados y discusión .....	88
2.1 Nódulos producidos en <i>Medicago sativa</i> a pH neutro y ácido .....	88
2.1.1 Nódulos inducidos por <i>S. meliloti</i> cepa 2011 .....	88
2.1.2 Nódulos inducidos por <i>Rhizobium</i> spp. tipo Oregón cepa LPU83 .....	89
2.2 Nódulos de <i>Phaseolus vulgaris</i> .....	90
IX. <i>CAPÍTULO 5: Estudios en microcosmos de persistencia bacteriana y competitividad por la nodulación</i> .....	103
1 Introducción .....	105
2 Resultados y discusión .....	106
2.1 Estudios de persistencia bacteriana en suelo ácido .....	106
2.2 Competitividad por la nodulación en alfalfa en suelo ácido.....	109
X. <i>DISCUSIÓN GENERAL</i> .....	111
XI. <i>CONCLUSIONES</i> .....	117
XII. <i>BIBLIOGRAFÍA</i> .....	121

## ABREVIATURAS

**ADN:** Ácido Desoxirribonucleico.

**ADNr:** Ácido Desoxirribonucleico ribosómico.

**ANR:** “Alfalfa Nodulating Rhizobia”, bacterias que nodulan alfalfa.

**AT:** “Acid-Tolerant Bacteria”, bacterias tolerantes a la acidez.

**Ca:** Calcio.

**D.O.:** Densidad Óptica.

**FBN:** Fijación Biológica de Nitrógeno.

**G:** Tiempo de Generación Bacteriano.

**IS:** Secuencia de Inserción.

**Km:** Antibiótico Kanamicina

**Km<sup>r</sup>:** Resistente a kanamicina.

**MAT:** “Medium Acid-Tolerant Bacteria”, bacteria medianamente tolerante a la acidez.

**MM:** Medio Mínimo de crecimiento bacteriano.

**N:** Nitrógeno.

**NMP:** Recuento de rizobios por medio del Número Más Probable.

**pb:** pares de bases nucleotídicas.

**PCR:** “Polymerase Chain Reaction”, reacción en cadena de la polimerasa.

**SD:** “Standard Deviation”, desviación estándar.

**SE:** “Standard Error”, Error estándar.

**ufc:** unidades formadoras de colonias bacterianas.

***I. INTERÉS Y OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN***

## 1 INTERÉS DE LA INVESTIGACIÓN

En Argentina y Uruguay existen unos 5 millones de hectáreas de prados cultivados con alfalfa (*Medicago sativa*). Esta planta es llamada la “Reina de los Cultivos de Forraje” por alcanzar grandes producciones vegetales, de alta calidad proteica, comúnmente usada en forma de pastos para alimentar al ganado. La alimentación con alfalfa es importante para determinar la calidad y aceptación mundial que tienen las carnes de ganado vacuno argentinas y uruguayas.

En los últimos 20 años estos suelos se están acidificando, volviéndose suelos moderadamente ácidos (pH 5,5 a pH 6), debido a la sobreexplotación ya que están sometidos a una agricultura intensiva. La producción vegetal en estos suelos está disminuyendo como consecuencia de diferentes factores, derivados de la bajada del pH, a saber: toxicidad de ciertos elementos como son aluminio y manganeso; baja disposición de otros elementos como molibdeno, calcio y fósforo; y el aumento de la concentración de hidrogeniones. Estos factores en conjunto afectan principalmente a la población microbiana, fundamentalmente a la bacteria *Sinorhizobium meliloti* y a la simbiosis que efectúa con alfalfa, simbiosis por la que realiza la Fijación Biológica de Nitrógeno atmosférico (FBN), proceso por el que se aporta a la planta la cantidad de nitrógeno necesaria para que haya un buen desarrollo vegetal. En estos suelos ácidos de Argentina y Uruguay se ha observado una gran reducción en los nódulos simbióticos producidos por la bacteria en la raíces de la planta y consecuentemente una reducción de aporte nitrogenado a los cultivos.

El suministro de abonos químicos nitrogenados (fundamentalmente nitratos, amonio y urea) a estos suelos, para aumentar la producción, es una solución muy cara tanto económicamente como medioambientalmente; el proceso de producción de estos abonos requiere un gran coste energético y cierto daño atmosférico, además el abonado en los campos tiene que realizarse frecuentemente por las continuas pérdidas que se producen en el ciclo del nitrógeno y la lixiviación del terreno que produce la lluvia y el riego conllevando riesgo de contaminación de acuíferos en el subsuelo. La llegada de la “Revolución Industrial”, su alta demanda de materia prima y el aumento de producción trajo secundariamente consigo unos efectos nefastos para la Naturaleza: contaminaciones y sobreexplotaciones de recursos naturales, efecto invernadero, etc. Diversas cumbres de los principales países que dirigen la economía mundial, así como otros países menos favorecidos, han apuntado los efectos negativos, de las prácticas abusivas con el Medio Ambiente, tanto sobre la biosfera como su biodiversidad y la calidad de vida humana. En concreto en agricultura se propone seguir el modelo de

“*Agricultura Sostenible*”, utilizando técnicas agrarias menos agresivas con el entorno y en la que los productos así obtenidos alcanzan mejores precios en el mercado, consecuencia de la concienciación social. Entre estas técnicas agrarias se encuentra el abono con inoculantes bacterianos. Los inoculantes rizobianos como aporte nitrogenado se viene utilizando en campos desde hace más de un siglo. Por otra parte, especial interés se está desarrollando sobre la preservación de la Biodiversidad en nuestro planeta, recurriendo para su estudio en numerosas ocasiones a las más avanzadas técnicas de genética molecular.

## 2 OBJETIVOS

El presente trabajo se ha realizado con los siguientes objetivos:

### OBJETIVOS GENERALES:

- a) Estudio de las poblaciones de rizobios nodulantes de alfalfa y su interacción simbiótica con leguminosas en ecosistemas con suelos ácidos.
- b) Desarrollo de unos criterios y selección de bacterias aisladas de suelos ácidos de Argentina y Uruguay con el fin de obtener un inoculante biológico que se aplique en esos mismos suelos para aumentar la productividad de los cultivos de alfalfa.

### Para la consecución de estas metas se han planteado una serie de **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- a) Caracterización fisiológica de crecimientos bacterianos en medios de cultivo definidos, a distintos pHs.
- b) Estudio de la diversidad de rizobios nodulantes de alfalfa tanto aislados de suelos ácidos como aislados de suelos neutros.
- c) Caracterización de las interacciones simbióticas entre bacterias y plantas, comparando los comportamientos a pH neutro y ácido. Por medio de:
  1. Estudios de nodulación y producción vegetal en cultivo hidropónico por medio de monoinoculación y coinoculación bacteriana.
  2. Estudio de microscopía óptica comparativa de nódulos producidos a pH neutro y ácido.
  3. Estudios en microcosmos de persistencia bacteriana y competitividad por la nodulación.

***II. RESUMEN DE LA INVESTIGACIÓN***

## RESUMEN

La investigación desarrollada en este trabajo comenzó con el ensayo en medio mínimo de cultivo bacteriano a pH ácido y neutro, de cepas de rizobios aislados de alfalfa de suelos ácidos de Argentina y Uruguay con objeto de comprobar su tolerancia a la acidez. El pH mínimo descrito de crecimiento para *Sinorhizobium meliloti* (la bacteria que habitualmente establece simbiosis con alfalfa) en estas condiciones es de pH 5,5. En nuestros ensayos junto a las bacterias tolerantes a pH 5,5, a las que se llamó cepas MAT (Medianamente Acido-Tolerantes) apareció un grupo de bacterias que toleraban una acidez de pH 5,0, a las que se llamo cepas AT (Acido-Tolerantes) con lo que surgieron esperanzas de obtener unas cepas altamente tolerantes a la acidez, nodulantes de alfalfa, y potencialmente buenos inoculantes. A continuación se realizó una caracterización fisiológica del crecimiento de ambos grupos bacterianos en condiciones ácidas y neutras, determinándose que el grupo MAT se afectaba en su tiempo de generación por el pH y el Ca, ajustándose a lo previamente descrito con *S. meliloti* mientras que el grupo AT apenas se alteraba su tiempo de generación por la acidez y el Ca. Posteriormente se realizó una caracterización genética de cada una de estas bacterias. Se llevó a cabo la secuenciación parcial de ADN<sub>r</sub> 16S de todas las cepas, previa amplificación por PCR utilizando unos fragmentos cebadores de proteobacterias y se comprobó, que las secuencias de los aislados MAT se correspondían con *Rhizobium meliloti* tipo A (actualmente designada *Sinorhizobium meliloti*) y que los aislados AT se correspondían con *Rhizobium* spp. tipo Oregón. Este tipo de bacterias fue previamente descritas en suelos ácidos de Oregón (USA) como nodulante de alfalfa, de muy baja eficiencia en la fijación de nitrógeno sobre esta planta, capaz de nodular *Phaseolus vulgaris* (judía), y genéticamente próxima a *Rhizobium etli*. A continuación se llevó a cabo un "IS-Fingerprint" de todas las cepas bacterianas utilizando la sonda de hibridación obtenida de la secuencia de inserción *ISRm2011-2*, previamente descrita como presente en todas las cepas de *S. meliloti*. Solo aparecía hibridación en el ADN de bacterias MAT, las cepas AT no presentaban esa secuencia de inserción. Por medio de estas técnicas también se estudió la biodiversidad bacteriana de este ecosistema y de un ecosistema de suelos de pH neutro como es el de la Estación Experimental del Zaidín (EEZ) de Granada. Se observó que la diversidad de las poblaciones de *S. meliloti* de suelos neutros y ácidos era alta en ambos casos. De otro lado se llevó a cabo la inoculación de judía (*P. vulgaris*) en condiciones estériles con bacterias AT y MAT y se comprobó que las cepas AT producían nódulos fijadores de nitrógeno y las cepas MAT producían nódulos pequeños, blancos, no fijadores de

nitrógeno. Ambos grupos de nódulos fueron sometidos a microscopía óptica para estudiar su estructura, se observaron células infectadas y bacteroides en ambos casos, aunque el número de células infectadas en los nódulos producidos por *S. meliloti* era mínimo y los bacteroides presentaban morfología atípica.

Todos estos datos, junto con el hecho de haber encontrado cepas tipo Oregón en los suelos ácidos de Argentina y Uruguay, hizo dirigir la investigación por dos caminos: por una parte el estudio del efecto que podría tener, en la nodulación y producción vegetal de alfalfa, la presencia de cepas ineficientes en la FBN en los ecosistemas de suelos ácidos, estas bacterias podrían ser un factor importante en la disminución de la producción de alfalfa de suelos ácidos de Argentina y Uruguay (y también de otros lugares del mundo) y por otra parte la selección de un *S. meliloti*, entre los aislados, eficiente en la FBN en el que habría que tener en cuenta, que superase la competitividad de las bacterias tipo Oregón.

Se realizaron estudios fisiológicos de la simbiosis, en cultivo hidropónico en condiciones de acidez y neutralidad. Se midieron parámetros como la formación de nódulos y la fijación de nitrógeno (expresada en peso seco y contenido en N). Se estudiaron bacterias en monoinoculación donde se comprobó que todas las cepas de *S. meliloti* tenían un comportamiento muy homogéneo respecto a la nodulación, retrasándose en el tiempo la aparición de nódulos en las plantas y disminuyendo su número final de nódulos a pH ácido respecto a pH neutro, sin afectar a la producción vegetal al final del experimento. Se seleccionaron los aislados de *S. meliloti* más infectivos y eficientes. Respecto a los rizobios tipo Oregón se observó que producían mayor número de nódulos a ambos pHs que *S. meliloti*, sin embargo su fijación de nitrógeno era mínima en ambos casos. Se realizó un estudio microscópico para caracterizar los nódulos de alfalfa en condiciones ácidas y neutras producidos tanto por *S. meliloti* como por *Rhizobium* spp. tipo Oregón. En los nódulos del rizobio tipo Oregón aparecieron zonas senescentes prematuras que los mostraban como nódulos ineficientes. En los nódulos formados por *S. meliloti* apenas si había diferencias entre ambos pHs.

Posteriormente se estudió la fisiología de la simbiosis en coinoculación (1:1). En condiciones neutras los *Rhizobium* spp. tipo Oregón eran menos competitivas que *S. meliloti*, la producción vegetal era similar a cuando se inoculaba *S. meliloti* en monoinoculación. En condiciones ácidas, *Rhizobium* spp. tipo Oregón eran más competitivas en la nodulación que *S. meliloti* y además disminuía la producción vegetal, respecto a *S. meliloti* inoculada sola. Con esto se manifiesta la importancia que puede acarrear la presencia de *Rhizobium* spp. tipo Oregón en la disminución de producción de los alfalfares en suelos ácidos. La cepa de *S. meliloti*, aislada de suelos ácidos, seleccionada como de alta eficiencia en la FBN se comportó como mejor competidor en la nodulación con los *Rhizobium* spp. tipo Oregón, en condiciones ácidas, que otras cepas controles de *S. meliloti*.

Se realizaron estudios en microcosmos para comprobar por una parte la persistencia bacteriana, sin planta, en suelos ácidos uruguayos tanto estériles como no estériles en monoinoculación, se observó un mejor comportamiento en condiciones naturales de las bacterias aisladas de suelos ácidos. Finalmente se realizó un experimento en macetas con plantas de alfalfa, en cámara de cultivo en condiciones controladas, para estudiar la competitividad por la nodulación en un sistema más próximo al campo que el cultivo



hidropónico. Se corroboró que una cepa de *S. meliloti* aislada de suelo ácido de Argentina y Uruguay seleccionada como muy infectiva y eficiente es más competitiva en la nodulación con las cepas tipo Oregón que otras cepas de *S. meliloti* usadas como controles. Esta cepa se propone para una próxima investigación de liberación en campo.



### *III. INTRODUCCIÓN*

## 1 SIMBIOSIS RIZOBIO-LEGUMINOSA

El nitrógeno molecular ( $N_2$ ) es el gas más abundante en la atmósfera terrestre (aproximadamente 80%), pero debido a su carácter inerte, no es útil *per se* como fuente de nitrógeno para el desarrollo de la vida en la Tierra ya que las plantas sólo son capaces de asimilarlo en forma combinada (amonio, nitratos, etc.), y quizás es el factor limitante más común para el crecimiento de las plantas. La ganancia de nitrógeno de un determinado hábitat se puede relacionar básicamente con tres procesos fundamentales, como son:

a) El proceso de Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) que por medio a la maquinaria enzimática bacteriana hace posible la reducción del nitrógeno molecular en amonio. Por este proceso aparecen unos 180 millones de toneladas/año de ganancia de nitrógeno en la biosfera.

b) Fijación espontánea de nitrógeno, originada como consecuencia de la producción de óxidos de nitrógeno o amonio, basándose en la actividad natural de descargas eléctricas, de rayos cósmicos, etc., sobre el nitrógeno molecular de la atmósfera. Con una ganancia de 30 millones de toneladas/año.

c) Fijación industrial, por el proceso de Haber-Bosch, originada por la transformación industrial del nitrógeno atmosférico en amoniaco, con el interés fundamental de su uso como fertilizante y en consecuencia su aplicación específica en agricultura. Con una ganancia de 70 millones de toneladas/año (Martínez, 1992).

La FBN es realizada por un conjunto de microorganismos procariotas denominados diazotrofos. Estas bacterias pertenecen a dos categorías: microorganismos fijadores de vida libre entre los que se encuentran bacterias de los géneros *Azospirillum*, *Beijerinckia*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Mycobacterium* y *Pseudomonas*; o bacterias fijadoras en simbiosis como el actinomiceto *Franckia*, la cianobacteria *Anabaena* y las bacterias denominadas rizobios: *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium*. La simbiosis rizobio-leguminosa proporciona el 40% de la FBN, lo que muestra una entrada muy importante de nitrógeno en la biosfera (Orive *et al.*, 1983). El lugar de utilización o fijación biológica de nitrógeno (FBN) se sitúa en unas excrecencias radiculares que se denominan *nódulos* inducidos por la bacteria y en el interior de los cuales se sitúan estas, donde se diferencian a un estado bacteriano llamado bacteroide el cual transforma el dinitrógeno en amonio, suministrándoselo directamente a la planta. En esta simbiosis mutualista la bacteria recibe la protección de la planta y la fuente hidrocarbonada para su mantenimiento.

## 2 LEGUMINOSAS

La capacidad de establecer simbiosis fijadora de nitrógeno con rizobios está restringida a las leguminosas con una excepción el género *Parasponia* de la familia vegetal de las *Ulmaceae*. La familia de las *Leguminosae* (también llamada *Fabaceae*) comprende tres subfamilias, *Caesalpinieae*, *Mimosoideae*, y *Papilionoideae*, todas ellas contienen géneros capaces de formar nódulos en la raíz. En esas tres familias los porcentajes de especies nodulantes son bastante diferentes. Hay pocos géneros no nodulantes en las familias más evolucionadas, *Papilionoideae* y *Mimosoideae* (van Rhijn *et al.*, 1995)

### 2.1 ALFALFA (*MEDICAGO SATIVA* L.)

#### 2.1.1 Origen e historia.

La alfalfa es una papilionacea originaria de Persia, de zonas templadas de clima continental árido, con inviernos fríos, veranos cálidos y secos y suelos ricos en bases con una capa freática profunda. De allí fue llevada por las caravanas comerciales a diversos puntos de Asia y Arabia. Las invasiones de los persas a Grecia posiblemente introdujeron en esa península la alfalfa y de ahí pasó a Italia en el siglo IV o V a C. Pero la difusión más importante fue con las invasiones árabes a través del norte de Africa, llegando a España, de donde se difundió a Europa. Aunque la alfalfa llegó a Italia antes del comienzo de nuestra era, desapareció como cultivo durante la Edad Media, pero sobrevivió en formas espontáneas, lo mismo sucedió en Grecia. La introducción de alfalfa en el continente americano se realizó primero en América del Sur (Argentina, Chile, Perú y México) donde fue llevada por los conquistadores. En 1850 fue introducida en California como "trébol de Chile" y su expansión y popularidad aumento a partir de este momento en América del Norte aunque anteriormente hubo otros intentos de introducción (Muslera *et al.*, 1991).

#### 2.1.2 Morfología.

La alfalfa es una planta perenne, vivaz, de desarrollo erecto, tallo poco ramificado de 60 a 100 cm de altura en condiciones naturales, hojas trifoliadas con un pedicelo intermedio más largo que los laterales, foliolos ovalados, en general sin pelos, tiene márgenes lisos con los bordes superiores ligeramente dentados. Los tallos son delgados, sólidos o huecos, cuadrados cuando jóvenes y fuertes para soportar erectos el peso de hojas e inflorescencias. La raíz es pivotante, con una corona que sale fuera del terreno, del cual emergen los brotes que darán lugar a los tallos. Las flores crecen en forma de racimos de axila de las hojas. El color es azul o púrpura en las variedades cultivadas. Las legumbres sin espinas forman espirales con tres vueltas que encierran 2 a 6 semillas de color marrón claro o amarillentas. *M. sativa* es una planta de recuperación rápida después del corte. Su número de cromosomas es de 32 (Muslera *et al.*, 1991).

### 2.1.3 Adaptabilidad.

La alfalfa se cultiva en una amplia variedad de suelos y climas. Es una planta muy bien adaptada a suelos profundos bien drenados y alcalinos y tiene una tolerancia a la salinidad moderada. Sin embargo no se adapta bien en suelos con pH ácido, debido a las limitaciones que la acidez produce en la supervivencia y multiplicación del *Sinorhizobium meliloti* específico. La alfalfa soporta mal el encharcamiento como consecuencia de la toxicidad por el aluminio. La temperatura óptima para el crecimiento está entre 15 °C y 25 °C durante el día y 10 °C y 20 °C en la noche. Las temperaturas por encima de 30 °C reducen el crecimiento por aumento de la respiración de la planta. Es conocida la resistencia de la alfalfa a la sequía, que se origina de dos hechos fundamentalmente. La longitud y profundidad de sus raíces, con las que obtiene agua de las capas más profundas del terreno, y la capacidad de detener su crecimiento (dormancia o letargo) cuando las condiciones del medio lo hacen necesario, temperaturas extremas altas o bajas y/o sequía (Muslera *et al.*, 1991).

### 2.1.4 Aprovechamiento de la alfalfa.

Al igual que todas las leguminosas es importante por el enriquecimiento de nitrógeno que aporta al suelo. El valor nutritivo es especialmente importante cuando se destina a animales en producción, leche o carne; debiendo ser objetivo de su manejo conseguir un forraje de buena digestibilidad y alto contenido de proteína. Desde un punto de vista bromatológico se puede decir que la alfalfa es un forraje de buena calidad. Comparado con otras leguminosas como trébol blanco, trébol violeta, esparceta, su digestibilidad y valor energético es menor, pero su contenido de materias nitrogenadas es más elevado. También las gramíneas más comunes, ray-grass inglés, ray-grass italiano, dactilo, festuca y otros, en estados vegetativos previos a la floración tienen valores energético y digestibilidad superior al de la alfalfa, pero menor contenido de proteínas. La alfalfa es un forraje cuya principal ventaja es el alto contenido proteico, y de ahí el valor de este forraje y la gran demanda que existe hacia él.

El pastoreo de la alfalfa es un sistema económico de aprovechamiento, muy interesante en la reducción de costos de la explotación ganadera. La alfalfa no dura mucho tiempo bajo pastoreo continuo, por tanto, es totalmente necesario la adopción de un sistema discontinuo que permita a las plantas recuperen sus reservas y alcanzar la madurez.

### 2.1.5 Otras Medicagos

*M. sativa* (alfalfa) es la Medicago más importante a nivel mundial por las razones que se citan anteriormente. También es importante la otra planta perenne de este género *M. falcata*, igualmente denominada alfalfa, aunque es menos productiva. Existen una serie de Medicagos de crecimiento anual, aunque quizás no de la calidad alimenticia de la alfalfa, tienen gran importancia agronómica, en zonas como Oeste de Australia donde está extendido su uso para aportar nitrógeno al suelo en el descanso de cereales (Howieson, 1995a) y por cierta tolerancia a suelos moderadamente ácidos de algunas especies como *M. polymorfa* (también ampliamente utilizada en Argentina y Uruguay) y *M. murex* (Muslera *et al.*, 1991).

### 3 FAMILIA RHIZOBIACEAE

#### 3.1 TAXONOMÍA

Los miembros de la familia Rhizobiaceae se caracterizan por interactuar con plantas, bien formando simbiosis estrechas, bien dando origen a patogenicias. Sin embargo está claro que esta familia, definida casi enteramente por las interacciones de esas bacterias con plantas, es una familia no natural. La comparación de secuencias de ADN indica que cada uno de los géneros reconocidos, tienen parentescos próximos, con bacterias que están en familias muy distintas, tal es el caso de Rhodospirillaceae y Rickettsiaceae. Todos esos organismos se han encuadrado en el subgrupo alfa de las proteobacterias (Young *et al.*, 1992). Se están realizando numerosos estudios para clarificar la taxonomía y filogenia de bacterias que son capaces de inducir nódulos en plantas leguminosas. Están ocurriendo rápidos cambios en la clasificación de esos organismos, gracias a las nuevas tecnologías genéticas, fundamentalmente comparación de secuencias homólogas de ADN, y se están describiendo nuevos géneros y nuevas especies. En 1984 el Manual de Taxonomía Sistemática de Bergey (Jordan *et al.*, 1984) situaba la familia Rhizobiaceae en el reino Procariotas, división Gracilicutes, clase Scotobacteria, en su grupo cuatro: bacilos y cocos gram-negativos aerobios/microaerofilos. Dentro de la familia se reconocían los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Agrobacterium*, *Azorhizobium* y *Philobacterium*. Se reconocían las siguientes especies en el género *Rhizobium*: *R. leguminosarum*, *R. meliloti*, y *R. loti*. Desde entonces se han descrito nuevas especies, *R. galegae* (Lindstrom, 1989), *R. huakuii* (Chen *et al.*, 1991), *R. tropici* (Martinez-Romero *et al.*, 1991), *R. etli* (Segovia *et al.*, 1993), *R. ciceri* (Nour *et al.*, 1994) y *R. mediterraneum* (Nour *et al.*, 1995). Se creó un nuevo género (*Sinorhizobium*) que agrupaba los antiguos *R. meliloti* y *R. fredii* (ahora *S. meliloti* y *S. fredii*) así como dos nuevas especies descritas *S. teranga* y *S. sahelii* (De Lajudie *et al.*, 1994). Se nombró una nueva especie *S. medicae* con las bacterias que antes se encuadraban en el grupo B de *R. meliloti* (Rome *et al.*, 1996). Y recientemente se ha agrupado bajo el género *Mesorhizobium* los antiguos *R. loti*, *R. huakuii*, *R. ciceri*, *R. mediterraneum* y *R. thiansemense* (Jarvis *et al.*, 1997). Hay numerosas cepas de rizobios que aun no se le ha asignado especie y que muestran características genéticas próximas a otros grupos. Se les llama genéricamente *Rhizobium* spp. Es de destacar en nuestra investigación, la cepa nodulante de alfalfa, *Rhizobium* spp. tipo Oregón que muestra características genéticas próximas a *R. etli*.

#### 3.2 RANGO DE HUÉSPED DE LOS GÉNEROS *RHIZOBIUM* Y *SINORHIZOBIUM*

Las clasificaciones de los rizobios que se hicieron inicialmente estaban basadas en que la mayoría de las distintas especies y variedades rizobianas tienen un rango específico de huésped, es decir, infectan una o unas pocas especies concretas de leguminosas, pero no a las demás. Esto permite distinguir los grupos de inoculación cruzada: conjunto de cepas capaces de infectar una especie (o un grupo determinado de especies) de leguminosas. Se ha comprobado que hay numerosas excepciones en los grupos de inoculación cruzadas (Wilson, 1939). A continuación se muestran los huéspedes principales para las especies de los géneros *Rhizobium* y *Sinorhizobium*.

**Tabla 1. Especies bacterianas de los generos *Rhizobium* y *Sinorhizobium* y sus leguminosas huéspedes más comunes.**

Espece bacteriana	Leguminosa huésped
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	
bv. <i>viciae</i>	<i>Pisum, Vicia, Lathyrus, Lens</i>
bv. <i>trifolii</i>	<i>Trifolium</i>
bv. <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>
<i>Rhizobium etli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Rhizobium tropici</i>	<i>P. vulgaris, Leucaena spp, Macroptilium spp.</i>
<i>Rhizobium galegae</i>	<i>Galega officinales, G. orientales</i>
<i>Sinorhizobium fredii</i>	<i>Glycine</i>
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	<i>Medicago, Melilotus, Trigonella</i>
<i>Sinorhizobium medicae</i>	<i>Medicago</i>
<i>Sinorhizobium teranga</i>	<i>Acacia</i>
<i>Sinorhizobium saheli</i>	<i>Acacia</i>

## 4 CICLO SIMBIÓTICO DE LOS RIZOBIOS

Tradicionalmente se han considerado tres etapas en la simbiosis rizobio-leguminosa (Iañez 1994b):

-especificidad: es la capacidad de cada especie o biovar de rizobio de reconocer la especie adecuada de leguminosa y unirse a sus pelos radicales.

-infectividad: es la capacidad de formar nódulos en las raíces (los nódulos son desarrollos hiperplásicos benignos típicos de esta simbiosis).

-efectividad: es la capacidad del nódulo de fijar nitrógeno.

### 4.1 ESPECIFICIDAD

Las razones por las que una especie o grupo de rizobios es reconocido por la planta son diversas y no bien conocidas. Tradicionalmente se hablaba de grupos de inoculación cruzado cuando un grupo de rizobios reconocía y entraba en simbiosis con un grupo de leguminosas determinado, hoy se sabe que hay muchas excepciones y se dice que el reconocimiento entre bacteria y planta se debe a una serie de reconocimientos moleculares que en conjunto forman los estados tempranos de la nodulación (Vlassak *et al.*, 1997).

#### 4.1.1 Diálogo molecular

Las leguminosas liberan con sus exudados radicales una serie de moléculas que son reconocidas específicamente por los rizobios con los que van a comenzar la simbiosis. Estas moléculas atrayentes se denominan flavonoides (que suelen ser flavonas y

flavononas en el caso de rizobios de crecimiento rápido e isoflavonas en el caso de *Bradyrhizobium*). Cuando la bacteria llega a una zona con una determinada concentración, el flavonoide se une a una proteína sensora de la membrana citoplásmica bacteriana (Nod D). Cada rizobio puede producir uno o varios Nod D, dependiendo del número de genes *nodD* que posea, cada cual se une a diferentes flavonoides (Spaink *et al.*, 1995). Esta unión hace que Nod D cambie de conformación y se convierte en un activador transcripcional de una serie de genes específicos para la infección de la planta y para la nodulación (genes *nod*) los cuales desencadenarán la producción de la molécula señal del microsimbionte llamada factor Nod o lipoquitoligosacárido, que será importante en todas las fases de la simbiosis. Los factores Nod constan de una estructura básica formada por entre 3 y 5 residuos de N-acetilglucosamina unidas por enlaces  $\beta$ -1,4 que lleva en el C2 del azúcar del extremo no reductor un ácido graso. La estructura básica del lipoquitoligosacárido, es sintetizada por el producto de los genes *nodA*, *nodB* y *nodC* y es modificada por otras proteínas Nod, codificadas por los genes *nod* específicos, estas modificaciones son las que determinarán la especificidad de huésped. En el caso de *S. meliloti* la especificidad sobre alfalfa viene determinada a que su factor Nod está sulfatado en la parte reductora del azúcar terminal lo que depende del gen *nodH* que produce una sulfotransferasa (Laeremans *et al.*, 1996).

#### 4.1.2 Quimiotaxis y colonización de la raíz

En la rizosfera (zona del suelo influida por los productos secretados por la raíz) de la leguminosa crecen numerosos tipos de bacterias del suelo, entre ellas los rizobios móviles por flagelos peritricos. Entre los exudados radicales de la planta se encuentran azúcares, aminoácidos, y ácidos orgánicos que se han identificado como quimioatrayentes para varias bacterias de la rizosfera. También se han encontrado flavonoides y otros compuestos fenólicos que inducen respuestas microbianas distintas a la de inducción de genes *nod* (que llevarían a la formación del nódulo), esas respuestas son la metabolización y utilización como fuente de energía y carbono, produciendo efectos de tipo quimioatrayente y de estímulo del crecimiento bacteriano en la rizosfera y rizoplana (superficie de la raíz), ese aumento de bacterias en la rizosfera y rizoplana es denominado colonización (Vlassak *et al.*, 1997; Broek *et al.*, 1995).

#### 4.1.3 Curvatura del pelo radical

Cuando los rizobios han entrado en contacto con los pelos radicales, transcurrida aproximadamente una hora, se produce una deformación y curvatura de éstos, denominado "curling", atrapando uno o varios rizobios. La curvatura está precedida por despolarización de la membrana citoplásmica, cambios en el flujo de iones calcio, eflujo de protones, reorganización de filamentos de actina e incremento en las corrientes citoplásmicas. Todo este proceso también se puede desencadenar añadiendo a la raíz una solución de factores Nod (Heidstra *et al.*, 1995; Spaink, 1995).



## 4.2 INFECTIVIDAD

El rizobio produce enzimas (pectinasas, celulasas, etc.) que desorganizan localmente la pared celular del pelo radical. Se empieza a producir una invaginación de la membrana citoplásmica de la célula del pelo, que va avanzando hacia su base: este es el cordón o canal de infección, que conforme va creciendo en longitud, se va recubriendo de celulosa. El canal sigue prolongándose, atravesando varias capas de células corticales de la raíz y en su interior los rizobios van avanzando, y se van multiplicando activamente. El canal puede producir ramificaciones, y cada una de ellas llega finalmente a algunas de las células del cortex de la raíz. Entonces el canal produce vesículas cerradas, por endocitosis englobando a uno o varios rizobios. Paralelamente a la formación de los canales de infección, en la corteza radicular, ciertas células se activan y se dividen mitóticamente para formar el primordio nodular. En las leguminosas de climas templados, como alfalfa, guisante o trébol, las células que se dividen son las células más internas de la corteza radicular y progresivamente se van reactivando y dividiendo las células más alejadas, formando así el primordio nodular. Las células de la parte distal del primordio, comienzan a hacerse pequeñas y aumenta el contenido citoplásmico, constituyendo el meristemo apical del nódulo. Gracias a este meristemo el nódulo estará en continuo crecimiento, y se le denomina nódulo indeterminado. En leguminosas tropicales, como soja y judía, son las células externas de la corteza radicular las que se reactivan y dividen para formar el primordio nodular. Las células centrales del primordio, al ser infectadas pierden la capacidad de división, sin embargo, las células de la periferia permanecen mitóticamente activas. Como serán infectada más tarde, se forma un meristemo esférico que pierde su actividad unos 10 días después de la infección, dejando entonces el nódulo de crecer. Al tener un crecimiento limitado se denominan nódulos determinados (van Rhijn *et al.*, 1995).

Los factores Nod son capaces de producir esta activación mitótica de las células radicales. El mecanismo por el que produce esta activación parece ser debido a un desequilibrio en el balance normal de las hormonas vegetales auxinas/citoquininas. A estas estructuras nodulares se le denominan pseudonódulos (Hirsch *et al.*, 1994).

Los nódulos son, por tanto, los engrosamientos de la raíz (una especie de tumores), producidos por la proliferación activa de las células tetraploides del cortex y que albergan las vesículas con las bacterias. El tumor posee su sistema de xilema y floema, conectado con el de la raíz, y rodeado por una corteza de células normales diploides. Estas bacterias sufren un proceso de diferenciación a bacteroide que es el encargado de realizar la FBN. El bacteroide pierde su forma habitual bacilar y adquieren aspectos alargados, de letra "Y", ovoides, hinchados, etc.; acumula reservas de poli-beta-hidroxibutirato; pierde su capacidad de dividirse y de volver a su estado anterior.

## 4.3 EFECTIVIDAD

En medios adecuados los rizobios pueden fijar nitrógeno en vida libre, mostrando que poseen la información genética necesaria para realizar la fijación.

La reacción de fijación de  $N_2$  consiste en la reducción de esta molécula a amonio. La mayor parte de este es metabolizado posteriormente, en el citosol de las células vegetales, a los aminoácidos glutamina y glutamato, por las enzimas glutamina sintetasa

y glutamato sintetasa, siendo regulada la fijación por la presencia de estas enzimas. Los aminoácidos producidos pasan al xilema y se distribuyen al resto de la planta.

El proceso de FBN está catalizado por la enzima Nitrogenasa, formada por dos componentes proteicos el dímero de componente II (ferroproteína) y el tetrámero de componente I (molibdo-ferroproteína). Para que la nitrogenasa actúe como catalizador de la reacción necesita ser activada por ATP (Adenosin-trifosfato), que se hidroliza dando ADP (Adenosin-difosfato) y fosfato. La cantidad de ATP utilizado por mol de nitrógeno reducido es variable según las condiciones y se estima entre 15-25.

La nitrogenasa además de catalizar la reducción de sustrato natural, el nitrógeno molecular, es capaz de utilizar otros sustratos, especialmente aquellos que poseen triples enlaces o potenciales triples enlaces en posición terminal, carbono-carbono, carbono-nitrógeno o nitrógeno-nitrógeno. La reducción de protones a hidrógeno molecular es otra reacción catalizada por la nitrogenasa, que ocurre normalmente de forma simultánea con la reducción del nitrógeno, esto le supone una pérdida energética de la eficiencia del sistema fijador, ya que consume ATP. Algunas cepas de rizobio poseen hidrogenasa capaz de reciclar el hidrógeno producido, recuperando el ATP y mejorando la eficiencia (Orive *et al.*, 1983).

La enzima nitrogenasa es altamente sensible al oxígeno, inactivándose de forma irreversible, e incluso inhibiéndose su síntesis en presencia de este elemento. La protección al oxígeno de la nitrogenasa se debe a la leghemoglobina asociada a la membrana que rodea al bacteroide. El interior del nódulo efectivo es de color rosa debido a las grandes cantidades de leghemoglobina. La leghemoglobina es una hemoproteína con hierro, cuyo grupo hemo es sintetizado por la bacteria y la porción proteica es sintetizada por la planta. Esta molécula al interconvertirse entre su forma oxidada y reducida va suministrando oxígeno al bacteroide a una tasa apropiada para que sea empleado de forma óptima como aceptor terminal de electrones de una cadena transportadora aeróbica que trabaja a bajas tensiones de este gas y permite que haya en el nódulo la tensión baja de oxígeno que no afecte a la actividad de la nitrogenasa. Una vez que en el interior del bacteroide se alcanza una tensión de oxígeno suficientemente baja, se inducen sus genes *nif*, que codifican el complejo nitrogenasa.

## 5 ACIDEZ

Los suelos ácidos ocupan el 30% (3950 mill. ha) de la tierra sin hielo. Solo el 4,5% (179 mill. ha) de suelos ácidos son utilizados como suelos arables de cultivo, el resto está ocupado por bosques, sabanas, praderas y estepas.

Una de las causas que conducen a la acidificación de un suelo puede ser la propia composición del suelo; en Sud América hay unas 700 mill. ha que son suelos tipo Ultisol y Oxisol que son inherentemente ácidos, también los sistemas de pastos de legumbres así como los métodos de agricultura intensiva aceleran la acidificación del terreno (von Uexkull *et al.*, 1995).

En suelos ácidos la producción de los cultivos de leguminosas se ve disminuida debido a diversos factores que afectan a la planta huésped (Howieson *et al.*, 1992); a la población rizobiana (Brockwell *et al.*, 1995; Rice *et al.*, 1977; Lowendorf *et al.*, 1981); y a la propia interacción simbiótica que conduce a la fijación biológica de nitrógeno

(FBN) (Rice *et al.*, 1977; Munns, 1968). Los factores causantes son diversos como son la baja disponibilidad de los elementos Mo, P, y fundamentalmente el Ca (Howieson *et al.*, 1993; Rice, 1975; Pijnemborg *et al.*, 1990c, Caetano-Anolles *et al.*, 1989), toxicidad del Al y Mn (Graham, 1992; Hartel *et al.*, 1989; Flis *et al.*, 1993; Yokota *et al.*, 1995) y el efecto de la concentración de  $H^+$  (o pH ya que éste se define como el  $-\log [H^+]$ ) *per se* (Pijnemborg *et al.*, 1990b; Glenn *et al.*, 1994).

## 5.1 EFECTO DE LA ACIDEZ EN LA PLANTA

Las leguminosas en general crecen bien en condiciones ácidas. La acidez del suelo tiene un fuerte efecto en el crecimiento cuando el aporte de nitrógeno depende de la simbiosis. Cuando se le aporta a la planta bastante nitrógeno mineral la planta puede crecer en suelos con un pH bastante bajo (Pijnemborg *et al.*, 1990a). Se ha comprobado que la alfalfa crece bien a pH 4,0 con una cantidad de  $CaCO_3$  de 5mM (Rice, 1975). Distintas especies anuales de *Medicago* (*M. murex*, *M. polymorfa*) se han descrito como mejores tolerantes a la acidez que otras (*M. trunculata*, *M. littoralis*) pues nodulan mejor en suelos ácidos (Howieson *et al.*, 1992).

## 5.2 EFECTO DE LA ACIDEZ EN LA BACTERIA

### 5.2.1 Población de rizobios en suelos ácidos

En suelos ácidos hay una importante disminución del número de rizobios que puede pasar de  $10^5$ , en el suelo a pH neutro, a 37 bacterias en suelo a pH 6 (Brockwell *et al.*, 1991). Al disminuir el número de rizobios, no todas las plantas se nodulan en cantidad suficiente para que haya una FBN adecuada para el buen crecimiento vegetal. Igualmente se ha descrito que hay un aumento en la proporción de nódulos inefectivos, no fijadores de  $N_2$ , en los suelos ácidos y en mayor medida en los suelos ácidos que llevan un tiempo sin cultivarse la planta huésped. Se especula que los suelos ácidos inducen la pérdida de la diversidad de población eficiente o que esas bacterias pierden su capacidad simbiótica (Barber, 1980).

### 5.2.2 Rizobios tolerantes a la acidez en cultivo *in vitro* y tolerantes a la acidez en suelo

En el estudio de la tolerancia a la acidez de los rizobios podemos considerar tolerancia a la acidez en medio de cultivo, *in vitro*, (o tolerancia a la acidez propiamente dicha) y tolerancia a la acidez en suelos. En el primer caso podemos delimitar el efecto del pH *per se* sobre las bacterias y en el segundo consideramos la tolerancia a la acidez junto a una serie de factores como son fundamentalmente la persistencia y nodulación bacteriana (la persistencia de una bacteria en el suelo y su capacidad de nodulación tras el verano se denomina competencia saprofitica) en el suelo que viene determinado por el conjunto de valores que son la tolerancia a la concentración de hidrogeniones, a elementos tóxicos, poca disponibilidad de otros elementos y la presencia de ciertos factores biológicos como son otras bacterias que sean competitivas en nodulación o competitivas saprofiticamente con otros microorganismos o virus que pongan en peligro su nicho ecológico. Que un rizobio sea "ácido-tolerante" (*in vitro*) no implica que sea

también “ácido-tolerante” en suelo. Así mismo puede haber rizobios que no sean “ácido-tolerantes” *in vitro* y que estén bien adaptados a ese suelo, y persistan por ejemplo en micronichos donde se conserva un pH óptimo para su crecimiento y/o supervivencia (Lowendorf *et al.*, 1983). En la selección de un rizobio con fin de preparar un inoculante para mejorar una producción en suelos ácidos se suelen tomar rizobios tolerantes a la acidez en medio definido como un requisito de selección de rizobios tolerantes a la acidez en suelo (Glenn *et al.*, 1994).

Los rizobios de crecimiento rápido (*S. meliloti*, *S. medicae*, *R. etli*, *R. tropici*, *R. leguminosarum*, etc.) son menos tolerantes a la acidez que los rizobios de crecimiento lento (*Bradyrhizobium*, *cowpea rhizobia*, etc.), salvo *R. tropici* que algunas cepas llegan a crecer bien a pH 4,0. *S. meliloti* y *S. medicae* son menos tolerantes a la acidez que el resto de rizobios, su pH mínimo de crecimiento y supervivencia es 5,5 (Graham, 1992).

Experimentos en campo e invernadero han mostrado en poblaciones de *S. meliloti* que la nodulación y producción relativa de alfalfa descendió en gran proporción a medida que el pH del suelo bajaba de pH 6 (Rice *et al.*, 1977), siendo *S. meliloti* más afectada por la acidez que la planta (Clarke *et al.*, 1993).

Para superar el problema de establecimiento de pastos de *Medicago* spp. en suelos moderadamente ácidos de Australia, se aislaron cepas de *S. meliloti* de la cuenca del Mediterráneo (Grecia e Italia). Las cepas se seleccionaron por un criterio empírico de tolerancia a la acidez en suelo (Howieson *et al.*, 1986) y utilizando *M. Polymorfa*, se comprobó que tenían mayor capacidad de colonización, persistencia y nodulación sobre *M. Polymorfa* que los inoculantes utilizados hasta entonces: cc169 y U45 (O’Hara *et al.*, 1989).

Hay estudios que muestran una correlación positiva entre la selección de *S. meliloti* tolerantes a la acidez en medio definido en placa y su persistencia y aumento de la nodulación en el campo (Howieson *et al.*, 1986). Hay otros estudios que están en contra de que las bacterias ácido tolerantes en placa lo sean también en el campo (Howieson *et al.*, 1988). Con otros rizobios distintos a *S. meliloti* también hay datos a favor (Graham *et al.*, 1982; Rice, 1982; Hartel *et al.*, 1983) y en contra (Bromfield *et al.*, 1980) de esa correlación.

### 5.2.3 Tolerancia a la acidez y pH interno

Cepas de bacterias como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Shigella flexneri*, se han mostrado que mantienen su pH interno a niveles alcalinos mientras sobreviven en pH ácido (2-3) durante algunas horas, a esto se le ha llamado homeostasis del pH citoplásmico (Park *et al.*, 1996; Small *et al.*, 1994). La cepa “ácido-tolerante” *Rhizobium tropici* UMR1899 se sometió a choque ácido y mostró una limitada capacidad de regular su pH interno (Graham *et al.*, 1994). Sin embargo estudios realizados sobre la cepa “ácido-tolerante” *S. medicae* WSM419 muestran que esta bacteria presenta homeostasis de su pH interno y no así sus mutantes “ácido-sensibles”. Según estos estudios parece haber una relación directa entre el mantenimiento del pH citoplásmico bacteriano a niveles alcalinos en condiciones de medio externo ácido y la tolerancia a la acidez rizobiana en campo (O’Hara *et al.*, 1989; Glenn *et al.*, 1994; Howieson, 1995a).

#### 5.2.4 Estado fisiológico bacteriano durante la acidez

Fisiológicamente los rizobios cultivados en condiciones ácidas tienen niveles citoplásmicos superiores de glutamato y K y alteración de poliaminas al igual que en situación de estrés osmótico (Graham, 1992; Fujihara *et al.*, 1993). También se observa una relación entre la acidez y las características de superficie de rizobios como son exopolisacáridos (EPS), motilidad, antígenos de superficie (Glenn *et al.*, 1994). Por otra parte se ha estimado que la fuente de Carbono es importante en la caracterización de curva de crecimiento, si no hay fuente de carbono a pH 5,6, mueren las bacterias (Graham *et al.*, 1994).

#### 5.2.5 Bases genéticas de la tolerancia a la acidez de rizobios

Las bases de la tolerancia al bajo pH en rizobios son desconocidas pero diferentes estudios usando mutantes "ácido-sensibles" sugieren que pueden estar implicados muchos genes dispersos por el cromosoma (Chen *et al.*, 1993; Glenn *et al.*, 1994). En *S. medicae* se han obtenido mutantes sensibles a la acidez *in vitro* de la cepa WSM419 (cepa tolerante a la acidez en suelos y de leve tolerancia a la acidez *in vitro*, a pH 5,6) estos mutantes dejan de crecer a pH 5,8 y unos son recuperables con 50 mM de Ca (con lo que crecen a pH 5,6) y otros no son recuperables con Ca (Tiwari *et al.*, 1992; Goss *et al.*, 1990). De ellos se han conseguido identificar tres genes que están relacionados con la sensibilidad a la acidez: *actA*, gen sensible a la acidez y al cobre, y se piensa que esta proteína puede estar unida a la membrana y relacionada con el metabolismo de lípidos (Tiwari *et al.*, 1996a), y los genes *actR* y *actS* que son genes reguladores y sensores respectivamente, relacionados con la acidez, aunque aun no se conoce su mecanismo preciso de acción (Tiwari *et al.*, 1996b). No han aparecido mutantes de *S. meliloti* o *S. medicae* que toleren niveles de acidez inferior a pH 5,5.

### 5.3 EFECTO DE LA ACIDEZ EN NODULACIÓN Y EFICIENCIA SIMBIÓTICA

Se ha observado una disminución de la producción vegetal de las leguminosas en suelos con pH inferior a 6. La causa es dependiente de unos bajos niveles de FBN que es consecuencia de dos factores: la proliferación de bacterias ineficientes que compiten en la nodulación con las bacterias eficientes, infectan la raíz y producen nódulos no fijadores de nitrógeno; y en segundo lugar la menor proporción de plantas noduladas y de nódulos por planta, consecuencia por una parte del menor número de rizobios en el suelo y por otra del proceso de nodulación que se ve afectado en sus diversos niveles: quimiotaxis, adhesión de la bacteria a la raíz y proceso de inducción del nódulo (Burton, 1972).

#### 5.3.1 Diálogo molecular

Los flavonoides liberados por las distintas especies o variedades de plantas se pueden ver afectados tanto cualitativamente como cuantitativamente en condiciones de acidez. Lo que indica que interaccionarán de distinta forma sobre los receptores NodD de los rizobios. Igualmente los factores Nod de los distintos rizobios se podrán ver afectados

en su liberación tanto cuantitativamente como cualitativamente por el medio ácido, lo que repercutirá en el diálogo entre ambos simbioses (Howieson, 1995a). En este proceso parecen intervenir los iones Ca (Richardson *et al.*, 1988; Howieson *et al.*, 1992).

### 5.3.2 Adhesión

Cuando el número de rizobios en el suelo es bajo es importante la adhesión bacteriana a la raíz para que ocupen el máximo número de sitios posibles de unión y haya una buena nodulación que conllevará una buena producción vegetal. La adhesión se ve influida en gran medida tanto por el Ca como por el pH siendo necesaria una mayor concentración de Ca en condiciones ácidas para una mayor adhesión, esto se ha comprobado en *M. sativa* (Caetano-Anolles *et al.*, 1989) en otras *Medicagos* anuales (Howieson *et al.*, 1993), y en otras leguminosas como *P. vulgaris* (Lodeiro *et al.*, 1995).

### 5.3.3 Nodulación

En estudios en cultivo hidropónico, donde se observa el efecto del pH per se, se ha demostrado que la prevención de la nodulación, en *M. sativa*, con un inóculo alto de rizobios ( $10^8$ - $10^9$ ), donde hay una buena colonización de la rizosfera, ocurre a pH ácido (4,4) en fases muy tempranas de la nodulación, en la curvatura del pelo radical (Munns, 1968), al aumentar el pH por encima de 4,8 y al aumentar la concentración de Ca se desencadenaba todo el proceso de curvatura del pelo radical, aparición de canales de infección y resto del proceso de formación del nódulo (Munns, 1970). Pijnemborg *et al.* (1990b), en estudios en rhizotron con suelo ácido (pH 5,2), al encalar la semilla inoculada con alta concentración bacteriana, observó que el aumento de nodulación se debe en un 80% a la neutralización del pH y en un 20% a la entrada de Ca.

*IV. MATERIAL Y MÉTODOS*



## 1 CEPAS BACTERIANAS Y PLÁSMIDOS

Los plásmidos y las cepas bacterianas, de *Rhizobium*, *Sinorhizobium* y *Escherichia coli* utilizados en la realización de este trabajo así como sus características más relevantes aparecen relacionados en las tablas 1 y 2 respectivamente.

Tabla 1. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Características relevantes	Fuente o referencia
pRK2013	Replicón ColE1, Km <sup>r</sup> , tra,	Figurski <i>et al.</i> (1979)
pGUS3	plásmido movilizador Fusión traducional del gen GUS al promotor del gen <i>nfeD</i> en el vector pBI100 (Clontech). Km <sup>r</sup>	F. M. García

Tabla 2. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.

Bacteria	Características relevantes	Fuente o referencia
<i>Escherichia coli</i> HB101	<i>pro</i> , <i>leu</i> , <i>thi</i> , <i>lacY</i> , <i>endA</i> , <i>recA</i> , <i>hsdR</i> , <i>hsdM</i> , Sm <sup>r</sup>	Boyer <i>et al.</i> (1969)
DH5 $\alpha$	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , $\phi 80d$ , <i>lacZ</i> , <i>dm15</i>	Bethesda Research Laboratory
<i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>bv. phaseoli</i> 2616 sp18	cepa silvestre cepa silvestre	E. Martínez-Romero ídem
<i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>bv. viciae</i> 248	cepa silvestre	E. Martínez-Romero
<i>Rhizobium etli</i> CFN42 Brasil 5 Viking 1	cepa silvestre cepa silvestre cepa silvestre	E. Martínez-Romero ídem ídem
<i>Rhizobium tropici</i> (tipoA) CFN-299	cepa silvestre	E. Martínez-Romero
<i>Rhizobium tropici</i> (tipoB) BR-852	cepa silvestre	E. Martínez-Romero



<i>Rhizobium</i> spp. (Oregón)		
Or191	cepa silvestre	Eardly <i>et al</i> (1985)
LPU81	cepa aislada de nódulo de <i>M. sativa</i> (Argentina)	A. Lagares
LPU83	ídem	ídem
LPU84	ídem	ídem
LPU154	ídem	ídem
LPU158	ídem	ídem
LPU250	ídem	ídem
LPU266	ídem	ídem
LPU275	ídem	ídem
LPU284	ídem	ídem
LPU285	ídem	ídem
LPU286	ídem	ídem
CE20	cepa aislada de nódulo de <i>M. sativa</i> (Uruguay)	G. Martinez-Dretz
CE26	ídem	ídem
CE46	ídem	ídem
LPU83(GUS3)	LPU83 con el plásmido pGUS3	Este trabajo
<i>Sinorhizobium fredii</i> HH102	cepa salvaje	Dowdle <i>et al.</i> (1985)
<i>Sinorhizobium medicae</i> WSM419	cepa salvaje, tolerante a la acidez	J. G. Howieson
<i>Sinorhizobium meliloti</i>		
GR4	cepa silvestre	Casadesus y Olivares
2011	cepa derivada de SU47	J. Denarié
WSM826	cepa salvaje, tolerante a la acidez	J. G. Howieson
WSM879	ídem	ídem
WSM922	ídem	ídem
LPU7	cepa aislada de nódulo de <i>M. sativa</i> (Argentina)	Lagares
LPU11	ídem	ídem
LPU18	ídem	ídem
LPU30	ídem	ídem
LPU63	ídem	ídem
LPU66	ídem	ídem
LPU119	ídem	ídem
CE17B	cepa aislada de nódulo de <i>M. sativa</i> (Uruguay)	G. Martinez-Dretz
CE21A	ídem	ídem
CE31A	ídem	ídem
CE32B	ídem	ídem
CE47B	ídem	ídem
CE56A1	ídem	ídem
CE65C4	ídem	ídem
CE47	ídem	ídem
B399	cepa utilizada como inoculante en Argentina	A. Lagares
Inoculante 143	cepa utilizada como inoculante en Uruguay	G. Martinez-Dretz
2011(GUS3)	2011 con el plásmido pGUS3	F. M. García
GR4(GUS3)	GR4 con el plásmido pGUS3	P. van Dillewing
LPU63(GUS3)	LPU63 con el plásmido pGUS3	ídem
EDUn	aislados de nódulos de <i>M. sativa</i> (EEZ, Granada)	Este trabajo

Tabla 2 (continuación)

## 2 MEDIOS DE CULTIVO Y DE CONSERVACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS

### 2.1 MEDIOS PARA RHIZOBIACEAE

\*Los cultivos de las bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Sinorhizobium* se llevaron a cabo habitualmente en medio completo TY (Beringer, 1974) cuya composición es la siguiente:

CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,9	g
Triptona (DIFCO)	5	g
Extracto de levadura (DIFCO)	3	g
Agua (desionizada)	1000	g

Para la preparación de medios sólidos se añadió agar (PANREAC) al 1,5 %.

La esterilización se realizó durante 20 minutos a 120°C en autoclave.

\*El medio mínimo (MM1) utilizado para la selección de (*Sino*)*Rhizobium* fue el de Robertsen *et al.*, (1981), modificado según se especifica a continuación:

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,3	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,3	g
MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	0,15	g
CaCl <sub>2</sub>	0,05	g
FeCl <sub>3</sub>	0,006	g
NaCl	0,05	g
Glutamato sódico	1,1	g
Manitol	10	g
Biotina	0,0002	g
Pantotenato cálcico	0,0001	g
Agua (desionizada)	1000	ml

Para tamponar el medio se utilizó 20mM de MOPS, ácido (2-[N-Morpholino]propanosulfónico; SIGMA) a pHs 7 y 6,5 y 20 mM de MES, ácido (3-[N-Morpholino]ethanosulfónico; SIGMA) a pHs 6,0 y 5,6 (Howieson, 1985).

Para solidificar el medio se añadió 1,5% de agar purificado (BBL).

Se ajusta el pH a 6,8-7,0 y se esteriliza a 120°C, 20 minutos en autoclave.

\*El medio mínimo (MM2) en el que se hizo la discriminación en placa de cepas "ácido tolerantes" y no "ácido-tolerantes" fue el siguiente:

Sacarosa	29,2	mM
Glutamato sódico	2,67	mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 3H <sub>2</sub> O	0,15	mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,15	mM
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,7	mM
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	1,0	mM
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	1,0	mM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,048	mM
MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	0,01	mM
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,01	mM
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0,048	mM
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0,0005	mM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,001	mM
FeCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O	0,001	mM
Tiamina HCl	0,00295	mM
Ac. Pantoténico	0,0042	mM
Biotina	0,000082	mM

Se tampona: a pH 5,0 con PO<sub>4</sub>H<sup>-</sup>/PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> (20 mM), a pH 5,5 y 6,0 con MES (20mM) y a pH 7,0 con MOPS (20mM). Para solidificar el medio se añadió 1,5% de agar purificado (BBL).

La temperatura de incubación para *Rhizobium* fue de 28°C.

## 2.2 MEDIO PARA *E. COLI*

Para el cultivo de las cepas de *Escherichia coli* se utilizó habitualmente el medio Luria-Bertani (LB)(Sambrook *et al.*, 1989) cuya composición es la siguiente:

NaCl	5	g
Triptona (DIFCO)	10	g
Extracto de levadura	5	g
Agua (desionizada)	1000	ml

Para preparar medio sólido se utilizó agar (PANREAC),15 g/l.

El medio se esterilizó igualmente a 120°C durante 20 minutos.

La temperatura de incubación para *E. coli* fue de 37°C.

## 2.3 MEDIOS DE CONSERVACIÓN

La conservación a largo plazo de las cepas bacterianas se hizo por congelación rápida de cultivos crecidos hasta la fase logarítmica tardía suplementados de glicerol estéril hasta una concentración final del 20% (V/V). Los criotubos se almacenan a una temperatura de -70°C, siendo viables durante varios años.

### 3 ANTIBIÓTICOS

Los antibióticos, cuando se requirieron, fueron adicionados a los medios de cultivo a partir de soluciones 100 veces concentradas de los mismos en agua desionizada. Las soluciones preparadas en agua se esterilizaron por filtración a través de unidades Minisart<sup>®</sup> NML (Sartorius) de 0,2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. Las concentraciones finales en los medios de cultivo fueron ( $\text{mg.l}^{-1}$ ): Kanamicina sulfato (Km, BOEHRINGER), 50 para *E. coli*, y 180 para (*Sino*)*Rhizobium*; cicloheximida (CyH, SIGMA), 200.

### 4 CONTROL DEL PH

Para obtener el pH deseado, se realizó la medición con pHmetro de la marca Crison (MicropH 2000), previa y posteriormente (en medio líquido) al esterilizar los medios en autoclave. Al finalizar los crecimientos bacterianos en cultivo líquido se le eliminó las bacterias por centrifugación y al sobrenadante se le midió nuevamente el pH.

## 5 ESTUDIOS *IN VITRO* DE TOLERANCIA A LA ACIDEZ DE (*SINO*)*RHIZOBIUM*

### 5.1 TOLERANCIA A LA ACIDEZ EN PLACA

La tolerancia a la acidez de los distintos rizobios nodulantes de alfalfa se hizo en placa petri con medio mínimo MM2, a pHs 5,0, 5,5, 6,0 y 7,0 utilizando tampón fosfato como amortiguador de pH. Para ello se tomó con un asa de siembra estéril una pequeña cantidad de la cepa a ensayar de la correspondiente placa de cultivo. Se realizó la extensión sobre la placa a pH tamponado. Se dispusieron 8 cepas bacterianas por placa. A los cinco días se observó el crecimiento y se fotografió con una cámara POLAROID MP-4 y película POLAROID tipo 667.

### 5.2 CURVAS DE CRECIMIENTO EN MEDIO MÍNIMO EN FUNCIÓN DE LA ACIDEZ

Las curvas de crecimiento de las distintas cepas bacterianas ensayadas se realizó en medio mínimo de Robertsen (MM1) tamponado con MOPS a pH 7,0 y 6,5 y con MES a pHs 6,0 y 5,6. Los cultivos se incubaron a 28°C en agitación (225 r.p.m.), en tubos de ensayo (2 tubos/tratamiento) que contenían 3 ml de medio mínimo (MM), inoculados al 1% a partir de preinóculos crecidos en MM a pH neutro durante 2-3 días (D.O.600=1,0). El crecimiento se determinó mediante la lectura de la absorbancia (D.O.) a 600 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro Pharmacia LKB-Novaspec II.

Simultáneamente se retiraron alícuotas de cada tubo para determinar el número de células viables en cada momento. Esto se hizo mediante la preparación de diluciones

seriadas al décimo y siembra de 0,1 ml de las diluciones adecuadas en placas (2 placas/dilución) de medio TY. Las placas se incubaron a 28°C. Tras el recuento de las colonias aparecidas se determinó el tiempo de generación (G) definido como el tiempo en que se duplica la población bacteriana en la fase logarítmica del crecimiento.

## 6 EXTRACCIÓN DE ADN TOTAL DE (*SINO*)*RHIZOBIUM*

De la cepa correspondiente, se centrifugan durante 3 min. en un tubo eppendorf 1,5 ml de un cultivo bacteriano en fase exponencial tardía. Las células se lavan en 200 µl de N-lauril sarcosina al 0,1% en TE y se centrifugan. A continuación, se resuspenden en 300 µl de TE, se añade 100 µl de pronasa (2,5 mg/ml en TE, predigerida a 37°C durante un mínimo de 90 minutos) y 100 µl de SDS al 5% en TE. Se mezcla por inversión y se incuba a 37°C durante 1-2 horas. Transcurrido este tiempo, se precipitan los restos celulares con 125 µl de una solución de NaCl 5M en TE previamente esterilizada en autoclave. Se incuba en hielo 30 minutos, y se centrifuga. Posteriormente, a la solución de ADN se le añade 1 volumen igual de fenol y se agita con vórtex vigorosamente durante 1 min., se deja reposar y se mezcla nuevamente de la misma manera durante otro minuto. Se centrifuga durante 5 min., pasando a continuación la fase superior acuosa a un nuevo tubo donde se extrae una vez más con fenol. Recogida la fase acuosa, se procede a dos nuevas extracciones sucesivas con fenol/cloroformo y cloroformo. El ADN se precipita añadiendo 2,5 volúmenes de etanol 100% frío (-20°C), se mezcla por inversión y se incuba a -20°C un mínimo de 2 horas. Después se centrifuga durante 15 min., el precipitado se lava con 0,5 ml de etanol al 70%, se seca al vacío durante 20-30 minutos y el ADN seco se resuspende en 25-50 µl de TE. A las que se añade 1 µl de una solución de RNasa de 1mg/ml.

## 7 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ADN Y OLIGONUCLEÓTIDOS

Se ha seguido el método espectrofotométrico descrito en Sambrook *et al.* (1989). Se mide la absorbancia de la solución de ADN en agua o en TE a 260 y 280 nm utilizando como blanco agua o TE libre de ADN. La concentración en la muestra se calcula respecto a los valores estándar de  $DO_{260nm}$ , 1 para soluciones con 50 µg/ml de ADN de cadena doble, 40 µg/ml de ADN de cadena sencilla o ARN, y 20 µg/ml de oligonucleótidos. La relación  $DO_{260nm}/DO_{280nm}$  se usa como estimador de la pureza de la preparación, considerándose valores por debajo de 1,8 como indicadores de contaminación por proteínas o fenol. Para muestras de ADN muy impuras o de baja concentración, se empleó el método de comparación de fluorescencia en gel de agarosa bajo luz UV frente a marcadores de ADN de concentración conocida, también descrito por Sambrook *et al.* (1989).

## 8 PREPARACIÓN DE LISADOS CELULARES

Las bacterias crecidas sobre placas de TY se recogen con palillos estériles y se resuspenden en 100  $\mu$ l de 0,1% de N-lauril sarcosina (sarcosil) en TE8 (DO<sub>600</sub>=0,6), se centrifuga a 14.000 r.p.m. durante 5 min., y se lavan con agua desionizada estéril 1 ó 2 veces. El precipitado se resuspende finalmente en 100  $\mu$ l de agua y se hierve 5-10 min. Se centrifuga y los lisados se conservan a 4°C.

## 9 TRATAMIENTO ENZIMÁTICO DEL ADN

Las digestiones con enzimas de restricción, se realizaron en las condiciones óptimas para la enzima, siguiendo las indicaciones de temperatura y tampón propuestas por las casas comerciales (BOEHRINGER y PROMEGA), y las recomendaciones descritas en Sambrook *et al.* (1989).

Las reacciones se llevaron a cabo habitualmente con 0,5-5  $\mu$ g de ADN, 0,1 volumen del tampón correspondiente suministrado por la casa comercial, diez veces concentrado y 0,5-1 unidad del enzima a utilizar, en volúmenes finales de 10-25 $\mu$ l completados con agua ultrapura. Estas reacciones se llevaron a cabo incubando las mezclas de reacción 2 horas a la temperatura indicada por el fabricante.

## 10 ELECTROFORESIS DE ADN

### 10.1 SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN O DE AMPLIFICACIÓN POR PCR MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Se llevó a cabo la separación de fragmentos de restricción mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa (SIGMA tipo I) generalmente al 0,8% en tampón TBE (Tris 89 mM, EDTANa<sub>2</sub> 2,5 mM, BO<sub>3</sub>H<sub>2</sub> 89 mM, pH 8,2). El voltaje usual de trabajo ha sido de 40-50 V para los "IS-fingerprint" y 100-120 V en la separación de las amplificaciones de PCR. Como solución de carga se utilizó sacarosa 40% y azul de bromofenol 0,25% en una relación 5  $\mu$ l solución de ADN/1  $\mu$ l solución de carga.

### 10.2 REVELADO DE GELES Y FOTOGRAFÍA

Para la visualización del ADN, los geles de agarosa se revelaron sumergiéndolos en una solución de bromuro de etidio (agua a la que previamente se añaden unas gotas de solución de bromuro de etidio al 0,001%) durante 15-20 min. Posteriormente se observó con luz UV de 260 nm en un transiluminador.

Las fotografías de los geles se realizaron con una videocámara de la marca "gelprinter" VM5092 de TDI.

### 10.3 ESTIMACIÓN DE LOS PESOS MOLECULARES DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN POR ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

El tamaño de los fragmentos de restricción se determinó por interpolación gráfica en curvas en las que se representa el logaritmo del peso molecular frente a la movilidad relativa del fragmento (distancia de migración dividida por la longitud del gel), utilizando como patrones los marcadores de peso molecular que consisten en fragmentos de ADN del fago lambda resultantes de la digestión con endonucleasa *Hind*III (marcador II) o bien se usó el ADN del fago lambda digerido con las endonucleasas *Eco*RI y *Hind*III (marcador III). Cuando los fragmentos esperados tenían tamaños por debajo de 2,6 Kb (como son los fragmentos de ADNr 16S de unos 250 pb) se utilizó el marcador de peso molecular pGEM de PROMEGA. Algunos de estos marcadores se utilizaron marcados con digoxigenina para el caso de usarse en geles que se iban a transferir a filtros e hibridarse con sondas no radiactivas.

## 11 EXPERIMENTOS DE HIBRIDACIÓN ADN-ADN. "IS-FINGERPRINT"

### 11.1 SONDA NO RADIATIVA

La sonda para *ISRm2011-2* (Selbitschka *et al.* 1995) fue amablemente cedida por la Dra. S. Zekrí (tesis doctoral, 1997) se obtuvo por amplificación de PCR de un fragmento interno de esta secuencia de inserción utilizando el plásmido pRmNT40 (Toro *et al.*, 1986) proveniente de la cepa GR4. Los oligonucleótidos usados en la reacción de amplificación fueron 2011B1 (5'TGGACGAAGACGAACATGG3')/2011B2 (5'TTGAAGTAGGCTGCGCATT3'). Los fragmentos de PCR fueron aislados de gel de agarosa y marcados con digoxigenina-11-dUTP (DIG, Boehringer Mannheim).

### 11.2 TRANSFERENCIA DE ADN A FILTROS DE NYLON

La transferencia de fragmentos de restricción de ADN plasmídico o total a filtros de nylon cargados positivamente (Boehringer Mannheim) se realizó usando el sistema de transferencia a vacío (VacuGene XL) de Pharmacia Biotech.

Una vez digerido el ADN con la correspondiente enzima de restricción se separan los fragmentos generados por electroforesis horizontal en gel de agarosa. Después de fotografiar el gel y de medir sus dimensiones se procede a la desnaturalización del ADN mediante exposición a luz ultravioleta durante 10-20 minutos. Durante este tiempo, se corta un trozo de filtro y se equilibra en una solución 20xSSC (NaCl 3 mol/l, citrato sódico 0,3 mol/l, pH 7,0), previamente humedecido con agua estéril. Se monta el sistema colocando filtro más gel y se conecta la bomba de vacío a una presión constante de 55 mbar durante una hora. El tampón de transferencia consiste en una solución 1M de NaOH. Una vez finalizada la transferencia, se lava el filtro con una solución de 2xSSC para eliminar restos de agarosa y se deja secar un poco al aire. Posteriormente, se fija el ADN al filtro cociéndolo a 120°C durante media hora al vacío.

### 11.3 HIBRIDACIÓN Y REVELADO

Después de mantener el filtro en la solución de prehibridación (20 ml/100 cm<sup>2</sup> de filtro) compuesta por 5xSSC; N-lauril sarcosina 0,1%; SDS 0,02%; formamida 50% y agente bloqueante al 2% durante un mínimo de una hora a 42°C, se reemplaza la solución con 10 ml de sonda marcada y se deja rotando lentamente a una velocidad constante en un horno de hibridación (HB-1D de Techne) un mínimo de 12 horas a 42°C.

Finalizada la hibridación se lavan los filtros siguiendo las recomendaciones de los proveedores y posteriormente se lleva a cabo la detección inmunológica. Esta última se efectuó usando el protocolo para detección quimioluminiscente mediante el uso de fragmentos F<sub>ab</sub> de anticuerpos antidigoxigenina conjugados con la fosfatasa alcalina que desfosforilará el sustrato quimioluminiscente AMPPD<sup>®</sup> (Boehringer Mannheim).

Las películas utilizadas para detectar las señales de hibridación fueron las de Kodak X-OMAT y se revelaron con el revelador Neutol Liquid NE (AGFA) y fijador N FIX 172 (NEGRA) a las diluciones y tiempos recomendados por las casas comerciales.

### 11.4 ANÁLISIS INFORMATIZADO DE LOS DATOS DEL "IS-FINGERPRINT"

Las películas con las imágenes de hibridación fueron "escaneadas" y los patrones de bandas importados a un banco de datos. La comparación de esos patrones se realizó con el programa AQ-Image software (Bio Image). Se identificó una diferencia del 4% de todas las bandas entre 500 y 23000. Para realizar el dendrograma se utilizó el método UPGMA ("unweighted pair group with mathematical averaging").

## 12 ANÁLISIS DEL ADN R 16S.

### 12.1 OLIGONUCLEÓTIDOS

La región correspondiente a los nucleótidos 20 a 338 del ADN 16S de *Escherichia coli* fue amplificada para cada cepa de este trabajo con los cebadores universales Y1 (5'-TGGCTCAGAACGAACGTGGCGGC-3') e Y2 (5'-CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3') previamente descritos para proteobacterias (Young *et al.*, 1991). Los oligonucleótidos cebadores utilizados fueron sintetizados por el servicio de síntesis de oligonucleótidos del Instituto de Parasitología López Neyra, CSIC-Granada.

### 12.2 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Todas las reacciones de PCR se hicieron con un patrón común de ciclos: 1 ciclo de desnaturalización a 95°C durante 5 minutos; 30 ciclos de síntesis divididos en tres pasos, paso de desnaturalización de 1 min., a 95°C, paso de apareamiento de bases durante 1 min a la temperatura específica de cada par de oligonucleótidos (que en nuestro caso fue 65 °C) y paso de síntesis propiamente dicho de 2 min., a 72°C; la reacción de PCR se termina con un último ciclo a 72°C durante 10 min.



Las reacciones de PCR se llevan a cabo en tubos de 0,5 ml GeneAmp de Perkin Elmer en termocicladores Stratagene<sup>R</sup>. El volumen final de reacción fue de 25  $\mu$ l cubiertos con unos 30  $\mu$ l de aceite mineral (SIGMA) para evitar evaporaciones. Se amplificaron 4  $\mu$ l de los lisados celulares ó 120 ng de ADN total purificado con 50 pmoles de cada uno de los oligonucleótidos específicos; 0,4 mM de los deoxinucleósidos trifosfato y 2,5  $\mu$ l de 10x tampón de PCR (BOEHRINGER) conteniendo 15 mM MgCl<sub>2</sub>. En las reacciones se utilizó 1 unidad de Taq ADN polimerasa (BOEHRINGER).

### **12.3 PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE PCR**

La purificación de los fragmentos de ADN generados por PCR se llevó a cabo mediante el uso de "Magic PCR preps<sup>TM</sup>" (PROMEGA) o "MicroSpin<sup>TM</sup> S300HR columns" (PHARMACIA).

En ambos casos se siguieron las instrucciones de las respectivas casas comerciales, si bien y dado que los resultados obtenidos fueron más rápidos y mejores con la utilización de las columnas de PHARMACIA, estas fueron las más utilizadas.

El protocolo de utilización de las columnas de PHARMACIA es el siguiente: se resuspende la resina de la columna por agitación. Se abre la tapa 1/4 de vuelta y se rompe la parte inferior de la columna. Dentro de un tubo eppendorf se centrifuga a 3.000 r.p.m. durante 1 min. Tras haber eliminado el aceite mineral de la muestra de PCR con cloroformo, se coloca esta sobre la columna en un nuevo eppendorf y se centrifuga 2 min. a 3.500 r.p.m. para recoger así el producto puro de la amplificación que podrá entonces ser utilizado en otras manipulaciones.

### **12.4 SECUENCIACIÓN DE ADN R 16S**

#### **12.4.1 Secuenciación automática**

Se amplificó por PCR el ADN ribosómico 16S de diversas cepas (apartado 8 y 9.2) posteriormente los correspondientes productos resultantes de la amplificación se secuenciaron en el secuenciador automático láser de fluorescencia de Millipore por el servicio de secuenciación del Instituto de Parasitología López Neyra (CSIC-Granada).

Para llevar a cabo la secuenciación en el secuenciador automático se mezclaron 150 ng de ADN de doble cadena, proveniente de amplificado de PCR y purificado por columnas, con 3,2 pmoles de cebador en un volumen final de 11  $\mu$ l con agua. La secuenciación se realizó en ambas cadenas.

#### **12.4.2 Programas de ordenador utilizados para análisis de secuencias**

Las secuencias de ADN fueron analizadas con el programa GeneWorks versión 2.3 (Intelligenetics, Inc.). Así mismo se accedió por Internet (utilizando el programa Netscape 3.0) al banco de datos GENBANK para importar las secuencias 16S de rizobios previamente descritas.

## 13 MÉTODOS DE CONJUGACIÓN

### 13.1 CRUCES TRIPARENTALES

Con este modelo de cruce se efectuó la transferencia, desde una cepa no movilizadoras de *E. coli*, del plásmido pGUS3 no autotransmisibles que contiene el *oriT* del plásmido RK2 a *Rhizobium*, utilizando como plásmido movilizador en *trans* pRK2013 (Ditta *et al.*, 1980). Para ello se mezclaron en la proporción 1:1:1, la cepa donadora, en fase logarítmica del crecimiento, con la receptora y movilizadora en su fase exponencial tardía. Donador, receptor y movilizador se centrifugaron en un tubo de microfuga y se resuspendieron en un pequeño volumen de medio de cultivo (100-200 µl). La mezcla se pone sobre un filtro Millipore estéril de 0,45 µm de poro y 2,5 cm de diámetro, previamente colocado sobre una placa de TY-agar, y se incubó toda la noche a 28°C. Transcurrido este tiempo, la mezcla de conjugación se resuspende en medio estéril y se efectúan las diluciones adecuadas, sembrándolas sobre medio selectivo (MM1) adicionado del antibiótico para cuya resistencia codifica el plásmido que se transfiere.

## 14 ENSAYOS CON PLANTA

### 14.1 PLANTAS, ESTERILIZACIÓN EN SUPERFICIE Y GERMINACIÓN DE SEMILLAS

#### 14.1.1 -alfalfa

En los distintos experimentos se utilizó *Medicago sativa* (alfalfa), ecotipo Aragón como planta huésped. Las semillas de alfalfa fueron esterilizadas en superficie por inmersión en 2,5% de HgCl<sub>2</sub> durante 9 min., 30 seg. Transcurrido este tiempo, se lavaron abundantemente (5-6 veces) con H<sub>2</sub>O estéril y se dejaron en imbibición durante 2 h. A continuación, se extendieron en condiciones asépticas sobre papel de filtro humedecido con H<sub>2</sub>O colocado en placas petri, y se dejaron finalmente en oscuridad a 28°C hasta su germinación (24-48 h).

Opcionalmente se pudo comprobar el grado de esterilidad extendiendo algunas semillas en placas de TY e incubándolas a 28°C

#### 14.1.2 -judía

Para los ensayos de nodulación de judía se utilizaron semillas de *Phaseolus vulgaris* amablemente suministradas por "semillero Hermanos Barrera", Adra (Almería). Las semillas de judía se lavaron abundantemente con agua para eliminar restos de fungicida, posteriormente se esterilizó con lejía al 5% durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se lavaron abundantemente con agua estéril y se dejó en imbibición 4 horas. Los pasos posteriores son similares a las semillas de alfalfa.

## 14.2 CONDICIONES DE CULTIVO

Todos los ensayos se realizaron en una cámara de cultivo de plantas mantenida en las siguientes condiciones: 500  $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$  (400-700 nm) de intensidad luminosa, fotoperíodo de 16/8 horas (luz/oscuridad), 25/18°C de temperatura (día/noche) y 50% de humedad relativa.

## 14.3 CULTIVO AXENICO DE PLANTAS

### 14.3.1 -alfalfa

Se ha seguido la técnica descrita por Olivares *et al.*, (1980). Cuando las plántulas alcanzan una longitud de 1-2 cm, se introducen en condiciones asépticas en tubos de 20x200 mm que contienen 10 ml de solución nutritiva y un soporte de papel de filtro. Para evitar que la luz incida directamente sobre las raíces, los tubos se cubren en su mitad inferior con papel opaco y se llevan a la cámara de cultivo de plantas.

### 14.3.2 -judía

La infectividad de diversos rizobios sobre judía se realizó con la técnica de jarras Leonard (Leonard, 1943) conteniendo vermiculita. Las jarras Leonard constan de dos recipientes de vidrio que encajan perfectamente: la parte superior contiene la vermiculita y la inferior la solución nutritiva. A través de una mecha de papel de filtro asciende la solución por capilaridad, manteniéndose de esta forma el grado de humedad del sustrato. Se esterilizan al autoclave a 120 °C durante 20 minutos. Las jarras se cubrieron con papel opaco y se llevaron a la cámara de cultivo de plantas.

### 14.3.3 Solución nutritiva

Como solución mineral libre de nitrógeno para los cultivos hidropónicos de alfalfa y judía se utilizó la descrita por Rigaud y Puppo (1975) modificada según se especifica a continuación:

$\text{KH}_2\text{PO}_4$		0,200 g
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$		0,200 g
KCl		0,200 g
$\text{CaSO}_4$		0,120 g
EDTA $\text{FeNa}_2$		0,025 g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4$		0,004 g
	Microelementos	
$\text{H}_3\text{BO}_3$		0,018 g
$\text{MnSO}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$		0,020 g
$\text{ZnSO}_4$		0,030 g
$\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$		0,002 g

Para amortiguar la variación en el pH de la solución nutritiva que la planta pueda inducir (Haynes, 1990) se utilizó 20mM de MOPS, ácido (2-[N-Morpholino]propanosulfónico; SIGMA) a pH 7 y 20 mM de MES, ácido (3-[N-Morpholino]ethanosulfónico; SIGMA) a pH 5,6 (Howieson, 1985).

Esta solución se ajusta a los correspondientes pHs y se esteriliza a 120°C durante 20 minutos.

#### **14.3.4 Inoculación de los cultivos**

La inoculación de las plantas de alfalfa con los cultivos bacterianos se hizo tras 12 días de permanencia en la cámara de cultivo, añadiendo a cada tubo 1 ml de una suspensión bacteriana ( $10^7$  cel/ml) de la cepa en estudio. Con cada cepa de *S. meliloti* se inocularon al menos 24 plantas individuales (1 planta/tubo).

La inoculación de las plantas de judía se hizo en el momento de la siembra en vermiculita, añadiendo 1 ml de suspensión bacteriana ( $10^9$ /jarra Leonard) en agua de la cepa en estudio.

#### **14.3.5 Determinaciones realizadas:**

##### **14.3.5.1 *determinación de la cinética de nodulación de alfalfa***

A partir del cuarto día, después de la inoculación, se registró diariamente el número de plantas noduladas y el número de nódulos formados en cada planta. Se consideró que una planta estaba nodulada cuando en sus raíces existía al menos un nódulo visible.

##### **14.3.5.2 *peso seco de parte aérea de alfalfa***

El día 30 post-inoculación bacteriana se retiraron los cultivos hidropónicos de la cámara de cultivo. Se separó la parte aérea de cada planta de alfalfa. Se introdujeron en sobres de papel individuales. Se secaron en estufa a 65 °C durante 48 horas y se determinó el peso seco.

##### **14.3.5.3 *determinación analítica de N de parte aérea de alfalfa***

Las determinaciones analíticas se realizaron en el Laboratorio de Análisis de Plantas de la Estación Experimental del Zaidín. El material seco obtenido según se describe en el apartado anterior se molió hasta obtener un polvo fino y homogéneo. Se sometió a un proceso de mineralización por vía húmeda con ácido sulfúrico y agua oxigenada en un microondas. El nitrógeno se determinó en un automatizador de acuerdo a la reacción de Berthelet (Krom, 1980). Los valores de N se expresaron en porcentaje y en mg/planta.

#### 14.3.5.4 Microscopía

Se realizó sobre nódulos tomados de cultivos hidropónicos de *M. sativa* y *P. vulgaris*. Se tomaron 2-3 nódulos al azar de cada interacción a estudiar 30 días post-inoculación bacteriana. Se fijaron introduciendo las muestras en el fijador (4% paraformaldehído + 0,25% glutaraldehído en tampón fosfato sódico, 10mM pH 6,8). Se aplicó un ligero tratamiento de vacío, durante 1 hora, para facilitar la penetración del fijador en las muestras. Posteriormente se reemplazó la solución fijadora con solución fresca y se dejó durante 3 horas a temperatura ambiente. Las muestras se deshidrataron realizando pases sucesivos en etanol al 10%, 30%, 50%, 70%, 90% y 100%. Posteriormente se incluyeron en resina Unicryl (Biocell international Ltd.UK) a través de pases sucesivos en mezclas Unicryl/etanol 100% (3/1, 1/1, 1/3 y Unicryl puro). Las muestras se polimerizaron a -20°C con luz ultravioleta durante 4 días en cápsulas de gelatina. Se obtuvieron cortes longitudinales de 1 micrómetro de espesor en un ultramicrotomo Reichert-Jung. Las secciones se tiñeron con azul de toluidina o I-IK. Se observaron y fotografiaron en un microscopio Zeiss Axioplan equipado con una cámara MC-100 usando película Kodak Gold 100 ASA.

#### 14.3.6 Medida de la competitividad para la nodulación

La determinación del número de nódulos que una raza es capaz de formar en presencia de otra se hizo por el marcaje de las cepas con el gen informador *uidA* (GUS) que produce nódulos azules en presencia de X-Gluc.

Previamente a la preparación de los inóculos, se hizo una estimación del número de células viables en un cultivo en comienzo de fase estacionaria en medio TY líquido de la correspondiente cepa. Una vez realizados los recuentos y conocido el número de células viables, se tomó de cada cultivo el volumen adecuado que se diluyó en agua estéril para conseguir una densidad celular de  $1 \times 10^7$  cel/ml

La inoculación de las plantas se realizó con suspensiones bacterianas formadas por la mezcla de dos cepas en proporciones 1:1 (V:V) y la mezcla se utilizó para inocular (1ml/tubo) un mínimo de 12 plantas (1 planta/tubo) y en cada mezcla se usó una cepa portadora del gen *gus*. La cepa marcada fue enfrentada a todas las demás del ensayo. 15 días después de la inoculación se cortaron las raíces noduladas y se pusieron en 7 ml de una solución de X-Gluc (21 mg/40 ml) en tampón fosfato sódico 50 mM pH 7 y 1% SDS, posteriormente se incubaron hasta la aparición de coloración azul en los nódulos. A continuación se hizo el recuento del número de nódulos de color blanco y azul, presentes en cada planta. El porcentaje de doble ocupación estimado mediante ensayos basados en selección por resistencia a antibióticos, se sitúa entre 15-30% (Lindemann *et al.*, 1974; Bromfield *et al.*, 1979; Bromfield *et al.*, 1985).

#### 14.3.7 Determinación del número más probable de bacterias en suelo (NMP)

La inoculación de las plántulas de alfalfa se hizo tras una semana de permanencia en la cámara de cultivo, añadiendo a cada tubo 1 ml de la suspensión de suelo correspondiente.

La evaluación de las poblaciones infectivas (bacterias que forman nódulos en simbiosis) de *S. meliloti* se determinó por la técnica del Número Más Probable (NMP), en la que 25 tubos con plantas de alfalfa crecidas en medio sin nitrógeno se inoculan en diluciones seriadas de suspensiones de suelo y los resultados se valoran según las tablas correspondientes (Brockwell, 1982).

#### 14.3.8 Reaislamiento de (*Sino*)*Rhizobium* de los nódulos

Los nódulos, aparecidos según el apartado anterior, fueron separados de la planta y esterilizados en superficie con HgCl<sub>2</sub> al 0,25% durante 4 min. Seguidamente se lavaron con agua estéril 5-6 veces y se trituraron individualmente, en condiciones asépticas, con una varilla de vidrio. Una gota del triturado se extendió sobre placas de medio TY, con lo que se aislaron bacterias para ensayarlas en el estudio de biodiversidad de la población de rizobios nodulantes de alfalfa de suelo granadino.

#### 14.4 ENSAYOS DE MICROCOSMOS

Se utilizó tierra procedente de Uruguay con las características que se citan en la tabla.

Origen	Uruguay
Fuente	G. Martínez-Dretz
pH (H <sub>2</sub> O); 1:5 (p:V)	6,5
pH (ClK, 0,1%); 1:5 (p:V)	5,5
Análisis mecánico (%)	arena 28,32 limo 49,78 arcilla 21,89
Clase textural	franco-franco limosa
Carbono orgánico (%)	1,29
Materia orgánica (%)	2,22

Se realizaron experimentos de:

-persistencia de la población bacteriana inoculada en suelo natural (con y sin planta) y estéril (sin planta).

-competitividad por la nodulación de las cepas inoculadas en suelo natural con plantas.

##### 14.4.1 Preparación del suelo

Se secó el suelo al aire libre, se cribó en un cedazo de 5 mm de tamaño de poro para eliminar la arena gruesa y restos de raíces. Cuando fue necesario se realizó esterilización del suelo a vapor fluyente, al autoclave, calentando 1 hora a 100 °C, cada día, durante tres días consecutivos.

#### **14.4.2 Ensayos de microcosmos sin planta. Estudio de la persistencia bacteriana**

El estudio se realizó paralelamente en suelo estéril y no estéril. Se dispusieron 10 g de suelo en tubos estériles de plástico con tapón de rosca. Se añadió agua hasta alcanzar la capacidad de campo (previamente estimada en 30%) dejando que empape la tierra 4-6 horas. Se inoculó con  $10^6$ - $10^7$  bacterias por gramo de suelo a partir de un cultivo bacteriano en comienzo de fase estacionaria previamente lavado. Se incubó en obscuridad durante 50 días.

##### **14.4.2.1 Diseño experimental**

Se dispusieron dos repeticiones de suelo por cepa bacteriana a ensayar en forma de monoinoculación y se incubaron en oscuridad a 28°C. Se hicieron recuentos bacterianos a las 2 horas de inoculación bacteriana (tiempo cero, en el que nos aseguramos que las bacterias se han distribuido homogéneamente), a las 24 horas, a los 7 días, a los 14 días y a los 21 días. Semanalmente, hasta el día 21, se añadieron 50 µl de agua destilada estéril para compensar la desecación. Tras el día 21 se destapan los tarros sometiendo la tierra a *desecación*. El día 36 se hizo recuento bacteriano. A partir de este día se llevaron las muestras a estufa a 37°C sometiendo las muestras a *choque térmico* hasta el día 50 en que se hizo nuevo recuento bacteriano. Los recuentos bacterianos se realizaron tomando 0,5 g de suelo de cada muestra y haciendo diluciones seriadas en agua estéril y seleccionando las colonias azules en medio Ty+Km+CyH+X-gluc.

#### **14.4.3 Ensayos de microcosmos con plantas**

Se mezcló tierra no estéril y arena lavada en la relación 1:2. Se llenaron macetas de 150 ml con la mezcla anterior. Se sembraron semillas pregerminadas en condiciones estériles. Se inocularon  $10^6$ - $10^7$  bacterias por gramo de suelo en 25 ml de agua estéril, a continuación se añadió agua hasta niveles de saturación.

##### **14.4.3.1 Diseño experimental**

Se inocularon 5 macetas de 250 ml con 4 plantas cada una por cada ensayo de coinoculación (relación bacteriana 1:1) y 3 macetas en los controles de monoinoculación. Los ensayos se realizaron como se muestran a continuación:

Las plantas se disponen durante 30 días en cámara de cultivo en condiciones controladas.

Para ensayar la *persistencia* bacteriana se comprueba el número de bacterias a las 3 horas de la inoculación y al final del experimento de la repetición número uno de cada ensayo. Para ello se toma 0,5 gramos de suelo, se hacen diluciones seriadas y se realiza recuento en medio Ty+Km+CyH+X-gluc.

Para comprobar la *competitividad* por la nodulación se toman las raíces y se incuban con X-Gluc y se hace el recuento de los nódulos azules y blancos.

## 15 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los distintos experimentos, cuando fue posible, se diseñaron con la finalidad de someterlos a análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Para ello se dispusieron las condiciones en que los resultados se ajustasen a la Normalidad: se pusieron suficientes repeticiones, se distribuyeron las muestras al azar en la cámara de cultivo, y cuando fue preciso se recogieron los nódulos al azar de una muestra representativa de la población. Se realizó estadística descriptiva multivariable para comprobar que los datos se ajustaban a la normalidad y posteriormente se realizaron análisis multivariados y ANOVA. Las diferencias significativas se obtuvieron por el test de L.S.D., con los programas SuperANOVA<sup>R</sup> (Abacus concepts) y/o StatGraphics Plus<sup>R</sup> 2.0 (Statistical Graphics Corp.).



*V. CAPÍTULO 1: Crecimiento de rizobios que nodulan alfalfa  
en medios de cultivo definidos a distintos pHs*

1994; Tiwari *et al.*, 1992). La población de *S. meliloti* en medio moderadamente ácido suele aumentar el pH, con lo que es necesario tamponar el medio de cultivo; el amortiguador de pH de elección a pH ácido es MES que tampona eficientemente entre pH 5,5 y 6,5 y no interfiere en el crecimiento bacteriano (Howieson *et al.*, 1985). En *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Aeromonas hydrophila* se ha estudiado con detenimiento el fenómeno de "respuesta de adaptación de acido-tolerancia" (ATR) en el que bacterias creciendo a pH ácido (pH 5) son más tolerantes a los subsiguientes choques ácidos (pH 3) que las bacterias que crecían a pH neutro. En este proceso ocurre una síntesis de proteínas durante el crecimiento a pH 5 para adaptarse al crecimiento a pH 3 (Glenn *et al.*, 1994; Karem *et al.*, 1994). No está claro la existencia de ATR en *Bradyrhizobium*, *R. tropici* y *R. leguminosarum* (O'Hara *et al.*, 1994), la tolerancia a la acidez de estas cepas parece ser que no es debido a respuesta adaptativa, sino que el fondo genético les permite crecer a pH ácido (Graham *et al.*, 1994). *S. meliloti* no se ha conseguido que crezca a pHs inferiores a 5,5 aun intentando el proceso de adaptación.

Se ha observado un efecto positivo del Calcio (Ca) sobre el crecimiento de *S. meliloti* en condiciones de acidez, en alguna ocasión se ha descrito que también puede afectar en condiciones neutras (Howieson *et al.*, 1992). No están claros los mecanismos por los que actúa el Ca aunque se han sugerido varios: la movilización de P (Graham, 1992; Beck *et al.*, 1985); la integridad de la pared celular; cambios a pH ácido en los lipopolisacaridos (Graham, 1992). Se ha comprobado para varias cepas de *S. meliloti* que el Ca también afecta, en acidez, al número de células finales que se obtiene en un cultivo líquido (Reeve *et al.*, 1993). Así mismo distintas cepas tienen distintos requerimientos de Ca, así *S. medicae* WSM419, para crecer en placa a pH 5,6, necesita 1 mM de Ca, mientras que *S. meliloti* cc169 necesita 5 mM y *S. meliloti* U45 crece sin nada de Ca a ese pH. También se ha observado que el Ca produce un efecto similar suministrado en la forma de  $Cl_2Ca$  o  $Ca(NO_3)$ . En definitiva *S. meliloti* responde al Ca en pH ácido, tanto creciendo más rápido como creciendo a menor pH (Tiwari *et al.*, 1992).

Solo hay una bacteria nodulante de alfalfa (ANR) con mayor tolerancia a la acidez que *S. meliloti* es *Rhizobium* spp. tipo Oregón, que cuando fue aislada se consideró que era *S. meliloti* (Eardly *et al.*, 1985) y estudios genéticos posteriores mostraron que era una especie, aun por nombrar, próxima a *R. etli* (Eardly *et al.*, 1992).

En este capítulo se hace un estudio del crecimiento bacteriano, en medio mínimo a distintos pHs y distintas concentraciones de Ca, de rizobios nodulantes de alfalfa aislados de suelos ácidos de Argentina y Uruguay, y de cepas controles aislados de suelos ácidos y neutros.

## 2.2 CURVAS DE CRECIMIENTO EN FUNCIÓN DEL pH DE LAS CEPAS MAT

Se realizó un estudio más profundo sobre el comportamiento de estas cepas en condiciones ácidas y neutras. Para ello se hacen las curvas de crecimiento midiendo densidad óptica (D.O.) a 600 nanómetros y realizando sus correspondientes recuentos de unidades formadoras de colonia (ufc) a los pHs 7, 6 y 5,6 de 3 cepas controles (GR4, 2011 y WSM826) y dos cepas MAT representativas de la población aislada de Argentina y Uruguay (LPU63 y CE31A, esta última no mostrada gráficamente pero de resultados similares a LPU63). El incremento de D.O. se siguió hasta las 160 horas. Los resultados de las curvas de D.O. se muestran en la figura 1.1 y los de ufc asociados a ellos en la figura 1.2.

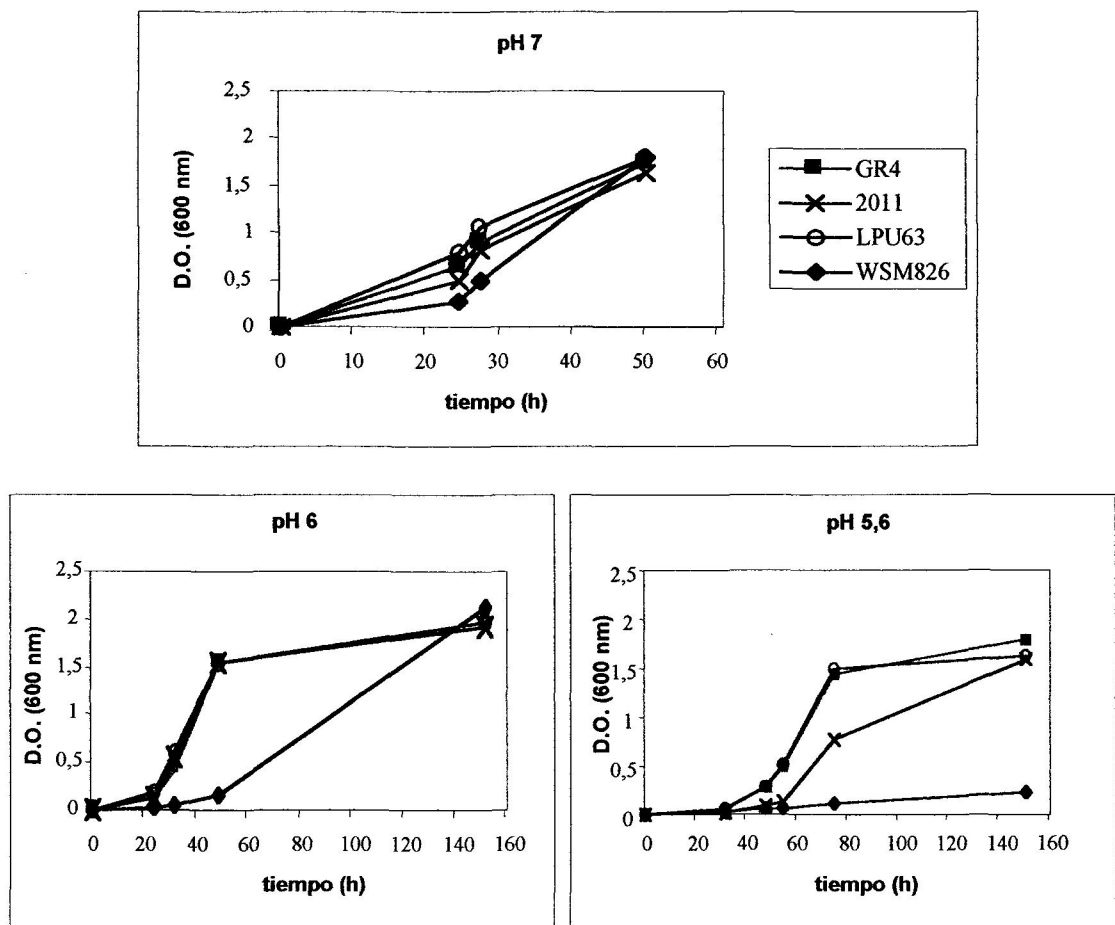
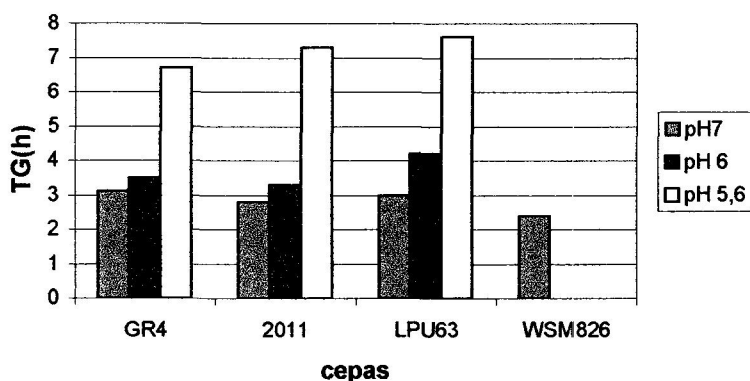


Figura 1.1. Curvas de crecimiento, en D.O. a 600 nm, de cuatro cepas de *S. meliloti*, a pHs 7,0; 6,0 y 5,6.

Al calcular el tiempo de generación se observó que al disminuir el pH aumenta el tiempo de generación, necesitándose una media de 3 horas para duplicar la población a pH 7, unas 4 horas a pH 6 y unas 7 horas a pH 5,6. (figura 1.3). El tiempo de generación para WSM826 a pHs 6 y 5,6 es superior a 8 horas.



**Figura 1.3.** Tiempo de generación (G) de cuatro cepas de *S. meliloti* crecidas en MM1 a tres pHs distintos.

Un incremento en la D.O. hasta llegar a 0,5-0,9 aproximadamente se corresponde linealmente con un aumento en el número de células viables, a partir de entonces la D.O. aumenta en mayor medida que el número de células debido fundamentalmente a la producción de metabolitos secundarios, como pueden ser los exopolisacáridos, que aumentan la turbidez. A pH ácido la zona de transición comienza aproximadamente a D.O. de 0,5 y a pH neutro a D.O. de 0,9. El espectrofotómetro comienza a detectar turbidez con concentraciones celulares de *S. meliloti* de  $10^6$ - $10^7$  células/ml a pH neutro, y  $10^5$ - $10^6$  a pH ácido.

### 2.3 CURVAS DE CRECIMIENTO EN FUNCIÓN DEL CALCIO Y PH DE LAS CEPAS MAT

La cepa GR4 se utilizó inicialmente como cepa modelo para comprobar el efecto que tienen distintas concentraciones de Ca (0,1; 1; y 2 mM de  $Cl_2Ca$ ) a distintos pHs: 7, 6,5 y 6 (figura 1.4). Se observó que a pHs 7 y 6,5 no se ven afectadas de forma importante las curvas de crecimiento ni por el pH ni por el incremento de Ca, aunque se aprecia un leve efecto negativo, a pH 7, del Ca al aumentar de 1 a 2 mM molar. A pH ácido (pH 6) tiene gran importancia el aumento de la concentración de Ca apreciándose una mejora importante en el crecimiento bacteriano. Este efecto del Ca, coincide con datos previamente descritos (Glenn *et al.*, 1994). Los aislados MAT ensayados tuvieron un comportamiento similar a GR4.

## 2.4 CURVAS DE CRECIMIENTO EN FUNCIÓN DEL pH DE LAS CEPAS AT

Se tomaron varias aislados AT y se ensayaron a pH neutro y ácido para comprobar su comportamiento en curva de crecimiento. Se utilizó como control *S. meliloti* GR4. En la figura 1.5 se observa que las cepas AT (LPU83, LPU154 y LPU266) apenas si se afectan por el pH ácido, mientras que GR4 sufre una fuerte disminución en su curva de crecimiento. Al calcular el tiempo de generación de acuerdo al conteo de viables en LPU 83 (figura 1.6) se observó que a pH 7 es de 2,5 horas, a pH 6 es de 3,2 y a pH 5,6 es de 4,2 horas.

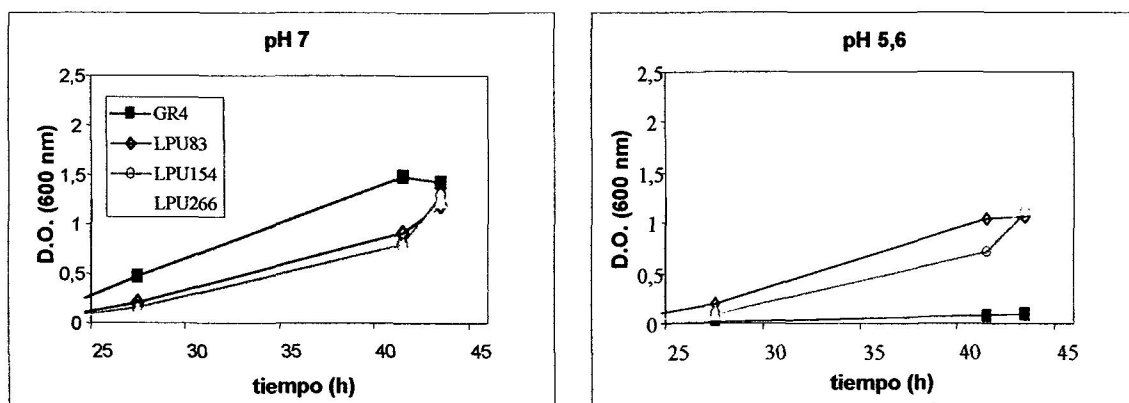


Figura 1.5. Curvas de crecimiento, en D.O. a 600 nm, de tres bacterias AT, aisladas de nódulos de alfalfa en suelos ácidos de Argentina, y la bacteria control *S. meliloti* cepa GR4, a pHs 7,0 y 5,6.

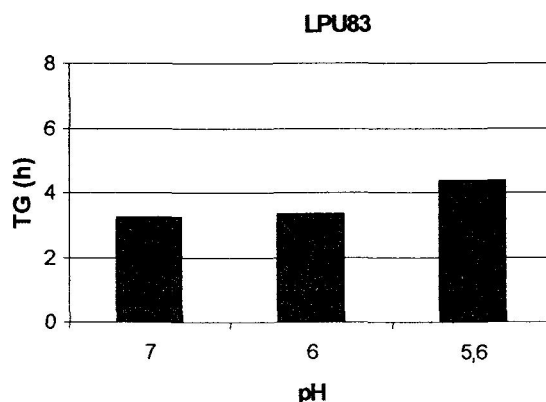


Figura 1.6. Tiempo de generación (a pHs 7,0; 6,0 y 5,6) de la AT-bacteria LPU83, aislada de suelos ácidos de Argentina.

### 3 DISCUSIÓN

Para que los rizobios tengan éxito en la inoculación en suelos ácidos deberían ser tolerantes a la acidez, capaces de sobrevivir y mantener sus funciones celulares a bajos pHs externos y además crecer en el grueso del suelo y la rizosfera, la combinación de estos factores se le denomina "ácido-tolerancia en suelos" (Howieson 1995a). Los estudios *in vitro* de tolerancia a la acidez se vienen realizando de forma rutinaria mediante crecimiento en medio sólido y en medio líquido. Por ambos métodos se ha comprobado que la especie *S. meliloti* crece a un pH mínimo de 5,5-6,0 independientemente de la concentración de Ca utilizada (Glenn *et al.*, 1994; Graham *et al.*, 1994). En medio sólido es el más adecuado para determinar el pH mínimo al que crece una cepa bacteriana, en este caso el tamaño de la colonia varía debido, probablemente, a la capacidad de las cepas bacterianas para modificar el pH del medio de cultivo o a que determinadas cepas tienen la capacidad de utilizar una segunda fuente de carbono tras el agotamiento de la primera. Por otra parte, por medio de las curvas de crecimiento en medio líquido se puede comparar el crecimiento de distintas cepas bacterianas y se puede observar si presentan alguna alteración metabólica que requiera condiciones especiales para su crecimiento, factor a tener en cuenta en el momento de preparar un inoculante bacteriano.

Tras el ensayo en medio sólido en placa realizado en este trabajo (tabla 1.1) se establecieron 2 grupos de cepas que nodulan alfalfa, aisladas de Argentina y Uruguay, ensayadas de acuerdo al pH mínimo al cual aparecían colonias: tolerantes a pH 5,0 (cepas "ácido-tolerantes", AT) y tolerantes a pH 5,5 (cepas medianamente "ácido-tolerantes", MAT). En las curvas de crecimiento ufc/tiempo (figura 1.2) se observa una mínima fase de retardo (fase "lag") lo que muestra que las cepas MAT y AT no retrasan su crecimiento para sintetizar proteínas que les permita crecer a pH ácido, sino que utilizan proteínas preexistentes en su citoplasma para tolerar la acidez; este es un indicativo de que en estas cepas no hay respuesta de adaptación a la acidez (ATR) al contrario que ocurre con las bacterias *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila* y *Salmonella* que pueden tolerar pHs muy bajos (Glenn *et al.*, 1994; Karem *et al.*, 1994). A parte de esto, en el crecimiento en medio líquido las cepas MAT presentaron un comportamiento de tolerancia a la acidez similar al previamente descrito para *Sinorhizobium meliloti* y *S. medicae* WSM419: (1) hay un incremento en el tiempo de generación al disminuir el pH (figura 1.3); (2) dejan de crecer en el intervalo de pH 6,0-5,5 y (3) mejoran su crecimiento en acidez al añadir Ca (figuras 1.4) (Glenn *et al.*, 1994; Graham, 1992). Es interesante señalar que las especies *S. meliloti* y *S. medicae* se agrupaban en la especie *Rhizobium meliloti* hasta fechas recientes (Rome *et al.*, 1996) debido a lo cual encontramos confusión en la bibliografía respecto a si los estudios de crecimiento bacteriano se hacían sobre un grupo u otro (salvo el gran número de investigaciones realizadas sobre la cepa WSM419) sin embargo las cepas MAT ensayadas en el presente estudio se comprobará en el capítulo siguiente (capítulo 2) que son *S. meliloti*, por tanto, al tener comportamiento ante la acidez similar a *S. medicae* induce a pensar que ambas especies bacterianas tienen un fondo genético suficientemente parecido como para que les confiera respuestas similares ante

***VI. CAPÍTULO 2: Estudio de la diversidad genética de rizobios que nodulan alfalfa en suelos ácidos de Argentina y Uruguay. Efecto del pH en la selección de la población infectiva***

## 1 INTRODUCCIÓN

El estudio de biodiversidad de los rizobios nativos del suelo, se viene realizando por varias técnicas de identificación y de clasificación de acuerdo a características fenotípicas (resistencia intrínseca a antibióticos, anticuerpos monoclonales que reaccionan frente a distintas cepas bacterianas, etc.) y genotípicas (análisis del perfil de plásmidos, hibridación de ácidos nucleicos, etc.).

Las nuevas metodologías en la identificación de microorganismos basadas en las secuencias propias del genoma de las cepas de interés, están alcanzando amplia difusión debido, fundamentalmente, a la rapidez de los ensayos, el alto número de muestras que se pueden manejar, la sensibilidad, precisión y facilidad para reproducir los resultados obtenidos. Cabe destacar las técnicas basadas en PCR ("Polymerase Chain Reaction" o reacción en cadena de la polimerasa) (Saiki *et al.*, 1988) y en "IS-fingerprint" ("huella dactilar" de Secuencias de Inserción) (Selbitschka *et al.*, 1995).

El PCR puede hacerse con cebadores (pequeñas secuencias oligonucleotídicas de ADN, ácido desoxi-ribonucleico) específicos de cepas, especies, géneros o de grupos de bacterias más amplios, o con cebadores que generen su "huella dactilar" ("fingerprint") amplificando zonas determinadas del ADN y luego observando el patrón de bandas, característico de cepa o grupo, que aparece en los geles de revelado (Williams *et al.*, 1990). La información que se obtiene a partir de "fingerprints" realizados con cebadores al azar, RAPD-PCR ("Random Amplified Polymorphic DNA" o ADN polimórfico amplificado al azar) es mucho más valiosa que la obtenida por análisis del perfil de plásmidos o por estudios de polimorfismos de isoenzimas, pero mucho menor que la obtenida por polimorfismo de largos fragmentos de restricción de ADN (RFLP "Restriction Fragment Length Polymorphism") (Laguerre *et al.*, 1992; Young *et al.*, 1992). La utilización de pequeñas sondas oligonucleotídicas complementarias a regiones variables de ARN (ácido ribonucleico) ribosómico de 16S y 23S permite la detección de determinadas bacterias en el medio natural (Amann *et al.*, 1990). En el caso de *Rhizobium* nos encontramos con algunas limitaciones por el desconocimiento de las secuencias de ARN 23S y el hecho de que los ARNs 16S conocidos están tan conservados que es imposible diseñar sondas específicas de cepa, a lo sumo de género y especie (Willems *et al.*, 1993). Se pueden identificar y caracterizar bacterias tanto gram-negativas como gram-positivas de la rizosfera usando análisis de restricción de ADN ribosómico amplificado (ARDRA, "Amplified Ribosomal DNA-Restricción Análisis")



mediante cebadores de las regiones conservadas de los ADNs ribosomales 16S y utilizando enzimas de restricción que cortan en las regiones no conservadas de estos ADNs (Tichy *et al.*, 1994). Los cebadores correspondientes a secuencias palindrómicas extragénicas repetitivas REP-PCR (“Repetitive Extragenic Palindromic elements”) o secuencias consenso enterobacterianas intergénicas repetitivas (ERIC-PCR, “Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus”) se utilizan para generar “fingerprints” de diferentes genomas bacterianos y estos pueden ser usados para la identificación de rizobios en el suelo, en inóculos o en muestras de nódulos (Versalovic *et al.*, 1991; De Bruijn *et al.*, 1992).

Para definir claramente el género y especie de bacterias nodulantes de raíces y tallos se recomienda el estudio de la secuencia de oligonucleótidos de ARN ribosómico 16S, hibridación ADN-ADN, polimorfismo de los fragmentos de restricción de ADN (RFLP) y polimorfismo de multilocus enzimático (MLEE), junto con el tradicional estudio de características simbióticas y culturales (Graham *et al.*, 1991). Tanto la conservación del ARN ribosómico, por ser parte fundamental del ribosoma, como la existencia de variabilidad en algunos dominios le confiere a la secuencia de genes del ARN ribosómico (5S, 16S, y 23S) un muy buen criterio para comparar organismos e inferir filogenias (Martinez-Romero, 1994). La secuenciación parcial y total de ADN ribosómico (ADNr) 16S, a partir de amplificadores, obtenidos por PCR, con cebadores determinados, es la más utilizada. La secuenciación parcial fue el criterio fundamental para proponer nuevas especies como es el caso de *Rhizobium etli* (Segovia *et al.*, 1993) y agrupar especies bajo un mismo género como es el caso de *Sinorhizobium fredii* y *Sinorhizobium meliloti* (De Lajudie *et al.*, 1994). La secuenciación total de ADNr 16S ha sido el principal criterio para separar las especies *S. medicae* de *S. meliloti*.

Los “IS-fingerprint” se viene utilizando desde 1988 en *Sinorhizobium meliloti* y consiste en digerir el ADN total bacteriano con una enzima de restricción y observar el patrón de hibridación que aparece con la sonda de ADN de una Secuencia de Inserción determinada (Wheatcroft *et al.*, 1988). Las secuencias de inserción (IS) se definen como entidades genéticas móviles relativamente pequeñas (entre 700 y 2500 pares de bases nucleotídicas), y que a diferencia de los transposones que llevan resistencia a drogas y/o antibióticos, no contienen genes seleccionables. Además las inserciones de estos elementos son capaces de provocar inversiones, deleciones y fusiones de replicones que conduzcan a la activación y expresión de genes crípticos. En *S. meliloti* se ha utilizado la técnica de “IS-fingerprint” con la secuencia de inserción *ISRm2011-2* para caracterizar la población de cepas de *S. meliloti* aisladas de suelos (Kosier *et al.*, 1993; Selbitschka *et al.*, 1995; Villadas *et al.*, 1996; Niemann *et al.*, 1997). *ISRm2011-2* se aisló de *S. meliloti* 2011 en 1991 (Simon *et al.*, 1991) tiene 1.055 pares de bases, y se ha encontrado hasta ahora en todas las cepas de *S. meliloti* estudiadas. En relación con este elemento IS se ha comprobado que se mantiene estable el patrón y número de bandas, en una cepa determinada, a lo largo de diversos pases de nodulación, tras dejarlo en placa de uno a cuatro meses, y al someterlo a situaciones de estrés como son largos periodos de bajas temperaturas, choques de calor, etc. (Kosier *et al.*, 1993). Esta IS tiene dos pautas abiertas de lectura (ORF), ORFA y ORFB. ORFA muestra homología con transposasas de la familia IS3 y con factores de transcripción eucarióticos. ORFB muestra homología con transposasas de la familia IS630-*Tc1* que incluye transposasas tanto de elementos transponibles procarióticos como eucarióticos (Selbitschka *et al.*, 1995). Las imágenes digitalizadas de los geles de electroforesis que aparecen en los

“fingerprint” pueden ser procesadas y usadas para generar una matriz de coeficientes de similitud entre todos los posibles pares de cepas, y por medio de éste es posible diseñar un dendrograma en el cual todos los modelos son emplazados en un “árbol” horizontal con ramas agrupadas por coeficientes de similitud. Aunque automatizados en gran medida, los programas que realizan esos procesos, requieren la intervención del operador actuando sobre los artificios reconocidos por el sistema automatizado. Los programas para realizar estos dendrogramas son utilizados con gran eficacia aunque solo es fiable respecto a la proximidad de cepas, parentescos genotípicos y no para establecer cuadros filogenéticos (Seward *et al.*, 1997).

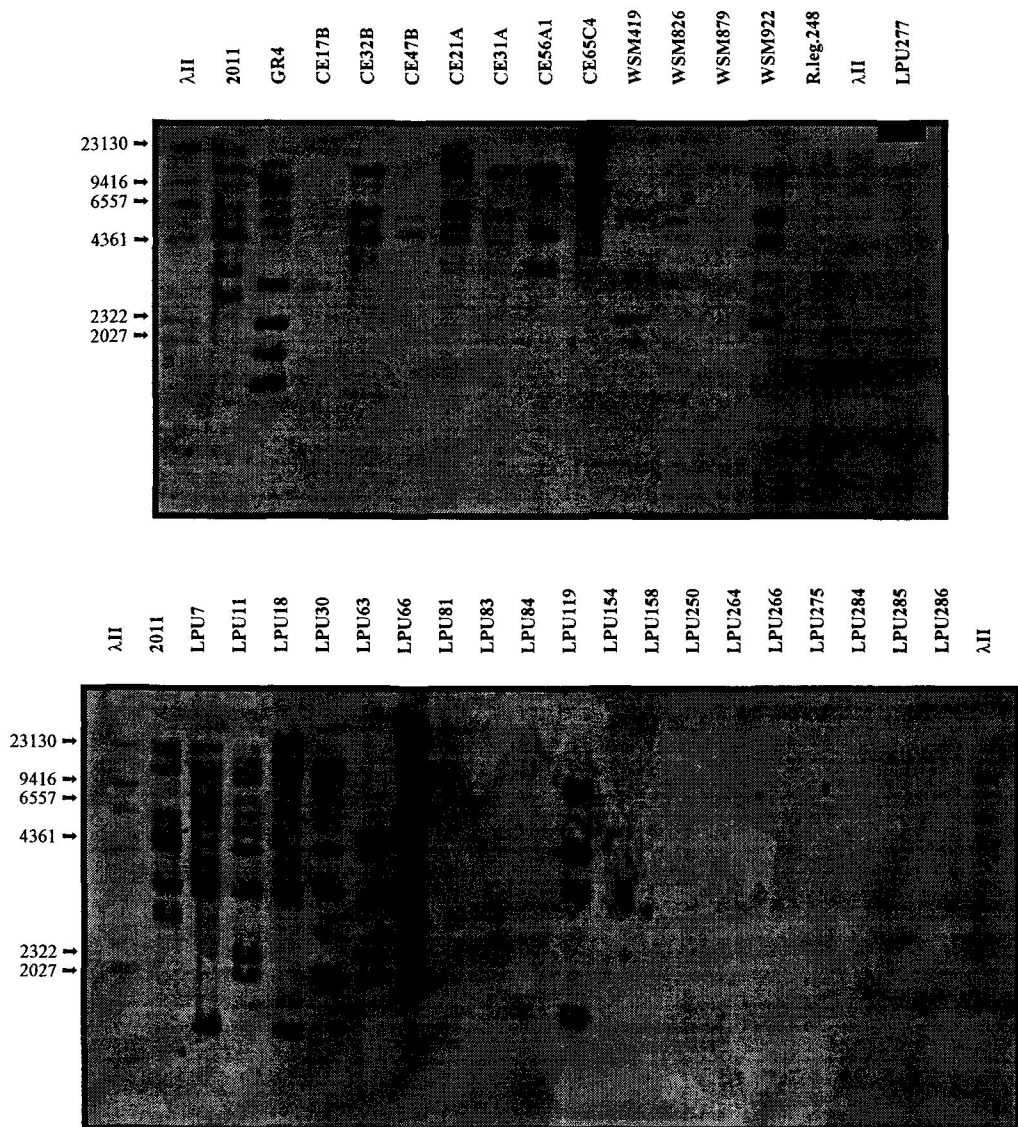
En este trabajo se estudió la diversidad de las bacterias que nodulan alfalfa (ANR) en suelos ácidos de Argentina y Uruguay (Del Papa *et al.*, 1998) por medio de “IS-fingerprint” con una sonda derivada de *ISRm2011-2* y de secuenciación parcial de ADNr 16S. Con esto se pretende estudiar la diversidad de cepas *S. meliloti* y comprobar si existe alguna otra especie de ANR en este estudio. Por otra parte se llevó a cabo el aislamiento de rizobios, en cultivo hidropónico, a pH ácido y neutro, a partir de suelo de la Estación Experimental del Zaidín (EEZ) de Granada (España), suelo con un pH neutro. El análisis del “IS-fingerprint”, con la sonda *ISRm2011-2*, de las bacterias aisladas tenía la finalidad de estudiar la diversidad de la población de *S. meliloti* del suelo granadino captados por el método del número más probable (NMP) y agrupar esas bacterias del suelo de acuerdo a algún criterio relacionado con la acidez como es la selección de bacterias en solución nutritiva a distinto pH y distinta dilución de suelo.

## 2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

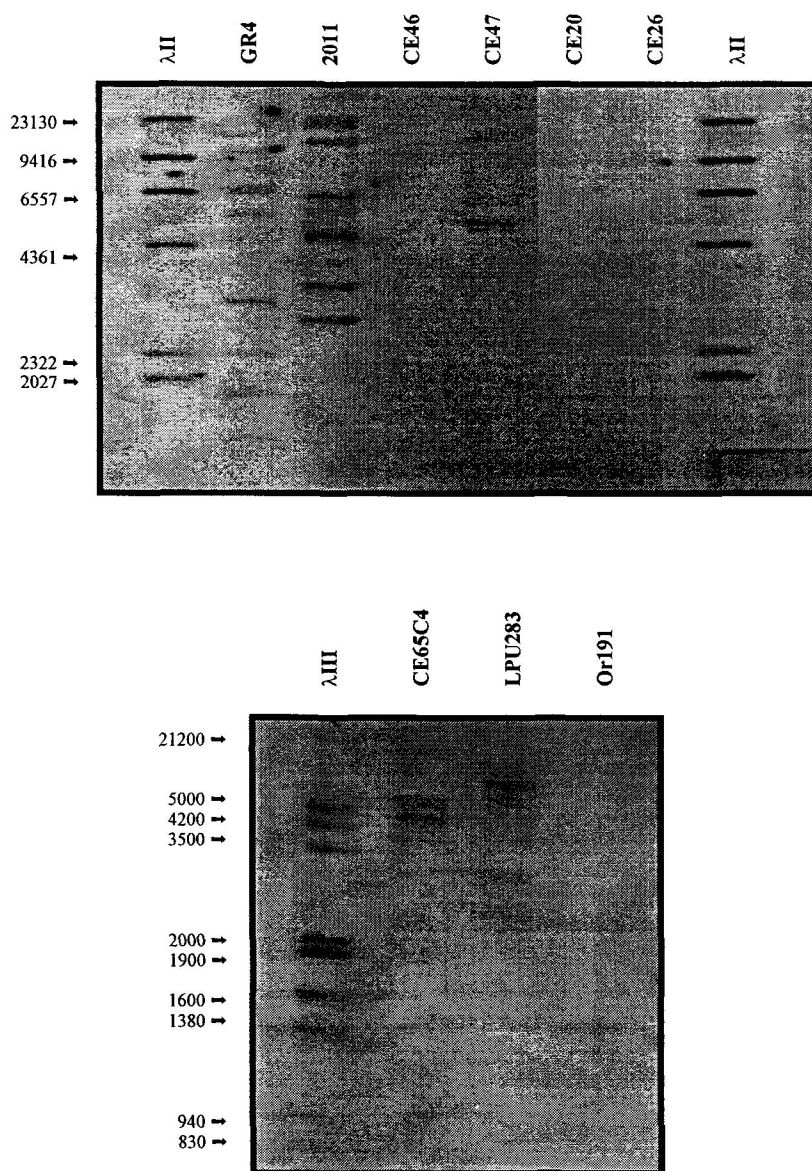
### 2.1 “IS-FINGERPRINT” DE ANR AISLADAS DE SUELOS ÁCIDOS DE ARGENTINA Y URUGUAY

Se ensayaron 31 bacterias aisladas de Argentina (aislados LPU) y Uruguay (aislados CE); 5 controles de *S. meliloti* cepas GR4, 2011, WSM826, WSM879, WSM922; 1 de *S. medicae* cepa WSM419; 1 *R. spp.* tipo Oregón cepa modelo OR191; 1 de *R. leguminosarun* bv. *viciae* cepa 248. Solo apareció hibridación con la sonda *ISRm2011-2* (sonda virtualmente presente en todas las cepas de *S. meliloti* estudiadas, Kosier *et al.*, 1993) en 14 de los 27 aislados de Argentina y Uruguay, en los controles de *S. meliloti* y en la cepa de *S. medicae* WSM419 (figura 2.1a y 2.1b). De entre los aislados CE y LPU las que mostraron hibridación (LPU7, LPU11, LPU18, LPU30, LPU63, LPU66, LPU119, LPU283, CE17B, CE21A, CE31A, CE32B, CE47B, CE56A1, CE65C4) coincidían con las descritas en el capítulo anterior de este trabajo como cepas “medianamente ácido-tolerantes” (MAT). La diversidad de la población de los ANR que hibridaron fue muy alta: usando el umbral de similitud del 85% solo se encontraban en el mismo grupo las cepas CE21A, CE31A y CE32B (figura 2.2). El número medio de bandas de hibridación fue de 12, apareciendo desde una sola banda como en CE17 a un total de 18 bandas como en CE18. Los aislados que no hibridaban con *ISRm2011-2* (LPU81, LPU83, LPU84, LPU154, LPU158, LPU250, LPU264, LPU266, LPU275, LPU277, LPU284, LPU285, LPU286, CE20, CE26, CE46) coincidían con las cepas

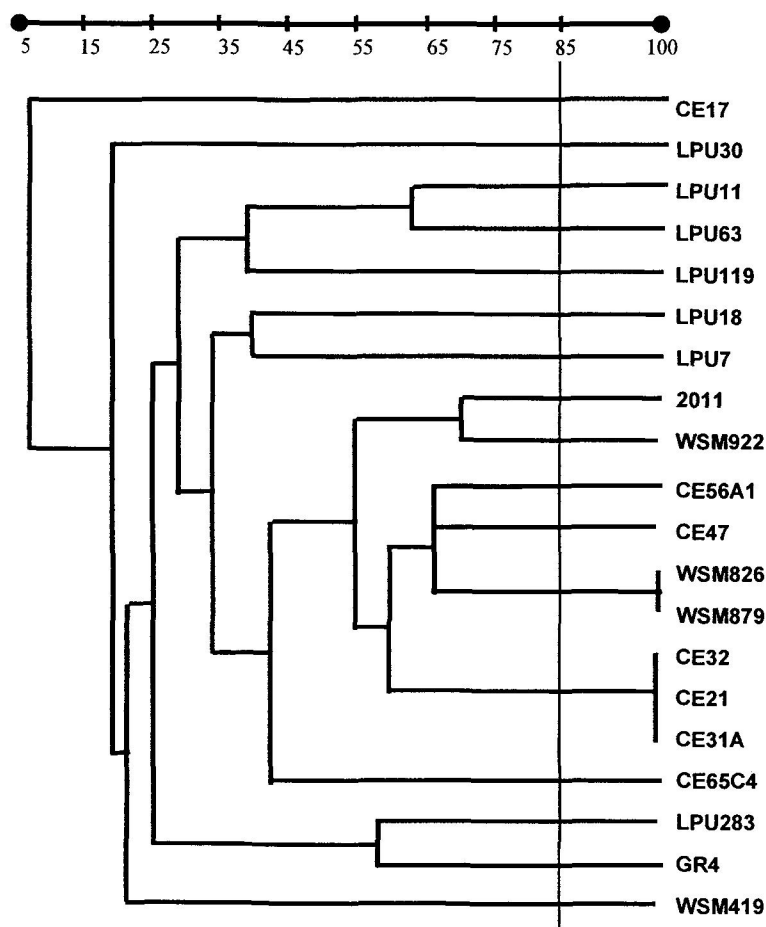
ácido-tolerantes (AT), lo que sugería que los aislados AT no eran *S. meliloti*, por lo que se llevó a cabo la secuenciación parcial de ADNr 16S para determinar la especie.



**Figura 2.1a.** Hibridación, con la sonda de ADN *ISRM2011-2*, del ADN total, digerido con *Eco* RI, de bacterias que nodulan alfalfa (*S. meliloti* y *R. spp.* tipo Oregón) aisladas de Argentina y Uruguay. A la izquierda se muestran los tamaños, en pares de bases (pb), correspondientes al marcador de peso molecular ( $\lambda$ -*Hind* III marcado con digoxigenina,  $\lambda$  II). Se muestran los patrones de bandas de las cepas controles *S. meliloti* GR4, 2011 y WSM y la carencia de hibridación de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* cepa 248.



**Figura 2.1b.** Hibridación, con la sonda de ADN IS*Rm2011-2*, del ADN genómico, digerido con *Eco* RI, de bacterias que nodulan alfalfa (*S. meliloti* y *R. spp.* tipo Oregón) aisladas de Argentina y Uruguay. A la izquierda se muestran los tamaños correspondientes a los marcadores de peso molecular en pb ( $\lambda$ -*Hind* III marcado con digoxigenina y  $\lambda$ -*Hind* III/*Eco* RI marcado con digoxigenina,  $\lambda$  III). Se aprecia el patrón de bandas de las cepas controles *S. meliloti* GR4 y 2011 y la carencia de hibridación con *R. spp.* Or191.



**Figura 2.2.** Dendrograma derivado de las hibridaciones de la sonda de ADN *ISRm2011-2* con ADN total de cepas de *S. meliloti* aisladas de suelos ácidos de Argentina y Uruguay (figuras 2.1a y 2.1b). En el intervalo de 85-100% se observaron grupos de aislados con patrones de bandas similares. La correlación fue realizada el test de correlación "Dice" y para realizar el correspondiente dendrograma se utilizó el método UPGMA.

## 2.2 SECUENCIACIÓN PARCIAL DE ADN<sub>r</sub> 16S DE ANR AISLADAS DE SUELOS DE ARGENTINA Y URUGUAY

Se llevó a cabo la secuenciación parcial de ADN<sub>r</sub> de 30 cepas bacterianas: aislados argentinos (LPU7, LPU283, LPU81, LPU83, LPU84, LPU119, LPU154, LPU158, LPU250, LPU266, LPU275, LPU284, LPU285, LPU286), y uruguayos (CE31A, CE56A1) y las cepas controles: *S. meliloti* GR4, 2011, WSM826, WSM922; *R. spp.* Or191; *R. etli* cepas CFN42, Brasil5, Viking1; *R. fredii* cepa 1781; *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* cepas sp18 y 2616; *R. leguminosarum* bv. *viciae* cepa 248; *R. tropici* tipo A cepa CFN299; y *R. tropici* tipo B cepa BR852. Esta secuenciación se realizó para determinar la especie o especies de los ANR que no hibridaban con la sonda *ISRm2011-*

2, y para determinar si los aislados que hibridaban eran *S. meliloti* o *S. medicae*. Se comprobó que todos los aislados ensayados argentinos y uruguayos que mostraban hibridación con IS*Rm2011-2* eran *S. meliloti* (LPU7, LPU283, CE31A, CE56A1) y las que no mostraban hibridación eran *R. spp.* tipo Oregón (LPU81, LPU83, LPU84, LPU119, LPU154, LPU158, LPU250, LPU266, LPU275, LPU284, LPU285, LPU286). El resto de cepas ensayadas coincidía su secuenciación con la aparecida en el banco de genes donde estaban descritas sus correspondientes especies. Las secuencias parciales de ADNr 16S de *S. meliloti*, *R. spp.* Oregón, y *R. etli* se muestran en la figura 2.3.

```

S. meliloti GR4      AGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGCCCCGCAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGC
R. spp.Oregón LPU83 AGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGCCCCGCAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGC
R. etli             AGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGCCCCGCAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGC
*****

S. meliloti GR4      GTGGGAACTTACCCTTTTCTACGGAATAACGCAGGGAAACTTGTGCTAATACCGTATGAG
R. spp.Oregón LPU83 GTGGGAACTTACCCTTTTCTACGGAATAACGCATGGAAAGTGTGCTAATACCGTATGAG
R. etli             GTGGGAACTTACCCTTTTCTACGGAATAACGCAGGGAAACTTGTGCTAATACCGTATGAG
*****

S. meliloti GR4      CCTTTGGGGAAAGATTTATCGGTAAGGATGAGCCCGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTG
R. spp.Oregón LPU83 CCTTTGGGGAAAGATTTATCGGTAAGGATGAGCCCGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTG
R. etli             CCTTTGGGGAAAGATTTATCGGTAAGGATGAGCCCGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTG
*****

S. meliloti GR4      GGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATT
R. spp.Oregón LPU83 GGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATT
R. etli             GGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATT
*****

S. meliloti GR4      GGGACTGAGACACGGCCCAA
R. spp.Oregón LPU83 GGGACTGAGACACGGCCCAA
R. etli             GGGACTGAGACACGGCCCAA
*****

```

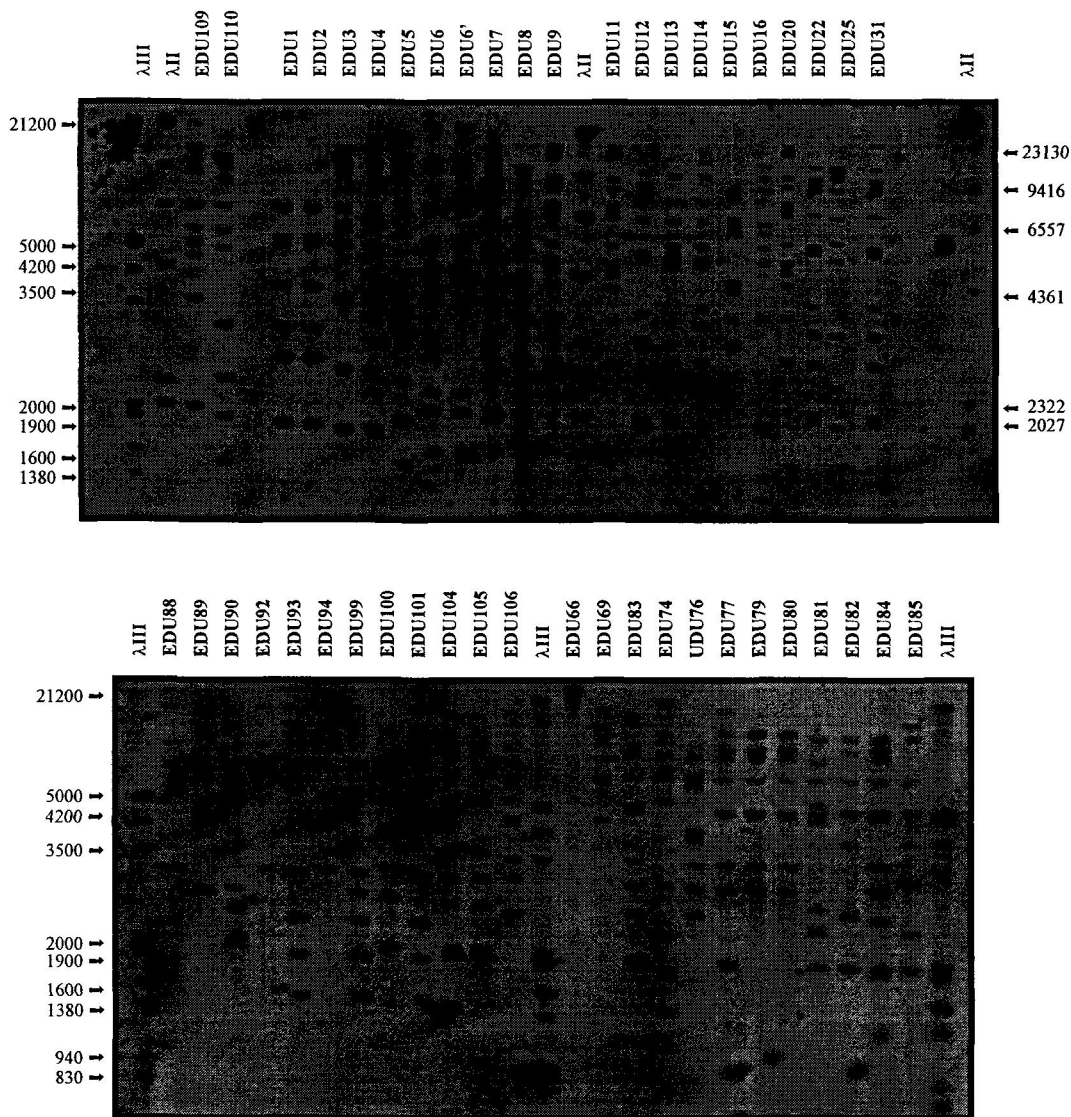
Figura 2.3. Secuencias parciales de ADN ribosómico 16S de *S. meliloti*, *R. spp.* tipo Oregón y *R. etli*.



### 2.3 “IS-FINGERPRINT” DE ANR AISLADOS DE SUELOS NEUTROS DE GRANADA

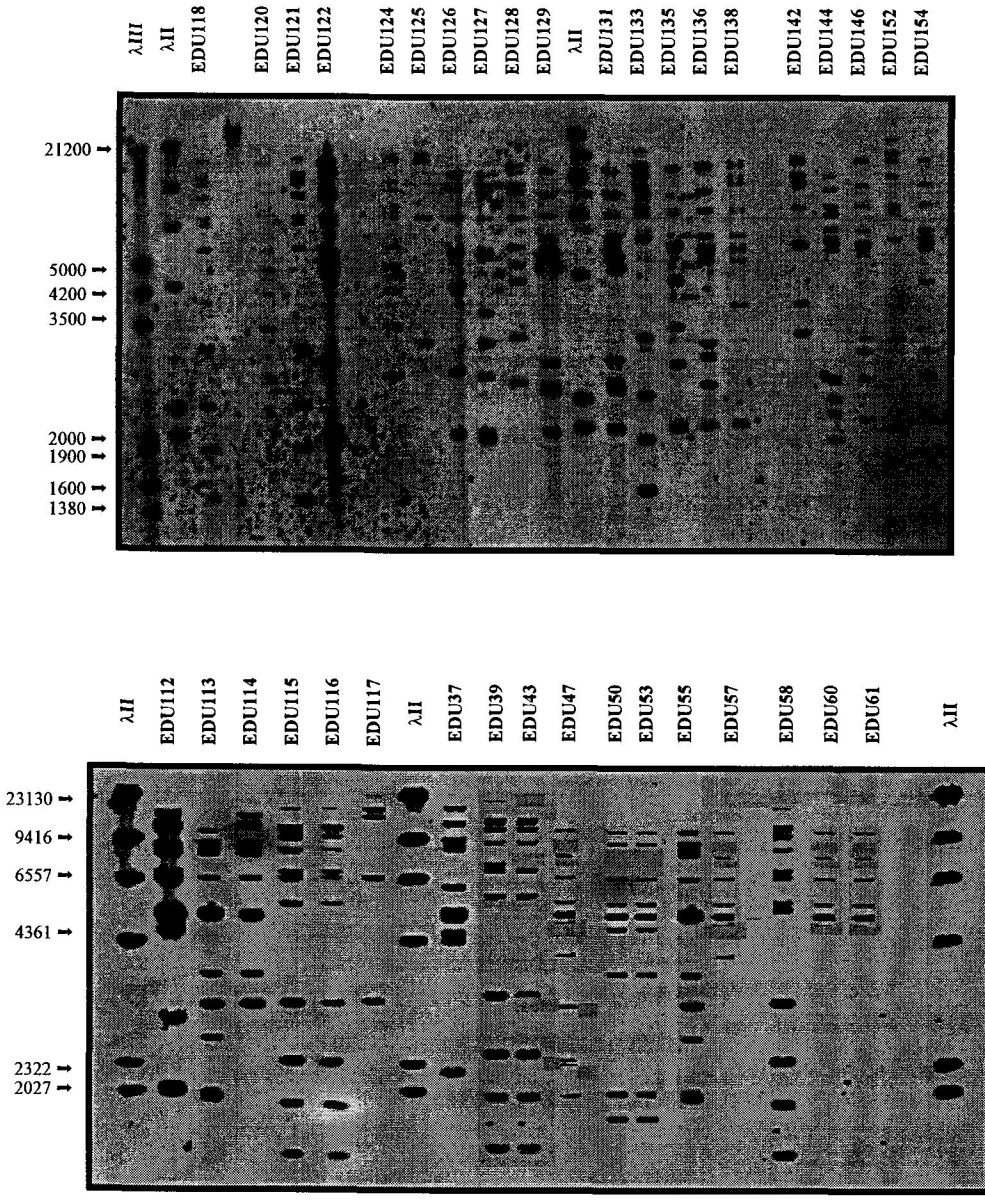
La población de *S. meliloti* del suelo de la EEZ infectiva de alfalfa fue estimada en unas  $10^5$  bacterias por gramo de suelo. El recuento se realizó a pH neutro por el método NMP (Brockwell *et al.*, 1982), cuando esta misma estimación se realizó utilizando plantas de alfalfa crecidas en cultivo hidropónico a pH ácido resultó en  $10^3$  bacterias por gramo de suelo.

Para conocer si el pH ácido llevó a cabo una selección de bacterias eficientes en nodulación en este pH comparamos mediante “IS-fingerprint” la estructura de las poblaciones aisladas a pH 7,0 y 5,6. Se aislaron 154 ANR a partir de 115 nódulos de las plantas que crecieron en solución nutritiva a pH neutro y 39 nódulos de las plantas que crecieron a pH ácido, de ellas se examinaron 82 aislados (aislados EDU<sub>1-154</sub>): 52 aisladas de nódulos producidos a distintas diluciones de suelo en pH neutro y 30 producidos a distintas diluciones de suelo en pH ácido. Todas las cepas mostraron hibridación con la sonda *ISRm2011-2* lo que sugiere que ninguna de ellas pertenece a *Rhizobium* spp. tipo Oregón. El número de bandas obtenidas fue de 4 a 17 con una media de 11 (figuras 2.4a y 2.4b). Con todas las cepas se analizó la diversidad y utilizando un índice de similitud del 80% se pudieron distinguir 28 grupos de similitud o cepas denominados grupos EDU<sub>A-AB</sub> (figura 2.5, tabla 2.1), de ellos 21 grupos de bacterias aparecían a pH neutro (tabla 2.1) dando un porcentaje de diversidad del 40% (21/52) similar al obtenido en otras investigaciones (Kosier *et al.*, 1993). Los grupos (EDU<sub>A-AB</sub>), obtenidos a pH neutro, que contienen mayor número de aislados (tabla 2.1) muestran los genotipos rizobianos más abundantes en el suelo y competitivos por la nodulación (en la formación de nódulos por el método NMP la competitividad por la nodulación en un factor a tener en cuenta). A pH ácido se observa que los grupos con mayor número de aislados coinciden con los de mayor número de aislados a pH neutro: grupos EDU<sub>U</sub> y EDU<sub>L</sub> (tabla 2.1). El “IS-fingerprint” del grupo EDU<sub>U</sub> coincide con la cepa GR4 que es altamente efectiva en la competitividad por la nodulación. También se observan siete grupos de bacterias que solo aparecen en la selección a pH ácido (grupos EDU<sub>A</sub>, EDU<sub>Q</sub>, EDU<sub>S</sub>, EDU<sub>W</sub>, EDU<sub>Z</sub>, EDU<sub>AA</sub> y EDU<sub>AB</sub>). Las razones por la que no se detectan a pH neutro pueden deberse a que son bacterias poco abundantes en suelo y en la selección se haya tomado una muestra sesgada, en tal caso si se realizase el análisis a mayor número de nódulos se podrían detectar esas bacterias también a pH neutro. Sin embargo otra posibilidad es que realmente haya una selección de ANR en condiciones ácidas en tal caso pueden ser varias las razones por las que esas bacterias “tolerantes a la acidez” se verían favorecidas a pH ácido como es el caso de producir metabolitos que las hagan más competitivas, como son rizopinas que aumente su población en condiciones ácidas (Wexler *et al.*, 1995); bacteriocinas sintetizadas en condiciones ácidas que eliminen otras bacterias; que en condiciones ácidas estas bacterias tengan una mayor adhesión que otras a los pelos radicales de la raíz (Toro, 1996); etc. En cualquier caso para comprobar esta última posibilidad es necesario llevar a cabo estudios posteriores que puedan poner de manifiesto la ventaja en acidez (si la hay) de estas bacterias, por ejemplo coinoculaciones con la cepa GR4.



**Figura 2.4a.** Hibridaciones, con la sonda de ADN *IS<sub>Rm2011-2</sub>*, de ADN total, digerido con *Eco* RI, de bacterias nodulantes de alfalfa aisladas de suelo de Granada (pH neutro). A la izquierda se muestran los tamaños correspondientes al marcador de peso molecular, en pb,  $\lambda$ -*Hind* III marcado con digoxigenina. A la derecha se muestran los tamaños correspondientes al marcador de peso molecular  $\lambda$ -*Hind* III/*Eco* RI marcado con digoxigenina. También aparece la cepa control GR4.





**Figura 2.4b.** Hibridaciones, con la sonda *ISRM2011-2*, de ADN total, digerido con *Eco* RI, de bacterias nodulantes de alfalfa aisladas de suelo de Granada (pH neutro). A la izquierda se muestran los tamaños correspondientes al marcador de peso molecular, en pb,  $\lambda$ -*Hind* III marcado con digoxigenina ( $\lambda$  II) y  $\lambda$ -*Hind* III/*Eco* RI marcado con digoxigenina ( $\lambda$  III).

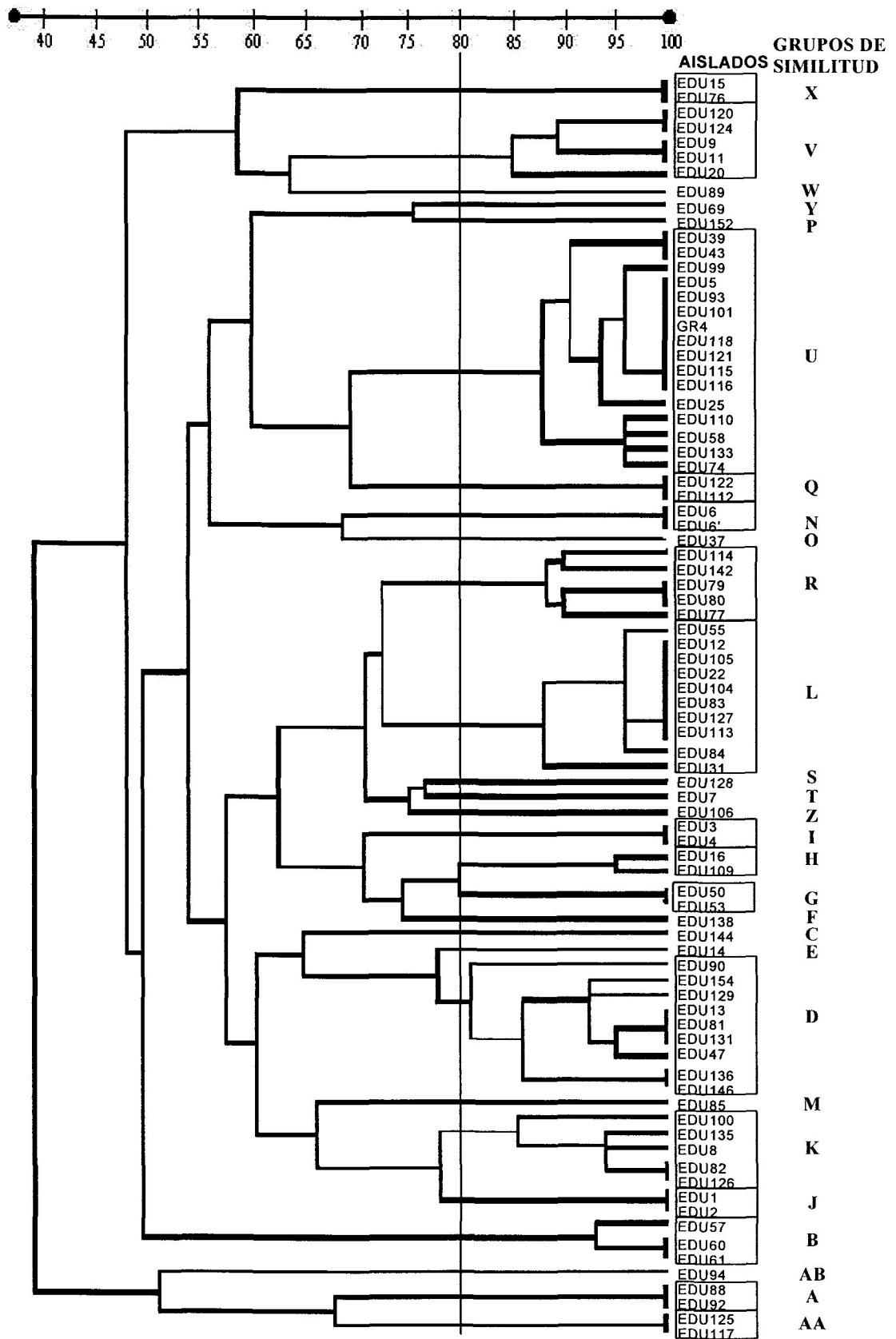


Figura 2.5. Dendrograma derivado de las hibridaciones de la sonda de ADN IS*Rm2011-2* con ADN total de cepas de *S. meliloti* aisladas de suelo de Granada (bacterias aisladas EDU1-154, figuras 2.4a y 2.4b). En el intervalo de 80-100% se observaron grupos de aislados con patrones de bandas similares (A-AB). La correlación fue realizada el test de correlación "Dice" y para realizar el correspondiente dendrograma se utilizó el método UPGMA.

Tabla 2.1: Rizobios aislados en cultivo hidropónico a dos pHs, 7 y 5,6, con diluciones de suelo de Granada.

PH5,6 <sup>a</sup>	A <sup>*</sup>	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	AA	AB	total	
1/50 <sup>b</sup>	2 <sup>**</sup> (88*** 92)			1 (90)							1 (82)	2 (104, 105)									3 (93, 99, 101)		1 (89)			1 (106)		1 (94)	12	
1/250				1 (129)							1 (126)	1 (127)					1 (122)		1 (128)		2 (118, 121)	2 (120, 124)				1 (125)			10	
1/1.250												1 (113)					1 (112)	1 (114)			2 (115, 116)					1 (117)			6	
1/6.250								1 (109)													1 (110)								2	
Total	2			2				1			2	4					2	1	1		8	2	1			1	2	1	30	
PH7	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	AA	AB		
1/50				1 (81)							1 (100)	2 (83, 84)	1 (85)					3 (77, 79, 80)			1 (74)			1 (76)	1 (69)					11
1/250			1 (144)	4 (131, 136, 146, 154)		1 (138)					1 (135)					1 (152)		1 (142)			1 (133)									10
1/1.250		3 (57, 60, 61)		1 (47)			2 (50, 53)					1 (55)			1 (37)						3 (39, 43, 58)									11
1/6.250				1 (13)	1 (14)			1 (16)				3 (12, 22, 31)									1 (25)	2 (11, 20)		1 (15)						10
1/31.250											1 (8)			2 (6,6')							1 (7)	1 (5)	1 (9)							6
1/156.250									2 (3,4)	2 (1,2)																				4
Total		3	1	7	1	1	2	1	2	2	3	6	1	2	1	1	2	5	1	1	7	3		2	1	1	2	1		52
Total	2	3	1	9	1	1	2	2	2	2	5	10	1	2	1	1	2	5	1	1	15	5	1	2	1	1	2	1		82

<sup>a</sup> pH al que se ha realizado el aislamiento de bacterias.

<sup>b</sup> dilución a la que se ha realizado el aislamiento.

\*grupo de bacterias EDU<sub>A-AB</sub>. La agrupación se llevó a cabo por similitud de bandas de hibridación de ADN con la sonda *ISRm 2011-2* (ver figura 2.5).

\*\*número de bacterias aisladas a un pH y dilución determinado que se encuadran en cada grupo EDU<sub>A-AB</sub>.

\*\*\*aislado EDU<sub>1-154</sub> del suelo de Granada.

***VIII. CAPÍTULO 4: Estudio de microscopía óptica comparativa  
de nódulos de alfalfa (pH neutro y ácido) y judía formados por  
S. meliloti y R. spp. tipo Oregón***

## 1 INTRODUCCIÓN

La simbiosis *Sinorhizobium meliloti-Medicago sativa* se consideraba de gran especificidad, mientras que *Phaseolus vulgaris* se consideraba una planta que producía simbiosis con un amplio rango de huéspedes, siendo nodulada por *R. etli*, *R. tropici*, *R. leguminosarum* biovar *phaseoli*, etc. (Anyango *et al.*, 1995; Eardly *et al.*, 1995; Hernandez-Lucas *et al.*, 1995; Van Berkum *et al.*, 1996). Tradicionalmente ha prevalecido el concepto de grupos de inoculación cruzada de leguminosas con el que se designa al grupo de rizobios que interactúan simbióticamente con una leguminosa determinada (Wilson, 1939). Sin embargo a mediados de siglo se proponía la eliminación de la clasificación de grupos de inoculación cruzada ya que mostraban gran cantidad de excepciones, entre ellas a rizobios aislados de alfalfa que nodulaban judía y también a diversos rizobios aislados de distintas plantas que nodulaban a *M. sativa* (Wilson, 1939; Wilson, 1944). Hay que añadir a estos datos que posteriormente se encontraron rizobios aislados de *M. sativa* (ineficientes sobre esta planta) que eran infectivos sobre *P. vulgaris* (Eardly *et al.*, 1985; Eardly *et al.*, 1992) y que no eran *S. meliloti* sino *Rhizobium* spp. tipo Oregón (Eardly *et al.*, 1992). Recientemente diversos *S. meliloti* efectivos con alfalfa se han ensayado también con judía y se ha comprobado que producen nódulos no efectivos (Bromfield *et al.*, 1990).

Al realizar un corte longitudinal a un nódulo de alfalfa se observan, al microscopio óptico, las siguientes zonas: zona I (meristemo); zona II (zona temprana de fijación o prefijadora) donde aparecen canales de infección en las células vegetales, de ellos se liberan bacterias que se dividen y comienzan a diferenciarse a bacteroide; y zona III (zona tardía de fijación). Esta última se diferencia funcionalmente en dos zonas: en la distal a la raíz se produce la fijación de nitrógeno, y en la proximal (ineficiente zona III) en la que los bacteroides presentan cambios citológicos indicativos de un inicio de lisis y se pierde la capacidad de fijación de  $N_2$ ; y finalmente la zona de senescencia (zona IV) (Vasse *et al.*, 1990; Hirsch *et al.*, 1983; Aguilar *et al.*, 1985). En los nódulos indeterminados como es el caso descrito de *M. sativa* el meristemo crece de forma continua mientras el nódulo es funcional mientras que en nódulos determinados (*P. vulgaris*) el nódulo deja de crecer al décimo día de la infección bacteriana debido a que se inactiva el meristemo que lo rodea.

En este trabajo se hace un estudio microscópico comparativo de los nódulos aparecidos en estudios de cultivo hidropónico, en alfalfa en condiciones ácidas (pH 5,6)

