

TP N°6: Fijadores Simbióticos de N₂

Objetivos:

- Conocer la metodología para el aislamiento del género *Rhizobium* a partir de nódulos de Leguminosas y comprobar su capacidad de nodulación.
- Caracterizar macro y micromorfológicas de los nódulos radicales de leguminosas

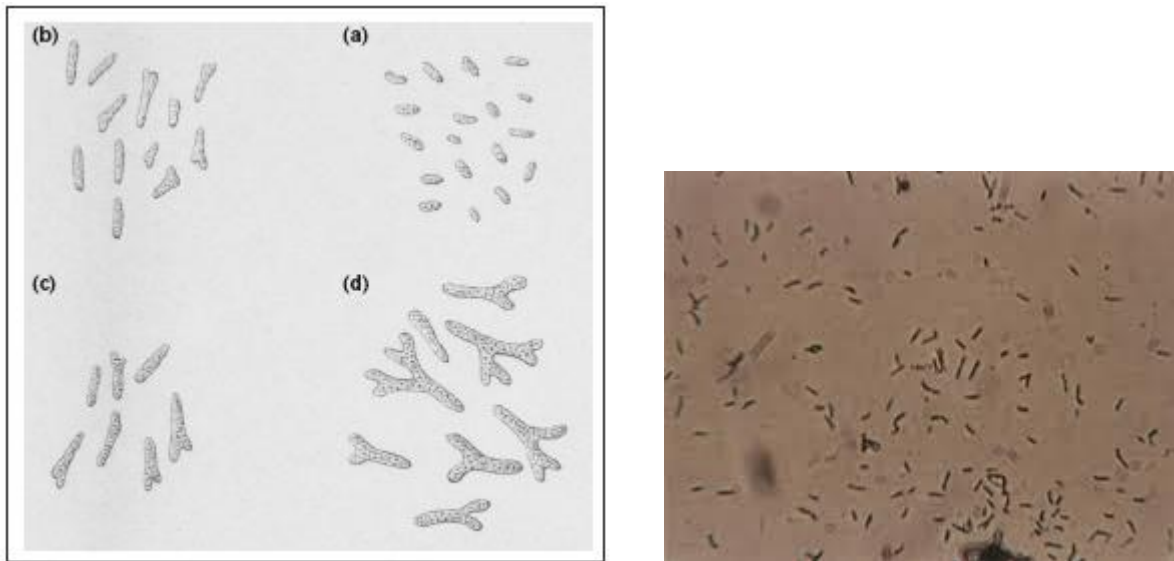
El nitrógeno se encuentra en la naturaleza fundamentalmente como gas (79% de la atmósfera), pero a pesar de su gran abundancia, de poco les sirve a las plantas y animales mientras permanezca en la atmósfera, ya que son incapaces de fijarlo y aprovecharlo. Existen microorganismos que son capaces de fijar ese nitrógeno atmosférico y transformarlo en compuestos fácilmente asimilables. El grupo de bacterias al que se conoce colectivamente como rizobios inducen en las raíces la formación de estructuras especializadas, los nódulos, dentro de los cuales el nitrógeno gaseoso se reduce a amonio. Las raíces vegetales que presentan nódulos fijadores de N₂ en sus raíces pertenecen a la gran familia de las Leguminosas, de amplia distribución mundial. Se estima que este proceso contribuye entre el 60-80% de la fijación biológica de nitrógeno (FBN), y esta simbiosis aporta una parte considerable del nitrógeno combinado en la tierra y permite a las leguminosas crecer sin fertilizantes nitrogenados que ocasionan grandes problemas de contaminación y sin empobrecer los suelos. Seleccionar cepas autóctonas con alta capacidad de competencia en lugar de introducir cepas que provienen de nódulos o suelos ajenos al sitio en cuestión, ya que el *Rhizobium* autóctono, compite con las cepas introducidas y da lugar a un menor rendimiento. El uso de estos rizobios autóctonos como biofertilizantes, constituiría una posible alternativa para el enriquecimiento de los suelos con actividad agrícola.

Mecanismo de Infección

Una de las simbiosis más importantes es la que se da entre leguminosas y bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*. El establecimiento de la simbiosis es un proceso complejo, donde las bacterias reducen N₂ que es asimilado por las leguminosas, las cuales reducen el CO₂ en azúcares durante la fotosíntesis y lo transportan a la raíz donde los bacteroides de *Rhizobium* lo usan como fuente de energía.

La infección de las raíces con una cepa adecuada de la bacteria (hay especificidad de huésped) conduce a la formación de nódulos radicales que tienen distinta forma según la planta hospedadora. Los Rizobios específicos entran en la raíz por el extremo de los pelos absorbentes que se retuercen en forma de báculo. Se forma en el pelo uno o varios tubos de infección dentro de los cuales los rizobios se hallan dispuestos en fila. El tubo de infección penetra en las células del córtex de la raíz. Algunas células de la raíz se dividen activamente produciendo un meristema. Los

rizobios contenidos en el tubo de infección son liberados en el citoplasma de estas células meristemáticas donde adquieren una forma distinta al rizobio de vida libre y se los llama bacteroides. Estos son capaces de fijar el nitrógeno molecular. En los nódulos la presión parcial de oxígeno es muy baja, si se eleva la enzima nitrogenasa quedaría inhibida y no se produciría la fijación. Sin embargo, el nódulo consume oxígeno provisto por la leghemoglobina que es codificada por un gen de la leguminosa, esta proteína se localiza en el nódulo. Es una molécula transportadora de O₂ que contiene grupo hemo y da a los nódulos color rojizo.



Figuras 1: Proceso de diferenciación en bacteroides. Desde la bacteria de vida libre (a) hasta el bacteroide funcional (d) a la izquierda. Bacteroides en preparado a la derecha.

Nodulación de leguminosas

Nódulos efectivos

- ❖ pocos y situados sobre todo en la raíz primaria
- ❖ voluminosos, con superficie lisa o rugosa
- ❖ actividad meristemática y nodular prolongada
- ❖ infección generalizada, zona bacteriana grande con muchos bacteroides
- ❖ interior pigmentado de rojo por la leghemoglobina.

Nódulos inefectivos

- ❖ numerosos y repartidos en todo el sistema radicular
- ❖ pequeños con superficie lisa
- ❖ actividad meristemática y nodular corta

- ❖ pocas células infectadas, pocos o sin bacteroides y gránulos de almidón
- ❖ interior no coloreado de rojo.



Figura 2: Nódulos efectivo

Inoculante para leguminosas

La inoculación artificial resulta imprescindible cuando se introducen nuevas leguminosas, sobre todo si son hospedadores de alta especificidad o cuando la deficiencia en nitrógeno limita el desarrollo vegetal. El método y las condiciones de inoculación deben permitir la supervivencia de los rizobios, además la semilla inoculada debe poseer la especie de rizobio adecuada y en número suficiente. Las condiciones del suelo próximo a la semilla deben favorecer la colonización de la rizósfera por la bacteria para lograr la formación de los nódulos y su funcionamiento efectivo.

Las cepas usadas en los inoculantes deben ser cuidadosamente seleccionadas y mantenidas, y probarse anualmente para minimizar la posibilidad de cambio en las propiedades simbióticas. La eficiencia de la fijación se evalúa por el número de nódulos, la masa nodular, el peso seco de la planta y el contenido de nitrógeno de la parte aérea. Son bacterias eficaces las que, por intermedio de los nódulos radicales, aportan nitrógeno reducido a la planta hospedadora produciendo un aumento de peso de la misma.

EXÁMEN DE NÓDULOS, AISLAMIENTO E INOCULACIÓN

Se realiza el examen de nódulos y bacteroides, aislamiento de rizobios de nódulos radicales, preparación del inoculante y germinación de semillas de leguminosas, la inoculación de plántulas con una cepa aislada, seguimiento, y al control de las leguminosas inoculadas.

Paso 1. Tomando un nódulo de la raíz de una leguminosa, se mide y dibuja su forma. Se corta y observa el color. Si la fijación de nitrógeno es efectiva se lo verá rosado o rojo, a veces pardo. Se aplasta entre dos portaobjetos. Se extiende el

material interno mezclado con una gota de agua, haciendo movimientos circulares con el asa. Se seca cerca de una llama. Se fija pasando tres veces el portaobjetos por dentro de la llama.

Se coloca el portaobjetos sobre un soporte colocado en una bandeja o la pileta. Se cubre la solución colorante (fucsina básica 1 g, fenol 5 g, agua destilada 100 mL). Luego de un minuto se debe lavar con agua. Secar cerca de una llama. Depositar una gota de aceite de inmersión, apoyar un cubreobjetos y sobre éste se coloca otra gota de ese aceite. Se observa al microscopio los bacteroides coloreados y se dibuja.

Paso 2. Se debe lavar la raíz para quitar el suelo. Elegiendo los nódulos de mayor tamaño, se los separa y coloca en un tubo. Se lava agitando con fuerza para eliminar los residuos. Se ponen los nódulos durante 30 segundos en etanol 95% y luego se sumerge en lavandina concentrada diluida al 1/10 durante 3 a 6 minutos. Se lava tres o cuatro veces, agitando energicamente, en tubos de agua estéril. Para transferir los nódulos de un recipiente a otro se usa una pinza desinfectada.

Se toma un nódulo y coloca entre dos portaobjetos desinfectados. Se aplasta y toma el material del nódulo con el asa para hacer estrías sobre la placa del medio de cultivo específico. Incubar a 25-30°C.

Paso 3. Se siembra en matraces con 50 mL de medio de cultivo con la cepa aislada de nódulos.

Paso 4. Se germina 4 a 6 semillas de porotos o de otra leguminosa.

Paso 5. Trasladando las plántulas al medio mineral inclinado en tubos grandes o macetas con tierra estéril. Dejando en lugar iluminado y ventilado. Uno o dos días después se vierte 1 mL del cultivo homogeneizado de rizobio sobre la radícula de plántulas cultivadas.

Control de las leguminosas inoculadas: se mide la longitud de las plantas inoculadas y los testigos. Observando y registrando la ubicación, tamaño y forma de los nódulos.

BIBLIOGRAFÍA

- Calvo García S. 2011. Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno. Gran Enciclopedia Universal, Vol. IX y XII, Madrid 2004, 383. 173- 186.
- Cuadrado B., Rubio G., Santos W. 2009. Caracterización de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (con habilidad de nodulación) seleccionados de los cultivos de frijol caupi (*Vigna unguiculata*) como potenciales bioinóculos. Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm. Vol. 38 (1), 78-104.

- Coba de la Peña, T., Fedorova, E., Pueyo, J. J., & Lucas, M. M. The Symbiosome: Legume and Rhizobia Co-evolution toward a Nitrogen-Fixing Organelle? *Frontiers in Plant Science*, 8, 2229. 2017. <http://doi.org/10.3389/fpls.2017.02229>
- Carrillo L., Microbiología Agrícola. Fac. de Cs. Agrarias. Univ. Nacional de Jujuy. Jujuy. Argentina. 2013.