

# I. ÍNDICE

|  | Página |
|--|--------|
| II. METODOLOGÍA  | 4      |
| Preparación de las semillas y repicación de la bacteria  | 5      |
| 2. Subcultivo de la bacteria y trasplante de la plántula | 6      |
| 3. Inoculación y riego                                   | 7      |
| 4. Análisis  | 8      |
| 5. Presentación de la información                        | 9      |
| III. RELACIONES ENTRE SERES VIVOS                        | 10     |
| 1. Relaciones intraespecíficas                           | 11     |
| 2. Relaciones interespecíficas                           | 11     |
| 2.1. El parasitismo                                      | 11     |
| 2.2. Depredación   | 12     |
| 2.3. Comensalismo  | 12     |
| 2.4. Mutualismo  | 12     |
| 3. La simbiosis  | 13     |
| 3.1. Tipos de simbiosis                                  | 14     |
| 4. Las simbiosis fúngicas                                | 15     |
| 4.1. Los líquenes  | 15     |
| 4.2. Las micorrizas                                      | 15     |
| 4.2.1. Ectomicorrizas                                    | 16     |
| 4.2.2. Endomicorrizas                                    | 16     |
| 4.2.3. Micorrizas ericoides                              | 17     |
| 4.2.4. Micorrizas orquidoides                            | 17     |
| IV. NITRÓGENO EN LAS PLANTAS                             | 18     |
| 1. Función   | 19     |
| 2. Fijación  | 19     |
| 2.1. Fijación abiótica                                   | 20     |
| 2.2. Fijación biológica                                  | 20     |
| 2.3. Nitrificación                                       | 21     |
| 3. Desnitrificación                                      | 21     |
| 4. Absorción   | 22     |
| 5. Carencia  | 22     |
| 5.1. Clorosis  | 23     |
| 5.2. Raquitismo  | 23     |
| 5.3. Relación tallo/raíz                                 | 23     |
| 5.4. Acumulación de pigmentos antocianos                 | 23     |
| 6. Exceso  | 23     |
| V. RHIZOBIUM   | 24     |
| 1. Rhizobium   | 24     |
| 2. Sinorhizobium Meliloti                                | 25     |
| VI. ALFALFA  | 26     |
| 1. Nitrógeno en la alfalfa                               | 27     |
| VII. SIMBIOSIS RHIZOBIUM-LEGUMINOSA                      | 28     |
| 1. Nodulación  | 29     |

| 1.1. Nódulos determinados e indeterminados     | 30 |
|--|----|
| 1.2. Leghemoglobina                            | 30 |
| 2. Fijación de nitrógeno                       | 31 |
| 3. Grupos de inoculación cruzada               | 32 |
| VIII. RESULTADOS                               | 34 |
| 1. Longitud aérea                              | 35 |
| 1.1. Primera medición                          | 35 |
| 1.2. Segunda medición                          | 36 |
| 2. Longitud de raíz                            | 37 |
| 3. Peso seco                                   | 38 |
| 3.1. Sin <i>Rhizobium</i>                      | 38 |
| 3.2. Con <i>Rhizobium</i>                      | 39 |
| 4. Número de hojas                             | 39 |
| 4.1. Primera cuenta                            | 40 |
| 4.2. Segunda cuenta                            | 40 |
| 5. Pigmentación                                | 41 |
| 6. Nódulos                                     | 41 |
| IX. CONCLUSIONES                               | 42 |
| 1. Tasa de supervivencia                       | 43 |
| 2. Longitud aérea                              | 44 |
| 3. Relación tallo/raíz                         | 45 |
| 4. Peso seco                                   | 47 |
| 5. Número de hojas                             | 48 |
| 6. Pigmentación                                | 48 |
| 7. Nódulos                                     | 49 |
| 8. Conclusiones generales                      | 50 |
| X. SOLUCIONES                                  | 51 |
| Inconvenientes de los fertilizantes químicos.  | 52 |
| 2. Beneficios de los biofertilizantes          | 53 |
| 2.1. Económicamente                            | 53 |
| 2.2. Biológicamente                            | 54 |
| 2.3. Cosechas de productos naturales           | 54 |
| 2.4. Diversa funcionalidad de <i>Rhizobium</i> | 55 |
| 3. Mecanismo de biocontrol                     | 55 |
| 4. Agricultura sostenible                      | 55 |
| 5. Desarrollo de cepas más eficientes          | 56 |
| XI. ANEXOS                                     | 57 |
| 1. Anexo I: Materiales                         | 58 |
| 2. Anexo II: Medio de cultivo Y.E.M.A.         | 60 |
| 3. Anexo III: Solución nutritiva               | 62 |
| 3.1. Solución de micronutrientes               | 63 |
| 4. Anexo IV: Tablas de recogida de datos       | 64 |
| XII. BIBLIOGRAFÍA                              | 68 |
| XIII. AUTORES                                  | 71 |
| 1. Alumnado                                    | 72 |
| 2 Coordinadores                                | 72 |

# II. METODOLOGÍA

La idea de llevar a cabo este proyecto surgió tras una larga búsqueda de temas interesantes en la red, a desarrollar para el trabajo de investigación que se realiza en primero y segundo de bachillerato en la clase de biología. Se encontraron diferentes proyectos de investigación, de los cuales solo uno se consideró apropiado y de gran interés biológico.

La idea consistía en el estudio de plantas inoculadas con bacterias fijadoras de nitrógeno, exactamente con Rhizobium. Debido al escaso conocimiento acerca de ese tema, se pensó en pedir asesoramiento a profesionales especializados en botánica. Se recurrió a una de las universidades más prestigiosas de España, la Universidad de Navarra. El departamento de botánica de esta universidad ofreció la posibilidad de realizar un trabajo cooperativo con la Dra. Goicoechea, la cual guió el proyecto gustosamente.

En primer lugar, se acudió a una cita en la UNAV con la Doctora con el fin de aportar información acerca del proyecto y resolver unas cuantas dudas. Tras este encuentro, se organizó la estructura del trabajo. Al cabo de un periodo de tiempo se volvió a acudir a la universidad para comenzar con la parte práctica.

# 1. PREPARACIÓN DE LAS SEMILLAS Y REPICACIÓN DE LA BACTERIA.

Para comenzar con el trabajo de investigación, se hizo uso de una cámara de flujo laminar donde se realizarían los primeros pasos del mismo. Antes de comenzar a trabajar en ella se mantuvo la luz ultravioleta encendida un rato para limpiar la cámara de cualquier organismo. Una vez que se fue a empezar, se puso en funcionamiento la cámara que proporciona un flujo continuo de aire que pasa por un filtro, de forma que esteriliza el área de trabajo.

El proyecto se inició con la desinfección de las semillas de alfalfa (*Medicago sativa*). Se sumergieron en una disolución de hipoclorito sódico al 10% durante 10 minutos para evitar que las semillas estuviesen contaminadas por algún tipo de organismo, lo cual alteraría los resultados del estudio.

Mientras, se comenzó con el repique de la bacteria *Sinorhizobium meliloti* de la cepa *102F78*. Para ello se esterilizaron y desinfectaron todos los



**IMAGEN 1.** Repicando la bacteria con la ayuda de un asa de Henle.

materiales usados en la práctica en el autoclave. Se usó el medio de cultivo Y.E.M.A. (Yeast



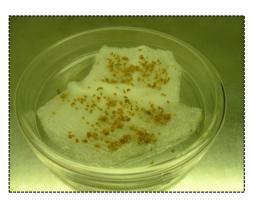
IMÁGEN 2. Placas con *Rhizobium* selladas.

Extract Mannitol Agar) (Ver **ANEXO II**), con la peculiaridad de que no contiene nitrógeno entre sus componentes. A continuación, con ayuda del asa de Henle, se extrajeron colonias de esta bacteria de cultivos anteriores y se sembraron en 9 placas de Petri (Ver **IMAGEN 1**). Una vez selladas las placas, se introdujeron en la incubadora a 25°C durante un par de días (Ver **IMAGEN 2**).

Tras el repique de la bacteria y el transcurso de los 10 minutos, se procedió a limpiar las semillas con

agua destilada y esterilizada. Después de realizar tres aclarados, se vertieron en un embudo en el cual, se había colocado previamente un papel de filtro para eliminar el exceso de agua.

Finalmente, en condiciones de esterilidad, se colocaron las gasas con las semillas en una placa de Petri con ayuda de unas pinzas (Ver **IMAGEN 3**). Para el inicio de la germinación de las semillas, se humedeció la placa con agua destilada y esterilizada, y se metieron en la incubadora a 25°C durante 7 días.



IMÁGEN 1. Semillas de alfalfa esterilizadas.

## 2. SUBCULTIVO DE LA BACTERIA Y YTANSPLANTE DE LAS PLÁNTULAS.

Tras 4 días se observó que las semillas germinaban correctamente, pero los cultivos de bacterias no se desarrollaron de manera adecuada. Únicamente en 3 de las placas se formaron colonias de *Sinorhizobium meliloti*, por lo tanto se procedió a realizar un subcultivo de las placas aptas.

3 días más tarde, los subcultivos se reprodujeron exitosamente y las semillas estaban listas para trasplantarlas (Ver **IMAGEN 4**). Para



**IMÁGEN 2.** Plántulas de alfalfa tras una semana de desarrollo.



**IMÁGEN 4.** Trasplantando las plántulas de alfalfa a las macetas.

proceder al trasplante de la alfalfa, se optó por utilizar perlita, puesto que: en primer lugar, es un material inerte que no aporta ningún tipo de nutriente a las plantas. En segundo lugar, tiene gran capacidad de absorción. Y por último, permite una posterior extracción de las raíces de forma sencilla.

Se limpió la perlita con agua desionizada (sin cloro), para evitar algún tipo de daño que las bacterias pudieran sufrir. A continuación, se

rellenaron

diez

macetas con la perlita húmeda y se dejaron escurrir para quitar el exceso de agua. Antes de proceder al trasplante, se separaron las macetas en dos grupos y se etiquetaron en amarillo las que contendrían la bacteria, y en azul las que no. Una vez etiquetadas, se procedió a trasladar las plántulas a las macetas y

con ayuda de unas espátulas se colocaron cinco por cada maceta (Ver **IMAGEN 5** y **6**).



**IMÁGEN 3.** Grupos de control. En amarillo +R y en azul –R.

#### 3. INOCULACIÓN Y RIEGO.

Para nutrir las bacterias antes de proceder a la inoculación, se realizó una disolución



**IMÁGEN 5.** Resuspendiendo las bacterias.

de sacarosa al 2%, y se utilizó para llevar a cabo la resuspensión de las bacterias. Para ello se rascó suavemente en la superficie del medio de cultivo con una pipeta, de esta forma las bacterias quedaron suspendidas en la disolución (Ver IMAGEN 7).

Con ayuda de una pipeta, se vertieron 3 mL de solución por cada plántula y el sobrante se repartió de manera equitativa entre las macetas (Ver **IMAGEN 8**). Una vez inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* se depositaron en el



**IMÁGEN 6.** Inoculando las plántulas.

laboratorio.

Tras concluir con las plantas, se preparó la solución nutritiva EVANS (Ver IMAGEN 9), la cual tiene todos los nutrientes necesarios para el desarrollo y evolución de la planta, exceptuando el nitrógeno (Ver ANEXO III). Se vertió toda la solución en un bidón de plástico de 5 litros. Para evitar la posible eutrofización y crecimiento de algas, se cubrió con

una bolsa negra de plástico.

A partir de aquí se regaron las plantas con la

solución EVANS en función de su necesidad. Las dos semanas posteriores a la primera inoculación se realizaron 2 más, es decir, una por cada semana, sumando un total de 3 inoculaciones. Todo ello para asegurar la simbiosis entre la



IMÁGEN 7. Preparando la solución EVANS.

alfalfa y la bacteria.

#### 4. ANÁLISIS.

Se dejaron crecer las plantas durante un periodo aproximado de dos semanas y se realizó la primera medición de la parte aérea (Ver IMAGEN 10). Se dejaron transcurrir otros quince días más antes de realizar la segunda medición, puesto que durante las primeras semanas, la diferencia en cuanto a longitud de los dos grupos de plantas es escasa.



**IMÁGEN 8.** Realizando la primera medición.



**IMAGEN 11.** Plantas preparadas para realizar la incisión.

En esta segunda medición se midió la parte aérea y la raíz; para ello, fue necesario sacar las plantas de las macetas con bastante cuidado para mantener las raíces en perfecto estado (Ver **IMAGEN 11**). Fue necesario separar los fragmentos de perlita que se adhirieron a la parte radicular de las plantas y tras ello se realizó una incisión separando ambas partes facilitando así la

medición (Ver IMAGEN 12). En esta ocasión pudimos comprobar las enormes diferencias entre ambos grupos, así como conseguir ciertos datos en cuanto a sus características físicas



**IMÁGEN 12.** Realizando la incisión en las plantas.

que recogimos en diversas tablas (Ver ANEXO IV).

Tras ello, se empaquetaron todos los fragmentos de planta de los 2 grupos en pequeños paquetes de papel de filtro, se etiquetaron para evitar cualquier confusión y se introdujeron en una estufa a 70°C durante una semana. Era necesario que la temperatura de la estufa se mantuviese constante y no aumentara más de lo establecido para evitar que ciertos nutrientes de la

planta se volatilizaran.

Una vez pasada una semana, se extrajeron las plantas de la estufa y el agua de las plantas ya estaba totalmente evaporada. Se comenzó, entonces, a medir el peso seco en ambos grupos con una balanza de precisión (Ver IMAGEN 13) y se recogieron los datos en otra tabla (Ver ANEXO IV).



**IMÁGEN 9.** Realizando la medida del peso seco.

#### 5. PRESENTACIÓN DE LA INFORMACIÓN.

Una vez recogida toda la información, se ordenó por apartados y se procedió a una interpretación de la misma para poder elaborar unos resultados. Tampoco se puede olvidar que con todos los datos se realizó un análisis exhaustivo de los mismos para obtener unas conclusiones finales con las cuales poder plantear unas soluciones.

Por último, cuando todo estuviera clasificado y en borrador, se pasó a su ordenación digital, es decir, su redacción a través del ordenador para obtener el informe. A su vez se elaboraron algunos posters para ambientar el centro con dicha información y con una presentación mediante la plataforma Prezi, que se utilizará para dar a conocer el trabajo en una charla informativa a escolares, profesores, padres, y ciudadanos en general.

# III. RELACIONES ENTRE SERES VIVOS

En el ciclo vital de todo ser vivo es necesario que se establezcan relaciones con otros seres. A lo largo del ciclo evolutivo de las especies, las relaciones entre seres vivos también han evolucionado con ellos. Son diversas en función del objetivo que se pretenda conseguir, que en último extremo es la supervivencia de la especie y no del individuo.

Se pueden diferenciar dos tipos de relaciones según los individuos entre los que se produzca.

#### 1. RELACIONES INTRAESPECÍFICAS.

Se llama relación intraespecífica a la interacción biológica en la que los organismos que intervienen pertenecen a la misma especie. En este tipo de relaciones se considera sobre todo las que se presentan en una población. La unión de machos y hembras para reproducirse, o para alimentar y proteger a las crías son ejemplos de relaciones dentro de una misma especie.

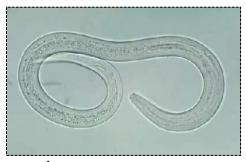
#### 2. RELACIONES INTERESPECÍFICAS.

Por otro lado encontramos la relación interespecífica que es la interacción que tiene lugar en una comunidad entre dos o más individuos de especies diferentes, dentro de un ecosistema. Las relaciones interespecíficas son relaciones ambientales que se establecen entre los organismos de la biocenosis.

Las relaciones entre animales pueden ser perjudiciales o beneficiosas. En las relaciones perjudiciales un individuo sale perjudicado, mientras que el otro se beneficia. Dentro de este grupo podemos encontrar el parasitismo que es una estrecha relación en la cual uno de los participantes, (el parásito o huésped) depende del otro (hospedador o anfitrión) y obtiene algún beneficio.

#### 2.1. El parasitismo.

El parasitismo es un proceso por el cual una especie amplía su capacidad de supervivencia utilizando a otras especies para que cubran sus necesidades básicas y vitales, que no tienen por qué referirse necesariamente a cuestiones nutricionales, y pueden cubrir funciones como la dispersión de propágulos o ventajas para la reproducción de la especie parásita, etc.



IMÁGEN 10. Parásito Necator americanus.

Existen dos tipos de parasitismo según la ubicación del parasitario. Se denomina endoparasitismo al proceso parasitario ocurre en el interior del huésped. Por ejemplo, en el intestino del huésped, alimentándose de los nutrientes que descienden por el intestino. Una vez alimentado el parásito, deposita un gran número de huevos que son expulsados por el tracto intestinal.

El proceso que ocurre en el exterior del huésped, estando el parásito adherido a la piel del huésped; se llama ectoparasitismo. Por ejemplo, algunas sanguijuelas acuáticas localizan organismos con sensores de movimiento y confirman su identidad registrando las sustancias químicas antes de fijarse a la piel.

#### 2.2. Depredación.

Otra interacción perjudicial que podemos encontrar es la depredación. En la



IMÁGEN 11. León cazando una cebra.

depredación un individuo de una especie animal (el predador o depredador) caza a otro individuo (la presa) para subsistir. Un mismo individuo puede ser depredador de algunos animales y a su vez presa de otros, aunque en todos los casos el predador es carnívoro. La depredación ocupa un rol importante en la selección natural.

En la depredación hay un individuo perjudicado, que es la presa, y otro que es beneficiado, que es el depredador, pasando la energía en el sentido presa a depredador. Sin embargo, hay que resaltar que tanto los depredadores controlan el número de individuos que componen la especie presa, como las presas controlan el número de individuos que componen la especie depredadora; por ejemplo, la relación entre el león y la cebra.

#### 2.3. Comensalismo.

Por otro lado existen relaciones que son beneficiosas para ambos organismos o como mínimo lo es para uno de ellos y al otro ni le perjudica ni le beneficia. Este es el caso del comensalismo. Originalmente fue usado para describir el uso de comida de desecho por parte de un segundo animal, como los carroñeros que siguen a los animales de caza, pero esperan hasta que el primero termine de comer. Los individuos de una población aprovechan los recursos que les sobran a los de otra población. La especie que se beneficia es el comensal.

#### 2.4. Mutualismo.

El mutualismo es una interacción biológica, entre individuos de diferentes especies, en donde ambos se benefician y mejoran su aptitud biológica. Las acciones similares que ocurren entre miembros de la misma especie se llaman cooperación. El mutualismo se diferencia de otras interacciones en las que una especie se beneficia a costas de otra; éstos son los casos de explotación, tales como parasitismo, depredación, etc.



IMÁGEN 12. Mutualismo entre pez payaso y anémona.

Las relaciones mutualistas juegan un papel fundamental en ecología y en biología evolutiva. Pueden ser consideradas como un tipo de trueque o canjeo biológico en el que las especies intercambian recursos o servicios. Podemos diferenciar, por tanto, tres tipos:

Las relaciones servicio-recurso son muy comunes, por ejemplo la polinización en que los recursos de néctar y/o polen son intercambiados por el servicio de dispersión de

los gametos (polen) de la planta.

Las relaciones estrictamente de servicio-servicio son muy escasas por razones aún no muy claras. Un ejemplo es la relación entre la anémona de mar y el pez payaso de la familia *Pomacentridae*. La anémona con sus dardos venenosos protege al pez contra depredadores y el pez payaso protege a la anémona contra peces de la familia *Chaetodontidae* que se alimentan de anémonas.

Las relaciones recurso-recurso, en que un tipo de recurso es canjeado por otro es posiblemente el tipo más común de mutualismo. Dentro de este tipo de mutualismo podemos encontrar la simbiosis.

#### 3. LA SIMBIOSIS.

La simbiosis puede ser un tipo particular de mutualismo de carácter íntimo, en que una de las partes (o ambas) es estrictamente dependiente de la otra. La simbiosis, por lo tanto, es una clase de relación biológica interactiva que mantienen seres similares y que suele producir un resultado beneficioso para ambos participantes. Estos se denominan simbiontes.

La simbiosis puede desarrollarse con distintos grados de integración. En el menor grado, los simbiontes viven uno junto a otro y los dos se benefician de sus respectivas

presencias. El grado más intenso de integración, en cambio, supone que la interacción deriva en un nuevo individuo a través de la transferencia genética.

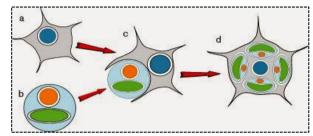
#### 3.1. Tipos de simbiosis.

Se puede distinguir entre varios tipos de simbiosis. De acuerdo al vínculo espacial de los organismos, es posible hablar de endosimbiosis (cuando el simbionte se halla dentro de las células del anfitrión o en el espacio que existe entre éstas) o de ectosimbiosis (el simbionte reside sobre el cuerpo del anfitrión).

La endosimbiosis es la asociación en la cual un organismo que habita en el interior del

otro. El término podría usarse para designar a cualquier simbionte que residiera en el interior del cuerpo de otro ser vivo. A partir de esta relación surge la teoría

endosimbionte, por la cual se forman los orgánulos de las células a partir de bacterias.



IMÁGEN 13. Teoría endosimbionte.

En la ectosimbiosis, también conocida como exosimbiosis, el simbionte vive sobre el cuerpo del organismo anfitrión, incluido el interior de la superficie del recorrido digestivo o el conducto de las glándulas exocrinas.



IMÁGEN 14. Ectosimbiosis entre gacela y pájaro.

Entre las ectosimbiosis mutualistas podemos distinguir dos grandes tipos de asociaciones. En primer lugar, están los tipos en los que el simbionte microbiano vive en la superficie externa de su hospedador. Algunas bacterias fotosintéticas, por ejemplo, se fijan a la superficie de otras bacterias no fotosintéticas y ciertos protozoos no flagelados, que habitan en el intestino de los termes, llevan en su superficie una capa de

En segundo lugar, muchos simbiontes microbianos habitan dentro de las cavidades del cuerpo de sus hospedadores.

Estas asociaciones son consideradas todavía como ectosimbiosis, ya que las cavidades del cuerpo, aunque internas respecto al organismo total, son externas con respecto a los tejidos y son continuas con las superficies externas del cuerpo del hospedador. Los ejemplos más familiares son los microorganismos que habitan en el tracto digestivo de los mamíferos; a la misma categoría pertenecen las bacterias luminosas que pueblan los órganos emisores de luz de algunos peces y moluscos.

espiroquetas.

#### 4. LAS SIMBIOSIS FÚNGICAS.

Los hongos tienen la capacidad de poder asociarse con otros organismos de forma simbiótica para poder colonizar medios y obtener unos beneficios que por ellos mismos serían incapaces de conseguir. Son dos las principales y más conocidas simbiosis fúngicas; la primera es la que forman con algas o cianofíceas para formar los líquenes, y otra es la que forman con las raíces de plantas vasculares para formar micorrizas.

#### 4.1. Los líquenes.

Los líquenes, también conocidos como hongos liquenizados, son organismos resultantes de la simbiosis de un hongo y un alga o una cianofícea. El hongo depende del organismo fotosintético para su metabolismo, y el alga depende del agua y sustancias minerales que le proporciona el hongo, además de estar protegida por las hifas del hongo.



IMÁGEN 15. Xanthoria parietina.

#### 4.2. Las micorrizas.

Por otro lado encontramos las micorrizas o raíces fúngicas. Son otro tipo de simbiosis que forman los hongos, en este caso con las raíces de las plantas terrestres. En esta simbiosis, las hifas del hongo se introducen en los tejidos radicales de la planta. Es una de las simbiosis más frecuentes que se pueden encontrar en la mayor parte de los hábitats, excepto en los más húmedos, ya que las raíces micorrizadas son muy eficaces en la captación de agua y sales.

Los hongos micorrícicos se enriquecen de las plantas, que les aportan carbohidratos y vitaminas. Por supuesto, esta relación también supone un gran beneficio para las plantas con las que se produce la simbiosis:

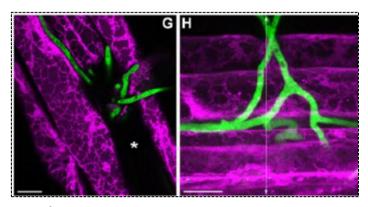
- Incrementan el área fisiológicamente activa en las raíces.
- Incrementan la captación de las plantas de agua y nutrientes como fósforo, nitrógeno, potasio y calcio del suelo.
- Incrementan la tolerancia de las plantas a las temperaturas del suelo y acidez extrema causadas por la presencia de aluminio, magnesio y azufre.
- Proveen protección contra ciertos hongos patógenos y nematodes.
- Inducen relaciones hormonales que producen que las raíces alimentadoras permanezcan fisiológicamente activas por periodos mayores que las raíces no micorrizadas.

Los hongos que forman estas simbiosis son Ascomycetes, Basidiomycetes,

**Zygomycetes**, y entre las plantas casi todas son capaces de ser micorrizadas, excepto las de algunas familias como crucíferas, cariofiláceas, juncáceas o ciperáceas.

En una micorriza, el hongo obtiene nutrientes de la planta, mientras que, gracias al micelio del hongo, su superficie y biomasa radical, ella incrementa la posibilidad de aumentar

la captación del agua. El hongo elabora sustancias como el etileno que, para la planta, es una hormona que regula su crecimiento. También la protege contra los parásitos, mejora la estructura del agua y participa en la absorción de minerales como N, P, K, Cu y otros, los cuales traspasa a la planta por sus hifas.



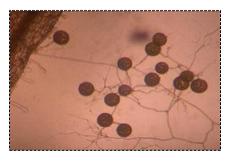
**IMÁGEN 16.** Hifas de *Colletotrichum tofieldiae* (en verde) penetrando en las raíces de *A. thaliana* (en magenta).

Los principales tipos de micorrizas son las ectomicorrizas, endomicorrizas, las micorrizas ericoides y las micorrizas orquidoides.

#### 4.2.1. Ectomicorrizas.

En las ectomicorrizas o micorrizas ectotróficas el micelio del hongo no se introduce en las células de la raíz, sino que forma una especie de envoltura a su alrededor llamada manto, desde el cual crecen al exterior, penetrando en el suelo, y hacia el interior entre las células de la corteza de la raíz, formando una especie de red llamada red de Harting. El micelio externo de hongo tabicado, mientras que el interno es cenocítico. Son micorrizas creadas por basidiomycetes, pertenecientes por ejemplo a las Agaricáceas o Boletáceas, por ascomycetes o también zygomycetes, siendo características de familias de plantas como Fagáceas, Salicáceas y Pináceas.

#### 4.2.2. Endomicorrizas.



IMÁGEN 17. Endomicorrizas en microscopio.

Las endomicorrizas o micorrizas endotróficas son el tipo más común de micorriza, ya que aparecen en casi el 90% de las plantas vasculares, sobretodo en plantas herbáceas, muchas de interés agrícola, en árboles frutales y arbustos aromáticos. Están producidas por un zygomycete

que se desarrolla en mayor grado en la propia raíz de la planta al no formar el manto exterior típico de las anteriores. Las hifas no desarrollan una red de Harting en el exterior, pero en el interior se introducen dentro de las células de la planta formando arbúsculos y vesículas. Este tipo de micorrizas son capaces de movilizar mayor cantidad de fosfatos del suelo.

#### 4.2.3. Micorrizas ericoides.

Las micorrizas ericoides son micorrizas asociados a brezos y plantas afines (Ericáceas y Empetráceas principalmente). El hongo es un ascomycete o basidiomycete (como por ejemplo un Boletus), que forman, dependiendo de la planta, un manto o rudimento del mismo, formando o no una red de Harting. Esta simbiosis permite a los brezos colonizar suelos ácidos y pobres en nutrientes,



**IMÁGEN 18.** Micorriza ericoide.

facilitando la absorción por la planta de nitrógeno y fosfato y aumentando su tolerancia a los metales pesados.

#### 4.2.4. Micorrizas orquidoides.

Las micorrizas orquidoides son las micorrizas que se forman en las orquídeas cuando no son más que una semilla, con pocas reservas; por ende, para germinar necesita la presencia de un hongo que le aporte nutrientes durante el transcurso de su desarrollo. Una vez que la planta crece y fotosintetiza, cuando está en la fase adulta generalmente se independiza del hongo. El hongo es por lo general un *basidiomycete*.

# IV. NITRÓGENO EN LAS PLANTAS

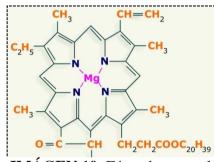
Después del agua, el nitrógeno es el nutriente más importante en el desarrollo de la planta debido a su abundancia en las principales biomoléculas de la materia viva (por ejemplo, aminoácidos, proteínas y ácidos nucleicos). Es uno de los elementos minerales que más escasean en los suelos, por lo que es frecuente añadirlo mediante fertilizantes. El mayor problema derivado de ello es que, como el nitrato es un anión y los aniones no son retenidos ni por la materia orgánica ni por las arcillas del suelo (ya que éstas también tienen cargas negativas), acaba filtrando a capas profundas del suelo y contaminando las aguas subterráneas.

#### 1. FUNCIÓN.

El nitrógeno es uno de los elementos primarios de las plantas. Se puede encontrar en los aminoácidos, por tanto forma parte de las proteínas, las amidas, la clorofila y hormonas (auxinas y citoquininas, nucleótidos, vitaminas, alcaloides y ácidos nucleicos).

Dado que es necesario para la síntesis de clorofila, tiene un papel en el proceso de fotosíntesis. La falta de nitrógeno provocaría que la planta no utilizase la luz solar como fuente de energía para llevar a cabo funciones esenciales.

También interviene en procesos enzimáticos como oxidasas, catalasas y proxidasas, deshidrogenasas, hidrolasas, nucleoproteínas, transforforilasas y transaminasas y carboxilasas.



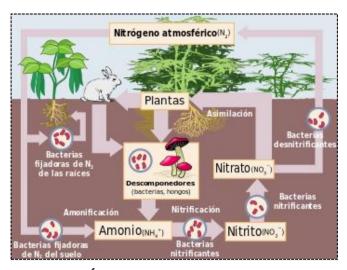
**IMÁGEN 19.** Fórmula general de la clorofila.

#### 2. FIJACIÓN.

La fijación de nitrógeno deja en el suelo una forma orgánica que no es asimilable por ninguna planta. Antes de eso, tiene que pasar por un proceso de degradación por el que pasa de orgánico a mineral. Estas formas minerales son el nitrato, el nitrito y el amonio.

La mineralización del nitrógeno orgánico pasa por diferentes etapas. El nitrógeno atmosférico (N2) se fija en el suelo de una de esas tres formas. Aunque el amonio puede usarse por la mayoría de seres vivos, las bacterias del suelo derivan la energía de la oxidación de dicho compuesto a nitrito o nitrato. Para ello llevan a cabo procesos de amonificación y nitrificación.

Un caso especial es el de las bacterias que fijan el nitrógeno atmosférico directamente, reduciéndolo y haciéndolo asimilable. Sin embargo, esta última posibilidad está restringida a



IMÁGEN 20. Ciclo del nitrógeno.

unas pocas familias de plantas que son capaces de asociarse simbióticamente con ciertas bacterias del suelo capaces de captar el N<sub>2</sub>. Entre estas familias destacan las leguminosas, muy importantes tanto para la dieta humana (lentejas, garbanzos, alubias, guisantes, soja, etc.) como animal (alfalfa, forrajera importante en climas templados).

Además, el terreno de cultivo también incrementa sus niveles de nitrógeno, por lo que las bacterias

fijadoras del N<sub>2</sub> atmosférico se consideran como 'fertilizantes naturales'.

#### 2.1. Fijación abiótica.

Existen dos vías por las cuales el nitrógeno atmosférico se fija en el suelo. Por un lado está la fijación abiótica. Esta sería la forma natural que puede ocurrir por procesos químicos espontáneos, como la oxidación que se produce por la acción de los rayos, que forma óxidos de nitrógeno a partir del nitrógeno atmosférico.

#### 2.2. Fijación biológica.

Es un fenómeno fundamental que depende de la habilidad metabólica de unos pocos organismos, llamados diazótrofos en relación a esta habilidad, para tomar  $N_2$  y reducirlo a nitrógeno orgánico:

$$N_2 + 8H^+ + 8e^- + 16 \text{ ATP} \rightarrow 2NH_3 + H_2 + 16 \text{ ADP} + 16 \text{ P}$$

La fijación biológica la realizan tres grupos de microorganismos diazótrofos:

- Bacterias gram negativas de vida libre en el suelo, de géneros como Azotobacter,
   Klebsiella o el fotosintetizador Rhodospirillum, una bacteria purpúrea.
- Bacterias simbióticas de algunas plantas, en las que viven de manera generalmente endosimbiótica en nódulos, principalmente localizados en las raíces. Hay multitud de especies encuadradas en el género *Rhizobium*, que guardan una relación muy específica con el hospedador, de manera que cada especie alberga la suya, aunque hay excepciones.

 Cianobacterias de vida libre o simbiótica. Las cianobacterias de vida libre son muy abundantes en el plancton marino y son los principales fijadores en el mar.
 Además hay casos de simbiosis, como el de la cianobacteria *Anabaena* en cavidades subestomáticas de helechos acuáticos del género *Azolla*.

#### 2.3. Nitrificación.

La nitrificación es la oxidación biológica del amonio al nitrato por microorganismos aerobios que usan el oxígeno molecular (O<sub>2</sub>) como receptor de electrones, es decir, como oxidante. A estos organismos el proceso les sirve para obtener energía, al modo en que los heterótrofos la consiguen oxidando alimentos orgánicos a través de la respiración celular. El carbono lo consiguen del CO<sub>2</sub> atmosférico, así que son organismos autótrofos.

El proceso fue descubierto por Serguéi Vinogradski y en realidad consiste en dos procesos distintos, separados y consecutivos, realizados por organismos diferentes:

- Nitritación: Partiendo de amonio se obtiene nitrito (NO<sub>2</sub>-). Lo realizan bacterias de, entre otros, los géneros *Nitrosomonas* y *Nitrosococcus*.
- Nitratación: Partiendo de nitrito se produce nitrato (NO<sub>3</sub>-). Lo realizan bacterias del género *Nitrobacter*.

#### 3. DESNITRIFICACIÓN.

La desnitrificación es la reducción del ion nitrato (NO<sub>3</sub>-), presente en el suelo o el agua, a nitrógeno molecular o diatómico (N<sub>2</sub>), la sustancia más abundante en la composición del aire. Por su lugar en el ciclo del nitrógeno este proceso es el opuesto a la fijación del nitrógeno.

Lo realizan ciertas bacterias heterótrofas, como *Pseudomonas fluorescens*, para obtener energía. El proceso es parte de un metabolismo degradativo de la clase llamada respiración anaerobia, en la que distintas sustancias, en este caso el nitrato, toman el papel de oxidante (aceptor de electrones) que en la respiración celular normal o aerobia corresponde al oxígeno (O<sub>2</sub>). El proceso se produce en condiciones anaerobias por bacterias que normalmente prefieren utilizar el oxígeno si está disponible.

El proceso sigue unos pasos en los que el átomo de nitrógeno se encuentra sucesivamente bajo las siguientes formas:

nitrato 
$$\rightarrow$$
 nitrito  $\rightarrow$  óxido nítrico  $\rightarrow$  óxido nitroso  $\rightarrow$  nitrógeno molecular 
$$2NO_3^{\cdot} + 10e^{\cdot} + 12H^{\cdot} \rightarrow N_2 + 6H_2O$$

La desnitrificación es fundamental para que el nitrógeno vuelva a la atmósfera, la única manera de que no termine disuelto íntegramente en los mares, dejando sin nutrientes a la vida continental. Sin la desnitrificación la fijación de nitrógeno, abiótica y biótica, terminaría por provocar la eliminación del N2 atmosférico.

#### 4. ABSORCIÓN.

Las plantas absorben el nitrógeno nítrico. De ahí que muchos agricultores empleen como abonado de fondo nitrógenos de tipo amoniacal o ureico, puesto que se espera de ellos que permanezcan en el suelo el mayor tiempo posible.

Este compuesto puede ser absorbido por la planta tanto a nivel radicular (por las raíces, lo más común) como foliar (en aplicación directa). Sin embargo, lo normal es que la absorción del nitrógeno se haga por el suelo, tanto en la amoniacal (NH4+) como en nítrica (NO3-).

La absorción del nitrato se caracteriza por ser una absorción activa, necesita ATP y un transportador. Se produce una mejor si el pH es ligeramente ácido y, sin embargo, se inhibirá a baja temperatura.

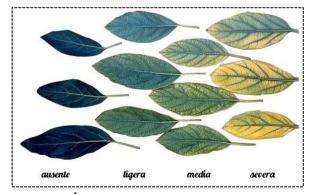
#### 5. CARENCIA.

Los síntomas de deficiencia de nitrógeno en la planta son muy llamativos y, como el nitrógeno es un mineral que se transporta muy rápido desde la raíz hasta la parte aérea, los primeros síntomas de deficiencia (de que escasea o falta este elemento) se observan en las hojas más viejas (las que se encuentran en la base del tallo).

#### 5.1. Clorosis.

La clorosis es el amarillamiento del tejido foliar causado por la falta de clorofila. Las

causas posibles de la clorosis son el drenaje insuficiente, las raíces dañadas, las raíces compactadas, la alcalinidad alta y las deficiencias nutricionales de la planta. Las deficiencias nutricionales pueden ocurrir debido a que el suelo no es rico en nutrientes o porque estos no están disponibles por el pH alto (suelo alcalino). También es posible que los nutrientes no



**IMÁGEN 21.** Niveles de clorosis.

puedan absorberse porque las raíces de las plantas están dañadas o poco desarrolladas.

Aunque la clorosis férrica es la más común, la carencia de nitrógeno también provoca esta clorosis. Debido a la acción de este elemento sobre la clorofila, su carencia provoca la inhibición de producción del pigmento verde.

#### 5.2. Raquitismo.

Como el nitrógeno está íntimamente ligado con el crecimiento, si una planta presenta carencia de este elemento, nos encontraremos con vegetales raquíticos que terminan por lignificarse pronto.

#### 5.3. Relación tallo/raíz.

Esta relación también se ve afectada por la falta de este nutriente. Al contrario que el raquitismo que va a sufrir la planta, la raíz se extenderá en busca del nitrógeno del que carece. Por ello las la raíz se muestra menos frondosa, pero más alargada.

#### 5.4. Acumulación de pigmentos antocianos.

La acumulación de pigmentos antocianos en los nervios de las hojas y el tallo, en algunas plantas (entre ellas, la alfalfa, el tomate y ciertas variedades de maíz), es otro de los síntomas de la carencia de este nutriente. Esta acumulación de antocianos proporciona una coloración rojiza o púrpura.



**IMAGEN 22.** Planta con pigmentos antocianos.

#### 6. EXCESO.

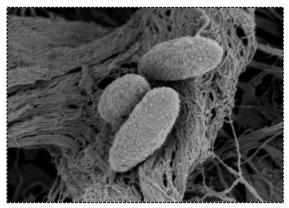
El exceso de este nutriente provoca que las plantas crezcan de una forma exagerada, dando un mayor desarrollo de brotes y ramas. Las plantas se muestran más tiernas, menos lignificadas y retrasa la aparición de partes leñosas. Por tanto se produce un retraso en la madurez de la planta.

Esto hace a las plantas afectadas más susceptibles a plagas y enfermedades, puesto que carecen de la robustez que les proporciona la maduración.

## V. RHIZOBIUM

#### 1. RHIZOBIUM.

Las bacterias *Rhizobium* son organismos de vida libre que habitan en la rizosfera y se alimenta de los restos de organismos muertos. Estas contienen un plásmido que codifica información que es vital para la infección y la nodulación de la planta hospedadora correspondiente.



IMÁGEN 23. Rhizobium leguminosarum en microscopio electrónico.

Son bacilos móviles, Gram-negativos, con dos capas de pared celular (la primera capa está hecha por carbohidratos y proteínas, y la segunda capa por lípidos y carbohidratos). Son procariotas, aerobios (necesitan oxígeno para crecer), móviles (al hacerse el test de motilidad, el agar se vuelve amarillo y no de su color original -morado-). (digiere beta hemoglobina), casi cualquier crece en temperatura, pero su desarrollo es más óptimo a

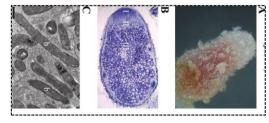
una temperatura de 25 °C (77 °F), sus dimensiones son de 0.5-0.9 x 1.2-3.0  $\mu$ m, y cuenta con flagelos.

Este es un género que pertenece a un grupo de bacterias fijadoras de nitrógeno que se denominan colectivamente rizobio. Viven en simbiosis con determinadas plantas (como por ejemplo las leguminosas) en su raíz, después de un proceso de infección inducido por la propia planta mediante la secreción de lectina, a las que aportan el nitrógeno necesario para que la planta viva y esta a cambio le da cobijo.

#### 2. SINORHIZOBIUM MELILOTI.

Sinorhizobium meliloti es una α-proteobacteria capaz de establecer asociaciones simbióticas con plantas de los géneros Medicago, Melilotus y Trigonella. Esta asociación es

el resultado de una relación molecular entre los simbiontes, que se diferencian a lo largo de la interacción para dar lugar a un nuevo órgano en las raíces de las plantas, el nódulo fijador de nitrógeno.



IMÁGEN 26. Diferentes vistas de Sinorhizobium meliloti.

# VI. ALFALFA

La Alfalfa, o también llamada *Medicago sativa*, es una hierba perenne, frecuentemente erecta o ascendente, rara vez postrada y muy ramificada. Es una planta



**IMAGEN 27.** Flor de *Medicago sativa* (Alfalfa).

forrajera que crece en campos de cultivo en barbechos, taludes y márgenes de caminos desde el nivel del mar a los 2000 m. Sus tallos son de 30 a 90 cm de largo, y llenos de pelos no glandulíferos. Sus flores son de color azul o púrpura con pétalos de hasta 1 cm, agrupadas en racimos de unos 4 cm de longitud sobre peciolos de inferior longitud al tubo del cáliz. Sus raíces suelen ser leñosas y con nudos, y muy profundas, pudiendo medir hasta 4,5 metros.

Tiene un ciclo vital de entre cinco y doce años, dependiendo de la variedad utilizada, así como el clima. Es preferible cultivar la alfalfa en un lugar luminoso, con luz solar directa, pues puede soportar sin problemas las temperaturas mínimas de muchos grados bajo cero.

La alfalfa es originaria de Crimea y Anatolia, pero actualmente se encuentra cultivada y naturalizada en todo el mundo.

#### 1. NITRÓGENO EN LA ALFALFA.

En la alfalfa, los niveles idóneos de nitrógeno en los tejidos que posibilitan un crecimiento adecuado de la planta oscilan entre un 3,5 y un 5,0 % del peso seco total de la parte aérea (tallos y hojas).

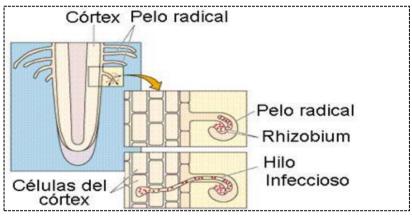
# VII. SIMBIOSIS RHIZOBIUM LEGUMINOSA

El establecimiento de una simbiosis efectiva entre las leguminosas y los rizobios es un proceso complejo que implica mecanismos de señalización y reconocimiento por parte de ambos simbiontes.

#### 1. NODULACIÓN.

Las raíces de las leguminosas liberan flavonoides e isoflavonoides, compuestos fenólicos que inducen la expresión de los genes de nodulación en el microsimbionte. Como resultado, los rizobios producen los factores de nodulación, denominados factores *nod*. Estos factores *nod* inducen una serie de respuestas en la planta, que incluyen la deformación de los pelos radicales, la división de las células corticales y la formación del nódulo.

La unión de los rizobios a los pelos radicales, la penetración a través de la epidermis y la invasión del tejido cortical a través del cordón de infección son sucesos que están acompañados del comienzo de actividad meristemática en las células del córtex y el periciclo radicales y la supresión de las respuestas de defensa de la planta.



IMÁGEN 28. Nodulación.

La liberación de rizobios del cordón de infección a células individuales del córtex se consigue mediante endocitosis, por lo que los rizobios se encuentran encerrados en una membrana de origen vegetal denominada membrana peribacteroidea o simbiosomal, que les aísla del citoplasma de la célula huésped.

Los rizobios se dividen activamente en las células infectadas y, quedan rodeados, individualmente o en grupos, por la membrana peribacteroidea. Antes de que se pueda llevar a cabo la FBN, es necesario un ambiente micro-aeróbico en el interior de los nódulos, que permite la diferenciación de los rizobios a bacteroides con capacidad para fijar nitrógeno.

El tipo de flavonoides liberado por cada especie de leguminosa es específico para activar los genes de nodulación de una especie determinada de rizobio. La activación de estos genes de nodulación en las distintas especies de rizobios determina la síntesis

específica de factores *nod* (lipo-quitin-oligosacaridos). De esta forma, estos factores *nod* activan de forma específica la respuesta simbiótica en la leguminosa correspondiente.

#### 1.1. Nódulos determinados e indeterminados.

Dependiendo del sistema simbiótico podemos encontrar dos tipos de nódulos: determinados o indeterminados. Ello va a venir dado por el lugar en donde se induzcan las divisiones mitóticas en la raíz. Así, si se originan en el córtex interno se originan nódulos indeterminados y si lo hacen en el córtex externo nódulos determinados. Ambos tipos de nódulos, además de presentar una estructura anatómica distinta, también difieren en la forma en que se comporta la bacteria dentro del nódulo en formación. A pesar de ello, la inducción



IMÁGEN 29. Nódulo determinado de *Medicago Sativa* con *Rhizobium*.

del ciclo celular en ambos sistemas sigue la misma regulación.

Los nódulos indeterminados se dan en plantas como las del género *Medicago*, *Pisum*, *Trifolium* y *Vicia*. En este tipo de nódulos son las células del córtex interior las que se reintroducen en el ciclo celular, además, tienen la característica de poseer un meristemo permanente, lo que les otorga una forma cilíndrica con simetría radial en la organización de los tejidos. Así en la zona más exterior se hallan las células vacuoladas del córtex, y hacia el interior se encuentran la endodermis y el parénquima, en donde también aparecen los haces

vasculares. Todo ello cubre una zona central en donde *Rhizobium* se alberga y realiza la fijación de nitrógeno.

Por otro lado, los nódulos determinados son inducidos en plantas como las del género *Phaseolus*, *Glycine*, *Vigna* y *Lotus*, entre otras. A diferencia que en los indeterminados, en esta clase de nódulos no hay un meristemo permanente. Así, su crecimiento se basa en la expansión en vez de en la división celular, razón por la que presentan una morfología esférica en vez de cilíndrica.



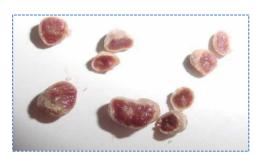
IMÁGEN 30. Nódulos determinados de *Phaseolus* vulgaris con *Rhizobium*.

#### 1.2. Leghemoglobina.

Ni las leguminosas, ni la bacteria Rhizobium pueden fijar nitrógeno en condiciones normales, solo se logra en el momento en que estas interactúan. Aunque en un cultivo axénico con condiciones microfílicas controladas la bacteria puede fijar nitrógeno atmosférico, esta necesita oxígeno para generar energía y así fijar nitrógeno, pero su nitrogenasa es inactivada por el oxígeno.

Por otro lado, en el nódulo se encuentran las concentraciones de oxígeno exactas, las cuales son controladas por la leghemoglobina, proteína que se une al oxígeno. La leghemoglobina evita la llegada de oxígeno a las inmediaciones del enzima nitrogenasa y lo transporta a lugares donde la respiración aerobia es intensa.

Esta proteína es de color rojo ya que contiene hierro, y siempre está presente en nódulos sanos fijadores de nitrógeno. Su formación es inducida por la interacción planta-bacteria, ya que cada una por aparte es incapaz de sintetizarla. Esta funciona como un tapón de oxígeno, que mantiene la concentración de este bajo, pero constante. La relación existente en el nódulo de leghemoglobina y oxígeno es 10000:1.



IMÁGEN 31. Nódulos de soja con el interior rosado, indicador de presencia de leghemoglobina.

#### 2. FIJACIÓN DE NITRÓGENO.

La fijación biológica del nitrógeno atmosférico, consistente en la reducción de N<sub>2</sub> a NH<sub>4</sub> por la enzima nitrogenasa, es, después de la fotosíntesis, la ruta metabólica más importante para el mantenimiento de la vida en la Biosfera. Este proceso crucial sólo puede ser llevado a cabo por unos pocos grupos de seres vivos como los Rhizobium. Estas bacterias realizan esta función cuando se han asociado con las raíces de las leguminosas y han provocado la formación de los nódulos.

Dado que se gasta mucho ATP en el proceso de fijación del  $N_2$  del aire, es necesario que la respiración aerobia de la raíz sea intensa para formar ATP. Por ello, los nódulos se localizan en partes altas de la raíz, próximas al cuello, porque hay más oxígeno cerca de la superficie del suelo. Sin embargo, este oxígeno puede inactivar al enzima nitrogenasa si se acerca demasiado a ella. Por eso, la fijación del  $N_2$  se da en el interior del nódulo, adonde no llega tanto oxígeno y, además, los nódulos cuentan con la presencia de una proteína similar a nuestra hemoglobina sanguínea (la leghemoglobina) que tiene gran afinidad por el oxígeno.

De forma paralela al desarrollo del nódulo, *Rhizobium* se distribuye por el mismo a través de los canales de infección, o a través de la división de células previamente infectadas, según se trate de un nódulo indeterminado o determinado, a la par que va sufriendo una serie de modificaciones que culminan en la formación del simbiosoma, el cual presenta una serie de características que son indispensables para realizar la actividad fijadora de nitrógeno.

#### 3. GRUPOS DE INOCULACIÓN CRUZADA.

Los grupos de inoculación cruzada son los grupos de cepas de *Rhizobium* que solo infectan a una determinado grupo de especies próximas a las leguminosas. El que una cepa pueda infectar a una determinada leguminosa, no significa que aparezcan los nódulos fijadores de nitrógeno. Esa capacidad está determinada por los genes presentes en las bacterias.

Se identifica a las cepas inefectivas porque producen nódulos de menor tamaño, blancuzcos y sin la capacidad fijadora de nitrógeno, mientras que las cepas efectivas forman nódulos mayores, rojizos y capaces de fijar nitrógeno. Es así que en conclusión, ya que existen diferentes variedades de bacterias *Rhizobium*, cada una tiene la capacidad de hacer simbiosis con una leguminosa determinada. La tabla a continuación muestra ciertas plantas hospedadoras con su correspondiente grupo de inoculación cruzada:

| <u>Planta hospedadora</u> | Cepa de la bacteria Rhizobium          |
|---------------------------|--|
| Guisante                  | Rhizobium leguminosarum biovar viciae  |
| Judía                     | Rhizobium Leguminosarum biovarphaseoli |
| Judía                     | Rhizobium tropici                      |
| Loto                      | Mesorhizobium loti                     |
| Trébol                    | Rhizobium lehuminosarum biovar trifoli |
| Alfalfa                   | Sinorhizobium melitoti                 |

| Soja                                    | Bradyrhizobium japonicum |
|---|--------------------------|
| Soja                                    | Bradyrhizobium elkanii   |
| Soja                                    | Rhizobium fredii         |
| Sesbania rostrata (leguminosa tropical) | Azorhizobium caulinodans |

## VIII. RESULTADOS

Para comenzar este estudio se plantaron un total de 50 plántulas, cinco por cada maceta, de las cuales solo 25 serían inoculadas con Rhizobium. De esta forma, solo la mitad de ellas conseguiría obtener nitrógeno, esta sería la única diferencia puesto que por lo demás estarían en igualdad de condiciones.

A pesar que la única diferencia entre los grupos de control fue que uno de ellos carecía de nitrógeno, los resultados de los análisis distan muchos unos de otros.

Cabe destacar que este estudio está hecho con dos grupos de controle de 25 plantas, por lo que todas las medias están hechas sobre 25, dando un valor de cero a aquellas plantas que mueren durante el proyecto.

#### 1. LONGITUD AÉREA.

Como parte aérea de la planta se considera tanto el tallo como las estructuras que se forman a partir de él, ya sean hojas o flores. A grandes rasgos se puede decir que es la parte que se encuentra en el exterior.

#### 1.1. Primera medición.

Tras un periodo aproximado de unas cuatro semanas después de trasplantar las plántulas a las macetas, se realizó la primera medición de ambos grupos de control.

Ambos grupos presentaron medidas muy diversas, aunque ya se comenzaban a ver diferencias con respecto a la presencia de nitrógeno (Ver IMÁGEN 32).

| Longitud parte aérea -R |        |               |        | Lo     | ngitud  | parte a | aérea + | -R     |        |
|-------------------------|--------|---------------|--------|--------|---------|---------|---------|--------|--------|
| 3 cm                    | 3,5 cm | 1,8 cm        | 3 cm   | 6,6 cm | 10 cm   | 9,1 cm  | 8,5 cm  | 9 cm   | 7 cm   |
| 2 cm                    | 2,9 cm | 1 cm          | 1,5 cm | 3,7 cm | 3,5 cm  | 5,5 cm  | 6,3 cm  | 4 cm   | 7,6 cm |
| 0,9 cm                  | 2,5 cm | 3 cm          | 3,5 cm | 3 cm   | 7,4 cm  | 1,5 cm  | 3 cm    | 6,5 cm | 6 cm   |
| 6,4 cm                  | 4,5 cm | 3,2 cm        | 4,5 cm | 4 cm   | 2,6 cm  | 1,9 cm  | 4,7 cm  | 9,8 cm | 4,5 cm |
| 5,4 cm                  | 2 cm   | 1 cm          | 3,4 cm | -      | 10,2 cm | 6,7 cm  | 7,4 cm  | 7,8 cm | 8,5 cm |
| MEDIA 3,05 cm           |        | MEDIA 6,36 cm |        |        |         |         |         |        |        |

TABLA 1. Primera medición. 27/02/2016

De las plantas que no fueron inoculadas con *Rhizobium* (-R) comenzaron a crecer 24. En esta medición las longitudes oscilaban entre 0,9 y 6,6 cm, dando una media total de 3,05 cm.

Por otro lado, las plantas inoculadas (+R) salieron adelante las 25 que se

trasplantaron. La planta menos desarrollada tenía una longitud de 1,5 cm, mientras que la más desarrollada midió 10,2 cm. En total se obtuvo una media de 6,36 cm (Ver



IMAGEN 32. Plantas en la primera medición.

#### TABLA 1).

#### 1.2. Segunda medición.

Esta segunda medición se llevó a cabo 13 días después de la primera. En esta ocasión se pudo observar una notable diferencia entre ambos grupos (Ver **IMÁGEN 33**).

| Longitud parte aérea -R |        |        |         |        | Longitud parte aérea +R |         |         |          |         |
|-------------------------|--------|--------|---------|--------|-------------------------|---------|---------|----------|---------|
| 4 cm                    | 3,2 cm | 3,5 cm | 1,3 cm  | 4 cm   | 25,7 cm                 | 20 cm   | 19,6 cm | 29 cm    | 20,5 cm |
| 3,5 cm                  | 3 cm   | 5 cm   | 3,2 cm  | 4,9 cm | 23,5 cm                 | 22 cm   | 22,8 cm | 22 cm    | 26 cm   |
| 6,8 cm                  | 3 cm   | 3,6 cm | 1,5 cm  | 5 cm   | 23,7 cm                 | 12 cm   | 15,5 cm | 7,5 cm   | 25 cm   |
| 4,2 cm                  | -      | -      | -       | -      | 21,7 cm                 | 22 cm   | 19 cm   | 14,3 cm  | 21,5 cm |
| -                       | -      | -      | -       | -      | 14,8 cm                 | 22,5 cm | 14,5 cm | 14 cm    | 11,8 cm |
| MI                      | EDIA   |        | 2,39 cm |        | ME                      | DIA     |         | 19,36 cm |         |

TABLA 2. Segunda medición. 11/03/2016

En este punto del estudio, el grupo de control que carecía de nitrógeno (-R) se vio bastante resentido. De las 24 plantas que salieron a delante en un principio, 9 murieron en este intervalo de 13 días. Las 16 plantas restantes no crecieron mucho más con respecto de la primera medición, las longitudes oscilaron entre 1,3 y 6,8 cm. A pesar de que en general



IMAGEN 33. Plantas en la segunda medición.

crecieron un poco más, la muerte de algunas de ellas provoca una caída de la media hasta 2,39 cm.

Sin embargo, del grupo con *Rhizobium* (+R) sobrevivieron las 25 plantas iniciales, las cuales incrementaron notablemente su longitud. La más corta se

quedó en 7,5 cm, mientras que la más larga alcanzó los 29 cm, obteniendo una media

total de 19,63 cm (Ver TABLA 2).

#### 2. LONGITUD DE RAIZ.

Como raíz se considera toda la parte de la planta que se encuentra enterrada. Al ser una parte delicada de la planta solo se pudo hacer una medición, puesto que se debían sacar de las macetas para poder conocer dicha longitud (Ver **IMAGEN 34**).

|            | Long          | gitud r | aíz -R  |         |         | Long    | itud ra | íz +R    |         |
|------------|---------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|----------|---------|
| 14 cm      | 13,5 cm       | 17 cm   | 6 cm    | 11,1 cm | 15,4 cm | 28,1 cm | 22,6 cm | 25,8 cm  | 21,1 cm |
| 20 cm      | 8,3 cm        | 18,4 cm | 17 cm   | 21 cm   | 24,2 cm | 26,7 cm | 17,5 cm | 20,2 cm  | 24,1 cm |
| 17,4<br>cm | 12,2 cm       | 12,7 cm | 14,3 cm | 20,2 cm | 20,6 cm | 21,2 cm | 29 cm   | 25,5 cm  | 22,9 cm |
| 10 cm      | -             | -       | -       | -       | 21 cm   | 19,6 cm | 18 cm   | 11,3 cm  | 30 cm   |
| -          | -             | -       | -       | -       | 17,8 cm | 33,2 cm | 25,7 cm | 30 cm    | 12,1 cm |
| Ml         | MEDIA 9,32 cm |         |         |         |         | DIA     |         | 21,46 cm |         |

TABLA 3. Única medición. 11/03/2016

El grupo de control –R desarrolló las raíces de forma que los resultados oscilaron entre los 6 y 20,2 cm (Ver **TABLA 3**). A pesar de obtener unos resultados, se



IMÁGE 34. Alfalfa tras ser extraída de las macetas.

podría decir que altos, la media vuelve a caer debido a las 9 que no sobrevivieron, obteniendo así una media total de 9,32 cm.

Por otro lado, el grupo inoculado (+R) obtuvo unos resultados altos, entre los 11,3 y 33,2 cm. Haciendo así, una media de 21,46 cm de raíz.

#### 3. PESO SECO.

Para obtener el peso de las plantas se prefirió utilizar el peso seco en vez del peso natural. Mediante esta forma se elimina toda el agua que puedan tener las plantas con un secado. Así queda únicamente el extracto que interesa.

#### 3.1. Sin Rhizobium.

Estas medidas se decidieron hacer diferenciando por un lado las raíces y por otro la parte aérea de las plantas sin inocular (-R).

|                  | Peso seco -R  |        |         |        |        |        |        |         |        |  |  |  |  |
|------------------|---|--------|---------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|--|--|--|--|
| Raíz Parte aérea |   |        |         |        |        |        |        |         |        |  |  |  |  |
| 7,1 mg           | 7,1 mg   5,5 mg   3,1 mg   5,6 mg   5,5 mg   11,1 mg   3,8 mg   7,8 mg   4,4 mg |        |         |        |        |        |        |         |        |  |  |  |  |
| 5,2 mg           | 7,5 mg  | 4,8 mg | 6,5 mg  | 5,3 mg | 2,9 mg | 4,1 mg | 3,9 mg | 11 mg   | 6,0 mg |  |  |  |  |
| 8,2 mg           | 8,5 mg  | 4,4 mg | 1,6 mg  | 5,3 mg | 2,8 mg | 4,7 mg | 8,3 mg | 6,9 mg  | 6,0 mg |  |  |  |  |
| 9,5 mg           | -   | -      | -       | -      | 6,3 mg | -      | -      | -       | -      |  |  |  |  |
| -                | -   | -      | -       | -      | -      | -      | -      | -       | -      |  |  |  |  |
| ME               | CDIA  |        | 3,74 mg |        | ME     | DIA    |        | 3,87 mg |        |  |  |  |  |

**TABLA 4.** 19/03/2016

Los resultados tanto en la parte aérea como en la raíz salieron muy parecidos. En la parte de la raíz el peso oscilaba entre los 1,6 y 9,5 mg, pero en general el peso se mantuvo en números altos del intervalo (Ver **TABLA 4**). Sin embargo en la parte aérea los resultados variaron más dentro del intervalo de 2,8 y 11,1 mg. Por ello, las medias obtenidas fueron muy similares, siendo 3,74 mg la de la raíz y 3,87 mg la de la parte aérea.

#### 3.2. Con Rhizobium.



IMAGEN 35. Pesando las raíces.

Al igual que con las no inoculadas, en este grupo de control (+R) se dividió el peso en raíz y parte aérea.

Tanto los resultados obtenidos de las raíces como de las partes aéreas son muy variados (Ver **TABLA 5**). Los pesos de las raíces variaron entre 10,6 mg y 120,0 mg y los de la parte aérea entre 17,0 y 139,9 mg. A pesar de no haber gran diferencia entre ambos intervalos, los resultados de la parte aérea fueron elevados dentro del

mismo. Por ello, obtuvimos unas medias de 63,79 mg en las raíces y 81,87 mg en la parte aérea.

|          | Peso seco +R |          |           |         |             |          |          |           |          |  |  |  |  |
|----------|--------------|----------|-----------|---------|-------------|----------|----------|-----------|----------|--|--|--|--|
|          |              | Raíz     |           |         | Parte aérea |          |          |           |          |  |  |  |  |
| 120,0 mg | 52,1 mg      | 66,2 mg  | 62,5 mg   | 77,0 mg | 139,9 mg    | 31,1 mg  | 17,0 mg  | 131,7 mg  | 69,5 mg  |  |  |  |  |
| 37,4 mg  | 79,0 mg      | 38,0 mg  | 33,3 mg   | 10,9 mg | 89,7 mg     | 59,6 mg  | 84,5 mg  | 89,2 mg   | 57,1 mg  |  |  |  |  |
| 73,1 mg  | 70,7 mg      | 43,1 mg  | 22,6 mg   | 55,5 mg | 31,7 mg     | 85,0 mg  | 99,3 mg  | 112,4 mg  | 37,3 mg  |  |  |  |  |
| 40,4 mg  | 58,0 mg      | 113,7 mg | 66,6 mg   | 16,0 mg | 88,5 mg     | 103,2 mg | 91,4 mg  | 84,3 mg   | 106,1 mg |  |  |  |  |
| 90,5 mg  | 84,8 mg      | 91,2 mg  | 115,1 mg  | 77,2 mg | 95,9 mg     | 23,6 mg  | 136,2 mg | 53,7 mg   | 129,5 mg |  |  |  |  |
| ME       | DIA          |          | 63,788 mg |         | ME          | DIA      |          | 81,868 mg |          |  |  |  |  |

**TABLA 5.** 19/03/2016

#### 4. NUMERO DE HOJAS.

La alfalfa tiene una peculiaridad al igual que muchas otras plantas que puede llevar a confusión a la hora de contar las hojas. Cada hoja de alfalfa tiene tres foliolos, algo parecido a tres hojas pequeñas unidas a un mismo tallo



**IMAGEN 36.** Hoja de alfalfa.

(Ver IMAGEN 36). Esas tres hojas pequeñas conforman la hoja en sí de la planta.

#### 4.1. Primera cuenta.

| ľ         | Númer      | o de h | ojas -I | 2 | Número de hojas +R |     |    |      |    |
|-----------|------------|--------|---------|---|--------------------|-----|----|------|----|
| 2         | 2          | 2      | 1       | 3 | 4*                 | 4*  | 4* | 4*   | 4* |
| 2         | 1          | 1      | 1       | 2 | 2*                 | 4   | 4  | 2*   | 4* |
| 2         | 1          | 1      | 2       | 2 | 3*                 | 2   | 2* | 3*   | 4* |
| 2         | 2          | 2      | 2       | 1 | 3                  | 3   | 4* | 3*   | 4* |
| 2 2 1 0 - |            |        |         |   | 4*                 | 4   | 3* | 3*   | 4* |
| ME        | MEDIA 1,56 |        |         |   | ME                 | DIA |    | 3,32 |    |

TABLA 6. Primera cuenta. 27/02/2016 \*Plantas con capullos.

Las plantas del primer grupo (-R) mostraron un numero de hojas de entre 1 y 3, de las cuales solo una tenía 3. Se obtuvo una media de 1,56 hojas en total y no hubo presencia de capullos (Ver **TABLA 6**).

Sin embargo el grupo que pudo obtener nitrógeno (+R) mostró un mayor número de hojas, entre 2 y 4. De ellas, en la gran mayoría se apreciaban capullos que darían nuevas hojas. Se obtuvo una media de 3,32 hojas en total.

#### 4.2. Segunda cuenta.

En esta segunda cuenta el grupo –R aumentó en algunas de las plantas el número de hojas, pero no dista mucho de la primera medición pues el intervalo permanece entre 1 y 3 (Ver **TABLA 7**). En esta ocasión únicamente dos de las plantas mostraron capullos.

A pesar de que la mitad de las plantas lograron un número de 3 hojas, nuevamente la media cae debido a las que no lograron sobrevivir, obteniendo una media total de 1,52 hojas.

Sin embargo el desarrollo de las plantas inoculadas (+R) provocaron un gran aumento en el número de las hojas y en la presencia de capullos de hojas. Se obtuvieron unos resultados de entre 5 y 19 hojas por planta, donde la mayoría sobrepasó las 10 hojas y, exceptuando 2, todas las plantas mostraron capullos que darían lugar a nuevas hojas. Con estos resultados se obtuvo una media de 10,4 hojas.

| ľ  | Númer      | o de h | ojas -I | 2  | Número de hojas +R |     |      |     |     |
|----|------------|--------|---------|----|--------------------|-----|------|-----|-----|
| 2  | 1          | 2      | 3       | 3  | 10*                | 5*  | 7*   | 9*  | 14* |
| 3  | 3          | 1      | 2*      | 3  | 9*                 | 11* | 11*  | 8*  | 5*  |
| 3* | 2          | 2      | 2       | 3  | 11*                | 11* | 12*  | 15* | 8*  |
| 3  | -          | -      | -       | -  | 10*                | 5   | 19*  | 7   | 18* |
| -  |            |        |         |    |                    | 14* | 7*   | 11* | 13* |
| ME | MEDIA 1,52 |        |         | ME | DIA                |     | 10,4 |     |     |

**TABLA 7.** Segunda cuenta. 11/03/2016 \*Plantas con capullos.

#### **5. PIGMENTACION.**

Las plantas que no recibieron aporte de nitrógeno presentan un color amarillento, en ocasiones tirando hacia marrón.

Sin embargo las plantas inoculadas con *Rhizobium* que recibieron este nutriente, se muestran de un color verde intenso.

#### 6. NÓDULOS.



**IMAGEN 37.** Nódulo resultante de la simbiosis entre alfalfa y *Rhizobium*.

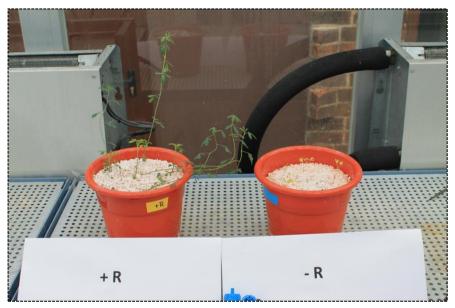
Las raíces de las plantas inoculadas presentan nódulos (Ver IMAGEN 37); estos nódulos pueden ser determinados si son esféricos y de tamaño fijo, o indeterminados, como es en este caso, si son alargados, con meristemos, ramificados, y situados mayoritariamente en el cuello de la raíz.

También presentan un color rosado debido a la presencia de leghemoglobina.

## IX. CONCLUSIONES

A lo largo de este trabajo de investigación, gracias a los análisis obtenidos y a la información recopilada, se ha podido llegar a una serie de conclusiones acerca de esta relación simbiótica y su importancia.

Se ha observado que el grupo inoculado con *Rhizobium* presenta grandes diferencias físicas respecto al que no fue inoculado. Las características de este último grupo tienen como finalidad hacer que la planta sobreviva en un medio exento de nitrógeno. (Ver **IMÁGEN 38**).



**IMAGEN 38.** A la izquierda planta con *Rhizobium*, a la derecha planta sin *Rhizobium*.

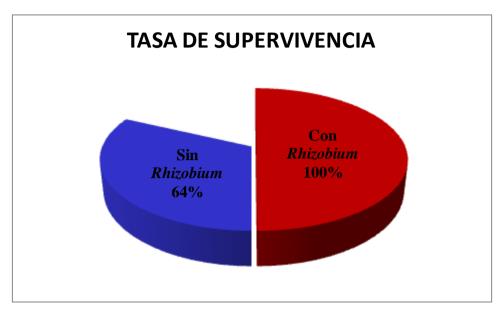
#### 1. TASA DE SUPERVIVENCIA.

El estudio comenzó con un total de 50 plántulas de alfalfa en condiciones exentas de nitrógeno, de las cuales 25 fueron inoculadas con *Rhizobium* y el resto se mantuvieron igual.

Al finalizar el estudio se pudo observar que de las 25 plantas que se inocularon con la bacteria, todas sobrevivieron (Ver **GRÁFICA 1**). Sin embargo, de las que permanecieron en un medio exento de nitrógeno, 9 perecedieron.

A rasgos generales y con esta tasa de supervivencia, se puede deducir que la ausencia de nitrógeno no es favorable para plantas. Debida a la gran funcionalidad del nitrógeno en los procesos químicos de las plantas, es un nutriente muy necesario, sin el cual una planta no lograría sobrevivir.

Si el estudio hubiese continuado unas semanas más, las 16 plantas no inoculadas que aún se mantenían con vida, hubiesen muerto ya que no podrían llevar a cabo ciertos procesos químicos y por tanto, no podrían desarrollarse adecuadamente.



**GRÁFICA 1.** Tasa de supervivencia.

#### 2. LONGITUD AÉREA.

La diferencia en cuanto a la longitud de la parte aérea de los dos grupos es uno de los rasgos más notables visiblemente. La presencia de nitrógeno provoca que la planta crezca correctamente y con una longitud apropiada, sin embargo las que carecen de este nutriente presentan raquitismo debido a su mal desarrollo. (Ver IMÁGEN 39).

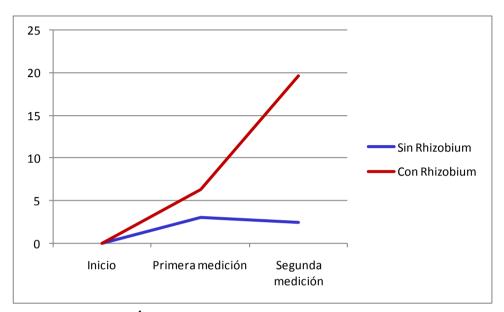
Durante la primera semana desde que se produjo la primera inoculación, las plantas no muestran a penas diferencias. Esto se debe a que la alfalfa todavía cuenta con los nutrientes que le proporciona la semilla. Dado que la semilla de la alfalfa es pequeña, estos nutrientes se consumen rápidamente, es entonces cuando se empiezan a apreciar cambios visibles en ambos grupos.

A partir de la cuarta semana de desarrollo, la



**IMAGEN 39.** Alfalfa tras cuatro semanas de desarrollo. Delante con *Rhizobium*, detrás sin.

tercera después de la primera inoculación, las diferencias ya son bastante claras. Por un lado, los nutrientes de las semillas se acaban, y por otro lado las bacterias comienzan a establecer la relación de simbiosis con las plantas inoculadas. Por tanto el grupo +R será el único que pueda obtener este nutriente. Es en este punto donde se realizó la primera medición, en la que ya se aprecian los cambios (Ver **GRÁFICA 2**). A partir de este punto, las diferencias se incrementan, dando lugar a plantas sanas y plantas raquíticas.



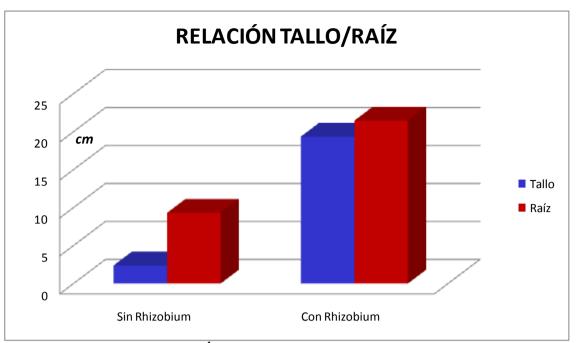
GRÁFICA 2. Crecimiento de la parte aérea.

En el transcurso de la primera a la segunda medición, las plantas que han incorporado nitrógeno a su nutrición presentan un rápido desarrollo. Gracias a la simbiosis, por la cual obtienen este nutriente, la parte aérea ha crecido sin problemas.

Por el contrario, las plantas que no son capaces de incorporar nitrógeno a sus nutrientes, empiezan a sufrir raquitismo, es decir, a penas crecen. A pesar de que algunas aumentan algo su tamaño, otras van muriendo, es por ello por lo que la gráfica comienza a descender a partir de la primera medición.

#### 3. RELACIÓN TALLO/RAÍZ.

En los datos obtenidos de la segunda medida, se ha podido observar una gran diferencia entre la relación tallo/raíz de ambos grupos de control (Ver **GRÁFICA 3**).



GRÁFICA 3. Relación tallo/raíz.

Las plantas inoculadas presentan un equilibrio entre la longitud de la parte aérea y la raíz. Debido a su buena situación en la que se enriquecen con todos los nutrientes necesarios, se desarrollan de igual forma bajo tierra que en el medio externo.

Sin embargo, la alfalfa que no recibe el nitrógeno que necesita, como se ha comentado en el apartado anterior, no va a desarrollar el tallo adecuadamente. Por ello, la planta ve la necesidad de hallar ese nutriente fundamental para su actividad metabólica. Este es el motivo por el cual las raíces del grupo –R muestran esta descompensada longitud en comparación con la parte aérea.



IMAGEN 40. Alfalfa sin Rhizobium.



IMÁGEN 41. Alfalfa inoculada con *Rhizobium*.

Debido a la carencia de nitrógeno, las plantas no inoculadas tienden a extender sus raíces en busca de este nutriente (Ver IMAGEN 40). Por ello, desarrollan sus raíces de forma que ocupen la mayor superficie posible, en este caso se han extendido hacia abajo y por ello presentan una mayor longitud.

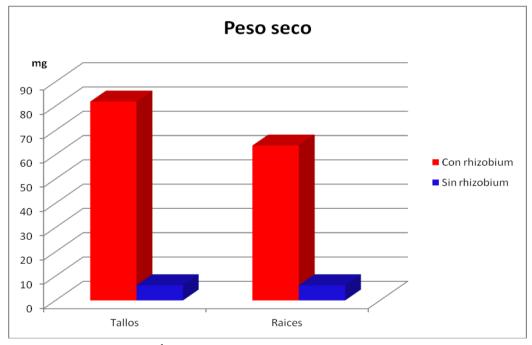
A diferencia de este grupo, las que

establecen la simbiosis no tienen necesidad de extender demasiado sus raíces, por ello se puede observar que se desarrollan muy agrupadas (Ver **IMAGEN 41**). De esta forma, a pesar de que tienen un mayor volumen radicular, su longitud no llama tanto la atención porque está en equilibrio con la del tallo.

#### 4. PESO SECO.

A pesar de las proporciones con respecto a la relación tallo/raíz que se ha comentado en el apartado anterior, se puede observar que, en el caso de las plantas que no han recibido nitrógeno, el peso seco es prácticamente igual (Ver **GRÁFICA 4**). Esto quiere decir que a pesar de la diferencia de longitud, la relación del peso entre la parte aérea y la raíz indica que la masa es prácticamente la misma.

En cambio, en el caso de las plantas inoculadas, si que se puede apreciar cierta diferencia entre el peso seco de la parte aérea y de la raíz. A pesar de que la relación de longitud es proporcionada, con poca diferencia entre raíz y tallo, nuevamente se puede ver que la masa no sigue esa misma relación. En este caso es la parte aérea la que ha pesado más.



**GRÁFICA 4.** Peso seco en raíces y tallos.

#### 5. NÚMERO DE HOJAS.

Al igual que la longitud de la parte aérea, la cantidad de hojas se ve afectada por la carencia de nitrógeno.

Las plantas del grupo –R muestran un número muy bajo de hojas y apenas presencia de capullos (Ver IMAGEN 42). Además estas pocas hojas son de un tamaño pequeño.

Sin embargo, el grupo que fue inoculado muestra un abundante número



IMÁGEN 42. A la derecha plantas inoculadas, a la izquierda plantas sin inocular.

de hojas y de un tamaño adecuado. También hay una gran presencia de capullos, lo que indica que tiene un buen desarrollo puesto que van a crecer nuevas hojas.

#### 6. PIGMENTACIÓN.

En cuanto al color de las plantas, las inoculadas presentan un característico verde intenso que le da la clorofila. Sin embargo, las no inoculadas tienden a ser amarillentas debido a la menor presencia de este pigmento (Ver **IMAGEN 42**), esta falta de color verdoso es conocida como clorosis.



IMÁGEN 43. Planta con carencia de nitrógeno. Presencia de antocianinas.

Este hecho se debe a que el nitrógeno es un elemento esencial en la síntesis de la clorofila, sin el cual, no se puede llevar a cabo. Y por consiguiente perjudica al proceso fotosintético que requiere de clorofila para poder realizarse.

Por otro lado, las plantas que carecen de nitrógeno contienen raíces y tallos más rojizos (Ver IMAGEN 43), esto de se debe a las Antocianinas, unos pigmentos rojos pertenecientes al grupo de fenoles que se sintetizan por rutas de metabolismo "secundario", llamado así por ser característico únicamente de las plantas. En muchas plantas es un pigmento normal que las caracteriza con ese color rojo, pero en este caso, su presencia de debe a la degradación de la clorofila.

#### 7. NÓDULOS.

Únicamente las raíces de las plantas presentan nódulos, esto es fruto de la relación de simbiosis que se ha establecido entre la bacteria y la leguminosa. Los nódulos que se pueden observar (Ver **IMAGEN 44**) son indeterminados puesto que tienen una forma más cilíndrica y tienen meristemos.



IMÁGEN 44. Nódulo determinado.

Otra característica muy importante es el color rosado que poseen que se debe a la presencia de leghemoglobina (Ver **IMAGEN 45**). Esta proteína juega un papel esencial en la fijación del nitrógeno. Para que esta fijación tenga lugar, la bacteria que se encuentra en el nódulo necesita oxígeno para obtener energía, pero a su vez el oxígeno inactiva su nitrogenasa. Ante este problema la leghemoglobina regula la concentración de oxígeno y la

hace apta para que la bacteria pueda realizar su función fijadora.

La leghemoglobina tiene este color debido a la presencia de hierro, elemento importante cuando se habla de transporte de oxígeno. El hecho de que parezca sangre se debe a eso mismo, la sangre también contiene hierro para el transporte de oxígeno. Se podría decir que esta proteína es como la hemoglobina de los animales, pero en plantas.



**IMÁGEN 45.** Leghemoglobina procedente de un nódulo.

Como se puede observar, los nódulos aparecen en la parte superior de la raíz, esto se debe a la razón que se comentaba anteriormente. Al necesitar oxígeno para llevar a cabo la fijación, se desarrollan lo más cerca de este posible, pero sin excederse, ya que eso impediría el funcionamiento de la nitrogenasa de la bacteria.

#### 8. CONCLUSIONES GENERALES.

Las plantas que no son inoculadas con *Rhizobium* no tienen medios para la obtención de nitrógeno. La carencia de este nutriente provoca que no se pueda llevar a cabo la síntesis de clorofila. Y carencia de este pigmento provoca una visible clorosis en la planta y por consiguiente la aparición de pigmentos de antocianinas. Sin poder sintetizar clorofila, la planta no puede realizar la fotosíntesis, por tanto no puede obtener energía del sol. Esto lleva a que se produzca un raquitismo y un número bajo de hojas, signo de un mal desarrollo. La planta intenta obtener el nitrógeno, por lo que expande la raíz, pero al no hallarlo acaba muriendo.

Por otro lado, las plantas que son inoculadas establecen una relación de simbiosis con la bacteria. Ante esta simbiosis se forman los nódulos indeterminados en el cuello de la raíz donde se alberga *Rhizobium*. Estos nódulos se presentan rojizos debido a la presencia de leghemoglobina que regula la concentración de oxígeno del nódulo para que sea ideal para la bacteria. Una vez que la bacteria tiene las condiciones ideales, puede comenzar a fijar nitrógeno atmosférico. De esta forma, la planta recibe el nitrógeno necesario para realizar un correcto desarrollo tanto a nivel radicular como a nivel de tallo y hojas.

# XI. SOLUCIONES

A raíz de los resultados obtenidos en los experimentos, se ha podido observar como las plantas que establecieron una simbiosis con Rhizobium se han desarrollado sin dificultades ante la carencia de nitrógeno en la tierra, obteniéndolo con ayuda de esta bacteria. Del mismo modo, se han observado los efectos que tiene la falta de este elemento en ellas, degradándolas hasta que mueren.

Las conclusiones obtenidas mediante el estudio indican la gran importancia de este nutriente en la alimentación de las plantas, sin el cual, no pueden llevar a cabo un buen desarrollo. Este es un hecho conocido por botánicos y agricultores, y por ello se suele recurrir a fertilizantes ante suelos pobres de nitrógeno. Pero existe otra gran alternativa, el uso de estas bacterias fijadoras de nitrógeno en grandes cultivos.

#### 1. INCONVENIENTES DE LOS FERTILIZANTES QUÍMICOS.

Además, en las últimas décadas, la necesidad de aumentar la producción de alimentos ha llevado a políticas de desarrollo agrícola que promueven el uso de aportes externos en



IMÁGEN 46. Fertilizando una plantación.

reemplazo de los recursos y procesos naturales de control. Por ejemplo, los fertilizantes inorgánicos, que sustituyeron al estiércol, el abono vegetal y la fijación biológica de nitrógeno.

Este reemplazo introdujo problemas en los seres humanos que a menudo se obvian, pero que existen como es la intoxicación y envenenamiento por los residuos de fertilizantes químicos en los alimentos. Así

mismo pueden producir enfermedades como malformaciones genéticas, anomalías reproductivas, problemas respiratorios, daños al hígado, trastornos endocrinos, problemas neurológicos...

Muchos de los abonos químicos contienen sales minerales fácilmente solubles como los aminoácidos libres, que el estómago humano digiere con dificultad, ácido oxálico y solanina y, en especial, nitratos procedentes del abono nitrogenado. El exceso de nitrato se transforma en nitrito a través de la saliva y de los jugos gástricos. Y el nitrito se combina con las aminas para formar la nitrosamina, que es una sustancia cancerígena para el ser humano.

En cuanto a la parte ambiental, los fertilizantes químicos son uno de los principales causantes del deterioro del ecosistema, pues acarrean consecuencias tales como:

- Daños en las mismas plantaciones si se aplican en cantidades excesivas.
- Pérdida de los nutrientes de los alimentos.
- La erosión de suelos.
- Empobrecimiento del suelo, provocando la disminución de su capacidad natural de absorción y retención de agua.



IMÁGEN 47. Eutrofización del agua.

- Estragos en la fauna cercana a las plantaciones, exterminio de insectos que pueden servir como alimento para otras especies.
- Transporte a los ríos de excesos de nutrientes como el fósforo, el nitrógeno y el potasio, que terminan produciendo eutrofización.
- Contaminación de los acuíferos y las corrientes de agua, llegando a los océanos donde se ha detectado restos de fertilizantes incluso en las focas del Antártico.
- Generación de lluvias ácidas.

#### 2. BENEFICIOS DE LOS BIOFERTILIZANTES.

Estas bacterias fijadoras de nitrógeno pueden ser utilizadas en remplazo de los fertilizantes nitrogenados para incrementar el crecimiento de las leguminosas, acabando con los problemas ambientales que se han venido causando, así como los estragos en la salud de los consumidores de dichos productos, tanto como a los agricultores que pueden dañar su salud mediante la inhalación de los abonos químicos.

#### 2.1. Económicamente.

Sería muy conveniente utilizar este método de inoculación de *Rhizobium*, con el fin de garantizar un mejor desarrollo de las plantaciones. Las empresas agricultoras, además de ahorrar en abonos, no se sentirían en la necesidad de analizar la tierra antes de plantar en busca de nitrógeno, y este no es más que un ejemplo de las diversas posibilidades que se encuentran dentro del mundo de las simbiosis.

Desde el punto de vista económico y social, las empresas requerirían de menos efectivos a la hora de potenciar sus cultivos, ya que inocular toda una plantación podría hacerse mediante el sistema de riego. Así mismo, desaparecería la necesidad de abonar el cultivo periódicamente, puesto que las bacterias, una vez que establecen la simbiosis con la planta ya la empiezan a abastecer con este elemento.

En definitiva, el uso de *Rhizobium* en los cultivos proporcionaría seguridad a las empresas dedicadas a la agricultura, utilizando métodos naturales a su vez. El costo económico que padecería la empresa seria prácticamente nulo y obtendrían mayores beneficios al librarse de los abonos.



IMÁGEN 48. Plantación de frijoles inoculada con Rhizobium.

**Rhizobium** debería convertirse en una técnica más común para plantar en tierras pobres o escasas en algún tipo de elemento, permitiendo comprar tierras más baratas o sin utilidad debido a dicha carencia, haciendo que las empresas obtengan mayores beneficios desde cualquier punto de vista.

#### 2.2. Biológicamente.

La gran experiencia acumulada durante décadas, ha demostrado que estas bacterias son inofensivas para las plantas, los animales y el hombre, por lo que resultan muy atractivas para su uso en biofertilización.

A diferencia de los fertilizantes nitrogenados, estas bacterias establecen relaciones de simbiosis naturales entre seres vivos. No se produce ninguna clase de alteración ni inclusión de productos externos. Así mismo, no contamina el medio ambiente, puesto que son organismos naturales. Y al no ser patógenas, no suponen ningún riesgo para el ser humano.

#### 2.3. Cosechas de productos naturales.

A raíz del uso de estos biofertilizantes, se lograrían cosechas de productos naturales, sin ningún tipo de residuo químico. Gracias a estos fertilizantes naturales se obtendrían muy buenas cosechas sin la necesidad de recurrir a productos externos que podrían causar daños.

#### 2.4. Diversa funcionalidad de Rhizobium.

De todos estos mecanismos, en los *Rhizobium*, hasta hace muy pocos años, solo se valoraba la capacidad para fijar nitrógeno en simbiosis con leguminosas y por ello, fueron utilizados durante varias décadas como inoculantes. Pero gracias a diversos estudios, hoy en día se sabe que pueden beneficiar a otro tipo de plantas.

Recientemente ha salido algún estudio que indica que estas bacterias pueden beneficiar al desarrollo y crecimiento de hortícolas. Para ello estas bacterias deberían ser incluidas en simbiosis con una leguminosa puesto que las bacterias de vida libre no ejercen ningún tipo de efecto sobre las plantaciones. De esta forma las plantas hortícolas también se podrían beneficiar de esta bacteria, aun que de una forma más pasiva.

Actualmente se está trabajando en este amplio campo de investigación. De momento se conoce que estas bacterias no solo son beneficiosas como fijadoras de nitrógeno en leguminosas, sino que pueden desempeñar diversas funciones en beneficio de diferentes plantas.

#### 3. MECANISMO DE BIOCONTROL.

Otra de las aplicaciones que pueden tener estas bacterias es la de mecanismo de biocontrol. Los métodos de control biológico de plagas y enfermedades buscan proteger a las plantas mediante el uso de microorganismos que compitan por los nutrientes con los patógenos o directamente otorguen resistencia a las plantas, por ejemplo al producir antibióticos.

Además, estos microorganismos son capaces de sintetizar sustancias fungistáticas que, al inhibir el crecimiento de los hongos del suelo que afectan a las plantas, promueven indirectamente el desarrollo de las plantas, especialmente en las etapas tempranas del cultivo.

#### 4. AGRICULTURA SOSTENIBLE.



IMÁGEN 49. Agricultura sostenible.

Precisamente, la reducción de agroquímicos es uno de los objetivos de la agricultura sostenible que persigue una mayor seguridad en los productos agroalimentarios. La sustitución de fertilizantes químicos por fertilizantes biológicos es por lo tanto un desafío para mejorar la calidad de los cultivos reduciendo

el aporte de compuestos potencialmente peligrosos para el medio ambiente y la salud humana.

Actualmente se manifiesta una tendencia a favor del ambiente en cuanto a la reducción del uso de fertilizantes químicos y plaguicidas en general, y una mayor sensibilización social sobre el potencial riesgo de su empleo. Esto ha abierto nuevas perspectivas en el empleo de productos biológicos.

#### 5. DESARROLLO DE CEPAS MÁS EFICIENTES.

Debido a la reducción del uso de fertilizantes químicos, se busca desarrollar bacterias fijadoras más eficientes y competitivas. Esta optimización, daría un gran empujón a este mundo de los biofertilizantes.

También se investiga sobre la obtención de cepas bacterianas con genes capaces de mejorar las limitaciones que presenta el proceso de simbiosis y de fijación de nitrógeno, así como conseguir que mediante algún tipo de nódulos, se establezcan relaciones con diferentes tipos de plantas.

## XII. ANEXOS

### **ANEXO I: MATERIALES**

Para llevar a cabo este proyecto de investigación, se han utilizado una serie de herramientas y materiales diferentes.

- Agua desionizada
- Agua destilada
- Aro de siembra
- Asa de Henle
- Autoclave
- Balanza de precisión
- Bidón 5L
- Bisturí
- Bolsa de plástico negra
- Campana de flujo laminar
- Cinta adhesiva
- Embudo
- Espátulas
- Estufa
- Gasas
- Hipoclorito sódico al 10%
- Incubadora
- Macetas 2L
- Mechero de alcohol
- Metro
- Papel de filtro
- Perlita
- Pinzas
- Pipeta graduada
- Placas Petri
- Sacarosa al 2%
- Sinorhizbium meliloti/cepa 102F78

# ANEXO II: MEDIO DE CULTIMO Y.E.M.A.

# MEDIO DE CULTIVO Y.E.M.A (YEAST EXTRACT MANNITOL AGAR), COMPOSICIÓN

| $K_2HPO_4$                           | 0,5 g/l      |
|--------------------------------------|--------------|
| Mg SO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O | 0,2 g/l      |
| NaCl                                 | 0,1 g/l      |
| Manitol                              | 10 g/l       |
| Extracto de levadura                 | 0,4 g/l      |
| Agar                                 | 15 g/l       |
| H <sub>2</sub> O                     | Hasta 1litro |

### ANEXO III: SOLUCIÓN NUTRITIVA.

#### SOLUCIÓN NUTRITIVA EVANS (SIN NITRÓGENO).

Solución concentrada para 250 litros de solución de riego.

| C16   | $\mathrm{Cl}_2Ca$                   | 14 g/l     |
|-------|-------------------------------------|------------|
| F14   | PO <sub>4</sub> HK <sub>2</sub>     | 36,25 g/l  |
| S-23  | K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>      | 69,75 g/l  |
| F19   | KH <sub>4</sub> PO                  | 5,57 g/l   |
| S18   | MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> 0 | 123,25 g/l |
| S-3-A | Sequestrene                         | 4,25 g/l   |

Para preparar la solución de riego tomar la cantidad correspondiente de cada una de las soluciones concentradas y añadir 1 ml de solución de micronutrientes + 1,033g de Ca SO<sub>4</sub> producto sólido (S-11) por litro de solución de riego.

#### 1. SOLUCIÓN DE MICRONUTRIENTES.

Para preparar 1 litro de solución concentrada. Se enrasa con agua destilada, hasta 1 litro.

| A8   | BO <sub>3</sub> H <sub>3</sub>                     | 1,43 g/l |
|------|--|----------|
| S19  | SO <sub>4</sub> MnH <sub>2</sub> O                 | 0,77 g/l |
| S26  | SO <sub>4</sub> Zn7H <sub>2</sub> O                | 0,22 g/l |
| S12  | SO <sub>4</sub> Cu5H <sub>2</sub> O                | 0,08 g/l |
| C18  | Cl <sub>2</sub> Co6H <sub>2</sub> O                | 0,12 g/l |
| M6 1 | MoO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> 0 | 0,05 g/l |

# ANEXO IV: TABLAS DE RECOGIDA DE DATOS.

| Lo | Longitud parte aérea -R |  |  |    |     | ngitud | parte a | aérea + | -R |
|----|-------------------------|--|--|----|-----|--------|---------|---------|----|
|    |                         |  |  |    |     |        |         |         |    |
|    |                         |  |  |    |     |        |         |         |    |
|    |                         |  |  |    |     |        |         |         |    |
|    |                         |  |  |    |     |        |         |         |    |
|    |                         |  |  |    |     |        |         |         |    |
| ME | MEDIA                   |  |  | ME | DIA |        |         |         |    |

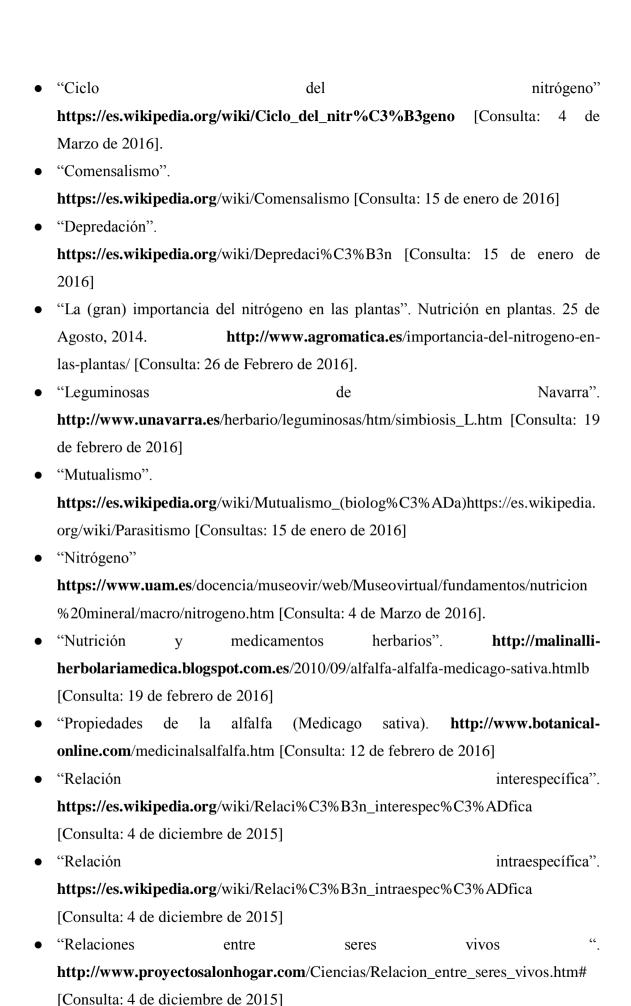
|    | Longitud raíz -R |  |  |  |    | Longi | tud raí | z+R |  |
|----|------------------|--|--|--|----|-------|---------|-----|--|
|    |                  |  |  |  |    |       |         |     |  |
|    |                  |  |  |  |    |       |         |     |  |
|    |                  |  |  |  |    |       |         |     |  |
|    |                  |  |  |  |    |       |         |     |  |
|    |                  |  |  |  |    |       |         |     |  |
| M] | MEDIA            |  |  |  | ME | DIA   |         |     |  |

|    | Peso seco +R     |  |  |  |    |     |  |  |  |  |  |  |
|----|------------------|--|--|--|----|-----|--|--|--|--|--|--|
|    | Raíz Parte aérea |  |  |  |    |     |  |  |  |  |  |  |
|    |                  |  |  |  |    |     |  |  |  |  |  |  |
|    |                  |  |  |  |    |     |  |  |  |  |  |  |
|    |                  |  |  |  |    |     |  |  |  |  |  |  |
|    |                  |  |  |  |    |     |  |  |  |  |  |  |
| MI | EDIA             |  |  |  | ME | DIA |  |  |  |  |  |  |

| Peso seco -R |  |  |  |             |  |  |  |  |  |
|--------------|--|--|--|-------------|--|--|--|--|--|
| Raíz         |  |  |  | Parte aérea |  |  |  |  |  |
|              |  |  |  |             |  |  |  |  |  |
|              |  |  |  |             |  |  |  |  |  |
|              |  |  |  |             |  |  |  |  |  |
|              |  |  |  |             |  |  |  |  |  |
| MEDIA        |  |  |  | MEDIA       |  |  |  |  |  |

| Número de hojas -R |  |  |  | Número de hojas +R |       |  |  |  |  |
|--------------------|--|--|--|--------------------|-------|--|--|--|--|
|                    |  |  |  |                    |       |  |  |  |  |
|                    |  |  |  |                    |       |  |  |  |  |
|                    |  |  |  |                    |       |  |  |  |  |
|                    |  |  |  |                    |       |  |  |  |  |
|                    |  |  |  |                    |       |  |  |  |  |
| MEDIA              |  |  |  |                    | MEDIA |  |  |  |  |

# XIII. BIBLIOGRAFÍA



"Rhizobium".
 https://es.wikipedia.org/wiki/Rhizobium [Consulta: 5 de febrero de 2016]

enero de 2016]

- "Simbiosis de los hongos. Líquenes y micorrizas".
   http://www.asturnatura.com/articulos/hongos/liquenes-micorrizas.php [Consulta: 29 de enero de 2016]
- "Simbiosis".
   https://es.wikipedia.org/wiki/Simbiosis#Tipos\_de\_simbiosis [Consulta: 22
- AZCON-BIETO J. y TALON M. (2000). Fundamentos de Fisiología Vegetal. Editorial McGraw-Hill Interamericana y Edicions Universitat de Barcelona.
- BOLAÑOS, Luis; BONILLA, Ildefonso; REDONDO-NIETO, Miguel. "Fijación biológica del nitrógeno".
   https://www.uam.es/personal\_pdi/ciencias/bolarios/Investigacion/fijacionN.htm
   [Consulta: 26 de febrero de 2016]
- DIAZ DE LA GUARDIA M. (2010). Fisiología de las plantas, 2ª edición. Grupo Editorial Universitario.
- Dr. Orlando Popoff. Instituto de Botánica del Nordeste, Argentina. "Reino fungi: Micorrizas".
  - http://www.biologia.edu.ar/fuas.htm [Consulta: 29 de enero de 2016]
- MENÉNDEZ VALDERREY, Juan Luis. "Medicago sativa L". Asturnatura.com 03/06/2012.
  - http://www.asturnatura.com/especie/medicago-sativa.html [Consulta: 5 de febrero de 2016]
- PAULSRUD, Bruce; SCHUSTER, James. "Clorosis". Universidad de Illinois en Urbana-Champaign.
  - http://extension.illinois.edu/focus\_sp/chlorosis.cfm [Consulta: 4 de Marzo de 2016].
- SALAS, María Eugenia. "La simbiosis fijadora de nitrógeno Sinorhizobium meliloti-alfalfa: aproximaciones ómicas aplicadas a la identificación y caracterización de determinantes genéticos del rizobio asociados a la colonización temprana de la raíz de alfalfa (Medicago sativa)". 2 de Julio de 2015.
   http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/46558 [Consulta: 26 de febrero de 2016]
- STAINER, R. et al. (1992). "Simbiosis". Capítulo 28. *Microbiología*. Editorial Reverté.

# XIV. AUTORES

#### 1. ALUMNADO

BELOKI PALACIOS, Maria. BERGÉS FALQUE, Xabi. FERNÁNDEZ PUJÓ, Wendy.

#### 2. COORDINADORES

GOICOECHEA, Nieves.
LIZARAZU HERNANDO, Juan Carlos.