REPORTE

Influencia del medio de cultivo y los rizobios en la nodulación de la soya y el frijol

✍ María C Nápoles[1], Daymy Costales[1], Jorge Corbera[1], Belkis Morales[1], Juan C Cabrera[1], Ines Reynaldo[1], Omar Cartaya[1], Mario Varela[1], Germán Hernández[2], Eduardo Bordallo[3], Raúl Hernández[3], Josefa Hormanza[4], Armando Rodríguez[5]

[1]Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA)
Carretera a Tapaste Km 3 1/2, San José de las Lajas, CP 32700, Gaveta Postal No. 1, La Habana, Cuba
[2]Instituto de Suelos
[3]Unión Investigación-Producción (UIP) Cuba 9
[4] Instituto Cubano de Investigaciones del Azúcar (ICINAZ)
[5]Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB)

RESUMEN

La inoculación de rizobios a las leguminosas no siempre resulta exitosa, se pueden obtener bajos rendimientos del cultivo debido a la carencia de nitrógeno. La producción de factores de nodulación por la bacteria constituye una clave esencial en el éxito de esta simbiosis. En este sentido, se realizaron varios experimentos con el objetivo de ahondar en el efecto inductor de diferentes compuestos y medios de cultivo sobre la nodulación y el desarrollo de cultivos como la soya y el frijol. Mediante experimentos de quimiotaxis, nodulación y cromatografías se demostró el poder inductor de la semilla de soya molinada y la melaza sobre los factores de nodulación de *Bradyrhizobium* y *Rhizobium*. Se diseñó un nuevo medio de cultivo con estos compuestos en su formulación, lo cual permitió obtener una elevada multiplicación celular, un incremento en la síntesis de factores Nod y un inóculo con alta capacidad de nodulación sobre diferentes variedades de soya y frijol. Los experimentos de campo permitieron validar la superioridad del nuevo medio de cultivo para diferentes variedades de la soya. Se reclasificó, además, la cepa ICA 8001 como cepa insigne de los inóculos para este cultivo en Cuba, según la nueva taxonomía propuesta para *Bradyrhizobium sp*. y se determinó el perfil de factores de nodulación producidos por esta cepa. Se demostró que este perfil depende del medio de cultivo, por lo cual se propone modular algunas señales moleculares relacionadas con la nodulación en beneficio de la interacción *Rhizobium-leguminosa*.

Palabras claves: nodulación, inducción, medio de cultivo, soya, frijol

*I*ntroducción

El uso de las leguminosas como fuente de fibras y alimento se incrementa cada vez más. El uso de estas plantas asociadas con organismos fijadores de nitrógeno en la agricultura está cambiando la percepción que se tiene acerca de ellas y su importancia en los sistemas sostenibles [1]. Su empleo en la fitorremediación, la generación de energía eléctrica, así como en la elaboración de productos industriales, farmacéuticos y naturales, entre otros, puede incrementar sustancialmente la presencia de estas especies en la biosfera y la diversidad en los sistemas de cultivo.

La energía proveniente de la biomasa vegetal no contamina el ambiente, pues la producción de cenizas, materiales alcalinos, monóxido de carbono y óxidos de nitrógeno es menos que con el empleo de cualquier otra tecnología energética [2].

Las rizobiáceas (*Rhizobiaceae*), familia de bacterias que habitan el suelo, no pueden fijar el nitrógeno del aire de manera independiente sino asociadas con las leguminosas, proceso simbiótico en el que ambos participantes se benefician. Este fenómeno es la consecuencia de complejas interacciones (señales) moleculares planta-microorganismo, en las cuales ambos simbiones determinan el resultado final. La interacción de ambos organismos es de gran importancia en la agricultura, pues incrementa notablemente el nitrógeno combinado en los suelos. Debido a que frecuentemente este elemento no está presente en los suelos sin fertilizar, se estudian aquellas leguminosas noduladas que poseen ventajas selectivas en estas condiciones y pueden crecer bien en áreas donde otras plantas no pueden hacerlo.

A pesar de que se han logrado considerables avances en el conocimiento molecular y bioquímico de la fijación simbiótica del nitrógeno, estos no han alcanzado el desarrollo esperado. Mucho queda por investigar en pos de una agricultura eficiente y sostenible. La inoculación rizobios a las leguminosas no siempre resulta exitosa, pues la carencia de nitrógeno influye en la obtención de cultivos con muy bajo rendimiento. Numerosos factores determinan el resultado de la interacción, pero la producción de factores de nodulación (lipoquitinoligosacáridos) constituye quizás la clave del éxito de esta simbiosis [3].

Si bien se conoce la función que pueden desempeñar los medios de cultivo en la obtención de biopreparados y cómo es posible modificar la expresión genética de un microorganismo en dependencia de la composición de aquellos, nada se ha publicado acerca de su efecto sobre la síntesis de los factores de nodulación como moléculas clave en esta simbiosis. Hasta el presente los medios de cultivo para inocular leguminosas solo han tenido la finalidad de producir biomasa bacteriana y no de explotar la capacidad fisiológica de la célula para producir estas biomoléculas.

Por la importancia de estos cultivos, así como la necesidad de medios de cultivo que garanticen biopreparados de máxima calidad, esta investigación

1. Vance CP. Legume symbiotic nitrogen fixation: agronomic aspects: In: Spaink HP, *et al*. (Eds.). The Rhizobiaceae. Kluwer Academic Publishers 1998, Dordrecht: 509-30.

2. De Long MM, Oelka EA, Onischak M, Schmid MR, Wiant BC. Sustainable biomass energy production and rural economic development using alfalfa as a feedstock, in Proc. Second Biomass Conf. Americas 1995:1582-92, National Renewable Energy Laboratory, Department of Energy, Publication NREL/CP-200-8098.

3. Hadri AE, Bisseling T. Responses of the plant to Nod factors. The *Rhizobiaceae*, molecular biology of model plant-associated bacteria. Spaink HP, Kondorosi A, Hooykaas PJJ, eds. Kluwer academic Publishers 1998, Dordrecht:1102-56

✍ Autor de correspondencia

se realiza con el objetivo de demostrar la posibilidad de modular las señales moleculares que intervienen en esta simbiosis para lograr mejores resultados en la interacción, así como evaluar la capacidad de inducción de algunos compuestos de fácil obtención, lo que permitiría obtener medios de cultivo más económicos y eficientes.

Materiales y métodos

Se determinaron las características culturales, morfológicas y tintoriales de la cepa *Bradyrhizobium japonicum* (*B. japonicum*) ICA 8001 mediante microscopía estereoscópica y óptica según su crecimiento en un medio de cultivo YEM sólido a 30 ºC después de 7 días, pH 6.8, así como la característica de modificación del pH del entorno en este mismo medio de cultivo con 0.5% de indicador bromocresol púrpura en hidróxido de sodio (0.016 N), a pH 5.5. El ácido desoxirribonucleico (ADN) de las cepas estudiadas se amplificó por la reacción en cadena de la polimerasa (RCP), con el empleo de los cebadores fD1 (5´-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3´) y rD1 (5´AAGCTTAAGGAGGTCATCCAGCC-3´), diseñados por Weisburg y cols. [4]. Los resultados de la RCP se centraron en las enzimas de restricción DdeI, MspI, Sau3AI, HinfI, RsaI y HhaI, y se visualizaron en geles de agarosa al 3%, con el empleo de un marcador (ladder) de 1 kb (100 pb por banda) (Pharmacy Biotech). Para la comparación se emplearon como patrones las cepas B. japonicum USDA 110, *Bradyrhizobium elkanii* (*B. elkanii*) USDA 76 y *Bradyrhizobium sp*. (cepas 90 y 70 de Lupinus).

El ensayo de quimiotaxis se realizó según Nápoles, María C Gutiérrez y Varela [5], con la modificación de que las células se colectaron en la fase log y se diluyeron en la solución amortiguadora HEPES hasta 2.5 x 106 UFC.mL-1 para facilitar el recuento en los capilares. El porcentaje de células atraídas se estimó con respecto al total de células en el ensayo.

Se estudió el perfil de factores de nodulación producidos y excretados por la cepa *B. japonicum* ICA 8001 en diferentes medios de cultivo y los sustratos de soya molinada y melaza a la concentración de 10 g.L-1 y genisteína 10 µM, añadidos al medio YEM. La soya fue utilizada en las variantes cruda y tratada enzimáticamente. Se utilizó además la genisteína 10 µM como amplificador de la respuesta de inducción en todos los extractos.

Se utilizaron medios de cultivo YEM [6], de propagación [7] y de propagación modificado para estudiar la dinámica de crecimiento de *Bradyrhizobium* con las cepas *B. japonicum* ICA 8001 y *B. elkanii* LMG 6134. Las bacterias se cultivaron a 30 ºC durante 6 días a 230 rpm, y su multiplicación se midió automáticamente cada 30 minutos en un Bioscreen C (Labsystems, Helsinki, Finlandia), a una longitud de onda de 595 nm. Para cada punto se calculó la densidad óptica promedio y se graficaron los valores cada 120 minutos, después de lo cual se calculó la velocidad específica de crecimiento µ (h-1) en la fase lineal del crecimiento exponencial según:

$$\mu = \frac{\ln (DO_2 / DO_1)}{(t_2 - t_1)}$$

Resultados y discusión

En este trabajo, los caracteres morfológicos, culturales y tintoriales, unidos a la capacidad nodular de la soya permitieron corroborar la clasificación de la cepa ICA 8001 dentro del género *Bradyrhizobium*.

El análisis del polimorfismo de los fragmentos de ADN ribosómico 16S, amplificado mediante la PCR, generado por enzimas de restricción, para diferentes cepas de este género, permitió conocer que la cepa ICA 8001 es cercana a *Bradyrhizobium elkanii*, desde el punto de vista taxonómico, a pesar de que había sido clasificada anteriormente como *Bradyrhizobium japonicum*. Se llega a esa conclusión porque esta cepa comparte el 97% de homología con la cepa patrón, *B. elkanii* USDA 76, frente 6 enzimas de restricción empleadas. El 72% de similitud con la especie *B. japonicum* responde a que *B. elkanii* precisamente fue propuesto como nueva especie a partir del grupo II de *B. japonicum* [8], por lo que, lógicamente, deben tener algunas características en común. Los resultados anteriores se confirmaron mediante un dendrograma que separó de la misma forma las cepas anteriores en tres grupos claramente definidos (Tabla 1).

Las concentraciones de ácido ferúlico empleadas resultaron quimioatrayentes para *B. japonicum* ICA 8001 (Tabla 2).

La semilla de soya y la melaza se mostraron como portadores de inductores para varias cepas de *Bradyrhizobium*, los cuales inducen la producción de factores de nodulación (factores Nod) como moléculas esenciales en el éxito de la simbiosis. Es preciso señalar la importancia del efecto de estos

4. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16 S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J Bacteriol 1991;173:697-703.

5. Nápoles MC, Gutiérrez A, Varela M. Quimiotaxis de Bradyrhizobium japonicum ICA 8001 hacia ácidos orgánicos y exudados de semillas de soya. Cultivos Tropicales 1998;19(2):27-9.

6. Vincent JM. A manual for the practical study of root-nodule bacteria/ Vincent JM.- En: International Biological Programme Handbook. No. 15. Blackwele scientific publications 1970, Oxford, England.

7. López M. Manual de Tecnologías de Producción del biofertilizante Bio-Rhizo. La Habana: Empresa Cubana de Productos Veterinarios Cuba-Vet. Instituto de Ciencia Animal, Instituto de Investigaciones Pastos y Forrajes 1990.

8. Bécquer CJ, Prévost D, Cloutier J. Diversidad genética de rizobios, aislados de leguminosas forrajeras de Sancti-Spiritus. Biología 2002;16:130-6.

Tabla 1. Patrones de restricción determinados mediante análisis de PCR-RFLP al ADN de diferentes cepas de *Bradyrhizobium*.

Enzima de restricción	Cepas				
	Tamaño de los fragmentos de restricción (pb)				
	Grupo I	Grupo II	Grupo II	Grupo III	Grupo III
	USDA 110	ICA 8001	USDA 76	Aislado 90	Aislado 70
Dde1	60, 240, 360, 400	60, 120, 240, 360, 400	60, 120, 240, 360, 400	60, 240, 360, 400	60, 240, 360, 400
Msp1	80, 150, 210, 300, 500	50, 80, 110, 150, 210, 300, 500	50, 80, 110, 150, 210, 300, 500	50, 80, 150, 210, 300, 500	50, 80, 150, 210, 300, 500
Sau3A1	60, 80, 180, 210	60, 80, 110, 180, 210, 520	60, 80, 110, 180, 210, 520	60, 180	60, 180
Rsa1	60, 180, 380	60, 180, 510, 600	60, 180, 510, 600	60, 180	60, 180
Hinf1	180, 400, 600	180, 250, 380, 400	50, 180, 250, 380, 400	50, 180, 400, 600	50, 180, 400, 600
Hha1	40, 60, 80, 100, 150, 300, 650	40, 60, 80, 100, 150, 300, 400	60, 80, 100, 150, 300, 400	60, 80, 300, 650	60, 80, 300, 650

Table 2. Quimiotaxis de B. japonicum ICA 8001 hacia diferentes concentraciones de ácido ferúlico.

Concentración de ácido ferúlico	Respuesta quimiotáctica		% de células atraídas
1 mM	1.41	ab	6.32
10 mM	1.85	a	8.32
100 mM	1.30	b	5.84
Esx*	0.06		

compuestos sobre la capacidad de fijación del nitrógeno, por constituir esta la máxima expresión del éxito en la nodulación. El efecto de inducción de ambos compuestos supera, incluso, al ejercido por la genisteína isoflavonoide, la cual se tiene como el más potente inductor de los genes nodulares en *Bradyrhizobium*. San Juan y cols. [9] observaron una mayor producción de factores Nod al inducir la nodulación con extractos de semillas de soya que con la genisteína, en una cepa salvaje de *B. japonicum*. Estos resultados y los de Gagnon e Ibrahim [10] hacen pensar que tanto en la soya como en la melaza coexisten varios elementos con poder de inducción.

El medio de propagación modificado superó marcadamente al medio de propagación con la producción de 8 entes cromatográficos, algunos de ellos en elevada concentración (Figura 1). Este medio produce la mayor parte de los factores Nod mostrados por los restantes inductores por separado, lo que resulta lógico debido a su composición química, en la que están incluidos todos.

El medio propuesto evidenció su superioridad sobre el resto de los medios al permitir una mayor velocidad específica de crecimiento y mayor biomasa, no solo para la cepa B. japonicum ICA 8001, sino también para la cepa LMG 6134 (Figura 2).

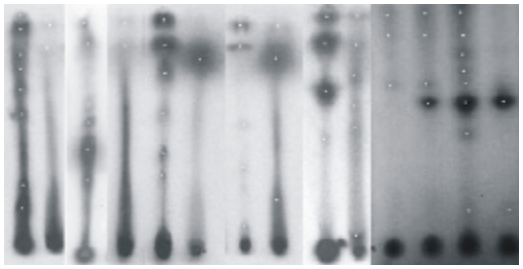
El estudio económico, aunque preliminar, avala la utilización del nuevo medio que, además de superar al medio tradicional en cuanto a la multiplicación celular, producción de factores Nod, nodulación y rendimientos del cultivo, constituye una variante más económica.

Agradecimientos

Al Centro de Genética Microbiana y de las Plantas (CMPG), Universidad de Leuven, Bélgica, y al Centro de Ribotipificación, Universidad Autónoma de México.

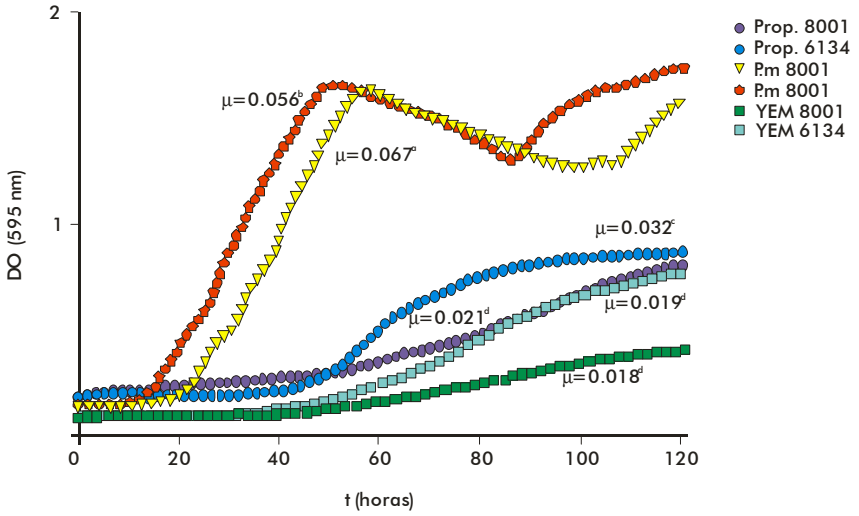
9. San Juan J, Grob P, Göttfert M, Hennecke H, Stacey G. NodW is essential for full expression of the common nodulation genes in *Bradyrhizobium japonicum*. MPMI 1994;7(3):364-9.

10. Gagnon H, Ibrahim RK. Aldonic Acids: A novel family of nod gene inducers of *Mesorhizobium loti*, *Rhizobium lupini*, and *Sinorhizobiom meliloti*. Mol Plant Microbe Interaction 1998;11:988-98.



Leyenda:
-: Extractos sin inducir
+: Extractos inducidos con genisteína 10μ M
YEM: medio Manitol-extracto de levadura
Y+G: medio YEM con genisteína 10 μM
Y+S: medio YEM con frijol de soya molinado a la concentración de 10 g.L^{-1}
Y+S+E: medio YEM con frijol de soya molinado a la concentración de 10 g.L^{-1} y tratado enzimáticamente
Y+M: medio YEM con melaza a la concentración de 10 g.L^{-1}
Propag.: medio propagación
Prop. modif.: medio propagación modificado

Figura 1. Perfil de factores Nod producidos por *B. elkanii* ICA 8001 ante diferentes inductores.



Leyenda:
Prop.: medio propagación
P.m: medio propagación modificado
YEM: medio YEM

Figura 2. Dinamica de crecimiento de las cepas ICA 8001 y LMG 6134 en diferentes medios de cultivo.