

T. 339



DONACION

Don. N.º 1016
Exp. N.º
Inv. N.º 59547

59547

**INFLUENCIA DE LA SALINIDAD
EN EL CRECIMIENTO Y
COMPORTAMIENTO FISIOLÓGICO DE CEPAS
DE *SINORHIZOBIUM MELILOTI***

MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA

SORAYA GABRIELA KIRIACHEK

DIRECTOR: DRA. SUSANA BEATRIZ ROSAS

CODIRECTOR: DRA. ALICIA GRASSANO

JURADO

DRA. ANA LIA RONCHI

DR. NESTOR CORREA

DR. HORACIO TIGIER

2004

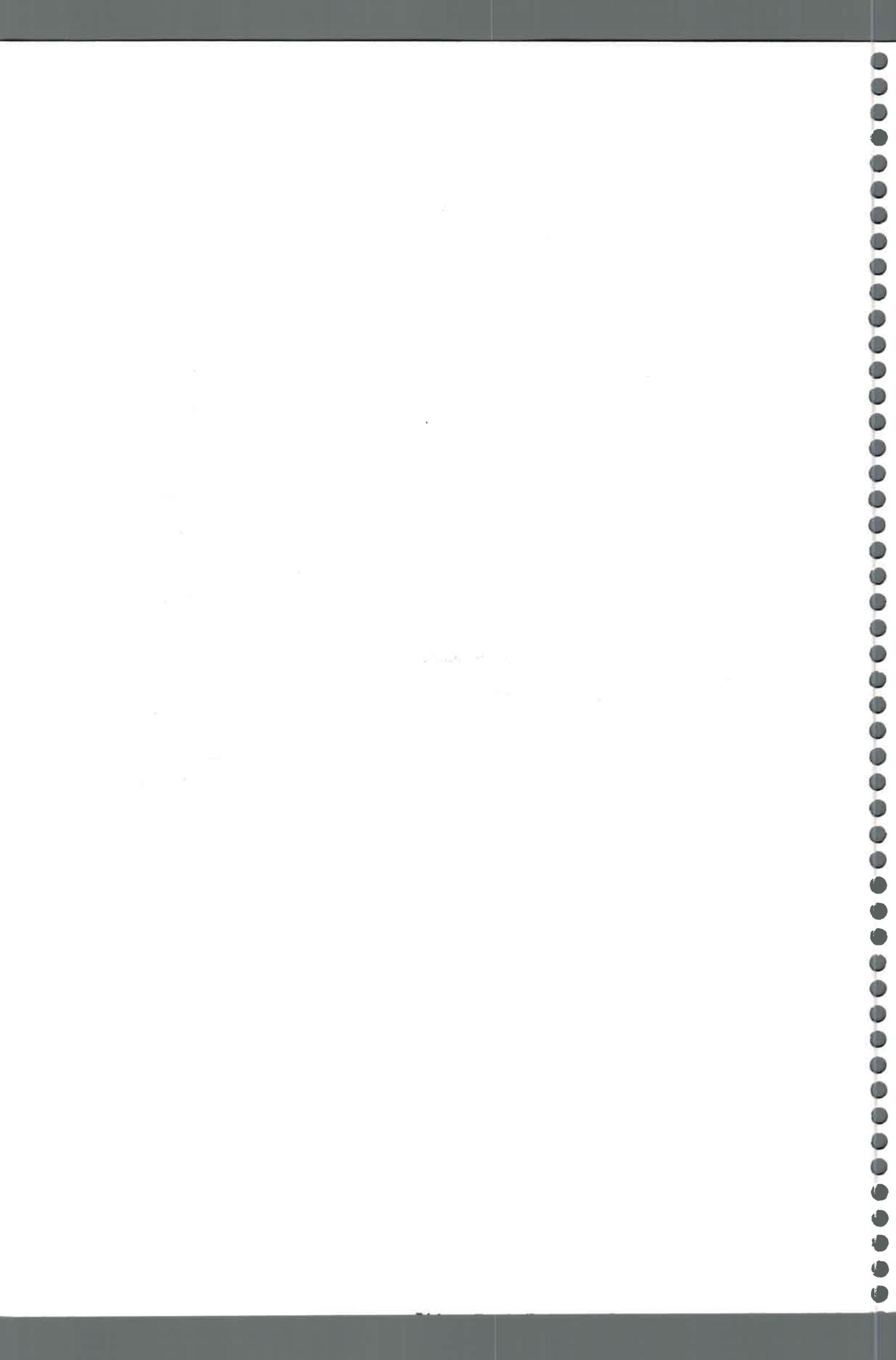
73646

59547



El Presente trabajo para optar por el grado de Magíster en Biotecnología se realizó en el Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de La Pampa. Por eso mi reconocimiento a la Facultad por permitirme utilizar sus equipos e instalaciones.

Mi agradecimiento a la Dra. Alicia Grassano por haber aceptado ser la codirectora de este proyecto y por acompañarme y guiarme en el desarrollo del trabajo. A la Dra. Susana Rosas por haber aceptado ser la directora de este proyecto. A mi familia y amigos por acompañarme en este crecimiento.



**INFLUENCIA DE LA SALINIDAD EN EL CRECIMIENTO Y
COMPORTAMIENTO FISIOLÓGICO DE CEPAS DE *SINORHIZOBIUM*
MELILOTI.**

RESUMEN

Con el objeto de obtener microorganismos simbióticos de alfalfa para su aplicación en zonas semiáridas y áridas, donde la limitante sea la leguminosa, se realizaron estudios con aislamientos de *Sinorhizobium meliloti* de la región semiárida pampeana y de la zona de Río Cuarto. Los microorganismos se hicieron crecer en medios adecuados para *Sinorhizobium meliloti*, pero modificados a tres condiciones de salinidad, 0,5 %, 1,5 % y 2,5 % de NaCl lo que implica una molaridad de 85,5 mM, 256 mM y 427 mM respectivamente, ya informado para otros rizobios. Los mismos se repicaron sucesivamente hasta lograr su resistencia y se probó su crecimiento en los medios líquidos correspondientes, determinando para cada caso su conductividad a fin de correlacionarlos con condiciones de salinidad de suelos. En las condiciones descritas se lograron cuatro aislamientos resistentes, identificados como Lq51r, B399r, RC4r y RC15r. Estos se sometieron a una prueba de infectividad y efectividad, en cámara climatizada, sobre una variedad de alfalfa de uso en la zona (Magnum III) y otra resistente a suelos salinos (salinera INTA). Para concentraciones de 85,5 mM se logró una respuesta aceptable para los cuatro aislamientos. En caso de salinidad de 25,3 mS.cm⁻¹ (256 mM) solo se observó nodulación en los aislamientos denominados RC4r y Lq51r. Para el aislamiento RC4r que mostró una buena respuesta a 427 mM no se pudieron evaluar sus propiedades simbióticas dado que a esos valores de conductividad en el medio Jensen no se desarrolló la leguminosa, ni aún la salinera INTA.

Los cuatro aislamientos que tuvieron respuesta favorable en condiciones de cámara climatizada se probaron en invernáculo, frente a la variedad salinera INTA con suelos que presentan conductividad superior a 10,9 mS.cm⁻¹. Los resultados obtenidos fueron favorables para todos los ensayos realizados.

INDICE

<u>Tema</u>	<u>página</u>
1. <i>Introducción</i>	1
1.1. <i>Sistemas biológicos fijadores de Nitrógeno</i>	3
1.2. <i>La Bacteria</i>	3
1.3. <i>La Nitrogenasa</i>	6
1.4. <i>Ingeniería genética de la fijación de nitrógeno</i>	8
1.5. <i>Establecimiento de la simbiosis</i>	10
1.6. <i>Etapas en la formación de nódulos</i>	15
1.7. <i>Los flavonoides como señales para los microbios de la rizósfera</i>	17
1.8. <i>Sal y estrés osmótico</i>	20
1.9. <i>Estrés salino, estrategias de adaptación de cepas y cepas modificadas para lograr la adaptación a condiciones adversas</i>	23
1.10. <i>Características de suelos salinos</i>	32
1.11. <i>La alfalfa (Medicago Sativa) y las concentraciones salinas limitantes para su desarrollo</i>	34
1.12. <i>Características de la variedad de alfalfa Salinera INTA</i>	35
2. <i>Objetivos</i>	37
3. <i>Materiales y Métodos</i>	38
3.1. <i>Ensayo de efectividad e infectividad en la nodulación con cepas que se aislaron en Río Cuarto (Córdoba), en cámara climatizada</i>	38
3.2. <i>Determinación de peso seco</i>	39
3.3. <i>Determinación del contenido de Nitrógeno total y Proteína bruta (Método KJELDHAL)</i>	40
3.4. <i>Microorganismos seleccionados para su adaptación a estrés salino</i>	40
3.4. <i>Mantenimiento, crecimiento y adaptación</i>	40
3.5. <i>Desarrollo en medio líquido</i>	40
3.6. <i>Medidas de la concentración celular de los inóculos</i>	41
3.6. <i>Ensayo para elegir la variedad de alfalfa a utilizar en los ensayos en cámara climatizada e invernáculo</i>	41
3.7. <i>Esterilización de semillas de alfalfa, siembra y condiciones de crecimiento</i>	42
3.8. <i>Ensayo de efectividad e infectividad en la nodulación con las cepas Lq51, B399, 4, 15 y semilla Salinera INTA en cámara climatizada</i>	42
3.9. <i>Determinación de la salinidad del suelo</i>	43
3.9.1. <i>Pasta saturada de suelo</i>	43
3.9.2. <i>Obtención de los extractos de saturación</i>	43
3.9.3. <i>Determinación de la conductividad</i>	44
3.10. <i>Ensayo de efectividad e infectividad, en invernáculo, con las cepas Lq51, B399, 4 y 15 y semillas de alfalfa Salinera INTA</i>	44
3.11. <i>Determinación de la densidad de población naturalizada y de la obtenida por semilla luego de inoculadas</i>	44
3.12. <i>Fertilización con nitrógeno</i>	45



3.13. <i>Cálculo y manejo del riego en los ensayos con cilindros</i>	45
3.14. <i>Siembra</i>	46
3.14. <i>Cosecha y análisis</i>	47
3.15. <i>Aislamiento de microorganismos a partir de los nódulos</i>	47
3.16. <i>Electroforesis de isoenzimas</i>	47
4. <i>Resultados</i>	49
4.1. <i>Evaluación del desarrollo de las plantas que se inocularon con las cepas de Río Cuarto</i>	49
4.2. <i>Crecimiento de las cepas en medio agarizado</i>	51
4.3. <i>Valores de conductividad de los inóculos</i>	52
4.4. <i>Crecimiento de las cepas en medio líquido (Inóculo)</i>	52
4.5. <i>Valores de conductividad del medio Jensen</i>	61
4.6. <i>Crecimiento de las dos variedades de semillas en las distintas concentraciones</i>	61
4.7. <i>Crecimiento de las cepas Lq51, B399, 4 y 15 en medio líquido y recuento en las distintas concentraciones</i>	64
4.8. <i>Valores de peso seco y nodulación en el ensayo en cámara climatizada</i>	64
4.9. <i>Ensayo de nodulación en cámara climatizada</i>	65
4.10. <i>Conductividad y pH de la muestra de suelo de la zona del Bajo Giuliani</i>	71
4.11. <i>Valores de NMP de los inóculos que se utilizaron en el ensayo de invernáculo</i>	71
4.12. <i>Determinación del contenido de nitrógeno, proteína y peso seco de parte aérea y raíz</i>	71
5. <i>Discusión</i>	75
6. <i>Bibliografía</i>	79



Indice de tablas y figuras

<i>Figura 1. Ciclo del nitrógeno</i>	1
<i>Figura 2. Sistema de la nitrogenasa</i>	7
<i>Tabla 1. Clasificación de los suelos salinos en función de sus valores de conductividad</i>	33
<i>Tabla 2. Medio de cultivo de Sinorhizobium meliloti, concentración de NaCl 1,71 mM, concentración normal</i>	38
<i>Tabla 3. Modificaciones realizadas en la concentración de NaCl para el medio de cultivo de Sinorhizobium meliloti</i>	38
<i>Tabla 4. Medio Jensen</i>	39
<i>Tabla 5. Medio Jensen modificado</i>	42
<i>Tabla 6. Medio TY</i>	47
<i>Tabla 7. Medio TY modificado con el agregado de NaCl</i>	47
<i>Tabla 8. Valores de materia seca, contenido de nitrógeno y proteínas</i>	49
<i>Figura 3. Plantas crecidas en cámara climatizada e inoculadas con cepas, aisladas en Río Cuarto</i>	50
<i>Figura 4. Plantas crecidas en cámara climatizada e inoculadas con la cepa 4, aislada en Río Cuarto</i>	50
<i>Figura 5. Plantas crecidas en cámara climatizada e inoculadas con la cepa 6, aislada en Río Cuarto</i>	51
<i>Figura 6. Plantas crecidas en cámara climatizada e inoculadas con la cepa 15, aislada en Río Cuarto</i>	51
<i>Tabla 9. Valores de conductividad para los medios de cultivo líquidos utilizados</i>	52
<i>Tabla 10. Valores de absorbancia en función del tiempo para las curvas de crecimiento, realizadas por duplicado, de la cepa Lq51 a la concentración de 85,5 mM de NaCl</i>	52
<i>Figura 7. Curva de crecimiento de la cepa Lq51 a la concentración de 85,5 mM de NaCl</i>	53
<i>Figura 8. Gráfica del lnAbs en función del tiempo, realizadas por duplicado, para realizar los cálculos de la velocidad específica de crecimiento y del tiempo de duplicación para la cepa Lq51 a la concentración 85,5 mM</i>	53
<i>Figura 9. Curva de crecimiento de la cepa Lq51 a la concentración de NaCl de 256 mM</i>	54
<i>Figura 10. Curva de crecimiento de la cepa Lq51 a la concentración de NaCl de 427 mM</i>	54
<i>Figura 11. Curva de crecimiento de la cepa Lq42 a la concentración de NaCl de 85,5 mM</i>	54
<i>Figura 12. Curva de crecimiento de la cepa Lq42 a la concentración de NaCl de 256 mM</i>	54
<i>Figura 13. Curva de crecimiento de la cepa Lq42 a la concentración de NaCl de 427 mM</i>	55
<i>Figura 14. Curva de crecimiento de la cepa Lq22 a la concentración de NaCl de 85,5 mM</i>	55
<i>Figura 15. Curva de crecimiento de la cepa Lq22 a la concentración de NaCl de 256 mM</i>	55
<i>Figura 16. Curva de crecimiento de la cepa Lq22 a la concentración de NaCl de 427 mM</i>	55



<i>Figura 17. Curva de crecimiento de la cepa B399 a la concentración de NaCl de 85,5 mM</i>	56
<i>Figura 18. Curva de crecimiento de la cepa B399 a la concentración de NaCl de 256 mM</i>	56
<i>Figura 19. Curva de crecimiento de la cepa B399 a la concentración de NaCl de 427 mM</i>	56
<i>Figura 20. Curva de crecimiento de la cepa 4 a la concentración de NaCl de 85,5 mM</i>	56
<i>Figura 21. Curva de crecimiento de la cepa 4 a la concentración de NaCl de 256 mM</i>	57
<i>Figura 22. Curva de crecimiento de la cepa 4 a la concentración de NaCl de 427 mM</i>	57
<i>Figura 23. Curva de crecimiento de la cepa 6 a la concentración de NaCl de 85,5 mM</i>	57
<i>Figura 24. Curva de crecimiento de la cepa 6 a la concentración de NaCl de 256 mM</i>	57
<i>Figura 25. Curva de crecimiento de la cepa 6 a la concentración de NaCl de 427 mM</i>	58
<i>Figura 26. Curva de crecimiento de la cepa 15 a la concentración de NaCl de 85,5 mM</i>	58
<i>Figura 27. Curva de crecimiento de la cepa 15 a la concentración de NaCl de 256 mM</i>	58
<i>Figura 28. Curva de crecimiento de la cepa 15 a la concentración de NaCl de 427 mM</i>	58
<i>Figura 29. Curva de crecimiento de la cepa 23 a la concentración de NaCl de 85,5 mM</i>	59
<i>Figura 30. Curva de crecimiento de la cepa 23 a la concentración de NaCl de 256 mM</i>	59
<i>Figura 31. Curva de crecimiento de la cepa 23 a la concentración de NaCl de 427 mM</i>	59
<i>Tabla 11. Datos de la velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación, calculados a partir de las curvas de crecimiento obtenidas, en las tres concentraciones para cada cepa</i>	60
<i>Tabla 12. Valores de conductividad para el medio Jensen utilizado</i>	61
<i>Tabla 13. Resultados de crecimiento de las dos variedades de alfalfa en medio Jensen con distintas concentraciones de NaCl</i>	62
<i>Figura 32. Plantas de la variedad de alfalfa Magnum 3, crecidas en cámara climatizada, con una concentración en el medio Jensen de NaCl de 0,5 %, y suplementadas con NO₃K</i>	63
<i>Figura 33. Plantas de la variedad de alfalfa Salinera INTA, crecidas en cámara climatizada, con una concentración en el medio Jensen de NaCl de 0,5 %, y suplementadas con NO₃K</i>	63
<i>Tabla 14. Recuento de colonias en medio agarizado a las 24 horas</i>	64
<i>Figura 34. Valores de materia seca obtenidos en el ensayo en cámara climatizada realizado con las cepas B399r, Lq5r, RC15r y RC4r a concentración normal de NaCl, con 0,5 % de NaCl y 1,5 % de NaCl frente a los testigos</i>	65
<i>Figura 35. Plantas crecidas en cámara climatizada, con una concentración de NaCl en el medio de Jensen de 85,5 mM e inoculadas con la cepa</i>	

<i>B399r</i>	66
<i>Figura 36. Plantas crecidas en cámara climatizada, con una concentración de NaCl en el medio de Jensen de 85,5 mM e inoculadas con la cepa RC15r</i>	66
<i>Figura 37. Plantas crecidas en cámara climatizada, con una concentración de NaCl en el medio de Jensen de 85,5 mM e inoculadas con la cepa Lq51r</i>	67
<i>Figura 38. Plantas crecidas en cámara climatizada, con una concentración de NaCl en el medio de Jensen de 85,5 mM e inoculadas con la cepa RC4r</i>	67
<i>Figura 39. Plantas crecidas en cámara climatizada, con una concentración de NaCl en el medio de Jensen de 256 mM e inoculadas con la cepa RC15r</i>	68
<i>Figura 40. Perfiles isoenzimáticos de α y β esterasas de las cepas Lq51r y RC15r</i>	69
<i>Figura 41. Perfiles isoenzimáticos de α y β esterasas de las cepas B399r y RC4r</i>	70
<i>Tabla 15. Valores de pH de la muestra de suelo de la zona del Bajo Giuliani</i>	71
<i>Tabla 16. Valores de peso seco de la parte aérea, de la raíz, porcentaje de nitrógeno y de proteínas, obtenidos en el ensayo de invernáculo</i>	72
<i>Figura 42. Plantas crecidas en invernáculo con suelo salino e inoculadas con las cepas RC15r, Lq51r, RC4r y B399r</i>	73
<i>Figura 43. Planta inoculada con la cepa RC15 y desarrollo de su sistema radical</i>	73
<i>Figura 44. Raíces noduladas de tres plantas inoculadas con la cepa Lq51r</i>	74
<i>Figura 45. Raíces noduladas de tres plantas inoculadas con la cepa RC15r</i>	74
<i>Figura 46. Nódulos de las raíces de las plantas inoculadas con la cepa B399r.</i>	75



INTRODUCCIÓN

Los cuatro elementos más abundantes en la composición de los vegetales son: carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno. Los tres primeros están disponibles en forma ilimitada para las plantas en la atmósfera y en el suelo como CO_2 , H_2O y O_2 . (Grassano A., 1994).

El nitrógeno gaseoso, N_2 , forma parte del 80 % del volumen del aire que respiramos, pero no puede ser usado directamente por las plantas o animales para sintetizar componentes biológicos esenciales que contienen nitrógeno como los aminoácidos y los nucleótidos. Para ser utilizado se debe convertir, una vez fijado, en amonio. Esta conversión requiere una gran cantidad de energía. La energía para la fijación biológica de nitrógeno proviene de la hidrólisis de una cantidad considerable de adenosina trifosfato (ATP). La conversión a nivel industrial del N_2 a amonio se realiza a valores altos de energía a través de altas temperaturas y presión. (Grassano A., 1994).

Dentro de los ciclos biogeoquímicos de los elementos minerales, el del nitrógeno (Fig. 1) es especialmente complicado por encontrarse, en condiciones naturales, en distintos estados de valencia (de $+5$ a -3) formando compuestos estables. (Olivares Pascual J., 2001).

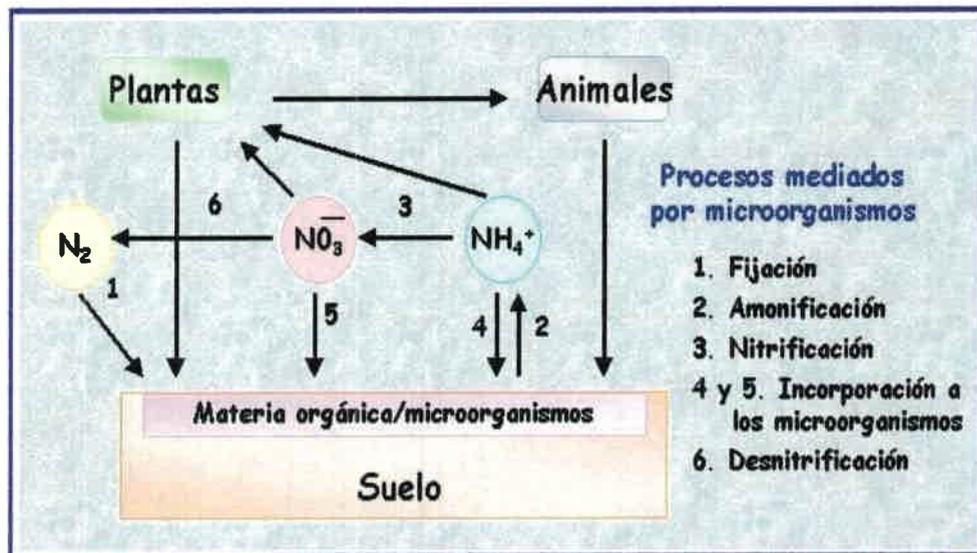


Fig. 1. Ciclo del nitrógeno

Uno de estos compuestos, el nitrato, la forma más usual tomada por la planta, es clave en la nutrición de las plantas y puede hallarse en el suelo derivado del contenido mineral del mismo, de aquel que se pueda incorporar de la atmósfera o de la biotransformación de las moléculas orgánicas que lo contienen formando parte de los restos vegetales y animales que allí llegan o de los propios

microorganismos que lo habitan. La desnitrificación, o reducción del nitrato hasta nitrógeno molecular o dinitrógeno, N_2 , es una actividad microbiana importante. Las pérdidas de nitrógeno asimilable que esta actividad conlleva son compensadas por la llamada fijación de nitrógeno, que se entiende como la oxidación o reducción de este elemento para dar óxidos o amonio. Todos los procesos del ciclo actúan de forma que en condiciones normales las diferentes actividades microbianas están equilibradas y las pérdidas son compensadas por las ganancias. (Pérez S. y Torralba A., 1997).

Más de un millón de toneladas de nitrógeno fijado se necesitan anualmente para la producción de alimentos. (Grassano A., 1994).

Los fertilizantes químicos, sin duda ayudan de manera considerable en el aumento del rendimiento de los cultivos, pero su uso continuo provoca problemas de contaminación y una disminución de las reservas de nutrientes en el suelo. Además su costo va constantemente en aumento. Estos factores dan un incentivo para el desarrollo de fuentes alternativas para la fijación de nitrógeno, incluyendo el desarrollo de microorganismos como “fertilizantes bacterianos”. (Racca R., 2003).

La fijación de nitrógeno puede ser puramente abiótica o biológica. Por la primera se forman óxidos como consecuencia de la combustión de compuestos inorgánicos, descargas eléctricas, etc., que son arrastrados al suelo por la lluvia; o amonio por el proceso industrial Haber Bosch. Por la segunda, la fijación biológica de nitrógeno (FBN), proceso llevado a cabo por organismos procarióticos, el N_2 es reducido a amonio e incorporado a la biosfera.

A pesar de la abundancia de este elemento en la atmósfera, no es aprovechable por las plantas que se ven obligadas a utilizar las formas combinadas que se encuentran en el suelo en cantidad insuficiente para soportar los cultivos intensivos. Por lo que supone el aporte de nitrógeno a la planta, la FBN presenta un gran interés que ha determinado que sea objeto de intensa investigación desde que en 1888 fue descubierta, aunque empíricamente era aprovechada ya por los romanos cuando observaron el efecto beneficioso de la rotación de los cultivos. Hoy día cobra más valor, dentro del contexto de la agricultura sostenible, ya que puede evitar el uso abusivo de fertilizantes nitrogenados con el consiguiente ahorro en el consumo de energía y la disminución de la degradación del ambiente. Desde este punto de vista ecológico, también es interesante la FBN en el mar por la necesidad de nitrógeno asimilable disponible que requieren los océanos para actuar como sumideros del CO_2 de la atmósfera.

La FBN es llevada a cabo por microorganismos procarióticos en vida libre o en simbiosis, esto último si ocurre en asociación mutualista con las plantas. Los fertilizantes sintéticos aportan la mitad del nitrógeno que se necesita, y la mayor parte del resto deriva de la fijación biológica de

nitrógeno, que se realiza por bacterias como el *Rhizobium*, *Frankia*, *Azospirillum*, *Azotobacter* y *Cianobacteria*. (Olivares Pascual J., 2001).

La FBN es un proceso altamente consumidor de energía. El triple enlace que une los dos átomos de nitrógeno es duro de romper. El trabajo es llevado a cabo por la enzima nitrogenasa con el consumo de 16 a 24 moléculas de ATP por N₂ reducido, según la ecuación:



(Schröder E., 1995).

Sistemas biológicos fijadores de Nitrógeno.

Dentro de la fijación biológica, la asociación mutualista *Rhizobium* – leguminosa ha sido, desde siempre, la más estudiada por la importancia de las plantas involucradas desde el punto de vista agronómico, económico y social. La asociación de *Frankia*, un actinomiceto fijador, con plantas leñosas, como aliso o, pertenecientes a diferentes familias tiene un interés más forestal y ecológico. En otras asociaciones no tan estrictas pueden estar implicadas bacterias como *Azospirillum* y *Acetobacter diazotrophicus*. En estos casos, la caña de azúcar y otras plantas de zonas cálidas son los hospedadores mayoritarios pero sin la especificidad característica de las leguminosas. A pesar de que estos microorganismos son fijadores claros en microaerobiosis, todavía no hay una evidencia clara de que esa característica sea la determinante del mayor desarrollo de las plantas infectadas. La producción de sustancias promotoras del crecimiento vegetal (fitohormonas) parece ser, por lo menos en el caso de *Azospirillum*, la causa del efecto beneficioso encontrado cuando se usa como inóculo de la caña de azúcar o maíz. Se puede considerar un grupo PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) que engloba microorganismos que manifiestan la capacidad de producir fitohormonas, sideróforos, compuestos que como el ácido salicílico parecen inducir una resistencia sistémica en la planta contra patógenos, etc y que complementan a los estrictamente fijadores, como *Rhizobium*. Las cianobacterias, algas fijadoras que pueden formar asociaciones muy interesantes con helechos, contribuyen también de forma sustancial al conjunto total del nitrógeno fijado, siendo esta contribución especialmente relevante en ciertos habitats. (Olivares Pascual J., 2001).

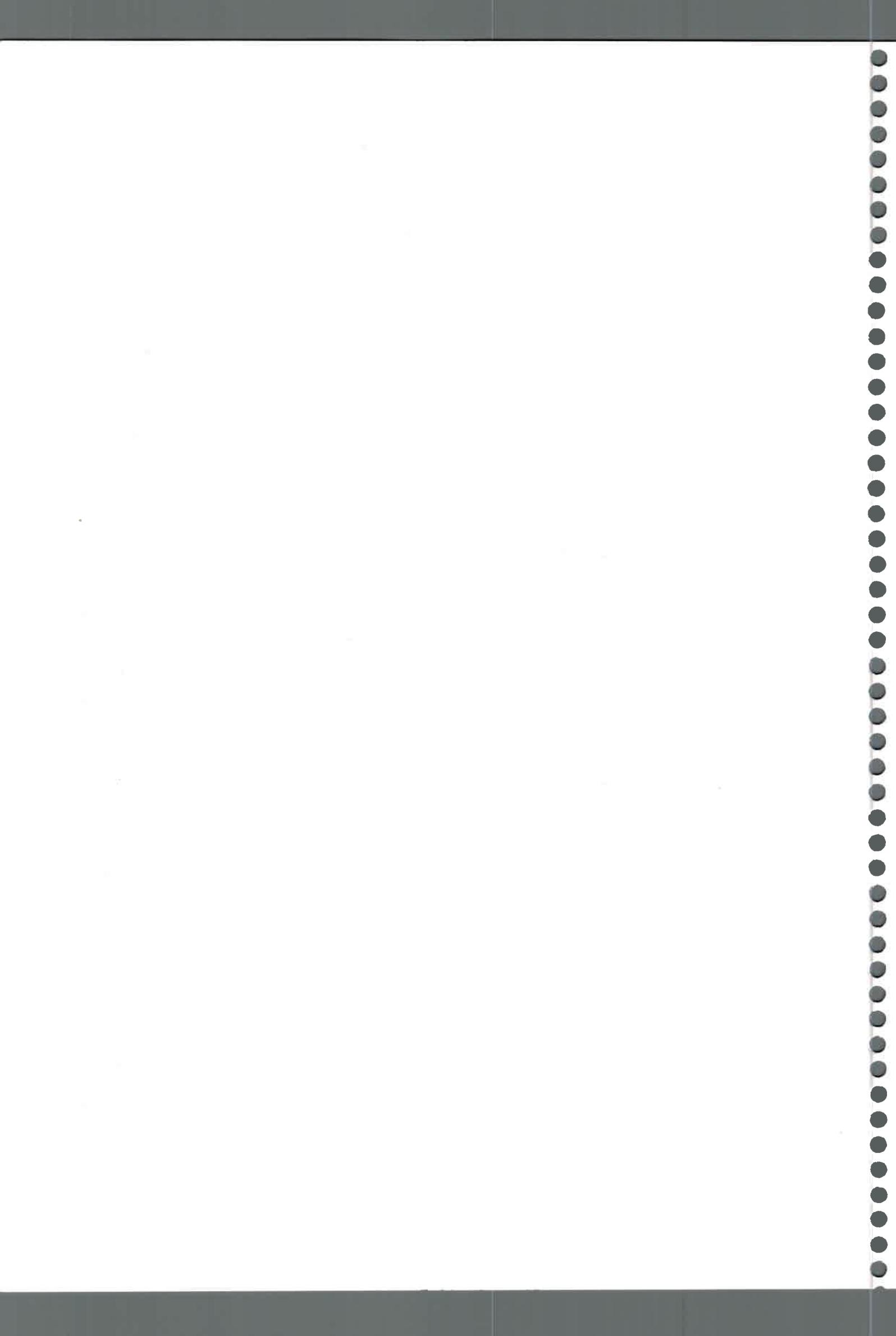
La Bacteria.



Rhizobium es un género de bacterias en forma de bacilos Gram negativos, aerobios, que carecen de esporas y con un tamaño que oscila entre 0,5 a 0,9 x 1,2 a 3 μ . Son móviles cuando jóvenes por flagelos polares, subpolares o peritricos. Se conocen dos tipos de flagelos en bacterias, sencillos y complejos. Mediante microscopio electrónico se observa que los flagelos sencillos son polímeros uniformes de una sola proteína que se auto – arregla en hélices largas, flexibles, levógiras. Bacterias como *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium lupini*, *Bradyrhizobium japonicum*, tienen flagelos complejos. Estos flagelos complejos, son dextrógiros, y las hélices tienen una topografía que incluye aristas y ranuras alternadas. Son más rígidos, más resistentes a la depolimerización térmica, y tienen un contenido más alto de aminoácidos hidrofóbicos que los flagelos complejos que se encuentran normalmente. Se ha establecido que, el flagelo, pierde movilidad cuando el medio carece de cationes divalentes (Ca, Mg). Las células contienen gránulos característicos de beta – hidroxí – butirato polimerizado (PHB). Este polímero se tiñe con colorantes lipofílicos y se puede extraer con cloroformo.

La mayoría de las cepas producen abundantes polisacáridos mucilaginosos extracelulares que van desde una goma acuosa a altamente densa, cuya composición varía con la cepa. Los *Rhizobium* sufren un cambio morfológico dentro de las células del nódulo para formar los “bacteroides”. Estas células son agrandadas, vacuoladas y en algunos casos claramente ramificadas. Difieren también de las células normales por carecer de flagelos y ser incapaces de reproducirse. Los bacteroides están encerrados en membranas de origen vegetal, a veces aislados y a veces en grupo, dependiendo de la especie. Al final de la vida activa del nódulo los bacteroides se desintegran. Desde el punto de vista nutritivo los rizobios son quimiorganótrofos y tienen requerimientos no especificados de carbono. Los requerimientos de nitrógeno no son específicos pero los compuestos amino son mejores fuentes que el nitrato y amonio en medios sintéticos. Algunas cepas requieren factores de crecimiento y aminoácidos para un crecimiento óptimo. También se agregan los principales elementos inorgánicos aún a medios complejos aunque sólo se conocen bien los requerimientos de magnesio, calcio, hierro y cobalto. El extracto de levadura es la fuente más común de nitrógeno y factores de crecimiento usado en los medios de cultivo.

Los rizobios pueden separarse en dos grupos, dependiendo de sus velocidades de crecimiento en agar – levadura – manitol, de crecimiento rápido y de crecimiento lento. Los límites de la curva de crecimiento en medios de cultivos en laboratorio son de 0 ° y 47 ° C y que el rango óptimo es de 25 – 30 ° C. Se han encontrado diferencias en la tolerancia a temperaturas elevadas. *R. meliloti* es la especie más tolerante a temperaturas elevadas (36,5 – 42,5 ° C), *R. leguminosarum* y *R. trifolii* (31 – 38 ° C) son mucho menos tolerantes; los rizobios de crecimiento lento tienen un rango más amplio pero con algunas cepas resistentes (30 – 42 ° C). El pH óptimo de crecimiento se sitúa entre 6,7 y



7.2. La tolerancia a la alcalinidad es del mismo orden para el conjunto de los rizobios, pero tienen diferencias en la sensibilidad a la acidez. Los pH límites para *R. meliloti* y *R. trifolii* son 5,4 y 5,2 respectivamente mientras que *R. lupini* y *R. japonicum* son capaces de crecer a pH 3,2 como límite inferior máximo. (Schröder E, 1995).

Los microorganismos más importantes que se usan ahora en agricultura están relacionados con los géneros, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Bradyrhizobium*. Estas bacterias son gram negativas, flageladas, y con forma de bastón, y forman relaciones simbióticas con las leguminosas. Cada especie de rizobio en mayor o menor medida es específica para un número limitado de plantas y no podrían interactuar con otras que no sean sus huéspedes naturales. (Lindsey K. and Jones M., 1992; Glick B. and Pasternack J. J., 1998).

Sinorhizobium meliloti es una bacteria del suelo, la cual establece simbiosis para fijar nitrógeno con la leguminosa *Medicago sativa*. Trabajos recientes han identificado un par de genes, *sinR* y *sinI*, los cuales representan un sistema potencial de “quorum – sensing” (diálogo entre bacterias) y son responsables de la producción de N-acil homoserina lactonas (AHLs) en dos cepas de *S. meliloti*, Rm1021 y Rm41. Se ha caracterizado el locus de *sinRI* y se mostró que estos genes son responsables para la síntesis de varios AHLs de cadena larga variando de 12 a 18 carbonos de largo. Cuatro de estos, 3-oxotetradecanoil HL, 3-oxohexadecenoil HL, hexadecenoil HL, y octadecanoil HL, tienen estructuras nuevas. Es el primer registro que se tiene de AHLs con cadenas acil más largas que 14 carbonos. Se mostró que la interrupción del *sinI* eliminó estos AHLs y una interrupción de *sinR* resulta en sólo valores basales de AHLs. Además, la misma mutación en *sinI* y *sinR* también conduce a una disminución en el número de nódulos rosados durante los ensayos de nodulación, hay también un pequeño retardo en la aparición de nódulos rosados, indicando el rol para “quórum sensing” en simbiosis. Se ha mostrado también que los mutantes *sinI* y *sinR* son capaces de producir varios AHLs de cadena corta, uno de los cuales fue identificado como octanoil HL. Se cree que estos AHLs de cadenas cortas son evidencias de un segundo sistema de “quorum-sensing” en Rm1021, al cual se lo denomina el sistema mel, para "*S. meliloti*". (Marketon MM, et al; 2002).

Cepas altamente eficientes en la fijación de nitrógeno seleccionadas en el laboratorio con frecuencia fallan en el incremento de la producción de leguminosas en suelos agrícolas conteniendo poblaciones de rizobio autóctonas y adaptadas porque ellas no pueden competir contra esta población para la formación de nódulos. Se ha demostrado, con una cepa mutante de *Sinorhizobium meliloti* PutA⁻, que la actividad de la prolina deshidrogenasa se requiere para colonización y por lo tanto para la eficiencia en la nodulación y la competencia de *S. meliloti* en las raíces de alfalfa.

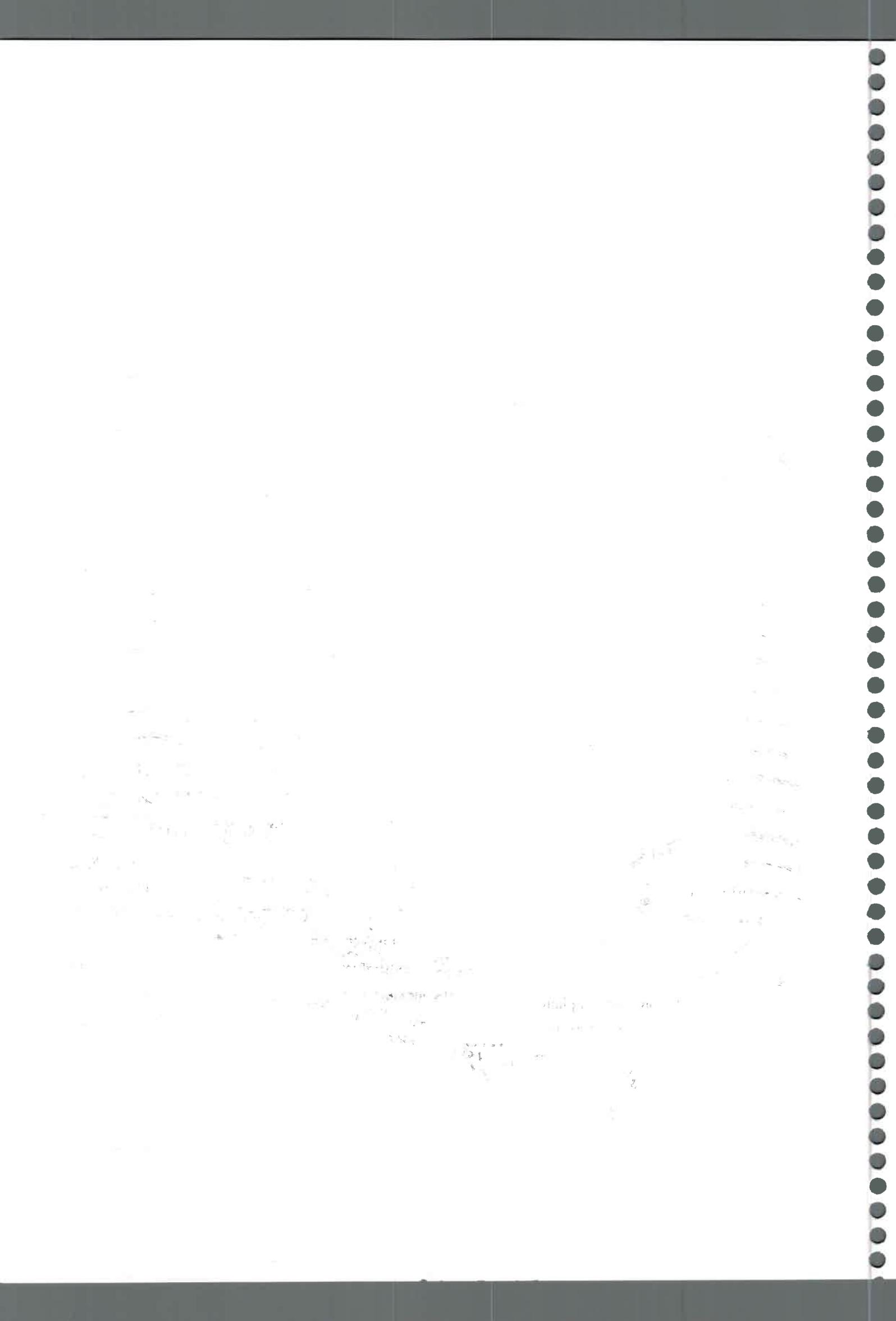
(Jiménez-Zurdo J. I., et al, 1995). Se ha investigado si el gen *putA* puede ser usado para incrementar la competitividad en cepas de *S. meliloti*. Se realizó una construcción en la cual un promotor constitutivo fue reemplazado por 190 nucleótidos corriente arriba del codón de inicio del gen *putA*. Esto resultó en un incremento de la expresión basal de estos genes, este incremento fue también mayor en presencia del sustrato prolina. Se encontró que la presencia de multicopias de plásmidos conteniendo este gen *putA* construido, incrementó la competitividad de *S. meliloti* en experimentos en suelos no estériles sembrados con plantas de alfalfa, sometidos a estrés hídrico sólo durante el primer mes. Se encontró que la frecuencia de ocupancia de nódulos fue mayor con inóculos conteniendo el gen modificado *putA* para muestreos que fueron analizados después de 34 días, pero no para muestras que fueron analizadas más tarde. (van Dillewijn P., et al, 2001).

La nitrogenasa.

El sistema nitrogenásico de la bacteria cataliza la reducción del dinitrógeno (N_2) a amoníaco, en un proceso que requiere energía. La nitrogenasa consta de dos polipéptidos, denominados componentes I y II, respectivamente (Fig 2). Por lo tanto, los electrones fluyen desde un transportador reducido, como la ferredoxina o la flavodoxina, hasta el componente II (denominado también nitrogenasa), que entonces reduce el componente I (dinitrógeno reductasa) que cataliza a su vez la reducción de N_2 a NH_4^+ . No se han detectado intermediarios libres de reacción entre el nitrógeno y el amonio. (Brock T. and Madigan M., 1993; Frazzon J., et al, 1997).

Cuando la nitrogenasa purificada se incuba con ATP en ausencia de nitrógeno, se produce hidrógeno gaseoso. Esta actividad secundaria de la nitrogenasa es un gasto innecesario en términos energéticos; y el propio hidrógeno es un inhibidor competitivo de la actividad nitrogenásica. La nitrogenasa también es extremadamente sensible al efecto inhibitor del hidrógeno y su susceptibilidad puede explicar en parte la distribución de la fijación de nitrógeno en un número reducido de especies. (Newton W., 1997)

Dentro del nódulo, la nitrogenasa es protegida del efecto tóxico del oxígeno atmosférico de dos formas. Primero, el oxígeno no se difunde dentro del nódulo. Segundo, el oxígeno contenido dentro del nódulo es regulado por la leghemoglobina. Esta proteína que se une al oxígeno; es sintetizada por la bacteria la parte leghemo, y la porción globina de la molécula se codifica por genes de la planta. La planta provee a la bacteria carbono fijado fotosintéticamente, el cual la bacteria necesita para crecer. Por otro lado la planta se beneficia recibiendo nitrógeno de la bacteria. (Lindsey K. and Jones M.G.K., 1992; Glick B. R. and Pasternak J. J., 1998).



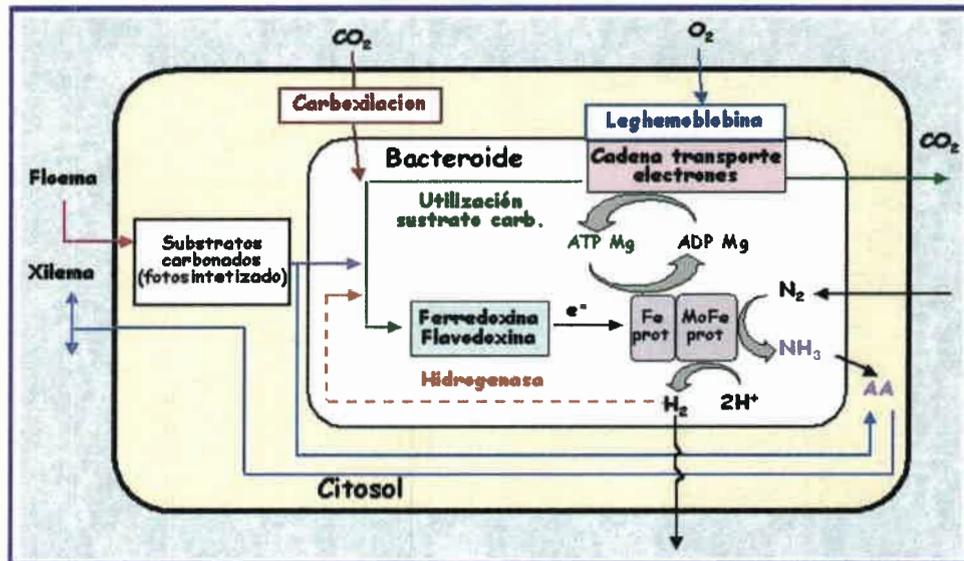
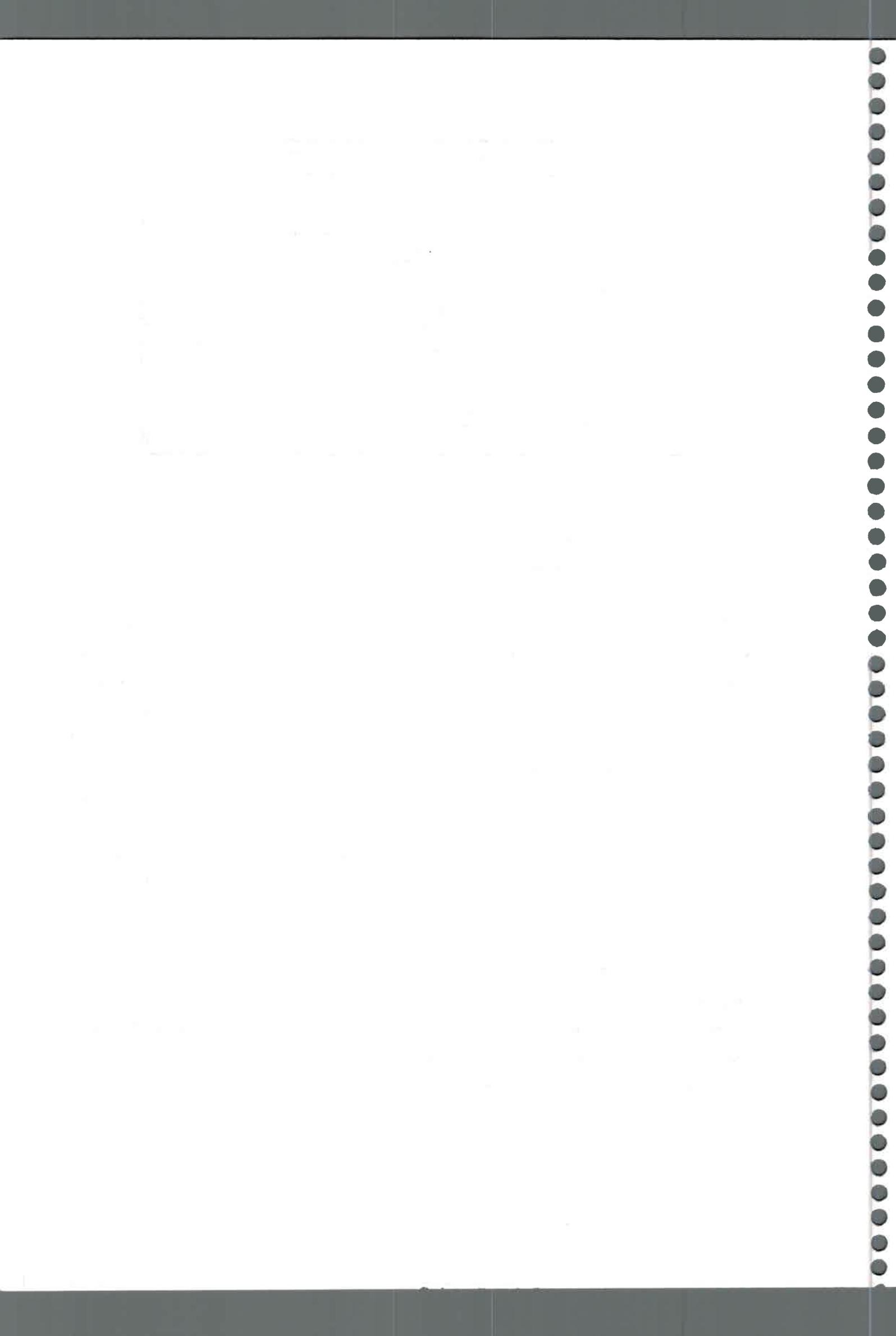


Fig 2. Sistema de la nitrogenasa

La emisión de hidrógeno por la nitrogenasa, no es eficiente para el proceso de fijación de nitrógeno por la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. Para desarrollar una estrategia para generar cepas de rizobio con la habilidad para reciclar H_2 , se construyó un minitransposón derivado del Tn5 (TnHB100) que contiene el ca. 18-kb H_2 uptake (*hup*) gen cluster de *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* UPM791. Bacteroides de TnHB100 contenido en cepas de *R. Leguminosarum* bv. *Viciae* PRE, *Bradyrhizobium japonicum*, *R. Etti*, y *Mesorhizobium loti* expresaron altos niveles de actividad de la hidrogenasa que resultó en un reciclaje completo del hidrógeno emitido por la nitrogenasa en nódulos. El procesamiento eficiente de la gran subunidad de la hidrogenasa (*HupL*) en estas cepas fueron mostradas con análisis de inmunoblot de extractos de bacteroides. En contraste, cepas de *Sinorhizobium meliloti*, *M. Ciceri*, y *R. Leguminosarum* bv. *Viciae* UML2 mostraron una pobre expresión del sistema *hup* lo que resulta en nódulos emitiendo H_2 . Para el último grupo, se detectó material que no es inmunorreactivo en extractos de bacteroides usando anti suero anti-*HupL*, sugiriendo un bajo nivel de expresión de los genes *hup* o inestabilidad de *HupL*. Se ha desarrollado y usado un procedimiento general para la caracterización del sitio de inserción del minitransposón y la remoción de la resistencia a antibióticos incluida en TnHB100 para generar cepas de ingeniería convenientes para liberar al campo. (Báscones E., et al; 2000).

La proteína fijadora de O_2 , en el nódulo radical, la leghemoglobina, está codificada genéticamente en parte por la planta y en parte por la bacteria. La porción globina es codificada por el DNA de la planta, en tanto que la síntesis del hemo está codificado por genes bacterianos. La fijación misma del nitrógeno es claramente un proceso genéticamente dirigido por la bacteria; los genes *nif* residen



en el plásmido *Sym*, o en algunas especies de *Rhizobium* sobre el mismo cromosoma. La síntesis de lectina y de flavonoides son propiedades genéticas de la planta. (Brock T. and Madigan M; 1993).

El gen para la enzima hidrogenasa, el gen *hup*, es bacteriano y frecuentemente codifica sobre el plásmido *Sym*. El papel de la hidrogenasa en los rizobios es incorporar el H₂ desprendido por la actividad de la nitrogenasa. Estos genes *Hup* se encuentran en alrededor el 20 % de todas las cepas de *R. Leguminosarum* y *B. Japonicum*, está totalmente ausente en las cepas de campo de *R. Meliloti* y *R. Trifolii*. Los estudios de rendimiento han demostrado que las cepas de rizobios que contienen hidrogenasa aumentan significativamente los niveles de nitrógeno de la planta total, sobre otras cepas que carecen de la actividad de hidrogenasa porque parte del hidrógeno que de otra forma se desperdicia por actividad de la nitrogenasa, se recicla. (Brock T. and Madigan M.; 1993).

Ingeniería genética de la fijación de nitrógeno.

Los determinantes genéticos de la nodulación se localizan tanto en células vegetales como en bacterianas. Un primer paso para ampliar el espectro de las simbiosis es la manipulación, relativamente sencilla, de los genes bacterianos. Se han conseguido transferir los genes plasmídicos *nod* de cepas de bacterias noduladoras a otras que no lo son. A este respecto, se puede demostrar que si se transfiere un plásmido de *Rhizobium leguminosarum*, que normalmente nodula en guisantes, a *R. phaseoli*, que normalmente nodula sólo en judías, se transfiere también la capacidad de nodular guisantes. No resulta tan fácil definir el papel de la planta hospedadora en la determinación del éxito de una relación simbiótica, y ha sido estudiado ante todo caracterizando los productos de los genes específicos de los nódulos: las nodulinas. Se puede decir que el producto más importante y ciertamente más abundante de estas proteínas es la leghemoglobina, que representa un 20-30 % del contenido protéico total del nódulo. Esta proteína es el producto de la acción de una familia de multigenes y está relacionada estructural y funcionalmente con las proteínas animales hemoglobina y mioglobina, poseyendo una elevada afinidad por el oxígeno. Debido a la fuerte inhibición por el oxígeno de la actividad nitrogenásica, se cree que la leghemoglobina mantiene una concentración estable de O₂ dentro del nódulo, actuando como un transportador de oxígeno. Todas las nodulinas, incluyendo la leghemoglobina, pueden dividirse en tres grupos:

Nodulinas del grupo 1: son las proteínas estructurales del nódulo, pero todavía hay que asignarles funciones específicas. Debido a la asociación de una serie de polipéptidos con la membrana del

nódulo, se ha sugerido que algunas nodulinas de grupo 1 podrían desempeñar un papel en el transporte de los metabolitos del nódulo.

Nodulinas del grupo 2: incluyen enzimas implicadas en el metabolismo posterior del nitrógeno fijado, como por ejemplo la glutamina sintetasa y la uricasa. La glutamina sintetasa cataliza la conversión de amonio y ácido glutámico en glutamina, que a su vez se metaboliza para sintetizar otros aminoácidos y en última instancia proteínas. La uricasa está presente en las células de los nódulos carentes de bacteroides y es mediadora en el catabolismo del ácido úrico, un producto de la degradación de las purinas, a alantoína, que parece ser, junto con el ácido alantóico, las principales formas de transporte y almacenamiento de nitrógeno.

Nodulinas del grupo 3: son aquellas proteínas que sostienen la función del bacteroide, entre las que se incluye la leghemoglobina. Resulta por ello patente la complejidad de los aspectos de la simbiosis codificados en la planta y cabría esperar que cualquier modificación de esta relación, tal como la ampliación del espectro de hospedadores, requeriría la transferencia de estos caracteres, así como de aquellos caracteres bacterianos que también sean importantes. (Lindsey K. and Jones M.G.K, 1992).

Los genes directores de las etapas específicas en la nodulación de una leguminosa por una cepa de *Rhizobium* se han denominado genes *nod*. Se han podido conservar muchos genes *nod* de diferentes especies de *Rhizobium* y generalmente provienen de plásmidos llamados plásmidos *sym*. Además de los genes *nod* que dirigen los eventos directos de nodulación específicos, los plásmidos *sym* contienen genes de especificidad, que restringen una cepa de *Rhizobium* para una planta huésped particular. Además la capacidad nodular de determinada leguminosa se puede transferir a través de especies de *Rhizobium* por transferencia sencilla de sus plásmidos *sym*.

En el plásmido *Sym* de *R. leguminosarum*, los genes *nod* están localizados entre dos grupos de genes para la fijación del nitrógeno, los genes *nif*. Se han identificado diez genes *nod* en esta especie. La región entera *nod* ha sido secuenciada y se conoce la función de muchas proteínas *nod*. Los genes *nodABC* dirigen el rizado de los pelos radiculares, una etapa temprana en la nodulación. Los genes *nodD* codifican para una proteína reguladora que controla la expresión de otros genes *nod*. En presencia de señales específicas de nodulación, el producto del gen *nodD* activa la transcripción de otros genes *nod*. En la mayor parte de especies de *Rhizobium* la proteína *nodD* es constitutiva y regula la transcripción de otras funciones *nod* por un tipo de control de inducción simple. La proteína *nodF* participa en la síntesis de un lípido o un polisacárido necesario para la nodulación efectiva y se considera que participa en el transporte de sustancias necesarias para iniciar la nodulación. La función de los genes *nodE* y *nodL* en la determinación de los límites de

10/10/10

10/10/10

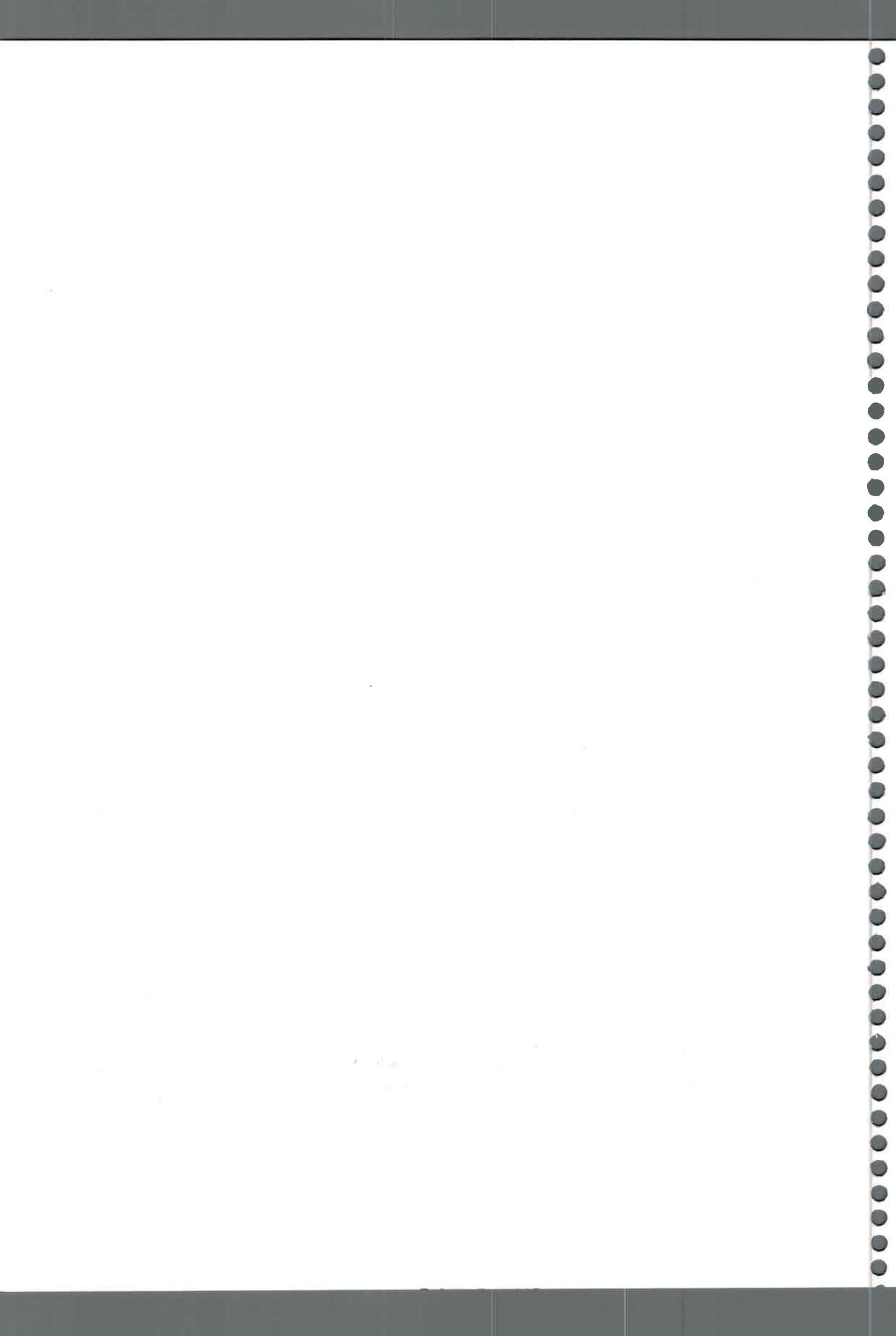
10/10/10

huéspedes, *nodD* codifica para una proteína que participa en la biosíntesis de la porina y *nodL* codifica para una proteína de membrana cuya función se desconoce.

La clonación y secuenciación de los genes *nod* en *R. leguminosarum* sugiere que están acomodados en al menos tres operones. Como proteína reguladora, la proteína *nodD* se fija a una secuencia muy constante de DNA de 35 pares de bases que precede a cada operón. Estas regiones, conocidas como cajas *nod*, presumiblemente son genes operadores a los que se puede fijar la proteína *nodD*. Después de la interacción con las moléculas inductoras la forma de la proteína *nodD* cambia haciendo que salga del DNA de la caja *nod*. Posiblemente este evento expone un sitio promotor para que la RNA polimerasa se fije, lo cual inicia la transcripción de los genes estructurales *nod*. Se han identificado varias moléculas inductoras, las principales son flavonoides vegetales. Estos tienen varias funciones en las plantas, entre ellas la regulación del crecimiento y la atracción de los insectos para la polinización. Las leguminosas secretan gran cantidad de flavonoides por sus raíces, posiblemente para disparar la expresión de los genes *nod* en las células cercanas a los rizobios en el suelo. Se puede sugerir que parte de la especificidad que se observa entre la planta y la bacteria en la simbiosis *Rhizobium* – leguminosa podría deberse a la naturaleza química de los flavonoides por determinada planta. (Brock T. and Madigan M.; 1993).

Establecimiento de la simbiosis.

Como parte de su ciclo de vida, el rizobio invade las células de la raíz de la planta e inicia una serie de cambios complejos que lideran la formación del nódulo de la raíz. Dentro del nódulo de la raíz, la bacteria prolifera y persiste como forma de célula sin membrana. La bacteria en el interior del nódulo fija nitrógeno atmosférico por medio de la enzima nitrogenasa. La estructura y la interacción bioquímica en la simbiosis del rizobio y el huésped es bastante complicada y beneficiosa para ambos. (Lindsey K. and Jones M.G.K, 1992; Glick B. R. and Pasternak J. J., 1998). Las proteínas implicadas en la fijación están codificadas por una serie de genes *nif* (“fijadores de nitrógeno”) agrupados en el cromosoma bacteriano o, como en el caso de algunas especies de *Rhizobium*, en grandes plásmidos extracromosómicos. La asociación simbiótica entre la raíz y el *Rhizobium* está determinada por otra serie más de genes bacterianos, los genes *nod* (“nodulación”) y también por genes de la planta que codifican proteínas, “nodulinas”, un grupo de al menos 30 péptidos específicos del nódulo. Se ha estudiado la regulación por el desarrollo de algunos de los genes de las nodulinas. El proceso de infección consta de una serie de estadios diferenciados: el reconocimiento de la raíz hospedadora; el arrollamiento del pelo radical, que es el punto de entrada de la bacteria; la invaginación de la pared celular del pelo radical para formar un “filamento de



infección”, a través del cual alcanzará la bacteria las células del córtex radical; y finalmente, la liberación de la bacteria a las células corticales, que aumentan de tamaño y se diferencian para formar el nódulo. Las propias bacterias se convierten en “bacteroides” fijadores de nitrógeno. Cada leguminosa se asocia con una especie particular de *Rhizobium*. Esta especificidad parece estar determinada por los factores de reconocimiento de proteínas, situados en la superficie de los pelos radicales, que se unen a los receptores para azúcares de la superficie de la bacteria. (Lindsey K. and Jones M.G.K., 1992; Glick B. R. and Pasternak J. J., 1998).

La biotina externa estimula en gran medida el crecimiento de bacterias y la colonización de la raíz de alfalfa por *Sinorhizobium meliloti* cepa 1021. Varios genes están involucrados en la respuesta derivada de la biotina en las plantas y han sido identificados en esta bacteria, pero los genes requeridos para el transporte de biotina no se conocían, y no se asignaron todos los loci requeridos para la síntesis de biotina. La búsqueda del genoma de *S. meliloti* en base de datos en combinación con tests de complementación de *Escherichia coli* auxótrofo de biotina indica que la síntesis de biotina probablemente es limitada en *S. meliloti* 1021 por el pobre funcionamiento o la ausencia completa de varios genes key. (Entcheva P., et al; 2002).

Para incrementar la fijación de nitrógeno en plantas de alfalfa, se construyeron cepas de *Sinorhizobium meliloti* conteniendo diferentes promedios de números de copias de la región simbiótica de DNA, estas construcciones se realizaron por una amplificación específica de DNA (SDA). Un fragmento de DNA conteniendo un gen regulador (*nodDI*), los genes comunes de nodulación (*nodABC*), y un operón esencial para la fijación de nitrógeno (*nifN*) de la región del regulón *nod*, regulón del plásmido simbiótico pSyma de *S. meliloti*, fueron clonados en un plásmido incapaz de replicarse en este organismo. El plásmido luego se integró en las regiones homólogas de DNA de *S. meliloti* cepas 41 y 1021, lo cual resultó en la duplicación de la región simbiótica. Derivados de *Sinorhizobium* acarrean muchas amplificaciones y fueron seleccionadas creciendo las bacterias en concentraciones en aumento de un antibiótico marcador presente en el vector integrado. Fueron obtenidos derivados de 41 cepas conteniendo promedios de copias de 3 y 6 y un derivado de la cepa 1021 conteniendo un promedio de 2.5 copias de la región simbiótica. Además, la misma región se introdujo en ambas cepas como un plásmido multicopia, produciendo derivados con un promedio de siete copias por célula. Fueron analizadas la nodulación, la actividad nitrogenasa, el contenido de proteína en la planta, y el crecimiento en plantas inoculadas con diferentes cepas. El número de copias de la región simbiótica fue crítico para determinar el fenotipo de la planta. En este caso, en cepas con un aumento moderado en el número de copias, las propiedades simbióticas se incrementaron significativamente. La inoculación de la alfalfa con estas cepas resultó en un aumento en el crecimiento de la planta.(Castillo Marcela, et al; 1999).



Se analizó la diversidad genética de 531 cepas de *Sinorhizobium meliloti* aisladas de nódulos de cultivos de *Medicago sativa* en dos suelos diferentes de Italia durante 4 años de crecimiento de las plantas. Los aislados fueron analizados por el método de polimorfismo de DNA con el random amplified polymorphic (RAPD). La población mostró un alto nivel de polimorfismo genético distribuido a todos los aislamientos, con 440 tipos diferentes de halotipos. El análisis de variación molecular permitió relacionar la estructura genética de la población simbiótica con varios factores, incluyendo el tipo de suelo, cultivares de alfalfa, plantas individuales en el interior de un cultivo, y el tiempo. Algunos de estos factores están afectando significativamente la estructura genética de la población, y su relativa influencia cambia con el tiempo. En el comienzo del experimento, el suelo de origen y, mucho más, el cultivo influye significativamente en la distribución de la variabilidad genética de *S. meliloti*. Luego de tres años, la población de rizobio se vió alterada; esto muestra una estructura genética basada principalmente en diferencias entre plantas, mientras que el efecto del suelo y del cultivo no fueron significativos. (Carelli María, et al; 2000).

Los lipopolisacáridos (LPS) y los polisacáridos capsulares (antígenos K) pueden influir en la interacción del rizobio con su hospedador específico; por lo tanto, se han realizado ensayos comparativos entre *Sinorhizobium fredii* y *Sinorhizobium meliloti*, los cuales están genéticamente relacionados, pero son distintos genéticamente en la fijación microsimbótica de nitrógeno. Se encontró que ambas especies producen antígenos K que consiste de ácido 3-deoxi-D-manno-2-octulosónico (Kdo), y otro azúcar 1-carboxi-2-keto-3-deoxi (como el ácido siálico), y hexosas. Los antígenos K de cada cepa son distinguidos por la composición en glicosil, configuración anomérica, acetilación de pesos moleculares. Una diferencia entre los antígenos K de *S. fredii* y los de *S. meliloti* es la presencia de grupos *N*-acetil en los últimos polisacáridos. En contraste con los antígenos K, los LPS de *Sinorhizobium* spp. son antígenos más comunes. El (R) LPS es la forma predominante de los LPS producidos por células cultivadas, y algunas cepas sueltan poco (S) LPS, que no es detectable en la extracción. *Sinorhizobium* spp. están delineados dentro de dos núcleos de serogrupos mayoritarios, RLPS, los cuales no corresponden a especies (i.e., rango de hospedador). Los antígenos O de los SLPS, cuando están presentes, tienen grados similares de polimerización y aparecen para ser estructuralmente conservados a través del género. Se encontró que una cepa era diferente a todas las otras: *S. fredii* HH303 produce un antígeno K único, el cual contiene ácido galacturónico y ramnosa, y los RLPS no entran dentro de ninguno de estos núcleos de serogrupos RLPS. Los resultados de este estudio indicaron que los S- y RLPS de *Sinorhizobium* spp. conservaron la información de la diferencia estructural necesaria para influenciar al hospedador específico, mientras que los antígenos K variables pueden afectar la interacción cepa – cultivo. (Reuhs B. L., et al; 1998).



Fueron identificados cuatro genes, codificando pequeñas proteínas con un contenido de glicina significativamente alto, en los nódulos de raíces de *Medicago sativa*. Todas estas proteínas y sus homólogos en *Medicago truncatula* llevan un péptido señal amino terminal y un dominio carboxi terminal rico en glicina. Todos excepto *nodGRP3* carecen de la estructura repetida descrita para la pared celular y de la respuesta relacionada con el estrés, proteínas ricas en glicina (GRP). La expresión de éstos genes GRP fue indetectable en flores, hojas, tallo, y células de hipocotilos, mientras que la expresión fue altamente inducida durante el desarrollo de nódulo de raíz, sugiriendo que los genes GRP actúan como nodulinas. Además, ninguno de estos genes GRP, fueron expresados en nódulos cuando fueron activados por hormonas o tratamientos de estrés, los cuales son inductores de muchas otras GRPs. Estos resultados demostraron que se requiere la infección bacteriana pero no la diferenciación a bacteroide para la inducción de los genes GRP nódulo específico. Diferencias cinéticas y de localización en la activación de genes, así como en la estructura primaria de las proteínas, sugieren roles no redundantes para estas GRPs en la organogénesis del nódulo. (Kevei Z, et al; 2002).

La simbiosis *Rhizobium*-leguminosa involucra la formación de un órgano nuevo en la planta, el nódulo, en el cual la bacteria en su espacio intracelular reduce el nitrógeno molecular para ser usado en la producción de los fotosintatos de la planta. El desarrollo de nódulos requiere una señal de la bacteria como el factor Nod, el cual en *Sinorhizobium meliloti* es un β -(1,4)-unido a un tetrámero de *N*-acetilglucosamina conteniendo modificaciones *N*-acil y *O*-acetil en el final no reducido y un crítico 6-*O*-sulfato en el extremo final reductor. Esta modificación de sulfato requiere la acción del producto de los siguientes genes: *nodH*, el cual cataliza la transferencia de sulfonil, y *nodPQ*, el cual produce la forma activada de sulfato, 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato. Se ha publicado previamente que polisacáridos de la superficie de células de *S. meliloti* son también covalentemente modificadas por sulfato en una reacción que depende de *nodPQ*. Se ha caracterizado esta única forma de modificación de carbohidrato bacteriano. Se ha clonado el gen afectado por esta mutación (referido como *lps-212*) y se encontró que éste era un alelo de *lpsL*, un gen del cual se predijo que codifica una epimerasa del ácido UDP-glucurónico. Se demostró que ese *lpsL* codificó la actividad epimerasa del ácido UDP-glucurónico que fue reducida en mutantes *lps-212*. La mutación en *lps-212* resultó en estructuras alteradas de lipopolisacáridos que fueron reducidos en la modificación de sulfato in vitro y in vivo. Finalmente, se determinó que la mutación *lps-212* provoca que se aborte prematuramente la formación de los hilos de infección. (Keating David H., et al; 2002).

Sinorhizobium meliloti es una bacteria del suelo capaz de invadir y establecer una relación simbiótica con plantas de alfalfa. El proceso de invasión requiere la síntesis, por *S. meliloti*, de por lo menos uno de los dos exopolisacáridos importantes simbióticamente, succinoglicano y EPS II. Se

ha demostrado previamente que el locus *sinRI* de *S. meliloti* codifica un sistema de quorum-sensing que juega un rol en el proceso simbiótico. Se mostró que el locus *sinRI* ejerce un nivel de control a través de la regulación en la síntesis de EPS II. Una alteración del gen autoinducido sintasa, *sinI*, anula la producción de EPS II tan bien como la expresión de varios genes en el operón *exp*, que son responsables de la síntesis de EPS II. Este fenotipo fue complementado por la adición de extractos de acil homoserina lactona (AHL) de la cepa tipo salvaje pero no para un mutante *sinI*, indicando que el *sinRI*-específico y AHLs son requeridos para la expresión de los genes *exp*. Esto fue confirmado más tarde por la observación de que palmitoleil homoserina lactona (C(16:1)-HL) sintética, uno de los identificados previamente como *sinRI*-específico AHLs, específicamente restauran la expresión de los genes *exp*. La ausencia de EPS II simbióticamente activo en mutantes *sinI* se confirmó en ensayos de nodulación de plantas, acentuando el rol del “quorum sensing” en simbiosis.(Marketon MM, et al; 2003).

Fueron identificados genes que contribuyeron a la producción de riboflavinas en *Sinorhizobium meliloti*, una cepa bacteriana que sobreproduce esta vitamina fue construida para caracterizar como afecta la riboflavina adicional la interacción entre alfalfa (*Medicago sativa*) y *S. meliloti*. Genes que sintetizan riboflavina en *S. meliloti* están relacionados a tres grupos separados y designados como *ribBA*, *ribDC*, y *ribH*. Células de *S. meliloti* conteniendo copias extras de *ribBA* liberaron 10 a 20% más riboflavina que la cepa control pero crece a una velocidad similar en un medio definido carente de riboflavina. Células acarreando copias extras de *ribBA* colonizaron la raíz con densidades que fueron 55% mayores que aquellas cepas control. No se detectó un efecto extra en genes *rib* en el crecimiento de la alfalfa en la ausencia o presencia de N combinado. Estos resultados apoyan la importancia de la riboflavina extracelular para la colonización de la raíz de alfalfa por *S. meliloti* y son consistentes con la hipótesis que esta molécula beneficia a la bacteria indirectamente a través del efecto en la planta.(Yang G, et al; 2002).

Se ha estudiado el rol de la biosíntesis de leucina por *Sinorhizobium meliloti* en el establecimiento de la simbiosis de la fijación de nitrógeno con alfalfa (*Medicago sativa*). El gen *leuA* de *S. meliloti*, codificando la sintasa alfa-isopropilmalato, la cual cataliza el primer paso específico en la vía de biosíntesis de leucina, fue caracterizado por mutantes *S. meliloti* *LeuA(-)*, fueron auxótrofos *Leu* y carentes de actividad sintasa de la alfa-isopropilmalato. Los auxótrofos *leuA* no fueron hábiles para nodular alfalfa. Las raíces de alfalfa parece que no secretaron leucina suficiente para soportar el crecimiento de auxótrofos de leucina en la rizósfera. Además, esta limitación en el crecimiento probablemente impone la inhabilidad para iniciar la simbiosis. Sin embargo, de la auxotrofia de leucina, las cepas *leuA* fueron perjudicadas en la activación de los genes de nodulación por un





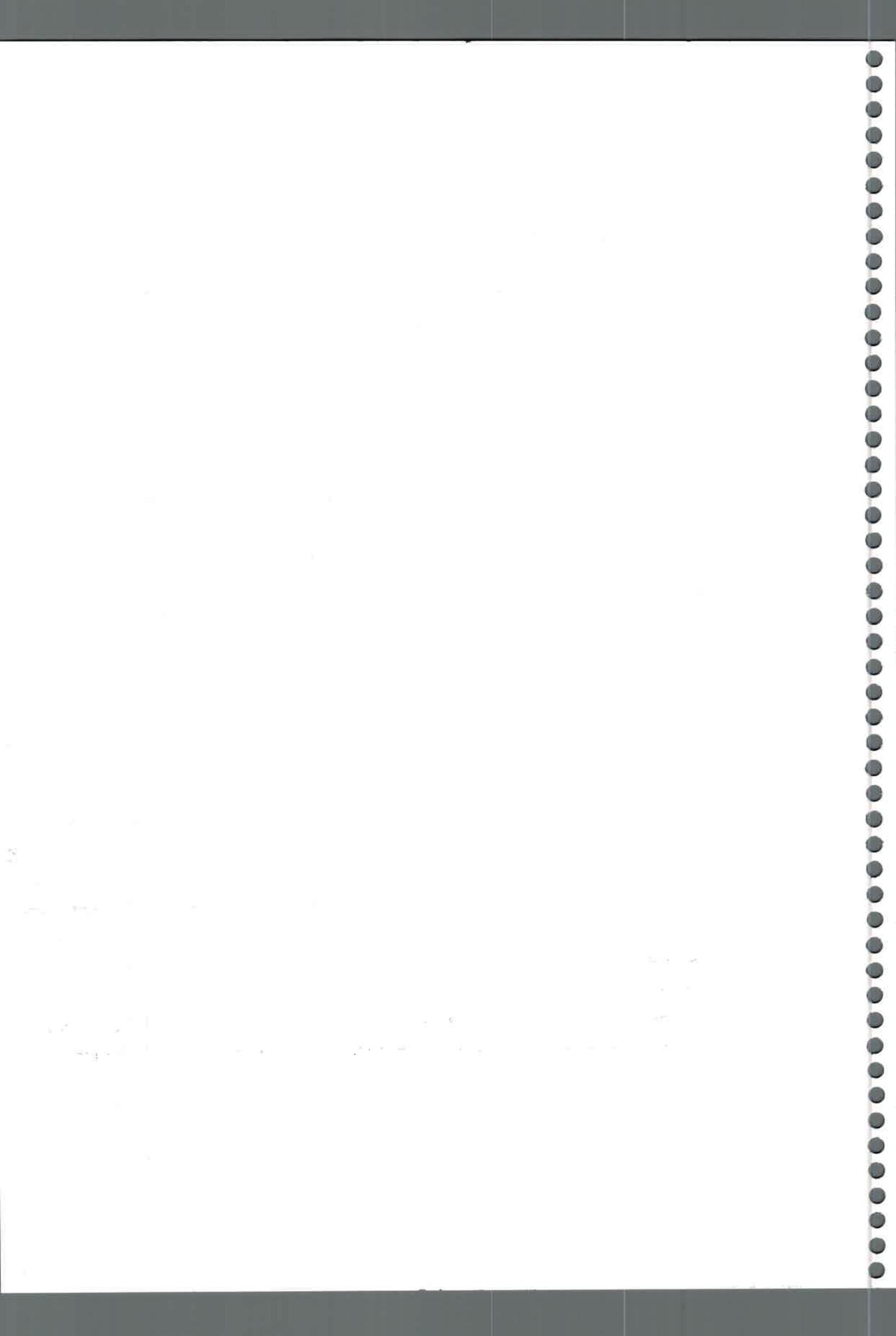
activador transcripcional NodD1 en respuesta al flavonoide luteolina de la planta. Por contraste, la activación de los genes nod por NodD3, el cual no está involucrado en los inductores derivados de las plantas, no fue afectado. Algunos resultados sugieren que la leucina relacionada como intermediario metabólico podría estar involucrado en la activación de los genes de nodulación por NodD1 y luteolina. Esta clase de control puede ser un camino relevante para unir el estado fisiológico de la bacteria para la respuesta de las señales de la planta y la iniciación de la simbiosis. (Sanjuan-Pinilla JM, et al; 2002; Sanjuan-Pinilla JM, et al; 2003).

Etapas en la formación de nódulos.

Las etapas en la infección y el desarrollo de nódulos incluyen:

1. Reconocimiento de la pareja correcta por parte tanto de la planta como de la bacteria y fijación de la bacteria a los pelos radicales.
2. Invasión de los pelos de la raíz por la formación bacteriana de una cadena infecciosa.
3. Viaje a la raíz principal por medio de la cadena infecciosa.
4. Formación de las células bacterianas deformadas, bacteroides, dentro de las células vegetales y desarrollo del estado fijador del nitrógeno.
5. División continúa de la planta y de las bacterias y formación del nódulo radical maduro.

Las raíces de las plantas leguminosas secretan varias sustancias orgánicas que estimulan el desarrollo de una microflora en la rizósfera. Este estímulo no está restringido a los rizobios, sino que abarca muchas bacterias diferentes. La fijación, en la simbiosis leguminosa – *Rhizobium*, depende del reconocimiento apropiado de las macromoléculas de la superficie de los pelos superficiales de la raíz que interactúan con los polisacáridos de la superficie de la célula del *Rhizobium*. Este proceso ha sido estudiado en detalle, en la simbiosis con el trébol blanco *R. trifolii*. Las células de *R. trifolii* tienen una cápsula extensa y se ha demostrado que en ella ocurre una fijación específica de las células bacterianas a los pelos radicales del trébol blanco. *R. trifolii* no se fija tan fuertemente a los pelos radicales de otras leguminosas, y otras especies de *Rhizobium* no se fijan tan fuertemente a los pelos de la raíz de trébol blanco. Se puede extraer una sustancia, que es posible purificar, de las raíces del trébol blanco que aglutina específicamente las células de *R. trifolii*, y esta sustancia, una lectina llamada trifolina, es el agente que adhiere las células de *R. trifolii* al pelo de la raíz. Las lectinas son proteínas vegetales con una alta afinidad por residuos específicos de azúcar. Las lectinas de la raíz que interactúan con especies específicas de *Rhizobium*



también se han encontrado en la soya, en el trébol dulce y en el chícharo. (van Rhijnt P. and Vanderleyden J., 1995).

En la fijación en la simbiosis *R. Trifolii* - trébol participa una porción polisacárida de la capa externa de *R. trifolii* que contiene el azúcar 2 – desoxiglucosa. Si se adiciona 2 – desoxiglucosa a las raíces, se bloquea la fijación de *R. trifolii*. Se ha estudiado la interacción del material capsular del polisacárido de *R. trifolii* con la superficie del pelo de la raíz convirtiéndolo en un derivado fluorescente y al observar la fluorescencia de los pelos radicales cuando se tratan con esta sustancia. Los pelos de la raíz se fijan a este material más enérgicamente que las células que están debajo de los pelos de la raíz y la fijación parece ser especialmente fuerte cerca de la punta de los pelos radicales. En la adición de 2 – desoxiglucosa, también se necesita un polisacárido cíclico que contenga unidades de glucosa enlazadas beta 1,2 para que se efectúe una nodulación efectiva.

La penetración inicial del *Rhizobium* en el pelo radical es a través de la punta de este. Después de la entrada a este sitio, la bacteria prolifera y forma la llamada ruta de la infección, que se extiende hacia la base del pelo radical.

Una célula de la raíz adyacente al pelo radical queda infectada, y si ésta célula es del tipo diploide anormal, generalmente es destruida por la infección, sufriendo necrosis y degeneración; pero si es una célula tetraploide, puede convertirse en la precursora de un nódulo. En la raíz siempre hay un pequeño número de células tetraploides que se han originado espontáneamente, y si una de ellas queda infectada se estimula su división. Las divisiones progresivas de células infectadas de esta manera dan lugar a la producción de un nódulo parecido a un tumor. En cultivo, los rizobios producen sustancias llamadas citocininas, que ocasionan la división de las células tetraploides y es muy posible que la producción de citocininas tenga lugar en las células infectadas.

Las bacterias se multiplican rápidamente dentro de las células tetraploides y quedan rodeadas individualmente o en pequeños grupos por porciones de la membrana del huésped. Las bacterias son algunas veces transformadas en formas ramificadas, edematosas, contrahechas llamadas bacteroides. Únicamente después de que ha tenido lugar la formación de los bacteroides se inicia la fijación del nitrógeno (los nódulos que fijan el nitrógeno pueden detectarse por reducción de acetileno). En este estadio, los nódulos se deterioran y liberan las bacterias hacia el suelo. Las formas de bacteroides son incapaces de dividirse, pero siempre queda un pequeño número de células en forma de bastón en dormancia. En estos momentos, dichas células proliferan empleando como nutrientes algunos de los productos del nódulo en deterioro y pueden iniciar la infección en otras raíces o mantener una existencia de vida libre en el suelo.(Brock T. and Madigan M., 1993; Grasso D., 2003; Sanjuán J., 2003).

Los flavonoides como señales para los microbios de la rizósfera

Los flavonoides liberados por las leguminosas, como por ejemplo la luteolina (3', 4', 5, 7-tetrahidroxiflavona) en el extracto de semillas de alfalfa, la 4, 4' - dihidroxi - 2' - metoxichalcona exudado de la raíz de alfalfa, la 4', 7 - dihidroxiflavona exudado de la raíz de alfalfa, afectan la nodulación de la raíz.

La afectan de tres maneras diferentes:

- 1) induciendo la transcripción de genes de nodulación del rizobio requeridos para la infección.
- 2) promoviendo el movimiento bacteriano en dirección a la planta.
- 3) incrementando el porcentaje de crecimiento de las células bacterianas.

Observando los factores de las legumbres huéspedes que se necesitan para la transcripción de algunos genes *nod* en bacterias como el *Rhizobium* y el *Bradyrhizobium* se puede llegar a la identificación de flavonoides particulares en diferentes leguminosas. La lista de genes *nod* activos que están induciendo la liberación de flavonoides de varias plantas leguminosas huésped ha llegado a ser extensa, se han aislado factores activos adicionales de los lavados de semillas y los exudados de raíz. Los flavonoides controlan la transcripción de los genes *nod* interactuando en algunas vías con productos de la familia de genes regulatorios *nod D*.

Los flavonoides son llaves de encendido y apagado, son moléculas que controlan la formación de nódulos en la raíz y es afectada por el número de células rizobiales presentes.

La inducción de células rizobiales es un evento molecular, pero la formación de un número óptimo de nódulos es un fenómeno de población que requiere un amplio número de bacterias inducidas.

Los flavonoides agregados a la rizósfera incrementaron la formación de nódulos en la raíz y la fijación de nitrógeno en alfalfa bajo condiciones controladas. El rol de los flavonoides en la nodulación de la raíz involucró la inducción de genes *nod* y también sirven como quimioattractantes del rizobio en concentraciones nanomolares y micromolares.

Mutaciones en los genes *nod D* eliminan la respuesta quimiotáctica del *Sinorhizobium meliloti* a la luteolina. De este modo el movimiento del rizobio en dirección a la alfalfa y la inducción de genes requeridos para la formación de nódulos de la raíz están aparentemente afectados por el mismo compuesto.

Los flavonoides liberados pueden alterar el crecimiento bacteriano. Las semillas de leguminosas liberan compuestos que inhiben el crecimiento bacteriano. En alfalfa, dos de los flavonoides dominantes liberados desde las semillas embebidas, luteolina - 7 - O - glucósido y quercetina - 3 -



O – galactósido, aumentan el porcentaje de crecimiento de todas las cepas de *Sinorhizobium meliloti* testeadas en un medio mínimo, y la respuesta se satura a 1 – 5 micromolar.

Aparentemente el efecto de crecimiento de los flavonoides es controlado en forma separada por la transcripción del gen *nod*, porque una cepa de *S. meliloti* mutada en todos los genes *nod D*, creció más rápido con quercetina y luteolina.

Como la alfalfa libera flavonoides estructuralmente distintos desde la raíz y las semillas, así podría haber dos zonas económicamente diferentes alrededor de la planta. La mayor parte de los flavonoides liberados desde las semillas tienen un sustituyente en la posición C-5 y cerca de dos tercios de la fracción está compuesta por derivados de luteolina y quercitina. Los exudados primarios de la raíz son flavonoides 5-deoxi. La luteolina y la quercitina, pero no los flavonoides 5-deoxi, liberados desde la raíz, aumentan el porcentaje de crecimiento de *S. meliloti*. Puede haber efectos especiales de los flavonoides en la transcripción de los genes *nod* donde hay zonas solapadas en la raíz y la semilla, porque mezclas de 4, 4' – dihidroxi – 2'- metoxichalconas de las raíces y luteolina de las semillas tienen efectos sinérgicos en la inducción de los genes *nod*. Estas moléculas interactúan de distinta forma con los productos de varios genes *nod D* de *S. meliloti*. La planta puede hacer decrecer la actividad de inducción de los genes *nod* en la rizósfera parando la síntesis. La planta puede tener la posibilidad de liberar más de un inductor de genes débil como el 4', 7 dihidroxiflavonoide y permite a la molécula disminuir el efecto de inducción fuerte de la luteolina por uniones competitivas a un sitio activo en los productos de los genes *nod D*. Las semillas de alfalfa cuando están germinando pueden alterar toda la inducción de los genes *nod* en *S. meliloti*, esto se verifica porque semillas esterilizadas liberan actividad glucosidasa que hidroliza al inductor *nod* inactivo, como la luteolina – 7 – O – glucósido al inductor fuerte, luteolina.

La importancia de todos los procesos en conjunto, usando los flavonoides de las plantas para inducir los genes *nod* de los rizobios se pone de manifiesto por el hecho de que ambos, la planta de alfalfa y el *S. meliloti* han involucrado pasos críticos, la planta libera una variedad de flavonoides capaces de estar induciendo los genes *nod*, mientras que la bacteria tiene tres copias homólogas de los genes *nod D*.(Grasso D., 2003)

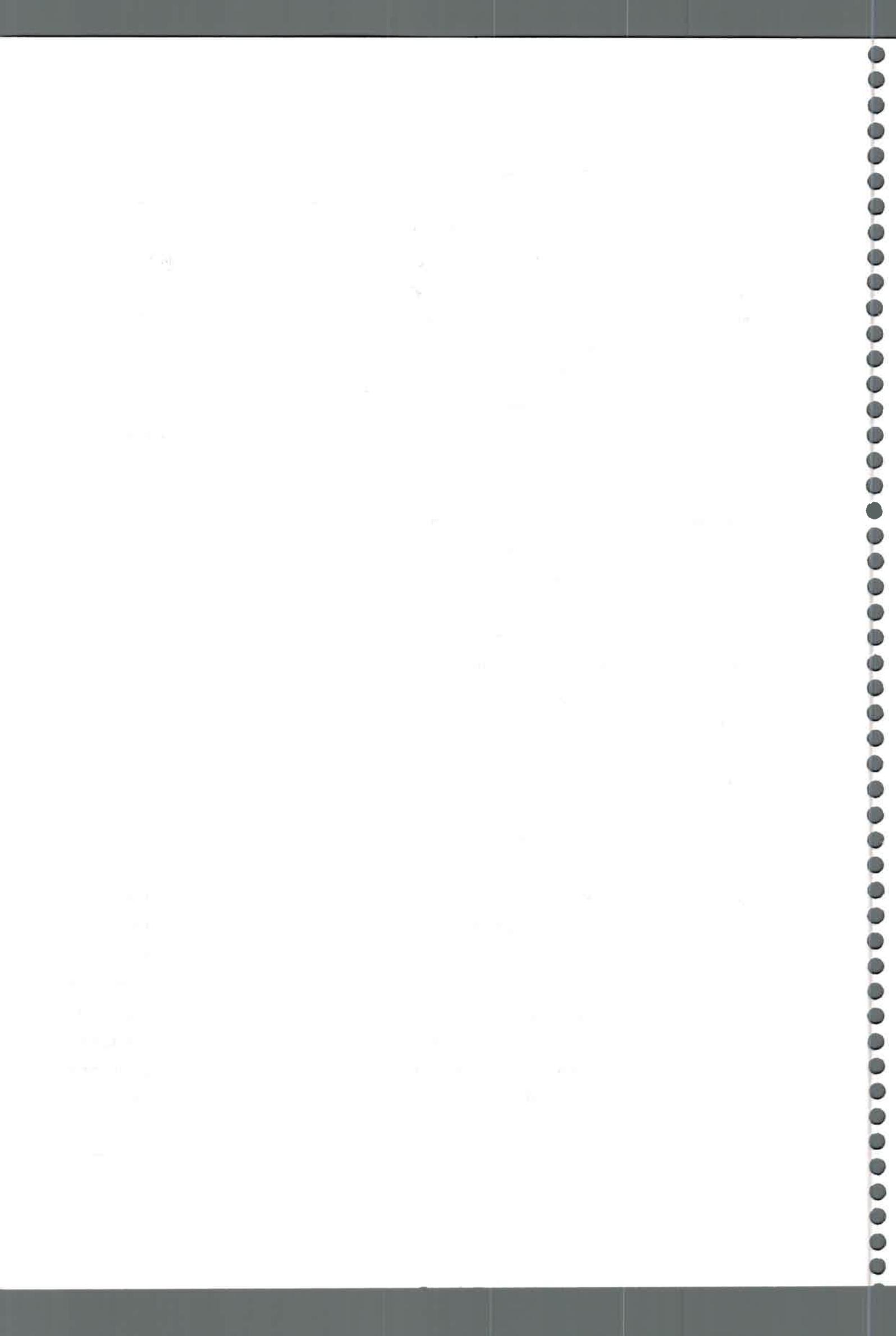
Las leguminosas usan flavonoides para controlar los procesos tempranos de unión con el rizobio simbiótico, es posible que mecanismos análogos influyan la simbiosis entre las plantas y los hongos micorrizales. Los flavonoides y otras moléculas pequeñas de las plantas pueden influir sobre la germinación de las esporas fungales de las micorrizas, crecimiento de la hifa y / o infección. Se han encontrado flavonoides como aspiregin, hesperitin y maringein que promueven la germinación de la espora y el crecimiento de la hifa de *Gigaspora margarita* a concentraciones de 0,15 – 1,5 micromolar. Se han testado por esto flavonoides que ocurren naturalmente en la semilla y en la

zona de la raíz de las plantas de alfalfa para ver sus efectos en el desarrollo “in vitro” de esporas de “*Glomus etunicatum*”. En experimentos preliminares en agar agua, quercitina, la aglicona liberada de las semillas de alfalfa, promovió notablemente la germinación de esporas, crecimiento de la hifa y ramificación, mientras tanto el 4', 7 - dihidroxiflavona, que es el flavonoide exudado por las raíces jóvenes de la alfalfa, primariamente aumentan la ramificación de la hifa. Las respuestas a flavonoides se saturan a concentraciones más bajas que 10 micromolar cuando se suministran los nutrientes con el flavonoide con el agar agua. Bajo estas condiciones, 4', 7 dihidroxiflavonas promueve fuertemente la germinación de *G. etunicatum*.

Los flavonoides pueden influir en el crecimiento microbiano en el suelo. El efecto positivo de la luteolina y quercitina en el porcentaje de crecimiento bacteriano no es específico para *S. meliloti* pero ninguno de los dos es un fenómeno general que está afectando a todos los microbios que se encuentran alrededor de plantas jóvenes cultivadas de alfalfa. Los mismos compuestos promueven el crecimiento de las bacterias benignas del suelo como *Pseudomona putida*.

Tratamientos con estos flavonoides hasta 10 micromolar disminuyeron el crecimiento “in vitro” de *Pythium irregulare* y *P. Ultimum*, dos hongos patógenos de alfalfa. Esto puede ser útil para examinar como los flavonoides son liberados naturalmente de las plantas por influencia de la población bacteriana del suelo. Los efectos críticos de los microbios del suelo en el contenido de materia orgánica y estructurales del suelo son bien conocidos y se ha determinado que los flavonoides son factores que están controlando estos procesos y pueden beneficiar la agricultura. (Phillips D. A. and Tsai S. M., 1992).

Dentro de los sistemas biológicos para fijar el nitrógeno, quizás el más promisorio, desde el punto de vista agronómico, lo constituye la asociación simbiótica entre las bacterias del género *Rhizobium* y las raíces de las leguminosas. La asociación *Rhizobium*-leguminosa reviste un carácter específico: una cepa determinada de la bacteria sólo puede infectar ciertas especies o variedades de leguminosa. Es posible que la lectina producida por la planta juegue algún papel en el enlazamiento de la bacteria, con posterioridad a los eventos de reconocimiento entre planta y bacteria. Un hecho que apoya esta posibilidad es que las lectinas se localizan en la región de la raíz que es más susceptible a la infección por *Rhizobium*. Las lectinas son proteínas o glucoproteínas. En general, no se conoce la función fisiológica de las lectinas de las plantas, puede ser que las lectinas jueguen un papel en el enlazamiento de factores Nod. Existe la posibilidad de clarificar esta hipótesis mediante la disponibilidad de factores Nod marcados. De todas formas, el papel bioquímico de las lectinas y los eventos simbióticos en los cuales participan siguen sujetos a debate. Se aisló la lectina de la semilla de arveja (LSA) y se purificó por cromatografía de afinidad, a través de una columna de Sephadex G-100. La lectina de raíz (LRA) se aisló de las paredes celulares de la raíz de arveja.

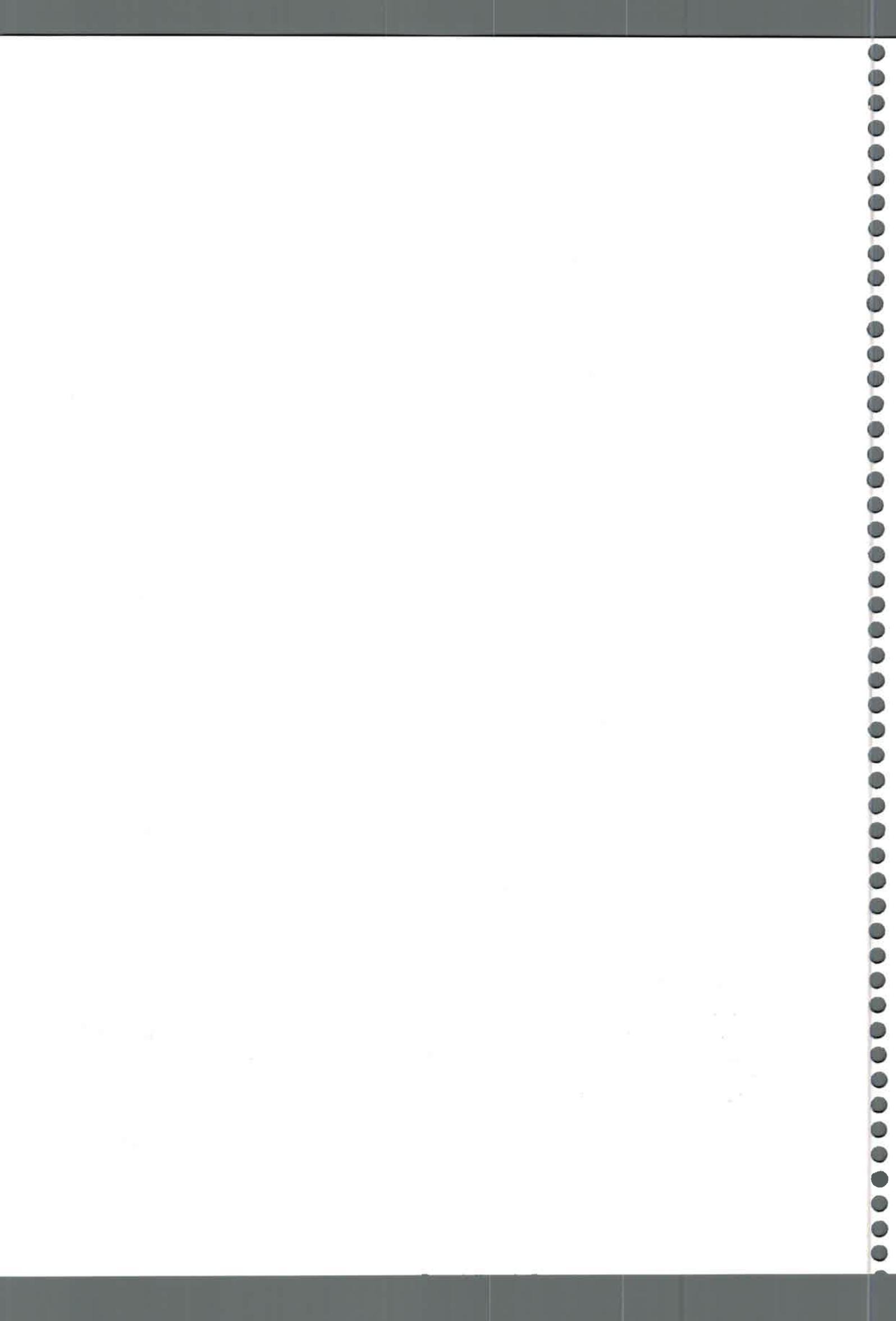


Entre los extractantes utilizados el que mostró mejores resultados fue el citrato de sodio 0.1 M, pH 4.2. Las diferencias en el proceso de extracción, comportamiento diferente en filtración por gel, diálisis, inhibición de la eritroaglutinación por carbohidratos, electroforesis en gel, la acción aglutinante frente a diversas cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae*, las divergencias en el peso molecular y en la solubilización parecen indicar que las lectinas extraídas de la semilla y de la raíz de arveja son moléculas diferentes. Por otro lado, bacterias de *Escherichia coli* se unieron a las lectinas de semilla y de raíz lo cual sugiere que la unión lectina-*Rhizobium* no es específica. (Luque T. J. E., 1997).

En líneas generales, cada leguminosa libera al medio determinados inductores (p. e. la alfalfa, luteolina y la soja genisteína) que la bacteria reconoce y la lleva a sintetizar el factor Nod correspondiente, que está constituido por un esqueleto de 4 o 5 N-acetil glucosaminas con bastantes sustituciones que determinan la especificidad. Estos factores, que se conocen también por su composición como lipoquitooligosacáridos (LCOs), determinan modificaciones en los pelos radicales, la formación del canal de infección y la división de células del cortex, que conducen a la formación del nódulo en cuyo interior, perfectamente estructurado, se va a llevar a cabo la fijación. Al nódulo llega el fotosintetizado, en forma de sacarosa, para soportar el proceso. Servirá de fuente de energía, poder reductor y esqueleto carbonado para la incorporación del amonio resultante de la fijación. Será transportado por el xilema al resto de la planta en forma de amidas o ureídos, según el hospedador sea de clima templado o tropical. (Schröder E., 1995).

Sal y estrés osmótico.

La salinidad es una amenaza seria para la agricultura en regiones áridas y semiáridas. Cerca del 40% de la tierra de la superficie del mundo puede ser categorizado como que tiene problemas de salinidad potenciales; la mayoría de estas áreas están confinadas a los trópicos y a las regiones mediterráneas. Aumentos en la salinidad de los suelos o en las aguas usadas para irrigación resulta en un decrecimiento en la productividad de la mayoría de cultivos de plantas y conduce a un marcado cambio en el patrón de crecimiento de las plantas. Incrementos en las concentraciones salinas pueden tener un efecto nocivo en la población microbiana del suelo como resultado de una toxicidad directa así como a través del estrés osmótico. La infertilidad del suelo en zonas áridas es a menudo debido a la presencia de una gran cantidad de sal, y la introducción de plantas capaces de sobrevivir bajo estas condiciones (plantas tolerantes a la sal) es digno de ser investigado. Se ha planteado actualmente la necesidad de desarrollar cultivos altamente tolerantes a la sal para reciclar aguas drenadas en la agricultura, las cuales son literalmente ríos de aguas contaminadas que son



generadas en distritos de zonas áridas de irrigación. La tolerancia a la sal en las plantas es un fenómeno complejo que involucra cambios morfológicos y de desarrollo así como procesos fisiológicos y bioquímicos. La salinidad disminuye el crecimiento y el rendimiento, dependiendo de la especie de la planta, niveles de salinidad, y composición iónica de las sales. La respuesta a la salinidad de las leguminosas varía y depende de algunos factores como las condiciones climáticas, propiedades del suelo, y el estado de crecimiento. Ha sido reportada la variabilidad en la tolerancia a la sal entre las cosechas de leguminosas. Algunas leguminosas, ej, *Vicia faba*, *Phaseolus vulgaris*, y *Glycine max*, son más tolerantes que otros, ej, *Pisum sativum*. Algunas líneas tolerantes de *V. faba* mantienen la fijación de nitrógeno bajo condiciones salinas. Otras leguminosas, como *Prosopis*, *Acacia* y *Medicago sativa*, son tolerantes a la sal, pero menos que sus rizobios simbiotes.

La simbiosis entre *Rhizobium* – leguminosa y la formación de nódulos en las leguminosas son más sensibles a la sal o al estrés osmótico de lo que son los rizobios. El estrés salino inhibe los pasos iniciales de la simbiosis *Rhizobium* – leguminosa. Pelos de la raíz de soja mostraron un pequeño encurvamiento y deformación cuando se inocularon con *Bradyrhizobium japonicum* en presencia de 170 mM de NaCl, y la nodulación fue completamente suprimida por 210 mM de NaCl. La colonización bacteriana y el encurvamiento del pelo de *V. faba* fueron reducidos en presencia de 50 a 100 mM NaCl o 100 o 200 mM de polietilén glicol como osmótico; la proporción de pelos radicales conteniendo hilos de infección fue reducida en 30 y 52% en presencia de NaCl y polietilenglicol respectivamente. Los efectos del estrés salino en la nodulación y la fijación de nitrógeno en leguminosas han sido examinados en varios estudios. La reducción en la actividad de la fijación de nitrógeno por el estrés salino es atribuido usualmente a la reducción en la respiración de los nódulos y a la reducción en la producción de proteína citosólica, específicamente leghemoglobina, por nódulos. El efecto depresivo del estrés salino en la fijación de nitrógeno por las leguminosas está directamente relacionado por la disminución inducida por la sal, en la materia seca y en el contenido de nitrógeno en el vástago de la planta. Las deformaciones inducidas por sal en la estructura del nódulo, se podrían deber también a la disminución en la velocidad de fijación de nitrógeno por leguminosas sometidas a estrés salino. La reducción en la actividad fotosintética es posible que afecte la fijación de nitrógeno por leguminosas bajo estrés salino.

Aunque el nódulo de raíz colonizado por la bacteria del género *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* es más tolerante a la sal, que sus leguminosas hospedantes, mostró marcada variación en la tolerancia. El crecimiento de rizobios fue inhibido por 100 mM de NaCl, mientras algunos rizobios, ej, *SinoRhizobium meliloti*, fueron tolerantes de 300 a 700 mM de NaCl. Se han hallado cepas de *Rhizobium leguminosarum* tolerantes a concentraciones de NaCl por encima de 350 mM de NaCl en

caldo de cultivo. Rizobios de soja y garbanzo fueron tolerantes a 340 mM de NaCl, con cepas de crecimiento rápido más tolerantes que las cepas de crecimiento lento. Cepas de *Rhizobium* de *Vigna unguiculata* fueron tolerantes a NaCl por encima del 5,5%, lo cual es equivalente a cerca de 450 mM de NaCl. Ha sido encontrado recientemente que el rizobio de crecimiento lento en el maní es menos tolerante que un rizobio de crecimiento rápido. Rizobios de leguminosas leñosas también mostraron una substancial tolerancia a la sal: cepas de Acacia, Prosopis, y Leucaena son tolerantes a 500 a 800 mM de NaCl. El crecimiento de *S. meliloti* fue severamente inhibido por iones Mg^{+2} , mientras que los iones Na^+ y K^+ tienen un efecto inhibitorio pequeño.

Varias especies de bacterias se adaptaron a condiciones salinas por la acumulación intracelular de solutos orgánicos de bajo peso molecular llamados osmolitos. La acumulación de osmolitos es usada para contrarestar el efecto de la deshidratación por baja actividad del agua en el medio pero no para interferir con la estructura macromolecular o función. El Rizobio utiliza este mecanismo de adaptación osmótica. En presencia de altos niveles de sal (encima de 300 a 400 mM NaCl), los niveles de glutamato intracelular libre y / o K^+ fueron incrementados en gran medida (a veces por encima del séxtuplo en pocos minutos) en células de *R. meliloti*, *R. Fredii* y *Sinorhizobium fredii*, el ion K^+ , controla las fluctuaciones de Mg^{2+} durante el shock osmótico. La acumulación del osmolito, amida del N-acetilglutaminil-glutamina en células de *R. Meliloti*, depende del nivel del estrés osmótico, la fase de crecimiento del cultivo, la fuente de carbono, y la presencia de osmolitos en el medio de crecimiento. (Ghittoni N. E. y Bueno M. A., 1992).

El disacárido trealosa juega un rol en la osmoregulación cuando el rizobio está creciendo bajo estrés osmótico o salino. La trealosa se acumula a altos niveles en células de *R. leguminosarum* y rizobios de maní bajo el incremento de la presión osmótica de hipersalinidad. Rizobios de crecimiento rápido de maní acumulan trehalosa en presencia de varias fuentes de carbono (manitol, sacarosa, o lactosa), pero los de crecimiento lento acumulan trealosa sólo cuando son cultivados con manitol como fuente de carbono. En un medio suplementado con 400 mM de NaCl, el contenido de trealosa se incrementó intracelularmente en la fase logarítmica y estacionaria de crecimiento de rizobio de maní. Los disacáridos sacarosa y ectoína son usados como osmoprotectores por *Sinorhizobium meliloti*. Sin embargo, estos compuestos, a diferencia de otros osmoprotectores bacterianos, no se acumulan como osmolitos citosólicos en células de *S. meliloti* con estrés salino. (González P. S., et al, 1995).

Una respuesta al estrés salino u osmótico recientemente identificado en rizobios es la acumulación intracelular de glicina betaína, la concentración de esta se incrementa más, en cepas tolerantes a la sal de *R. meliloti*, que las cepas sensibles. La adición de sales de sodio para bacteroides de nódulos

de *Medicago sativa* incrementó la actividad de captación de la glicina betaina agregada exógenamente. (Zaharán H., 1999).



Estrés salino, estrategias de adaptación de cepas para lograr la adaptación a condiciones adversas.

En los microorganismos del suelo, la respuesta a la hipersalinidad del suelo es crítica. Las bacterias halófitas son abundantes en ambientes como lagos salados, suelos salinos y productos alimenticios salados. La mayoría de las especies conservan sus concentraciones iónicas intracelulares a niveles bajos mientras se está acumulando o sintetizando solutos orgánicos para promover un equilibrio osmótico del citoplasma con el medio circundante. Mecanismos complejos de ajuste del ambiente intracelular y las propiedades de las membranas citoplasmáticas permiten una rápida adaptación a los cambios en la concentración salina del ambiente. (Ventosa A., et al, 1998).

La capacidad de organismos para responder a fluctuaciones en su medio osmótico es un proceso fisiológico importante que determina sus habilidades para prosperar en habitats variados. La respuesta primaria de la bacteria expuesta a un ambiente osmótico alto, es la acumulación de K^+ , glutamato, trealosa, prolina y glicina betaina, en concentraciones que son proporcionales a la osmolaridad del medio. La supuesta función de estos solutos es mantener la osmolaridad del citoplasma a un valor mayor que la osmolaridad del medio y de ese modo proveer a la célula de presión de turgor (turgencia) en el interior de las células. La acumulación de estos metabolitos se realiza por síntesis de novo o porque son tomados del medio. La producción de proteínas que median la acumulación o la toma de estos metabolitos esta bajo control osmótico. (Csonka L., 1989). En *Rhizobium leguminosarum*, el K^+ estimuló la actividad de la enzima trealosa (González P.S., et al., 1995). Un mecanismo común para la adaptación celular al estrés osmótico es la acumulación de solutos orgánicos en el citosol. Se ha utilizado RMN ^{13}C para identificar todos los solutos orgánicos que se acumula a niveles significantes en *Sinorhizobium meliloti*. Un nuevo dipéptido, amida N-acetilglutaminilglutamin (NAGGN), se acumula durante estrés osmótico. Sólo raramente los péptidos muestran función en la bacteria. (Smith LT, et al 1989).

Existen varios estudios respecto al comportamiento de los oligoglucanos periplasmáticos (OP) de algunas *Rhizobiaceae* sometidas a estrés salino, se ha demostrado que *Sinorhizobium meliloti* en esas condiciones sintetiza trealosa y sus derivados no reductores. Una especie autóctona de *Rhizobium* del grupo misceláneo, de nódulos de maní Blanco Manfredi 68 INTA sintetiza en medio control (CINa 1,71 mM) OP neutros con peso molecular alrededor de 3300 y unidad disacárida. Pero cuando la bacteria se cultivó en medios con salinidad creciente fue disminuyendo la

concentración de esos OP hasta desaparecer totalmente en CNa 400 mM, donde sólo se detectó un glucano de bajo peso molecular, cercano a un disacárido. Las características de los OP del nuevo cultivo coincidieron con las de las bacterias que crecieron originalmente en medio control. Esta reversión indica que el glucano de bajo PM, detectado solamente en hipersalinidad, es un osmoprotector. El osmoprotector sintetizado por *Rhizobium sp* simbionte del maní en hipersalinidad, es un diglucano neutro no reductor, algo más del 50% de las moléculas puede ser trealosa, y el resto un fosfodiéster de trealosa. (Ghittoni N. E. y Bueno M. A., 1992).

El estrés ambiental desempeña un importante papel en la limitación de los niveles de producción de leguminosas. Hasta hace una década, el estudio de este problema se focalizó en la identificación de los agentes productores de estrés y en la utilización de procedimientos los cuales, actuando a nivel químico o físico, pudieran disminuir los efectos adversos producidos por esos agentes. Se ha planteado como solución alternativa, el aislamiento y caracterización de cepas bacterianas y, en algunos casos, de variedades de leguminosas capaces de tolerar diferentes condiciones de estrés. Actualmente se están desarrollando estudios a nivel molecular acerca de los mecanismos sensores y de respuesta al estrés ambiental, así como sobre la interacción planta – bacteria en presencia de estos agentes. Se estudió el efecto de las condiciones de estrés sobre la expresión de un gen (*nodC*) que participa en el proceso de nodulación de alfalfa por *S. meliloti*. (Catalán A.I., et al, 1995).

La glicina betaína es un potente osmoprotector acumulado por *Sinorhizobium meliloti* para salir del estrés osmótico. La biosíntesis de glicina betaína desde la colina es codificada por un operón de cuatro genes, *betICBA*, determinado por secuenciación y análisis de mutantes. Los genes *betI* y *betC* son separados por una región intergénica conteniendo elementos mosaicos de 130 bp que además están presentes entre los genes *betB* y *betA*. Además se encontraron genes que están codificando una proteína presumiblemente regulatoria (*betI*), enzimas, que también se encontraron en *Escherichia coli*, como la betaína aldehído deshidrogenasa (*betB*), y la colina deshidrogenasa (*betA*), y un nuevo gen (*betC*) que fue identificado como codificante de la colina sulfatasa que cataliza la conversión de choline-*O*-sulfate y, a una velocidad más baja, fosforilcolina, a colina. La actividad de la colina sulfatasa estuvo ausente para mutantes del gen *betC* pero no para mutantes de *betB* y se mostró que puede ser inducido indiferentemente por colina o choline-*O*-sulfato, como lo fueron las otras enzimas de la vía. Diferente fue lo que se mostró en otras bacterias y plantas, la choline-*O*-sulfato no fue usada como osmoprotector per se en *S. meliloti*, pero es metabolizado a glicina betaína. *S. meliloti* también puede usar este compuesto como única fuente de carbono, nitrógeno o sulfuro para crecer y esto depende del locus funcional *bet*. La choline-*O*-sulfate y la

phosphorylcholine, las cuales fueron encontradas en plantas superiores y hongos, aparecen como sustrato para la biosíntesis de glicina betína en *S. meliloti*. (Østerås M, et al, 1999).

Las cepas de rizobio, excepto el *B. japonicum*, poseen actividad para captar colina y la pueden usar como fuente de carbono, nitrógeno y energía para crecer. Para *S. meliloti*, la habilidad para captar colina se expresa constitutivamente y está inhibida por osmolaridad elevada en cepas de rizobios, excepto para *M. Huakuii*, en el que se observó un efecto opuesto. La colina funciona como osmoprotector pero sólo en cepas donde se encontró que la glicina betaína es efectiva, esto es porque la colina es el precursor de la glicina betaína. Esto se ha demostrado para varias bacterias, incluyendo *S. meliloti* y otras bacterias del suelo como *B. subtilis*. Se encontró actividad de las enzimas CDH (colina deshidrogenasa) y BADH (betaína deshidrogenasa) en todas las cepas, excepto en *B. japonicum* y *M. huakuii*, las cuales pueden utilizar ambos glicina betaína y colina como componentes celulares o como osmoprotectores. (Boncompagni E, et al, 1999).

La colina cumple ambos roles nutricional y osmoregulador en *Sinorhizobium meliloti* (Bernard T., et al 1986). En vista de estos hechos, el transporte de colina fue estudiado en *Sinorhizobium meliloti* 102F34 para determinar como es modulada la cantidad de colina captada. Se encontraron una actividad de alta afinidad y otra actividad de baja afinidad en células crecidas en un medio mínimo. La adición de 0.3 M NaCl u otros osmolitos al medio dieron como resultado una marcada disminución en la actividad de alta afinidad, mientras que la actividad de baja afinidad permaneció constante. Además, resultados de experimentos de shock osmótico alto y shock osmótico bajo, indican que la respuesta de la célula a la osmolaridad alta es rápida. Una segunda actividad de alta afinidad de transporte fue inducida por la misma colina. Semejante a la actividad de transporte de baja afinidad constitutiva, esta actividad no fue alterada mayormente cuando las células fueron crecidas en un medio con elevada fuerza osmótica. Los tres sistemas de transporte cinéticamente distintos son eficientes a baja osmolaridad, sólo las actividades de alta y baja afinidad son importantes para la osmorregulación. (Pocard JA, et al, 1989).

La acumulación intracelular de glicina betaína ha sido mostrada para conferir un aumento en el nivel de tolerancia al estrés osmótico en *Sinorhizobium meliloti*. Una alta osmolaridad en el medio hace decrecer la actividad de la enzima involucrada en la degradación de la glicina betaína pero no de aquellas enzimas que lideran su biosíntesis desde colina. De ese modo, la concentración de osmoprotectores como glicina betaína se incrementaron en células estresadas. Esto demuestra la habilidad de la osmolaridad del medio de crecimiento para regular el uso de glicina betaína como fuente de carbono y nitrógeno o como osmoprotector (Smith L T, et al; 1988).



La glicina betaína es acumulada sólo transitoriamente como un osmolito citoplasmático en cultivos jóvenes de cepas salvajes 102F34 y RCR2011 de *Sinorhizobium meliloti*. Estas cepas acumulan glicina betaína como osmolito preferido el cual previene virtualmente de la acumulación de osmolito endógeno durante la fase lag y la fase exponencial temprana de crecimiento. Luego, los niveles de betaína en células estresadas decrecen abruptamente durante la segunda mitad de la fase exponencial. En este paso, los niveles de glutamato y de el dipéptido N-acetilglutaminilglutamina amida se incrementan activamente por esto los dos solutos endógenos reemplazan a la glicina betaína en cultivo envejecidos, por lo cual se vuelve un osmolito menor porque es progresivamente catabolizado. Finalmente, la glicina betaína desaparece cuando las células estresadas entran en la fase estacionaria. En este punto, las cepas salvajes de *S. meliloti* también acumulan el disacárido trealosa como tercer osmolito endógeno mayoritario. Por contraste, la glicine betaína es siempre el osmolito dominante y suprime fuertemente la construcción de osmolitos endógenos en todos los pasos del ciclo de crecimiento de una cepa mutante, *S. meliloti* GMI766, la cual no cataboliza este osmoprotector endógeno bajo cualquier condición de crecimiento. (Talibart R, et al, 1997).

La enzima colina oxidasa, aislada desde la bacteria del suelo *Arthrobacter globiformis*, convierte colina en glicinbetaína (N- trimetilglicina) sin requerimiento de ningún cofactor. El gen de esta enzima, designado *cod A*, fue clonado e introducido dentro de cianobacteria *Synechococcus sp.* PCC 7942. El gen *cod A* fue expresado bajo el control de un promotor constitutivo fuerte, y las células transformadas acumularon glicina betaína a niveles intracelulares de 60 – 80 mM. Consecuentemente las células adquirieron tolerancia al estrés salino, evaluado en términos de crecimiento, acumulación de clorofila y actividad fotosintética (Deshnium P, et al, 1995).

La sacarosa y ectoína (ácido carboxílico 1,4,5,6-tetrahidro-2-metil-4-pirimidina) son osmoprotectores muy usuales para *Sinorhizobium meliloti*. Estos compuestos, a diferencia con otros osmoprotectores de bacterias, no se acumulan como osmolitos citosólicos en células de *S. meliloti* en estrés salino. La sacarosa y la ectoína corresponden a una nueva familia de osmoprotectores sinorhizobiales que no son acumulados lo cual también abarca los seis disacáridos siguientes: trealosa, maltosa, celobiosa, gentiobiosa, turanosa, y palatinosa. Algunos de estos disacáridos son osmoprotectores exógenos muy efectivos para cepas de *Rhizobium leguminosarum* biovars *phaseoli* y *trifolii*. La sacarosa y la trealosa son sintetizadas como osmolitos endógenos en varias bacterias. Todos estos disacáridos que actúan como poderosos osmoprotectores en *S. meliloti* y *R. leguminosarum* también actúan como un competidor muy efectivo en la captación de sacarosa [¹⁴C] en cultivos de estas bacterias con estrés salino. Inversamente, los disacáridos que no fueron osmoprotectores para *S. meliloti* y *R. leguminosarum* no inhiben la captación de sacarosa en estas bacterias. Los osmoprotectores disacáridos nuevos no fueron acumulados a niveles osmóticamente

Faint, illegible text, possibly bleed-through from the reverse side of the page. The text is too light to transcribe accurately.

significativos en células *S. meliloti* estresadas por sal; mejor dicho, estos compuestos, como sacarosa y ectoína, fueron catabolizados durante el crecimiento exponencial temprano, y contribuye indirectamente para aumentar los niveles citosólicos de dos osmolitos sintetizados endógenamente, el glutamato y el dipéptido *N*-acetilglutaminilglutamina amida. Se ha demostrado que la sacarosa y la ectoína pertenecen a una amplia clase, los osmoprotectores no acumulados por *S. meliloti*. Los nuevos osmoprotectores de los sinorizobios son seis disacáridos (trealosa, maltosa, celobiosa, gentiobiosa, turanosa, y palatinosa), y un trisacárido, maltotriosa. Por otra parte, la sacarosa, trealosa, celobiosa, y maltosa también actúan como potentes osmoprotectores para varias cepas de *R. leguminosarum* bv. trifolii y phaseoli. Excepto sacarosa y trealosa, los otros cinco disacáridos y la maltotriosa no ha sido demostrado que participen en la osmoregulación. (Gouffi K, et al, 1999).

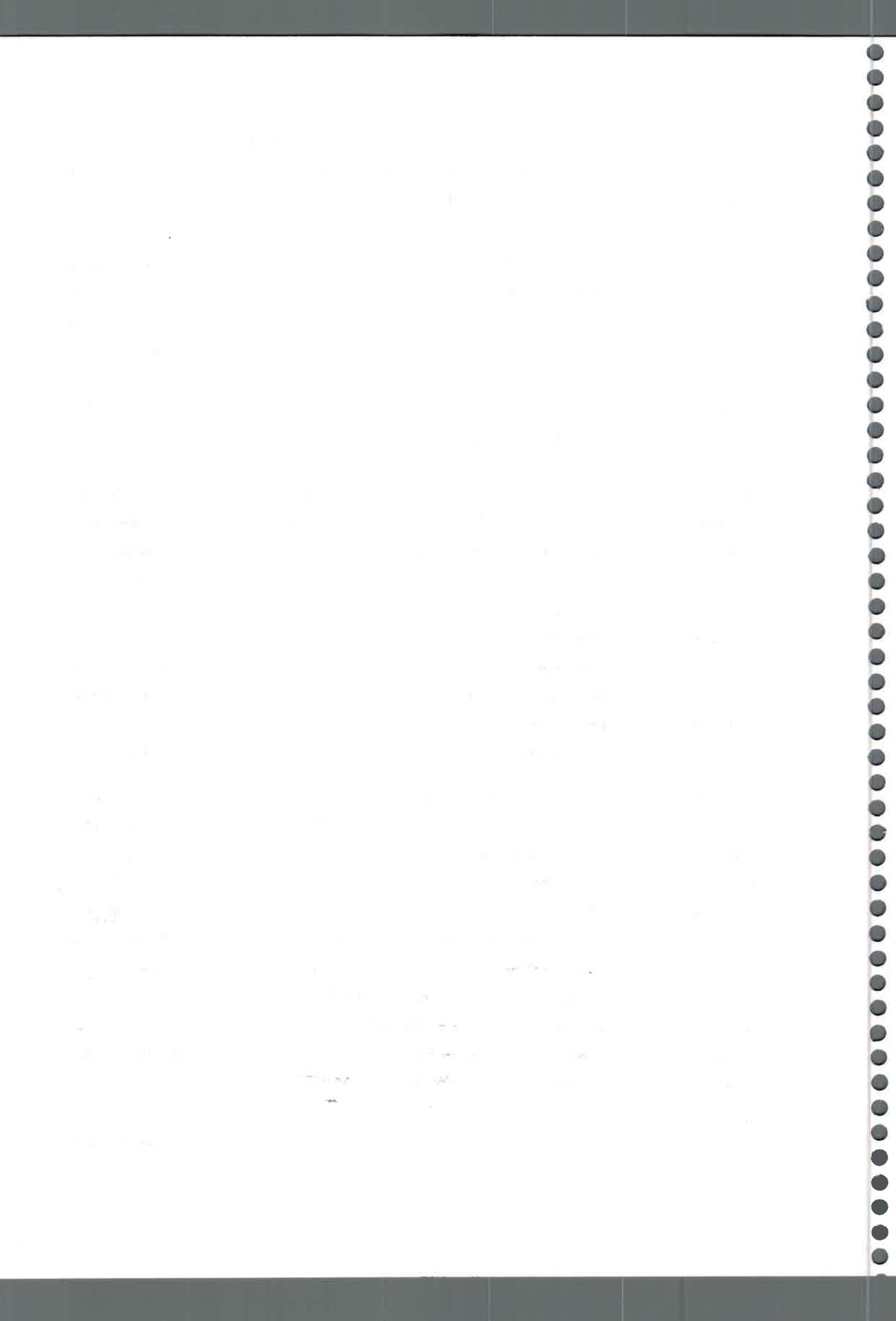
La ectoína pareció casi tan efectiva como la glicina betaína para incrementar el crecimiento del *R. meliloti* bajo condiciones osmóticas adversas (0.5 M NaCl). Por otra parte, se observó también el incremento en el crecimiento de cepas de rizobios insensibles a la glicina betaína. Está demostrado que el transporte de ectoína depende de una proteína periplasmática, y se demuestra por experimentos de competencia, distintos que para el transporte de glicina betaína. La osmolaridad del medio tiene un pequeño efecto en las características de captación, desde la velocidad de flujo que se incrementa de 12 a sólo 20 nmol min⁻¹ mg por proteína⁻¹ cuando las concentraciones de NaCl fueron elevadas de 0 a 0.3 o 0.5 M, con una constante de transporte de 80 μM. La ectoína, a diferencia de la glicina betaína, no se acumuló intracelularmente y, como consecuencia, esto no reprime la síntesis de solutos endógenos compatibles (glutamato, *N*- acetilglutaminilglutamina amida, y trehalosa). Además, el fuerte aumento en el contenido de glutamato en células osmóticamente estresadas en presencia de ectoína sugiere que, en lugar de estar involucrado en la restauración del balance osmótico, la ectoína debería jugar un rol de llave disparadora de la síntesis de osmolitos endógenos. Como resultado se cree que hay por lo menos dos clases distintas de osmoprotectores: aquellos como glicina betaína o glutamato, los cuales actúan como osmolitos genuinos, y aquellos como la ectoína, el cual actúa como intermediarios químicos. (Talibart R, et al, 1994).

El ácido pipecólico DL-Pipecólico (DL-PIP) promueve la restauración del crecimiento de células de *Sinorhizobium meliloti* revirtiendo la inhibición por hiperosmolaridad. Sorpresivamente, los isómeros D y L de estos imino ácidos suplementados separadamente no fueron efectivos. La captación de L-PIP fue favorecida significativamente en presencia del isómero D y por estrés hiperosmótico. L-PIP participa en la síntesis de los osmolitos endógenos más importantes (glutamato y el dipéptido *N*- acetilglutaminilglutamina amida) durante la fase lag, esto adquiere significado para las células estresadas para recuperar el balance osmótico. La presencia de los dos

isómeros de la misma molécula son necesarios para manifestar la actividad osmoprotectiva. Sin duda, D-PIP parece que juega un rol mayor en la osmoadaptación celular, a través de ambos su propia acumulación e incremento de la utilización del isómero L como inmediato precursor de osmolitos endógenos. (Gouffi K, et al, 2000).

Como primer paso para la elucidación de los mecanismos moleculares responsables para la utilización de la colina y glicina betaína (betaína) como fuente de carbono y nitrógeno o como osmoprotectores en *Sinorhizobium meliloti*, se seleccionó un mutante de Tn5, LTS23-1020, el cual no crece con colina pero sí crece con betaína. El mutante fue deficiente en la actividad de la colina deshidrogenasa (CDH), fallando en la oxidación de [methyl- 14C]colina a [methyl-14C]betaína, y no usa colina, pero puede usar betaína, como osmoprotector. La mutación en LTS23-1020 de Tn5 fue complementada con el plásmido pCHO34, aislado de un banco genómico de *S. meliloti* 102F34. Subclonaciones y secuenciado de DNA mostró que pCHO34 contiene dos ORFs los cuales mostraron 60 % y 57 % de identidad con el gen *betB* de *Escherichia coli* que codifica betaína aldehído deshidrogenasa (BADH) y el gen *betA* codifica CDH, respectivamente. En adición con la homología con genes de *E. coli*, la secuencia deducida participa en la proteína sinorhizobial CDH solo con una identidad de 21 % de residuos de colina oxidasa para *Arthrobacter globiformis*. La organización estructural de los genes *betBA* en *S. meliloti* difiere de aquellas descritas en *E. coli*: (i) los dos ORFs son separados por una secuencia de 210 bp conteniendo invertido repeticiones asemejando un falso terminador de transcripción rho eficiente, y (ii) no hay secuencias homólogas para *betT* (sistema de transporte de colina altamente eficiente) o *betI* (regulador) que fue encontrado en la vecindad de los genes sinorizobiales *betBA*. La evidencia es también presentada como que los genes *betBA* de *S. meliloti* no están localizados en megaplásmidos. (Pocard JA, et al, 1997).

Se comprobó que el estrés hídrico y salino inhiben la nodulación en el sistema guar – *Bradyrhizobium sp.* GB2, (simbionte nativo). Las condiciones de estrés podrían afectar las primeras etapas de la simbiosis, el reconocimiento planta – microorganismo en la cual se requiere la expresión de los genes *nod* presentes en la bacteria. Estos genes son activados por moléculas señales secretadas por la planta, flavonoides o compuestos relacionados derivados del metabolismo de los fenilpropanoides, los cuales también están involucrados en la defensa de la planta. Los flavonoides son liberados como agliconas o conjugados glicosídicos, estos últimos son menos activos pero tienen una alta solubilidad en agua y pueden ser convertidos a la forma activa por glicosidasas bacterianas. Las condiciones de estrés producen cambios a nivel de exudados radicales que permitirán o no la transcripción de genes *nod*. Se estudiaron exudados radiculares liberados por guar ante situaciones de estrés hídrico y salino generado por PEG (polyetilenglicol) 6000 y ClNa,



como agentes osmóticos y la activación de los genes nod utilizando cepas isogénicas. (Soria R., et al;1995).

El estrés salino limita el rendimiento de las leguminosas, especialmente el proceso de fijación del nitrógeno. El aislamiento y caracterización de cepas tolerantes a condiciones de estrés puede predecir el comportamiento de dichas comunidades en suelos y su interacción con la planta, para su posterior introducción en áreas desfavorables.

Cepas de *Bradyrhizobium sp.* tolerantes a salinidad (88 mM, 264 mM y 440 mM NaCl) fueron caracterizadas según: análisis de DNA cromosomal utilizando la técnica Rep – PCR, utilización de 95 fuentes carbonadas por el método BIOLOG GN, tipo de metabolismo, determinación de exopolisacáridos, producción de sideróforos, solubilización de fosfatos, perfil plasmídico, perfil protéico y lipídico. En general, los tolerantes a salinidad aumentaron su capacidad de adaptación con respecto a la cepa nativa, *Bradyrhizobium GB2*, a través de mayor capacidad de oxidar fuentes de C, a excepción de los tolerantes a mayor concentración de NaCl, incremento en la velocidad de crecimiento y producción de exopolisacáridos involucrados en adhesión. Algunos tolerantes perdieron un plásmido de alto peso molecular sugiriendo que la salinidad puede comportarse como agente de curado. Se observaron alteraciones cualitativas y cuantitativas a nivel de membranas cuando se determinaron lípidos, proteínas y carbohidratos totales. Algunos tolerantes han adquirido capacidad PGPR solubilizando Fe y P. (Barboza F., et al; 2000.).

La caracterización e identificación de cepas de rizobia es uno de los mayores problemas en la experimentación a campo, más aún, con aquellas que han sido seleccionadas bajo situaciones de estrés y pueden haberse diferenciado de la cepa original. Cepas de *Bradyrhizobium sp.* crecieron hasta una concentración de 170 mM de NaCl, pero la nodulación se vio afectada por encima de 100 mM de NaCl. Se mostró que las cepas tolerantes presentaron aumento en la velocidad de crecimiento como así también alteraciones a nivel de membrana observados al determinar lípidos, proteínas y carbohidratos totales. Cepas tolerantes a 0,5 % y a 1,5 % de NaCl perdieron un plásmido de alto peso molecular, sugiriendo que NaCl puede actuar como agente de curado (Barboza F., et al; 1995).

En Túnez, la producción de forrajes, particularmente en zonas marginales, está limitada por la sequía y la salinidad que afecta al 10 % o más de los suelos. Se recolectaron 462 aislamientos locales de *Sinorhizobium* y fue estudiada su tolerancia a medios salinos, in vitro, y el efecto del NaCl en sus interacciones con *Medicago sativa cv. Gabes*. Se identificaron tres grupos (tolerantes a la sal, sensibles e intermedios), dentro de los cuales hay cuatro aislamientos que fueron tolerantes in vitro a concentraciones de NaCl 0,7 M. El análisis del perfil de plásmidos de 12 aislamientos

presenta diferentes sitios y grados de tolerancia a salinidad, in vitro, y mostraron patrones con uno, dos y tres bandas. Todos los aislamientos poseen por lo menos un megaplásmido de 1,500 Kb característico de *Sinorhizobium meliloti*. La tolerancia a la salinidad de 12 aislamientos no se correlacionan con sus perfiles plasmídicos. Los patrones de restricción de ADN total mostraron diferencias entre cepas de *Sinorhizobium*. El efecto de la sal en la asociación entre *Medicago sativa* cv. *Gabes* y 6 cepas de *Sinorhizobium* se estudiaron con la determinación de materia seca de plantas con diferentes tratamientos. La inoculación con aislamientos locales de *Sinorhizobium* da como resultado un crecimiento mejor de *Medicago* que la cepa que se usa como referencia (SU47). Las altas concentraciones salinas provocaron una disminución en el crecimiento de la planta y en la nodulación para todas las asociaciones. (Jebara, M; et al, 2000)

La caracterización de nueve transposones para inducir mutantes de *Rhizobium tropici* con el decrecimiento de la tolerancia a la sal (DST) permitió la identificación de ocho loci de genes requeridos para la adaptación a altas concentraciones externas de NaCl. La mayoría de los genes también fueron involucrados en la adaptación al medio hiperosmótico y fueron requeridos para superar la toxicidad del LiCl. De acuerdo a sus posibles funciones, los genes identificados pueden ser clasificados en tres grupos. El primer grupo incluyó dos genes involucrados en la regulación de la expresión de genes, como el ntrY, el elemento sensor del sistema regulatorio de dos componentes ntrY/ntrX, involucrado en la regulación del metabolismo del nitrógeno, y greA, el cual codifica el factor de transcripción de elongación. El segundo grupo incluyó genes relacionados para síntesis, ensamblaje, o maduración de proteínas, como también el alaS codificando para alanina – tRNA sintetasa, dnaJ, el cual codifica una molécula chaperona, y un homólogo de nifS probablemente codificando una cisteína desulfurasa involucrada en la maduración de proteínas Fe-S. Los genes relacionados con el ensamblado y mantenimiento estaban en el tercer grupo, tal como un homólogo del noeJ, codificando una manosa – 1 – fosfato guanililtransferasa probablemente involucrada en la biosíntesis de lipopolisacáridos, y *kup*, especificando una proteína de membrana interna involucrada en la captación de potasio. Otros genes fueron identificados, pero no tuvieron homología con genes conocidos, pero esto podría ser conservado en otros rizobios. Cuando son inoculados en *Phaseolus vulgaris* creciendo bajo condiciones no salinas, todos los mutantes DST mostraron defectos simbióticos severos: mutantes de ntrY y noeJ fueron dañados en la nodulación, y los mutantes sobrantes formaron simbiosis con una actividad nitrogenasa muy reducida. Los resultados sugirieron que la habilidad de la bacteria para adaptarse al estrés hiperosmótico y salino es importante para la función del bacteroide como fijador de nitrógeno dentro del nódulo de la leguminosa y provee evidencia genética sosteniendo la sugerencia que el rizobio hace frente a los



cambios severos del medio ambiente luego que ellos se liberan dentro de las células de las plantas.(Nogales J., et al, 2002).

Las plantas leguminosas son hábiles para establecer simbiosis para fijación de nitrógeno con ciertas bacterias Gram – negativa, conocida como rizobio. En la simbiosis *Rhizobium* – leguminosa, el proceso de fijación de nitrógeno está fuertemente relacionado al estado fisiológico de la planta hospedante. Sin embargo, una cepa eficiente de rizobio no se espera que se exprese en su capacidad completa para la fijación de nitrógeno si factores limitantes imponen limitaciones en el vigor de la leguminosa hospedante. Varias condiciones ambientales son factores limitantes para el crecimiento y la actividad de la fijación de nitrógeno en las plantas. Ambientes típicos estresados, frente a leguminosas noduladas y sus socios simbióticos, debe incluir estrés hídrico, salinidad, pH del suelo, temperatura, metales pesados, y así sucesivamente. La salinidad es una amenaza seria para la agricultura en regiones áridas y semiáridas. La infertilidad de los suelos en estas áreas a menudo es debido a la presencia de altas cantidades de sal. Las leguminosas fijadoras de nitrógeno tolerantes a la salinidad representan una alternativa para aumentar la fertilidad. En general, las leguminosas son más sensibles a la salinidad que sus rizobios complementarios y, consecuentemente, la simbiosis es más sensible al estrés salino que los rizobios viviendo libres. El estrés salino puede inhibir los pasos iniciales de la simbiosis (iniciación del nódulo, infección del nódulo, y desarrollo) pero esto también posee un efecto depresivo en la fijación de nitrógeno. Sin embargo, la tolerancia a la salinidad de los rizobios también es importante para la simbiosis. El incremento de las concentraciones de sal puede tener un efecto en detrimento en las poblaciones de rizobio como resultado de una toxicidad directa así como a través del estrés osmótico. Los rizobios muestran una marcada variación en la tolerancia a la sal, pero no está claro que los rizobios que son tolerantes a la sal sean mejores fijadores de nitrógeno que aquellos que son sensibles a la sal en un ambiente salino. Muchos reportes han demostrado que cepas altamente tolerantes son simbióticamente más efectivas que las sensitivas a salinidad bajo un estrés salino. La mayor crítica que se realizó a los datos reportados son las diferencias en la eficiencia simbiótica, y pudo ser producida por las variaciones genotípicas que no están relacionadas con la tolerancia a la sal. Sin duda, en algunas experiencias se han usado cepas isogénicas o isogénicas cercanas con respecto a la tolerancia a la sal y la eficiencia en la simbiosis. Por ejemplo, Chien, et al (1992) describieron que mutantes espontáneos de una cepa de *Rhizobium leguminosarum* sensibles a la sal, pero con una tolerancia a la sal mayor, indujeron nódulos en *Vicia faba* que era deficiente en la actividad nitrogenasa. En contraste, el trabajo de Ohwada, et al, (1998) mostraron que un mutante inducido con un transposón de *Sinorhizobium fredii* con reducida tolerancia al NaCl formó simbiosis inefectiva en soja. En ninguno de éstos dos casos fueron caracterizados los genes involucrados. El *Rizobio* puede usar

distintos mecanismos para la adaptación osmótica en estrés salino, así como la acumulación intracelular de solutos orgánicos de bajo peso molecular (osmolitos), incluyendo aminoácidos, azúcares y poliaminas, o la acumulación de iones (ej K^+). Otras respuestas inducidas por sal en los rizobios son cambios en la morfología y tamaño de la célula o modificaciones en el patrón de polisacáridos extracelulares (EPS) y lipopolisacáridos (LPS). La respuesta tardía puede tener un impacto en la interacción simbiótica porque los EPS y LPS son muy importantes para el desarrollo de nódulos de raíz. Sin embargo, la respuesta y la adaptación al estrés ambiental es probablemente un fenómeno complejo involucrando varios procesos fisiológicos y bioquímicos que probablemente se reflejan en cambios en la expresión de genes.

Cepas rizobiales de *R. tropici* CIAT899 que forman simbiosis efectiva con *Phaseolus vulgaris* y árboles de *Leucaena* CIAT899 han demostrado tolerancia a varios estrés abióticos, incluyendo alta temperatura, bajo pH, o salinidad. Se han identificado ocho locis diferentes de genes involucrados en la tolerancia de CIAT899 al estrés salino (NaCl). La mayor parte de éstos genes se requieren para la adaptación al medio hiperosmótico. Todos los genes parecen ser muy importantes para establecer una simbiosis eficiente en la fijación de nitrógeno con la leguminosa huésped.(Nogales J., et al, 2002).

Características de suelos salinos.

Se define como suelos salinos a aquellos que contienen suficiente sal soluble para reducir su productividad y que no son alcalinos; es decir, suelos cuyo pH no es igual ni superior de 8,5 y cuya cantidad de sodio presente es tal, que no interfiere con el crecimiento de las plantas (se considera que el nivel crítico de Na en este aspecto es el de 15 % de la capacidad de intercambio catiónico. La solución saturada de los suelos salinos tiene una presión osmótica mayor que 1,5 bar.

Estos suelos son comunes en regiones semiáridas o áridas, son el resultado del proceso de salinización, es decir, de la acumulación de sales. Este último fenómeno también puede tener lugar en regiones próximas a las costas marinas, debido a la intrusión de agua de mar, la que por evaporación repetida depositará sales en cantidades perjudiciales.

En condiciones continentales, los suelos salinos se producen por ascenso capilar de aguas freáticas ricas en sales solubles y su depósito por evaporación, o por la acumulación de sales que dejan las aguas de riego con alto contenido de ellas, cuando el lavado del suelo es deficiente, ya sea por falta de agua o por mal drenaje. También debe considerarse como fuentes de sales la meteorización de minerales, las sales depositadas hace largos períodos y, en un pequeño grado, las lluvias; estas últimas contribuyen con sales, especialmente en las áreas cercanas a los mares.

Igualmente importante es la presencia de suelos salinos y sódicos en valles de ríos.

El contenido de sales en los suelos no es uniforme, sino que varía en sentido horizontal, vertical y en el transcurso del año. Los problemas se presentan frecuentemente, en forma de manchas en los campos.

Los suelos salinos de tierra firme, en general, tienen bajos contenidos de N y P, pero disponen de abundante K. Existen también suelos salinos orgánicos y suelos salinos calcáreos.

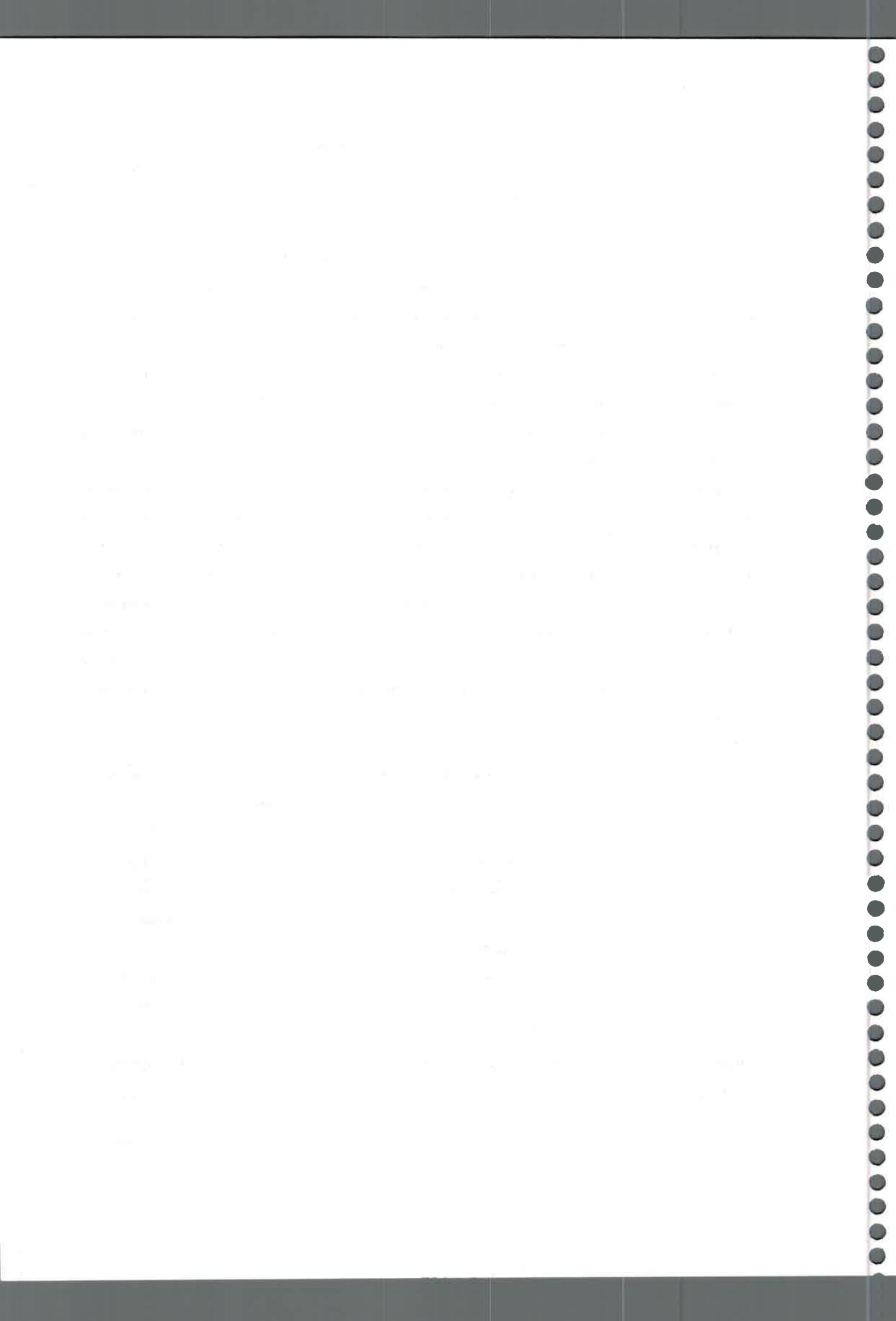
Para efectos de suelos se consideran sales solubles, aquellas cuya solubilidad es mayor que la del yeso (2,41 g.l⁻¹). Los cationes principales en las sales solubles son el Na⁺, el Ca⁺² y el Mg⁺² pero, en general, también se encuentran menores niveles de K⁺ y de NH₄⁺. Los aniones comunes son el cloruro y el sulfato con cantidades menores de carbonato ácido, de nitrato y, con niveles altos de pH del carbonato. En proporciones mucho menores, pero con gran influencia, se presenta el borato que es fuertemente fitotóxico.

Lo característico en suelos salinos es que tengan niveles elevados de sales solubles. Se observó que la acción se debe al efecto osmótico de la salinidad total y que su composición es, en general, de importancia menor. Por lo tanto, la salinidad de los suelos se mide por la conductividad del extracto acuoso saturado, el cual se expresa en milisiemens (mS) por centímetro; o milimho por centímetro. Se ha observado una serie de efectos sistemáticos entre el aumento de la conductancia de los extractos saturados y los problemas en suelos. Los efectos se detallan en el Tabla 1, los cambios son graduales, como se observa en él, suelos con conductividad mayor de 4 mS.cm⁻¹ son considerados salinos. Las condiciones favorecen la acumulación de sales cuando la precipitación anual es menor de 400 mm.

Tabla 1. Clasificación de los suelos en función de los valores de conductividad.

Conductividad (mS.cm⁻¹)	Efecto sobre cosecha	Presión osmótica	Clasificación
0 - 2	Comúnmente despreciable	0 - 1	No salino
2 - 4	Cultivos muy sensibles afectados	1 - 2	Poco salino
4 - 8	Muchos cultivos afectados	2 - 4	Medianament e salino
8 - 16	Solamente cultivos tolerantes crecen bien	4 - 8	Muy salino
> 16	Solamente crecen cultivos muy tolerantes	> 8	Extremadame nte salino

Muchos suelos salinos deben su origen a sistemas de riego mal administrados, los que dan por resultado aguas de drenaje que eliminan menos sales de las que se añaden en el riego, restando a



este último lo adsorbido en la cosecha. La diferencia permanece en el perfil del suelo y, según su cantidad, provocará una salinización más o menos rápida. La aplicación de excesos de riego puede reducir este problema, aunque sólo se efectúe por períodos cortos; esto será así, especialmente si un adecuado sistema de drenaje elimina las aguas de alto contenido de sal.

La influencia de la salinidad es comúnmente mayor sobre las plantas jóvenes y sobre el crecimiento vegetativo que sobre las plantas maduras y su producción de granos. El efecto de la salinidad depende, entre otros factores, de la humedad del suelo, decreciendo con la mayor dilución de suelos inundados.

El efecto de las sales sobre las propiedades físicas de los suelos es positivo, ya que permiten la floculación. Como consecuencia su permeabilidad es por lo menos igual, y a veces incluso mayor que la de los suelos similares no salinos. Por lo mismo su aereación es adecuada, fomentando un buen crecimiento de raíces. Esto es muy importante porque muchos suelos salinos son de textura fina y a menudo tienen capas impermeables.

En lo que se refiere a los efectos químicos, estos dependen de los iones presentes. Se sabe que los excesos de iones pueden causar toxicidad; por ejemplo, el Cl^- es tóxico para muchas especies poco tolerantes, cuando su concentración en la solución del suelo excede $0,5 \text{ cmol.L}^{-1}$, mientras que las plantas resistentes soportan unas cinco veces este nivel (Fassbender H.W., Bornemisza E., 1987).

La alfalfa (*Medicago Sativa*) y las concentraciones salinas limitantes para su desarrollo.

Concentraciones salinas de 350-400 mmol/l en el medio germinativo inhibirán la germinación, pero los cultivares más tolerantes alcanzan altos porcentajes de germinación a 400 mmol/l. Además la temperatura y la concentración de sales interactúan con un potencial osmótico negativo mayor que $-0,7 \text{ MPa}$ inhiben la germinación, especialmente a temperaturas por encima de 27° C (Colins M., et al, 1989; Mc Kimmie T. and Dobrenz A. K., 1991).

Muchos suelos tienen una elevada concentración de sales (generalmente sódicas), afectando el crecimiento de las plantas. Las leguminosas varían ampliamente en respuesta a la salinidad, desde extremadamente sensibles a especies tolerantes. Algunas responden a la condición salina mediante la exclusión de sodio por las hojas. La evaluación de leguminosas para suelos salinos debe considerar su resistencia relativa a la capacidad de fijación. También se ha demostrado que el establecimiento de la simbiosis (nodulación) es altamente sensible al estrés por sales. Además, la salinidad tiene efectos adversos en la nutrición de calcio y potasio. (Schröder E., 1995)

Los factores abióticos, entre ellos la baja disponibilidad hídrica de los suelos y la salinidad, regulan la población de los rizobios. La mayor parte de los cultivos son sensibles a altos niveles de salinidad

y en el caso de las leguminosas existe un problema adicional porque no solo la planta sino también la bacteria simbiótica se ve afectada. Se ha estimado que el 23% de los suelos agrícolas son afectados por problemas relacionados a alta salinidad. (Lloret et al., 1995).

La selección de células de alfalfa tolerantes a concentraciones salinas relativamente altas en el medio de cultivo también ha sido practicada con cierto éxito. La línea Regen-S fue capaz de tolerar concentraciones de NaCl de hasta 62,5 mM. Desafortunadamente, su capacidad de regeneración se vio severamente afectada. (Basigalup D. H. y Hijano E. H, 1995).

Las respuestas de las plantas al estrés hídrico y salino tienen mucho en común. La salinidad reduce la habilidad de las plantas para captar el agua, y esto causa una reducción en la velocidad de crecimiento, con una serie de cambios metabólicos idénticos a aquellos causados por el estrés hídrico. La reducción inicial en el crecimiento del vástago es probablemente debido a las señales hormonales generadas por las raíces. También debe haber efectos específicos que ocasiona la sal que luego tienen un impacto en el crecimiento; si cantidades excesivas de sal entran a la planta, la sal podría eventualmente elevarse a niveles tóxicos en las hojas más viejas que están transpirando, causando una senescencia prematura, y de éste modo se reduce el área fotosintética de las hojas de la planta a un nivel al cual no puede sostener el crecimiento. Las plantas tolerantes a la sal difieren de las sensibles en que tienen una velocidad baja en el transporte de Na^+ y Cl^- a las hojas, y la habilidad para compartimentalizar éstos iones en vacuolas para prevenir sus construcciones en el citoplasma o paredes celulares para evitar la toxicidad por sal. Se ha tratado de identificar genes que controlan el transporte de sal a través de las membranas, esto es importante para evitar tratamientos que inducen la plasmólisis de células, y para diseñar experimentos que distinguen entre la tolerancia a la sal y el estrés hídrico. (Yeo A., 1998; Munnis R., 2002).

Características de la variedad de alfalfa Salinera INTA.

En el desarrollo de esta especie intervinieron la Estación Experimental Agropecuaria La Banda (Santiago del Estero) y la Estación Experimental de Anguil (La Pampa). El material inicial proviene de las variedades MOAPA, CALIENTE y un germoplasma seleccionado en la variedad DAWSON.

Los caracteres agronómicos de esta variedad son los siguientes:

La variedad responde al tipo de alfalfa sin latencia invernal, con alto potencial de recuento, aun en suelos salinizados. La planta es de porte intermedio, erecta, altura promedio de 70 cm, corona angosta, raíz pivotante, tallos regulares huecos, hojas de color verde normal y foliosidad regular. Las flores son de color púrpura claro con frutos de 3 o más espiras, destacándose su alto potencial para la producción de semilla.

Características principales de la especie:

- Resistencia al pulgón verde (*Acyrtosiphon pisum*).
- Productividad semillera: el material proveniente del ciclo de selección por resistencia al pulgón verde se prueba con polinización libre y se evalúa la producción de semilla en las plantas provenientes de Moapa. Aquellos clones con más de 70 gr en plantación de 50 x 50 cm, se someten al segundo ciclo en Anguil, contra pulgón verde.
- Tolerancia a suelos salinos – sódicos: la semilla obtenida de plantas sobrevivientes a pruebas con pulgón verde se sembró en suelos salinos sódicos con tendencia al anegamiento donde la conductividad eléctrica se mantuvo por encima de los 8 milimhos. Semillas de plantas que progresaron normalmente se volvieron a sembrar en igual ambiente edáfico. Luego se sembraron en suelos del área de riego con salinidad promedio de 12 milimhos.
- Producción de materia verde: con el fin de evaluar su comportamiento respecto al material original de MOAPA y la influencia de la productividad de semilla, se realizó un ensayo desde 1978, con tres conjuntos de los clones seleccionados: bajo rendimiento de semilla, alto recuento de semilla y la mezcla de 28 clones de MOAPA que intervinieron en la evaluación semillera.

La variedad Salinera INTA debe ser considerada, como una variedad de alta resistencia a pulgón verde, elevada producción, carente de reposo invernal y especial adaptación a suelos salinos sodicos como las áreas de riego de los Río Dulce y Salado en Santiago del Estero. En condiciones normales, sin salinidad, en ensayos que aproximadamente duran cuatro años, los rendimientos anuales son variables, dependiendo de la posibilidad de riegos, que en general van de 4 a 6 riegos por año. El rendimiento promedio de los ciclos de 4 años es aproximadamente de 12 tnMS/ha, con producciones máximas que oscilan entre los 17 tnMS/ha año y mínimas de 8 TnMS/ha.año. Las producciones por corte según la época varían de menos de 1 tnMs/ha a 3 tn/MS/ha. (Cornacchione, M, comunicación personal).

OBJETIVOS

La pérdida de calidad en los suelos es una preocupación, principalmente en zonas en que se advierte un acelerado proceso de deterioro de componentes del suelo, esto adquiere más relevancia en ambientes frágiles como son los de la región semiárida y subhúmeda pampeana. (Hijano, E.H, Basigalup, D.; 1995).

Se ha producido un deterioro físico de los suelos principalmente por la destrucción de agregados y dispersión que los tornan más sensibles a los efectos de las lluvias, los vientos y al efecto de la labranza (compactación). Además el uso intensivo de los suelos sin una adecuada rotación de cultivos ha producido una reducción en los contenidos de los principales nutrientes como nitrógeno y fósforo, fenómeno que se intensifica en aquellos que han sufrido inundaciones con la consecuente salinización de los mismos. (Romero, N. A, et al; 1995).

En razón de la problemática planteada, y enfocando el estudio en la deficiencia de nitrógeno, como nutriente esencial de cultivos y de mayor necesidad aún en las leguminosas se plantea como **hipótesis** que se pueden lograr cepas de *S. meliloti* resistentes a estrés salino, sin pérdidas de sus propiedades simbióticas.

Los **objetivos** están orientados a:

- desarrollar una metodología biotecnológica que asegure la adaptación de *S. meliloti* a condiciones de estrés por salinidad;
- evaluar las propiedades de infectividad y efectividad de los microorganismos adaptados para asegurar la fijación de nitrógeno atmosférico como producto de su simbiosis con *Medicago sativa* que es la leguminosa de forraje que mayoritariamente se emplea en la región en estudio.

MATERIALES Y METODOS

Ensayo de efectividad e infectividad en la nodulación con cepas que se aislaron en Río Cuarto (Córdoba), en cámara climatizada.

Este ensayo se realizó con el objetivo de determinar cuales de los aislamientos obtenidos por el Laboratorio de Fisiología Vegetal de Río Cuarto presentaban mayor capacidad infectiva y eran efectivas en el proceso de nodulación y fijación

El ensayo se realizó con 9 cepas identificadas como 1, 2, 4, 6, 7, 14, 15, 19 y 23. A estas cepas se las hizo crecer en medio para *Sinorhizobium meliloti* de concentración normal (Tabla 2 (B)).

Tabla 2: Medio de cultivo de *Sinorhizobium meliloti*, concentración de NaCl 1,71 mM, concentración normal.

COMPONENTES	MANTENIMIENTO (A)	INOCULO (B)
	g	g
K ₂ HPO ₄	0,5 g	0,5g
KH ₂ PO ₄	0,5 g	0,5g
MgSO ₄	0,2 g	0,2 g
NaCl (1,71 mM)	0,1g	0,1g
MnSO ₄ (10 %)	2 gotas	2 gotas
FeCl ₃ .6H ₂ O (10 %)	2 gotas	2 gotas
Sacarosa	5 g	5 g
Extracto de levadura	2 g	2 g
Rojo Congo	10 ml	-
Agar	15 g	
Agua Destilada	1000 ml	1000 ml

pH 6,8 antes de esterilizar

Tabla 3: Modificaciones realizadas en la concentración de NaCl para el medio de cultivo de *Sinorhizobium meliloti*.

COMPONENTE	MANTENIMIENTO (A)	INOCULO (B)
	g / l	g / l
NaCl (85,5 mM)	5 g	5 g
NaCl (256 mM)	15 g	15 g
NaCl (427 mM)	25 g	25 g

Las semillas de alfalfa utilizadas fueron de la variedad WL 323 de Cargill que corresponden al grupo 5-6 grados de reposo invernal.

Las semillas se lavaron sucesivamente con etanol 95 % 30 segundos, con HgCl_2 al 0,2 % en medio clorhídrico (3 – 4 minutos) y con agua esterilizada (5 veces), luego se colocaron para germinar en cajas de Petri con discos de papel de filtro humedecido. Se sembraron dos semillas por tubo que contienen Medio Jensen (Tabla 4), cuando éstas habían desarrollado aproximadamente 5 mm de radícula con ayuda de ansa y en condiciones de esterilidad, se sembraron de modo que el extremo de la radícula quedara debajo de la superficie del agar. La inoculación se realizó el quinto día después de la siembra, cuando se observó un desarrollo uniforme de las plántulas. Los tubos se colocaron en soportes de madera de modo que la superficie del agar coincidiera con el borde del soporte, para proteger a las raíces de la luz. La disposición de los tubos fue al azar. Se usó iluminación lateral empleando doble hilera de tubos GroLux por sus emisiones altas entre 600 – 700 nm (favorecen la fotosíntesis) y 400 – 500 nm (favorecen la síntesis de clorofila). El fotoperíodo se controló con reloj automático de modo de tener 16 hs diarias de luz. La temperatura se mantuvo controlada en el rango de 22 – 25 °C para la luz y 16 – 19 °C en oscuridad.

Se realizaron cinco repeticiones con dos plantas por cada tubo, hicieron un total de 10 plantas, por cepa para determinar la efectividad de las mismas. Se prepararon dos testigos. Uno de los testigos con el agregado de una solución de NO_3K 0,05 % y el otro sin agregado de nitrógeno.

Tabla 4. Medio Jensen.

Componentes	g
PO_4HCa	1 g
PO_4K_2	0,2 g
$\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,2 g
NaCl	0,2 g
FeCl_3	0,1 g
Agar	12 g
Agua destilada	1000 ml

pH 6,5 – 7

Determinación de Peso Seco.

Se cosecharon las plantas que se desarrollaron en medio Jensen. Se pusieron a secar en estufa con circulación de aire a 65° C hasta peso constante. Se pesaron y se calculó por diferencia de pesada los gramos de materia seca producidos.

Determinación del contenido de nitrógeno total y proteína bruta (Método KJELDHAL).

Para la determinación del porcentaje de nitrógeno se pesó 0,1 g de muestra sobre papel y se agregó un catalizador (óxido de mercurio) y un elevador de la temperatura de ebullición (sulfato de potasio), con el agregado de ácido sulfúrico se logra que el Nitrógeno se mineralice a Sulfato de amonio. Se digitaron las muestras durante una hora. Luego se realizó la destilación y titulación en equipo automático KJELTEC (analizador Kjeltec 1030).

Microorganismos seleccionados para su adaptación a estrés salino.

Se utilizaron tres cepas aisladas y probadas de la región semiárida pampeana: Lq 51, Lq 42 y Lq 22, (Grassano A., et al, 2002), las cepas seleccionadas de Río Cuarto: 4, 6, 15 y 23 y la cepa B399 como patrón.

Mantenimiento, crecimiento y adaptación.

Los microorganismos se mantuvieron en tubos con agar inclinado conteniendo el medio de concentración normal (1,71 mM en NaCl), se detalla en la Tabla 2 (A) su composición. Las cepas se hicieron crecer repetidamente en placas de Petri entre cinco y ocho veces hasta lograr crecimiento masivo y constante para cada concentración con medio para *Sinorhizobium meliloti*, con diferentes concentraciones de NaCl 85,5mM, 256 mM y 427 mM, que corresponden a valores de NaCl de 0,5 %, 1,5 % y 2,5 % según lo recomendado en bibliografía (Ghittoni, N., Bueno M., 1992; Jebara, M., et al, 2000). De estas placas se hicieron repiques en tubos con agar inclinado, con las tres concentraciones de NaCl, para mantenerlas hasta ser utilizadas.

Desarrollo en medio líquido.

El medio con la concentración de NaCl que se utiliza habitualmente, 1,71 mM para el inóculo, se detalla en la Tabla 2 (B). Para iniciar el ensayo se siembran con ansa de platino, partiendo de los tubos con agar inclinado, erlenmeyers de 250 ml de capacidad con 50 ml de medio base para inóculo. Se usa esta relación de 1/5 de volumen de líquido, para conseguir así una correcta aeración de los cultivos. Una vez sembrados los erlenmeyers se colocan en agitador rotatorio a 250 rpm y 2,5 cm de excentricidad en cuarto estufa a 30° C.

Se midió la conductividad de los inóculos con las diferentes concentraciones de NaCl (1,71 mM, 85,5 mM, 256 mM y 427 mM).

Medidas de la concentración celular de los inóculos.

La concentración celular en los inóculos se midió de acuerdo a dos métodos transcurridas 24 horas:

- a) Turbidimetría: se usó un espectrofotómetro UV-visible Metrolab VD-40, se realizaron las medidas a 600 nm, con diluciones adecuadas de las muestra a fin de que los valores de absorbancia leídos estuvieran comprendidos entre 0,2 y 0,6. Estos valores corregidos por dilución se expresaron como unidades de densidad óptica (D.O.) con correspondencia a valores de concentración celular según una curva patrón para el microorganismo en estudio.
- b) Dilución en placas: se efectuaron las diluciones convenientes de las muestras, mezclando luego 1 ml de cada uno de las dos últimas diluciones con medio correspondiente a cada concentración salina fundido y mezclado íntimamente por rotación de las placas de Petri (Koch, 1981), incubándolas invertidas en estufa a 28 °C. Para evaluar crecimiento se utilizaron diluciones 10^8 y 10^9 ó 10^9 y 10^{10} por duplicado.

Ensayo para elegir la variedad de alfalfa a utilizar en los ensayos en cámara climatizada e invernáculo.

Las semillas de alfalfa utilizadas pertenecen a la variedad Magnum 3 y Salinera INTA, que se presenta como resistente a concentraciones elevadas de NaCl.

Se utilizó medio Jensen sin nitrógeno y con nitrógeno. Para el desarrollo de las plántulas se preparó el medio con diferentes concentraciones de NaCl. Se agregó nitrógeno, (como NO_3K 0,5 g/l) en la mitad de los tubos de ensayo para que no se torne limitante del crecimiento y se pueda comparar el desarrollo con las plantas que no tienen disponibilidad de nitrógeno. Se realizaron tres repeticiones por cada concentración y para cada semilla

La composición del medio Jensen normal y con diferentes concentraciones de NaCl se muestra en la Tabla 4. Se sembraron dos semillas pre – germinadas por tubos.

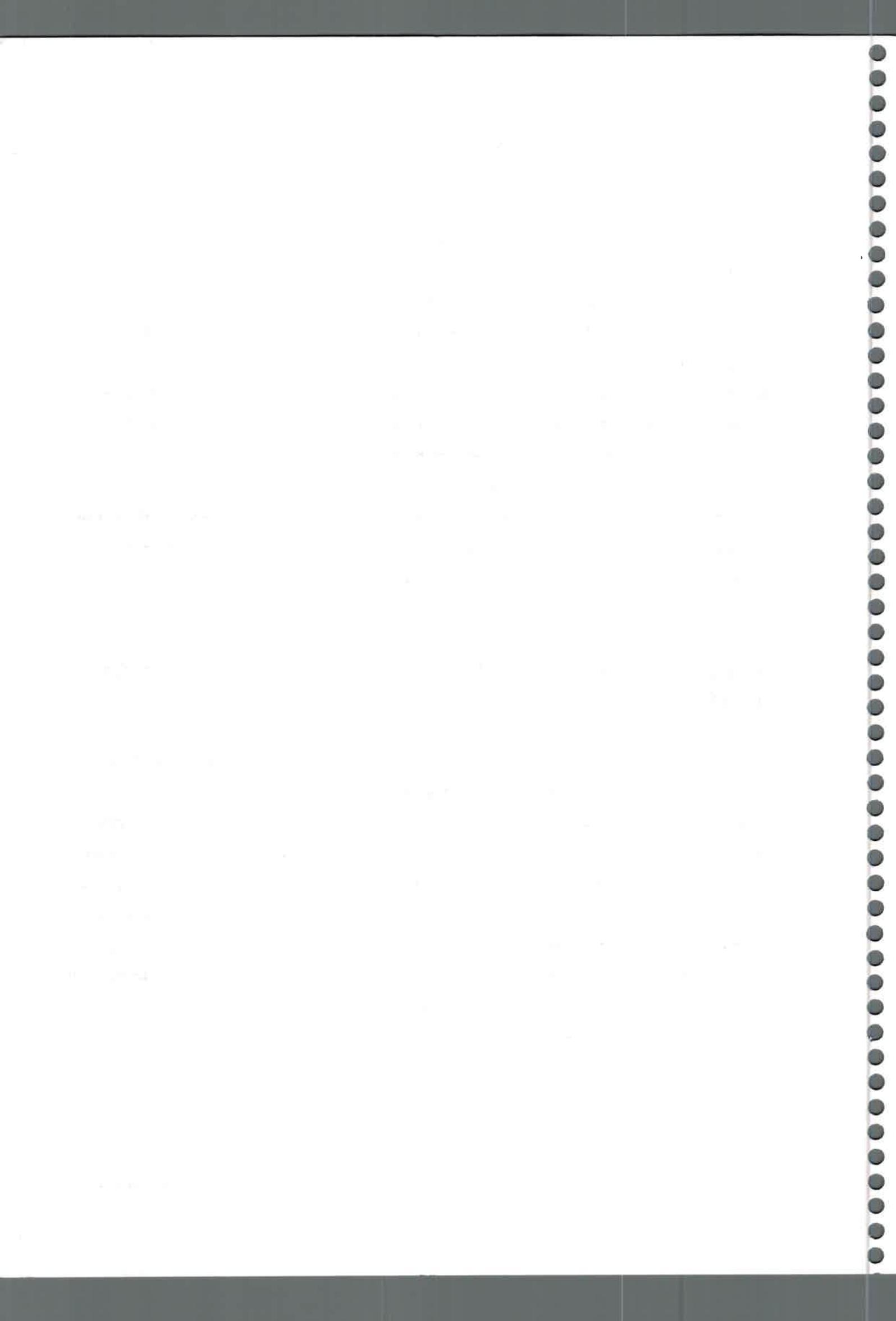


Tabla 5. Medio Jensen modificado.

Componentes	3,42 mM	85,5 mM	256 mM	427 mM
PO ₄ HCa	1 g	1 g	1 g	1 g
PO ₄ K ₂	0,2 g	0,2 g	0,2 g	0,2 g
SO ₄ Mg.7 H ₂ O	0,2 g	0,2 g	0,2 g	0,2 g
NaCl	0,2 g	5,15 g	15,44 g	25,74 g
FeCl ₃	0,1 g	0,1 g	0,1 g	0,1 g
Agar	12 g	12 g	12 g	12 g
Agua destilada	1000 ml	1000 ml	1000 ml	1000 ml

pH 6,5 – 7

Se midió la conductividad eléctrica del medio Jensen, para determinar en que rango de salinidad se ubicaría nuestro medio con respecto a la clasificación que se realiza para determinar si un suelo es salino o no.

Esterilización de semillas de alfalfa, siembra y condiciones de crecimiento en cámara climatizada.

Las metodologías aplicadas para la esterilización de semillas, siembra y condiciones de crecimiento de este ensayo fueron descritas con anterioridad en el ensayo de efectividad e infectividad en la nodulación de cepas aisladas de Río Cuarto.

Ensayo de efectividad e infectividad en la nodulación con las cepas Lq 51, B399, 4, 15 y semillas de alfalfa de Salinera INTA en cámara climatizada.

Las semillas se sembraron en medio Jensen con concentraciones normales, 85,5 mM, 256 mM y 427 mM. Se dejó que se desarrollaran durante cinco días y luego se inocularon.

Se prepararon los inóculos con las cinco cepas con concentración normal, 85,5 mM y 256mM de NaCl. Para la cepa RC4r se preparó el inóculo a 427 mM también, porque se observó que crecía bien con esta concentración en medio agarizado y se probó si puede promover el crecimiento de las plantas de alfalfa. Las plantas se desarrollaron en cámara climatizada durante 7 semanas. Una vez cosechadas se determinó el peso seco de las plantas. Se cosecharon los nódulos para realizar el aislamiento para purificar las cepas utilizadas para inocular. Los aislamientos se realizaron según



los métodos descritos por Vincent (1970). Los nódulos se sometieron a esterilización superficial a través de tratamiento sucesivo de alcohol 95% (30 segundos) y HgCl₂ al 0,1% (3 – 4 minutos). Después de cinco lavados con agua esterilizada fueron macerados y sembrados en cajas de Petri conteniendo el medio descrito en la Tabla 2 (A), a diferentes concentraciones de NaCl (1,71 mM, 85,5 mM, 256 mM y 427 mM). Con las bacterias de éstos nódulos se realizaron electroforesis de isoenzimas para caracterizar las cepas utilizadas.

Determinación de la salinidad del suelo.

La determinación se realiza siguiendo los pasos que se detallan a continuación.

1. Pasta saturada de suelo: La pasta saturada de suelo se prepara agregando agua destilada a una muestra, secada y tamizada, y agitando con una espátula. De vez en cuando la muestra debe consolidarse golpeando el recipiente con cuidado sobre la mesa de trabajo. Debido a la respuesta de los suelos cuando se les trabaja cerca de su capacidad de campo, se debe agregar inicialmente suficiente agua para casi saturar la muestra. La pasta de suelo saturada brilla por la reflexión de luz, fluye ligeramente si se inclina el recipiente y se desliza fácilmente de la espátula, excepto en el caso de suelos con alto contenido de arcilla. La cantidad de suelo que se requiere depende del volumen de extracto deseado. Una muestra de 250 g de suelo en un recipiente de plástico de 250 ml de capacidad es fácil de manejar y proporciona suficiente extracto para las determinaciones ulteriores.

Después del mezclado se deja reposar la muestra durante una hora y se comprueba si se mantiene saturada. En ese momento la pasta no debe acumular agua en la superficie, perder su brillo o endurecerse. Si ha perdido brillo o se ha endurecido, es necesario agregar agua destilada y mezclar nuevamente. Si la pasta posee demasiada agua se agrega suelo seco en la cantidad mínima necesaria.

2. Obtención de los extractos de saturación: En la mayor parte de los casos la extracción para evaluar la salinidad puede hacerse poco después de preparar la pasta saturada. Si en el extracto se van a analizar los componentes iónicos, la pasta debe dejarse en reposo de 4 a 16 horas antes de la extracción. Esto se debe a que la solución del suelo necesita llegar a un equilibrio con la fase sólida. Normalmente se efectúan las pastas a última hora de la tarde, se dejan en reposo toda la noche y se extrae a la mañana siguiente.

La pasta saturada se coloca en un embudo Buchner con papel de filtro. El embudo se coloca en un frasco Kitasato conectado a una línea de vacío y se procede a extraer la solución de la muestra. Existen diversos artificios para lograr que el extracto sea recibido en un recipiente. Si el filtrado inicial es



turbio, se puede descartar o pasar nuevamente al suelo. La extracción al vacío debe de terminarse cuando empieza a pasar aire por el filtro.

3. Determinación de la conductividad: En el extracto de saturación se determina la salinidad mediante un conductímetro (SAMLA, Sistema de Apoyo Metodológico de Laboratorios de Suelos y Aguas, 1995).

Ensayo de efectividad e infectividad, en invernáculo, con las cepas Lq 51, B 399, 4 y 15 y semillas de alfalfa Salinera INTA.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los ensayos anteriores se diseñó el ensayo de invernáculo. Se usó la variedad Salinera INTA. El suelo que se utiliza en las macetas se obtuvo de la zona del Bajo Giuliani, al sur de la ciudad de Santa Rosa, de un campo que estuvo inundado y aún hoy hay lagunas se recogió suelo de loma, media loma y bajo. Se midió la conductividad de cada fracción para determinar la proporción de la mezcla de suelo a realizar para que el valor no exceda los 10 milimho x cm⁻¹ porque por encima de este valor la salinidad se torna limitante para el crecimiento de la alfalfa.

Se utilizó un diseño totalmente aleatorio con cuatro repeticiones, y con los tratamientos que se describen:

- 1). Macetas con suelo normal, para ver como se comporta la especie Salinera INTA, sin inocular.
- 2). Macetas con suelo salino sin inocular.
- 3). Macetas con suelo salino, que se fertilizaron a los 17 días con nitrógeno.
- 4). Macetas con suelo salino, inoculadas con las cepas Lq 51, B 399, 15 y 4 a una concentración de NaCl de 85,5 mM.
- 5). Macetas con suelo salino, inoculadas con la cepa 15 la inoculación con una concentración de NaCl de 256 mM.

Determinación de la densidad de población naturalizada y de la obtenida por semilla luego de inoculadas.

Método del número más probable (NMP): se lo utilizó para determinar población nativa en suelo con diluciones de hasta 10⁶ y para determinar número de rizobios para semilla.

Se realizaron frotis con muestras de inóculo para observar al microscopio (microscopio de contraste de fases, JENAMED 2, Carl Zeiss – Jena) la densidad de crecimiento de los rizobios y movilidad para realizar una caracterización preliminar por forma, tamaño y aspecto de la colonia.

Faint, illegible text, possibly bleed-through from the reverse side of the page. The text is arranged in several paragraphs and appears to be a formal document or report.

Las semillas se dejaron dos horas embebiéndose con el inóculo, antes de ser sembradas y de cada tratamiento se reservaron 100 semillas para determinar NMP.

Fertilización con Nitrógeno.

La primera aplicación de nitrógeno se hace dos semanas después de la germinación. Se aplica el equivalente de 150 kg de N por hectárea, en forma de urea. La aplicación de nitrógeno se fraccionó en tres aplicaciones, cada dos semanas. Se utilizaron cilindros de pvc a modo de maceta.

El cálculo se realiza de la siguiente forma:

diámetro del cilindro: 7,5 cm

Superficie: $\pi \times r^2 = 3,1416 \times (3,75 \text{ cm})^2 = 44,17875 \text{ cm}^2$

150 kg / ha de nitrógeno equivalen a 321,43 kg / ha de urea

1 ha = 10^8 cm^2 ----- 321,43 kg

44,17875 cm^2 ----- 0,000142003 kg = $1,42003 \times 10^{-4} \text{ kg} = 142,003 \text{ mg}$

Cálculo y manejo del riego en los ensayos en macetas (cilindros de pvc).

Para que la cantidad de agua durante el ensayo sea la adecuada hay que conocer la capacidad de campo del suelo, y mantener la humedad del suelo en ese nivel durante todo el ensayo.

Para determinar el porcentaje de humedad inicial del suelo, se toman 5 macetas y se vierte su contenido, mezclándolo bien. Se toman muestras de 100 g de suelo cada una y se secan en estufa a 120 ° C durante 24 hs. Al cabo de este tiempo, se pesan para conocer el porcentaje de humedad y se calcula de la siguiente forma:

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{100 \text{ g} - \text{Peso después de secar}}{100} \times 100 = \% \text{ humedad del suelo medido}$$

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{100 \text{ g} - 85,3 \text{ g (promedio)}}{100} \times 100 = 14,7 \%$$

Las demás macetas se pesan el mismo día en que se toman las muestras usadas para determinar humedad. Cada cilindro se marcó con un número de identificación y su peso. Según los pesos, se dividen en grupos, cada grupo representa un rango de peso.

Grupo A posee cilindros de PVC (macetas) con un peso de 99,95 g, el peso del plato es de 25,185 g.

Bloque A1: con un promedio de pesos de 970 g de suelo.

Bloque A2: con un promedio de pesos de 990 g de suelo.

Faint, illegible text, possibly bleed-through from the reverse side of the page. The text is arranged in several paragraphs and appears to be a formal document or report.

Bloque A3: con un promedio de pesos de 1010 g de suelo.

Grupo B posee cilindros de PVC (macetas) con un peso de 120,39 g, el peso del plato es de 25,185 g.

Bloque B1: con un promedio de pesos de 950 g de suelo.

Bloque B2: con un promedio de pesos de 998 g de suelo.

Con estos datos se calculó la cantidad de agua que se necesitó para regar; para uniformar las condiciones en el inicio y para mantener durante el ensayo el suelo a capacidad de campo para que las plantas no sufran estrés hídrico.

Como ejemplo calculamos la cantidad de agua que hay que agregarle al Bloque A1:

PSS = PSHi – Contenido de humedad

PSHi = peso de suelo húmedo inicial

$$PSS = 970 - \frac{970 \times 14,7}{100} = 827,41$$

PSS = peso suelo seco

El contenido de humedad final que se requiere para mantener este suelo a capacidad de campo es de 20 % del peso húmedo, el porcentaje de peso seco es de 80 % del peso final de suelo húmedo (PSHf).

$$PSHf = \frac{PSS}{0,8}$$

$$PSHf = \frac{827,41}{0,8} = 1034,26 \text{ ml.}$$

Por lo tanto, un cilindro (maceta) de este bloque que pesaba 970 g, para llegar a la humedad calculada debe regarse con: $1034,2625 - 970 = 64,26 \text{ ml}$

Los demás bloques se regaron con:

Bloque A2: 65,59 ml

Bloque A3: 66,91 ml

Bloque B1: 62,94 ml

Bloque B2: 66,12 ml

Siembra.

Se sembraron seis semillas de alfalfa de la variedad Salinera INTA en cada tubo. A los quince días se realizó el riego y raleo, se dejaron tres plantas por tubo, las que estaban mejor implantadas y desarrolladas. En este momento se realizó la primera fertilización con nitrógeno al testigo. Luego se



fraccionó la fertilización en dos etapas más para completar el total de la cantidad de nitrógeno calculada de acuerdo a la cantidad de nitrógeno que se recomienda por hectárea.

Cosecha y análisis.

Para obtener la máxima información posible se concluyó el ensayo al 5% 10 % de la floración. Se separó la parte aérea de la raíz y se secaron por separado en estufa a una temperatura de 65 °C.

Se evaluó peso seco de la parte aérea, peso seco de la raíz, contenido de nitrógeno y proteínas y aislamiento de microorganismos a partir de nódulos en los medio adecuados para realizar electroforesis de isoenzimas para caracterizarlos.

Aislamiento de microorganismos a partir de los nódulos.

Se realizaron según la metodología descrita por Vincent (1970).

Electroforesis de isoenzimas.

Las bacterias se hicieron crecer en medio TY (50 ml) durante 24 hs a 28 ° C con agitación.

Tabla 6. Medio TY

Componentes	g / l
Extracto de Levadura	3 g / l
Triptona	5 g / l
CaCl ₂	0,87 g / l

pH 7,2

Tabla 7. Medio TY modificado con el agregado de ClNa

Componente	g / l
ClNa 85,5 mM	5 g / l
ClNa 256 mM	15 g / l



Se centrifugo a 10.000 rpm (Centrifuga Sorvall RC5C, con rotor GSA, code 10), durante 30 minutos a 4 ° C. Se volcó el sobrenadante y el precipitado se lavó y resuspendió con 1 ml de solución de CINA al 0,85 %. Se recogió en tubos eppendorff y se centrifugo durante 10 minutos a 1.500 rpm. Se vuelca nuevamente el sobrenadante y se recoge en 0,5 ml de tampón de extracción (Tris- HCl 0,1 M y pH 7,2; MgCl₂ 5 mM; glicerol 15 % y mercaptoetanol 0,1 %) se centrifugo a 15.000 g durante 10 minutos y se resuspende en el mismo tampón con lisozima en concentración de 1 mg / ml, después de incubar 10 minutos a temperatura ambiente se cetrifugó 10 minutos a 15.600 g y se resuspendió en tampón de sonicación (Tris – HCl 0,1 M, pH: 8,8 y glicerol 15 %). Se sonicó (Sonicador Branson Sonifier 250) durante seis ciclos de 30 segundos. Se centrifugó durante 10 minutos y le sobrenadante se reservó para la corrida electroforética. Esta se realizó usando el gel de poliacrilamida al 5 % para el gel concentrador y 10 % para el separador. Se coloreó para α y β esterasas, con Fast Blue RR y α y β naftil acetato como sustrato (Grassano A., et al; 1996).

RESULTADOS



Evaluación del desarrollo de las plantas que se inocularon con las cepas de Río Cuarto.

Se evaluaron las plantas según valores de materia seca, cantidad de nitrógeno y proteína bruta, los cuales se toman como parámetros para medir la efectividad de las cepas utilizadas en la inoculación de las plantas de alfalfa, los resultados se muestran en la Tabla 8. En las Figuras 3, 4, 5 y 6 se muestra el desarrollo de las plantas, al inocularlas con las cepas utilizadas.

Concentración de HCl, 0,097575 N

Cálculo de proteínas: $\frac{V \times N}{0,1 \text{ g}} \times 0,0014 \times 1000 \times 6,25$

Tabla 8. Valores de materia seca, contenido de nitrógeno y proteínas.

Tratamiento	Peso seco promedio (g)	Gasto promedio de titulante	Promedio % N	Promedio % P
C-1	0,01194	1,078	1,47	9,20
C-14	$8,949 \times 10^{-3}$	0,984	1,34	8,40
C-15	0,01577	2,46	3,36	21,00
C-19	$9,611 \times 10^{-3}$	1,007	1,38	8,60
C-2	0,01277	1,38	1,89	11,81
C-23	0,01450	2,36	3,22	20,12
C-4	0,01474	2,43	3,32	20,75
C-6	0,01509	2,50	3,41	21,34
C-7	0,01177	1,82	2,49	15,54
N	0,01537	2,55	3,48	21,77
T s/N	$8,25 \times 10^{-3}$	0,992	1,69	10,59

De este ensayo se concluyó que las cepas que se van a utilizar en la adaptación, debido a su rendimiento en materia seca y proteína son la 4, 6, 15 y 23.

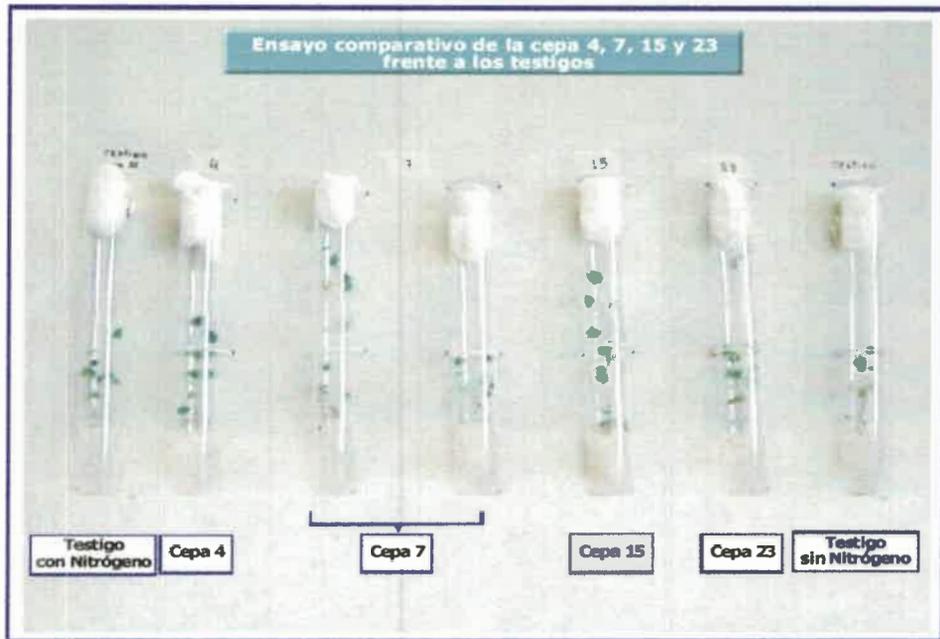


Fig. 3. Plantas crecidas en cámara climatizada e inoculadas con cepas, aisladas en Río Cuarto.

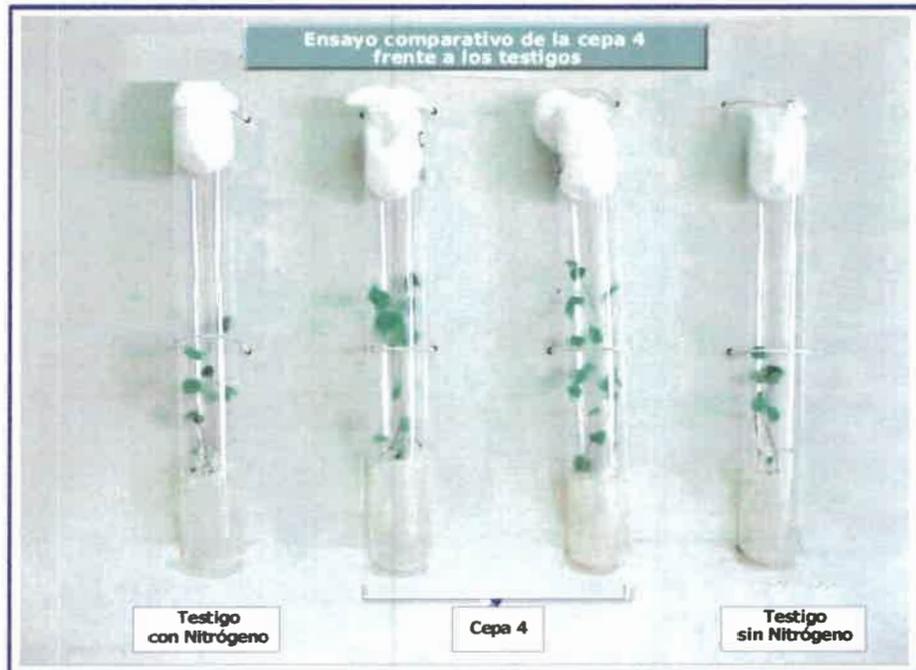
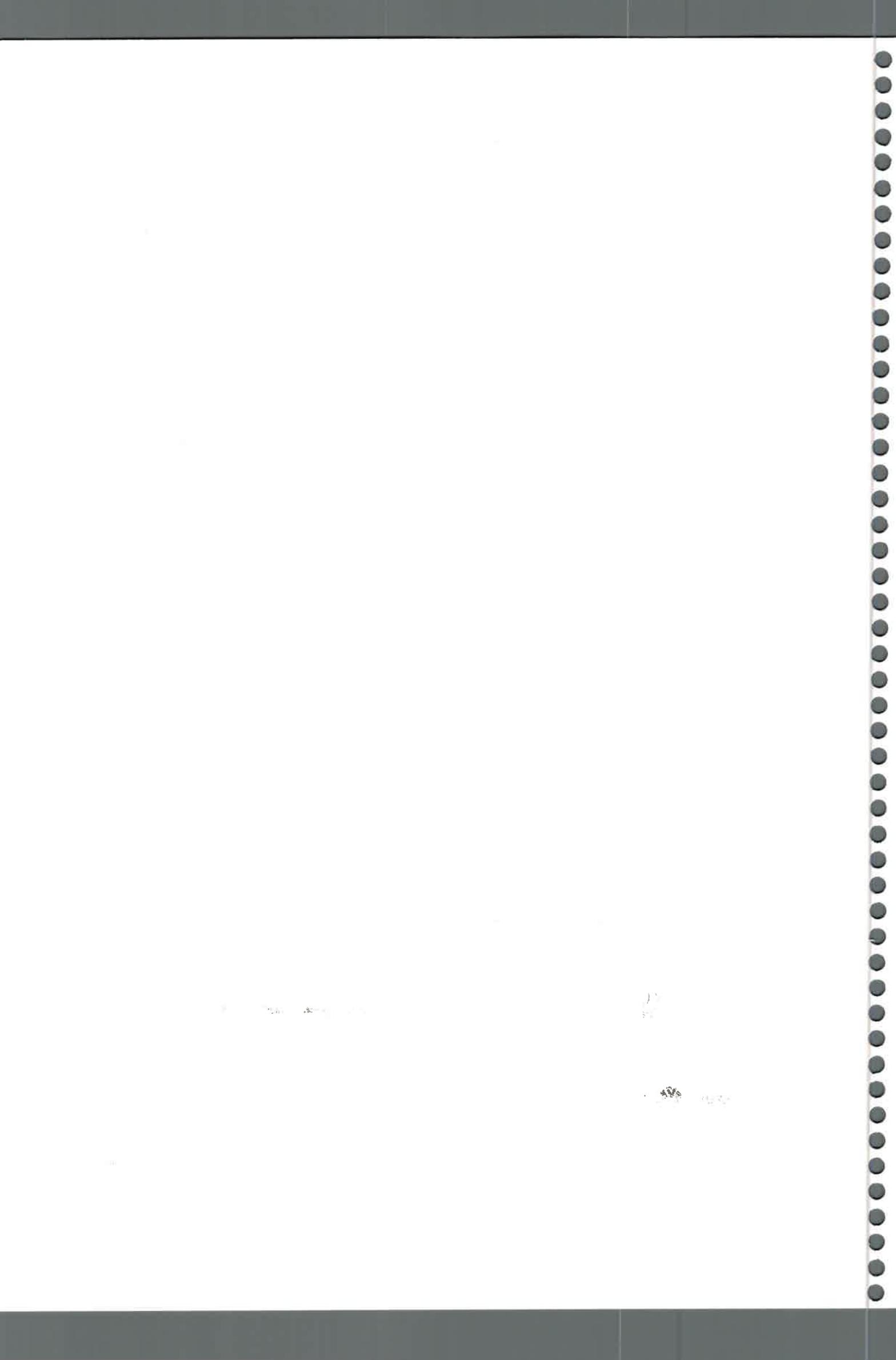


Fig. 4. Plantas crecidas en cámara climatizada e inoculadas con la cepa 4, aislada en Río Cuarto.



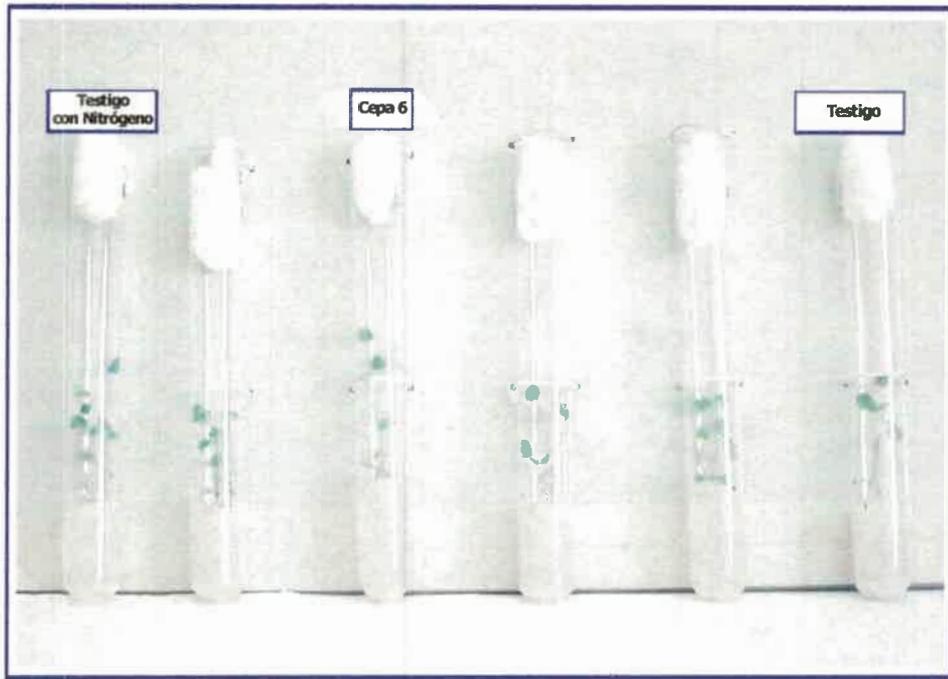


Fig. 5. Plantas crecidas en cámara climatizada e inoculadas con la cepa 6, aislada en Río Cuarto.

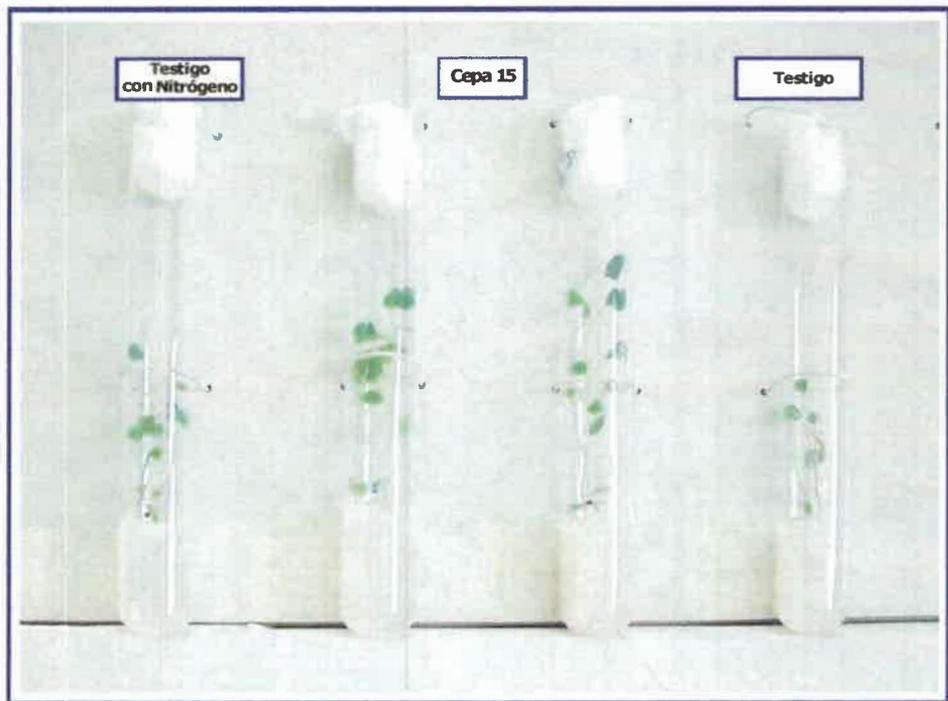


Fig. 6. Plantas crecidas en cámara climatizada e inoculadas con la cepa 15, aislada en Río Cuarto.

Crecimiento de las cepas en medio agarizado.



Después de las repeticiones descritas en Materiales y Métodos se observó que los aislamientos seleccionados del ítem anterior, más los microorganismos aislados de la región pampeana y la cepa patrón presentaron abundante crecimiento en las concentraciones 85,5 mM y 256 mM. En la concentración de 427 mM el crecimiento disminuye.

Valores de conductividad de los inóculos.

Los valores de conductividad obtenidos para los inóculos con las diferentes concentraciones de NaCl, se muestran en la Tabla 9:

Tabla 9. Valores de conductividad para los medios de cultivo líquidos utilizados.

Concentración (mM)	Conductividad (micromho.cm ⁻¹)	Conductividad (milimho.cm ⁻¹) o (mS.cm ⁻¹)
1,71	2830	2,83
85,5	10900	10,900
256	25300	25,300
427	31500	31,500

Crecimiento de las cepas en medio líquido (Inóculo).

Este ensayo se realizó para determinar las concentraciones a las que se va a trabajar con las cepas cuando se implemente el ensayo en cámara climatiza. Además la finalidad de este ensayo es observar qué aislamiento tiene aptitudes biotecnológicas adecuadas, si se piensa en una transferencia futura, en función de la velocidad específica de crecimiento (μ) y del tiempo de duplicación de la población (θ_g).

Se realizaron las curvas de crecimiento, por duplicado, para todas las cepas con las tres concentraciones de NaCl que se utilizan (85,5 mM, 256 mM y 427 mM) y se obtuvieron los siguientes resultados:

Valores de la curva de crecimiento de la Cepa Lq51 obtenidos a la concentración de 85,5 mM.

Fig. 7, 8, 9 y 10.

Tabla 10. Valores de absorbancia en función del tiempo para las curvas de crecimiento, realizadas por duplicado, de la cepa Lq51 a la concentración de 85,5 mM de NaCl.

Cepa Lq 51	Tiempo	Absorbancia(1)	Tiempo	Absorbancia(2)
85,5 mM	3hs	0.655	3hs	0.5
	5hs	0.769	5hs	0.736
	8hs	1.682	8hs	1.572
	24hs	3.74	24hs	3.84
	27hs	4.08	27hs	4.184
	30hs	4.16	30hs	4.3
	50hs	3.94	50hs	4.39



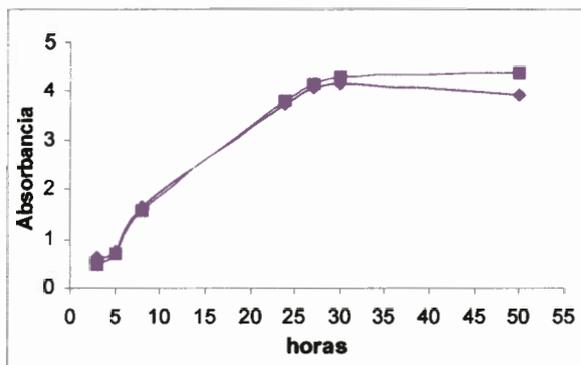


Fig 7. Curva de crecimiento de la cepa Lq51 a la concentración de 85,5 mM de NaCl.

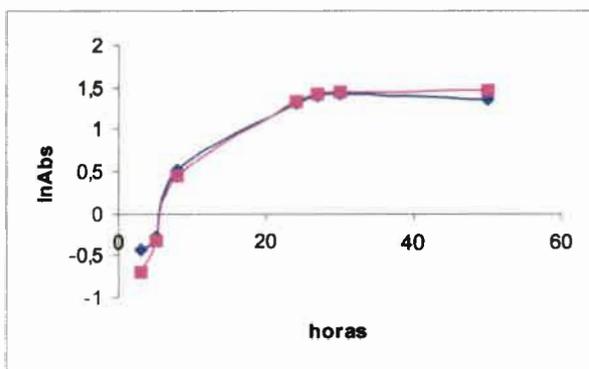


Fig. 8. Gráfica del lnAbs en función del tiempo, realizadas por duplicado, para realizar los cálculos de la velocidad específica de crecimiento y del tiempo de duplicación para la cepa Lq51 a la concentración 85,5 mM.

Cálculo de la velocidad específica y del tiempo de generación:

$$\text{Promedio de absorbancia de la curva para } t_1 : \frac{0.769 + 0.763}{2} = 0.7525 \quad \ln_1 = -0.284$$

$$\text{Promedio de absorbancia de la curva para } t_2 : \frac{1.682 + 1.572}{2} = 1.627 \quad \ln_2 = 0.487$$

$$\mu = \frac{\ln_2 - \ln_1}{t_2 - t_1} \quad \mu = \frac{0.486 - (-0.248)}{3} \quad \mu = 0.257$$

$$\theta_g = \frac{\ln 2}{\mu} \quad \theta_g = 2 \text{ h } 42 \text{ min.}$$



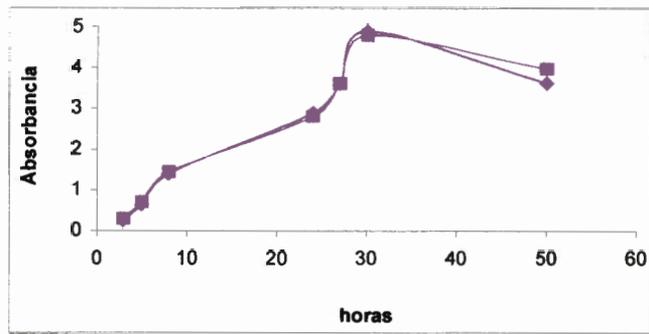


Fig. 9. Curva de crecimiento de la Ceba Lq51 a la concentración de NaCl de 256 mM.

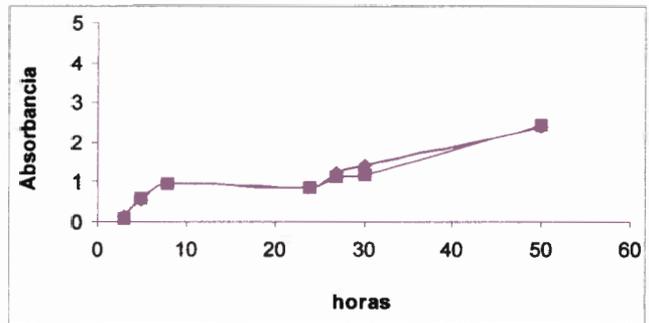


Fig. 10. Curva de crecimiento de la Ceba Lq51 a la concentración de NaCl de 427 mM.

Curvas de crecimiento de la Ceba Lq42, en las tres concentraciones. Fig. 11, 12 y 13.

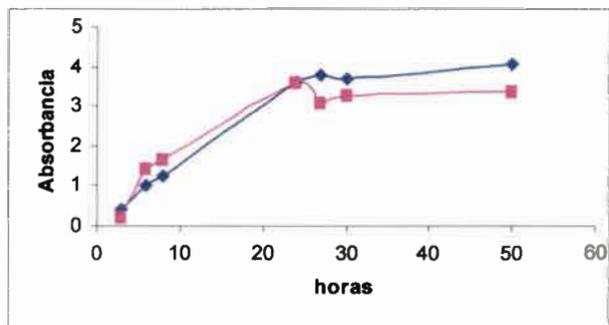


Fig. 11. Curva de crecimiento de la Ceba Lq42 a la concentración de NaCl de 85,5 mM.

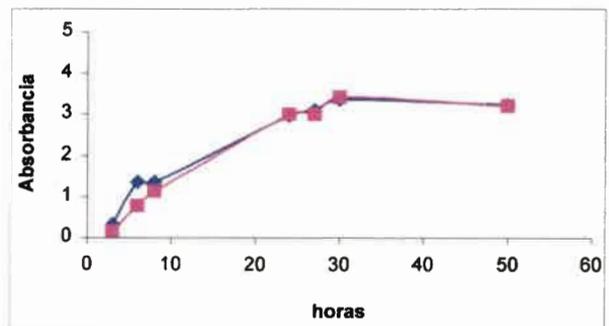


Fig. 12. Curva de crecimiento de la Ceba Lq42 a la concentración de NaCl de 256 mM.

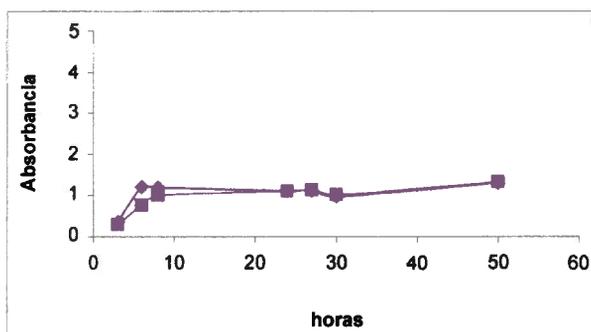


Fig. 13. Curva de crecimiento de la Cepa Lq42 a la concentración de NaCl de 427 mM.

Curvas de crecimiento de la Cepa Lq22, en las tres concentraciones. Fig. 14, 15 y 16.

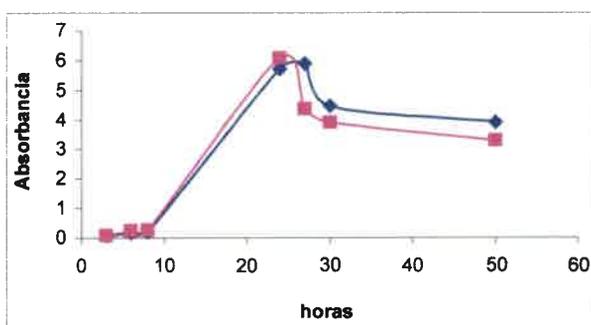


Fig. 14. Curva de crecimiento de la Cepa Lq22 a la concentración de NaCl de 85,5 mM.

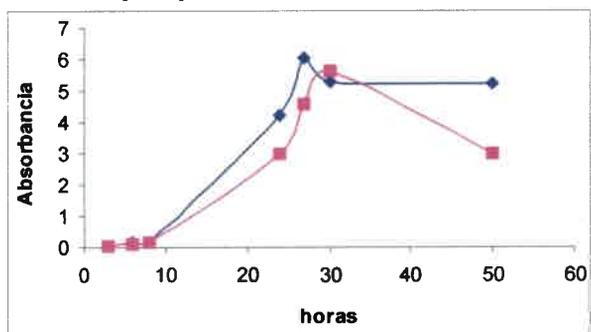


Fig. 15. Curva de crecimiento de la Cepa Lq22 a la concentración de NaCl de 256 mM.

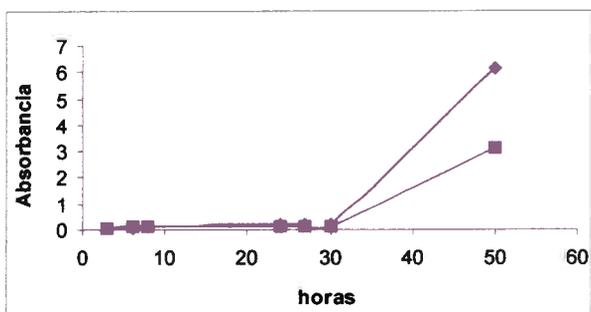


Fig. 16. Curva de crecimiento de la Cepa Lq22 a la concentración de NaCl de 427 mM.



Curvas de crecimiento de la Cepa B399, en las tres concentraciones. Fig. 17, 18 y 19.

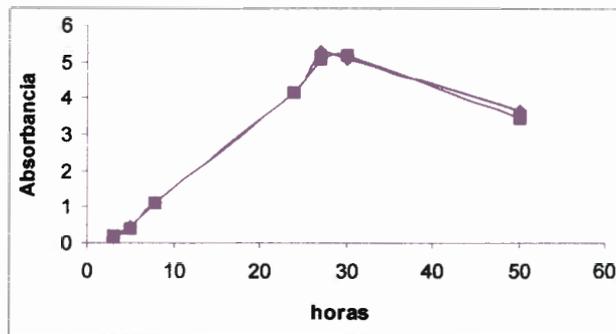


Fig. 17. Curva de crecimiento de la Cepa B399 a la concentración de NaCl de 85,5 mM.

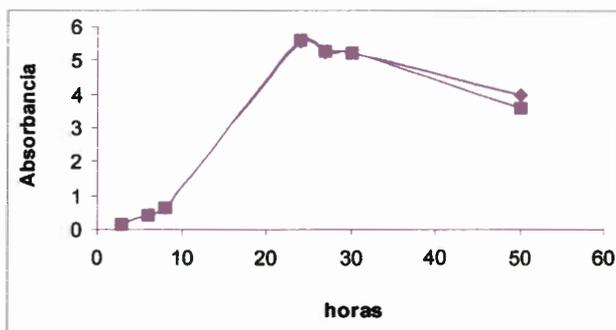


Fig. 18. Curva de crecimiento de la Cepa B399 a la concentración de NaCl de 256 mM.

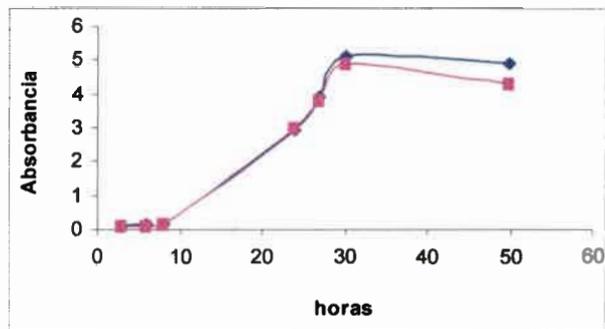


Fig. 19. Curva de crecimiento de la Cepa B399 a la concentración de NaCl de 427 mM.

Curvas de crecimiento de la Cepa 4, en las tres concentraciones. Fig. 20, 21 y 22.

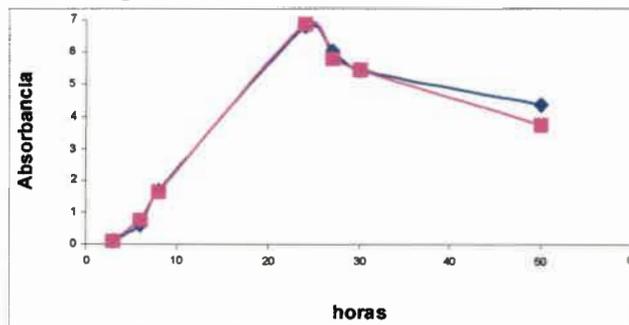


Fig. 20. Curva de crecimiento de la Cepa 4 a la concentración de NaCl de 85,5 mM.

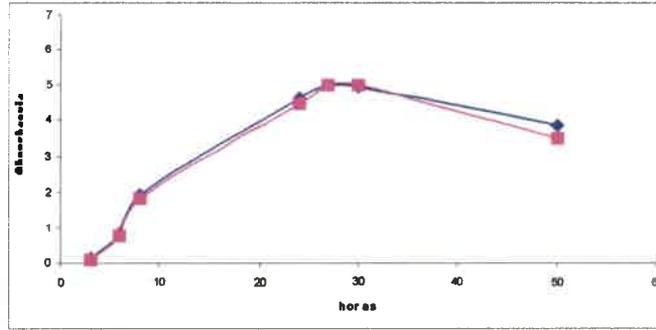


Fig. 21. Curva de crecimiento de la Cepa 4 a la concentración de NaCl de 256 mM.

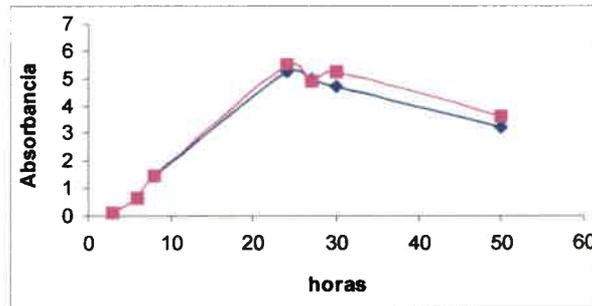


Fig. 22. Curva de crecimiento de la Cepa 4 a la concentración de NaCl de 427 mM.

Curvas de crecimiento de la Cepa 6, en las tres concentraciones. Fig. 23, 24 y 25.

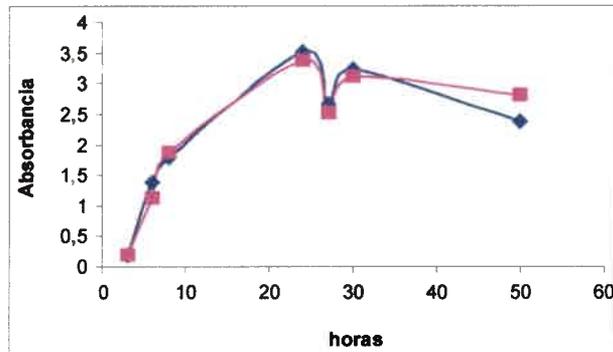


Fig. 23. Curva de crecimiento de la Cepa 6 a la concentración de NaCl de 85,5 mM.

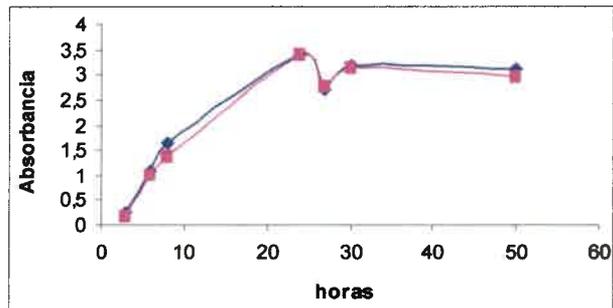


Fig. 24. Curva de crecimiento de la Cepa 6 a la concentración de NaCl de 256 mM.



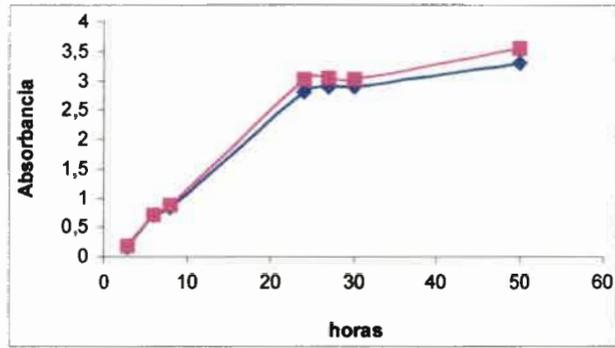


Fig. 25. Curva de crecimiento de la Ceba 6 a la concentración de NaCl de 427 mM.

Curvas de crecimiento de la Ceba 15, en las tres concentraciones. Fig. 26, 27 y 28.

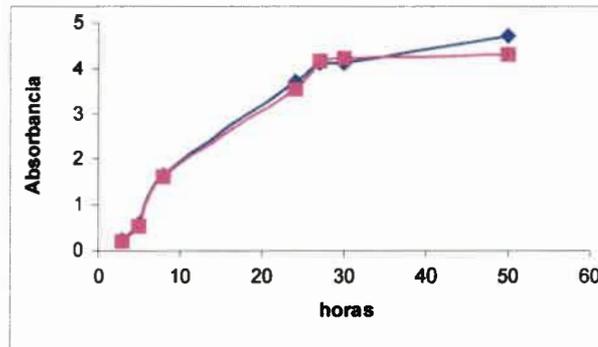


Fig. 26. Curva de crecimiento de la Ceba 15 a la concentración de NaCl de 85,5 mM.

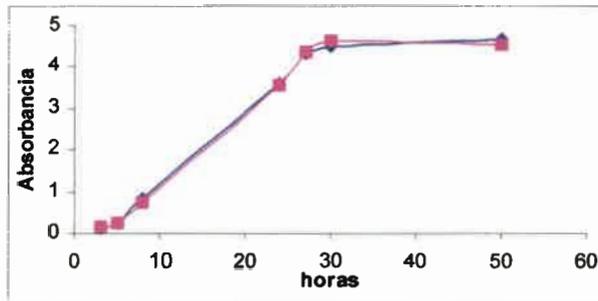


Fig. 27. Curva de crecimiento de la Ceba 15 a la concentración de NaCl de 256 mM.

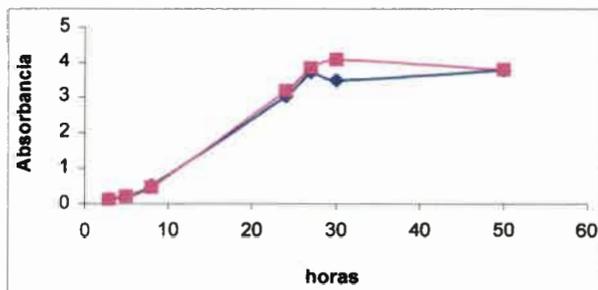


Fig. 28. Curva de crecimiento de la Ceba 15 a la concentración de NaCl de 427 mM.



Curvas de crecimiento de la Cepa 23, en las tres concentraciones. Fig. 29, 30 y 31.

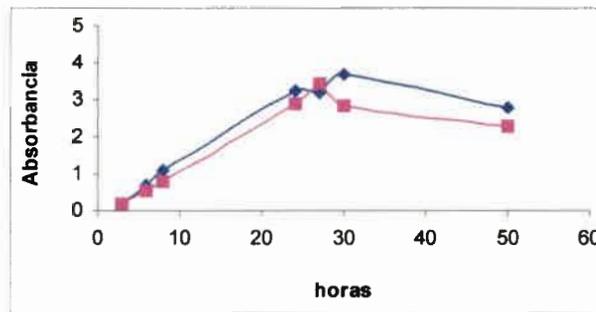


Fig. 29. Curva de crecimiento de la Cepa 23 a la concentración de NaCl de 85,5 mM.

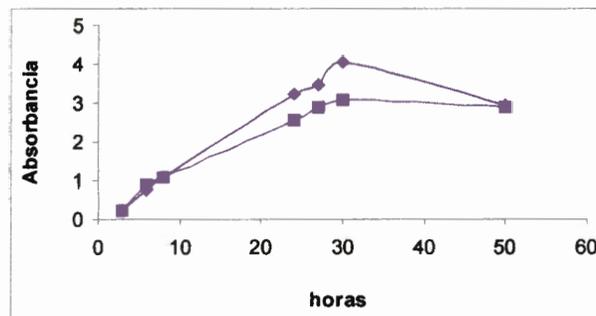


Fig. 30. Curva de crecimiento de la Cepa 23 a la concentración de NaCl de 256 mM.

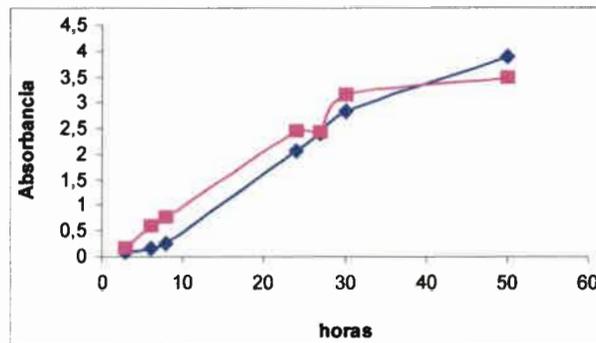


Fig. 31. Curva de crecimiento de la Cepa 23 a la concentración de NaCl de 427 mM.

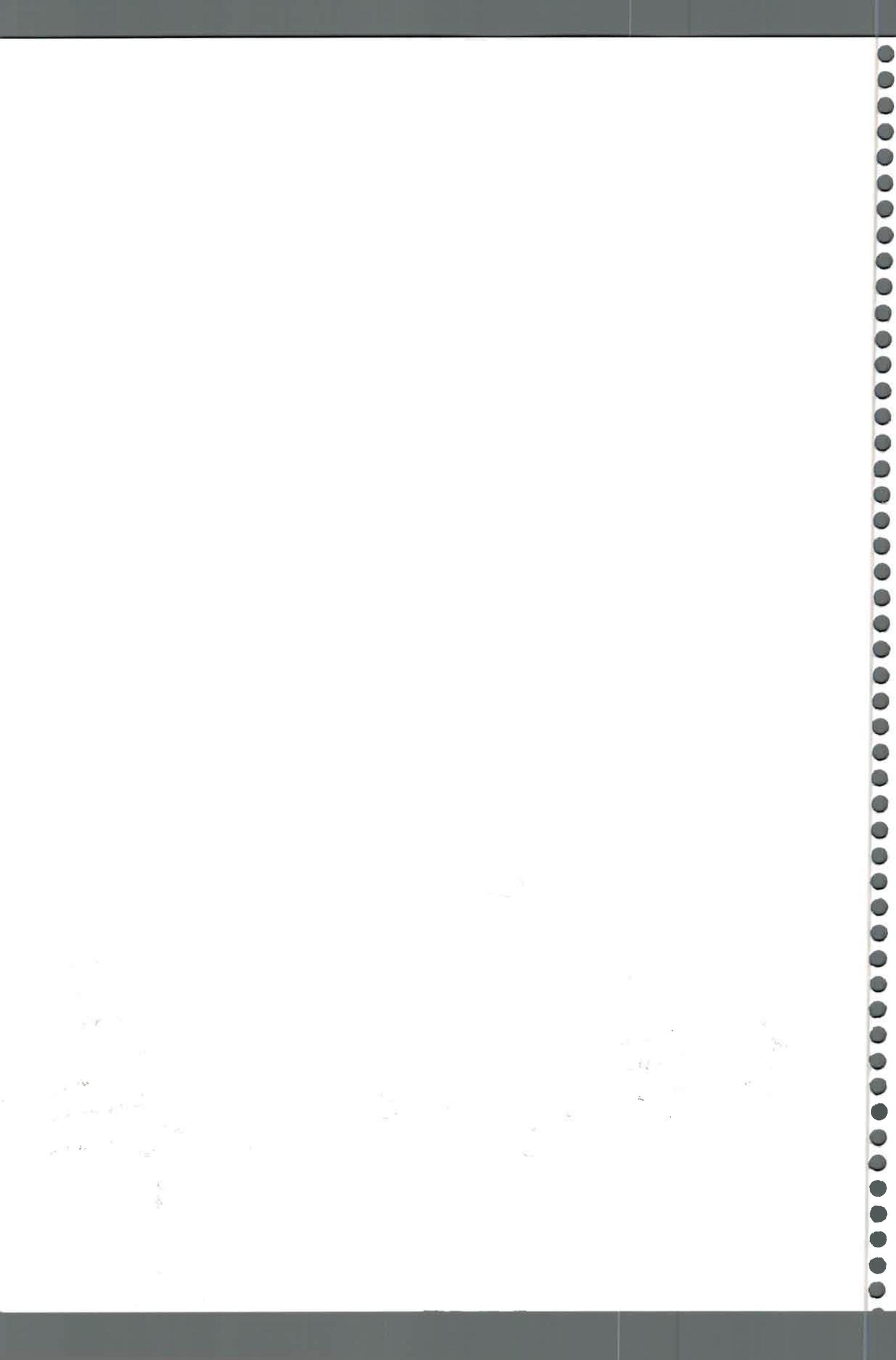


Tabla 11. Datos de la velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación, calculados a partir de las curvas de crecimiento obtenidas, en las tres concentraciones para cada cepa.

Cepa y concentración	Velocidad específica de crecimiento (μ)	Tiempo de duplicación (θ_g)
Lq 51 85,5 mM	0.0257	2 h 42 m
Lq 51 256 mM	0.2456	2 h 49 m
Lq 51 427 mM	0.1816	3h 49 m
Lq 42 85,5 mM	0.0816	8 h 28 m
Lq 42 256 mM	0.077	8 h 59 m
Lq 42 427 mM	0.050	13 h 48 m
Lq 22 85,5 mM	0.065	10 h 35 m
Lq 22 256 mM	0.057	12 h 4 m
Lq 22 427 mM	No se pudo calcular	No se pudo calcular
B 399 85,5 mM	0.308	2 h 14 m
B 399 256 mM	0.2186	3 h 10 m
B 399 427 mM	0.033	20 h 30 m
4 85,5 mM	0.301	2h 18 m
4 256 mM	0.2718	2h 32 m
4 427 mM	0.2624	2h 38 m
6 85,5 mM	0.179	3h 52 m
6 256 mM	0.090	7 h 40 m
6 427 mM	No se pudo calcular	No se pudo calcular
15 85,5 mM	0.336	2 h 3 m
15 256 mM	0.2636	2 h 37 m
15 427 mM	0.2310	3 h
23 85,5 mM	0.21	3 h 17 m
23 256 mM	0.14	4 h 42 m
23 427 mM	0.105	6 h 34 m

Al analizar estos resultados se determinó que se van a utilizar las cepas B 399, Lq 51, 15 con las concentraciones 85,5 mM y 256 mM. Y la cepa 4 con las tres concentraciones 85,5 mM, 256 mM y 427 mM. Porque son las que mantienen los valores de velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación característicos de *Sinorhizobium meliloti*.

Handwritten notes in the lower-left quadrant, including the number "12" and some illegible scribbles.

Handwritten notes in the lower-right quadrant, including the number "13" and some illegible scribbles.

Valores de conductividad del medio Jensen.

Los resultados obtenidos al medir la conductividad del medio Jensen con las diferentes concentraciones de NaCl, se muestran en la Tabla 12:

Tabla 12. Valores de conductividad para el medio Jensen utilizado.

Concentración (mM)	Conductividad (micromho.cm⁻¹)	Conductividad (milimho.cm⁻¹) o (mS.cm⁻¹)
3,42	1430	1,430
85,5	9300	9,300
256	22000	22,000
427	37400	37,400

Crecimiento de las dos variedades de semillas de alfalfa en las distintas concentraciones

La especie Salinera INTA presentó muy buen desarrollo en la concentración 85,5 mM y suplementado con KNO₃, respecto a la variedad Magnum 3. Los tubos que no están suplementados con KNO₃ no presentan diferencias de una especie a la otra.

En la concentración de 256 mM no se notaron marcadas diferencias entre las dos especies y entre las suplementadas con KNO₃ y las que no lo están. Frente a la concentración de 427 mM no se desarrollaron ninguna de las especies, ya sean suplementadas con KNO₃ o sin suplementar.

Los siguientes resultados se obtuvieron luego de 18 días de crecimiento; y se muestran en la Tabla 13 y en las Figuras 32 y 33.



Tabla 13. Resultados de crecimiento de las dos variedades de alfalfa en medio Jensen con distintas concentraciones de NaCl.

Concentración de NaCl, suplementados o no con KNO₃	Magnum 3	Salinera INTA
85,5 mM + 0,5 g/l KNO ₃	Tres tubos presentan muy buen desarrollo de plantas y raíces.	Tres tubos presentan muy buen desarrollo de plantas y raíces, hay diferencia con la Magnum 3, a favor de Salinera INTA.
85,5 mM	Tres tubos presentan buen desarrollo de plantas y raíces, menor que las que están suplementadas con KNO ₃	Tres tubos presentan buen desarrollo de plantas y raíces, menor que las que están suplementadas con KNO ₃
256 mM + 0,5 g/l KNO ₃	Tres tubos desarrollaron hojas pero con poco crecimiento de las plantas y de la raíz.	Tres tubos desarrollaron hojas pero con poco crecimiento de las plantas y de la raíz.
256 mM	Tres tubos desarrollaron hojas pero con poco crecimiento de las plantas y de la raíz.	Tres tubos desarrollaron hojas pero con poco crecimiento de las plantas y de la raíz.
427 mM + 0,5 g/l KNO ₃	No hay crecimiento y la mayoría de las semillas no se desarrollaron.	No hay crecimiento y la mayoría de las semillas no se desarrollaron.
427 mM	No hay crecimiento y la mayoría de las semillas no se desarrollaron.	No hay crecimiento y la mayoría de las semillas no se desarrollaron.

Teniendo en cuenta estos datos y observando los límites que se plantean para determinar si un suelo es salino o no y los límites de tolerancia que plantean los cultivares de alfalfa, se realizará el desarrollo en cámara climatizada de la especie Salinera INTA con dos concentraciones 85,5 mM y



256 mM, y se va a probar con la cepa 4 a la concentración 427 mM, que en términos de conductancia estos valores son 9,300, 22,000 y 37,400 milimho.cm⁻¹ respectivamente.

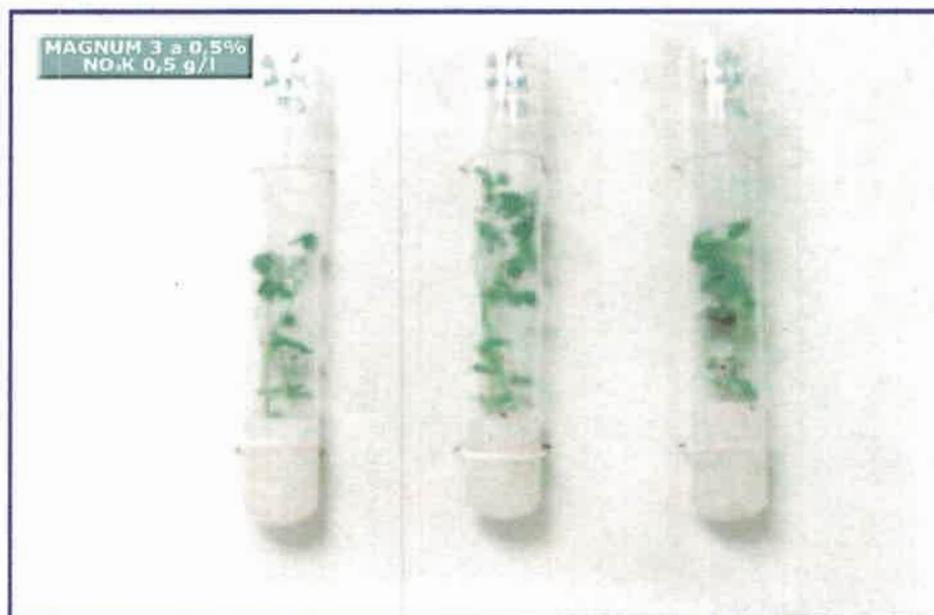


Fig. 32. Plantas de la variedad de alfalfa Magnum 3, crecidas en cámara climatizada, con una concentración en el medio Jensen de NaCl de 0,5%, y suplementadas con NO₃K.

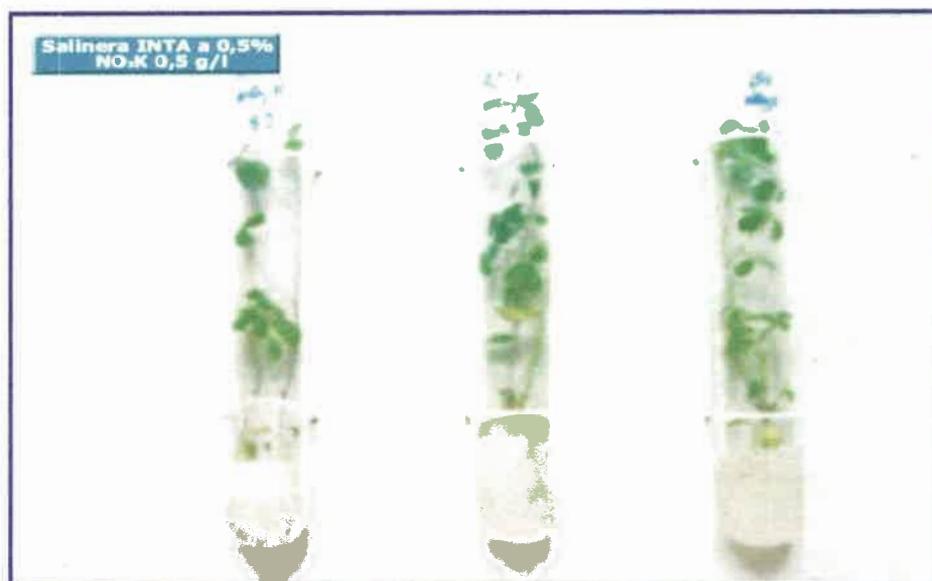


Fig 33. Plantas de la variedad de alfalfa Salinera INTA, crecidas en cámara climatizada, con una concentración en el medio Jensen de NaCl de 0,5%, y suplementadas con NO₃K.

Crecimiento de las cepas Lq 51, B 399, 4 y 15 en medio líquido y recuento en las distintas concentraciones.

Los inóculos se hicieron crecer durante 24 horas, luego se realizaron los recuentos en placa y se inocularon las plantas que crecieron en cámara climatizada.

Tabla 14. Recuento de colonias en medio agarizado a las 24 horas.

Cepa	Normal	85,5 mM	256 mM	427 mM
Lq 51	$1,8 \times 10^{11}$	$1,205 \times 10^{11}$	$2,3 \times 10^{10}$	
B 399	$2,25 \times 10^{10}$	$1,80 \times 10^{11}$	$7,075 \times 10^9$	
4	$1,27 \times 10^{10}$	$8,00 \times 10^{10}$	$4,3 \times 10^{10}$	$4,15 \times 10^{10}$
15	$6,60 \times 10^{10}$	$1,08 \times 10^{12}$	$2,17 \times 10^{10}$	

Valores de Peso Seco y nodulación en el ensayo en cámara climatizada.

Para la cepa 15 a concentración normal nodularon los 10 tubos con un promedio de 0,035457 g peso seco/ planta, para la misma cepa a concentración 85,5 mM hay 8 plantas noduladas con un promedio de 0,023375 g peso seco / planta, para la concentración de 256 mM se encontró sólo una planta nodulada y desarrollada con un peso de 0,0159 g peso seco / planta.

En la cepa Lq 51 en concentración normal nodularon 10 plantas con un peso promedio de 0,032295 g peso seco / planta, para la concentración 85 mM hay 9 plantas noduladas con un peso promedio de 0,04291 g peso seco / planta, para la concentración de 256 mM no hubo crecimiento.

La cepa 4 a concentración normal presentó plantas noduladas con un peso promedio de 0,035725 g peso seco / planta, a 85 mM no se detectaron nódulos pero si agallas en tres tubos, a 256 mM no hubo crecimiento.

La cepa B399 noduló las 10 plantas en concentración normal con un peso promedio de 0,04035 g peso seco / planta, a 85,5 mM nodularon 9 plantas con un peso promedio de 0,0403066 g peso seco / planta.

Los testigos sin inocular presentaron un peso promedio de 0,005716 g peso seco / planta, los testigos inoculados presentaron un peso promedio de 0,038648 g peso seco / planta.

Las cepas obtenidas como resistentes, a las concentraciones elevadas de salinidad, se las designa conservando su nomenclatura y adicionando una "r" minúscula.



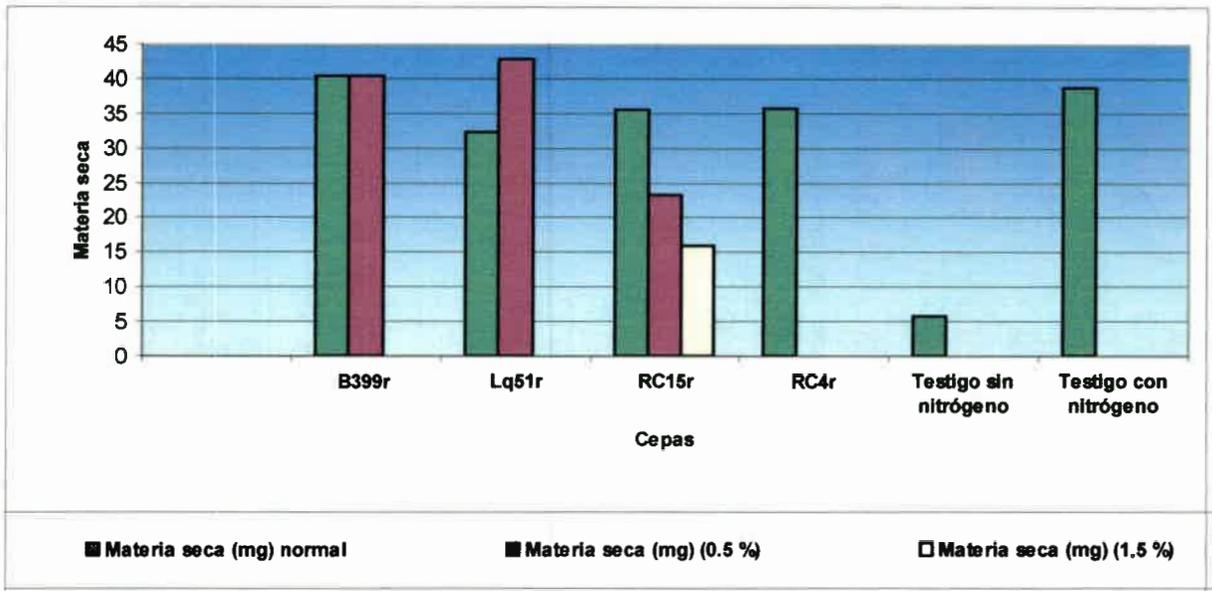


Fig. 34. Valores de materia seca obtenidos en el ensayo en cámara climatizada realizado con las cepas B399r, Lq51r, RC15r y RC4r a concentración normal de NaCl, con 0,5% de NaCl y 1,5 % de NaCl frente a los testigos.

Ensayo de nodulación en cámara climatizada.

Las cepas B399r y Lq51r presentaron en condiciones normales y a 0,5 % de NaCl muy buen desarrollo de nódulos. La cepa RC15r en las tres concentraciones también noduló satisfactoriamente, pero no ocurrió lo mismo con la cepa RC4r que sólo noduló en condiciones normales. Los resultados se muestran en las Figuras 35, 36, 37, 38 y 39.



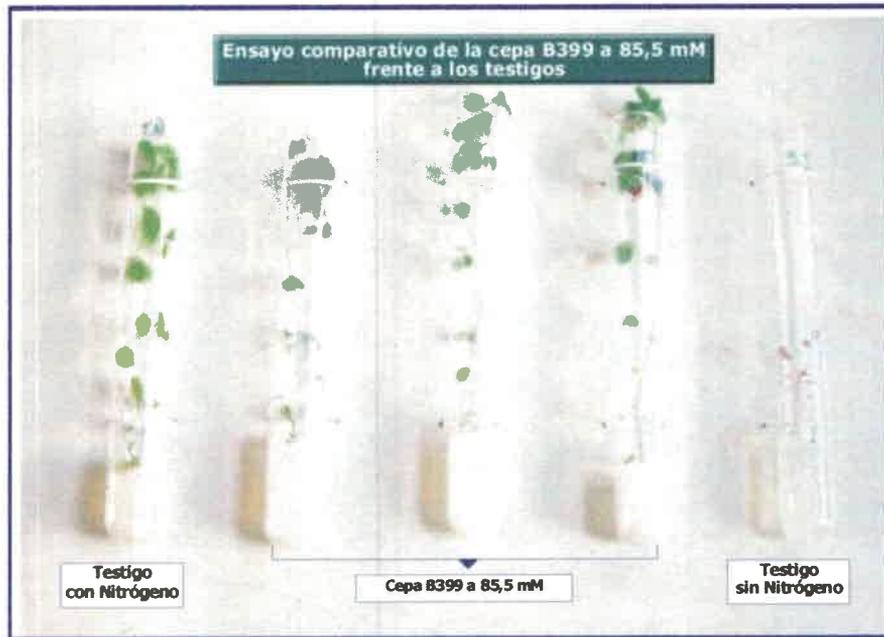


Fig. 35. Plantas crecidas en cámara climatizada, con una concentración de NaCl en el medio de Jensen de 85,5 mM e inoculadas con la cepa B399r.

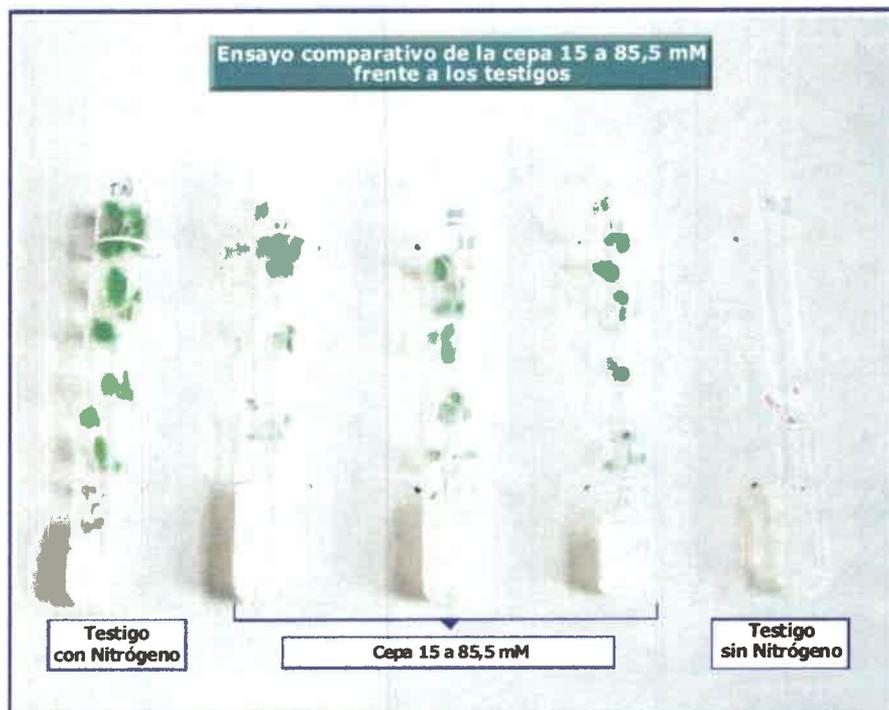
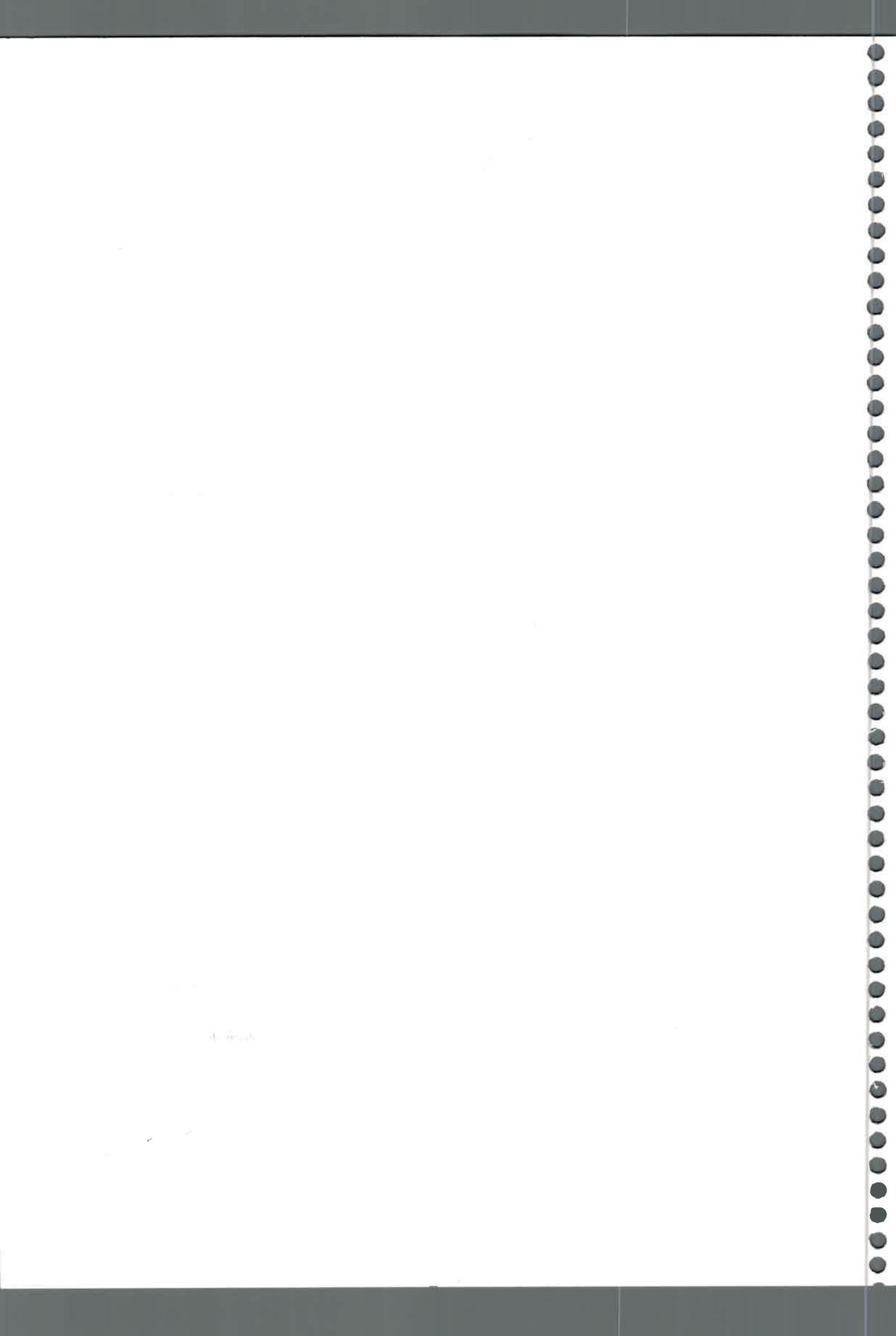


Fig. 36. Plantas crecidas en cámara climatizada, con una concentración de NaCl en el medio Jensen de 85,5 mM e inoculadas con la cepa RC15r.



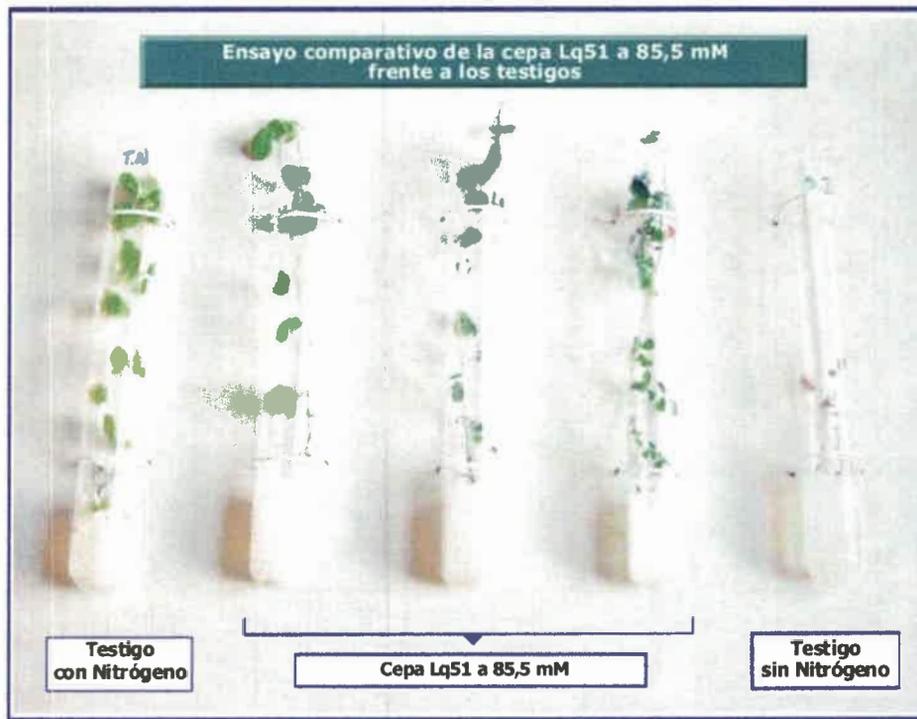


Fig. 37. Plantas crecidas en cámara climatizada, con una concentración de NaCl en el medio Jensen de 85,5 mM e inoculadas con la cepa Lq51r.

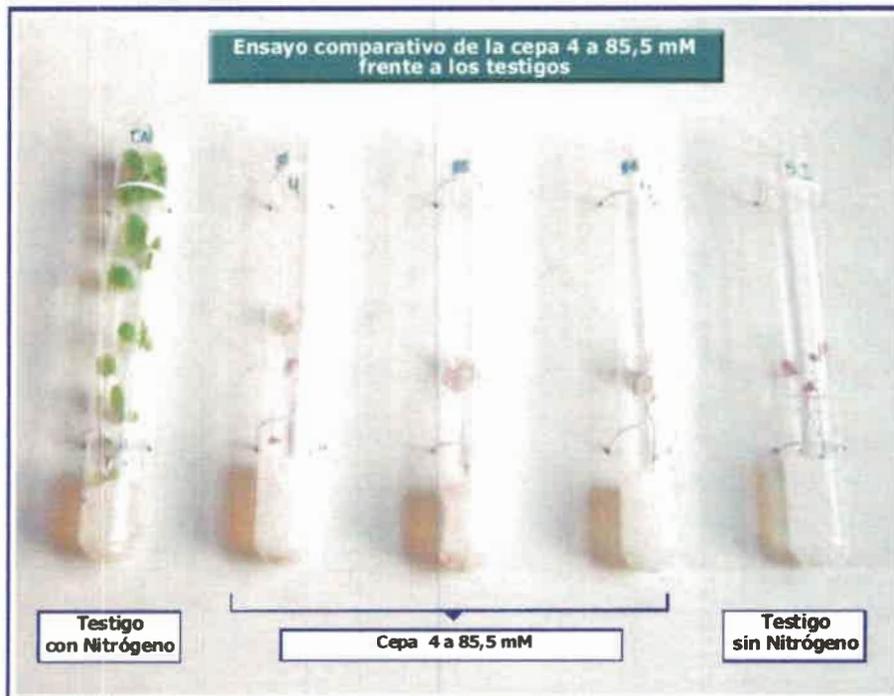


Fig. 38. Plantas crecidas en cámara climatizada, con una concentración de NaCl en el medio Jensen de 85,5 mM e inoculadas con la cepa RC4r.



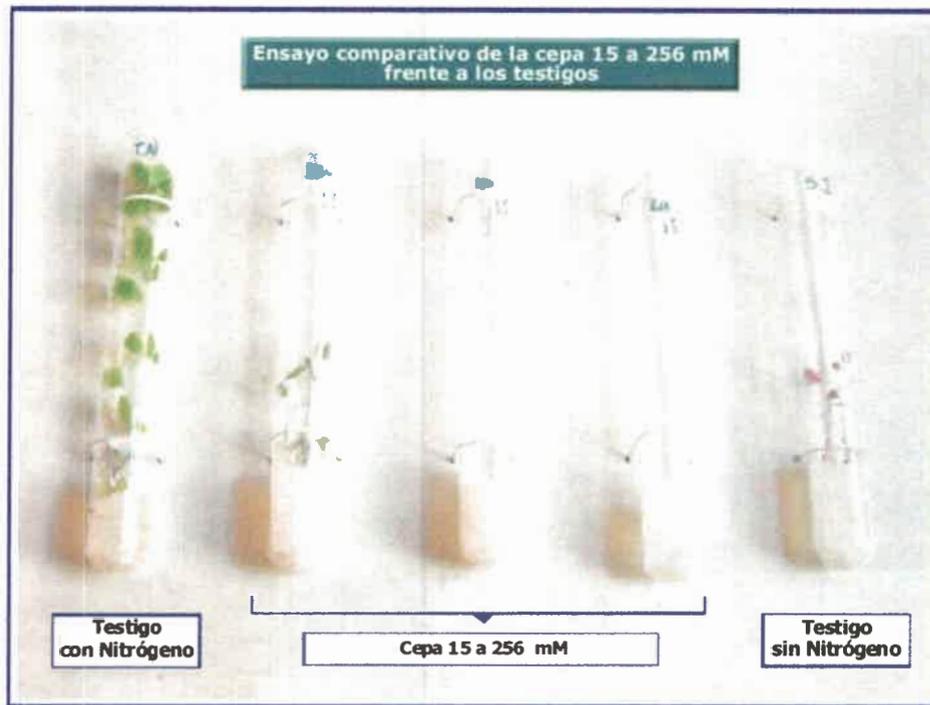


Fig. 39. Plantas crecidas en cámara climatizada, con una concentración de NaCl en el medio Jensen de 256 mM e inoculadas con la cepa RC15r.

Se aislaron los rizobios de los nódulos cosechados y se realizaron las electroforesis de isoenzimas para caracterizar las cepas con las que se estuvo trabajando. Se obtuvieron los siguientes perfiles para las enzimas α y β esterases determinados según Materiales y Métodos.

El análisis de los perfiles de α y β esterases (Figura 40), de las cepas aisladas revelan que la cepa Lq51r, presenta los mismos perfiles, detallados en las tres primeras calles. El primer perfil corresponde a la cepa crecida en condiciones normales, en la segunda se agregó al medio TY 5 g/l de NaCl y en la tercera se corrió una cepa que ya estaba adaptada a una concentración de 85,5 mM. Los Rf calculados son 0,42; 0,46 y 0,67 para las α esterases y para β esterases 0,06 y 0,181. Para la cepa RC15r, en el cuarto lugar, la cepa creció en medio TY con el agregado de 15 g/l, los Rf calculados son 0,18 para β esterases y 0,30 y 0,60 para α esterases. En el quinto lugar se encuentra la cepa RC15r en condiciones normales los Rf para β esterases son 0,18; 0,26 y 0,32 para α esterases es de 0,46; 0,52; 0,67 y 0,76. En el sexto lugar se encuentra la cepa RC15r adaptada a una concentración de 256 mM. Los dos últimos perfiles corresponden a la cepa RC15r con el agregado de 5 g/l de NaCl en el medio TY y adaptada a 85,5 mM, respectivamente. Los Rf calculados son 0,30 y 0,60 para α esterases.



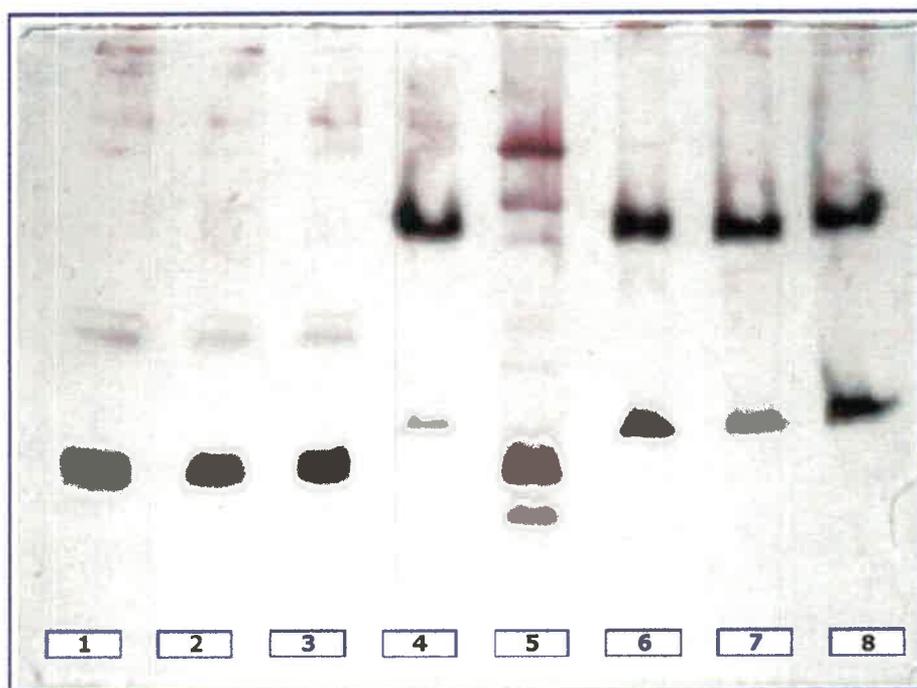


Fig. 40. Perfiles isoenzimáticos de α y β estererasas de las cepas Lq51r y RC15r.

Calle 1. Cepa Lq51r crecida en medio TY en condiciones normales.

Calle 2. Cepa Lq51r crecida en medio TY con el agregado de 5 g/l de NaCl.

Calle 3. Cepa Lq51r crecida en medio TY adaptada con anterioridad a la concentración de 85,5 mM de NaCl.

Calle 4. Cepa RC15r crecida en medio TY con el agregado de 15 g/l de NaCl.

Calle 5. Cepa RC15r crecida en medio TY en condiciones normales.

Calle 6. Cepa RC15r crecida en medio TY adaptada con anterioridad a la concentración de 256 mM de NaCl.

Calle 7. Cepa RC15r crecida en medio TY con el agregado de 5 g/l de NaCl.

Calle 8. Cepa RC15r crecida en medio TY adaptada con anterioridad a la concentración de 85,5 mM de NaCl.

Los perfiles que se muestran en la Figura 41 pertenecen, las tres primeras calles a la cepa patrón B399r. En primer lugar se trata de la cepa adaptada a 85,5 mM, los Rf calculados son 0,06; 0,19 y 0,28 para β estererasas. En la segunda calle la cepa creció en medio TY con el agregado de 5 g/l de NaCl, los Rf calculados son 0,09; 0,19; 0,30 y 0,35 para β estererasas y de 0,66; 0,76 y 0,83 para α estererasas. La tercera pertenece a la cepa B399 en condiciones normales, los Rf calculados para β estererasas son 0,19; 0,29; 0,35 y 0,49 y para α estererasas 0,58; 0,76 y 0,83. En cuarto lugar se encuentra el perfil de la cepa RC4r adaptada a 85,5 mM. El perfil que se encuentra en el quinto

lugar se trata de la cepa RC4r con el agregado de 5 g/l de NaCl al medio TY. Los Rf calculados para estos dos perfiles coinciden, para α esterasas se calcularon 0,04; 0,16; 0,24; 0,26; 0,51; 0,59 y 0,76 y para β esterasas 0,71. En el sexto lugar encontramos la cepa RC4r en condiciones normales, los Rf calculados para β esterasas son 0,20; 0,29; 0,35 y 0,58 y para α esterasas 0,76 y 0,82. En los últimos dos lugares se encuentran los perfiles isoenzimáticos de la cepa RC15r adaptada a 427 mM, con Rf calculados para α esterasas de 0,04; 0,09; 0,25; 0,34; 0,66; 0,71 y 0,76, y normal, con Rf calculados para β esterasas 0,21; 0,29 y 0,35 y para α esterasas 0,48; 0,57; 0,63; 0,73 y 0,81.

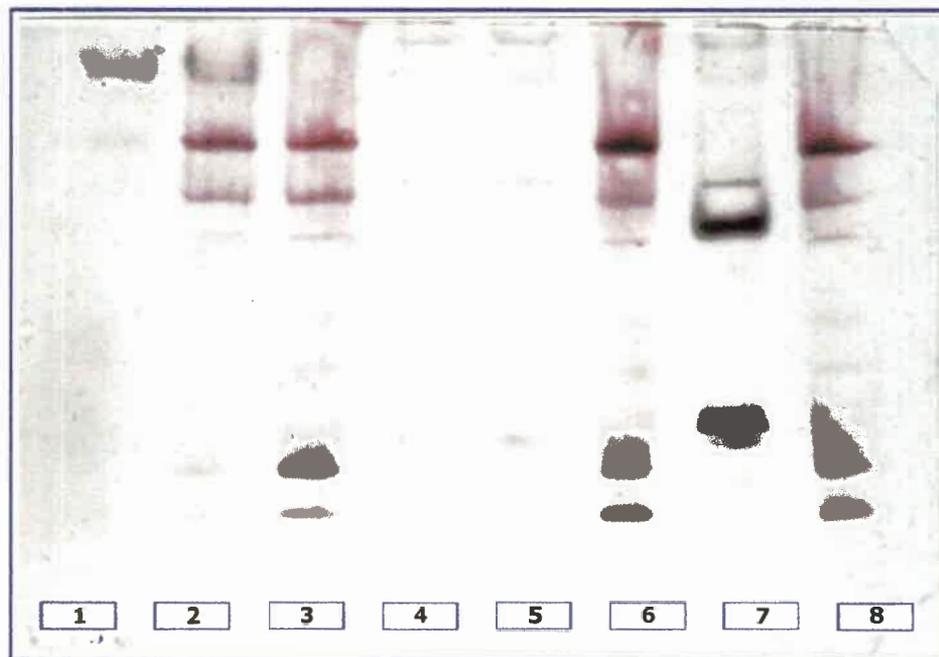


Fig. 41. Perfiles isoenzimáticos de α y β esterasas de las cepas B399r y RC4r.

Calle 1. Cepa B399r crecida en medio TY adaptada con anterioridad a la concentración de 85,5 mM de NaCl.

Calle 2. Cepa B399r crecida en medio TY con el agregado de 5 g/l de NaCl.

Calle 3. Cepa Lq51r crecida en medio TY en condiciones normales.

Calle 4. Cepa RC4r crecida en medio TY adaptada con anterioridad a la concentración de 85,5 mM de NaCl.

Calle 5. Cepa RC4r crecida en medio TY con el agregado de 5 g/l de NaCl.

Calle 6. Cepa RC4r crecida en medio TY en condiciones normales.

Calle 7. Cepa RC15r crecida en medio TY adaptada con anterioridad a la concentración de 427 mM de NaCl.

Calle 8. Cepa RC15r crecida en medio TY en condiciones normales.

Conductividad y pH de la muestra de suelo de la zona del Bajo Giuliani.

El pH se determinó en pasta y en la solución de extracción 1: 5 y la conductividad en el extracto. Se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 15. Valores de pH y conductividad del suelo que se utilizará en el ensayo de invernáculo.

Muestra	pH en pasta	pH en solución de extracción	Conductividad (milimho x cm⁻¹)
Loma	7,79	8,06	1,4
Media Loma	6,19	6,64	1,2
Bajo	6,67	6,80	15,8
Mezcla	6,75	7,28	6,6

Teniendo en cuenta estos resultados se prepararon dos mezclas con una proporción de loma: media loma: bajo de 100: 100: 125 y 100: 100: 150. La conductividad para cada mezcla fue de 8,3 milimho x cm⁻¹ y 9,5 milimho x cm⁻¹ respectivamente. Se determinó, con estos valores que se va a utilizar para las macetas una proporción de 100: 100: 150 de acuerdo al relieve del suelo, porque el valor de conductividad obtenido corresponde a un suelo muy salino.

Valores de NMP de los inóculos que se utilizaron en el ensayo de invernáculo.

Los valores de número más probable que se obtuvieron en los diferentes ensayos son del orden de 10⁵. Para la cepa RC15r, a 85,5 mM, el valor obtenido fue de 5,8 x 10⁵ microorganismo / semilla, al observar al microscopio el cultivo estaba muy denso, poblado y puro. Con las cepas RC4r, Lq51r y B399r a 85,5 mM se obtuvo el valor 1,7 x 10⁵ microorganismo / semilla. En la observación microscópica la densidad en el crecimiento de la cepa RC4r aparentemente era menor. Para la cepa RC15r a 256 mM el valor hallado fue de 5,8 x 10¹ microorganismo / semilla, la densidad de crecimiento observada al microscopio fue muy baja. El valor obtenido para el testigo realizado con el suelo para determinar el número más probable de población nativa fue de 1,7 x 10¹ microorganismo/g.

Determinación del contenido de nitrógeno, proteína y peso seco de parte aérea y raíz.

Una vez cosechadas las plantas que se estaban desarrollando en el invernáculo, se pusieron a secar las raíces y la parte aérea para determinar el peso seco. Se determinó el contenido de nitrógeno y proteínas para cada uno de los tratamientos.

Los resultados obtenidos se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 16. Valores de peso seco de la parte aérea, de la raíz, porcentaje de nitrógeno y de proteínas, obtenidos en el ensayo en invernáculo.

Tratamiento	Peso seco promedio parte aérea (g)	Peso seco promedio raíz (g)	% N	% Proteínas	Promedio % N	Promedio % Proteínas
B399r 85,5 mM	0,757083	0,295	2,685	13,719	2,74	17,12
			2,718	11,987		
			2,817	17,607		
Lq51r 85,5 mM	0,8333	0,2742	1,858	11,612	1,772	11,077
			1,878	11,737		
			1,581	9,881		
RC 4r 85,5mM	0,95083	0,460833	1,806	11,287	1,813	11,331
			1,704	10,65		
			1,928	12,05		
RC15r 85,5 mM	0,76	0,279166	2,286	14,287	2,266	14,162
			2,439	15,242		
			2,072	12,950		
RC15r 256 mM	0,7483	0,345	2,062	12,887	1,976	12,352
			1,897	11,856		
			1,970	12,312		
T s/N	0,925	0,3	1,970	12,312	1,902	11,885
			1,735	10,844		
			2,000	12,501		
T N	0,605	0,2627	2,710	16,937	2,717	16,979
			2,714	16,962		
			2,726	17,037		

En las Figura 42 se muestran las plantas desarrolladas en invernáculo e inoculadas con las cuatro cepas adaptadas para ser utilizadas en suelos salinos.



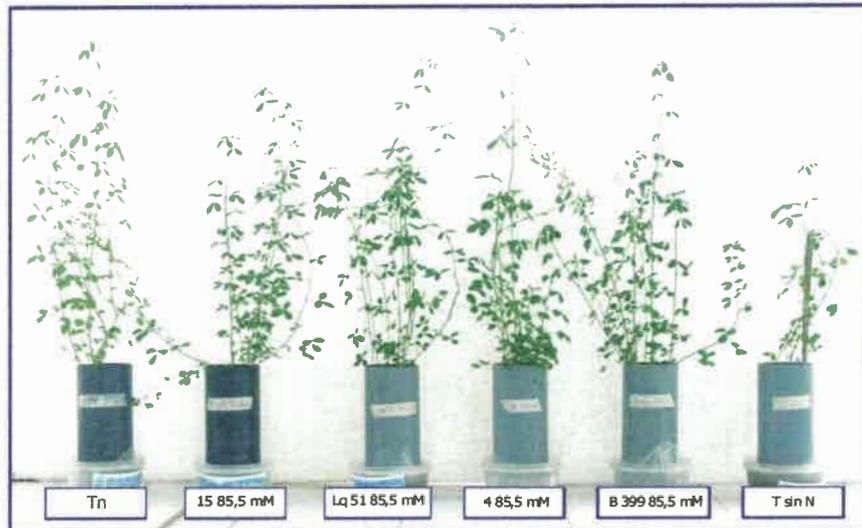


Fig. 42. Plantas crecidas en invernáculo con suelo salino e inoculadas con las cepas RC15r, Lq51r, RC4r y B399r.

En la Figura 43 se muestra el desarrollo aéreo y radical de una planta de alfalfa inoculada con la cepa RC15r.



Fig. 43. Planta inoculada con la cepa RC15r y desarrollo de su sistema radical.

Se observó un porcentaje en la nodulación elevado con gran cantidad de nódulos en raíz principal y las raíces laterales, siendo estos efectivos en apariencia porque presentaban coloración rosada. En



las Figuras 44, 45 y 46 se muestran los desarrollos radicales de las plantas inoculadas con las cepas Lq51r y Rc15r, y los nódulos obtenidos en las raíces de las plantas inoculadas con la cepa B399r.



Fig. 44. Raíces noduladas de tres plantas inoculadas con la cepa Lq51r.



Fig. 45. Raíces noduladas de tres plantas inoculadas con la cepa RC15r.



Fig. 46. Nódulos de las raíces de las plantas inoculadas con la cepa B399r.



1. The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions and activities. It emphasizes that this is crucial for ensuring transparency and accountability in the organization's operations.

2. The second part of the document outlines the various methods and tools used to collect and analyze data. It highlights the need for consistent data collection procedures and the use of advanced analytical techniques to derive meaningful insights from the data.

3. The third part of the document focuses on the role of technology in data management and analysis. It discusses how modern software solutions can streamline data collection, storage, and processing, thereby improving efficiency and accuracy.

4. The fourth part of the document addresses the challenges associated with data management, such as data quality, security, and privacy. It provides strategies to mitigate these risks and ensure that the data remains reliable and secure throughout its lifecycle.

5. The fifth part of the document concludes by summarizing the key findings and recommendations. It stresses the importance of a data-driven approach in decision-making and the need for continuous monitoring and improvement of the data management process.

DISCUSIÓN

Al analizar los valores de materia seca, de porcentaje de nitrógeno y de proteínas que se obtuvieron del ensayo en cámara climatizada para evaluar las cepas de *Sinorhizobium meliloti* aisladas de una región próxima a Río Cuarto se determinó que las caracterizadas como RC4, RC6, RC15 y RC23 demostraron aceptables propiedades simbióticas (infectividad y efectividad) ya que los parámetros citados en comparación a los obtenidos para los testigos (tratamiento sin inocular y fertilizado con nitrógeno) superan un índice de eficiencia relativo de 75%, valor recomendable por bibliografía como límite para una selección de cepas con potencial agronómico (Vincent, 1970; CIAT, 1988) Estas cepas más otras obtenidas de la región semiárida pampeana cuyas propiedades simbióticas ya habían sido probadas en las distintas instancias de cámara climatizada, invernáculo y en campo como muy eficientes (Grassano, 1994), y la cepa B399 como patrón recomendada por los organismos Nacionales de Referencia, fueron elegidas para su desarrollo en medios de cultivo agarizado en las distintas condiciones de salinidad propuestas para lograr resistencia, de acuerdo a lo recomendado por. (Lloret et al., 1995; Balatti y J. Freire, 1996).

Con los aislamientos obtenidos en esta etapa se realizaron experiencias de crecimiento en medio líquido para analizar su desarrollo y comportamiento como posibles productos biotecnológicos. Del análisis del desarrollo de las curvas de crecimiento y considerando los tiempos de duplicación y velocidad específica de crecimiento, parámetros biotecnológicos muy importantes, se comprobó que las cepas designadas como B399r, Lq51r y RC15r a concentraciones de NaCl 85,5 mM (conductividad 10,7 mS.cm⁻¹ que equivale a suelos muy salinos) y 256 mM (conductividad 25,3 mS.cm⁻¹ correspondiente a suelos extremadamente salinos) (Fassbender, 1987) arrojan tiempos de duplicación que fluctúan entre 2 y 3 hs que son los valores normales que se conocen para microorganismos de crecimiento rápido. La cinética de estos procesos responde a condiciones biotecnológicas deseables debido a que estos tiempos de duplicación se traducen en un acortamiento del período lag del desarrollo hecho que conduce a una optimización del proceso ya que por una parte se disminuyen los riesgos de contaminación y por otra se obtiene un ahorro de energía que disminuye costos operativos (Balatti y Jardim Freire, 1996). En el caso de la cepa RC4r este comportamiento se repite para la concentración salina 427 mM. Además presentan un desarrollo de biomasa adecuado ya que se obtienen valores de UDO superiores a 4 unidades lo que implica una viabilidad del orden de 10¹⁰ microorganismos por ml de medio.



Estos criterios de análisis: variables cinéticas y rendimiento de biomasa condujeron a desechar los otros aislamientos.

Si se considera la cepa Lq42r no se observa reproducibilidad en las repeticiones y si bien una de ellas alcanza valores de UDO superiores a 4 el tiempo de duplicación fluctúa entre 8 h 28 min. Para concentración salina de 85,5 mM hasta 13 h 48 min. Para la concentración de 427 mM lo que la hace inviable para su uso tecnológico por las razones ya expuestas.

Situaciones semejantes surgen del análisis de los procesos de las otras cepas no seleccionadas, Para Lq22r se obtienen tiempos de duplicación muy altos, a pesar de alcanzar rendimientos superiores a 6 UDO en concentración 85,5 mM.

Respecto del aislamiento RC23r (a 85,5 mM y 256 mM) sus parámetros cinéticos están comprendidos en un rango que puede considerarse aceptable, pero no hay buena reproducibilidad en las repeticiones y los valores de biomasa celular en ningún caso llegan a 4 UDO.

Para la cepa RC6r a idénticas concentraciones de las indicadas para RC23r se repiten las consideraciones cinéticas, hay reproducibilidad en los duplicados pero no se logran desarrollos de biomasa superiores a 3-3,5 UDO y además su curva de crecimiento muestra una marcada anomalía de un brusco descenso al entrar en la fase estacionaria, hecho que se repite para las dos concentraciones consideradas y en sus duplicados.

La variedad de *Medicago sativa* seleccionada para realizar el ensayo es la Salinera INTA porque de acuerdo al ensayo realizado frente a la variedad Magnum 3, presentó una mejor respuesta a condiciones de estrés salino de 85,5 mM equivalente a un suelo caracterizado como salino o muy salino, esto es consistente con las características de la variedad explicitadas en la Introducción.(Cornacchione, M.).

Confrontando estos resultados se puede concluir que la limitante de estas experiencias es la variedad vegetal (Parker y col. 1977; Sprent,1984).ya que las cepas elegidas mostraron una buena adaptación a condiciones de salinidad elevadas en medio líquido y agarizado.

Al realizar el ensayo en cámara climatizada con la especie Salinera INTA y con las cepas seleccionadas B399r, Lq51r, RC15r y RC4r, a 85,5 mM, 256 mM y 427 mM se observó que la simbiosis se mantenía en las cepas B399r y Lq51r en condiciones normales, conductividad 1,430 mS.cm⁻¹, y a 85,5 mM, conductividad 9,300 mS.cm⁻¹. La cepa RC15r presentó nodulaciones efectivas en las tres concentraciones, la concentración de 256 mM equivale a una conductividad 22,000 mS.cm⁻¹ y la concentración de 427 mM equivale a una conductividad de 37,400 mS.cm⁻¹. La cepa RC4r noduló solamente en condiciones normales.

Se aislaron los rizobios de los nódulos obtenidos y se realizaron las electroforesis de isoenzimas. Los perfiles de isoenzimas obtenidos corresponden a los perfiles isoenzimáticos de especies de

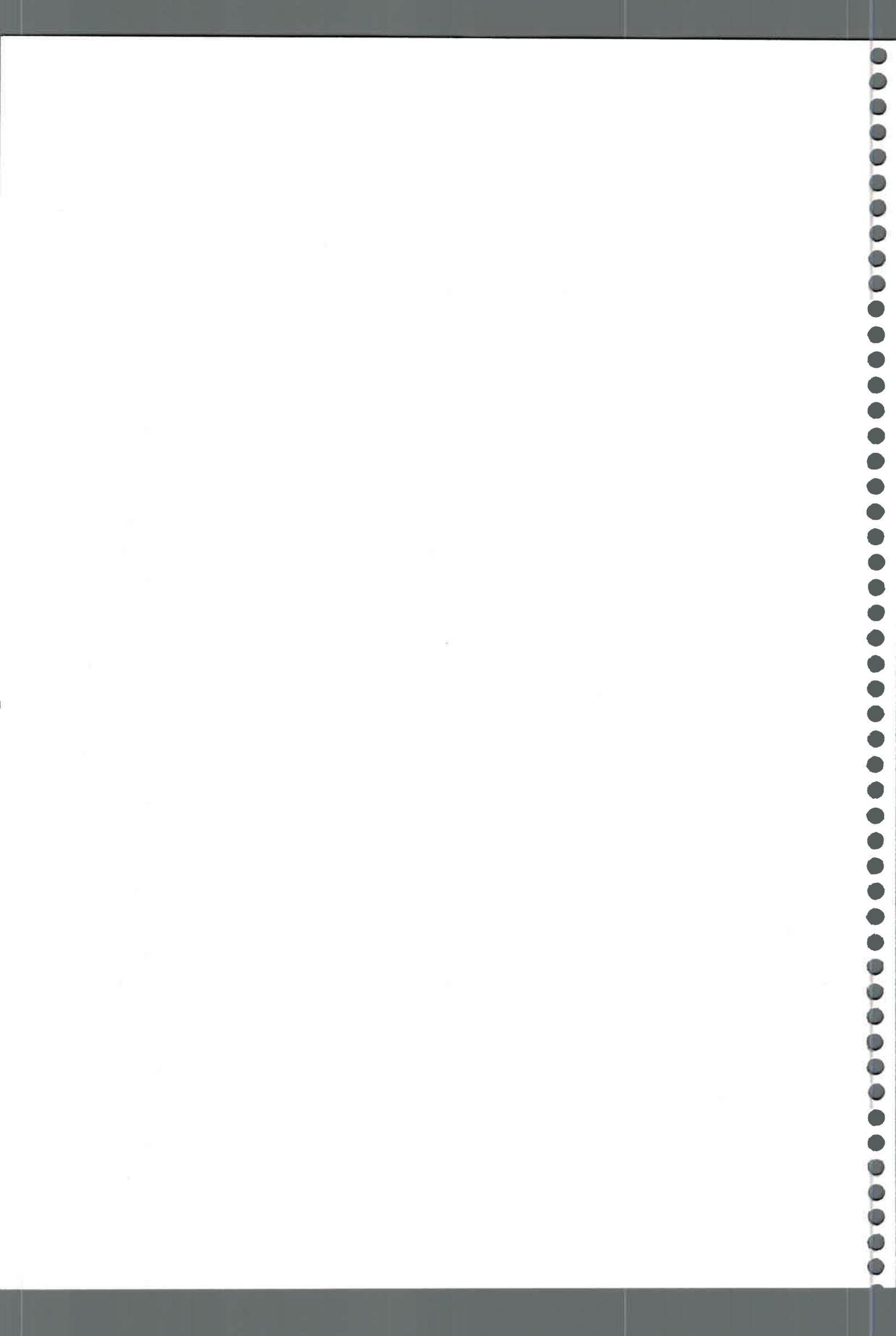


Sinorhizobium meliloti y se pudo observar que están conservados estos perfiles en las diferentes concentraciones salinas utilizadas, confirmando de este modo que se ha logrado la adaptación sin que se produzcan modificaciones en el genotipo isoenzimático de dichas cepas. Las ligeras desviaciones que se observan en algunos valores de Rf como se detalla en los resultados, corresponderían a una ligera deficiencia en el grado de polimerización del gel o a la falta de uniformidad en las condiciones eléctricas durante el desarrollo del electroforetograma, debido a que se cuenta con fuentes de poder que solo permiten trabajar a potencial (V) y/o corriente (A) constante cuando lo deseable es desarrollar la corrida en condiciones de potencia (W) constante pues de este modo se disminuye el efecto Joule que se genera por el rozamiento de las biomoléculas al desplazarse a través de los poros del gel, obteniéndose una mejor resolución con bandas nítidas, sin difusión y un desplazamiento con velocidades que dependen exclusivamente de la movilidad electroforética (me) de las biomoléculas.(Andrews, 1988, Ferreira y Grattapaaglia, 1996)

Finalmente se probaron estas cepas, B399r, Lq51r, RC15r y RC4r, en una prueba realizada en invernáculo con un suelo muy salino con una conductividad de $9,500 \text{ mS.cm}^{-1}$ que equivale a una concentración de $85,5 \text{ mM}$ (0,5 %). La cepa RC15r, como mostró una muy buena nodulación en las tres concentraciones en el ensayo en cámara, se probó en invernáculo como se comportaba haciendo crecer la cepa a la concentración de 256 mM (1,5 %) e inoculando las plantas que están en un suelo con una conductividad de $9,5 \text{ mS.cm}^{-1}$. La cepa RC4r se incluyó en este ensayo, a pesar que sólo había nodulado en condiciones normales en cámara climatizada, porque su comportamiento en las curvas de crecimiento había sido satisfactorio. Se supuso que la poca nodulación en cámara climatizada podría deberse a alguna limitación durante el ensayo, considerándose que debía someterse a condiciones más semejantes a las que debe someterse un microorganismo cuando inciden en los factores bióticos y abióticos. Existen muchos trabajos que ilustran los problemas que surgen cuando se estudia una propiedad o condición aisladamente, y luego se generaliza para el mecanismo de simbiosis rizobio-leguminosa en condiciones reales de campo. (Marques Pinto y col.,1974; Labandera y Vincent, 1975; Materon y Vincent, 1980)

En este ensayo se observa que el recuento de microorganismos viables por semilla supera, en todos los casos de inoculación con desarrollos a $85,5 \text{ mM}$ de NaCl, los estándares recomendados por la legislación vigente para la aplicación correcta de la técnica de inoculación, excepto para el caso de RC15r a 256 mM .

El número de microorganismos existente en el suelo era muy bajo y por eso no hubo riesgo de que ejerciera una presión importante al tiempo de inocular. Este hecho es muy importante al



momento de decidir si se aplica la técnica de inoculación y cómo debe procederse para que los microorganismos introducidos puedan competir eficazmente, con los naturalizados.(Keyser, 2000)

En todos los tratamientos inoculados se observa buena nodulación tanto en cantidad como en su ubicación y viabilidad, por lo que se asegura la propiedad de **infectividad** de los microorganismos en estudios. Si bien los resultados de materia seca y porcentaje de Nitrógeno arrojan resultados por debajo de lo normal de acuerdo a la bibliografía, este hecho debería atribuirse a la limitante impuesta por la alfalfa en su desarrollo en condiciones de la salinidad ensayadas ya que los valores que muestran los resultados del testigo fertilizado son similares a los obtenidos en los tratamientos inoculados lo que sugiere que los microorganismos realizaron una **eficiente** fijación de Nitrógeno.

Conclusiones.

Del análisis de los resultados obtenidos podemos concluir que:

1. Se comprueba que algunas cepas que se adaptan a concentraciones salinas elevadas conservando sus perfiles isoenzimáticos característicos.
2. Se corrobora que la limitante a concentraciones salinas elevadas está dada por la variedad de la planta hospedadora, que es muy sensible a los suelos salinos.
3. Las cepas crecidas en medio con mayor concentración salina a la del suelo y que son utilizadas para inocular este suelo son **infectivas** ya que se verifica el mecanismo de nodulación.
4. Si bien los porcentajes de Nitrógeno y proteínas disminuyen en suelos de alta salinización, respecto a suelos de conductividades adecuadas para el normal crecimiento y rendimiento de la alfalfa; los resultados obtenidos constituyen un aporte significativo dado que los microorganismos adaptados pueden desarrollar una simbiosis relativamente **efectiva** frente a las condiciones limitantes de la forrajera lo que redundaría en tener la posibilidad de forraje en zonas improductivas.



BIBLIOGRAFIA

1. Andrews T.A. (1988). "Basic Principles of electrophoresis. In Electrophoresis. Theory, Techniques and Biochemical and Clinical Applications". Clarendon PRESS. Oxford. Cap.1: 1-74.
2. Balatti A.P y Jardim Freire J. (1996). "Legume Inoculants. Selection and characterization of strains. Production, use and management". Ed. Kingraf. La Plata, Argentina. 148 pag.
3. Barboza F., Correa N., Rosas S. (1995). "Estudios metabólicos de cepas de *Bradyrhizobium sp.* tolerantes a estrés salino". Memorias XVIII Reunión Latinoamericana de Rhizobiología. Santa Cruz de la Sierra. Bolivia. Editores Jan Pijnenborg, David Ruiz, Wilma Siles. Asociación Latinoamericana de Rhizobiología (ALAR). Proyecto Rhizobiología Bolivia (CIAT – CIF – PNGL – CIFP – WAU). Imprenta Sirena, Santa Cruz de la Sierra, Bolivia. Pág. 197 - 199.
4. Barboza F., Fulchieri M., Correa N., Rosas S. (2000). "Caracterización genotípica y fenotípica de cepas de *Bradyrhizobium sp.* tolerantes a salinidad". XX Reunión Latinoamericana de Rhizobiología y defensa del medio ambiente. IDEMA (Instituto de Defensa del Medio Ambiente). Anales Científicos XX RELAR Arequipa Perú. Pag.: 10.
5. Báscones Elena, Imperial Juan, Ruiz-Argüeso Tomás, Palacios José Manuel. (2000). "Generation of New Hydrogen-Recycling *Rhizobiaceae* Strains by Introduction of a Novel *hup* Minitransposon". Applied and Environmental Microbiology, Vol. 66, No. 10, p. 4292-4299.
6. Boncompagni Eric, Østerås Magne, Poggi Marie-Christine, Le Rudulier Daniel. (1999). "Occurrence of Choline and Glycine Betaine Uptake and Metabolism in the Family *Rhizobiaceae* and Their Roles in Osmoprotection". Applied and Environmental Microbiology, Vol. 65, No. 5, p. 2072-2077.
7. Brock Thomas D., Madigan Michael T. (1993). Microbiología. Sexta Edición. Prentice Hall Hispanoamericana S.A. Capítulo 17, Ecología Microbiana, pp. 715-720.

8. Carelli Maria, Gnocchi Stefano, Fancelli Silvia, Mengoni Alessio, Paffetti Donatella, Scotti Carla, Bazzicalupo Marco. (2000). "Genetic Diversity and Dynamics of *Sinorhizobium meliloti* Populations Nodulating Different Alfalfa Cultivars in Italian Soils". Applied and Environmental Microbiology, Vol. 66, No. 11, p. 4785-4789.
9. Castillo Marcela, Flores Margarita, Mavingui Patrick, Martínez-Romero Esperanza, Palacios Rafael, Hernández Georgina. (1999). "Increase in Alfalfa Nodulation, Nitrogen Fixation, and Plant Growth by Specific DNA Amplification in *Sinorhizobium meliloti*". Applied and Environmental Microbiology, Vol. 65, No. 6, pág. 2716-2722.
10. Catalán A.I., Carrera I., Batista S., Martínez – Drets G. (1995). "Crecimiento y expresión de los genes de nodulación en *Rhizobium meliloti* en condiciones de estrés". Memorias XVIII Reunión Latinoamericana de rizobiología. Santa Cruz de la Sierra. Bolivia. Editores Jan Pijnenborg, David Ruiz, Wilma Siles. Asociación Latinoamericana de Rizobiología (ALAR). Proyecto Rizobiología Bolivia (CIAT – CIF – PNGL – CIFP – WAU). Imprenta Sirena, Santa Cruz de la Sierra, Bolivia, pág. 227 - 231.
11. Chien C. T, Maundu. J., Dandurand, L.M., Osser, C.S. (1992). "Characterizacion of salt – tolerance and salt – sensitive mutants of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* strain 1204b". FEMS. Microbiol. Lett. 69; pág.135 – 140.
12. CIAT Centro Internacional de Agricultura Tropical. (1988). "Simbiosis leguminosa – rizobio; manual de métodos de evaluación, selección y manejo agronómico". Ed. Por Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 178 pág.
13. Collins M. (1989). "Mineral concentrations in whole crop and pressed forage of three legumes". Agron. J.; 81: 901 – 906.
14. Cornacchione M.(comunicación personal). Becaria – área de producción animal. INTA EEA Santiago del Estero.
15. Csonka L. N. (1989). "Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress". Microbiol Rev; 53(1); pág. 121 – 47.

16. Deshniem P, Los DA, Hayashi H, Mustardy L, Murata N. (1995). "Transformation of *Synechococcus* with a gene for choline oxidase enhances tolerance to salt stress". *Plant Molecular Biology*; 29(5); pág. 897 – 907.
17. Entcheva Plamena, Phillips Donald A., Streit Wolfgang R. (2002). "Functional Analysis of *Sinorhizobium meliloti* Genes Involved in Biotin Synthesis and Transport". *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 68, No. 6, pág. 2843-2848.
18. Fassbender Hans W., Bornemisza Elemer.(1987). *Química de Suelos con énfasis en suelos de América Latina*. Instituto Interamericano de Cooperación para la agricultura San José, Costa Rica. Capítulo 6. Suelos salinos y sódicos, pp. 187-191.
19. Frazzon Jeverson, Spee Johan, Christiansen Jasón, Dean Dennis R. (1997). "Nitrogenase: Two Decades of Biochemical Genetics". Vol G 39 *Biological Fixation of Nitrogen for Ecology and Sustainable Agriculture*. Pág. 3 – 7.
20. Ferreira,M.E y Grattapaglia D. (1996). "Introducao ao Uso de Marcadores Moleculares em Analise Genética". EMBRAPA. Brasilia,DF.219 pag.
21. Ghittoni, Nora E.; Bueno Miguel A. (1992). "Relación entre estrés salino y aparición de un osmoprotector periplásmico en *Rhizobium* sp. simbionte de maní". Programa de actividades y resúmenes de la XVI Reunión Latinoamericana de Rhizobiología. Santa Rosa. La Pampa. Imprenta: Departamento Gráfico. Dirección de Prensa y Difusión. Secretaría de Cultura y Extensión Universitaria. Universidad Nacional de La Pampa. Pág. 55.
22. Glick Bernard R., Pasternak Jack J.. (1998). "Molecular Biotechnology. Principles and Applications of Recombinant DNA". Second Edition. Cap. 14. "Plant Growth – Promoting Bacteria". Pág. 347 – 374.
23. González P.S., Dardanelli M.S., Ghittoni N.E.. (1995). "Contenido Potásico y capacidad de nodulación de microsimbiontes del maní sometidos a estrés hipersalino". Memorias XVIII Reunión Latinoamericana de Rhizobiología. Santa Cruz de la Sierra. Bolivia. Editores Jan Pijnenborg, David Ruiz, Wilma Siles. Asociación Latinoamericana de Rhizobiología (ALAR).

Proyecto Rhizobiología Bolivia (CIAT – CIF – PNGL – CIFP – WAU). Imprenta Sirena, Santa Cruz de la Sierra, Bolivia. Pág: 245 - 247.

24. Gouffi Kamila, Pica Nathalie, Pichereau Vianney, Blanco Carlos. (1999). “Disaccharides as a New Class of Nonaccumulated Osmoprotectants for *Sinorhizobium meliloti* “. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 65, No.4, pág. 1491-1500.

25. Gouffi Kamila, Bernard Théophile, Blanco Carlos. (2000). “Osmoprotection by Pipecolic Acid in *Sinorhizobium meliloti*: Specific Effects of D and L Isomers”. Applied and Environmental Microbiology, Vol.66, No.6, pág. 2358-2364.

26. Grassano Alicia. (1994). “Fijación simbiótica de Nitrógeno. Estudios sobre Comportamiento Fisiológico de cepas de *Rhizobium meliloti*. Respuesta a la Inoculación de alfalfa con cepas nativas e introducidas en la Región Pampeana”. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de la Pampa. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. 159 pág.

27. Grassano Alicia; Ronchi A.L y Balatti A.P. (1996) “Respuesta de alfalfa a la inoculación en áreas de la provincia de la pampa”. R.I.A-INTA. Vol.26(2); pág. 1-14.

28. Grassano Alicia, Ronchi A.L., Balatti A.P. Scarone J.G. (2002). “Caracterización de cepas nativas de *sinorhizobium meliloti* y su evaluación en la inoculación de alfalfa”. Agrochimica. Vol. XLVI; pág. 1-9. Pisa. Italia.

29. Grasso, Daniel. (2003). Conferencia “Los rizobios son bacterias capaces de transformar el N₂ atmosférico en amonio en asociación simbiótica con la leguminosa”. Curso de Post – Grado Aspectos fisiológicos y bioquímicos de las relaciones plantas – microorganismos. Córdoba, Argentina.

30. Hijano Edgardo H., Basigalup Daniel H. (1995).”El cultivo de la alfalfa en la República Argentina”. La alfalfa en la Argentina Subprograma Alfalfa. EDITAR. Basigalup, Daniel H; Hijano, Edgardo H. Capítulo 1, pág. 14-15.

31. Hijano Edgardo H., Navarro Ariadna. (1995) “La alfalfa en la Argentina Subprograma Alfalfa”. EDITAR. 281 pág.

32. Jebara, M; Aouani, M. E.; Mhamdi, R.; Ghrir, R.; Mars, M.(2000). "Effet du sel des isolats de *Sinorhizobium* sp. de Tunisie in vitro ou en association avec *Medicago sativa*". *Agricultures*. Vol. 9, Número 2. Pág 99 – 102.
33. Jiménez-Zurdo J. I., van Dillewijn P., Soto M. J., de Felipe M. R., Olivares J., Toro N. (1995). "Caracterización del gen de la prolina deshidrogenasa de *Rhizobium meliloti*: implicación en el proceso de infección de *Medicago sativa* L". *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8. Pág. 492-498.
34. Keating David H., Willits Michael G., Long Sharon R. (2002). "A *Sinorhizobium meliloti* Lipopolysaccharide Mutant Altered in Cell Surface Sulfation". *Journal of Bacteriology*, Vol. 184, No. 23; pág. 6681-6689.
35. Keyser H. (2000). "Alternatives in Inoculant Production and use: Current state and prospects". *Anales Científicos de la XX RELAR, Arequipa, Perú*. Pag. 244-249.
36. Kevei Z, Vinardell JM, Kiss GB, Kondorosi A, Kondorosi E. (2002). "Glycine-rich proteins encoded by a nodule-specific gene family are implicated in different stages of symbiotic nodule development in *Medicago* spp". *Mol Plant Microbe Interact*;15(9); pág. 922-31.
37. Koch A. L. (1981). "Growth measurement". In: *Manual of Methods for General Bacteriology*". Ed. by P. Gerhardt y col. American Society for Microbiology, pág: 179 – 207.
38. Labandera C.A. y Vincent J.M.(1975). "Competition between an introduced strain and native Uruguayan strains of *Rhizobium trifolii*". *Plant and Soil*. 42:327-347.
39. Lindsey K., Jones M.G.K. (1992). *Bioteología Vegetal Agrícola*. Editorial Acribia S.A. Capítulo 7. Manipulación de la cantidad y calidad de los productos vegetales, pág: 152-157.



40. Lloret, J., Bolaños, L., Lucas, M. M., Peart, J. M., Brewim, N. J., Bonilla, L., Rivilla, R. (1995). "Ionic stress and osmotic pressure induce different alterations in the lipopolysaccharide of a *Rhizobium meliloti* strain". Appl. Environ. Microbiol. 61: 3701 – 3704.
41. Lloret, J., Wulff, B. B, Rubio, J. M., Downie, J. A., Bonilla, L., Rivilla, R. (1998). "Exopolisaccharide II production is regulated by salt in the halotolerant strain *Rhizobium meliloti* EFB1". Appl. Environ. Microbiol. 64: 1024 – 1028.
42. Luque T. J. Ernesto. (1997). "Comparación de las lectinas extraídas de la semilla y la raíz de arveja (*Pisum sativum*)". Revista Colombiana de Química Volumen 26, No. 1. Pág. 51 – 55.
43. Marketon MM, Gronquist MR, Eberhard A, Gonzalez JE. (2002). "Characterization of the *Sinorhizobium meliloti* sinR/sinI locus and the production of novel N-acyl homoserine lactones". J Bacteriol; 184(20):5686-95.
44. Marketon MM, Glenn SA, Eberhard A, Gonzalez JE. (2003). "Quorum sensing controls exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti*". J Bacteriol; 185(1):325-31.
45. Marques Pinto CC.; Yao Y.P. and Vincent J.M.. (1974). "Nodulating competitiveness amongst strains of *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium trifolii*". Australian Journal of Agricultural Research. 25: 317-329.
46. Materon L.A y Vincent J.M. (1980). "Host specificity and interstrains competition with soybean rhizobia". Fields Crops Research. 3:215-224.
47. McKimmie T., Dobrenz A. K. (1991). "Ionic concentration and water relations of alfalfa seedlings differing in salt tolerance". Agron. J.; 83: 363 – 367.
48. Munnis R. (2002). "Comparative physiology of salt and water stress". Plant, Cell and Environment 25, 239 – 250.

49. Newton William E. (1997). "Molybdenum – Nitrogenase: Estructure and Function". Vol G 39 Biological Fixation of Nitrogen for Ecology and Sustainable Agriculture. Pág. 9 – 12.
50. Nogales Joaquina, Campos Rosario, Ben Abdelkhalek Hanaa, Olivares José, Lluch Carmen, Sanjuán Juan. (2002). "*Rhizobium tropici* genes involved in free – living SALT tolerance and required for the Establishment of efficient Nitrogen – Fixing Symbiosis with *Phaseolus vulgaris*". The American Phytopathological Society. MPMI Vol. 15, Nº 3, pp. 225 – 232.
51. Ohwada, T., Sasaki, Y., Koike, H., Igawa, K., Soto, T. (1998). "Crrrelation between NaCl sensitivity of Rhizobium bacteria and ineffective nodulation of leguminous plants". Biosci. Biotechnol. Biochem. 62: 2086 – 2090.
52. Olivares Pascual José. (2001). Fijación biológica de Nitrógeno. Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada. <http://www.eez.csic.es/>
53. Østerås Magne, Boncompagni Eric, Vincent Nadine, Poggi Marie-Christine, Le Rudulier Daniel. (1998). "Presence of a gene encoding choline sulfatase in *Sinorhizobium meliloti bet* operon: Choline-*O*-sulfate is metabolized into glycine betaine". Microbiology, Vol. 95, Issue 19, 11394-11399.
54. Pérez, S; Torralba, A.(1997). "La fijación del Nitrógeno por los seres vivos". Seminario Fisiología Vegetal, 21.01. Facultad Biología Oviedo. 21 pp.
55. Phillips D. A.; Tsai S. M. (1992). "Flavonoids as plant signals to rhizosphere microbes". Mycorrhiza 1; 55 - 58.
56. Pocard JA, Bernard T, Smith LT, Le Rudulier D. (1989). "Characterization of three choline transport activities in *Rhizobium meliloti*: modulation by choline and osmotic stress". J Bacteriol; 171(1): 531-7.
57. Pocard JA, Vincent N, Boncompagni E, Smith LT, Poggi MC, Le Rudulier D. (1997). "Molecular characterization of the bet genes encoding glycine betaine synthesis in *Sinorhizobium meliloti* 102F34". Microbiology, Vol 143, 1369-1379.



58. Racca R. (2003). Conferencia “Ecofisiología de la simbiosis *Rhizobium* – leguminosa”. Curso de Post – Grado Aspectos fisiológicos y bioquímicos de las relaciones plantas – microorganismos. Córdoba, Argentina.
59. Reuhs Bradley L., Geller Daniel P., Kim John S., Fox Jennifer E., Kumar Kolli V. S. , Pueppke Steven G. (1998). “*Sinorhizobium fredii* and *Sinorhizobium meliloti* produce Structurally Conserved Lipopolysaccharides and Strain-Specific K Antigens. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 64, No. 12, p. 4930-4938.
60. Romero Néstor A; Juan Néstor A.; Romero Luis A; (1995). “Establecimiento de la alfalfa en la región pampeana”. La alfalfa en la Argentina Subprograma Alfalfa. EDITAR. Basigalup, Daniel H; Hijano, Edgardo H. Capítulo 2, pág 23 - 26.
61. SAMLA, Sistema de Apoyo Metodológico de Laboratorios de Suelos y Aguas. (1995). “Determinación del Contenido de sales solubles”. Coordina: - Dirección de Producción Agrícola - S.A.G. y P. Ing. Agr. Carmen VICIEN, Ing. Agr. Susana PENA; Colaboran: - Asociación Argentina de la Ciencia del Suelo: Ing. Agr. Liliana MARBAN; - INTA: Lic. Edaf. María L. RIVERO de GALETTO; - Facultad de Agronomía de la U.B.A.: Ing. Agr. Silvia RATTO; - Sociedad Rural Argentina: Ing. Agr. Ana M. RODRIGUEZ JANEIRO. Pág 1 – 13.
62. Sanjuan-Pinilla JM, Munoz S, Nogales J, Olivares J, Sanjuan J. (2002). “Involvement of the *Sinorhizobium meliloti* leuA gene in activation of nodulation genes by NodD1 and luteolin”. *Arch Microbiol*; 178(1): 36-44.
63. Sanjuán-Pinilla J M. (2003). Conferencia “Componentes y respuestas asociadas a patogénesis identificados en la simbiosis mutualista *Rhizobium* – leguminosa”. Curso de Post – Grado Aspectos fisiológicos y bioquímicos de las relaciones plantas – microorganismos. Córdoba, Argentina.
64. Schröder E. (1995). “La Fijación Biológica del Nitrógeno Atmosférico”. Dpto. de Agronomía y Suelos. Universidad de Puerto Rico. Apuntes de Cátedra.



65. Smith L T, Pocard JA, Bernard T, Le Rudulier D. (1988). "Osmotic control of glycine betaine biosynthesis and degradation in *Rhizobium meliloti*". J Bacteriol; 170(7): 3142 – 9.
66. Smith LT, Smith GM.. (1989). "An osmoregulated dipeptide in stressed *Rhizobium meliloti*". J Bacteriol ;171(9) : 4714-7.
67. Soria R., Correa N., Rosas S.. (1995). "Análisis de exudados radiculares en *Cyamopsis tetragonoloba* bajo condiciones de estrés hídrico y salino". Memorias XVIII Reunión Latinoamericana de Rhizobiología. Santa Cruz de la Sierra. Bolivia. Editores Jan Pijnenborg, David Ruiz, Wilma Siles. Asociación Latinoamericana de Rhizobiología (ALAR). Proyecto Rhizobiología Bolivia (CIAT – CIF – PNGL – CIFP – WAU). Imprenta Sirena, Santa Cruz de la Sierra, Bolivia. Pág: 325 - 327.
68. Soussi, M., Santamaría, M., Ocaña, A., Lluch, C. (2001). "Effects of salinity on protein and lipopolisaccharide pattern in a salt- tolerant strain of *Mesorhizobium ciceri*". J. Appl. Microbiol. 90: 476 – 481.
69. Talibart R, Jebbar M, Gouesbet G, Himdi-Kabbab S, Wroblewski H, Blanco C, Bernard T. (1994). "Osmoadaptation in rhizobia: ectoine-induced salt tolerance". J. Bacteriol., Vol 176, No. 17, 5210-5217.
70. Talibart R, Jebbar M, Gouffi K, Pichereau V, Gouesbet G, Blanco C, Bernard T, Pocard J. (1997). "Transient Accumulation of Glycine Betaine and Dynamics of Endogenous Osmolytes in Salt-Stressed Cultures of *Sinorhizobium meliloti*". Appl. Environ. Microbiol., Vol 63, No.12, 4657-4663.
71. van Dillewijn Pieter, Soto María José, Villadas Pablo J., Toro Nicolás. (2001). "Construction and Environmental Release of a *Sinorhizobium meliloti* Strain Genetically



Modified To Be More Competitive for Alfalfa Nodulation”. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 67, No. 9, p. 3860-3865.

72. van Rhijnt Pieterel, Vanderleyden Jos. (1995). “The *Rhizobium* –Plant Symbiosis”. *Microbiological Reviews*, American Society for Microbiology, Vol. 59, N° 1. Pág 124 – 142.

73. Vincent J. M. (1970). “A manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacteria”. IBP Handbook N° 15. Blackwell, Oxford, England. 163 pág.

74. Ventosa Antonio, Nieto Joaquín J., Oren Aarón. (1998). “Biology of Moderately Halophilic Aerobic Bacteria”. *Microbiol Mol Biol Rev*, Vol. 62, No. 2, p. 504-544.

75. Yang G, Bhuvaneswari TV, Joseph CM, King MD, Phillips DA. (2002). “Roles for riboflavin in the *Sinorhizobium*-alfalfa association”. *Mol Plant Microbe Interact*; 15(5):456-462.

76. Yeo Anthony. (1998). “Molecular biology of salt tolerance in the context of whole – plant physiology”. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 49, No. 323, pp. 915 – 929.

77. Zaharán H. H.. (1999). “*Rhizobium* – legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe conditions and in an Arid Climate”. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Vol. 63, N° 4, p. 968 – 989.



Biblioteca Central



59547

59547