



Diazotrofia de rizobios asociados a plantas de arroz cv. INCA LP-5 e INCA LP-7

Diazotrophy of rhizobia associated with rice plants cv. INCA LP-5 and INCA LP-7

 Ionel Hernández-Forte^{1*},  Rafael de Almeida-Leite²,  María Caridad Nápoles-García¹

¹Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), carretera San José-Tapaste, km 3½, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. CP 32 700.

²Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad s/n, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México. CP 62 210.

RESUMEN: Los rizobios se han estudiado, fundamentalmente, por su capacidad para realizar la Fijación Biológica del Nitrógeno, atributo que en la actualidad se ha comprobado también en su interacción con plantas no leguminosas. El objetivo de esta investigación fue evaluar la capacidad para fijar nitrógeno de cepas de rizobios, provenientes de la rizosfera de plantas de arroz, cultivares INCA LP-5 e INCA LP-7, cultivados en monocultivo. La investigación se realizó en el año 2018, en el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas de Cuba y en el Centro de Ciencias Genómicas en México. La diazotrofia de tres cepas de *Rhizobium* se determinó por tres métodos: la amplificación del gen *nifH*, para lo cual se emplearon tres juegos de cebadores y diferentes tiempos y temperaturas de alineamiento, en la técnica de PCR; mediante el crecimiento de las cepas en dos medios semisólidos libre de nitrógeno y a través de ensayos de inoculación con plantas de siratro (*Macroptilium atropurpureum*) y soya (*Glycine max* L.), en condiciones controladas. No se amplificó el gen *nifH* de ninguna de las tres cepas de rizobios; sin embargo, crecieron en los medios libre de nitrógeno y formaron nódulos efectivos en las raíces de plantas de las dos leguminosas estudiadas. La cepa *Rhizobium* sp. Rpr11 produjo el mayor número de nódulos en las raíces de ambas leguminosas a los 30 días de la inoculación. Este estudio constituye un primer acercamiento a la capacidad de fijar nitrógeno de cepas de rizobios asociados a cultivares cubanos de arroz en condiciones de monocultivo intensivo.

Palabras clave: fijación del nitrógeno, gramínea, simbiosis, *Rhizobium*.

ABSTRACT: The rhizobia have been studied, fundamentally, for their capacity to carry out the biological nitrogen fixation, an attribute that at present has also been verified in its interaction with non-legume plants. The aim of this research was to evaluate the capacity to fix nitrogen of rhizobia strains, from the rhizosphere rice plants cultivars INCA LP-5 and INCA LP-7, cultivated in intensive monoculture. The research was carried out in 2018, at the National Institute of Agricultural Sciences from Cuba and at the Center for Genomic Sciences in Mexico. The diazotrophy of three *Rhizobium* strains was determined by three methods. The amplification of *nifH* gene, for which three sets of primers and different alignment times and temperatures were used in the PCR technique; through the growth of strains in two semi-solid nitrogen-free media and through inoculation tests with siratro and soy plants, under controlled conditions. The *nifH* gene was not amplified from any of three rhizobia strains; however, they grew in nitrogen-free media and formed effective nodules on siratro and soy roots. The strain *Rhizobium* sp. Rpr11 produced the highest number of nodules in both legumes roots, 30 days after inoculation. This research is a first approach to understand the capacity to nitrogen fixation of rhizobia strains associated with Cuban rice cultivars under intensive monoculture.

Key words: nitrogen fixation, grass, symbiosis, *Rhizobium*.

*Autor para correspondencia: ionel@inca.edu.cu

Recibido: 17/03/2020

Aceptado: 15/03/2021

Este artículo se encuentra bajo los términos de la licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial (CC BY-NC 4.0).
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



INTRODUCCIÓN

La Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN) es un proceso biológico de suma importancia pues constituye la única vía, hasta ahora conocida, donde la mayor reserva de nitrógeno que existe en el planeta (N_2 (g)) se reduce a amonio, un estado químico que puede ser asimilado por las plantas (1). Este proceso solo se realiza por un grupo de procariotas (bacterias y archeas), denominadas diazotrofas (2).

Los rizobios son las Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPVC) que mayor contribución realizan a la FBN en la zona terrestre del planeta. Los estudios sobre la asociación simbiótica de estas bacterias con las plantas leguminosas datan de al menos 125 años y han comprobado que dicha interacción aporta alrededor de 600 kg N ha⁻¹ año⁻¹ (3,4). Sin embargo, la rizosfera y endosfera de algunas gramíneas de importancia económica como el maíz (*Zea mays* L.) y el arroz (*Oryza sativa* L.), también se han descrito como hábitats de estas bacterias, por lo que desde hace algunos años se busca extender a las gramíneas los conocimientos y usos de la FBN que se conoce en las leguminosas (5-7).

Por otra parte, existen diferentes métodos moleculares, fisiológicos y ecológicos que permiten clasificar a una BPCV como diazotrófica. Entre ellos se encuentran la amplificación del gen *nifH* (8), el crecimiento de las cepas bacterianas en medios semisólidos libre de nitrógeno (9), el ensayo de reducción del acetileno (ARA, por sus siglas en inglés) (10), los ensayos de inoculación de bacterias en plantas leguminosas patrones (11) y las técnicas isotópicas con N^{15} (12). Específicamente en plantas leguminosas inoculadas con estas bacterias fijadoras de nitrógeno se puede determinar, además, la actividad de la enzima glutamina sintetasa en nódulos y la concentración de ureidos en nódulos y hojas de las plantas (13).

Varios estudios, en los que se han empleado algunos de los métodos mencionados anteriormente, defienden la hipótesis de que la fitoestimulación es el principal mecanismo que emplean los rizobios para promover el crecimiento del arroz y no la FBN (14). Son escasas las evidencias que muestran la presencia de rizobios fijadores de nitrógeno en ecosistemas donde no hayan estado presentes leguminosas como cultivos precedentes a las gramíneas. En Cuba se carece de estudios donde se determine la capacidad para fijar nitrógeno de cepas de rizobios que se asocien, de manera natural, a gramíneas de importancia económica como el arroz. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue evaluar la capacidad para fijar nitrógeno de cepas de rizobios,

provenientes de la rizosfera de plantas de arroz cultivares INCA LP-5 e INCA LP-7, cultivados en monocultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el año 2018, en el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) de Cuba y en el Centro de Ciencias Genómicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Material biológico

Oligonucleótidos

Se emplearon tres pares de oligonucleótidos degenerados para la amplificación del gen *nifH* (Tabla 1). Estos cebadores se diseñaron teniendo en cuenta secuencias del gen *nifH* de 150 proteobacterias, provenientes de nódulos de diferentes leguminosas (15).

Cepas bacterianas

Se emplearon tres cepas de rizobios pertenecientes al cepario del Laboratorio de Microbiología del Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal del INCA. Dos cepas: *Rhizobium* sp. Rpr11 (Rpr11) y *Rhizobium* sp. Rpd16 (Rpd16), provinieron de la rizosfera de plantas de arroz cultivar INCA LP-5 y la cepa *Rhizobium* sp. 5P1 (5P1) de la rizosfera del cultivar INCA LP-7 (16). En el momento del aislamiento de estas cepas, ambos cultivares se encontraban establecidos en un suelo Gleysol Nodular Ferruginoso Petroférrico del municipio "Los Palacios", provincia Pinar del Río, Cuba. Este suelo se caracteriza por su baja fertilidad natural, debido a su explotación con monocultivo intensivo de arroz durante 50 años (17). Además, se utilizaron dos cepas como controles positivos de referencia: *Rhizobium etli* CFN42 (CFN42) para detectar el gen *nifH* (18) y la cepa *Bradyrhizobium elkanii* ICA 8001 (ICA 8001) en un ensayo de crecimiento en medios libre de nitrógeno (19).

Se obtuvieron inóculos de las cinco cepas de rizobios, a partir de la inoculación de una asada de éstas en frascos Erlenmeyers de 100 mL, que contenían 10 mL del medio Tripton-Extracto de levadura (TY) (20). Los Erlenmeyers se mantuvieron en agitación a 150 r min⁻¹ y 30 °C, durante 16 horas. La pureza de los inóculos se monitoreó mediante tinción de Gram. La concentración celular se determinó mediante el método de las diluciones seriadas y el cultivo en placas Petri con medio TY sólido; las cuales se incubaron durante 48 h a 30 °C. La concentración de rizobios en los inóculos se ajustó a 5 x 10⁹ UFC mL⁻¹.

Tabla 1. Oligonucleótidos que se emplearon en la amplificación del gen *nifH* de las tres cepas de rizobios.

Código	Denominación	Secuencia de Bases Nitrogenadas (BN)	Número BN
2087	nifH_AIF	GTGCTCGGCGACGTGGTRTGCGG	23
2088	nifH_AIR	ACGATGTTGTCGCGTGGCACGAARTGRATGAG	32
7807	nifH_UN_FW	CGGGCGTCGGNTGYGCNGG	19
7808	nifH_UN_RV	CAAAGCCACCGCANACNACRTCNC	25
180	KAD	TGCGAYCCSAARGCBGACTC	20
181	GEM	ATSGCCATCATYTCRCCGGA	20

Semillas de leguminosas, desinfección y germinación

Se emplearon semillas de siratro (*Macroptilium atropurpureum*) y soya (*Glycine max* L.) en ensayos de inoculación en condiciones controladas. Las semillas se desinfectaron superficialmente y se pre germinaron. Las de siratro se mantuvieron en etanol al 70 % durante 5 min, posteriormente se lavaron con agua destilada y se sometieron a un tratamiento con ácido sulfúrico concentrado durante 10 min. Se sumergieron en hipoclorito de sodio al 25 % (v/v) durante 15 min y se lavaron 10 veces con agua destilada estéril. Para la desinfección de las semillas de soya, se sumergieron en etanol al 70 % durante 5 min y posteriormente en hipoclorito de sodio al 25 % (v/v) por 15 min. Por último, se lavaron 10 veces con agua destilada estéril. Ambos grupos de semillas se colocaron en placas con agar agua (0,75 %) (m/v) y se incubaron a 30 °C en la oscuridad para favorecer la germinación. Las semillas de siratro se mantuvieron por 24 h en esta condición mientras que, las de soya estuvieron durante 72 h.

Detección de genes *nifH* en las cepas de *Rhizobium*

A partir de inóculos de las cepas de rizobios Rpr11, Rpd16, 5P1 y CFN42, se realizó la extracción del ADN genómico bacteriano mediante el UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit, de MOBIO Laboratories, Inc. Para comprobar el éxito de la extracción, 5 µL del extracto se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5 % (m/v) en TAE 1X. El tiempo y voltaje de la corrida electroforética, así como el marcador de peso molecular que se emplearon, se describieron previamente (15).

La amplificación del gen *nifH* se realizó mediante PCR a partir de los extractos del ADN genómico. Como cebadores se emplearon tres pares de oligonucleótidos degenerados (Tabla 1), a una concentración de 0,01 mM y un volumen de 3 µL por reacción de PCR. Los restantes componentes de la mezcla de la PCR fueron: tampón de reacción Taq 10X, 5 µL; MgCl 25 mM, 7 µL; Dimetil sulfóxido (DMSO) 99,5 %, 1 µL; dNTPs 10 mM, 1 µL; Polimerasa Taq 1 U µL⁻¹, 1 µL; DNA bacteriano 30 ng µL⁻¹, 1,0 µL y agua ultra pura 34 µL; en un volumen final de 50 µL por reacción de PCR.

Las condiciones que se utilizaron para realizar la PCR fueron: 1 ciclo a 94 °C, 3 min; 30 ciclos con un gradiente de temperaturas de alineamiento de 62 °C a 56 °C, 15 seg; 72 °C de extensión por 1 min y un ciclo a 72 °C, 10 min. El producto del PCR se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5 % (m/v) en TAE 1X. El tiempo y voltaje de la corrida electroforética, así como el marcador de peso molecular que se emplearon, se describieron en investigaciones previas (15).

Crecimiento de las cepas de *Rhizobium* en medios semisólidos libre de nitrógeno

A partir de los inóculos de las cepas Rpr11, Rpd16 y 5P1 se prepararon suspensiones celulares. Para ello, 1 mL de los

inoculantes se centrifugó a 10 000 rpm, 10 min y se desechó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 1 mL de solución salina (NaCl, 0,9 % m/v) estéril. Este procedimiento se repitió dos veces para lograr una suspensión celular carente de los componentes del medio TY.

Se inocularon 100 µL de las suspensiones bacterianas en frascos que contenían 10 mL de los medios semisólidos libre de nitrógeno Rennie y JMV (21). La inoculación se realizó liberando la suspensión celular de la parte inferior del medio a la superficie con una micropipeta. El control negativo del experimento consistió en frascos donde se inocularon 100 µL de la solución salina estéril. El control positivo consistió en frascos que se inocularon con el mismo volumen y concentración de una suspensión celular de la cepa ICA 8001.

Los frascos se incubaron durante cinco días a 30 °C y se determinó la capacidad de crecimiento de las cepas bacterianas mediante la formación de halos opacos en la superficie y el interior del medio. La tendencia al amarillamiento del medio JMV se interpretó como la producción de ácidos orgánicos (21). El ensayo se realizó dos veces y se emplearon cinco frascos por cada una de las cepas bacterianas.

Nodulación de plantas leguminosas inoculadas con las cepas de *Rhizobium*

Para determinar la capacidad de formar nódulos efectivos en la FBN de las cepas Rpr11, Rpd16 y 5P1; se realizaron ensayos de inoculación en plantas de siratro y soya. Semillas germinadas de siratro, con raíces de aproximadamente 1-2 cm de largo se colocaron en frascos de 200 mL que contenían 50 mL de medio Norris y Date semisólido (22), a razón de una semilla por frasco. De manera similar se procedió con las semillas germinadas de soya, las cuales se colocaron en tubos de ensayo (diámetro 2 cm, largo 20 cm) que contenían 20 mL del mismo medio.

Posteriormente, se aplicaron sobre cada semilla de siratro y soya inóculos de los tres aislados de rizobios, a razón de 0,5 mL y 1,0 mL, respectivamente. Semillas de ambas leguminosas, que se inocularon con medio LM estéril, se emplearon como control negativo del ensayo. La investigación se realizó dos veces con un diseño Completamente Aleatorizado y se utilizaron siete plantas por tratamiento en siratro y nueve para soya.

Las plantas crecieron en condiciones controladas con un fotoperíodo de 12 h luz/12 h oscuridad, a una temperatura día/noche de 26/22 °C y humedad relativa del 70 %. Cinco semanas después de la inoculación, se determinó en ambas leguminosas: el número de nódulos en la raíz primaria; el número total de nódulos; la efectividad de los nódulos totales en la FBN y la masa seca de los nódulos totales. La efectividad de los nódulos se determinó mediante el método visual. Para ello, se realizó su disección con hojas de bisturí de acero inoxidable, detectando o no la presencia de una coloración rojiza en el interior, característico de la proteína leghemoglobina (23).

Análisis estadístico

Los datos provenientes de los ensayos de inoculación de las plantas de siratro y soja se sometieron a la prueba de normalidad (prueba de Bartlett) y homogeneidad de varianza (prueba de Kormogorov- Smirnov). Los datos de número de nódulos en la raíz principal, totales y efectivos totales, se transformaron por la raíz cuadrada del valor, previo a su procesamiento estadístico. Se aplicó análisis de varianza de clasificación simple, con la prueba de comparación de medias de Tukey con $p < 0,05$; para determinar las diferencias entre las medias. Se utilizó el programa Statgraphic Plus versión 5.0 para el procesamiento estadístico de los datos.

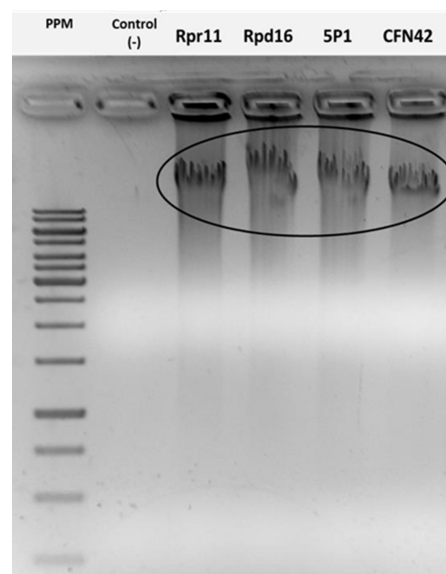
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La mayoría de los trabajos que abordan la identificación de rizobios asociados a gramíneas, se han realizado en áreas experimentales sometidas a técnicas de rotación de cultivo con plantas leguminosas (24,25). Según estas investigaciones, las leguminosas incrementan las poblaciones de rizobios fijadores de nitrógeno y la gramínea se beneficia del nitrógeno remanente en el suelo proveniente de la FBN. En este sentido, se ha comprobado que la contribución en nitrógeno que hacían algunas cepas de rizobios al cultivo del arroz, no provenía de la FBN; sino del presente en el suelo donde se encontraba el trébol (*Trifolium alexandrinum*) como cultivo antecesor (14).

En la presente investigación se emplearon métodos moleculares y fisiológicos para determinar la capacidad de realizar la fijación de nitrógeno de tres cepas del género *Rhizobium* provenientes de la rizosfera de plantas de arroz cultivado en monocultivo intensivo. Se extrajo el ADN genómico de las cepas de rizobios en estudio, el cual se visualizó como bandas en la parte superior del gel de agarosa (Figura 1). Sin embargo, no se amplificó el gen *nifH* en las cepas de *Rhizobium* 5P1, Rpr11 y Rpd16, con ninguno de los tres pares de cebadores que se emplearon. En todos los geles se observó una banda de 300-400 pb correspondiente a la amplificación del gen *nifH* de la cepa de referencia CFN42 (Figura 2).

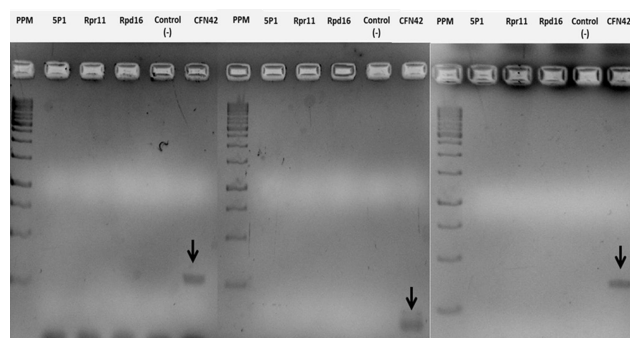
Resultados similares, en cuanto a la amplificación del gen *nifH*, se obtuvieron en investigaciones anteriores con cepas de *Rhizobium* provenientes de la rizosfera de plantas de arroz (26). De los genes que codifican para el complejo de la nitrogenasa, la amplificación del gen *nifH* no solo se realiza para detectar la presencia de esta enzima en las bacterias, sino también para realizar estudios de filogenia con microorganismos fijadores de nitrógeno (2).

Se conoce que genes como el *nifH* necesitan amplificarse con oligonucleótidos que contengan altos niveles de degeneración y con temperaturas adecuadas en la PCR, que permitan la hibridación entre los cebadores y la región correspondiente del ADN bacteriano (8). Por ello, se emplearon oligonucleótidos degenerados y un gradiente considerable de temperaturas de alineamiento. Sin embargo, no se logró su amplificación en las cepas de *Rhizobium*.



PPM, Patrón de Peso Molecular; Control (-), control negativo

Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa (1,5 %) (m/V) de los extractos de ADN de la cepa *Rhizobium etli* CFN42 y de tres aislados de rizobios, provenientes de los cultivares de arroz INCA LP-5 e INCA LP-7.



Los cebadores que se emplearon fueron *nifH*_AIF20187 y *nifH*_AIR2088 (A), *nifH*_UN_FW7807 y *nifH*_UN_RV7808 (B); KAD18 y GEM181 (C). PMM, Patrón de Peso Molecular; Control (-), Control negativo

Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa (1,5 %) (m/V) de los productos de PCR del gen *nifH* de la cepa de referencia *Rhizobium etli* CFN42 y de tres aislados de rizobios provenientes de los cultivares de arroz INCA LP-5 e INCA LP-7.

Otro aspecto a considerar en este tipo de estudios es la secuencia de los juegos de cebadores. Para el caso de los genes *nifH*, se han desarrollado cebadores de PCR universales y específicos de grupo, con el propósito de amplificar diversas secuencias de este gen. Sin embargo, la mayoría de ellos solo amplifican el 35 % de secuencias dentro de las alfa, beta y gamma proteobacterias. Además, en el caso de los cebadores universales para el gen *nifH*, menos del 50 % han permitido detectar secuencias conocidas de este gen, debido a la especialmente notable variación en la cobertura de este tipo de cebadores. Incluso, estudios previos demostraron que en el caso particular de los cebadores universales PolF/PolR solo cubren el 25 % de la diversidad *nifH* presentes en bases de datos (8).

Por otra parte, la falta de especificidad de algunos de los cebadores de genes *nifH* han amplificado secuencias del ADN de cepas de *Escherichia coli*, bacterias que hasta ahora no se han descrito como diazotróficas. La dimerización del cebador, la formación de horquillas, el contenido de guanina y citosina y la termodinámica del cebador; constituyen factores que afectan la especificidad y la cobertura de los cebadores (8). Teniendo en cuenta todo lo anterior, pudiera pensarse no solo en aspectos de la técnica de amplificación de PCR que explicarían la no detección del gen *nifH* en los tres aislados de *Rhizobium* que se estudiaron, sino también la falta de especificidad y cobertura de los juegos de cebadores que se emplearon, independientemente de que fueran diseñados a partir de secuencias de genes *nifH* de bacterias diazotróficas. La no detección del gen *nifH* en el genoma bacteriano por el método empleado, no necesariamente significa que las cepas carezcan de la capacidad para realizar la FBN. Sería necesario emplear otros juegos de cebadores que podrían diseñarse a partir de secuencias provenientes de bacterias diazotróficas asociativas de gramíneas.

En esta investigación se evaluó la capacidad de tres cepas de *Rhizobium* para realizar la FBN, desde el punto de vista fisiológico. Se evidenció el crecimiento de estas bacterias en dos medios de cultivo libre de nitrógeno (JMV y Rennie), a los cinco días de incubación. En ningún caso se observó cambio en la coloración del medio JMV. En investigaciones previas se constató que cepas de *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Azospirillum*; géneros que presentan una elevada frecuencia de aparición en la rizosfera de plantas de maíz y arroz; también tienen la capacidad de crecer en estos medios de cultivo (27,28).

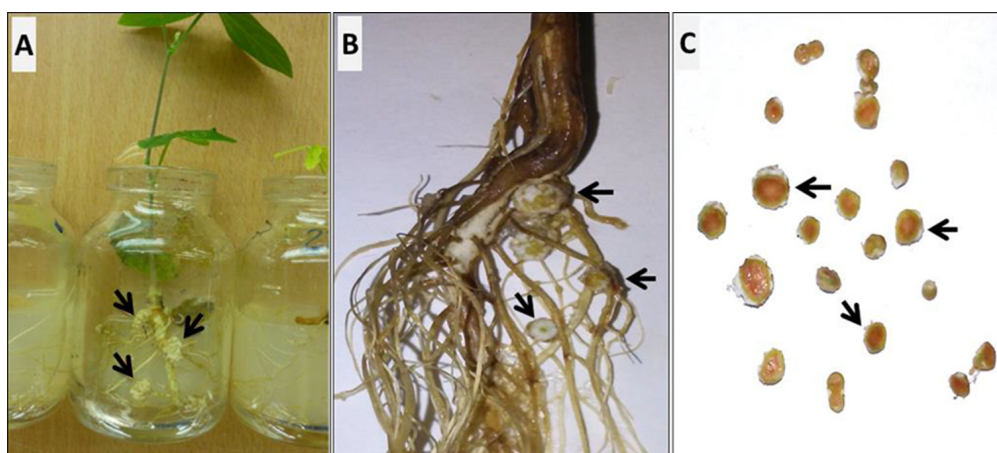
Estudios recientes han demostrado la capacidad de cepas de rizobios provenientes de gramíneas para crecer en medios libre de nitrógeno. Tal es el caso de cepas de *Bradyrhizobium* asociadas a la rizosfera de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), las cuales crecieron en medio Rennie y cepas de *Rhizobium undicola*, endófitos de plantas de arroz con la capacidad de crecer en el medio JNFb (29,30). En ambos casos, se confirma la diazotrofia de las cepas

mediante la técnica del ARA. Los medios libres de nitrógeno, como los que se emplearon en esta investigación, se utilizan en múltiples trabajos con la finalidad de seleccionar microorganismos diazotróficos y así descartar gran cantidad de microorganismos cultivables que se obtienen durante el proceso de aislamiento (9).

En esta investigación; además, se realizaron ensayos de inoculación en plantas de siratro y soja para evaluar la capacidad de las cepas de *Rhizobium* para realizar la FBN. Los resultados mostraron la formación de nódulos efectivos en ambas leguminosas, tras el empleo de las cepas bacterianas provenientes de la rizosfera de plantas de arroz (Figura 3, Tabla 2).

Los resultados mostraron que la inoculación de la cepa Rpr11 en las plantas de siratro produjo los mayores valores en todas las variables de nodulación. En las plantas que se trataron con la cepa Rpd16 se observaron nódulos. Sin embargo, no existieron diferencias significativas con el tratamiento control en ninguna de las variables que se midieron. Siratro, constituye una leguminosa forrajera que se ha establecido como planta modelo para evaluar la capacidad de infección y la efectividad de la nodulación de aislados de rizobios en condiciones controladas, pues responde como hospedero a un amplio espectro de cepas de rizobios provenientes de diversos hábitats (31).

Independientemente de la versatilidad de leguminosas como siratro para nodular con diferentes géneros del grupo de los rizobios, se ha discutido sobre la especificidad de la planta y la bacteria para establecer la simbiosis (32,33). En este sentido, la soja; otra de las leguminosas empleadas en esta investigación, se asocia generalmente con especies del género *Bradyrhizobium* (34). Sin embargo, investigaciones recientes demuestran que otros géneros como *Rhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium* y *Sinorhizobium* también forman nódulos en las raíces de estas plantas (35). La inoculación de la cepa 5P1 incrementó significativamente el número de nódulos de la raíz primaria de las plantas de soja; mientras que, el empleo de la cepa Rpr11 produjo los mayores valores en el número de nódulos totales, totales efectivos y la masa seca de los nódulos en estas plantas.



La coloración rojiza en el interior de los nódulos de soja (C) muestra su efectividad en la FBN. Los resultados corresponden a la primera repetición del experimento debido a su semejanza con los obtenidos en la segunda repetición

Figura 3. Presencia de nódulos en las raíces de plantas de siratro (A) y soja (B) inoculadas con uno de los aislados de rizobios.

Tabla 2. Efecto de la inoculación de las cepas Rpd16, Rpr11 y 5P1 en la nodulación de plantas de siratro y soya.

Tratamientos	NNrp	NNt	NNte	MSNt
Siratro				
Control negativo	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b
Rpd16	0,00 b	0,28 b	0,29 b	0,0001 b
Rpr11	1,28 a	5,85 a	4,81 a	0,024 a
ESx	0,21*	0,17*	0,19*	0,0002*
Soya				
Control	0,00 b	0,00 c	0,00 c	0,000 c
Rpd16	0,53 ab	3,13 b	2,46 b	0,006 b
Rpr11	0,35 b	3,78 a	3,36 a	0,011 a
5P1	1,27 a	2,78 b	2,34 b	0,006 b
ESx	0,22*	0,14*	0,20*	0,001*

Los resultados corresponden a la primera repetición del experimento debido a su semejanza con los obtenidos en la segunda repetición.

NNrp, número de nódulos en la raíz primaria; NNt, número de nódulos totales; NNte, número de nódulos totales efectivos; MSNt, masa seca de nódulos totales. Control, plantas inoculadas con medio LM estéril. Media con letras iguales en la misma columna no difieren significativamente (Tukey $\alpha=0,05$ y $n=7$ (siratro), $n=9$ (soya))

La disección de los nódulos presentes en las plantas de siratro y soya, que se inocularon con las tres cepas de *Rhizobium*, permitió observar una coloración rojiza en el interior de los mismos (Figura 3C). El color marrón, rojo o rosado es característico de la leghemoglobina, proteína indicadora de la efectividad de los nódulos en el proceso de FBN (23). Esta proteína tiene un grupo prostético tipo protohemo que se enlaza de forma reversible con el oxígeno una vez que este difunde hasta la zona central de los nódulos y lo transporta desde la membrana plasmática de las células infectadas hacia la membrana del simbiosoma. De esta manera, se establecen las concentraciones adecuadas de oxígeno en los nódulos para mantener viable al rizobio, proteger a la nitrogenasa de las altas concentraciones de oxígeno y favorecer la FBN (36).

Los resultados de esta investigación constituyen evidencias aparentemente contradictorias. Por un lado, el método molecular que se empleó no permitió amplificar el gen *nifH*. Sin embargo, los métodos fisiológicos como el crecimiento en medios semisólidos libre de nitrógeno y los ensayos de nodulación en plantas leguminosas, muestran que estas bacterias sí tienen la capacidad de fijar el nitrógeno del aire. El empleo de métodos moleculares más sofisticados en los estudios taxonómicos de bacterias ha permitido reformular conceptos tradicionales para intentar caracterizar, clasificar y nombrar a cepas de rizobios. Estas bacterias Gram negativas se diferencian del resto de los procariotas por su capacidad de fijar nitrógeno y formar nódulos en las leguminosas (4). Sin embargo, estudios recientes donde se emplean secuenciación de ADN total, indican que ambos atributos no necesariamente son propiedades inherentes a los rizobios (37). Estas investigaciones concluyen que cepas del género *Bradyrhizobium* tienen una gran diversidad en cuanto a la presencia de los genes *nif* y *nod*, estos últimos con la información genética para la formación de los nódulos. Ese estudio contempla que algunas de las cepas de *Bradyrhizobium* presentan ambos grupos de genes, otras ninguno de ellos y otras cepas solo los *nif*, independientemente del sitio de donde fueron aisladas (suelo, nódulos de leguminosas). Por lo tanto, en el estudio

de cepas de rizobios, enfocados a la capacidad de formar nódulos y fijar nitrógeno, tendría que tenerse en cuenta las particularidades genéticas descritas previamente.

Por otra parte, la capacidad de fijar nitrógeno en los rizobios tiene que contemplar la posibilidad de hacerlo, no solo en un contexto simbiótico con leguminosas, sino también en las otras formas de vida, en las que se han podido constatar que estos microorganismos pueden sobrevivir, dígase en vida libre, asociativa y endofítica (37). Las tres cepas que se estudiaron en esta investigación constituyen ejemplos de rizobios que, aislados de la rizosfera de dos cultivos de arroz de importancia económica (INCA LP-5 e INCA LP-7), cuentan con la capacidad de formar nódulos efectivos en plantas de siratro y soya. Sería necesario corroborar la capacidad de las cepas para fijar nitrógeno por métodos con mayor sensibilidad y especificidad como el ARA y el empleo del N^{15} .

El hecho de encontrar cepas de rizobios en áreas sometidas a prácticas de monocultivo intensivo de arroz, que se asocian naturalmente a esta gramínea, en suelos caracterizados por su baja fertilidad y con potencialidades de fijar nitrógeno, brinda un importante valor práctico a esas cepas bacterianas. El empleo de formulados a base de estas bacterias pudiera formar parte del manejo integrado del cultivo, con un ahorro de fertilizantes químicos. Esta tecnología adquiere especial relevancia en el contexto de una agricultura ecológica y económicamente sostenible, sobre todo en cultivos de alta demanda y de grandes áreas cultivadas como el arroz, donde cada año se incrementan los rendimientos a costa del uso irracional de fertilizantes químicos, productos que afectan negativamente a los ecosistemas (5).

CONCLUSIONES

- Cepas de *Rhizobium*, asociadas a plantas de arroz, cultivos INCA LP-5 e INCA LP-7 cultivadas en monocultivo, parecen tener la capacidad de fijar el nitrógeno del aire, a pesar de no mostrar amplificación del gen *nifH*. Si bien la presencia de este gen es una condición estrictamente necesaria para que una bacteria

fije nitrógeno, también son necesarias ciertas condiciones ambientales que propicien este proceso. Por lo tanto, podrían modificarse técnicas ya establecidas e incluso implementar nuevas, que permitan evaluar con precisión la capacidad de fijar nitrógeno de los rizobios asociados a plantas no leguminosas.

- Este estudio constituye un primer acercamiento a la capacidad de fijar nitrógeno de cepas de rizobios rizosféricos de arroz, cultivado en suelos expuestos al monocultivo intensivo de la gramínea.

BIBLIOGRAFÍA

1. Saiz E, Sgouridis F, Drijfhout FP, Ullah S. Biological nitrogen fixation in peatlands: Comparison between acetylene reduction assay and $^{15}\text{N}_2$ assimilation methods. *Soil Biology and Biochemistry*. 2019;131:157-65.
2. Nishihara A, Matsuura K, Tank M, McGlynn SE, Thiel V, Haruta S. Nitrogenase activity in thermophilic chemolithoautotrophic bacteria in the phylum Aquificae isolated under nitrogen-fixing conditions from Nakabusa hot springs. *Microbes and environments*. 2018;33(4):394-401.
3. Chanway CP, Anand R, Yang H. Nitrogen fixation outside and inside plant tissues. In: *Advances in biology and ecology of nitrogen fixation*. InTechOpen; 2014. p. 1-21.
4. Sahgal M, Jaggi V. Rhizobia: Culture Collections, Identification, and Methods of Preservation. In: *Microbial Resource Conservation*. Springer; 2018. p. 175-97.
5. Korshunov VV, Leshchinskaya AF. Mineral fertilizers: in addition to the private control government regulation is required. *Russian Journal of Industrial Economics*. 2017;10(1):44-52.
6. Zhao J-J, Zhang J, Sun L, Zhang R-J, Zhang C-W, Yin H-Q, et al. *Rhizobium oryzae* sp. nov., isolated from rice roots. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2017;67(4):963-8.
7. Pérez-Pérez R, Oudot M, Serrano L, Hernández I, Nápoles M, Sosa D, et al. Rhizospheric rhizobia identification in maize *Zea mays* L. plants. *Agronomía Colombiana*. 2019;37(3):255-62.
8. Gaby JC, Buckley DH. The use of degenerate primers in qPCR analysis of functional genes can cause dramatic quantification bias as revealed by investigation of nifH primer performance. *Microbial ecology*. 2017;74(3):701-8.
9. Xu J, Kloepper JW, Huang P, McInroy JA, Hu CH. Isolation and characterization of N₂-fixing bacteria from giant reed and switchgrass for plant growth promotion and nutrient uptake. *Journal of basic microbiology*. 2018;58(5):459-71.
10. Fulweiler RW, Heiss EM, Rogener MK, Newell SE, LeClerc GR, Kortebein SM, et al. Examining the impact of acetylene on N-fixation and the active sediment microbial community. *Frontiers in Microbiology*. 2015;6:418.
11. Howieson JG, Dilworth MJ. Working with rhizobia. Primera. Australia: Australian centre for international agricultural research Canberra; 2016. 314 p.
12. Roley SS, Xue C, Hamilton SK, Tiedje JM, Robertson GP. Isotopic evidence for episodic nitrogen fixation in switchgrass (*Panicum virgatum* L.). *Soil Biology and Biochemistry*. 2019;129:90-8.
13. Garg N, Saroy K. Interactive effects of polyamines and arbuscular mycorrhiza in modulating plant biomass, N₂ fixation, ureide, and trehalose metabolism in *Cajanus cajan* (L.) Mill sp. genotypes under nickel stress. *Environmental Science and Pollution Research*. 2020;27(3):3043-64.
14. Yanni YG, Rizk RY, Abd El-Fattah FK, Squartini A, Corich V, Giacomini A, et al. The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii with rice roots. *Functional Plant Biology*. 2001;28(9):845-70.
15. Mora Y, Díaz R, Vargas-Lagunas C, Peralta H, Guerrero G, Aguilar A, et al. Nitrogen-fixing rhizobial strains isolated from common bean seeds: phylogeny, physiology, and genome analysis. *Applied and environmental microbiology*. 2014;80(18):5644-54.
16. Hernández Forte I, Nápoles García MC. Rizobios residentes en la rizosfera de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) cultivar INCA LP-5. *Cultivos Tropicales*. 2017;38(1):39-49.
17. Pozo-Galves C, Cabrera-Alonso JR, Márquez-Reina E, Hernández-Hernández O, Ruiz-Sánchez M, Domínguez-Palacio D. Características y clasificación de suelos Gley Nodular Ferruginoso bajo cultivo intensivo de arroz en Los Palacios. *Cultivos Tropicales*. 2017;38(4):58-64.
18. González V, Santamaría RI, Bustos P, Hernández-González I, Medrano-Soto A, Moreno-Hagelsieb G, et al. The partitioned *Rhizobium etli* genome: genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(10):3834-9.
19. Nápoles MC, Martínez J, Costales D, Morales B, Martínez E, Rogel MA. Avances en la reidentificación de la cepa ICA 8001 (*Bradyrhizobium japonicum*) como perteneciente a *Bradyrhizobium elkanii*. *Revista Cubana de Ciencias Biológicas*. 2011;20(1-2).
20. Josey DP, Beynon JL, Johnston AWB, Beringer JE. Strain identification in *Rhizobium* using intrinsic antibiotic resistance. *Journal of Applied Bacteriology*. 1979;46(2):343-50.
21. Baldani JL, Reis VM, Videira SS, Boddey LH, Baldani VLD. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant and soil*. 2014;384(1):413-31.
22. Norris DO. Legume bacteriology. In: *Tropical pasture research: principles and methods*. Commonwealth Agricultural Bureaux; 1976. p. 134-74.
23. Kanu SA, Dakora FD. Symbiotic functioning, structural adaptation, and subcellular organization of root nodules from *Psoralea pinnata* (L.) plants grown naturally under wetland and upland conditions in the Cape Fynbos of South Africa. *Protoplasma*. 2017;254(1):137-45.
24. Chaintreuil C, Giraud E, Prin Y, Lorquin J, Bâ A, Gillis M, et al. Photosynthetic bradyrhizobia are natural endophytes of the African wild rice *Oryza breviligulata*. *Applied and environmental microbiology*. 2000;66(12):5437-47.
25. Matiru VN, Dakora FD. Potential use of rhizobial bacteria as promoters of plant growth for increased yield in landraces of African cereal crops. *African Journal of Biotechnology*. 2004;3(1):1-7.

26. Banik A, Mukhopadhyaya SK, Dangar TK. Characterization of N₂-fixing plant growth promoting endophytic and epiphytic bacterial community of Indian cultivated and wild rice (*Oryza* spp.) genotypes. *Planta*. 2016;243(3):799-812.
27. Breedts G, Labuschagne N, Coutinho TA. Seed treatment with selected plant growth-promoting rhizobacteria increases maize yield in the field. *Annals of Applied Biology*. 2017;171(2):229-36.
28. Ayubb N, Cerra A, Chamorro L, Pérez A. Resistencia a cadmio (Cd) de bacterias endófitas y bacterias rizosféricas aisladas a partir de *Oryza sativa* en Colombia. *Revista Colombiana de Ciencia Animal-RECIA*. 2017;9(2):281-93.
29. Singh MK, Singh SK, Singh DP. Novel bacterium *Rhizobium undicola* isolated from the upland cultivated rice *Oryza sativa* L. promoting plant growth. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2018;7(3):2437-44.
30. Hara S, Morikawa T, Wasai S, Kasahara Y, Koshiba T, Yamazaki K, et al. Identification of nitrogen-fixing *Bradyrhizobium* associated with roots of field-grown sorghum by metagenome and proteome analyses. *Frontiers in microbiology*. 2019;10:407.
31. Lima AS, Nóbrega RSA, Barberi A, da Silva K, Ferreira DF, de Souza Moreira FM. Nitrogen- fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the Western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro (*Macroptilium atropurpureum*). *Plant and Soil*. 2009;319(1):127-45.
32. Mbengue MD, Hervé C, Debellé F. Nod factor signaling in symbiotic nodulation. In: *Advances in Botanical Research*. Elsevier; 2020. p. 1-39.
33. Liu C-W, Murray JD. The role of flavonoids in nodulation host-range specificity: an update. *Plants*. 2016;5(3):33.
34. Wang ET, Tian CF, Chen WF, Young JPW, Chen WX. *Ecology and Evolution of Rhizobia*. Springer; 2019.
35. Chen WH, Yang SH, Li ZH, Zhang XX, Sui XH, Wang ET, et al. *Ensifer shofinae* sp. nov., a novel rhizobial species isolated from root nodules of soybean (*Glycine max*). *Systematic and applied microbiology*. 2017;40(3):144-9.
36. Tsujimoto R, Kotani H, Yokomizo K, Yamakawa H, Nonaka A, Fujita Y. Functional expression of an oxygen-labile nitrogenase in an oxygenic photosynthetic organism. *Scientific reports*. 2018;8(1):1-10.
37. Avontuur JR, Palmer M, Beukes CW, Chan WY, Coetzee MP, Blom J, et al. Genome-informed *Bradyrhizobium* taxonomy: where to from here? *Systematic and applied microbiology*. 2019;42(4):427-39.