

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA POLITECNICA SUPERIOR DE GANDIA

GRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



ESCOLA POLITÈCNICA
SUPERIOR DE GANDIA

**“Prueba preliminar de nodulación de leguminosas de interés
medioambiental”**

TRABAJO FINAL DE GRADO

Autor/a:

Carlos Anatol Acedo

Tutor/a:

Claudia Gabriela Pallotti Sagripanti

GANDIA, 2018

Resumen.

En este trabajo se realizó una prueba preliminar de nodulación en leguminosas de interés medioambiental cultivadas en suelo procedente de la sierra Calderona. La simbiosis entre los rizobios y las plantas leguminosas es una de las relaciones entre seres vivos mejor caracterizadas. En este tipo de relaciones los organismos pueden beneficiarse entre sí de distintas formas. En el presente trabajo se mostrará la simbiosis entre planta-bacteria, que tiene gran importancia para la planta, la bacteria, y cuya finalidad es proporcionar gran beneficio para el hombre.

Palabras clave: *Dorycnium pentaphyllum*, *Ulex parviflorus*, *Rhizobium*, nódulos, leguminosas.

Abstract

In this work a preliminar nodulation test was carried out on legumes of environmental interest cultivated in soil from the Sierra Calderona. The symbiosis between rhizobia and legumes is one of the relationships between living beings better characterized. In this type of relationships the organisms can benefit from each other in different ways. In the present work the symbiosis between plant and bacteria will be shown, which has great importance for the plant, the bacteria and whose purpose is to provide great benefit for man.

Key words: *Dorycnium pentaphyllum*, *Ulex parviflorus*, *Rhizobium*, nodules and legumes.

Índice

| | |
|--|----|
| 1. Introducción..... | 1 |
| 1.1. La familia <i>Leguminosae</i> | 2 |
| 1.2. El género <i>Rhizobium</i> | 3 |
| 1.3. Relación bacteria-planta..... | 4 |
| 1.4. Fijación de Nitrógeno..... | 4 |
| 1.4.1. Ciclo del nitrógeno..... | 5 |
| 2. Objetivos..... | 6 |
| 3. Metodología..... | 8 |
| 3.1. Selección de las especies vegetales y pruebas de germinación..... | 9 |
| 3.1.1. Selección de las especies vegetales..... | 9 |
| 3.1.2. Germinación en placa..... | 9 |
| 3.1.3. Preparación del sustrato para el cultivo..... | 10 |
| 3.2. Cultivo de las plántulas..... | 11 |
| 3.3. Descalzado de las plantas..... | 12 |
| 3.4. Caracterización macroscópica de raíces y nódulos..... | 12 |
| 3.4.1. Medición de las raíces..... | 12 |
| 3.4.2. Recuento de nódulos..... | 12 |
| 3.4.3. Caracterización macroscópica de los nódulos..... | 13 |
| 3.5. Estudio microscópico de los nódulos..... | 13 |
| 3.5.1. Squash..... | 13 |
| 3.5.2. Tinción de Gram y observación al microscopio..... | 14 |
| 3.5.3. Microscopio óptico empleado..... | 15 |
| 3.6. Desección de los nódulos..... | 16 |
| 4. Resultados y discusión..... | 17 |
| 4.1. Germinación en placa..... | 18 |
| 4.1.1. <i>Dorycnium pentaphyllum</i> | 18 |
| 4.1.2. <i>Ulex parviflorus</i> | 18 |
| 4.2. Trasplantado a macetas..... | 18 |
| 4.2.1. <i>Dorycnium pentaphyllum</i> | 18 |
| 4.2.2. <i>Ulex parviflorus</i> | 18 |
| 4.3. Caracterización macroscópica..... | 18 |
| 4.3.1. <i>Dorycnium pentaphyllum</i> | 18 |
| 4.3.2. <i>Ulex parviflorus</i> | 20 |

| | |
|--|----|
| 4.4. Estudio microscópico de los nódulos. | 21 |
| 5. Conclusiones | 23 |
| 6. Líneas futuras | 25 |
| 6.1. Relación planta-suelo. | 26 |
| 6.2. Empleo leguminosas para restauración de suelos degradados. | 26 |
| 7. Referencias bibliográficas | 27 |

1. Introducción

1.1. La familia *Leguminosae*.

Las leguminosas representan una familia de plantas ampliamente extendidas y de gran diversidad, son angiospermas del orden Fabales y se dividen en tres subfamilias: Mimosoideas, Caesalpinoideas y Papilonoideas (Marugan 2003). Los miembros de esta familia tienen capacidad para realizar simbiosis con bacterias del género *Rhizobium*. Las especies de leguminosas empleadas para este estudio fueron las siguientes:

Dorycnium pentaphyllum: Es un arbusto, que puede alcanzar tamaños de entre 40-50cm. Los tallos son leñosos en la base. Las flores son de color blanco y el cáliz de color pardo o púrpúreo ("Flora Vascular - Toda la información detallada sobre la Flora Vascular | - Especie: *Dorycnium pentaphyllum* | BioScripts.net", 2018). El nombre común de esta planta es bocha o boja blanca. Su clasificación taxonómica es la siguiente:

Reino: Plantae

Filo: Magnolophyta

Clase: Magnoliopsida

Superorden: Rosanae

Orden: Fabales

Familia: Leguminosae

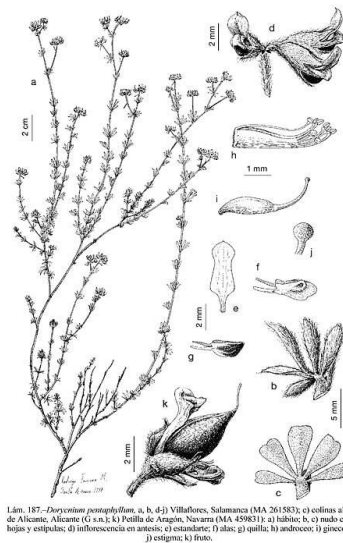


Figura 1. *D. pentaphyllum*

("Flora Vascular - Toda la información detallada sobre la Flora Vascular | - Especie: *Dorycnium pentaphyllum* | BioScripts.net", 2018).

Ulex parviflorus: Es un arbusto espinoso, perenne, de la familia de las leguminosas, de porte erguido, que alcanza 1,5 m de altura, aunque puede llegar a medir más de 2,5 m. Las flores son típicamente de morfología papilionada, con una longitud de 11- 14 mm, dispuestas en fascículos sobre las espinas primarias y secundarias de las ramas producidas el año anterior. (Baeza, 2001) El nombre común de la planta es aliaga. Su clasificación taxonómica es la siguiente:

Reino: Plantae
Filo: Magnolophyta
Clase: Magnoliopsida
Superorden: Rosanae
Orden: Fabales
Familia: Leguminosae

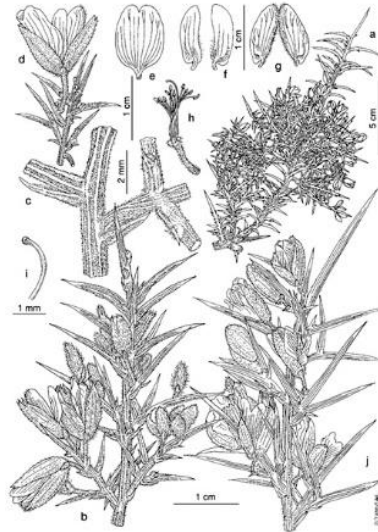


Figura 2. *U. parviflorus*

("Flora Vascular - Toda la información detallada sobre la Flora Vascular | - Especie: *Ulex parviflorus* | BioScripts.net", 2018)

1.2. El género *Rhizobium*.

Al principio de los años 60, estudios en el campo de la bacteriología, usando una amplia gama de caracteres (morfología, nutrición, metabolismo, serología, y características simples del ADN) permitieron demostrar relaciones entre géneros (*Rhizobium* y *Agrobacterium*) así como una distinción entre rizobios de crecimiento lento y rizobios de crecimiento rápido (Willems, A. 2006; Graham & Parker, 1964).

Mediante la introducción de técnicas de genética molecular, desde los años 80 hasta la actualidad, se descubrió una mayor diversidad de rizobios y su relación con otros grupos de bacterias. Esto proporcionó un incremento en el número de especies válidas, llegando en la actualidad a 48 especies reconocidas (Willems, A. 2006).

Los rizobios son microorganismos capaces de realizar simbiosis con la familia de las leguminosas.

A los microorganismos capaces de fijar el gas dinitrogeno (N_2) en amoníaco (NH_3), que puede incorporarse como fuente de nitrógeno para las células, se les conoce como diazótrofos. Los

diazótrofos normalmente fijan nitrógeno molecular cuando no hay otra fuente de nitrógeno disponible. (Madigan, Martinko, Bender, Buckley & Stahl, 2015)

Los rizobios son bacterias Gram negativas, pertenecientes al grupo α -Proteobacterias, que se pueden dividir en 5 géneros: *Rhizobium*, *Sinorhizobium* (conocido como *Ensifer*) *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*. (Diaz Alcántara 2010). Estas bacterias tienen la capacidad de crecer en el suelo o infectar las raíces de las leguminosas y establecer una relación simbiótica, esta infección causa la aparición de nódulos en las raíces de la planta o nódulos radicales. (Madigan, Martinko, Bender, Buckley & Stahl, 2015).

1.3. Relación bacteria-planta.

Los rizobios establecen diversas relaciones simbióticas con las plantas. Estas relaciones se definen, generalmente, porque el hospedador proporciona un entorno habitable, que proporciona carbono y energía y un sistema regulador del oxígeno, mientras que el simbionte proporciona una fuente de nitrógeno fijado.

La simbiosis entre los rizobios y las plantas leguminosas es una de las relaciones entre seres vivos mejor caracterizadas.

El estudio de dicha relación es de gran importancia, pues las leguminosas son la tercera familia más extensa entre las plantas con flores. Son un producto esencial para la industria agroalimentaria, y su capacidad de crecer sin fertilizantes nitrogenados supondría un ahorro de millones de euros anuales y la disminución de los efectos contaminantes del arrastre de los fertilizantes por el agua de lluvia. (Madigan, Martinko, Bender, Buckley & Stahl, 2015).

En la formación de nódulos en la raíz se produce una serie de etapas que se indican a continuación:

- 1) Reconocimiento de la planta y la bacteria como socios adecuados, y adhesión de la bacteria a los pelos radiculares.
- 2) Secreción de moléculas de oligosacáridos de señalización por la bacteria.
- 3) Invasión bacteriana del pelo radicular.
- 4) Traslado de la bacteria al cuerpo de la raíz por los filamentos de infección.
- 5) Formación de células bacterianas modificadas en el interior de las células vegetales y desarrollo del estado fijador de N_2 .
- 6) División celular continuada de la planta y las bacterias, con la formación de nódulos maduros en la raíz.

1.4. Fijación de Nitrógeno.

El nitrógeno (N_2) es un elemento esencial para la vida y se puede encontrar en varios estados, la forma más estable de este elemento es la forma gaseosa (NO y N_2O). Sin embargo, solo un pequeño número de procariontas pueden usarlo como fuente de energía para la célula, mediante el proceso de fijación de nitrógeno (Madigan, Martinko, Bender, Buckley & Stahl, 2015).

Aproximadamente el 98% del nitrógeno existente se encuentra en la litosfera, el 2% restante se encuentra casi en su totalidad en el aire, del cual constituye el 72%, en forma de N_2 . La transformación del nitrógeno atmosférico a una forma asimilable por las plantas se realiza principalmente mediante dos vías, la primera es mediante la oxidación del nitrógeno atmosférico en forma de óxido nítrico (NO), el cual reacciona con el ozono (O_3) para dar lugar a al ion nitrito (NO_2^-), el cual es arrastrado por la lluvia y vuelve a la tierra en forma de ácido nitroso (HNO_2), o ácido nítrico (HNO_3). La segunda vía de fijación de nitrógeno es la fijación biológica de nitrógeno, este proceso tiene lugar debido a una serie de reacciones químicas llevadas a cabo por algunos microorganismos que transforman el nitrógeno atmosférico en una forma asimilable, como puede ser el amoniaco (NH_3) (Paredes, 2013).

1.4.1. Ciclo del nitrógeno

Para entender bien los procesos por los cuales el nitrógeno atmosférico es transformado a una forma asimilable es necesario describir el ciclo del nitrógeno. Este proceso está constituido por tres etapas:

1. Amonificación → Básicamente es la transformación del nitrógeno atmosférico (N_2) a amoniaco (NH_3) o al ion amonio (NH_4^+).
2. Nitrificación → Proceso por el cual diferentes especies de bacterias oxidan el ion amonio y el amoniaco a nitrito (NO_2^-) o nitrato (NO_3^-).
3. Asimilación → Los nitritos y nitratos son asimilados por diferentes organismos, plantas, animales e introducidos en ellos como: aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, nucleótidos. ("IIB-INTECH - Instituto de Investigaciones Biotecnológicas", 2018).

En la *figura 3* se puede observar un esquema resumido del ciclo del nitrógeno

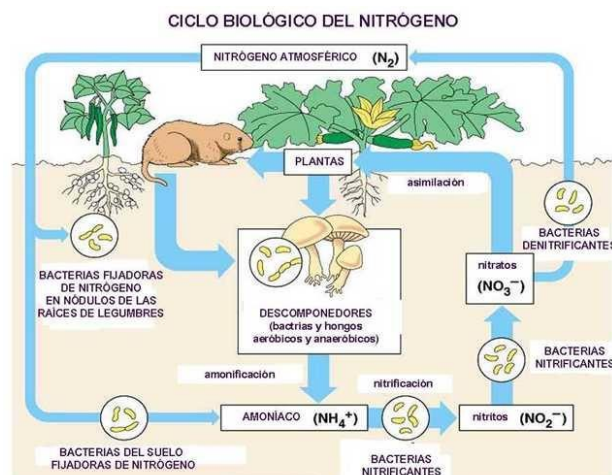


Figura 3. Ciclo del nitrógeno

(https://www.agroalimentando.com/nota.php?id_nota=4722)

2. Objetivos

El siguiente trabajo tiene como objetivo general comprobar la nodulación en leguminosas cultivadas en suelo de la Sierra Calderona.

Objetivos específicos:

- 1) Analizar la capacidad de nodulación en las especies vegetales y condiciones ensayadas.
- 2) Estudiar la cantidad y localización de los nódulos radiculares.
- 3) Realizar un estudio macro y microscópico de los nódulos desarrollados.

3. Metodología

3.1. Selección de las especies vegetales y pruebas de germinación.

3.1.1. Selección de las especies vegetales.

Las especies vegetales empleadas en el estudio fueron seleccionadas debido al conocimiento previo de su desarrollo en suelos de la Sierra Calderona.

En un primer momento las especies seleccionadas fueron *D. pentaphyllum* y *Anthyllis cytisoides*, debido a que estas dos especies pueden encontrarse en la Sierra Calderona. En el caso del *D. pentaphyllum*, las semillas germinaron en un lapso de unos 12 ± 3 días, pero en el caso de *A. cytisoides* no se observó germinación, esto podría ser debido a una falta de maduración de la semilla o bien por falta de fecundación (ausencia de fusión de gametos masculinos-femeninos). Por este motivo las semillas fueron sometidas a diferentes tratamientos destinados a debilitar su cubierta y facilitar así la germinación; los tratamientos realizados se detallan a continuación:

- a) Tratamiento por calor: Se realizaron tratamientos por calor, húmedo y seco. En el primer caso se sumergieron las semillas en agua a 32°C y así se mantuvieron hasta que el agua llegó a temperatura ambiente. En el caso del calor seco se realizaron dos tratamientos, en el primero las semillas se introdujeron en una estufa a 100°C durante 20 minutos (*A. cytisoides* y *D. pentaphyllum*), en el segundo tratamiento las semillas se introdujeron en una estufa a 80°C durante 3 minutos (este tratamiento se realizó para *D. pentaphyllum* y *U. parviflorus*).
- b) Tratamiento mediante ácido: Las semillas fueron sumergidas en ácido sulfúrico concentrado durante 24h, para debilitar su cubierta y facilitar de esta manera la germinación.
- c) Tratamiento de abrasión física: En este caso la cubierta de la semilla fue debilitada mediante el uso de papel de lija.

Debido a problemas relacionados con la germinación, en el caso de *A. cytisoides*, dicha especie vegetal fue sustituida por, *U. parviflorus*

Finalmente, las especies con las que se realizó el estudio fueron las ya descritas anteriormente en el apartado 1.1., *D. pentaphyllum* y *U. parviflorus*.

3.1.2. Germinación en placa.

Una vez seleccionadas las especies vegetales para el estudio, se procedió a prepararlas para el cultivo. Las semillas previamente sometidas a los tratamientos descritos en el apartado anterior, se sembraron en placas Petri sobre varias capas de papel de filtro humedecido con agua destilada. De la especie *D. pentaphyllum* se colocaron 350 semillas, 50 semillas en cada placa, mientras que de la especie *U. parviflorus* se emplearon 250 semillas, 50 semillas por placa. Empleamos un antifúngico Alial ®, a la dosis habitual, que se rociaba sobre las semillas para prevenir la proliferación de hongos. Transcurridos 14 ± 2 días, se observó el desarrollo de plántulas que fueron convenientemente trasplantadas a macetas.

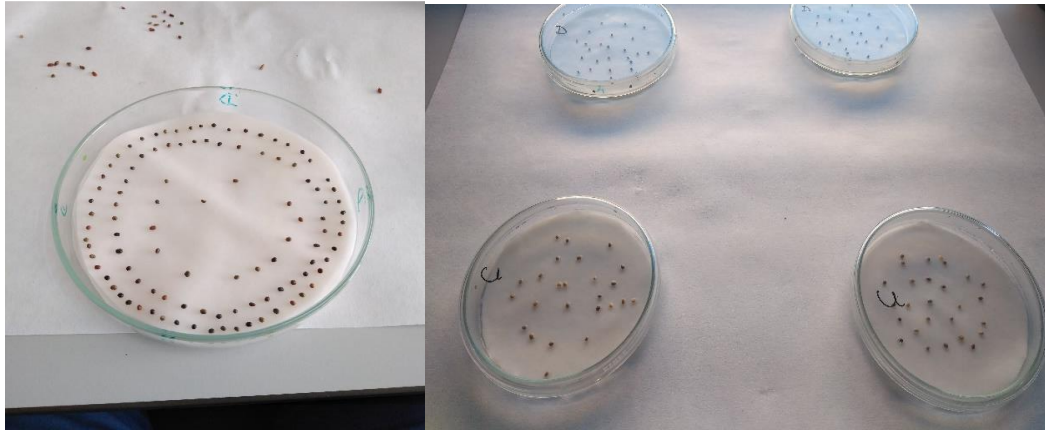


Figura 4. Siembra en placa de las semillas de *D. pentaphyllum* y *U. parviflorus* (Izq. y der. respectivamente)

3.1.3. Preparación del sustrato para el cultivo.

Para este estudio se utilizó suelo procedente de la Sierra Calderona, recogido en una zona donde se observó el desarrollo de vegetación con características similares a las especies vegetales utilizadas en el presente trabajo.

El suelo fue tamizado con un tamiz de 250mm diámetro y 2mm de luz de malla, para evitar la presencia de partículas de gran tamaño. Para la preparación del sustrato de cultivo se realizó una mezcla de suelo con sustrato COMPO SANA® Universal en la proporción 40%-60% (2 de tierra por cada 3 de turba).

Se preparó una maceta de control, en la cual solo se colocó sustrato universal. Y con la mezcla descrita anteriormente se prepararon 4 macetas.



Figura 5. Preparación del sustrato

3.2. Cultivo de las plántulas.

Una vez producida la germinación, se realizó el trasplante colocando 25-30 plántulas por maceta.

Una vez terminada esta fase, las macetas se dejaron en el exterior, para que las condiciones ambientales fueran lo más parecidas posible a las encontradas en la vida silvestre.

En cuanto al riego cabe aclarar, que al ser especies silvestres que viven en un ecosistema en que las precipitaciones son escasas había que adaptar los tiempos entre riegos a las necesidades de las plantas y a las condiciones climáticas, por tanto, en verano se regaron con más asiduidad que en invierno. Las plantas se regaron por capilaridad inundando las bandejas donde se encontraban las macetas.



Figura 6. Crecimiento de D. pentaphyllum: 2, 5 y 8 semanas, (de izq. a der.)



Figura 7. Planta de D. pentaphyllum descalzada al cabo de 12 semanas

3.3. Descalzado de las plantas.

Después de 12 semanas de cultivo en maceta se procedió a descalzar las plantas. El descalce de las macetas se realizó de forma secuencial, para poder conocer el efecto del tiempo en el desarrollo y a la viabilidad de los nódulos.

Para el descalce, se volcó la maceta en una bandeja con una profundidad adecuada que nos permitiera añadir agua para lavar las raíces y eliminar restos de sustrato adherido a ellas, es un proceso que requiere especial cuidado, debido a que las raíces secundarias y terciarias son muy frágiles. La tierra restante se guardó para futuros análisis.

Una vez retirado el sustrato adherido a las raíces y aisladas las diferentes plantas, se realizó un lavado de las raíces para eliminar restos de sustrato que pudieran interferir en posteriores análisis. Cuando las plantas habían sido separadas de la tierra y se habían desliado las raíces de las plantas, se realizó la medición de las raíces y el recuento de nódulos.

3.4. Caracterización macroscópica de raíces y nódulos.

3.4.1. Medición de las raíces.

El tamaño de las raíces es un indicativo de desarrollo de la planta, conocer el tamaño de la raíz y la cantidad de nódulos nos daría la posibilidad de conocer si existe una relación entre el estado de desarrollo de la raíz y desarrollo de los nódulos.

La planta se colocó sobre una superficie lisa, y tras haber separado las raíces y haberlas estirado, se midió el largo de la raíz con una regla.

3.4.2. Recuento de nódulos.

El recuento de nódulos es un paso importante y necesario para poder conocer la extensión de la relación simbiótica, es importante, además, observar la zona de la raíz en la cual se produce el mayor desarrollo de nódulos

Para facilitar el recuento de nódulos se separaron las raíces de modo que se pudiera observar de forma clara la presencia de nódulos. El recuento se hizo de forma manual, apuntándose el número, tamaño, forma y localización de los nódulos.

3.4.3. Caracterización macroscópica de los nódulos.

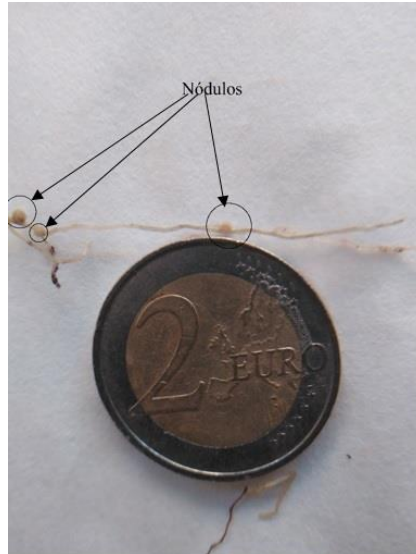


Figura 8. Nódulos presentes en la raíz primaria de *D. pentaphyllum*

3.5. Estudio microscópico de los nódulos.

3.5.1. Squash

Para la caracterización microscópica, los nódulos se extrajeron de las raíces con la ayuda de un bisturí, pinzas y lanceta, y con ellos se realizó la técnica del “squash” o aplastamiento de los nódulos. Esta técnica es la más usada por su simplicidad y rapidez, consiste en, colocar el nódulo a observar sobre un portaobjetos y agregar una gota de agua destilada, a continuación, se coloca un cubreobjetos sobre la gota de líquido y con cuidado se aplasta el nódulo y se esparce moviendo el cubreobjetos para hacer más fina la capa que se desea estudiar. (Huaman, 1995).

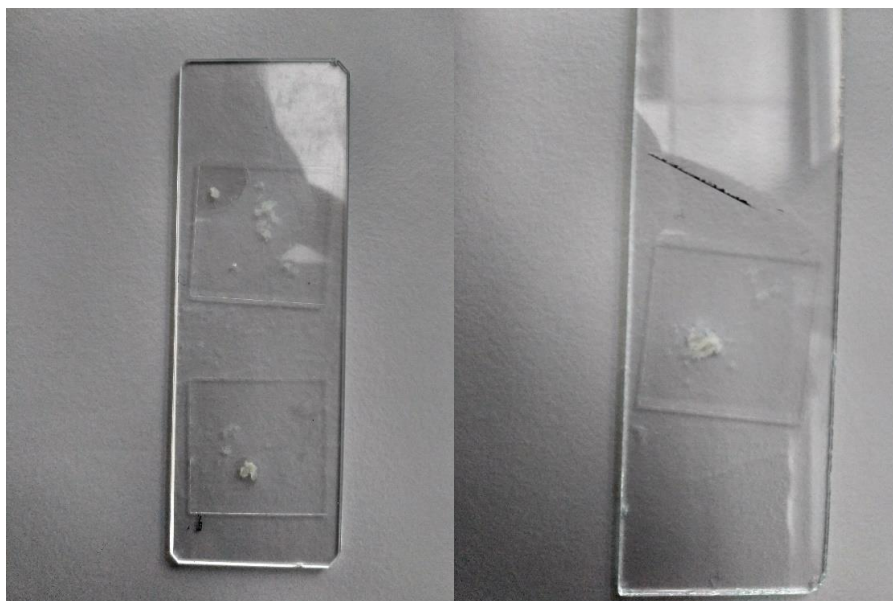


Figura 9. Squash nódulos *D. pentaphyllum*

3.5.2. Tinción de Gram y observación al microscopio.

Otra prueba realizada para analizar la presencia de microorganismos en los nódulos obtenidos fue la tinción de Gram, esta tinción fue desarrollada por Christian Gram en 1884, y nos permite, de acuerdo con la estructura y el grosor de la pared bacteriana, agrupar las bacterias en Gram positivas y Gram negativas. Las Gram positivas tienen una capa gruesa de péptidoglucano y carecen de membrana externa, mientras que las Gram negativas tienen una capa más delgada de péptidoglucano y poseen membrana externa. (Rodríguez Cavallini, 2005).

Existen variaciones de esta técnica, pero en términos generales, la tinción de Gram involucra los siguientes pasos:

- 1) Tinción inicial: Las células se tiñen con *crystal violeta*, el cual es el colorante primario. En este paso todas las células se tiñen de morado.
- 2) Mordiente: Se adiciona *yoduro* (lugol) que reacciona con el cristal violeta y forma un complejo cristal violeta-yoduro. En este paso todas las células continúan de color morado.
- 3) Decoloración: Se adiciona un solvente no polar, el cual actúa lavando el complejo cristal violeta-yoduro de las células Gram negativas. De esta manera las bacterias Gram positivas continúan moradas y las Gram negativas quedan incoloras. Este es el paso crítico de esta tinción, pues si nos excedemos se decoloran las Gram positivas y si por el contrario hay una insuficiencia del solvente no decoloraremos las Gram negativas. Este paso se repetirá hasta que casi no se libere el cristal violeta.
- 4) Contratinción: Se vuelve a teñir con *safranina* o *fucsina básica*, de manera que las bacterias Gram negativas, que habían sido decoloradas, se tiñen de color rosado a fucsia, según el colorante empleado; mientras que, las bacterias Gram positivas no se ven afectadas por la contratinción y mantienen el color morado.

Entre cada tinción se debe lavar la placa con agua destilada. Cada paso tiene un tiempo de espera para que los colorantes sean absorbidos por las bacterias, los tiempos de los pasos son:

- 1) Cristal violeta 1 minuto.
- 2) Lugol 2 minutos.
- 3) Contratinción 1 minuto.

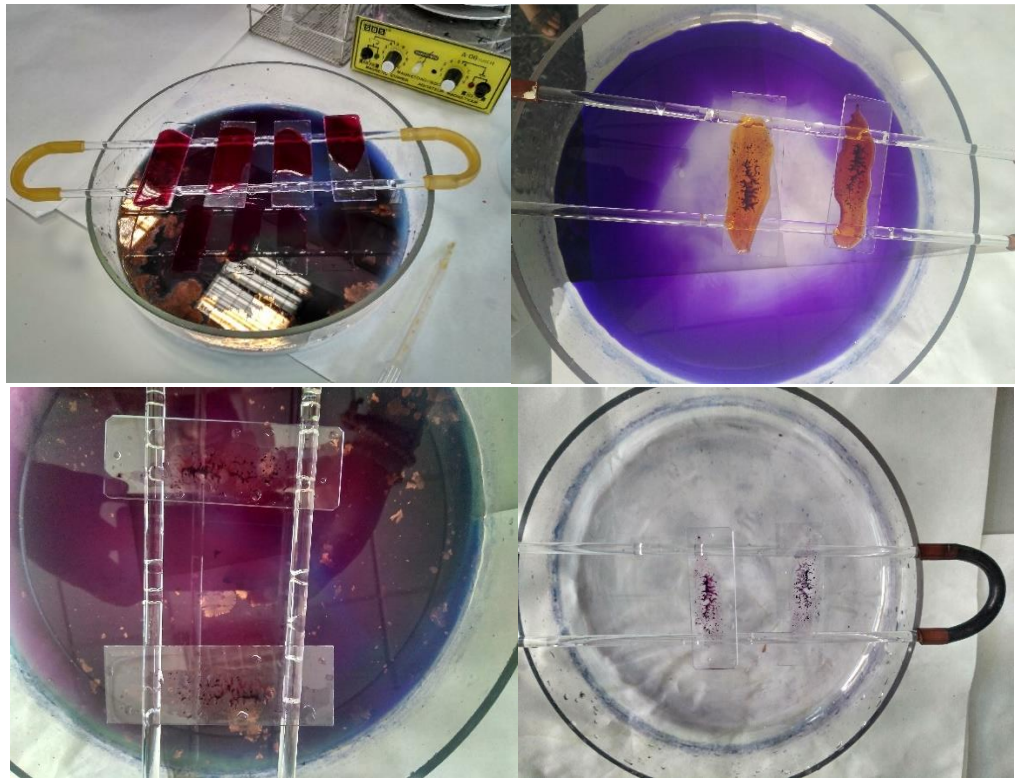


Figura 10. Pasos para la tinción de Gram

3.5.3. Microscopio óptico empleado

Para la observación de los nódulos se utilizó un microscopio óptico modelo ICC50 W, LEICA®.



Figura 12. Microscopio empleado

Este microscopio se encuentra conectado a un ordenador, por lo que las imágenes obtenidas mediante su uso son de gran calidad.

3.6. Desección de los nódulos

Una vez realizado el análisis macro y microscópico de los nódulos, algunos se guardaron desecados para posteriores estudios. Para la desecación, los nódulos, se introdujeron en un recipiente en el cual se había colocado previamente una capa de gel de sílice y una triple capa de papel de filtro, como se indica en el siguiente esquema:

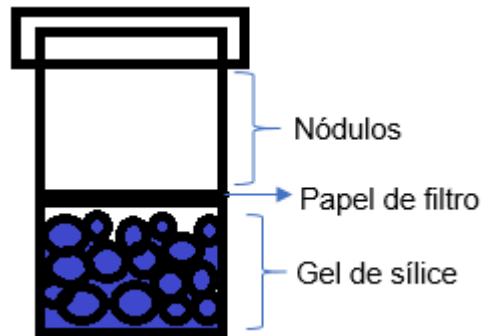


Figura 13. Preparación de los frascos para la desecación de los nódulos.

De esta manera, se seleccionaron fragmentos de raíces que contuvieran nódulos y se introdujeron en el frasco de muestras, con cuidado de que no entraran en contacto con el gel de sílice. (Beck, D. Materon, L. & Afandi, F. 1996).



Figura 14. Nódulos desecados mediante el uso de sílica gel.

4. Resultados y discusión

4.1. Germinación en placa.

4.1.1. *Dorycnium pentaphyllum*

De 350 semillas a germinar en placa → 280 semillas germinaron (80% de germinación).

4.1.2. *Ulex parviflorus*

De 250 semillas a germinar en placa → 125 semillas germinaron (50% de germinación).

4.2. Trasplantado a macetas.

4.2.1. *Dorycnium pentaphyllum*

De 280 plántulas trasplantadas a maceta → 14 individuos se desarrollaron correctamente (5% de éxito) a pesar del bajo porcentaje de éxito, debido a la gran cantidad de muestras empleadas, el estudio podía seguir adelante con los 14 individuos que se obtuvieron.

4.2.2. *Ulex parviflorus*

De 125 plántulas, solo se desarrolló un individuo que fue analizado siguiendo la metodología descrita anteriormente. (El porcentaje de desarrollo fue inferior al 1%).

4.3. Caracterización macroscópica.

4.3.1. *Dorycnium pentaphyllum*

Tabla 1. Parámetros caracterización macroscópica de *D. pentaphyllum*.

| Parámetros | Planta 1 | Planta 2 | Planta 3 | Planta 4 | Planta 5 | Planta 6 |
|-----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-----------------------------|-------------------|
| Longitud parte aérea (cm) | 16 | 6 | 12 | 14 | 8 | 14 |
| Longitud raíz | 31 | 17 | 10 | 21 | 12 | 26 |
| Nódulos en raíz Principal | Sí | Sí | Sí | Sí | Sí | Sí |
| Nódulos en raíces laterales | Sí | No | Sí | Sí | No | Sí |
| Tamaño nódulos | <5mm | <5mm | <4mm | <5mm | <1mm | <5mm |
| Forma nódulos | Redondeada | Redondeada | Redondeada | Redondeada | Redondeada-aplanada | Redondeada |
| Color Nódulos | Similar a la raíz | Similar a la raíz | Similar a la raíz | Similar a la raíz | Más claro que el de la raíz | Similar a la raíz |

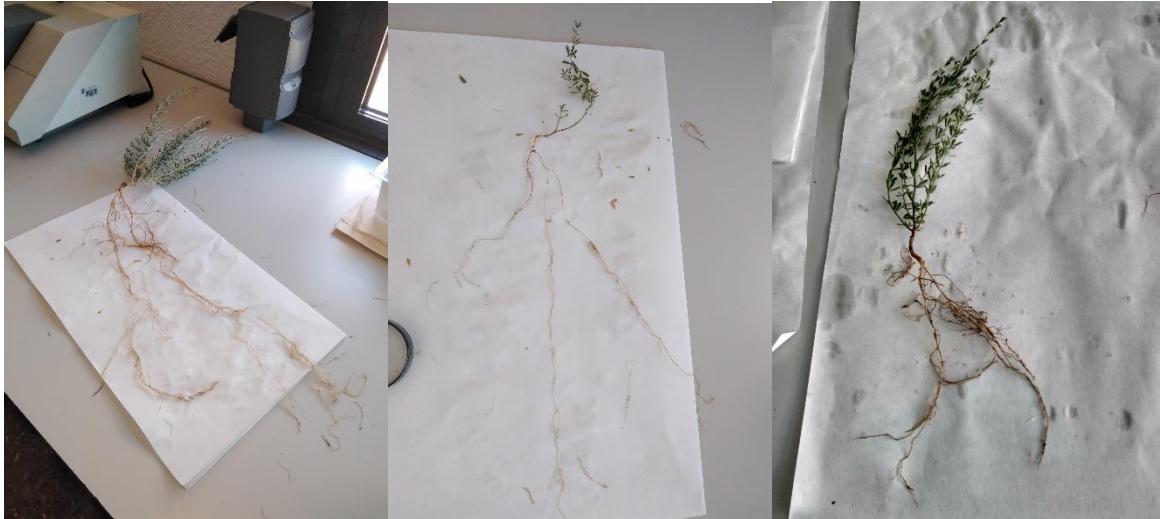


Figura 15 Plantas de *D. pentaphyllum* 1, 2, 3. (De izquierda a derecha)



Figura 16. Plantas de *D. pentaphyllum* 4, 5, 6. (De izquierda a derecha)

El desarrollo de los nódulos está estrechamente ligado al desarrollo de la planta, tanto a la de su parte aérea como a la radicular, observando la tabla 1, vemos que las plantas con nódulos tanto en las raíces principales como en las laterales son aquellas con un mayor desarrollo de la parte aérea y radicular (véase planta: 1, 4 y 6). También podemos pensar que para la especie *D. pentaphyllum* el tamaño y la forma de los nódulos no depende únicamente del desarrollo de la planta (véase planta 3). Podemos ver que en todos los individuos tanto el tamaño de los nódulos como la forma es similar, exceptuando la planta 5, cuyos nódulos tienen una forma redondeada-aplanada y un tamaño 5 veces menor al del resto, observando la tabla y las figuras podemos pensar que esto puede ser debido a que las raíces están menos desarrolladas.

4.3.2. *Ulex parviflorus*.

Tabla 2. Parámetros caracterización macroscópica *U. parviflorus*

| Parámetros | Planta 1 |
|-----------------------------|----------|
| Longitud parte aérea (cm) | 12 |
| Longitud raíz | 28 |
| Nódulos en raíz principal | No |
| Nódulos en raíces laterales | No |
| Tamaño nódulos | - |
| Forma nódulos | - |
| Color nódulos | - |

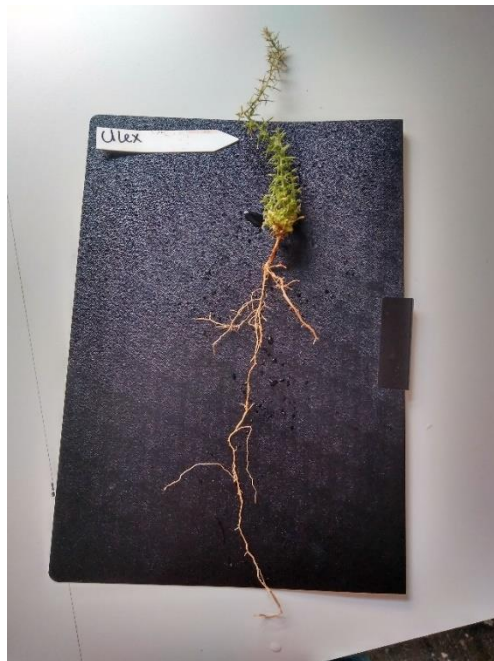


Figura 17. Individuo de la especie *U. parviflorus*

En el individuo de *U. parviflorus* obtenido no se observó nodulación, esto puede ser debido a la inmadurez del individuo, al ser un individuo joven las raíces no se han desarrollado lo suficiente para que las bacterias las infecten y se produzca la simbiosis.

4.4. Estudio microscópico de los nódulos.

La técnica en fresco (squash, *imagen 18*) nos permitió observar la presencia de simbiosomas, estas son unas estructuras redondeadas que se encuentran unidas a la pared celular. Los simbiosomas están constituidos por un grupo de bacteroides que han sido encapsulados por una membrana denominada membrana peribacteroide o simbiosomal, que aísla a los microorganismos del citoplasma de la célula huésped (Prescott, Harley & Klein, 1999).

También se pudo apreciar en el interior de los nódulos el color rojizo o amarronado que podría ser indicativo de la producción de leghemoglobina.

La leghemoglobina es una proteína con hierro presente en los nódulos sanos que fijan nitrógeno, que se induce por la interacción del hospedador vegetal y el simbiote bacteriano. Los rizobios necesitan algo de O_2 para generar energía para la fijación del N_2 , pero sus nitrogenasas se inactivan en presencia de O_2 , por lo que en el nódulo se controla la cantidad de O_2 mediante la leghemoglobina (Madigan, 2015).

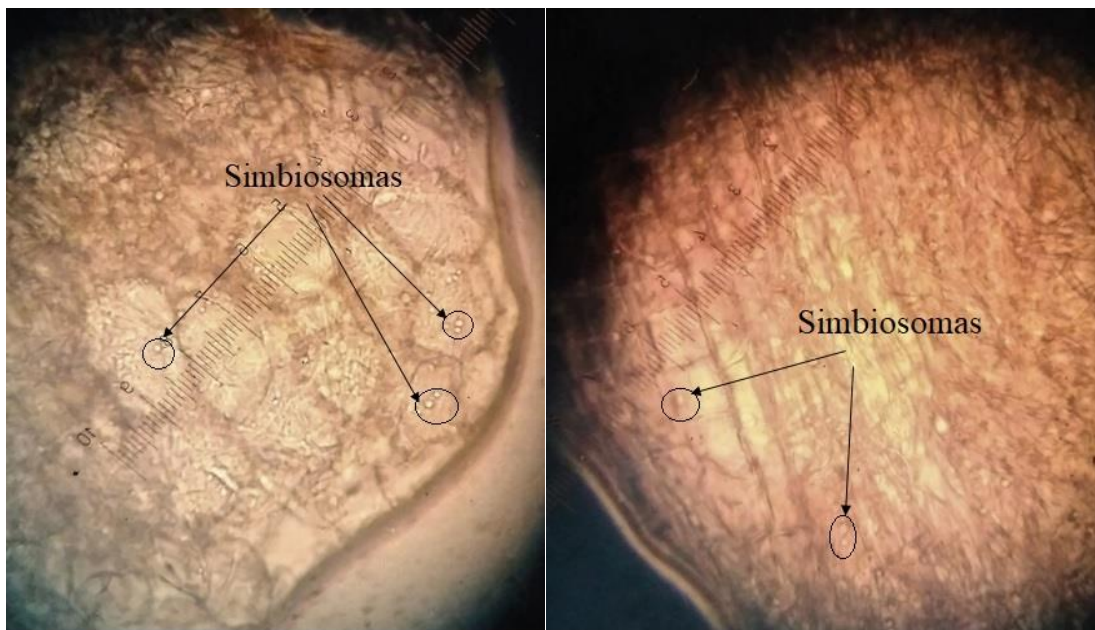


Figura 18. Simbiosomas en nódulos de *D. pentaphyllum*

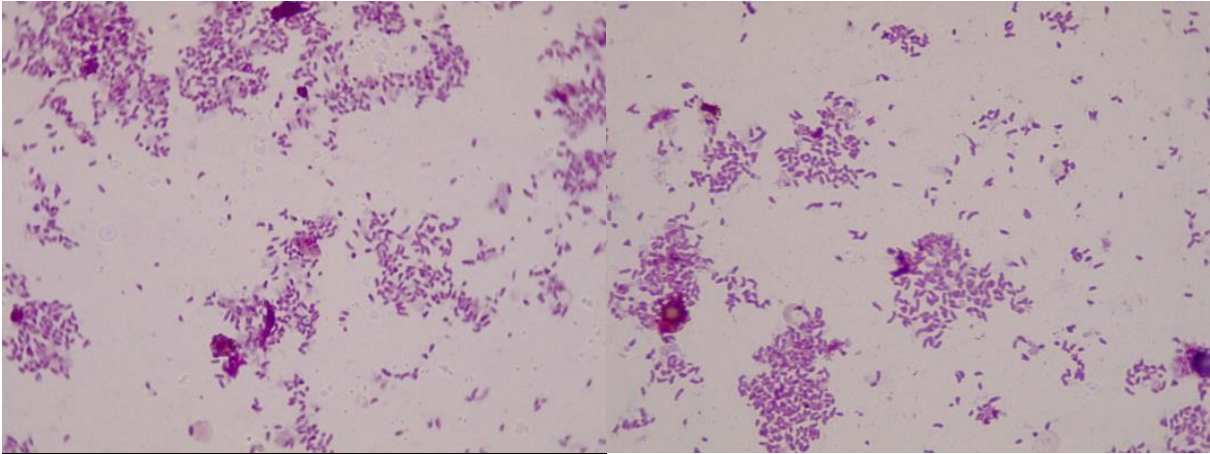


Figura 19. Bacilos Gram negativos provenientes de nódulos de D. pentaphyllum.

Además del estudio microscópico de los nódulos en fresco se realizó un estudio mediante tinción de Gram. En la *figura 19* se puede observar un gran número de bacilos Gram negativos libres o agrupados, así como, de estructuras de células que parecían romperse y dejar libres las bacterias.

De este modo, del estudio microscópico de los nódulos, tanto en fresco como mediante la tinción de Gram, se pudo observar la presencia de bacterias Gram negativas, lo cual es indicativo de la presencia de bacterias del género *Rhizobium*.

5. Conclusiones

Tras los resultados obtenidos en los distintos procedimientos, se llegó a las siguientes conclusiones:

Se ha observado diferencia en la capacidad de formación de nódulos en las especies estudiadas. En *D. pentaphyllum* el desarrollo nodular fue abundante.

Se observó que la concentración de nódulos radiculares fue mayor en las plantas que se encontraban en un estadio de desarrollo más avanzado.

Los nódulos formados no presentaron diferencias morfológicas significativas a lo largo de las diferentes partes de la raíz.

En la caracterización microscópica de los nódulos, mediante squash, se observó una coloración marrón-rojiza propia de la leghemoglobina. En la tinción de Gram se observaron bacterias con morfología de bacilos Gram negativos, lo que podría indicar la presencia de bacterias del género *Rhizobium*.

La presencia de nódulos en las especies vegetales seleccionadas, pone de manifiesto la existencia de bacterias fijadoras de N₂ en el suelo empleado.

6. Líneas futuras

6.1. Relación planta-suelo.

Litológicamente, la Sierra Calderona está constituida por materiales sedimentarios del Secundario, entre los que dominan las calizas, dolomías y margas. Sin embargo, existen también importantes afloramientos de areniscas y argilitas del Triásico.

En lo que respecta a los materiales silíceos, se han reconocido cuatro unidades edáficas, que son: Regosoles éutricos (sobre argilitas), Arenosoles álbicos (sobre areniscas en situaciones de cumbre y de principio de ladera y en los afloramientos rocosos), Arenosoles cámbicos (en zonas de mayor acumulación y estabilidad) y Luvisoles crómicos (en las laderas y fondos de vaguadas). (García-Fayos, 1991)

La vegetación de estas áreas se caracteriza por la gran extensión de los matorrales, a menudo con un estrato de pinos, y por la reducida superficie que ocupan los bosques de alcornoques. Entre las especies arbustivas presentes en estos suelos encontramos una gran cantidad de especies leguminosas, concretamente las especies en las que se basa este estudio *D. pentaphyllum* y *U. parviflorus*.

Basándonos en los resultados preliminares obtenidos en este trabajo podríamos continuar con el estudio de la relación entre leguminosas, que pueden crecer en estos suelos y las bacterias que establecen simbiosis con ellas. En estos suelos, con presencia de especies leguminosas, tiene lugar la simbiosis entre planta-bacteria, ya que hemos visto que estas plantas son capaces de formar nódulos debido a que en la rizosfera se encuentran comunidades de bacterias entre otras, del género *Rhizobium*. Además, todo esto no es importante únicamente por la capacidad de fijación de nitrógeno, sino también porque las raíces de las leguminosas se expanden mucho en el suelo, lo que ayuda a fijarlo y así prevenir la erosión.

6.2. Empleo leguminosas para restauración de suelos degradados.

Las leguminosas que pueden realizar simbiosis con microorganismos fijadores de nitrógeno son importantes para la recuperación de suelos que han sido degradados. Ya se conocen una gran cantidad de especies arbóreas que pueden realizar simbiosis con otros microorganismos para fijar fósforo, zinc u otros elementos, estos microorganismos son las micorrizas.

En el caso de las leguminosas, al unirse a bacterias del genero *Rhizobium* pueden producir un gran aumento de la fertilidad del suelo, debido al aporte de nitrógeno. (Dias, Franco, Campello, de Faria & Da Silva, 1995)

En la región de Valencia, antiguamente se empleaban dos especies de pinos para recuperar espacios degradados por incendios, *Pinus halepensis* y *Pinus pinaster*. Pero con el paso del tiempo se han buscados nuevas especies de rápida regeneración para recuperar estos espacios. Se plantean dos vías de actuación, una de ellas es el empleo de semillas de especies como por ejemplo *U. parviflorus* (Vallejo & Alloza, 1998).

La inoculación con hongos micorrízicos arbusculares indígenas y con bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Rhizobium* no solo mejora el establecimiento de especies de plantas clave, sino que también aumenta la fertilidad y la calidad del suelo (Requena, Perez-Solis, Azcon-Aguilar, Jeffries & Barea, 2001).

7. Referencias bibliográficas

Baeza Berná, MJ. (2001) *Aspectos ecológicos y técnicas de control del combustible (roza y quema controlada) en matorrales con alto riesgo de incendios dominados por Ulex parviflorus (Pourr.)*. (Licenciado) Universidad de Alicante.

Beck, D., Materon, L., & Afadi, F (1993). *Practical Rhizobium-legume technology manual*. Aleppo: ICARDA, pp. 1-15.

¿CONOCES LA IMPORTANCIA DEL CICLO DEL NITRÓGENO?. (2018). Disponible en: https://www.agroalimentando.com/nota.php?id_notas=4722 [Consulta 3/11/2018]

Dias, L., Franco, A., Campello, E., de Faria, S., & Da Silva, E. (1995). Leguminosas forestales: aspectos relacionados con su nutrición y uso en la recuperación de suelos degradados. *Bosque*, 16(1), 121-127.

Díaz Alcántara, C. (2010). *Aislamiento, caracterización y selección de rhizobia autóctonos que nodulan habichuela roja (Phaseolus vulgaris L.), en la República Dominicana*. (Licenciado). Universidad de León.

García-Fayos, P. (1991). La vegetación de la Sierra Calderona (Comunidad Valenciana). *Lazaroa*. (12). pp. 317-332.

Graham, P., & Parker, C. (1964). Diagnostic features in the characterisation of the root-nodule bacteria of legumes. *Plant And Soil*, 20(3), 383-396.

Flora Vascular - Toda la información detallada sobre la Flora Vascular | - Especie: *Dorycnium pentaphyllum* | BioScripts.net. (2018). Disponible en: <https://www.floravascular.com/index.php?spp=Dorycnium%20pentaphyllum> [Consulta 14/10/2018].

Flora Vascular - Toda la información detallada sobre la Flora Vascular | - Especie: *Ulex parviflorus* | BioScripts.net. (2018). Disponible en: <https://www.floravascular.com/index.php?spp=Ulex%20parviflorus> [Consulta 14/10/2018].

Huaman, Z. (1995). *Técnicas citológicas para determinar el número cromosómico y la fertilidad de las papas*. Lima, Perú: CIP.

IIB-INTECH - Instituto de Investigaciones Biotecnológicas. (2018). Disponible en: <http://www.iib.unsam.edu.ar/archivos/docencia/licenciatura/biotecnologia/2018/QuimicaBiol/1528215167.pdf>.

Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D., & Stahl, D. (2015). *Brock biology of microorganisms* (14th ed.). Harlow [etc.]: Pearson Education

Marugán Hernandez, V. (2003). *Caracterización proteómica de Rhizobium leguminosarum bv. Viciae*. (Licenciado) Universidad Politécnica de Madrid.

Paredes, M. C. (2013). Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas y gramíneas [en línea]. Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Católica Argentina. Disponible en: <http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/repositorio/tesis/fijacion-biologica-nitrogeno-leguminosas.pdf>

Prescott, L., Harley, J., & Klein, D. (1999). *Microbiología*. Madrid: MacGraw-Hill Interamericana.

Requena, N., Perez-Solis, E., Azcon-Aguilar, C., Jeffries, P., & Barea, J. (2001). Management of Indigenous Plant-Microbe Symbioses Aids Restoration of Desertified Ecosystems. *Applied And Environmental Microbiology*, 67(2), 495-498.

Rodríguez Cavallini, E. (2005). *Bacteriología general*. San José, Costa Rica: Editorial de la Universidad de Costa Rica.

Vallejo, R., y Alloza J.A. (1998). The restoration of burned lands: the case of eastern Spain, (ed. Moreno, J.M.), En *Large forest fires*. Leiden, Backhuys Publishers, pp. 91-108.

Willems, A. (2006). *The taxonomy of rhizobia: an overview*. *Plant and Soil*, 287(1-2), 3-14.