

**MEMORIA JUSTIFICATIVA DEL PROYECTO “DISEÑO DE  
BIOFERTILIZANTES BACTERIANOS PARA LA MEJORA DE LA  
PRODUCCIÓN DE VEZA EN ROTACIÓN DE CULTIVO CON CEREALES”**

**Investigador solicitante:**

Nombre: Raúl Rivas González

Teléfono: 923294500 ext. 1919

Email: raulrg@usal.es

Dirección: Departamento de Microbiología y Genética. Lab 210. Edificio Departamental de Biología. Plaza Doctores de la Reina s/n. 37007 Salamanca.

**Miembros investigadores colaboradores de la Universidad de Salamanca:**

Eustoquio Martínez-Molina; Pedro F. Mateos González; M<sup>a</sup> de la Encarnación Velázquez Pérez; José David Flores Félix; Marta Marcos García.

Los objetivos planteados proyecto han sido los siguientes:

Objetivo 1. Aislar cepas de rhizobia a partir nódulos de *Vicia sativa* en los suelos cultivados por el agricultor participante en este proyecto.

Objetivo 2. Analizar la biodiversidad genética de las cepas aisladas mediante perfiles de RAPD y agruparlas mediante tratamiento matemático de los perfiles obtenidos con el objetivo de seleccionar cepas representativas para la secuenciación de genes.

Objetivo 3. Identificar a nivel de género, especie y simbiovariedad los aislados mediante secuenciación de genes.

Objetivo 4. Analizar la efectividad de la simbiosis de cepas de diferentes grupos filogenéticos con *Vicia sativa*.

Objetivo 5. Analizar la competitividad de las cepas más efectivas en condiciones de microcosmos.

Objetivo 6. Analizar la capacidad de colonización de las cepas más efectivas en las raíces de trigo.

Objetivo 7. Diseño de un biofertilizante en base a *Rhizobium* y evaluación de su eficacia en campo.

## **RESULTADOS OBTENIDOS**

### **OBJETIVO 1.**

Aislar cepas de rhizoba a partir nódulos de *Vicia sativa* en los suelos cultivados por el agricultor participante en este proyecto.

Metodología.

El aislamiento se llevó a cabo en medio YMA a partir de nódulos efectivos de plantas creciendo en los suelos cultivados actualmente con *Vicia sativa* en rotación con trigo utilizando la técnica descrita por Vincent (1970). Se tomaron muestras de 2 suelos representativos de la localidad de Aldeatejada donde se realiza de manera habitual la rotación de cultivos de veza y trigo, con coordenadas 40°54'42.6"N 5°40'48.7"W y 40°54'09.0"N 5°40'55.6"W respectivamente.

Estos suelos se dispusieron en botes de 1 litro de capacidad y se utilizaron semillas de veza esterilizadas para asegurar el aislamiento de endosimbiontes autóctonos de los suelos muestreados evitando contaminaciones horizontales por bacterias presentes en las cubiertas de las semillas. Las semillas se esterilizaron siguiendo el protocolo indicado en Alvarez-Martinez et al., (2009) consistente en 30 segundos en etanol (70% v/v), seguido de 5 minutos en NaClO<sub>3</sub> 10% (v/v) y 5 lavados con agua destilada esteril. Se colocaron 8 semillas en vermiculita esteril como control de esterilidad. Ambos tratamientos se regaron durante todo el proceso con agua destilada estéril.

Transcurridos 21 días, siguiendo el protocolo descrito en Vincent (1970) se procedió a esterilizar superficialmente los nódulos radiculares de las diferentes plantas sumergiéndolos en una solución de HgCl<sub>2</sub> (2,5% m/v) durante 2 minutos, realizándose 5 lavados con agua destilada

esteril para eliminar los restos de HgCl. Los nódulos se macharon y se sembraron en placas de YMA (Yeast Manitol Agar), manteniéndose a 28°C durante 5 días cuando aparecieron colonias aisladas a partir de las cuales se obtuvieron cultivos puros.

## Resultados

Se procesaron un total de 80 nódulos a partir de los que se aislaron 86 cepas diferentes que presentaban la morfología típica de los rhizobia, con aspecto mucoso y blanquecino. Las cepas fueron nombradas como VSAT seguido de un número (01, 02, ...), este nombre hace referencia al hospedador *Vicia sativa* (VS) y la localidad de procedencia Aldeatejada (AT).

## **OBJETIVO 2.**

Analizar la biodiversidad genética de las cepas aisladas mediante perfiles de RAPD y agruparlas mediante tratamiento matemático de los perfiles obtenidos con el objetivo de seleccionar cepas representativas para la secuenciación de genes.

## Metodología.

Para la obtención de perfiles de RAPD, se realizó una amplificación del ADN utilizando el primer M13 (5' CAGGGTGGCGGTTCT 3'), diseñado a partir de la región central del fago del mismo nombre (Schonian et al., 1993). Esta técnica permite la obtención de perfiles característicos que están formados por bandas de DNA obtenidas por amplificación al azar utilizando el primer mencionado.

El tratamiento matemático de los perfiles obtenidos se realizó empleando el programa Bionumerics (Applied Maths, Nv; EEUU). Para ello primero se evaluaron los perfiles de bandas obtenidos para todas las cepas muestreadas utilizando el coeficiente de correlación de Pearson. A partir de estos perfiles se desarrolló una matriz de similitud que fue utilizada por el programa para construir un mapa de escalado multidimensional.

## Resultados.

En un primer momento se seleccionaron 26 cepas diferentes de los 86 aislados pertenecientes a nódulos, plantas y suelos diferentes con el fin de facilitar la labor de selección. Tras el tratamiento matemático de los perfiles obtenidos se obtuvieron 5 grupos diferentes como se pueden observar en la figura 1. Encontramos un grupo muy numeroso con 10 aislados, 2

grupos formados por 5 aislados y otros dos grupos formados por tres aislados. De los cuales se seleccionaron 1 representante, para proceder con la identificación específica mediante secuenciación del gen ribosómico 16S y los genes housekeeping *atpD* y *recA*, así como determinar la simbiovariedad del mismo mediante la secuenciación del gen simbiótico *nodC*.

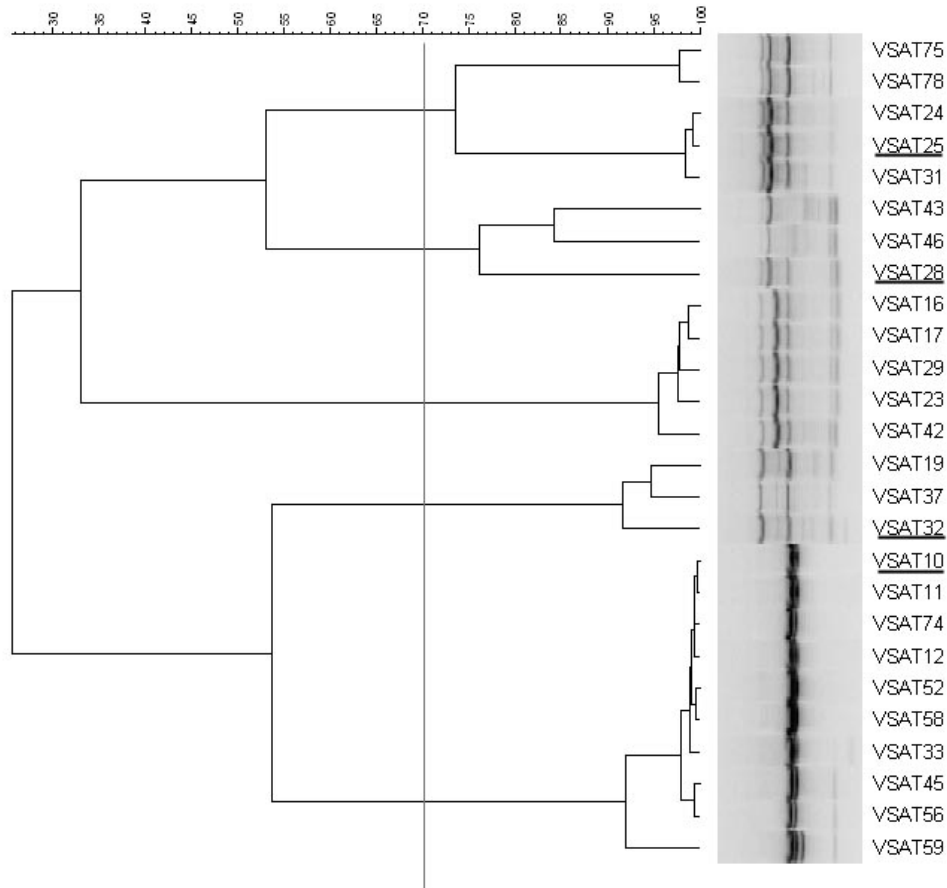


Figura 1. Dendrograma donde se muestra la diversidad infraespecífica de los aislados. La línea marca el porcentaje mínimo de variabilidad en el perfil genético para ser considerado como un grupo diferente.

### OBJETIVO 3.

Identificar a nivel de género, especie y simbiovariedad los aislados mediante secuenciación de genes.

#### Metodología

Actualmente, la clasificación filogenética de las bacterias está basada en la comparación de las secuencias del gen ribosómico 16S. Este método fue introducido en

la sistemática bacteriana como una herramienta de clasificación basada en la filogenia molecular que revolucionó la taxonomía. Para estudiar el gen ribosómico 16S de nuestros aislados, se secuenciaron diversos representantes de los grupos de RAPD y las secuencias se compararon con las secuencias de los genes ribosómicos 16S de todas las cepas tipo depositadas en las bases de datos públicas (EMBL, Genbank, y NCBI) y comparándolas a través del servidor Ez-Taxon (<http://www.eztaxon.org/>). Sin embargo, en el caso del género *Rhizobium*, esta puede no ser necesaria debido a la gran similitud existente entre algunas de sus especies, por lo que es necesaria la utilización de otros genes que han mostrado tener una gran capacidad de discriminación entre especies. Estos genes son los denominados genes housekeeping, donde los más utilizados son los genes *recA* y *atpD* que codifican para una recombinasa y una ATP-sintasa.

## Resultados

La identificación a nivel de género, especie y simbiovariedad se llevó a cabo para un representante de cada uno de los grupos obtenidos en el objetivo anterior. La identificación a nivel de género y especie se llevó a cabo secuenciando los genes 16S rRNA, *recA* y *atpD*, que son empleados habitualmente para la identificación genética de los rhizobia. Se observó que todos los aislados pertenecían al grupo filogenético de *Rhizobium leguminosarum* (Figura 2), que actualmente contiene 6 especies con genes 16S rRNA similares, pero con genes *recA* y *atpD* divergentes y que permiten la diferenciación de dichas especies de este grupo.

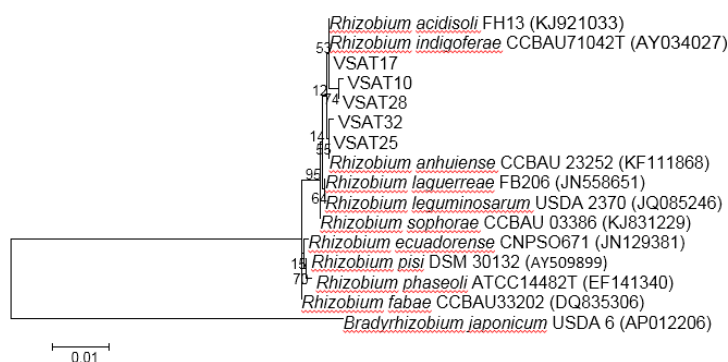


Figura 2. Árbol filogenético mostrando la posición filogenética de los aislados con respecto al cluster filogenético de *Rhizobium leguminosarum* de acuerdo a la secuenciación del gen ribosómico 16S.

El análisis de las secuencias de los genes *recA* y *atpD* obtenidas para los aislados de este proyecto mostró que pertenecen a un cluster y a un linaje filogenéticamente

divergentes de las especies del grupo de *Rhizobium leguminosarum*. Por lo tanto, las cepas de este proyecto pertenecen a especies diferentes a las descritas actualmente en este grupo y se han aislado por primera vez en el presente proyecto (Figura 3).

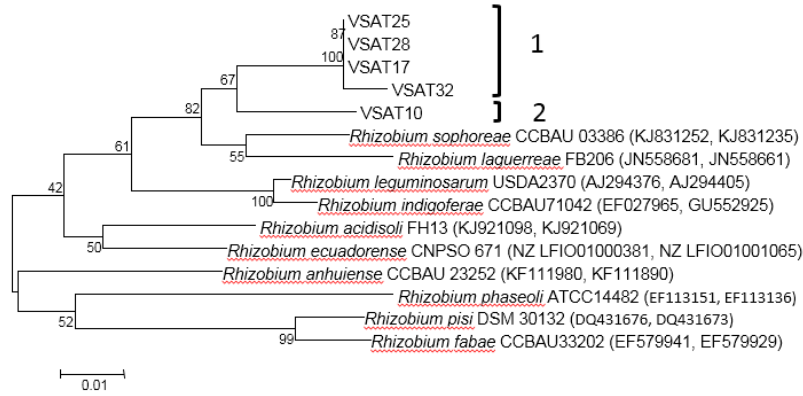


Figura 3. Árbol filogenético mostrando la posición filogenética de los aislados con respecto al cluster filogenético de *Rhizobium leguminosarum* de acuerdo a la secuenciación de los genes *atpD* y *recA*.

La simbiovariedad fue analizada en base a la secuenciación del gen *nodC*, que se utiliza habitualmente para la diferenciación de simbiotes de la misma o de diferentes especies de rhizobia. Todos los aislados pertenecen a la simbiovariedad *viciae* que es la que nodula a las leguminosas del género *Vicia* debido a que este hospedador es muy restrictivo y forma simbiosis con una única simbiovariedad (Figura 4).

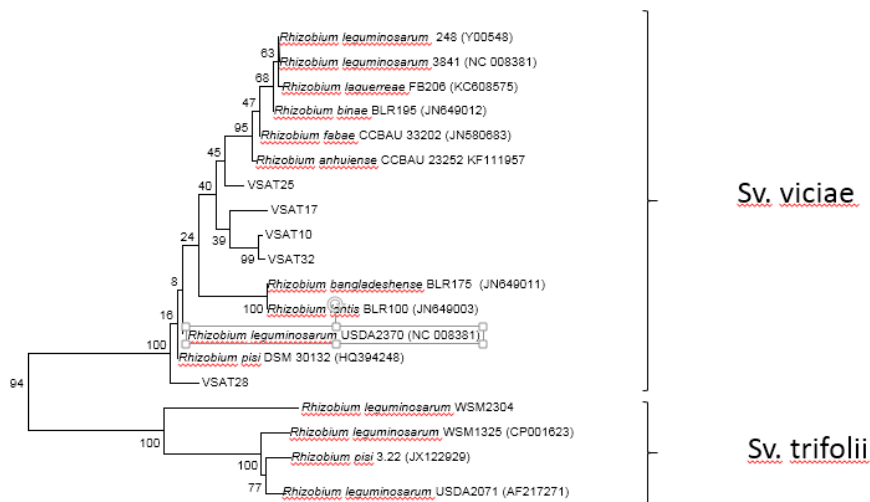


Figura 4 Árbol filogenético mostrando la posición filogenética de los aislados con respecto otras especies tipo del género *Rhizobium* de los simbiotes *viciae* y *trifolii* de acuerdo a la secuenciación del gen *nodC*.

#### **OBJETIVO 4.**

Analizar la efectividad de la simbiosis de cepas de diferentes grupos filogenéticos con *Vicia sativa*.

#### Metodología

Los ensayos de efectividad simbiótica se llevaron a cabo en cámara iluminada con condiciones de humedad y temperatura controladas. Se llevaron a cabo 8 tratamientos diferentes, 5 correspondientes a las 5 cepas seleccionadas en función de su perfil de RAPD, un control negativo de nodulación, un control positivo con nitrógeno y un control positivo de nodulación inoculado con la cepa tipo de *Rhizobium leguminosarum* simbiovar *viciae*. Se evaluaron 24 plantas por tratamiento y se mantuvieron durante 28 días regándose cada dos días con agua destilada o una solución nutritiva de manera alterna. En el caso del control positivo con nitrógeno, la solución nutritiva se suplementó con 0,04 g de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .

Una vez transcurrido este tiempo se procedió a limpiar la raíz, contar el número de nódulos y pesar la parte aérea tanto en fresco como en seco.

#### Resultados

Todos los aislado empleados fueron capaces de producir, al menos, un incremento del 75% en el peso fresco en las plantas de veza, sin embargo, los aislados VSAT25, VSAT28 y VSAT32 presentaban un incremento mayor que el resto de los aislados. En el caso de los dos primeros este incremento era de una 92% y en el caso de la cepa VSAT32 este incremento llegaba al 97% (Figura 5). En cuanto al número de nódulos por planta no se observaron diferencias entre los aislados por lo que se decidió seleccionar estos tres aislados que mostraban un mayor incremento en la producción de biomasa aérea.

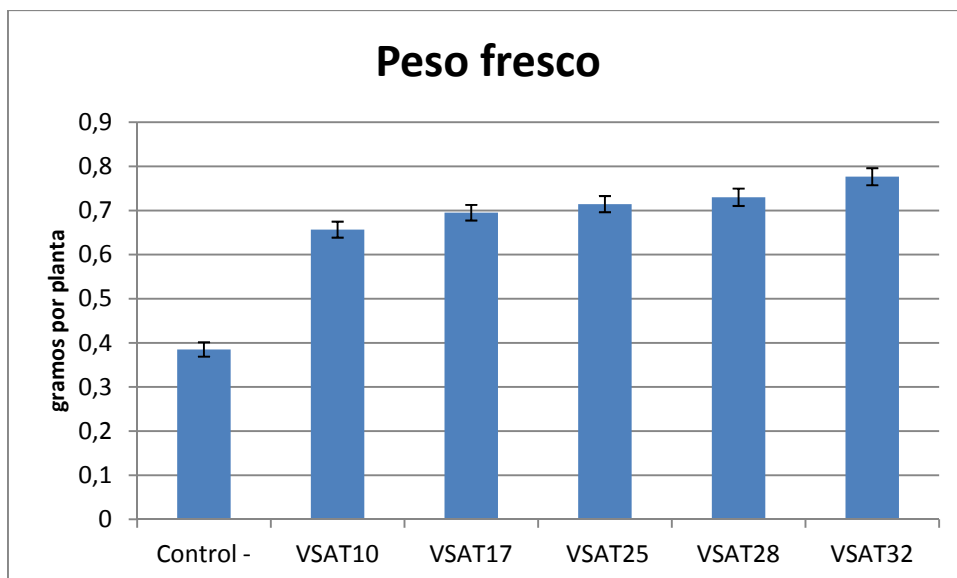


Figura 5. Grafico donde se muestran los valores medio de producción de biomasa aérea obtenidos en el ensayo en cámara iluminada.

## OBJETIVO 5.

Analizar la competitividad de las cepas más efectivas en condiciones de microcosmos.

### Metodología

Con el fin de estudiar la colonización radicular por parte de la cepa seleccionada denominada VSAT32 se utilizó el marcador celular Syto13 ® (Thermofisher) para localizar las células bacterianas en la superficie radicular de veza. Se realizó una suspensión de la cepa seleccionada a una  $DO=2$  equivalente a  $10^6$  unidad formadoras de colonia por mililitro. La inoculación de las diferentes cepas se realizó en placas Petri con medio Agar-agua y papel de filtro previamente esterilizado sobre las que se colocaban las semillas. La esterilización de las semillas de veza se llevó a cabo sumergiéndolas en etanol al 70% (w/v) durante 30 segundos, tras lo que se las sumergió en una solución de  $NaClO_7$  (35 g de cloro activo por litro) durante 5 minutos y posteriormente se realizaron aclarados con agua estéril con el fin de eliminar los restos de  $NaClO_7$ . Todo el proceso se realizó manteniendo las condiciones asépticas.

Las bacterias unidas a la raíz se observaron mediante microscopía óptica de fluorescencia con un microscopio Nikon Eclipse 80i aplicando una longitud de onda de 480 nm mediante el laser de argón y un filtro de emisión de banda ancha centrado en un 500 nm.



Se procedió a realizar el corte histológico de los nódulos y la tinción de estructuras vitales utilizando azul de toluidina.

## Resultados

Todos los aislados seleccionados mostraban una colonización intensa de la superficie radicular, creando tapices bacterianos más o menos extensos con una densidad moderada. A partir de los 7 días de la inoculación se empezaron a observar los denominados “callados de pastor”, o puntos de infección en los pelos radicales por lo que se inicia la colonización bacteriana de los células de la raíz. A partir de los 15 días de infección se empezaron a observar los nódulos sobre la raíz, que a los 21 días se procedió a realizar cortes histológicos de los mismos para estudiar en profundidad si el desarrollo de los mismos era correcto (Figura 6). Esto nódulos presentaban un color rosado indicativo de la producción de leghemoglobina, una proteína sintetizada por la planta para crear las condiciones idóneas para llevarse a cabo la fijación biológica de nitrógeno (Figura 7).

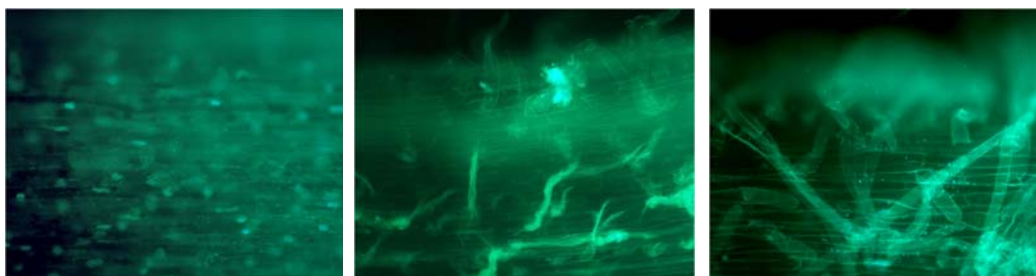


Figura 6. Imagen donde se muestran fotografías de microscopía óptica de fluorescencia de la superficie radicular, del proceso de infección y de la colonización tardía de la superficie (de izq. a derecha).

Como se observa en las imágenes, los nódulos presentan una estructura de nódulo indeterminado con diferentes zonas de diferenciación celular y con una alta ocupación bacteriana como indica el color azul predominante en la mayoría de los nódulos (Figura 8).



Figura 7. Imagen donde se muestran fotografías de nódulos producidos por las diferentes cepas inoculadas.

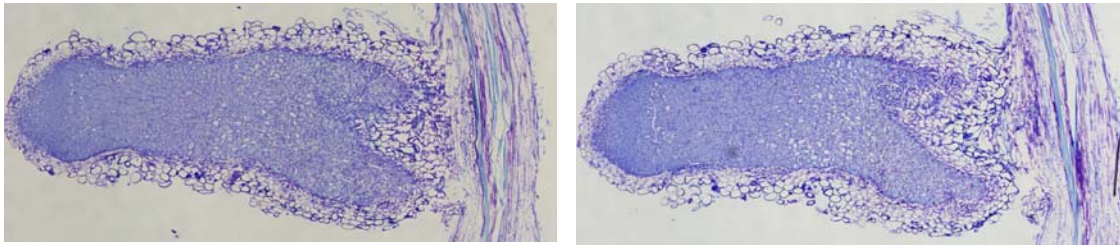


Figura 8. Imagen donde se muestran fotografías de cortes histológicos de nódulos de veza teñidos con azul de toluidina. El color azul intenso indica una alta ocupación endosimbótica.

## OBJETIVO 6.

Analizar la capacidad de colonización de las cepas más efectivas en las raíces de trigo.

Metodología.

Con el fin de estudiar la colonización radicular por parte de las cepas seleccionadas se utilizó el marcador celular Syto13<sup>®</sup> (Thermofisher) para localizar las células bacterianas en la superficie radicular de trigo. Se realizó una suspensión de la cepa seleccionada a una DO=2 equivalente a  $10^6$  unidad formadoras de colonia por mililitro. La inoculación de las diferentes cepas se realizó en placas Petri con medio Agar-agua y papel de filtro previamente esterilizado sobre las que se colocaban las semillas. La esterilización de las semillas de veza y trigo se llevó a cabo sumergiéndolas en etanol al 70% (w/v) durante 30 segundos, tras lo que se las sumergió en una solución de NaClO<sub>7</sub> (35 g de cloro activo por litro) durante 5 minutos y posteriormente se realizaron aclarados con agua estéril

con el fin de eliminar los restos de  $\text{NaClO}_7$ . Todo el proceso se realizó manteniendo las condiciones asépticas.

Las bacterias unidas a la raíz se observaron mediante microscopía óptica de fluorescencia con un microscopio Nikon Eclipse 80i aplicando una longitud de onda de 480 nm mediante el laser de argón y un filtro de emisión de banda ancha centrado en un 500 nm.

## Resultados.

Las fotografías tomadas secuencialmente mostraban que durante las primeras etapas de colonización, 0 a 5 días, ésta ocurría de forma escasa y difusa. Este comportamiento era similar en los tres aislados seleccionados. Sin embargo a partir del séptimo día la colonización se volvía más intensa y empezando a verse capas más o menos extensas de bacterias que cubrían la superficie radicular. Así, esta colonización fue derivando de manera paulatina hasta una colonización dirigida a los espacios intercelulares, siguiendo las intersecciones celulares de las células de la epidermis radicular (Figura 9).

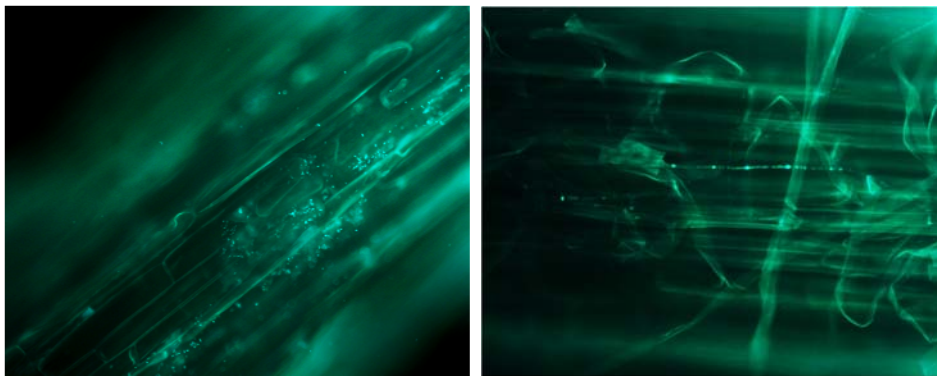


Figura 9. Imagen donde se muestran fotografías de microscopía óptica de fluorescencia de la superficie radicular y de las etapas tardías de colonización.

## **OBJETIVO 7.**

Diseño de un biofertilizante en base a *Rhizobium* y evaluación de su eficacia en campo.

### Metodología

Para abordar el presente objetivo se hizo uso de los invernaderos experimentales del Campus Científico de la Universidad de Salamanca en el Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE). El experimento se diseñó utilizando macetas de 4,5 litros de volumen empleando suelo agrícola de las zonas de producción en Aldeatejada mezcladas con perlita estéril en proporción 3:1 para evitar la compactación durante el experimento y mejorar la aireación. Se colocaron 6 macetas por tratamiento y cultivo, colocándose 3 plantas de veza y 5 de trigo en cada caso. En ambos casos, el experimento se mantuvo durante 6 semanas, procediéndose a su recolección y a la medición de parámetros de producción.

En el caso de las macetas sembradas con veza se realizó un ensayo de aproximación de rotación, dejando las raíces dentro de la tierra durante 2 semanas, procediéndose a remover la tierra y volver a colocar en las macetas para su posterior cultivo con trigo. En este caso, cada tratamiento contaba con 6 macetas, tres de las cuales eran inoculadas y las otras tres se mantenían sin inocular.

Tras la selección y estudio de la capacidad colonizadora de la cepa VSAT32 se procedió a realizar su aplicación en campo en microparcels experimentales como primera aproximación. Este experimento contó con tres tratamientos diferentes, control negativo sin fertilizar y sin inocular, control positivo fertilizado y sin abonar y tratamiento inoculado sin fertilizar. Se demarcaron 9 parcelas, tres por tratamiento, de 2 por 3 metros separadas entre ellas por un pasillo de 1,5 metros para evitar interferencias entre los distintos tratamientos. La siembra se realizó siguiendo los parámetros usuales en la siembra de trigo y veza.

Para realizar la inoculación, se realizó una suspensión de la cepa VSAT32 a una densidad óptica DO: 0.5 equivalente a  $10^5$  UFC/ml, inoculando cada parcela con 3 litros de esta suspensión. Dicha inoculación se realizó 5 días después de la emergencia de la raíz, para facilitar la colonización de la raíz del cultivo por parte del inoculante.

Los cultivos se recogieron cuando fue oportuno, cuando el 10% de las plantas se encontraba en floración en el caso de la veza, o cuando se había completado el desarrollo de los granos en el caso del trigo.

El material vegetal resultante de estos experimentos fue analizado en el Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC) para conocer su composición elemental.

## Resultados

En la primera etapa se procedió a realizar la evaluación de los tres aislados seleccionados para competir en condiciones de microcosmos. En el primero de los casos, esta capacidad se evaluó en veza evaluándose la capacidad para incrementar la biomasa de la parte aérea de las plantas y el número de nódulos como indicativo de la capacidad de competición de los aislados. De esta manera se observó que la cepa VSAT32 fue capaz de incrementar tanto la biomasa de la parte aérea (Figura 10) como el número de nódulos producidos (Figura 11). Este hecho es significativo tenemos una bacteria capaz de colonizar de manera activa las raíces de veza, competir de forma eficiente y provocar un efecto positivo sobre el desarrollo de la planta.

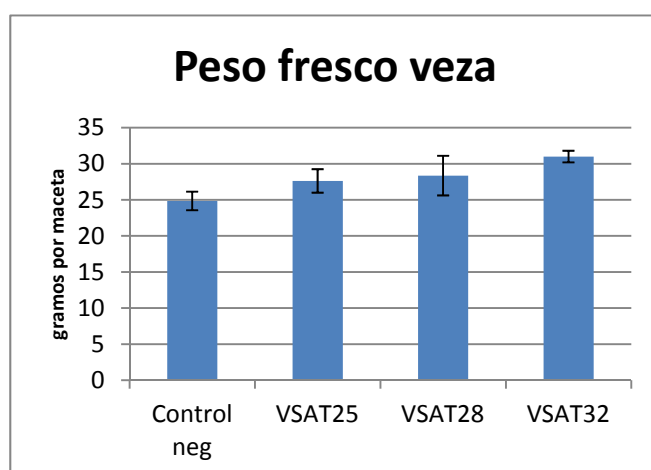


Figura 10. Producción de biomasa aérea de veza en condiciones de microcosmos.

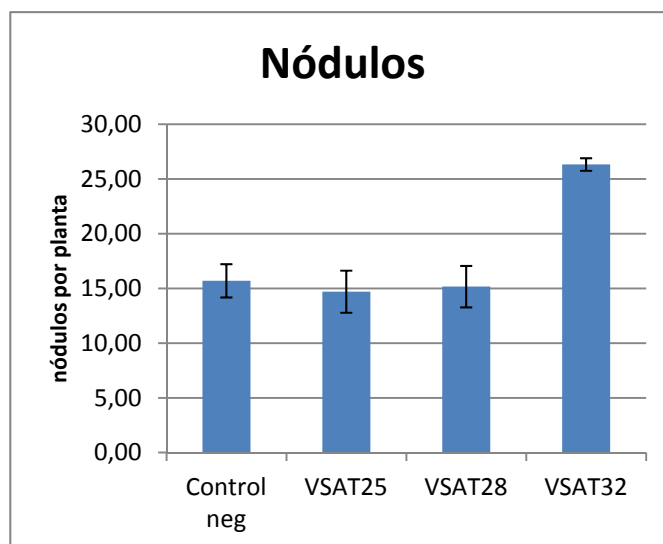


Figura 11. Número medio de nódulos por planta de veza en condiciones de microcosmos.

En el caso del trigo, se evaluó la capacidad para promover el desarrollo vegetal en dos etapas diferentes. La primera de las etapas es la que podemos definir como inoculación simple, en la que el efecto se mostraba mucho más discreto que en la veza, siendo la cepa VSAT32 la única que producía un incremento apreciable en la producción de biomasa aérea en esta planta (Figura 12). La segunda de las etapas en las que se realizó la evaluación del trigo tiene como objeto de estudio la rotación que por cuestiones temporales nos ha sido imposible abordar en este tiempo. De esta manera, aprovechando las macetas donde se había plantado veza se procedió a mover la tierra y dejarla durante 2 semanas, tras este periodo se procedió a realizar el sembrado de trigo, simulando una rotación de los cultivos. Así se observó que la mayor producción aparecía en aquellas macetas donde se había inoculado VSAT32 sobre las plantas de veza y se había reinoculado esta misma cepa sobre el trigo. Las plantas de trigo sembradas sobre macetas donde se había inoculado la cepa VSAT32 mostraban un ahijado mayor tanto si habían sido reinoculadas como sino.

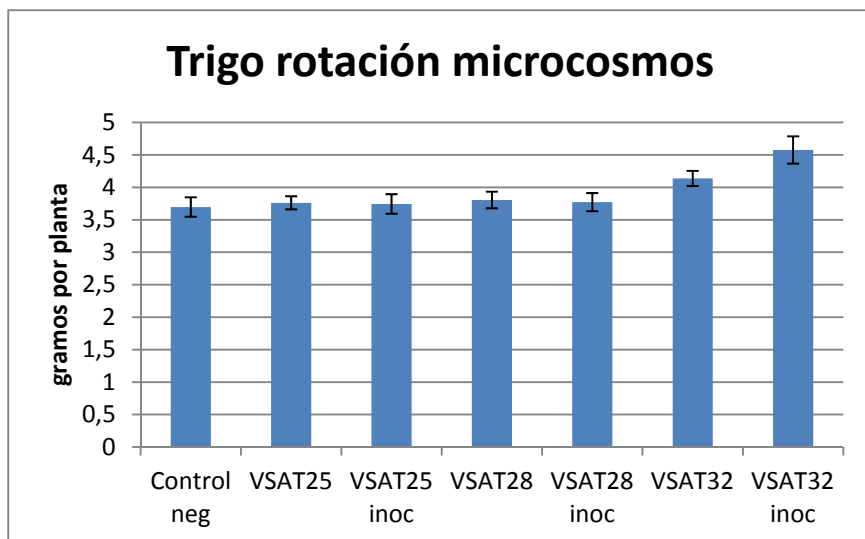


Figura 12. Peso fresco de la biomasa aérea del trigo en la primera inoculación.

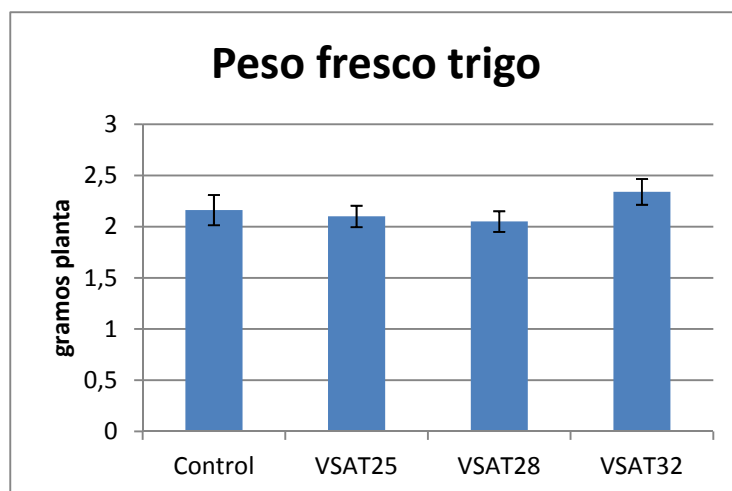


Figura 13. Producción media de biomasa aérea de trigo durante la segunda etapa de siembra de trigo con reinoculación y sin ella.

Por lo tanto se decidió seleccionar la cepa VSAT32 para ser inoculada en la realización de los ensayos de campo sobre ambas plantas. En el caso de las plantas de veza se observó que la producción de biomasa aérea era muy superior con respecto del Control negativo sin fertilización, aunque también encontrábamos un incremento considerable con respecto al Control positivo (Figura 14). Estos incrementos fueron del 120% y del 60% respectivamente que junto a un incremento en la concentración de nitrógeno por gramo de planta ponen de manifiesto la efectividad de la cepa VSAT32 en la mejora de la producción de esta leguminosa forrajera.

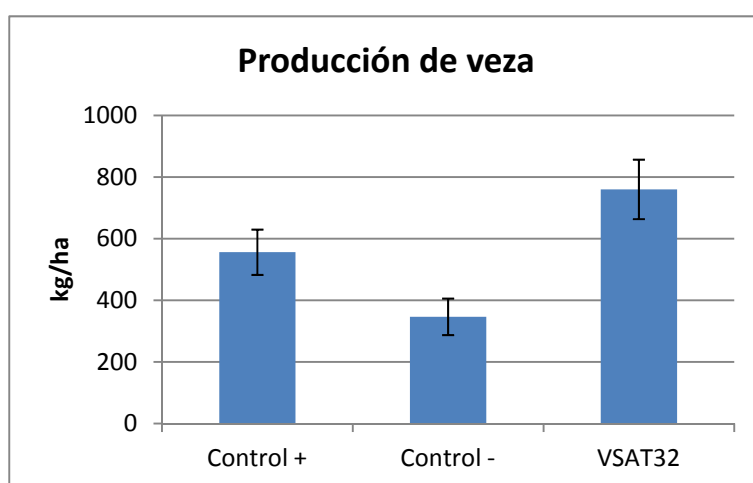


Figura 14. Peso medio de la producción obtenida en campo en el ensayo acometido con veza.

En el caso del trigo los resultados también fueron positivos observando un incremento en la producción de grano en las parcelas inoculadas con la cepa VSAT32 del 22% frente al no fertilizado y un 16% frente al fertilizado siendo estos resultados sumamente destacables (Figura 15). En el caso de la producción de paja encontrábamos un comportamiento similar con incrementos del tratamiento inoculado con VSAT32 de un 21.5% y un 17.8% respectivamente (Figura 16).



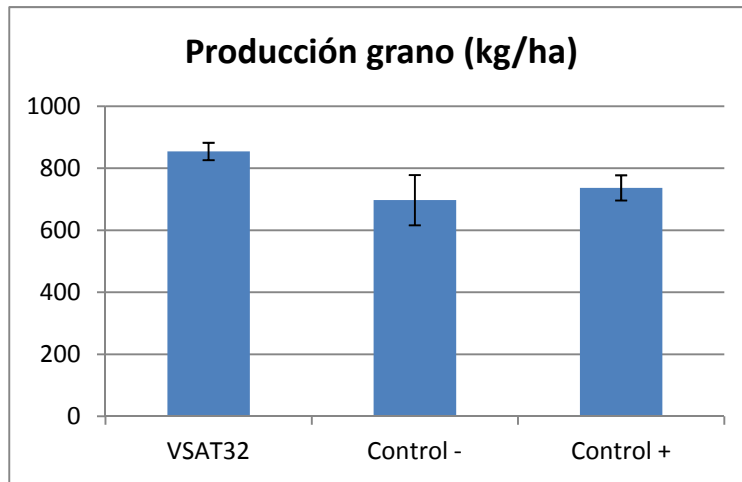


Figura 15. Producción media de grano de trigo obtenida en el ensayo de campo.

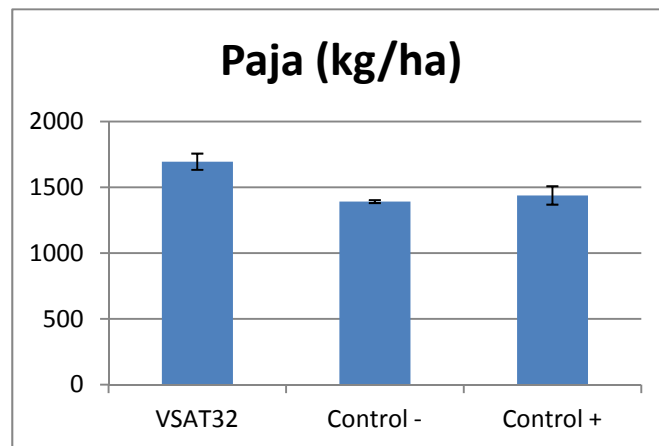


Figura 16. Peso medio de paja de trigo producido en el ensayo de campo.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la utilización de VSAT32 es una estrategia posible capaz de aportar buenos resultados en los sistemas agrarios de rotación cereal-leguminosa con el fin de implementar nuevas técnicas más respetuosas con el medio ambiente que permitan cumplir con los requisitos marcados en la Política Agraria Comunitaria, haciendo de estos sistema agrícolas más competitivos.