

08. SIMBIOSIS LEGUMINOSA-RIZOBIO

Beneficiosa para las plantas, para las bacterias y para nosotros

CIUDAD
CIENCIA

OBJETIVO

Comprender la importancia del nitrógeno en la nutrición vegetal y comprobar que hay una alternativa a la fertilización nitrogenada de los cultivos, que es barata y respetuosa con el medio ambiente.

INSTITUTO DE CIENCIAS
AGRARIAS – (CSIC)

MATERIALES

- 30 botes de 1 litro
- Un saco de vermiculita
- 60 semillas de altramuz
- 20 viales conteniendo 1 ml de suspensión de rizobios
- 2 litros de solución nutritiva concentrada (x4) para altramuz sin N (SNA-N)
- 1 litro de solución nutritiva concentrada (x4) para altramuz con KNO_3 2,5 mM (SNA+N)
- Una probeta de 50 ml
- Una probeta de 1.000 ml

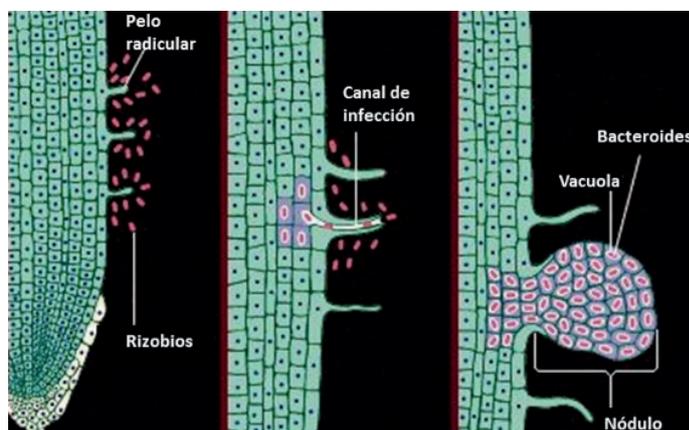
– 01

INTRODUCCIÓN

Las plantas, además de luz y agua, necesitan nutrientes para crecer y desarrollarse. El aire es una fuente inagotable de carbono (en forma de CO_2) y oxígeno. Sin embargo, aunque nuestra atmósfera contiene casi un 80% de nitrógeno, las plantas no pueden utilizarlo directamente. Por ello, deben tomarlo del suelo junto con otros elementos como el hierro, el potasio, el calcio, etc. El nitrógeno, lamentablemente, es tan abundante en el aire como escaso en la mayor parte de los suelos. Por eso, cuando se quieren cultivar plantas intensivamente lo más frecuente es recurrir a la fertilización nitrogenada. El problema es que un porcentaje alto del nitrógeno que contienen los abonos termina contaminando las aguas superficiales y subterráneas, y afectando a la salud de los animales y las personas.

VOCABULARIO

- **Simbiosis:** Asociación de organismos de especies diferentes para beneficiarse mutuamente.
- **Anaeróbico:** Sin oxígeno.
- **Zona infectada:** Zona interna del nódulo donde se encuentran los bacteroides.



Infección y formación de nódulos de leguminosas.

Pero hay una alternativa. En todos los suelos del mundo existen bacterias llamadas rizobios que son capaces de transformar el nitrógeno del aire en nitrógeno combinado cuando establecen simbiosis con las leguminosas. En la simbiosis leguminosa-rizobio, la planta obtiene una fuente inagotable de nitrógeno, mientras que las bacterias se benefician obteniendo azúcares y otros metabolitos necesarios para su vida. Tener una fuente continua de nitrógeno combinado permite a las leguminosas desarrollarse con normalidad en suelos muy pobres, lo que les da una ventaja muy grande sobre otros grupos de plantas.

La simbiosis leguminosa-rizobio tiene lugar cuando las bacterias entran a través de los pelos radiculares 'infectando' la raíz. Las plantas identifican a los rizobios y forman un órgano nuevo en sus raíces: el nódulo. Dentro de los nódulos, los rizobios se transforman en bac-



GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE CIENCIA
E INNOVACIÓN



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



Infección y formación de nódulos de leguminosas.

teroides, un estadio que en el ambiente anaeróbico de la zona infectada es capaz de transformar el nitrógeno molecular del aire en amonio y suministrarlo a la planta.

- 02

PROCEDIMIENTO

RECOGIDA DE LOS EJEMPLARES

En primer lugar hay que lavar la vermiculita. Para ello, se llenará 2/3 de un recipiente lo más grande posible con vermiculita y se añadirá agua hasta arriba. Se removerá y luego se dejará una hora en reposo, transcurrida la cual se recogerá la vermiculita que flota en la superficie y se desechará la que quede en el fondo. Este proceso se repetirá tantas veces como sea necesario para llenar los 30 botes que se utilizarán para el experimento.

Antes de sembrar las semillas hay que esterilizar su superficie. Para ello se sumergen durante cinco minutos en lejía (sin detergente) diluida al 10% (10 ml de lejía mezclados con 90 ml de agua).

Después se realizan cuatro lavados de dos minutos con agua agitando suavemente y un lavado de 60 minutos sin agitar. Transcurrido ese tiempo, se verá cómo las semillas se han hinchado y están listas para sembrarse.

Una vez preparados los 30 botes, se regarán con agua y posteriormente se sembrarán dos semillas (a 2 cm de profundidad y separadas por unos 5 cm) en cada bote. Una vez hecho eso, los botes se separarán en tres bandejas formando tres grupos de diez que se etiquetarán de la siguiente manera:

→ **PRIMERA BANDEJA:** se etiquetará '-N' (plantas a las que ni se inoculará ni se suministrará una fuente de nitrógeno). Los botes se numerarán del 1 al 10. Las semillas se cubrirán con vermiculita, sin inocular.

→ **SEGUNDA BANDEJA:** se etiquetará '+N' (plantas a las que se suministrará una fuente de nitrógeno). Los botes se numerarán del 11 al 20. Las semillas se cubrirán con vermiculita, sin inocular.



Nutrición nitrogenada vegetal: fertilizante vs. inoculante.

→ **TERCERA BANDEJA:** se etiquetará 'P.I.' (plantas inoculadas, con rizobios). Los botes se numerarán del 21 al 30. En esta bandeja, cada semilla se rociará (se inoculará) con un vial de rizobios y se cubrirá con vermiculita.

A lo largo del experimento, los botes se regarán con la solución correspondiente cada dos días (lunes, miércoles y viernes) sobre las 10:00 horas.

El protocolo de riego será el siguiente:

→ **1ª semana:** agua (25 ml/bote). Todos los botes igual.

→ **2ª semana:** solución nutritiva para altramuz diluida a ¼ (25 ml/bote). Para regar los botes de las bandejas '-N' y 'P.I.' se mezclarán 100 ml de SNA-N (x4) y 1500 ml de H₂O. Para la bandeja '+N' se mezclarán 50 ml de SNA+N (x4) y 750 ml de H₂O.

→ **3ª a 6ª semanas:** solución nutritiva para lupino diluida a ½ (50 ml/bote). Para regar los botes de las bandejas '-N' y 'P.I.' se mezclarán 400 ml de SNA-N (x4) y 2.800 ml de H₂O. Para la bandeja '+N' se mezclarán 200 ml de SNA+N (x4) y 1.400 ml de H₂O.

A las dos semanas (cuando las plantas tengan aproximadamente 8-10 cm de altura) cortamos cuidadosamente los cotiledones.



Cómo cortar los cotiledones.

Algunas puntualizaciones:

→ Lo ideal sería que el agua que se utiliza para regar las plantas sea destilada. Si no se dispone de ésta, se podrá utilizar agua corriente aunque teniendo la precaución de dejarla unas horas en algún recipiente que permita la evaporación del cloro, ya que éste mata los rizobios.

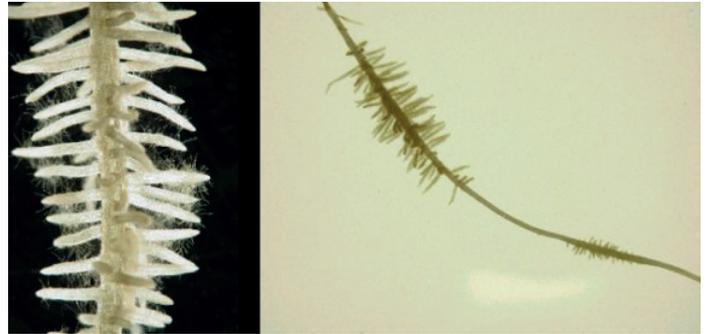
→ El objetivo del experimento es que haya una planta por bote, por lo que al final de la primera semana debe eliminarse una planta de cada bote sacándola cuidadosamente para extraer la raíz lo más entera posible. En los botes dónde sólo se haya desarrollado una planta, retirar la semilla que no haya germinado.

→ En cada vial de rizobios hay más de 100 millones de bacterias. Es sumamente fácil que alguna(s) de éstas llegue(n) a los botes de las bandejas '-N' y '+N' lo cual desvirtuaría el experimento puesto que queremos que esas plantas nos sirvan de control para ver qué les ocurre cuando carecen de fuente de nitrógeno. Hay que evitar salpicaduras al inocular o al regar. Igualmente, hay que evitar manejar los botes de la bandeja '-N' después de tocar los de la bandeja 'P.I.'.

– 03

RESULTADOS

A las seis semanas se observan las diferencias entre las plantas de las tres bandejas. Se hacen fotos y se toman notas de las características que presentan (por ejemplo, la altura de las plantas, el color de las hojas, la presencia o no de flores, etc). Posteriormente, se extraen cui-



Raíces proteoides

dadosamente las plantas de los botes (volcándolos para facilitar la separación de la vermiculita de las raíces). Se lavan las raíces suavemente con agua para eliminar el máximo de vermiculita, se secan cuidadosamente con papel de cocina y se comparan las de los 3 grupos. De nuevo se pueden tomar fotos de las plantas completas (sobre un papel blanco) y tomar nota de las características de las raíces (tamaño, color, presencia de nódulos u otras formaciones anómalas). Dos parámetros de interés que se pueden analizar son los pesos de la parte aérea y la raíz por separado. Para ello, se cortan las plantas separando ambas partes por la base del tallo. También es interesante contar el número de nódulos de cada planta y pesarlos.

Nuestro experimento durará 6 semanas, pero si se dispone de más tiempo y se quiere ver el efecto de la presencia-ausencia de una fuente de nitrógeno sobre la floración y la formación de frutos (vainas), se pueden reservar 2-3 plantas de cada bandeja y continuar regándolas 2 ó 3 semanas más con las soluciones nutritivas que hayan sobrado o simplemente con agua.

No olvidéis subir al blog de Ciudad Ciencia las tablas autorrellenables que acompañan esta ficha.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

1	¿Hay diferencias a simple vista entre los distintos grupos de plantas?
2	¿Hay diferencias entre los distintos grupos cuando se miden parámetros cuantitativos como la altura o el peso de la parte aérea o de la raíz?
3	¿Tienen nódulos las plantas de la bandeja etiquetada "P.I."? (es decir, las plantas que se inocularon con rizobios) ¿Y las de las bandejas "-N" y "+N"?
4	Tomar varios nódulos y cortarlos por la mitad cuidadosamente con una cuchilla. ¿De qué color es su interior, es decir, su zona infectada? Investigar a qué se debe ese color tan característico.
5	¿Presenta alguna de las plantas raíces proteoides? Las raíces proteoides son pequeñas raíces laterales muy juntas que forman una estructura parecida a una pequeña pluma. Investigar qué son y cuándo aparecen.
6	¿Cómo se explican los resultados del experimento en referencia a la necesidad de las plantas de disponer de una fuente de nitrógeno para desarrollarse con normalidad?