

LA SIMBIOSIS LEGUMINOSA-RIZOBIO: CARACTERÍSTICAS GENERALES E IMPORTANCIA PRODUCTIVA

C.J. Bécquer

Estación Experimental de Pastos y Forrajes Sancti-Spiritus
Apdo. 2228, ZP 1, Sancti-Spiritus, Cuba
Email: becquer@pastos.yavabo.inf.cu

Aspectos generales de la simbiosis leguminosa-rizobio

La simbiosis leguminosa-rizobio es la relación recíproca entre las plantas y la bacteria. La bacteria invade las raíces (o en casos raros, los tallos) e induce la formación de un nódulo, en el cual ésta reduce el nitrógeno atmosférico en amonio y provee a la planta de compuestos nitrogenados a cambio de compuestos carbonatados y otros nutrientes. La planta gana en habilidad para crecer en suelos pobres en nitrógeno y la bacteria obtiene una cubierta protectora en la que se multiplica, y de la cual escapa en un gran número al ocurrir la senescencia del nódulo.

La simbiosis fue reconocida por primera vez hace más de 100 años, y su importancia agrícola ha sido asegurada a través de las investigaciones científicas realizadas en el mundo. Una característica inusual de estas investigaciones ha sido la relacionada con la diversidad taxonómica de las plantas y sus simbiontes. Los esfuerzos encaminados en este aspecto, lejos de ser una pérdida de tiempo, han proporcionado una información comparativa que permite distinguir los casos específicos de los generales (Young y Johnston, 1989).

Existen otras formas de fijación biológica del N_2 atmosférico, pero la combinación de las leguminosas y los rizobios resulta la más significativa en términos de la fijación global de nitrógeno y es, hasta el momento, la más comprendida.

El género *Rhizobium* ha dejado de ser único para las bacterias que fijan dinitrógeno atmosférico en las leguminosas. A partir de las investigaciones realizadas sobre la base de la taxonomía numérica y las técnicas de biología

molecular, ha surgido una nueva nomenclatura que comprende hasta el momento representantes de los géneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Allorhizobium* (Young y Haukka, 1996; de Lajudie, Laurent-Fulele, Willems, Torck, Coopman, Collins, Kersters, Dreyfus y Gillis, 1998a; de Lajudie, Willems, Nick, Moreira, Molouba, Hoste, Torck, Neyra, Collins, Lindstrom, Dreyfus y Gillis, 1998b). Estos géneros representan las bacterias que provocan la nodulación radicular de un enorme rango de leguminosas diseminadas a través de las más variadas zonas geográficas y climáticas del mundo.

Las leguminosas son muy diversas en su morfología, hábitat y ecología, desde las plantas anuales del ártico, hasta los árboles tropicales. Sin embargo, la gran mayoría de ellas son infectadas por los rizobios (Young y Johnston, 1989). Con aproximadamente 700 géneros y 18 000 especies, la familia *Leguminosae* es la tercera familia más grande de las plantas con flores. *Leguminosae* se divide en tres subfamilias: *Caesalpinioideae*, *Mimosoideae* y *Papilionoideae*. Existen cerca de 152 géneros y 2 800 especies en *Caesalpinioideae*, cerca de la misma cantidad en *Mimosoideae* y 480 géneros con 12 000 especies en *Papilionoideae* (Somasegaran y Hoben, 1994). Según Polhill y Vidal (1981), *Caesalpinioideae* fue la subfamilia que sirvió de base para la evolución de las subfamilias *Mimosoideae* y *Papilionoideae*. Sin embargo, Sprent (1994) consideró incorrecta esta información, debido a algunas evidencias que se basaron, entre otros estudios, en la estructura de los nódulos.

El proceso de nodulación ha sido encontrado en más del 90 % de las plantas pertenecientes a las subfamilias *Mimosoideae*

y *Papilionoideae*, y en un 30 % de las *Caesalpinioideae* (Vincent, 1982). Por ejemplo, el género *Chamaecrista* de las *Caesalpinioideae* nodula bien; sin embargo, no se ha observado nodulación en los géneros *Delonix*, *Tamarindus*, *Peltophorum* y muchos otros. Naisbitt, James y Sprent (1992) afirmaron que las células infectadas en los nódulos de *Chamaecrista* muestran bacteroides retenidos dentro de los filamentos de infección durante el período de fijación del dinitrógeno, mientras que en otras especies los rizobios son liberados durante la diferenciación, lo que según Sprent (1994) pudiera ser el indicio de una evolución de los nódulos de forma prematura en el desarrollo de las leguminosas, o una evolución de una forma parasítica a una más simbiótica. Por otra parte, McKey (1994) aseguró que el déficit de nitrógeno en el suelo ejerció una marcada influencia en el desarrollo de esta familia.

Asociaciones leguminosa-rizobio

Los primeros estudios sobre la asociación leguminosa-rizobio estaban dirigidos principalmente hacia las especies pertenecientes a los géneros *Pisum*, *Vicia*, *Lens*, *Lathyrus*, *Trifolium* y *Medicago*, las cuales eran utilizadas frecuentemente en la agricultura europea y norteamericana. Esos mismos estudios incipientes demostraron que las cepas aisladas de un género de leguminosas no necesariamente formaban nódulos en las de otro género y se llegó a la conclusión que las leguminosas estudiadas formaban grupos según la habilidad de sus respectivas cepas de rizobios para infectarlas (Vincent, 1982). En aquella época se denominó al rizobio de acuerdo con una de las plantas hospederas del grupo que éste infectaba (tabla 1).

Tabla 1. Grupos de inoculación cruzada (tomado de Vincent, 1982).

Grupo	Géneros representativos	Especies de <i>Rhizobium</i>
Trébol	<i>Trifolium</i>	<i>R. trifolii</i>
Vicia	<i>Pisum</i> , <i>Lathyrus</i> , <i>Lens</i> , <i>Vicia</i>	<i>R. leguminosarum</i>
Frijoles	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>R. phaseoli</i>
Alfalfa	<i>Medicago</i> , <i>Melilotus</i> , <i>Trigonella</i>	<i>R. meliloti</i>
Soya	<i>Glycine max</i>	<i>R. japonicum</i>
Lupin	<i>Lupinus</i> , <i>Ornithopus</i>	<i>R. lupine</i>
Caupí	Un gran número de géneros de tres subfamilias de <i>Leguminosae</i>	<i>Rhizobium</i> spp.
Otros	Pequeños grupos de uno o más géneros o especies los cuales son "específicos" en el requerimiento de rizobios. Ej: <i>Lotus</i> , <i>Sesbania</i> , <i>Mimosa</i> , <i>Leucaena</i> , <i>Cicer</i> , <i>Coronilla</i> , <i>Onobrychis</i> , etc.	<i>Rhizobium</i> spp.

Estudios más avanzados demostraron que muchas leguminosas son hospederas de más de una especie o género del simbiote y las cepas de rizobios varían enormemente en su especificidad; las más promiscuas infectan leguminosas en diferentes tribus e incluso diferentes subfamilias, por lo que cualquier correspondencia entre la filogenia del hospedero y el simbiote es difícil de aclarar (Young y Johnston, 1989).

Según Somasegaran y Hoben (1994), un grupo de inoculación cruzada consiste en una colección de especies de leguminosas que desarrollan una nodulación efectiva cuando

son inoculadas con el rizobio obtenido de los nódulos de cualquier miembro de ese grupo. Algunas asociaciones leguminosa-rizobio son altamente específicas, mientras que otras son promiscuas. Por ejemplo, la asociación *Cicer arietinum*-rizobio es altamente específica. Por otra parte, Tang, Tamayo y Márquez (1982); Tang, Rodríguez y Avila (1994) y Tang (1996) han encontrado respuestas pobres en las asociaciones *Stylosanthes guianensis*-rizobio, *Leucaena leucocephala*-rizobio y *Aeschynomene histrix*-rizobio inoculadas con diferentes cepas comerciales y nativas de Cuba. Mpepereki, Woullum y Makones (1996), en

estudios realizados con rizobios nativos de Zimbabwe, encontraron que *Arachis hypogaea* y el cv. Carioca de *Phaseolus vulgaris* resultaron muy específicos en cuanto a las cepas inoculadas, pertenecientes a un amplio rango de especies.

En la tabla 2 se muestran los grupos de inoculación cruzada según conceptos más modernos, prevalecientes hasta principios de la década de los 90. Sprent (2001) publicó una nueva lista de géneros y especies con ejemplos de leguminosas en las cuales los rizobios forman nódulos efectivos (tabla 3).

Mecanismos fisiológico-bioquímicos de la fijación simbiótica del dinitrógeno

♦ El proceso de nodulación en las leguminosas

La infección de una leguminosa por los rizobios es una relación íntima, la cual

depende del reconocimiento mutuo específico para una fijación efectiva del dinitrógeno (Vincent, 1982).

De acuerdo con lo expresado por Kijne (1992), una infección exitosa no se inicia en la superficie de la raíz, sino que consiste en un proceso multidisciplinario que comienza en la rizosfera. En este proceso toman parte la activación de los genes de nodulación, la ocupación por la bacteria de los sitios más apropiados de la superficie radicular y la liberación del estímulo por el rizobio.

En los exudados que emiten las raíces de las leguminosas existe un rango determinado de aminoácidos, azúcares y ácidos carboxílicos, los cuales resultan atrayentes en la quimiotaxis que se forma entre la bacteria y las raíces, aunque aparentemente la quimiotaxis no es el mayor factor en la determinación de la especificidad en la planta hospedera (Gaworzewska y Carlile, 1982).

Tabla 2. Especies de rizobios en los géneros I y II, y los grupos de inoculación cruzada de leguminosas noduladas por esos rizobios (tomado de Somasegaran y Hoben, 1994).

Rizobios	Grupos de inoculación cruzada	Leguminosas de los grupos de inoculación cruzada
Género I: <i>Rhizobium</i>		
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i>	Vicia	<i>Pisum</i> spp., <i>Vicia</i> y <i>Lathyrus</i> spp., <i>Lens esculenta</i>
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	Trébol	<i>Trifolium</i> spp.
<i>R. meliloti</i>	Alfalfa	<i>Medicago</i> spp., <i>Melilotus</i> spp., <i>Trigonella foenumgraecum</i>
<i>R. loti</i>	Lotus	<i>Lotus corniculatus</i> y <i>L. tenuis</i> , <i>Lupinus densi-florus</i> , <i>Ornithopus sativus</i> , <i>Anthyllis vulneraria</i>
<i>R. galegae</i>	Soya	<i>Galega orientalis</i>
<i>R. fredii</i>		<i>Glycine max</i>
<i>Rhizobium</i> spp.		<i>Leucaena</i> spp., <i>Gliricidia sepium</i> , <i>Sesbania grandiflora</i> , <i>Calliandra callothyrsus</i> , <i>Pithecellobium dulce</i> , <i>Prosopis pallida</i> , <i>P. juliflora</i> , <i>Acacia senegal</i> , <i>A. farnesiana</i> , <i>Robonia pseudoacacia</i>
<i>Rhizobium</i> sp.		<i>Cicer arietinum</i>
Género II: <i>Bradyrhizobium</i>		
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Soya	<i>Glycine max</i>
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	Caupí	<i>Cajanus cajan</i> , <i>Arachis hypogaea</i> , <i>Acacia mearnsii</i> , <i>A. mangium</i> , <i>A. auriculiformis</i> , <i>Phaseolus lunatus</i> , <i>Psophocarpus tetragonolobus</i> , <i>Macroptilium atropurpureum</i> , <i>Cyamopsis tetrago-nolobus</i> , <i>Vigna</i> spp., <i>Desmodium</i> spp., <i>Stylosanthes</i> spp., <i>Lablab purpureus</i>

Tabla 3. Relación de géneros y especies de rizobios, así como de leguminosas en las cuales forman nódulos efectivos (tomado de Sprent, 2001).

Género	Especies y biovars	Ejemplos de leguminosas que forman nódulos
<i>Allorhizobium</i>	<i>undicola</i>	<i>Neptunia natans</i> (de Lajudie et al., 1998a)
<i>Azorhizobium</i>	<i>caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i> (en el tallo)
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>elkanii</i>	<i>Glycine max</i>
	<i>japonicum</i>	<i>Glycine max</i>
	<i>liaoningense</i>	<i>Glycine max</i>
	sp. (género del hospedero)	Muchas especies potenciales (Ej. <i>Lupinus</i>) están actualmente definidas por sus hospederos
<i>Mesorhizobium</i>	<i>amorphae</i>	<i>Amorpha fruticosa</i> (Wang et al., 1999a)
	<i>ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>
	<i>huakuii</i>	<i>Astragalus sinicus</i>
	<i>loti</i>	<i>Lotus corniculatus</i>
	<i>mediterraneum</i>	<i>Cicer arietinum</i>
	<i>plurifarum</i>	<i>Acacia senegal</i> (de Lajudie et al., 1998b)
	<i>tianshanense</i>	<i>Glycyrrhiza pallidiflora</i>
<i>Rhizobium</i>	<i>etli</i>	
	bv. <i>mimosae</i>	<i>Mimosa affinis</i> (Wang et al., 1999)
	bv. <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
	<i>gallicum</i>	
	bv. <i>gallicum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
	bv. <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
	<i>galegae</i>	
	bv. <i>officinalis</i>	<i>Galega officinalis</i>
	bv. <i>orientalis</i>	<i>Galega orientales</i>
	<i>giardinii</i>	
	bv. <i>giardinii</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
	bv. <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
	<i>haitanense</i>	<i>Desmodium sinuatum</i>
	<i>huautlense</i>	<i>Sesbania herbacea</i> (Wang et al., 1998)
	<i>leguminosarum</i>	
	bv. <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
	bv. <i>trifolii</i>	<i>Trifolium pratense</i>
	bv. <i>viciae</i>	<i>Pisum sativum</i>
	<i>mongolense</i>	<i>Medicago ruthenica</i>
	<i>tropicum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> . Esta es una especie compleja, con muchos tipos dentro de ella
<i>Sinorhizobium</i>	<i>arboris</i>	<i>Acacia senegal</i> (Nick et al., 1999)
	<i>fredii</i>	<i>Glycine max</i>
	<i>kostiense</i>	<i>Acacia senegal</i> (Nick et al., 1999)
	<i>medicae</i>	<i>Medicago truncatula</i>
	<i>meliloti</i>	<i>Medicago sativa</i>
	<i>saheli</i>	<i>Sesbania pachycarpa</i>
	<i>terangae</i>	
	bv. <i>acaciae</i>	<i>Acacia laeta</i>
	bv. <i>sesbaniae</i>	<i>Sesbania rostrata</i> (raíces)

Después de la formación de las raíces laterales, se ha observado un aumento de la población de rizobios en la rizosfera de *Pisum*, lo cual pudiera estar correlacionado con la liberación de cantidades significativas de homoserina de la raíz principal, en los lugares donde surgen las laterales (Van Egeraat, 1975a, 1975b). La homoserina es un aminoácido específico de este género de leguminosa y representa una fuente de carbono y de nitrógeno para algunas especies del género *Rhizobium* (Van Egeraat, 1975c).

Muchos genes en los rizobios que son responsables de la nodulación (genes *nod*) están localizados en los plasmidios de algunos géneros. Estos codifican para las funciones comunes y específicas en la nodulación de la planta hospedera y están organizados en al menos cuatro operones inducibles. La expresión de estos operones requiere de la presencia de un gen *nod* funcional, así como de los flavonoides exudados por la planta hospedera que ejercen una estimulación en los genes *nod*. Ejemplos de estos flavonoides lo constituyen: 4,4'-dihidroxi-2'-metaxichalcona (alfalfa); 7,4'-dihidroxi-2'-metaxichalcona (trébol), 7,4'-dihidroxi-4'-metanoxiflavona (vicia) y Daidzeína (soya) (Kijne, 1992). Sin embargo, Giller (2001) considera que esta estimulación no es del todo específica, ya que los exudados de algunas leguminosas no compatibles pueden activar los genes *nod* de la cepa de *Rhizobium* hasta cierto grado, y en algunos casos los exudados de plantas no leguminosas pueden causar esta estimulación. Al mismo tiempo, la presencia del rizobio en la rizosfera es el factor principal que incide claramente en la producción de moléculas inductoras de los genes *nod* por algunas leguminosas.

La proteína NodD es una proteína reguladora de transcripción derivada del gen *nodD* que interactúa con los exudados radiculares, entre ellos los flavonoides, lo cual contribuye a la especificidad del hospedero en esta primera fase (Geiger, Ritsema, van Russell, Tak y Wijffjes, 1994; Sprent, 2001). En una segunda fase la bacteria, después de activados los genes comunes *nodABC*, produce metabolitos (metabolitos o factor Nod), algunos de los cuales pueden actuar como señales en las plantas hospederas respectivas. En todos los casos estudiados estas señales son lipo-

oligosacáridos, los cuales son acompañados por grupos funcionales característicos para las especies de rizobios relacionados en su síntesis, que posteriormente inducen el proceso de nodulación en la planta (Denarié, Debelle y Rosenberg, 1992; Verma, 1992; Sprent, 2001).

En la planta hospedera el rizobio migra hacia el primordio nodular por un pasaje intracelular. Las células infectadas están localizadas en la zona radicular entre los pelos radiculares más pequeños emergentes y el extremo no piloso de la raíz (Kijne, 1992). Los pelos radiculares, ante la presencia de la bacteria, adoptan diferentes formas, como se ilustra en la figura 1. La unión del rizobio con la superficie radicular ocurre en dos fases: en la primera, las células bacterianas se adhieren por separado a la superficie del pelo radicular. En la segunda, otros rizobios se adhieren a la cadena de células, lo cual termina en una acumulación de rizobios en el sitio de unión (Smit, Logman, Boerrigter, Kijne y Lugtenberg, 1989). Diferentes moléculas están relacionadas con estas fases de unión. También Smit *et al.* (1989) descubrieron una proteína rizobiana de superficie, denominada rhicadesina, la cual probablemente esté relacionada con la unión del rizobio y la superficie radicular. Según el criterio de estos autores, esta proteína también es común para otras *Rhizobiaceae*, incluso para el *Agrobacterium*.

Después de la unión del rizobio con la superficie, el pelo radicular responde con un encorvamiento (Haack, 1964; Newcomb, Sipell y Peterson, 1979) (fig. 2). El rizobio atrapado en este encorvamiento puede ser ingerido por la célula radicular. Algunas células de la pared celular que han resultado degradadas sugieren la intervención de enzimas degradantes en el proceso de infección, como la pectinasa, las hemi-celulasas y las celulasas (Hubbell, Morales y Umali-García, 1978; Martínez-Molina, Morales y Hubbell, 1979). Otras sustancias, como las lectinas, probablemente estén involucradas en la iniciación y el desarrollo del sitio de infección. Según Brewin y Kardailsky (1997), las lectinas influyen en la morfogénesis celular vegetal y en el desarrollo del nódulo. Las lectinas están presentes en la superficie de las células epidérmicas en el momento de su diferenciación en trichoblastos (Mellor y Werner, 1990).

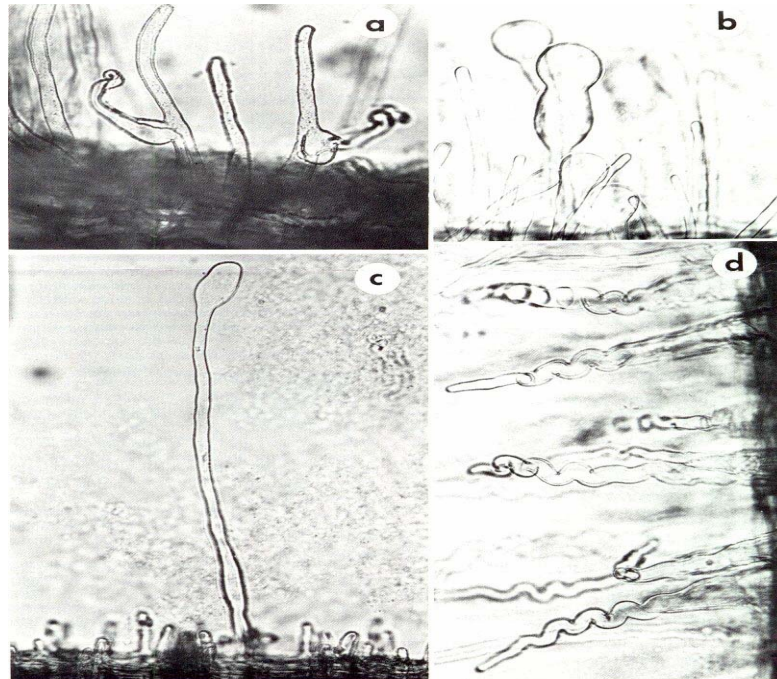


Fig. 1. Características típicas de la deformación de los pelos radicales ante la infección de los rizobios: a) Pelos radicales en su estado normal; b) Apariencia abultada de los pelos radicales ante la presencia de la bacteria viva; c) Apariencia elongada de los pelos radicales ante la presencia de la bacteria viva; d) Deformación helicoidal de los pelos radicales ante la presencia de la bacteria viva (adaptado de Ervin y Hubbell, 1985).

La llegada del rizobio al pelo radicular es seguida por la formación de una invaginación tubular creciente de la membrana plasmática hospedera, acompañada de una deposición de material de la pared celular en las regiones subapicales de la membrana invaginada. La estructura resultante es llamada filamento de infección y contiene el rizobio invasor; existen evidencias que sugieren que los polisacáridos extracelulares del rizobio están involucrados en la formación de este filamento (Kijne, 1992).

De acuerdo con lo observado por van Brussel, Bakhuizen, van Spremsen, Spaink, Tak, Lugtenberg y Kijne (1992), aún no se sabe hasta qué punto la presencia del rizobio en el filamento de infección influye en la polarización de las células y, por lo tanto, en el crecimiento del filamento. Es posible que las

moléculas extracelulares de la matriz del filamento contribuyan continuamente a las interacciones entre la bacteria y la membrana plasmática (Kijne, 1992). Según este autor, a la infección de la célula por los rizobios le sigue la migración del núcleo hacia el centro de la célula y la formación de estructuras cónicas radialmente orientadas, llamadas puentes cito-plasmáticos; el cruce del filamento e infección por la pared celular hospedera ocurre invariablemente opuesto al eje del puente citoplasmático, pasa el núcleo celular y eventualmente alcanza la pared periclínica de la célula.

Posteriormente, la bacteria se sitúa dentro de un compartimento celular rodeado de una membrana del hospedero: el simbiosoma (Roth, Jeon y Stacey, 1988; Brewin, 1998), el cual es producido por la planta hospedera por

un flujo de membrana de Golgi. Se ha demostrado que el microsimbionte tiene un papel decisivo en la formación, estabilidad, composición proteínica y densidad de las partículas de esta membrana (Werner, 1992). Algunas fuentes de peróxido, como NAPH oxidasa, diamina oxidasa u oxalato oxidasa, pueden encontrarse en el simbiosoma y la regulación de estas actividades puede ser muy importante en la simbiosis (Brewin, Rathbun y Wisniewski, 2000). Durante el desarrollo del

nódulo es altamente inducida la biosíntesis de la membrana y un flujo de proteínas, entre las que se encuentran las lectinas (Downie y Kondorosi, 1998).

Según Van Kammen (1995), cada una de las fases sucesivas de la formación del nódulo en las raíces es marcada por la expresión de genes de la planta, específicos en la nodulación, que codifican las proteínas llamadas nodulinas.

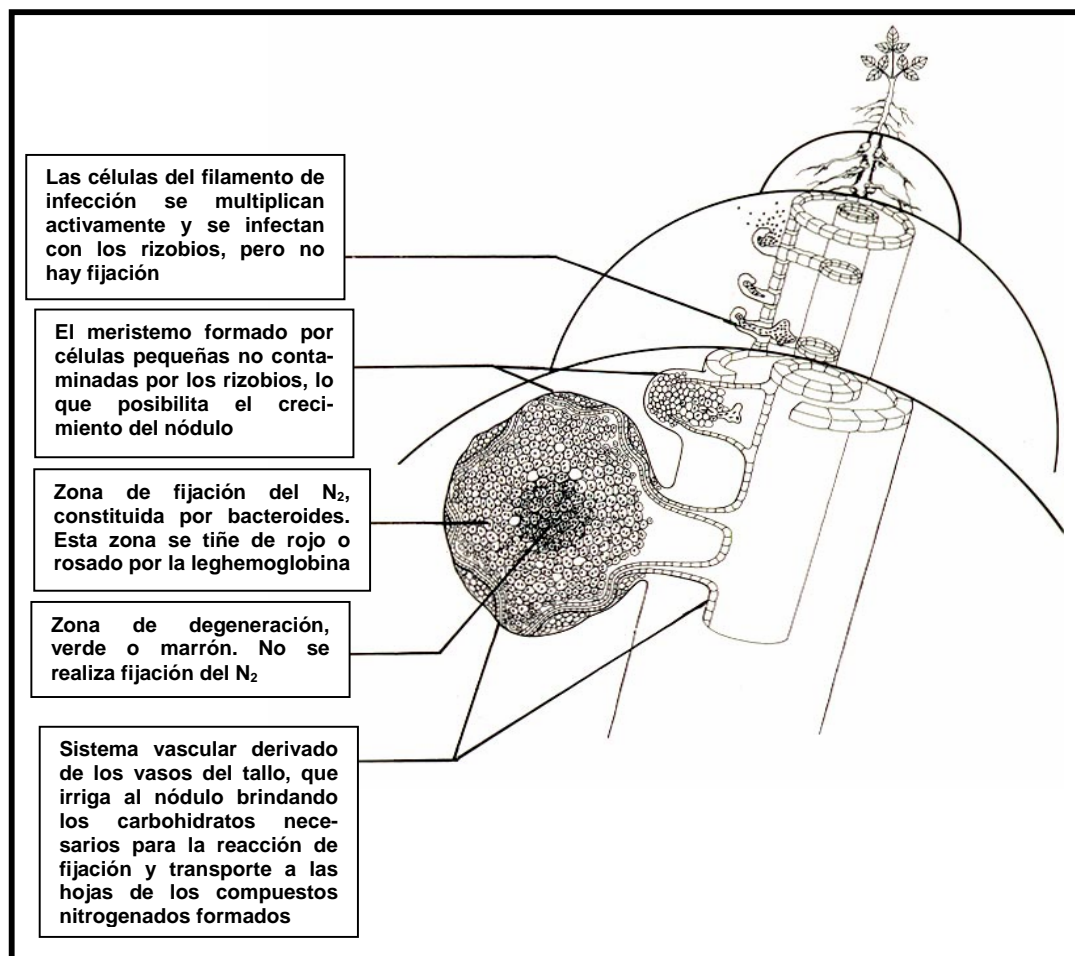


Fig. 2. Proceso general de infección y desarrollo nodular en una raíz de *Glycine max* (tomado de FAO, 1985).

En el simbiosoma los rizobios se dividen y cada uno adopta una forma pleiomórfica (los llamados bacteroides) y comienzan a reducir NH_2 en amonio en el nódulo completamente formado (Kijne, 1992).

De acuerdo con Boogerd y van Rossum (1997), existe otra vía de penetración del rizobio a la raíz, y es la que se realiza a través de dos células de la epidermis. Esto se ha comprobado en especies arbóreas como

Mimosa scabrella y nunca pudo ser observado el filamento de infección.

♦ **Reducción (fijación) del nitrógeno atmosférico en amonio por los rizobios en el nódulo**

En el nódulo, el meristemo nodular (zona I) puede ser diferenciado de la zona II de prefijación, donde ocurre la infección de las células corticales. En la interzona II-III el nitrógeno bacteriano es inducido y procede a través de la zona III de prefijación. En la zona de senescencia IV, los bacteroides son degradados por la planta (Van Kammen, 1995). De acuerdo con este autor, el gen que codifica la leghemoglobina comienza en la zona de infección II y alcanza su máxima actividad en la zona de fijación III (fig. 3).

La leghemoglobina es la proteína que le confiere el color rojo o rosado al nódulo, lo cual es indicio de una nodulación efectiva, y su estructura espectral es similar a la de la hemoglobina (Somasegaran y Hoben, 1994). Appleby (1962) informó que la leghemoglobina exhibía una gran afinidad por el O_2 y sugirió que esta proteína probablemente facilite la difusión del O_2 en el nódulo, lo cual

fue corroborado y calculado más tarde por este mismo autor (Appleby, 1984; 1985).

Por otra parte, Sánchez, Padilla, Pérez y Lara (1991) consideraron las leghemoglobinas como las nodulinas más abundantes, que funcionan como conductoras de O_2 y facilitan su difusión a los bacteroides; estos son producto de una familia de genes múltiples, cuya expresión es fuertemente activada antes de la fijación del dinitrógeno.

El sistema de la enzima nitrogenasa está compuesto por dos proteínas: la hierro (Fe-) proteína y la molibdeno-hierro (MoFe-) proteína, las cuales, en su conjunto, son responsables de la reducción del dinitrógeno atmosférico y es una actividad dependiente del ATP (Van Kammen, 1995). La Fe proteína acepta electrones de dos grupos de proteínas específicas a la nitrogenasa que donan electrones: las ferredoxinas o flavodoxinas, y los transfiere, uno a uno, hacia la MoFe proteína. La Fe proteína tiene dos moléculas de Mg.ATP asociadas a ella. La proteína reducida que porta un electrón para ser donado se enlaza con la MoFe proteína. Allí existe un sitio de enlace de cada mitad del tetrámero de la MoFe proteína, las cuales se cree que funcionen de forma independiente.

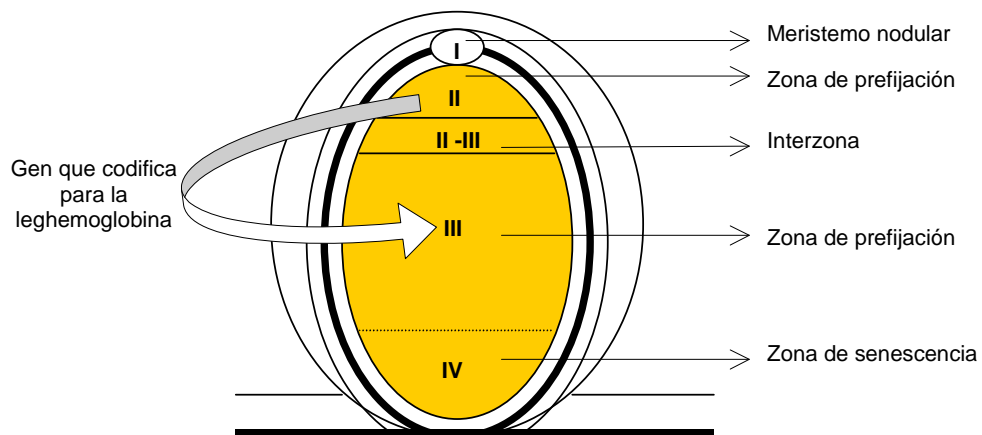
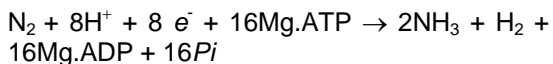


Fig. 3. Esquema básico general del proceso de fijación de dinitrógeno atmosférico en el nódulo (adaptado de Guan, Pawlovski y Bisselling, 1995).

En el enlace siguiente, un electrón es transferido de la Fe proteína hacia la MoFe proteína con una hidrólisis concomitante de ambos enlaces de moléculas de ATP hacia

ADP; ambas proteínas se disocian y el proceso comienza de nuevo (Giller, 2001). De acuerdo con lo informado por estos autores, la reacción de la nitrogenasa requiere de una

demanda energética grande: como mínimo 16 Mg.ATP son hidrolizados bajo condiciones ideales, como se observa en la reacción:



Se conoce que en condiciones naturales esta demanda es aun mayor; por lo tanto, es importante que el sistema de la nitrogenasa esté bajo el control de las células fijadoras de N_2 . Uno de los más interesantes y mejor definidos sistemas de control fue descrito primeramente en *Rhodospirillum rubrum* por Ludden y Burris (1976).

El sistema de la enzima nitrogenasa es muy sensible al oxígeno y esta es inhibida irreversiblemente por el O_2 . Según Giller (2001) esto puede ser una secuela accidental de la evolución de la nitrogenasa cuando la atmósfera de la tierra aún contenía bajos niveles de O_2 , o puede ser también un aspecto fundamental de la reacción de reducción del N_2 . Cuando este proceso ocurre, en los nódulos hay una alta demanda de O_2 ; por lo tanto, los bacteroides deben ser mantenidos en un ambiente bajo en O_2 , pero suplementados con un alto flujo de este elemento (Van Kammen, 1995).

Los genes que codifican para la síntesis de la enzima nitrogenasa se denominan genes *nif* (A, HDK, B, E, N, S) y son activados de diferentes formas, entre las que se encuentra el bajo nivel de O_2 ; los demás pueden constituir por sí mismos operones transcritos. En los rizobios, los genes *nif* normalmente son expresados únicamente dentro del nódulo, aunque algunas cepas de *Bradyrhizobium* pueden ser inducidas a expresarlos *ex planta* (Sprent, 2001). Otros genes que toman parte del proceso de fijación del dinitrógeno atmosférico son los genes *fix* (ABC, F, GHI, LJ, KN, R, X), muchos de los cuales son activados por los genes *nif* (Martínez-Romero y Palacios, 1990) y que codifican para otros componentes de la reacción general de la nitrogenasa, en particular en la cadena del transporte de electrones que conlleva hacia el proceso de reducción del nitrógeno (Sprent, 2001).

El H_2 producido por la reducción del N_2 en amonio es oxidado por la enzima hidrogenasa. La producción de H_2 por una enzima, seguida del consumo de H_2 por otra enzima, conlleva a un ciclo del H_2 (Arp, 1992) (fig. 4).

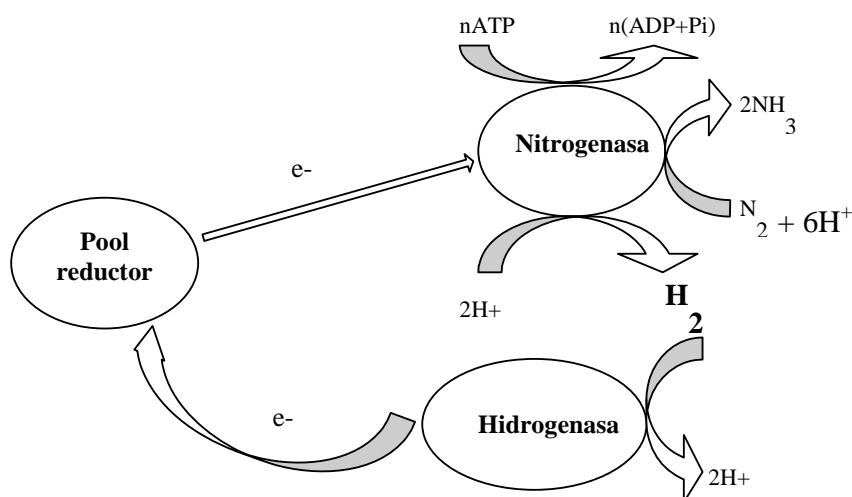


Fig. 4. Esquema del ciclo del H_2 en simbioses N_2 -fijadoras y las bacterias dinitrofijadoras de vida libre (adaptado de Arp, 1992).

La función de la hidrogenasa varía de acuerdo con la fisiología y el metabolismo del microorganismo. En el caso de los microorganismos dinitro fijadores, la habilidad para oxidar el H_2 está asociada con el microsimbionte y es generalmente considerada una propiedad beneficiosa de éstos, ya sea en simbiosis o en vida libre, ya que el H_2 liberado por la nitrogenasa puede ser consumido y el reductante usado de forma que pueda ser útil para las células (Dixon, 1976).

Otras ventajas de la hidrogenasa han sido detalladas por Giller (2001):

- Como la oxidación del H_2 está asociada al consumo (al menos en microorganismos aeróbicos, como los rizobios), esta característica ayuda a mantener la presión parcial de O_2 por debajo de los "niveles de peligro" para la nitrogenasa.
- El H_2 puede actuar como un inhibidor poderoso de la reducción de N_2 por la nitrogenasa, por lo que la actividad de la hidrogenasa puede servir para mantener alta la eficiencia de la reducción del N_2 mediante la eliminación del inhibidor potencial.

Importancia de la simbiosis leguminosa-rizobio en la práctica agrícola

El consumo individual de proteína de los 5,3 billones de habitantes del planeta es aproximadamente de 70 g/día, o 23 000 000 de toneladas de nitrógeno por año (Waggoner, 1994). Para mantener este nivel de consumo, y teniendo en cuenta que la población mundial se duplicará en los próximos 40 años, se necesitará el doble o el triple de la producción actual de alimentos (Vance, 1997).

Es sabido que la explosión demográfica del siglo XX ha sido mantenida por una combinación del proceso Haber-Bosch para producir amonio como fertilizante, y por la revolución verde, en la cual las variedades de vegetales altamente productivas fueron hibridadas en el contexto de un consumo pleno de nitrógeno; sin embargo, ¿debemos realmente mantener esta producción de la misma forma, con los mismos costos? (Newton, 1999).

Uno de esos costos provenientes de la utilización indiscriminada de fertilizantes se relaciona con la contaminación del agua

potable, así como de los lagos y los ríos por los nitratos. Este problema no existía 50 años atrás cuando las cosechas y el nitrógeno utilizados eran menos del 50 % de lo que son ahora (Bockman, citado por Newton, 1999). El otro tipo de costo es la producción de óxidos de nitrógeno, los cuales conllevan a perturbaciones atmosféricas potenciales. Tanto el óxido nitroso como el óxido nítrico se originan de las poblaciones de microorganismos del suelo (Newton, 1999). La denitrificación produce cerca de 90 % de nitrógeno gaseoso y 10 % de óxido nitroso, el cual es un gas de invernadero con una energía reflectiva 180 veces mayor que la del dióxido de carbono (Hardy y Eaglesham, 1995).

El manejo juicioso del nitrógeno en el ambiente es esencial para el desarrollo de una agricultura más productiva y sostenible (Newbold, 1989). En este contexto, la importancia de la fijación biológica del dinitrógeno para la seguridad de los alimentos en el mundo es realmente incuestionable y el uso de cultivos capaces de efectuar una fijación simbiótica del N_2 es el componente primario en una agricultura sostenible (Vance, Graham y Allan, 2000).

Las leguminosas, en su función de plantas hospederas de las bacterias rizobios, desempeñan un papel crucial en la agricultura sostenible, y desde décadas pasadas existen evidencias de su importancia en programas agrícolas de varios países (Heath, Metcalfe y Barnes, 1973; Vincent, Whitney y Bose, 1977; Summerfield y Bunting, 1980). Ruiz, Funes y Fernández (1976), Sistachs y Frías (1980), así como Machado y Alfonso (1981) y muchos otros autores, han hecho referencia a las características agronómicas y a la fijación del dinitrógeno de las leguminosas forrajeras y de grano en la ganadería de Cuba.

No obstante, en las zonas tropicales no están aún completamente explotadas las ventajas de la fijación simbiótica del dinitrógeno. De acuerdo con Dreyfus (1998), la mayoría de las leguminosas espontáneas anuales en los terrenos cultivables del trópico, que fijan activamente el dinitrógeno con los rizobios, son consideradas por los campesinos como malezas.

Los volúmenes de dinitrógeno fijado por los rizobios son realmente significativos. Existen informes de hasta 350 kg de N/ha^{-1} /época⁻¹ en

algunas leguminosas (Vance, 1997). En leguminosas de pastos se han registrado cantidades que difieren de acuerdo con la zona geográfica donde son evaluadas (tabla 4).

El mejoramiento del rendimiento de los cultivos a través de la transferencia de suelos productivos de un campo hacia otro es una práctica utilizada desde tiempos remotos

(Smith, 1992). Desde el descubrimiento hecho por Hellriegel en el siglo XIX sobre la nutrición nitrogenada de las leguminosas, la inoculación ha sido perfeccionada mediante la aplicación de técnicas más sofisticadas que comprenden la utilización de medios de cultivo y sustratos adecuados.

Los inoculantes constituyen el medio ideal para la transportación de los rizobios

Tabla 4. Volúmenes de nitrógeno atmosférico fijado por algunas leguminosas pratenses, localizadas en diferentes zonas geográficas.

Leguminosas pratenses	Autor	Kg N/ha ⁻¹ / época ⁻¹	Zona geográfica
<i>Arachis pinto</i>	Thomas, Asakawa, Rondón y Alarcón (1997)	1-7	Colombia
<i>Clitoria ternatea</i>	Armstrong, Mc Cosker, Miller, Walsh, Johnson y Probert (1997)	42	Australia
<i>Desmanthus virgatus</i>	Armstrong <i>et al.</i> (1997)	3-15	Australia
<i>Lablab purpureus</i>	Armstrong <i>et al.</i> (1997)	31-54	Australia
<i>Lotononis bainesii</i>	Armstrong <i>et al.</i> (1997)	17-92	Australia
<i>Macroptilium atropurpureum</i>	Alves, Rezende, Resende, Macedo, Tarre, Urquiaga y Boddy (2000)	97-137	Australia
<i>Neonotonia wightii</i>	Alves <i>et al.</i> (2000)	126	Australia
<i>Desmodium intortum</i>	Mwangi, Giller, Cadisch y Thorpe (2001)	35-51	Kenya
<i>Macrotyloma axillare</i>	Mwangi <i>et al.</i> (2001)	9-32	Kenya
<i>Stylosanthes capitata</i>	Behling Miranda, Fernandes y Cadisch (1999)	1-40	Colombia
	Thomas <i>et al.</i> (1997)	141-179	Brasil

desde el fermentador hasta la leguminosa en el campo. Una formulación y aplicación de alta calidad deben mantener, de una forma conveniente y económica, una alta población de rizobios efectivos en el suelo (Smith, 1992). Según Thikhonovich (1993), cerca del 30-40 % de las leguminosas del mundo pueden ser inoculadas con la actual producción de inoculantes. Para incrementar su utilización, es necesario mejorar la calidad y optimizar la tecnología de su aplicación práctica.

Otro de los aspectos que se deben tener en cuenta en la inoculación de leguminosas es la competencia de otros microorganismos en la rizosfera. En tal sentido, Vincent (1982) aseguró que existen factores relacionados con la competencia por la ocupación de las raíces, entre ellos:

- El genotipo de la planta hospedera.
- La cantidad de células en el inóculo y en la superficie radicular.

- El ritmo de multiplicación de los rizobios.
- El estado fisiológico de los rizobios en el momento de la inoculación.
- Temperatura, oxígeno y niveles nutricionales.
- Compatibilidad (a veces expresada en efectividad) entre el rizobio y la planta hospedera.

También Prévost, Drouin y Antoun (1999) afirmaron que la productividad de las leguminosas se afecta por las interacciones de la planta hospedera, los rizobios y los factores ambientales. Binder (1997) citó la intensidad de la luz, la temperatura y la humedad del suelo, el pH, la materia orgánica y la aplicación de nitrógeno al suelo como factores que inciden directamente en el proceso de simbiosis leguminosa-rizobio.

En Cuba, los trabajos de diversos autores (Bécquer, Prévost y Prieto, 2000; Bécquer, Prévost y Cloutier, 2001, 2002; Bécquer, Prévost, Cloutier y Laguerre, 2002) han

demostrado la existencia de cepas de rizobios que son tolerantes a factores físico-químicos estresantes, tales como: acidez, alcalinidad y altas temperaturas, y que presentan un alto potencial de eficiencia simbiótica al ser inoculadas en leguminosas promisorias para la ganadería. También López, Ramírez y González (1998); López, González y García (1999); así como López, González, Ramírez, Cordoví, Gómez y Castillo (2000) informaron acerca de cepas de rizobios tolerantes a diferentes grados de salinidad. Estas cepas, por proceder de ecosistemas ganaderos cubanos que se encuentran bajo condiciones edafoclimáticas agresivas, constituyen un factor importante de aplicabilidad agronómica en el futuro.

Según Herridge, Rupela, Serraj y Beck (1994), el manejo de los sistemas de cultivo para minimizar el estrés y maximizar los rendimientos, y el desarrollo de cultivares y la correcta selección de las cepas de rizobios con un potencial alto de fijación simbiótica, son factores de incremento de la productividad en las leguminosas.

CONCLUSIONES

La simbiosis leguminosa-rizobio constituye la asociación más significativa en cuanto a la fijación biológica del dinitrógeno y su impacto en la agricultura, y es, al mismo tiempo, la más comprendida por la ciencia.

A pesar de la gran diversidad genética de las leguminosas, la gran mayoría son infectadas por los rizobios, los cuales pasan a formar parte de un largo proceso que empieza con la infección del sistema radicular y termina con la senescencia de los nódulos en ciertas etapas fenológicas de la planta. Se ha revelado que para ocurrir la fijación del dinitrógeno en el interior de las raíces, deben estar presentes diversos factores bioquímico-genéticos desde el inicio del proceso en la rizosfera, tales como: la quimiotaxis entre la bacteria y las raíces, la presencia de leghemoglobina (el pigmento vegetal que facilita la difusión del O_2 en el nódulo), así como la enzima nitrogenasa, que es la responsable de la reducción del nitrógeno. La información genética desempeña también un papel fundamental en este proceso, ya que existen genes que codifican para determinadas funciones.

Una de las consecuencias negativas de la utilización indiscriminada de fertilizantes industriales lo constituye la contaminación del agua potable por nitratos, así como de lagos y ríos. Otros efectos negativos se manifiestan en las perturbaciones atmosféricas, ya que la denitrificación que ocurre por el exceso de fertilizantes nitrogenados en el suelo provoca la formación de nitrógeno gaseoso y de óxido nitroso, por lo que se impone el manejo juicioso del nitrógeno en el ambiente para el desarrollo de una agricultura más productiva y sostenible. En este contexto, la importancia de la fijación biológica del dinitrógeno para la seguridad de los alimentos en el mundo es incuestionable y el uso de cultivos capaces de efectuar una fijación simbiótica del N_2 es el componente primario en una agricultura sostenible.

CONCLUSIONS

The legume-rhizobium symbiosis constitutes the most significant association regarding the biological fixation of dinitrogen and its impact on agriculture, and it is, at the same time, the association best understood by science.

In spite of the great genetic diversity of legumes, most of them are infected by rhizobia, which become part of a long process that begins with the infection of the root system and ends with the senescence of the nodules in certain phenological stages of the plant. It has been revealed that for the dinitrogen fixation to take place within the roots, several biochemical-genetic factors must be present since the beginning of the process in the rhizosphere, such as: the chemotaxis between the bacterium and the roots, the presence of leghaemoglobin (the plant pigment that facilitates the diffusion of O_2 in the nodule), as well as the presence of the nitrogenase enzyme, which is responsible for the nitrogen reduction. The genetic information plays also a main role in this process, because there are genes that codify for certain functions.

One of the negative consequences of the indiscriminate use of industrial fertilizers is the pollution of drinking water, as well as of lakes and rivers, by nitrates. Other negative effects are shown in the atmospheric disturbances, because the denitrification caused by the

excess of nitrogen fertilizers in the soil produces the formation of gaseous nitrogen and nitrous oxide, and that is the reason why the judicious management of nitrogen in the environment is urged for the development of a more productive and sustainable agriculture. In this context, the importance of the biological fixation of dinitrogen for food security all over the world is unquestionable, and the use of crops capable of carrying out a symbiotic fixation of N₂ is the primary component of a sustainable agriculture.

REFERENCIAS

- Alves, B.J.R.; Rezende, C.D.; Resende, A.S.; Macedo, R.; Tarre, R.M.; Urquiaga, S. & Boddy, R.M. 2000. Estimation of N₂ fixation in *Desmodium ovalifolium* from the relative ureide abundance of stem solutes: comparison with the ¹⁵N dilution and an *in situ* soil core technique. **Nutrient Cycling in Agroeco-systems**. 56:177
- Appleby, C.A. 1962. The oxygen equilibrium of leghaemoglobin. **Biochem. Biophys. Acta** 60:226
- Appleby, C.A. 1984. Leghaemoglobin and *Rhizobium* respiration. **Ann. Rev. Plant Physiol.** 35:443
- Appleby, C.A. 1985. Plant hemoglobin properties, function and genetic origin. Nitrogen fixation and CO₂ metabolism. (Eds. P.W. Ludden & J.E. Burris). Elsevier, New York. p. 41
- Armstrong, R.D.; Mc Cosker, K.J.; Miller, G.R.; Walsh, K.; Johnson, S. & Probert, M.E. 1997. Improved nitrogen supply to cereals in central Queensland following short legume leys. **Austr. J. Exp. Agric.** 37:359
- Arp, D.J. 1992. Hydrogen cycling in symbiotic bacteria. In: Biological nitrogen fixation. (Eds. G. Stacey, R.H. Burris and H. Evans). Chapman and Hall Inc., Routledge. p. 432
- Bécquer, C.J.; Prévost, Danielle & Prieto, A. 2000. Caracterización fisiológica-bioquímica de cepas de rizobios, aislados en leguminosas forrajeras. **Biología**. 14:123
- Bécquer, C.J.; Prévost, Danielle & Cloutier, J. 2001. Aspectos fisiológicos y genotípicos en rizobios aislados de leguminosas forrajeras. **Pastos y Forrajes**. 24:123
- Bécquer, C.J.; Prévost, Danielle & Cloutier, J. 2002. Diversidad genética de rizobios aislados de leguminosas forrajeras en Sancti Spiritus, Cuba. **Biología**. 16:130
- Bécquer, C.J.; Prévost, Danielle; Cloutier, J. & Laguerre, Gisele. 2002. Enfoque taxonómico de rizobios aislados en las leguminosas forrajeras *Centrosema plumieri*, *C. virginianum* y *Neonotonia wightii*, colectadas en Sancti Spiritus, Cuba. **Biología**. 16:137
- Behling Miranda, C.H.B.; Fernandes, C.D. & Cadisch, G. 1999. Quantifying the nitrogen fixed by *Stylosanthes*. **Pasturas Tropicales**. 21:64
- Binder, U. 1997. *Centrosema pubescens*, Benth. En: Manual de leguminosas de Nicaragua. PASOLAC, EAGE. Nicaragua. Vol. II, p. 248
- Boogerdt, F.C. & van Rossum, D. 1997. Nodulation of groundnut by *Bradyrhizobium*: a simple infection process by crack entry. **FEMS Microbiology Reviews**. 21:5
- Brewin, N.J. 1998. Tissue and cell invasion by *Rhizobium*: the structure and development of infection threads and symbiosomes. In: The *Rhizobiaceae*. (Eds. H.P. Spaink, A. Kondorosi and P.J.J. Hooykaas). Kluwer, Dordrecht, The Netherlands. p. 417
- Brewin, N.J. & Kardailsky, I.V. 1997. Legume lectins and nodulation by *Rhizobium*. **FEMS. Microbiology Ecology**. 3:92
- Brewin, N.J.; Rathbun, E.A. & Wisniewski, J.P. 2000. Structure and development of infection threads. In: Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity. Proceedings of the 12th International Congress on Nitrogen Fixation. Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil. p. 237
- De Lajudie, P.; Laurent-Fulele, E.; Willems, A.; Torck, U.; Coopman, R.; Collins, M.D.; Kersters, K.; Dreyfus, B. & Gillis, M. 1998a. *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixing

- bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 48:1277
- De Lajudie, P.; Willems, A.; Nick, G.; Moreira, F.; Molouba, F.; Hoste, B.; Torck, U.; Neyra, M.; Collins, M.D.; Lindstrom, K.; Dreyfus, B. & Gillis, M. 1998b. Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 48:369
- Denarié, J.; Debelle, F. & Rosenberg, C. 1992. Signaling and host range variation in nodulation. **Annu. Rev. Microbiol.** 46:497
- Dixon, R.O.D. 1976. Hydrogenases and efficiency of nitrogen fixation in aerobes. **Nature.** 262:173
- Downie, J.A. & Kondorosi, A. 1998. Interactions in the *Rhizobium*-legume symbiosis. In: Biological nitrogen fixation for the 21st century. Proceedings of the 11th International Congress on Nitrogen Fixation. Institut Pasteur, Paris, France. p. 207
- Dreyfus, B. 1998. How to exploit the diversity of tropical symbiosis for sustainable agriculture: fallow legumes and rhizobia associated to wild rice. In: Biological nitrogen fixation for the 21st century. Proceedings of the 11th International Congress on Nitrogen Fixation. Institut Pasteur, Paris, France. p. 617
- Ervin, S.E. & Hubbell, D.H. 1985. Root hair deformations associated with fractionated extracts from *Rhizobium trifolii*. **Appl. Envir. Microbiol.** 49:61
- FAO. 1985. Inoculantes para leguminosas y su uso. Roma. 61 p.
- Gaworzewska, E.T. & Carlile, M.J. 1982. Positive chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* and other bacteria towards root exudates from legumes and other plants. **J. Gen. Microbiol.** 128:1179
- Geiger, O.; Ritsema, T.; van Russell, A.A.N.; Tak, T. & Wijffjes, A.H.M. 1994. Role of rhizobial lipo-oligosaccharides in root nodule formation on leguminous plants. **Plant and Soil.** 161:81
- Giller, K.E. 2001. Nitrogen fixation in tropical cropping systems. CAB International, UK. 423 p.
- Guan, C.; Pawlovski, K. & Bisseling, T. 1995. Nodulation in legumes and actinorhizal plants. In: Nitrogen fixation: fundamentals and applications. (Eds. I.A. Thikhonovich, N.A. Provorov, V.I. Romanov and W.E. Newton). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. p. 49
- Haack, A. 1964. Über den Einfluss der Knöllchenbakterien auf die Wurzelhaare von Leguminosen und Nichtleguminosen. **Zentr. Bakteriolog. Parasitenk. Abt. II.** 117:343
- Hardy, R.W.F. & Eaglesham, A.R.J. 1995. Ecology and agricultural applications of nitrogen-fixing systems: overview. In: Nitrogen fixation: fundamentals and applications. Proceedings of the International Congress on Nitrogen Fixation, St. Petersburg, Russia. (Eds. I.A. Thikhonovich, A. Provorov, V.I. Romanov and W.E. Newton). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 8:619
- Heath, M.E.; Metcalfe, D.S. & Barnes, R.F. (Eds.). 1973. Forages. 3rd ed. Iowa State University Press. Ames, Iowa. 755 p.
- Herridge, D.F.; Rupela, O.P.; Serraj, R. & Beck, D.P. 1994. Screening techniques and improved biological nitrogen fixation in cool season food legumes. **Euphytica.** 73:95
- Hubbell, D.H.; Morales, V.M. & Umali-García, M. 1978. Pectolic enzymes in *Rhizobium*. **Appl. Environ. Microbiol.** 35:210
- Kijne, J.W. 1992. The *Rhizobium* infection process. In: Biological nitrogen fixation. (Eds. G. Stacey, R.H. Burris and H. Evans). Chapman and Hall, Inc. Routledge. New York. p. 349
- López, R.C.; González, L.M.; Ramírez, R.; Cordoví, E.; Gómez, I. & Castillo, P. 2000. Aislamiento y caracterización de cepas nativas de *Rhizobium* aisladas de leguminosas pratenses en suelos afectados por la salinidad. **Pastos y Forrajes.** 23:129

- López, R.C.; Ramírez, R. & González, L.M. 1998. Efecto de la salinidad sobre la fijación de nitrógeno en *Teramnus labialis*. **Pastos y Forrajes**. 21:351
- López, R.; González, L.M. & García, D. 1999. Tolerancia a diferentes tenores de NaCl en cepas de *Rhizobium* aisladas de leguminosas pratenses. **Pastos y Forrajes**. 22:43
- Ludden, P.W. & Burris, R.H. 1976. Activating factor for the iron protein of nitrogenase from *Rhodospirillum rubrum*. **Science**. 194:424
- Machado, R. & Alfonso, A. 1981. *Centrosema*. **Pastos y Forrajes**. 4:249
- McKey, D. 1994. Legumes and nitrogen: the evolutionary ecology of a nitrogen-demanding lifestyle. In: Advances in legume systematics 5: the nitrogen factor. (Eds. J.I. Sprent & D.M. McKey). Royal Botanic Gardens, Kew. p. 211
- Martínez-Molina, E.; Morales, V.M. & Hubbell, D.H. 1979. Hydrolitic enzyme production by *Rhizobium*. **Appl. Environ. Microbiol.** 38:1186
- Martínez-Romero, Esperanza & Palacios, R. 1990. The *Rhizobium* genome. **Crit. Rev. Plant Sci.** 9:59
- Mellor, R.B. & Werner, D. 1990. Legume nodule biochemistry and function. In: Molecular biology of symbiotic nitrogen fixation. (Ed. P.M. Gresshoff). CRC Press, Boca Ratón, USA. p. 111
- Mpepereki, S.; Woullum II, A.G. & Makones, F. 1996. Diversity in symbiotic specificity of cowpea rhizobia indigenous to Zimbabwean soils. **Plant and Soil**. 186:167
- Mwangi, D.M.; Giller, K.E.; Cadisch, G. & Thorpe, W. 2001. Contribution of nitrogen fixation to the above ground N yield and N balance of Napier grass (*Pennisetum purpureum*) mixed with *Desmodium intortum*, *Macrotyloma axillare* and *Neonotonia wightii* in central Kenya. **Plant and Soil** (in press)
- Naisbitt, T.; James, E.K. & Sprent, J.I. 1992. The evolutionary significance of the genus *Chamaecrista* as determined by nodule structure. **New Phytologist**. 122:487
- Newbold, P. 1989. The use of nitrogen fertilizer in agriculture: where do we go practically and ecologically?. **Plant and Soil**. 115:297
- Newcomb, W.; Sipell, D. & Peterson, R.L. 1979. The early morphogenesis of *Glycine max* and *Pisum sativum* root nodules. **Can. J. Bot.** 57:2603
- Newton, W.E. 1999. Nitrogen fixation and the biosphere. In: Hight lights of nitrogen fixation research. (Eds. Esperanza Martínez and Georgina Menéndez). Kluwer Academic/Plenum Publishers. The Netherlands. 1:1
- Nick, G.; de Lajudie, P.; Eardly, P.; Suomalainen, S.; Paulin, L.; Zhang, X.; Gillis, M. & Lindström, K. 1999. *Sinorhizobium arboris* sp. nov., and *Sinorhizobium kostiense* sp. nov., isolated from leguminous trees in Sudan and Kenya. **Int. J. Bacteriol.** 49:1359
- Polhill, R.M. & Vidal, J.C. 1981. *Caesalpinieae*. In: Advances in legume systematics. (Eds. R.M. Polhill and P.H. Raven). Royal Botanic Gardens, Kew. Part 1. p. 61
- Prévost, Danielle; Drouin, P. & Antoun, H. 1999. The potential use of cold-adapted rhizobia to improve symbiotic nitrogen fixation in legumes cultivated in temperate regions. In: Biotechnical applications of cold-adapted organisms. (Eds. R. Margesin and F. Schinner). Springer-Verlag, Berlin. p. 161
- Roth, L.E.; Jeon, K. & Stacey, G. 1988. Homology in endosymbiotic systems: The term symbiosome. In: Molecular genetics of plant-microbe interactions. (Eds. R. Palacios and D.P.S. Verma). Amer. Phytopathol. Soc. Press, St. Paul. p. 220
- Ruiz, T.; Funes, F. & Fernández, F. 1976. Agronomical studies on perennial soybean (*Glycine wightii*). 2. Effect of NPK fertilization. **Cuban J. Agric. Sci.** 2:211
- Sánchez, F.; Padilla, J.E.; Pérez, H. & Lara, M. 1991. Control of nodulin genes in root-nodule

- development and metabolism. **Annu. Rev. Plant Physiol.** 42:507
- Sistachs, E. & Frías, R. 1980. Studies of initial nodulation in *Glycine wightii*. 1. Effects of bacterial strains. **Cuban J. Agric. Sci.** 3:321
- Smit, G.; Logman, T.J.J.; Boerrigter, M.E.; Kijne, J.W. & Lugtenberg, B.J.J. 1989. Purification and partial characterization of the *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* Ca²⁺- dependent adhesin, which mediates the first step in attachment of cells of the family *Rhizobiaceae* to plant root hair tips. **J. Bacteriol.** 171:4054
- Smith, R.S. 1992. Legume inoculant formulation and application. **Can. J. Microbiol.** 38:485
- Somasegaran, P. & Hoben, H.J. 1994. Handbook for rhizobia. Springer-Verlag, New York. 450p.
- Sprent, J.I. 1994. Evolution in the legume-rhizobium symbiosis: chaos theory?. **Plant and Soil.** 161:1
- Sprent, J.I. 2001. Nodulation in legumes. Royal Botanic Gardens, Kew, U.K. 146 p.
- Summerfield, R.J. & Bunting, A.H. (Eds.). 1980. Advances in legume science. Royal Botanic Gardens, Kew, England. 667 p.
- Tang, M. 1996. Efecto de la inoculación natural en ocho leguminosas. **Pastos y Forrajes.** 2131
- Tang, M.; Rodríguez, O. & Avila, V. 1994. Efecto de las cepas nativas de rizobios sobre varias leguminosas tropicales. **Pastos y Forrajes.** 1:45
- Tang, M.; Tamayo, E.V. & Márquez, B. 1982. Estudio de la acción de siete cepas de *Rhizobium* sobre cuatro leguminosas. **Pastos y Forrajes.** 2:159
- Thikhonovich, I.A. 1993. The prospects of increasing the input of biological nitrogen fixation in agriculture. In: New horizons in nitrogen fixation. (Eds. R. Palacios, J. Mora and W.E. Newton). Kluwer Academic Publishers. p. 667
- Thomas, R.J.; Asakawa, N.M.; Rondón, M.A. & Alarcón, H.F. 1997. Nitrogen fixation by three tropical forage legumes in an acid-soil savanna of Colombia. **Soil Biology and Biochemistry.** 29:801
- Van Brussel, A.A.N.; Bakhuizen, R.; van Sprensen, P.C.; Spaink, H.R.; Tak, Teung; Lugtenberg, B.J.J. & Kijne, J.N. 1992. Induction of preinfection thread structures in the leguminous host plant by nitrogenic lipo-oligosaccharides of *Rhizobium*. **Science.** 257:70
- Vance, C.P. 1997. Nitrogen fixation capacity. In: Biotechnology and improvement of forage legume. (Eds. B.D. McKersie and D.C.W. Brown). CAB International, UK. 15:375
- Vance, C.P.; Graham, P.H. & Allan, Deborah L. 2000. Biological nitrogen fixation: phosphorus-a critical need?. In: Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity. Proceedings of the 12th International Congress on Nitrogen Fixation. Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil. p. 509
- Van Egeraat, A.W.S.M. 1975a. Exudation of ninhydrin-positive compounds by pea seedlings roots: A study of the sites of exudation and of the composition of the exudate. **Plant and Soil.** 42:37
- Van Egeraat, A.W.S.M. 1975b. The growth of *Rhizobium leguminosarum* on the root surface and in the rhizosphere of pea seedlings in relation to root exudates. **Plant and Soil.** 42:367
- Van Egeraat, A.W.S.M. 1975c. The possible role of homoserine in the development of *Rhizobium leguminosarum* in the rhizosphere of pea seedlings. **Plant and Soil.** 42:381
- Verma, D.P.S. 1992. Signals in root nodule organogenesis and endocytosis of *Rhizobium*. **Plant Cell.** 4:373
- Van Kammen, A. 1995. The molecular development of nitrogen fixing root nodules. In: Nitrogen fixation: fundamentals and applications. Proceedings of the 10th International Congress on Nitrogen Fixation. St. Petersburg, Russia. p. 9
- Vincent, J.M. 1982. Nitrogen fixation in legumes. Academic Press, Sydney. 288 p.
- Vincent, J.M.; Whitney, A.S. & Bose, J. 1977. Exploiting the legume-*Rhizobium* symbiosis in

- tropical agriculture. Univ. Hawaii. Coll. Trop. Agric. Misc. Publ. p. 145
- Waggoner, P.E. 1994. How much land can ten million spare for nature?. Council for Agricultural Science and Technology Report 121. 63 p.
- Wang, E.T.; van Berkum, P.; Beyene, D.; Sui, X.H.; Dorado, O.; Chen, W.X. & Martínez-Romero, Esperanza. 1998. *Rhizobium huatlense* sp. nov., a symbiont of *Sesbania herbacea* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galegae*. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 48:687
- Wang, E.T.; van Berkum, P.; Sui, X.H.; Beyene, D.; Chen, W.X. & Martínez-Romero, Esperanza. 1999a. Diversity of rhizobia associated with *Amorpha fruticosa* isolated from Chinese soils and description of *Mesorhizobium amorphae* sp. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 49:51
- Werner, D. 1992. Physiology of nitrogen-fixing legume nodules: compartments and functions. In: Biological nitrogen fixation. (Eds. G. Stacey, R.H. Burris and H. Evans). Chapman and Hall, Inc. Routledge, London. p. 399
- Young, J.P.W. & Haukka, K. 1996. Diversity and phylogeny of rhizobia. **J. Phytol.** 133:87
- Young, J.P.W. & Johnston, A.W.B. 1989. The evolution of specificity in the legume-*Rhizobium* symbiosis. **Trends Ecol. Evol.** 4:341

Recibido el 20 de septiembre del 2001

Aceptado el 20 de febrero del 2002