

## Reseña

# FACTORES DE NODULACIÓN. EXPERIENCIA EN CUBA

María C. Nápoles<sup>✉</sup>, Gretel Gómez y Daimy Costales

**ABSTRACT.** Lipo-chitooligosaccharides produced by rhizobia are a class of signalling molecules mediating nodule recognition and organogenesis in the *Rhizobium*-leguminous symbiosis. Their synthesis is determined by rhizobium-nodulating genes; therefore, they are commonly known as Nod factors. This review is a compilation of updated information on some general topics, as *Rhizobium*-leguminous interaction signals, nod factor structure, as well as their role in symbiosis. Besides, a research view about this subject in Cuba is presented, describing results related to the design and optimization of culture media with nod factor inducers, with quorum sensing, with nod factor anti-stress effect, with the use of nod factor synthesis-induced inoculants and other oligosaccharines, and with the possible beneficial effect of the latter ones on bacterium-leguminous symbiosis.

**RESUMEN.** Los lipoquitinoligosacáridos producidos por los rizobios son una clase de moléculas señales que median el reconocimiento y la organogénesis del nódulo en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. Su síntesis está determinada por los genes de nodulación del rizobio; es por ello que comúnmente son conocidos como factores Nod. En este trabajo se recopiló y se expuso información actualizada acerca de varios aspectos generales, como las señales en la interacción *Rhizobium*-leguminosa, la estructura de los factores de nodulación, así como su papel en la simbiosis. Además, se realizó una panorámica de las investigaciones en Cuba acerca de esta temática, donde se describen resultados relacionados con el diseño y la optimización de medios de cultivo con inductores de la nodulación, con las señales de comunicación célula a célula, con el efecto antiestrés de los factores de nodulación; también con el empleo de inoculantes inducidos en la síntesis de los factores Nod y otras oligosacarinas, y los posibles efectos beneficiosos de estas últimas en la simbiosis bacteria-leguminosas.

*Key words:* nodulation, oligosaccharides, culture media, inoculation, stress

*Palabras clave:* nodulación, oligosacáridos, medio de cultivo, inoculación, estrés

## INTRODUCCIÓN

Las bacterias pertenecientes a los géneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium* y *Bradyrhizobium* poseen la capacidad de invadir las raíces de plantas leguminosas, causando la formación de un nuevo órgano, el nódulo, en el cual establecen una simbiosis que fija nitrógeno atmosférico.

Durante muchos años, diversos grupos científicos en todo el mundo se han dedicado al estudio de esta beneficiosa interacción. La fisiología de cada organismo, la bioquímica del proceso, así como los genes relacionados con cada etapa exigieron años de intenso trabajo (1, 2, 3).

Fue en 1990 que se identificó esa fracción del medio, encargada de inducir la transformación de los pelos radicales y que se llamó factor Nod. Publicado por Lerouge (4), fue esta la molécula del año y a partir de entonces numerosos estudios han descifrado su naturaleza y papel en esta importante simbiosis.

Esta reseña pretende recoger algunos aspectos relevantes de los factores de nodulación, como señales esenciales en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, así como el modesto aporte de las investigaciones al respecto desarrolladas en Cuba.

## SEÑALES EN LA INTERACCIÓN RHIZOBIUM-LEGUMINOSA

El intercambio de señales entre las células de *Rhizobium* y las leguminosas involucra varias etapas. Primero el crecimiento de las bacterias en la rizosfera del hospedero, la inducción de los genes de nodulación del rizobio por

los exudados de la planta, la producción de los factores de nodulación, la adhesión de las células microbianas a la raíz, la inducción de la división celular en la planta, seguido de la penetración del microsimbionte, hasta la formación del simbiosoma y su funcionamiento dentro del nódulo (5).

Las leguminosas excretan metabolitos secundarios hacia la rizosfera, entre ellos flavonoides y chalconas son los más importantes en esta interacción. En dependencia de la planta y la bacteria, específicos compuestos de estos servirán como señales inductoras de los genes *nod* mediante la proteína Nod D en *Rhizobium*. Este es el primer nivel de especificidad en la interacción (Figura 1).

Los genes de nodulación producen entonces una señal de retorno, los lipoquitinoligosacáridos, comúnmente llamados Factores de nodulación o Factor Nod, que constituye el segundo nivel de especificidad del hospedero (6, 7).

Dr.C. María C. Nápoles, Investigadora Titular, Ms.C. Gretel Gómez Ing. Daimy Costales, Investigadoras del Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana, CP 32 700

✉ tere@inca.edu.cu

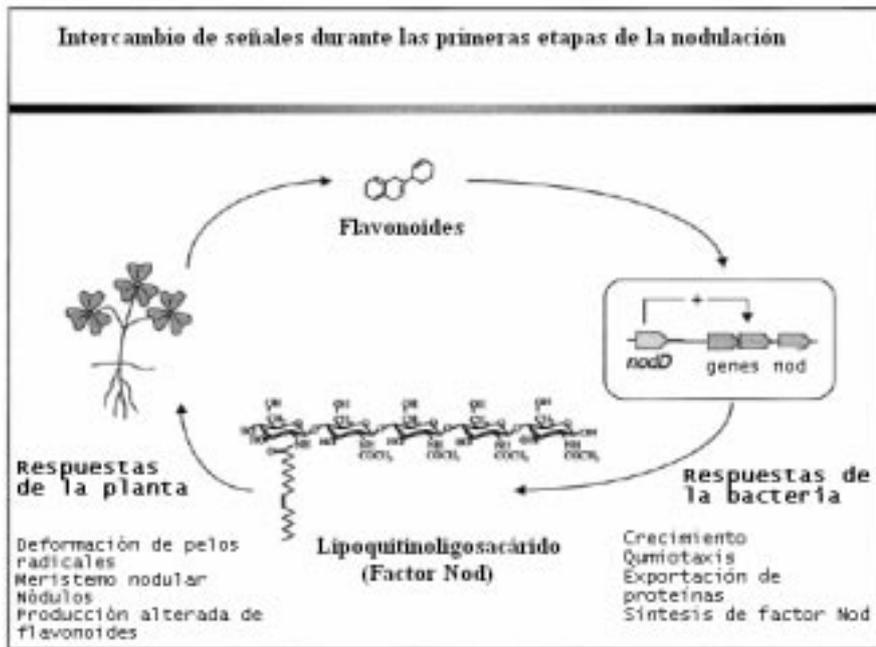


Figura 1. Intercambio de señales durante las primeras etapas de la nodulación (8)

## ESTRUCTURA DE LOS FACTORES DE NODULACIÓN

La estructura química básica del factor o factores de nodulación es compleja, pero con gran semejanza entre los producidos por las distintas especies de *Rhizobium*. Se trata de una cadena común de tres a cinco unidades de N-acetil glucosamina (quitina), unidas por enlace  $\beta$ -1,4 y derivada de la expresión de los genes comunes, con una sustitución en el extremo no reductor de una cadena alifática de variada longitud e insaturación (C16-C20) y distintas sustituciones (acetil, carbamoil, metil, sulfato y grupos azúcares) en el extremo reductor (9, 10, 11).

Estas decoraciones del esqueleto son las que determinan la especificidad (12) y su síntesis está determinada por los genes *nod* específicos, todos ellos inducidos por el gen *nodD*, sensor del flavonoide adecuado. Por su naturaleza, también se conoce a los factores Nod como lipoquitooligosacáridos o LCO (Figura 2).

Una cepa de *Rhizobium* puede sintetizar una gran diversidad de factores Nod, que pueden oscilar desde dos tipos de estas moléculas como en *Rhizobium etli* CFN42 (13) hasta unas 60 estructuras diferentes como ocurre en *Rhizobium galegae* HAMB1207 (14). Los lipo-oligosacáridos caracterizados en *Bradyrhizobium elkanii* varían en el tamaño de su

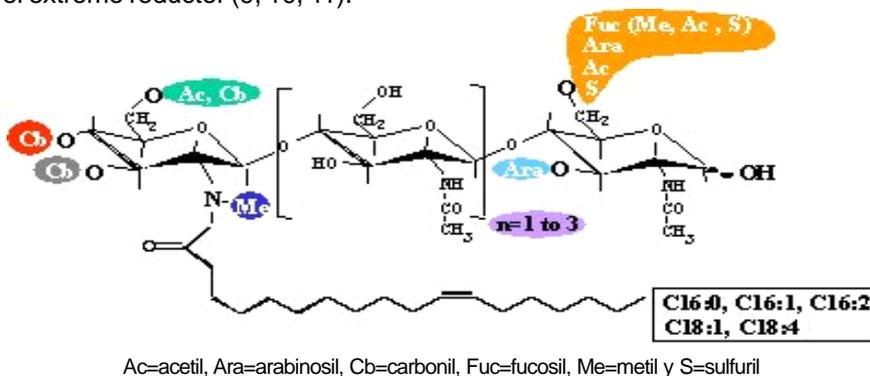


Figura 2. Estructura química del factor de nodulación (16)

estructura básica, en el tipo de ácido graso, en la presencia de acetilo y carbamilo o un N-metilo sobre el terminal no reductor y en la presencia de 2-O-metilfucosa o fucosa y glicerol sobre el extremo reductor. Esta variabilidad permite potencialmente la formación de al menos 96 estructuras diferentes, de las cuales muchas ya han sido identificadas; esto demuestra la diversidad metabólica de esta especie (15).

En la producción de tan importantes biomoléculas participan varias enzimas. El primer paso en la síntesis del factor Nod es llevado a cabo por una N-acetilglucosaminiltransferasa codificada por *nodC* (17). La elongación de la cadena por Nod C tiene lugar en el terminal no reductor. La desacetilasa Nod B remueve el ácido graso N-acetilo del extremo no reductor del oligosacárido (18, 19). Finalmente una aciltransferasa, codificada por *nodA*, une la cadena acil al carbono C-2 libre de acetilo del terminal no reductor del oligosacárido (20). La estructura básica es modificada por la acción de otras proteínas Nod que sintetizan o añaden varias sustituciones. Nod I y Nod J parecen estar involucradas en la exportación del Factor Nod al exterior de la célula bacteriana (21, 22).

La expresión de *nod ABC* es suficiente para la síntesis del esqueleto N-acetil-D-glucosamina acilado, el cual posee actividad simbiótica sobre ciertas plantas. El resto de las sustituciones o decoraciones que posee la molécula desempeñan un papel más sutil en la nodulación, tal vez permitiendo la interacción con ciertas especies o protegiendo al factor Nod de la degradación. Se han denominado decoraciones barrocas, ya que ellas resaltan y no sostienen la estructura básica de la molécula (12).

En algún momento se sugirió que tales estructuras estuviesen involucradas solamente en la interacción de *Rhizobium* con las leguminosas; sin embargo, investigaciones posteriores demostraron que pueden ser reconocidas por plantas que no son capaces de interactuar con dicho microsimbionte.

Por ejemplo, la expresión de los genes *nod A* y/o *nod B* afecta el desarrollo de plantas de tabaco (23). Factores Nod purificados son capaces de inducir división celular en protoplastos de este cultivo, activando la respuesta auxínica (24). En cultivos celulares de tomate estimulan una rápida alcalinización del medio (25) y en determinada línea celular de zanahoria, también han demostrado la posibilidad de formar embriones somáticos (26). Tales estudios demuestran que también algunas plantas no leguminosas son capaces de reconocer y responder ante los factores Nod.

No se habían identificado moléculas con estructura similar a los factores de nodulación en otros organismos. Sin embargo, Lian *et al.* (27) comprobaron mediante HPLC que al inducir el cultivo de *Bacillus circulans* con genisteína, se produce un compuesto que eluye en el mismo tiempo del lipoquitinolisacárido (Nod Bj-V (C18:1, MeFuc)) de *Bradyrhizobium japonicum*. Además, este compuesto presenta actividad biológica, deformación de las raíces en soya, lo que sugiere que pudiera ser un LCO o un compuesto muy cercano químicamente.

Lo que sí parece estar claro es que solamente tipos y mezclas específicas de factores Nod permitirán al rizobio nodular determinada leguminosa (28); por ello Relic *et al.* (29) caracterizaron a estas moléculas como "la llave para la puerta leguminosa".

## PAPEL DE LOS FACTORES DE NODULACIÓN EN LA SIMBIOSIS

Los lipoquitooligosacáridos afectan diferentes procesos fisiológicos en la planta. Ellos inducen la deformación de los pelos radicales (6), la ontogenia de la estructura completa del nódulo (30, 31), la división de las células corticales (32, 33), y la expresión de los genes nodulina, esenciales para la formación del cordón de infección (34, 35, 36).

La aplicación de factores Nod purificados a las raíces de legumino-

sas, induce la formación del cordón de infección (puentes citoplasmáticos polarizados) en las células corticales externas y divisiones celulares en la corteza interna (37). Varios genes ENOD (nodulinas tempranas) se expresan en respuesta a los factores Nod (38, 39, 40, 41, 42, 43).

La aplicación de una gota de factores Nod purificados es suficiente para inducir el enroscamiento de los pelos radicales; de esta forma, demostraron que no se requiere de la presencia de la bacteria (44) para que esto ocurra como se consideraba hasta entonces (45).

Se ha demostrado también que los LCO activan enzimas relacionadas con la defensa (46), incluyendo la biosíntesis de fitoalexinas, la producción de inhibidores de proteasas y otras proteínas relacionadas con la patogénesis.

Cuando se encuentran en el suelo, los factores Nod son capaces también de estimular otros procesos fisiológicos como la germinación de las semillas, promover el crecimiento de las plantas e incrementar el rendimiento en granos de leguminosas y no leguminosas, así como estimular la fotosíntesis de hojas que han sido asperjadas con esta biomolécula (47). En este sentido, Zhang y Smith (48) informaron que semillas embebidas en una solución que contenía factores Nod estimularon la germinación y el desarrollo de la plántula en ocho familias de angiospermas. La aplicación de concentraciones en el orden de  $10^{-7}$  M ó  $10^{-9}$  M incrementó la masa radical de la soya entre un 7-16 %, y el largo de la raíz entre 34-44 % (49). Aplicaciones en hojas a concentraciones de  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$  ó  $10^{-10}$  M causaron incrementos de un 10-20 % en el rango fotosintético de soya, frijol, maíz, arroz, manzana y uvas (49). Este incremento en la producción de fotosintatos condujo a un incremento en el rendimiento de granos de cerca del 40 % en plantas de soya crecidas en condiciones de campo.

También se les adjudica a estas moléculas un efecto sobre la alcalinización en el medio de cultivo

o la superficie de las raíces (50), la despolarización de las membranas (51), el flujo de iones (52) y los cambios en el contenido de calcio citosólico (53). Incluso la colonización de las raíces por hongos micorrícicos se ha visto estimulada por su acción (54, 55).

## EXPERIENCIA EN CUBA

La utilización de los biofertilizantes en los sistemas productivos es una alternativa viable y sumamente importante, para lograr un desarrollo agrícola ecológicamente sostenible, ya que permite una producción a bajo costo, no contamina el ambiente y mantiene la conservación del suelo desde el punto de vista de fertilidad y biodiversidad.

Desde hace algunos años nuestro país, entre muchos otros, intenta llevar a cabo esta práctica y, en tal sentido, el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) en colaboración con otros centros de investigación de Cuba, la Universidad Católica de Leuven, así como el INTA y la empresa Rizobacter, ambos de Argentina, ha realizado investigaciones estrechamente relacionadas con los factores de nodulación, como moléculas clave en el éxito de la interacción simbiótica y producción de inoculantes.

## DISEÑO DE MEDIOS DE CULTIVO CON INDUCTORES DE LA NODULACIÓN

La práctica de inoculación en las leguminosas no siempre resulta exitosa, por lo que la carencia de nitrógeno redundaría en cultivos con muy bajo rendimiento. Si bien se conoce el papel que pueden desempeñar los medios de cultivo en la obtención de biopreparados (56) y de cómo es posible modificar la expresión genética de un microorganismo en dependencia de la composición de aquellos, nada se conocía acerca de su efecto sobre la síntesis de los factores de nodulación. Hasta entonces los medios para inocular la soya solo habían tenido en cuenta la producción de biomasa bacteriana y

no la posibilidad de explotar la capacidad fisiológica de la célula para producir estas biomoléculas. Dada la necesidad de contar con medios de cultivo, que garanticen biopreparados de máxima calidad, se estudió cómo la variación en la capacidad fisiológica del microorganismo, influenciada por el medio de cultivo, incrementaba la efectividad de la nodulación en la simbiosis *Bradyrhizobium-soya* (57, 58, 59, 60).

Se reclasificó la cepa ICA 8001 (dada su amplia utilización en Cuba en la producción de inoculantes), según la nueva taxonomía propuesta para *Bradyrhizobium* sp., concluyéndose que no pertenece más a la especie *Bradyrhizobium japonicum* sino a *Bradyrhizobium elkanii* y se determinó el perfil de factores Nod producidos por esta cepa (61, 62).

Se demostró la influencia del medio de cultivo sobre la producción de los factores de nodulación en *Bradyrhizobium*, evidenciándose que el perfil de factores Nod depende también de los compuestos presentes en el medio donde se haya multiplicado: la cepa excreta un mínimo de LCO diferente, parcialmente definido por cromatografía de placa, gracias al dopaje previo con  $^{14}\text{C}$ -Ac y también mediante cromatografía líquida de alta resolución, pero su síntesis se acentúa en aquellos casos que se emplean inductores en el medio, tales como la melaza y los derivados de la semilla de soya. La variedad de factores Nod producidos por la cepa estudiada pudiera ayudar a explicar la capacidad de nodulación de esta con numerosas especies de soya. Los resultados de una mayor producción de factores Nod en los medios inducidos tuvieron una relación directa con resultados de nodulación, en ensayos posteriores a nivel de laboratorio, condiciones semicontroladas y de campo, que evidenciaron el papel de estas biomoléculas en la simbiosis, el crecimiento y desarrollo, así como de rendimiento del cultivo.

Estos trabajos demostraron también que la adición de un amplificador de la inducción de los genes *nod*,

cuando existen inductores fuertes en el medio, influye negativamente sobre la producción de los factores de nodulación (63, 64). Los resultados sugieren que para el éxito de la interacción, es importante contar con estructuras y concentraciones adecuadas de estas biomoléculas, por lo que debe tenerse en cuenta el diseño del medio de cultivo en la elaboración de inoculantes a base de *Bradyrhizobium*.

Los resultados abrieron la posibilidad de manejar algunas señales moleculares relacionadas con la nodulación en beneficio de la interacción *Bradyrhizobium-soya* y permitieron proponer un nuevo biopreparado para la inoculación de la soya (59, 65).

## OPTIMIZACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA *Bradyrhizobium*

En los procesos fermentativos microbianos, es necesaria la optimización del medio de cultivo y las condiciones ambientales, para explotar completamente el potencial de las cepas seleccionadas (66).

La obtención de un medio de cultivo optimizado, ya sea para el crecimiento o la producción de metabolitos por parte del microorganismo, requiere del empleo de un apropiado diseño estadístico (67).

El medio de cultivo propuesto por Nápoles (59, 65) tuvo en cuenta la multiplicación celular e inducción de la síntesis de factores de nodulación; sin embargo, este medio necesitaba ser optimizado para ambos parámetros. Este hecho, así como el conocer que no por mejores resultados una composición de medio de cultivo es la óptima, llevó a optimizar la multiplicación celular y síntesis de factores de nodulación por la cepa *Bradyrhizobium elkanii* ICA 8001.

Para la optimización del crecimiento microbiano se utilizó un diseño Central Compuesto, donde se variaron las concentraciones de melaza, extracto acuoso de soya y  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  como elementos esenciales

en el medio de cultivo. Como variable respuesta se determinó el número de unidades formadoras de colonias ( $\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). En el caso de la producción de factores Nod, la optimización se realizó mediante el empleo del diseño factorial de tres niveles y dos factores ( $3^2$ ) y como variable respuesta se utilizó el área total bajo la curva de los picos obtenidos por HPLC, correspondientes a moléculas de estos lipoquitinolisacáridos. Los factores seleccionados fueron la melaza y el extracto acuoso de soya, por su demostrado poder inductor sobre la producción de estos compuestos.

Las concentraciones de melaza y  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , así como la interacción melaza-extracto acuoso de soya influyeron positivamente en la multiplicación celular y producción de factores de nodulación por la cepa en estudio.

El biopreparado obtenido a escala de laboratorio, con el medio de cultivo optimizado para la producción de factores de nodulación, permitió un incremento significativo de la nodulación en soya.

A pesar de que las concentraciones óptimas de los componentes del medio para la producción de biomasa y de factores de nodulación no coincidieron con exactitud, existen rangos de concentraciones donde las zonas de óptimo para ambas variables respuestas se solapan. El resultado alcanzado permite proponer una estrategia de fermentación, que supone el empleo de una composición de medio de cultivo única: correspondiente al medio optimizado para la síntesis de factores de nodulación, basándose en que las concentraciones de compuestos inductores en dicho medio se encuentran dentro de la zona de valores óptimos para la multiplicación celular. Por tanto mediante esta vía, se verá potenciada tanto la producción de biomasa como de factores de nodulación.

Otra alternativa posible para la obtención de inoculantes para soya a base de *Bradyrhizobium elkanii* ICA 8001, es una fermentación en dos

etapas, donde una primera sería la preparación de un inóculo de alta densidad celular, empleando el medio de cultivo optimizado para el crecimiento. Posteriormente, una segunda etapa donde se potencie la síntesis de factores de nodulación en los cultivos, lo cual se garantiza mediante el uso del medio de cultivo optimizado para la producción de estas biomoléculas.

La elección de una u otra alternativa de fermentación responderá a las condiciones específicas de producción y también a un estudio más profundo de la eficiencia de los biopreparados obtenidos sobre la nodulación y el desarrollo de la soya.

El empleo de los diseños de optimización permitió obtener medios de cultivo más eficientes para la producción de inoculantes a base de *Bradyrhizobium elkanii* ICA 8001.

## SEÑALES DE COMUNICACIÓN CÉLULA A CÉLULA

Las células bacterianas detectan la densidad de su población mediante un sofisticado sistema de comunicación célula a célula. Es lo que se conoce como *quorum sensing* (68) y regula diversas actividades fisiológicas. Estos procesos incluyen virulencia, competencia, producción de antibióticos, movilidad y también se presenta en la simbiosis, como en el caso de la asociación *Rhizobium-leguminosa*. Se puede considerar que *quorum sensing* es el primer eslabón de la cadena que va desde el organismo unicelular al pluricelular, que hace, como en el caso de las biopelículas, que todas las células bacterianas funcionen como un todo; de ahí la importancia de conocer íntimamente este proceso, por las repercusiones que puede tener en numerosos ámbitos, uno de ellos, la mencionada simbiosis *Rhizobium-leguminosa*, donde se ha visto que es de vital importancia.

La eliminación en la bacteria de la capacidad de producir la correspondiente señal, un compuesto químico derivado de la acil homoserina lactona, repercute en el estableci-

miento de la asociación. Las plantas transgénicas dotadas del carácter de destruir o confundir la señal, afectan la simbiosis en el mismo sentido (69). Relacionado hasta cierto punto con esto, se ha encontrado (70) que el movimiento controlado de las células de *Rhizobium*, que se conoce como *swarming*, sobre la superficie de la raíz también afecta la simbiosis, posiblemente, y es pura especulación todavía, porque tal comportamiento actúa sobre el débil equilibrio que existe entre simbiosis y patogénesis.

La densidad celular de las poblaciones microbianas, así como el estadio fisiológico de ellas influyen sobre la producción de determinados metabolitos. Particularmente, la relación entre la densidad celular y la producción de factores de nodulación constituye un tema muy complejo y poco abordado.

Loh *et al.* (71) demostraron que la inducción de los genes *nod* en *Bradyrhizobium japonicum* es uno de los tantos comportamientos regulados en dependencia de la densidad celular de la población. En dicho estudio se evidenció una autorregulación negativa, pues cuando se utilizaron cultivos con elevadas densidades celulares, los niveles de inducción de dichos genes disminuyeron.

Nuestros resultados al evaluar el comportamiento de la multiplicación celular de *Bradyrhizobium elkanii* cepa ICA 8001, así como la concentración de factores de nodulación producidos en el tiempo, mostraron muy poca variación en la producción de estos últimos hasta las 58 h de cultivo (72). La mayor concentración de estos metabolitos se obtuvo a las 72 h de crecimiento, correspondiéndose este tiempo con la fase estacionaria del crecimiento de la población (73), lo que sugiere que la producción de estos metabolitos no está asociada al crecimiento microbiano.

La estructura básica de los factores de nodulación es muy similar a la de los lipopolisacáridos presentes en la pared de las bacterias Gram negativas. Es posible que durante la fase de crecimiento activo de la po-

blación, los precursores de ambas moléculas estén mayoritariamente destinados a garantizar la formación de dichas estructuras, vitales para el buen funcionamiento de las células. Llegada la fase estacionaria pudiera favorecerse la síntesis de los factores de nodulación, pues las células ya no requieren de un suministro constante de biomoléculas esenciales para la síntesis de nuevas estructuras. También podría pensarse en una mayor disponibilidad de precursores para la síntesis de los factores de nodulación, producto de la escisión de fragmentos de la pared celular en respuesta a esta fase del cultivo.

Diouf *et al.* (74) evaluaron el efecto del estadio fisiológico de *Rhizobium* LdK4 sobre la nodulación de la leguminosa forestal *Leucaena leucocephala*. El nivel de colonización fue significativamente superior cuando se empleó un cultivo bacteriano en fase estacionaria, ya que el número de nódulos se incrementó en un 36 % comparado con las plantas inoculadas con el cultivo en fase exponencial.

## FACTORES DE NODULACIÓN Y SU EFECTO ANTIESTRÉS

Condiciones de estrés como las temperaturas extremas, salinidad, acidez o sequía, afectan negativamente la simbiosis *rhizobium-leguminosa*, resultando en una pobre nodulación y bajos niveles de fijación de nitrógeno (75, 76).

Los cultivos de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* preinducidos con genisteína y metiljasmonato incrementaron la nodulación, la fijación del nitrógeno y el crecimiento del cultivo ante el efecto negativo de las bajas temperaturas (77).

Por su parte, otros evaluaron el impacto de lipoquitinolisacáridos aplicados (78) mediante aspersión foliar sobre la fisiología y productividad de plantas de soya sometidas a estrés por sequía. Los resultados correspondieron a un incremento en el número de flores y vainas, y una aceleración en la senescencia de las hojas.

Recientemente, hemos investigado sobre el posible papel de los factores Nod frente al estrés producido por el déficit de agua en el cultivo de soya. Para ello evaluamos el comportamiento de plantas inoculadas con un inóculo convencional y dos tratamientos en los que el inóculo fue previamente inducido con genisteína, frente a tres niveles de humedad: 30, 60 y 90 % de capacidad de campo. Los resultados arrojaron que ante la condición de estrés más severa, el empleo de la genisteína como inductor de la síntesis de los factores Nod favoreció el número de nódulos, la masa seca nodular y el contenido de nitrógeno en hojas. Una mejor respuesta a la sequía, por ende, se obtenía cuando los inóculos fueron producidos en presencia de inductores de los genes de nodulación.

## EMPLEO DE INOCULANTES INDUCIDOS EN LA SÍNTESIS DE LOS FACTORES NOD Y OTRAS OLIGOSACARINAS

De lo anteriormente descrito se puede concluir que, en la actualidad, un inoculante eficiente y competitivo es aquel que tiene no solamente altos niveles de concentración de la cepa más idónea, sino también concentraciones elevadas de los factores de nodulación específicos y tan necesarios en la simbiosis.

Existen diversos compuestos capaces de inducir la síntesis de factores de nodulación por el microorganismo, hasta hoy reconocidos: flavonoides, ácidos aldónicos y betaínas.

## POSIBLES EFECTOS BENEFICIOSOS DE LAS OLIGOSACARINAS EN LA SIMBIOSIS BACTERIA-LEGUMINOSAS

Los componentes polisacáridos y glicoproteicos de las paredes celulares de plantas y microorganismos constituyen una fuente de oligosacáridos, que una vez desprendidos actúan

como señales que activan respuestas defensivas y cambios en el crecimiento y desarrollo en la planta. El término oligosacarina se refiere, por tanto, a oligosacáridos de diferente origen que causan efectos biológicos en las plantas. Las oligosacarininas se denominan endógenas o exógenas, si son originadas en las paredes celulares del vegetal o del patógeno, respectivamente. Su estructura general consiste en una cadena de residuos glicósidos unidos por enlaces glicosídicos (79, 80).

Los LCO son considerados una oligosacarina de tipo exógena, ya que su estructura consiste en un esqueleto de N-acetil glucosamina, pero ramificado con una gama de sustituyentes específicos en cada interacción rizobio-leguminosa (81). Es conocido que la porción oligosacárida de esta molécula es reconocida por la membrana plasmática de las células de la planta (82) y juega un papel en la estimulación de la división celular, morfogénesis del sistema radicular y transducción de la señal conducente a la formación del nódulo (44, 83). Lo anterior sugiere que la estimulación de las raíces con oligosacáridos, cuya estructura consiste en residuos de N-acetil glucosamina, podría generar beneficios en la formación de nódulos radicales y, por tanto, en el proceso de simbiosis. Adicionalmente, otras oligosacarininas de diferentes estructuras pudieran probarse con este fin.

Los derivados de quitina, un polímero de N-acetil glucosamina, unidos por enlace  $\beta$  1-4 constituyen fuertes candidatos para el beneficio de la nodulación en leguminosas. Fragmentos menores y oligómeros de quitina y quitosana muestran una fortísima actividad fisiológica y pueden ser más activos que los polímeros de origen por ser más solubles, menos viscosos y más fácilmente absorbidos por las plantas (84).

Es escasa la información en la literatura acerca del efecto de oligosacarininas sobre la nodulación de leguminosas. El grupo de productos bioactivos del INCA ha evaluado dife-

rentes oligosacarininas endógenas (mezclas de oligopectatos) y exógenas (quitosana y sus derivados) sobre la nodulación *in vitro* de la soya por *Bradyrhizobium elkanii*, mediante imbibición de semillas y adicionadas al medio de cultivo vegetal donde se crecen las plántulas. El polímero de quitosana y fundamentalmente el polímero parcialmente hidrolizado causaron incremento en el número de nódulos y la biomasa nodular, en dependencia de la concentración y forma de aplicación de los derivados (85, 86). El empleo de oligosacáridos pécticos u oligogalacturónidos no mejoró la nodulación, aunque sí benefició la biomasa de los nódulos dependiendo de la concentración (86).

Resultados recientes demuestran que la adición de una mezcla de oligosacáridos de quitosana (grado de polimerización entre 5-9) al medio de cultivo vegetal, incrementa el número de nódulos, su biomasa y la longitud y biomasa radical de plántulas de soya inoculadas con *B. elkanii* en una amplia gama de concentraciones ensayadas.

También se evidenció en dinámicas de multiplicación y viabilidad celular de *B. elkanii* ICA 8001, que las oligosacarininas empleadas no inhibieron el crecimiento celular de la bacteria (86). Lo anterior justificaría la adición de estas oligosacarininas a los inoculantes, sin afectar el crecimiento del microsimbionte y potenciar así la nodulación en soya.

Los efectos beneficiosos de los oligosacáridos de quitina y quitosana sobre la nodulación pudieran explicarse en función de los diferentes efectos biológicos que estos derivados provocan en las plantas. Primeramente, por su acción como reguladores del crecimiento de diversos cultivos (87, 88) que se refleja en un incremento y mejoramiento del sistema radical. En segundo lugar, por su similitud estructural a la parte oligosacárida de los factores de nodulación, que podría confundir o desviar la función primaria de estas estructuras en los pelos radicales de las leguminosas (33, 89).

Finalmente, por su acción elicitora de las respuestas defensivas en la planta a través de la inducción del metabolismo secundario defensivo, que en la soya coincide con la formación de fitoalexinas de tipo isoflavonoide. Al aumentar la concentración de isoflavonoides en los exudados en soya (90), se estaría beneficiando la activación de los genes *nod* en la bacteria, lo que se traduciría en la síntesis de mayor cantidad de estos morfógenos y finalmente en una mejor nodulación.

## OTRA VENTAJA DE LA UTILIZACIÓN DE LAS OLIGOSACARINAS Y LCO EN LOS BIOINOCULANTES

Como se ha dicho anteriormente, una de las más importantes funciones de las oligosacarinas en las plantas es la inducción de respuestas defensivas y resistencia contra diversos patógenos (91). Este tema ha sido ampliamente estudiado y se ha demostrado la protección de varios cultivos contra sus principales patógenos con las más conocidas oligosacarinas (92, 93, 94).

Por otra parte, investigaciones recientes indican que la aplicación de factores Nod induce también resistencia en plantas de soya contra la infección causada por *Microsphaera difusa* (95), lo que permite pensar que la planta de soya es capaz de movilizar su potencial defensivo contra un patógeno concreto, como respuesta a una señal que al mismo tiempo promueve la simbiosis con otro microorganismo. Lo anterior es un ejemplo de lo complejo de las interacciones planta-microorganismo y abre nuevas incógnitas en el tema, como esta: ¿Es el LCO una molécula única en su capacidad de inducir una respuesta dual y contraria en la planta? o ¿pueden otras oligosacarinas de quitina y quitosana promover la misma respuesta en la planta?

Por tanto, no se puede descartar que tanto los factores Nod como la aplicación de oligosacarinas de quitina o quitosana en la forma y momentos adecuados, permitan ele-

var la eficacia de estos bioproductos, al provocar un efecto aditivo al beneficio de la simbiosis mediante la elevación de los niveles de resistencia del cultivo frente a sus patógenos. Desde este punto de vista, un inoculante será más eficiente y multipropósito en la medida que tenga además de elevados títulos bacterianos, una elevada concentración de factores Nod y otras oligosacarinas.

## REFERENCIAS

1. Stacey, G.; Evans, H. y Burris, R. Biological Nitrogen Fixation. New York : Chapman & Hall, 1992.
2. Downie, J. A. Signalling strategies for nodulation of legumes by rhizobia. *Trends Microbiol*, 1994, vol. 2, no. 9, p. 318-324.
3. Spaink, H. P.; Kondorosi, A. y Hooykaas, P. J. J. The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria. Dordrecht : Kluwer Academic Publishers, 1998.
4. Lerouge, P.; Roche, P.; Faucher, C.; Mailler, F.; Truchet, G.; Prome, J.C. y Denarié, J. Symbiotic host-specificity *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature*, 1990, vol. 344, p. 781-784.
5. Hadri, A. E.; Spaink, H. P.; Bisseling, T. y Brewin, N. J. Diversity of root nodulation and rhizobial infection processes. En H. P. Spaink, A. Kondorosi and P. J. J. Hooykaas (eds), 1998.
6. Spaink, H. P.; Sheeley, D. M.; van Brussel, A.; Glushka, J.; York, W. S.; Tak, T.; Geiger, O.; Kennedy, E. P.; Reinhold, V. N. y Lugtenberg B. J. J. A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipo-oligosaccharide signals determines host specificity of *Rhizobium*. *Nature*, 1991, vol. 354, p. 125-130.
7. Schultze, M.; Quiclet-Sire, B.; Kondorosi, E.; Virelizier, H.; Glushka, J. N.; Endre, G.; Gero, S. D. y Kondorosi, A. *Rhizobium meliloti* produces a family of sulphated lipo-oligosaccharides exhibiting different degrees of plant host specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 1992, vol. 89 p. 192-196.
8. Lindstrom, K.; Terefework, Z.; Suominen, L. y Lortet, G. Signalling and development of *Rhizobium-legume* symbioses. Biology and Environment: *Proceedings of the Royal Irish Academy*, 2002, vol. 102B, no. 1, p. 61-64.
9. Kamst, E.; Spaink, H. P. y Kafetzopoulos, D. Biosynthesis and secretion of rhizobial lipo-chitin-oligosaccharide signal molecules. En Biswas, B. B. and Das, H. K. (eds.), *Plant-microbe interactions - subcellular biochemistry*. New York : Plenum Press, 1998, p. 29-71.
10. Dénarié, J.; Debelle, F. y Promé, J. C. *Rhizobium* lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu. Rev. Biochem*, 1996, vol. 65, p. 503-535.
11. Cullimore, J. V.; Ranjeva, R. y Bono, J. J. Perception of lipo-chitooligosaccharidic Nod factors in legumes. *Trends Plant Sci*, 2001, vol. 6, p. 24-30.
12. Perret, X.; Staehelin, C. y Broughton, W. J. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2000, vol. 64, p. 180-201.
13. Poupot, R.; Martinez-Romero, E.; Gautier, N. y Promé, J. C. Wild type *Rhizobium etli*, a bean symbiont, produces acetyl-fucosylated, N-methylated, and carbamoylated nodulation factors. *J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 270, p. 6050-6055.
14. Yang, G. P.; Debelle, F.; Savagnac, A.; Ferro, M.; Schiltz, O.; Mailler, F.; Promé, D.; Treilhou, M.; Vialas, C. y Lindström, K. Structure of the *Mesorhizobium huakuii* and *Rhizobium galegae* Nod factors: a cluster of phylogenetically related legumes are nodulated by rhizobia producing Nod factors with  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated N-acyl substitutions. *Mol. Microbiol.*, 1999, vol. 34, p. 227-237.
15. Stokkermans, T. J. W.; Ron, O.; Kumar, V. S.; Russell, C. W. y Peters, N. K. Biological activities and structures of *Bradyrhizobium elkanii* low abundance lipo-chitin-oligosaccharides. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1996, vol. 9, p. 298-304.
16. D'Haese, W. y Holsters, M. Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. *Glyco-biology*, 2002, vol. 12, no. 6, p.79-105.

17. Geremia, R. A.; Mergaert, P.; Geelen, D.; van Montagu, M. y Holsters, M. The Nod C protein of *Azorhizobium caulinodans* is an N-acetylglucosaminyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, vol. 91, p. 2669-2673.
18. Kamst, E.; Pilling, J.; Raamsdonk, L. M.; Lugtenberg, B. J. J. y Spaink, H. P. *Rhizobium* nodulation protein NodC is an important determinant of chitin oligosaccharide chain length in Nod factor biosynthesis. *J. Bacteriol.*, 1997, vol. 179, p. 2103-2108.
19. Kamst, E.; Bakkers, J.; Quaedvlieg, N. E.; Pilling, J.; Kijne, J. W.; Lugtenberg, B. J. J. y Spaink, H. P. Chitin oligosaccharide synthesis by rhizobia and zebrafish embryos starts by glycosyl transfer to O4 of the reducing-terminal residue. *Biochemistry*, 1999, vol. 38, p. 4045-4052.
20. Debellé, F. C.; Plaz Janet, P.; Roche, C.; Pujol, A.; Savagnac, C.; Rosenberg, J. C.; Promé, J. C. y Dénarié, J. The NodA proteins of *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium tropici* specify the N-acylation of Nod factors by different fatty acids. *Mol. Microbiol.*, 1996, vol. 22, p. 303-314.
21. Cárdenas, L.; Domínguez, J.; Santana, O. y Quinto, C. The role of *nodI* and *nodJ* genes in the transport of Nod metabolites in *Rhizobium etli*. *Gene*, 1996, vol. 173, p. 183-187.
22. Fernández-López, M.; D'Haese, W.; Mergaert, P.; Verplanck, C.; Promé, J. C.; van Montagu, M. y Holsters, M. Role of *nodI* and *nodJ* in lipochitooligosaccharide secretion in *Azorhizobium caulinodans* and *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 1996, vol. 20, p. 993-1000.
23. Schmidt, J.; Röhrig, H.; John, M.; Wieneke, U.; Koncz, C.; Gary, S. y Schell, J. Alteration of plant growth and development by *Rhizobium nodA* and *nodB* genes involved in the synthesis of oligosaccharide signal molecules. *Plant J.*, 1993, vol. 4, p. 651-658.
24. Röhrig, H.; Schmidt, J.; Wieneke, U.; Kondorosi, E.; Barlier, I.; Schell, J. y John, M. Biosynthesis of lipooligosaccharide nodulation factors: *Rhizobium* NodA protein is involved in N-Acylation of the chitooligosaccharide backbone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, vol. 91, p. 3122-3126.
25. Staehelin, C.; Granada, J.; Müller, J.; Wiemken, A.; Mellor, R.; Felix, G.; Regenaas, M.; Broughton, W. y Boller, T. Perception of *Rhizobium* nodulation factors by tomato cells and inactivation by root chitinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, vol. 91, p. 2196-2200.
26. De Jong, A.; Heidstra, R.; Spaink, H.; Hartog, M.; Meijer, E.; Hendriks, T.; Schiavo, F.; Terzi, M.; Bisseling, T.; Van Kammen, A. y Vries, S. de. *Rhizobium* lipooligosaccharides rescue a carrot somatic embryo mutant. *The Plant Cell*, 1993, vol. 5, p. 615-620.
27. Lian, B.; Prithiviraj, B.; Souleimanov, A. y Smith, D. Evidence for the production of chemical compound analogous to nod factor by the silicate bacterium *Bacillus circulans* GY92. *Microbiol. Res.*, 2001, vol. 156, no. 3, p. 289-292.
28. Spaink, H. P.; Bloemberg, G. V.; van Brussel, A. A.; Lugtenberg, B. J.; van der Drift, K. M.; Haverkamp, J. y Thomas-Oates, J. E. Host specificity of *Rhizobium leguminosarum* is determined by the hydrophobicity of highly unsaturated fatty acyl moieties of the nodulation factors. *MPMI*, 1995, vol. 8, no.1, p. 155-164.
29. Relic, B.; Perret, X.; Estradarcía, M. T.; Kopcinska, J. y Golinowski, W. Nod factors of *Rhizobium* are the key to the legume door. *Mol. Microbiol.*, 1994, vol. 13, p. 171-178.
30. Fisher, R. F. y Long, S. R. *Rhizobium*-plant signal exchange. *Nature*. 1992, vol. 357, p. 655-660.
31. Dénarié, J. y Cullimore, J. Lipooligosaccharide nodulation factors: a new class of signalling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Cell*, 1993, vol. 74, p. 951-954.
32. Sanjuan, J.; Carlson, R. W.; Spaink, H. P.; Bhat, U. R.; Barbour, W. M.; Glushka, J. y Stacey, G. A 2-O-methylfucose moiety is present in the lipo-oligosaccharide nodulation signal of *Bradyrhizobium japonicum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 1992, vol. 89, p. 8789-8793.
33. Schulaman, H. R.; Gisel, A. A.; Quaedvlieg, N. E.; Bloemberg, G. V.; Lugtenberg, B. J.; Kijne, J. W.; Potrykus, I.; Spaink, H. P. y Sautter, C. Chitin oligosaccharides can induce cortical cell division in roots of *Vicia sativa* when delivered by ballistic microtargeting. *Development*, 1997, vol. 124, p. 4887-4895.
34. Horvath, B.; Heidstra, R.; Lados, M.; Moerman, M.; Spaink, H. P.; Promé, J. C.; van Kammen, A. y Bisseling, T. Lipo-chito-oligosaccharide of *Rhizobium* induce infection-related early nodulin gene expression in pea root hairs. *The Plant Journal*, 1993, vol. 4, p. 727-733.
35. Pichon, M.; Journet, E. P.; Dedieu, A.; De Billy, F.; Huguet, T.; Truchet, G. y Barker, D. G. Expression of the *Medicago truncatula* ENOD 12 gene in response to *R. meliloti* Nod factors and during spontaneous nodulation in transgenic alfalfa. En: Palacios R, Mora J, Newton WE, eds. New horizons in nitrogen fixation. Dordrecht : Kluwer Academic Publishers, 1993, p. 285-290.
36. Minami, E.; Kouchi, H.; Carlson, R. W.; Cohn, J. R.; Kolli, V. K.; Day, R. B.; Ogawa, T. y Stacey, G. Co-operative action of lipo-chitin nodulation signals on the induction of the early nodulin, ENOD2, in soybean roots. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1996, vol. 9, p. 574-583.
37. Van Brussel, A.; Bakhuizen, R.; Van Spronsen, P. C.; Spaink, H. P.; Tak, T.; Lugtenberg, B. J. J. y Kijne, J. W. Induction of pre-infection thread structures in the leguminous host plant by mitogenic lipo-oligosaccharides of *Rhizobium*. *Science*, 1992, vol. 257, p. 70-72.
38. Scheres, B.; van de Wiel, C.; Zalensky, A.; Horvath, B.; Spaink, H.; van Eck, H.; Zwartkruis, F.; Wolters, A. M.; Gloudemans, T. y van Kammen, A. The ENOD12 gene product is involved in the infection process during the pea-*Rhizobium* interaction. *Cell*, 1990, vol. 60, p. 281-294.
39. Pichon, M.; Journet, E. P.; Dedieu, A.; De Billy, F.; Truchet, G.; Barker, D. G. *Rhizobium meliloti* elicits transient expression of the early nodulin gene ENOD12 in the differentiating root epidermis of transgenic alfalfa. *Plant Cell*, 1992, vol. 4, p. 1199-1211.
40. Yang, W. C.; Katinakis, P.; Hendriks, P.; Smolders, A.; Vries, F. de; Spee, J.; Van Kammen, A.; Bisseling, T. y Franssen, H. Characterization of *Gm-ENOD40*, a gene showing novel patterns of cell-specific expression during soybean nodule development. *Plant J.*, 1993, vol. 3, p. 573-585.

41. Pingret, J. L.; Journet, E. P. y Barker, D. G. *Rhizobium* Nod factor signaling: evidence for a G protein-mediated transduction mechanism. *Plant Cell*, 1998, vol. 10, p. 659-672.
42. Compaan, B.; Yang, W. C.; Bisseling, T. y Franssen, H. ENOD40 expression in the pericycle precedes cortical cell division in *Rhizobium*-legume interaction and the highly conserved internal region of the gene does not encode a peptide. *Plant Soil*, 2001, vol. 230, p. 1-8.
43. Journet, E. P.; El-Gachtouli, N.; Vernoud, V.; Billy, F. de; Pichon, M.; Dedieu, A.; Arnould, C.; Morandi, D.; Barker, D. G. y Gianinazzi-Pearson, V. *Medicago truncatula* ENOD11: a novel RPRP-encoding early nodulin gene expressed during mycorrhization in arbuscule-containing cells. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2001, vol. 14, p. 737-748.
44. Esseling, J. J.; Lhuissier, F. G.; Emons, A. M. Nod factor-induced root hair curling: continuous polar growth towards the point of nod factor application. *Plant Physiol.*, 2003, vol. 132, no. 4, p. 1982-1988.
45. Catoira, R.; Timmers, A. C. J.; Maillet, F.; Galera, C.; Penmetsa, R. V.; Cook, D.; Dénarié, J. y Gough, C. The *HCL* gene of *Medicago truncatula* controls *Rhizobium*-induced root hair curling. *Development*, 2001, vol. 128, p. 1507-1518.
46. Inui, H.; Yamaguchi, Y. y Hirano, S. Elicitor actions of *N*-acetylchitooligosaccharides and laminarioligosaccharides for chitinase and L-phenylalanine ammonia-lyase induction in rice suspension culture. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 1997, vol. 61, p. 975-978.
47. Dakora, F. Defining new roles for plant and rhizobial molecules in sole and mixed plant cultures involving symbiotic legumes. *New Phytologist*, 2003, vol. 158, no.1, p. 39.
48. Zhang, F. y Smith, D. L. Interorganismal signalling in suboptimum environments: the legume-rhizobia symbiosis. *Advances in Agronomy*, 2001, vol. 76, p. 125-161.
49. Smith, D. L.; Prithiviraj, B. y Zhang, F. Rhizobial signals and control of plant growth. En: Finan TM, O'Brian MR, Layzell DB, Vessy K, Newton WE, eds. *Nitrogen fixation: global perspectives*. Wallingford, CAB International, 2002, p. 327-330.
50. Felle, H. H.; Kondorosi, E.; Kondorosi, A. y Schultze, M. The role of ion fluxes in Nod factor signalling in *Medicago sativa*. *Plant J.*, 1998, vol. 13, p. 455-463.
51. Ehrhardt, D. W.; Atkinson, E. M. y Long, S. R. Depolarization of alfalfa root hair membrane potential by *Rhizobium meliloti* Nod factors. *Science*, 1992, vol. 256, p. 998-1000.
52. Kurkdjian, A. C.; Bouteau, F.; Pennarun, A. M. Convert, M., Comel, D.; Rona, J. P. y Bousquet, U. Ion currents involved in early Nod factor response in *Medicago sativa* root hairs: a discontinuous single-electrode voltage-clamp study. *Plant J.*, 2000, vol. 22, p. 9-17.
53. Ehrhardt, D. W.; Wais, R. y Long, S. R. Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals. *Cell*, 1996, vol. 85, p. 673-681.
54. Xie, Z. P.; Staehelin, C.; Vierheilig, H.; Wiemken, A.; Jabbouri, S.; Broughton, W. J.; Vögeli-Lange, R. y Boller, T. Rhizobial nodulation factors stimulate mycorrhizal colonization of nodulating and nonnodulating soybeans. *Plant Physiol.*, 1995, vol. 108, p. 1519-1525.
55. Mathesius, U.; Schlaman, H. R. M.; Spaink, H. P.; Sautter, C.; Rolfe, B. G. y Djordjevic, M. A. Auxin transport inhibition precedes root nodule formation in white clover roots and is regulated by flavonoids and derivatives of chitin oligosaccharides. *Plant J.*, 1998, vol. 14, p. 23-34.
56. Bowen, W.; Carroll, W.; Bransford, J. y S. Glenn. Propagación industrial de microorganismos. En: *Microbiología General y Aplicada*. Salvat Editora, 1963. p. 185-196.
57. Nápoles, M. C.; Gutiérrez, A. y Varela, M. Comportamiento de una cepa de *Bradyrhizobium japonicum* en nuevos medios de cultivo que contienen inductores de la síntesis de los factores de nodulación. *Cultivos Tropicales*, 1998, vol. 19, no.1, p. 25-27.
58. Corbera, J. y Nápoles, M. C. Evaluación agronómica de la coinoculación de *Bradyrhizobium japonicum* y hongos micorrizógenos arbusculares en el cultivo de la soya sobre suelo Ferralítico Rojo compactado. *Cultivos Tropicales*, 2000, vol. 21, no.1, p. 21-25.
59. Nápoles, M. C. Inducción de la nodulación en soya por *Bradyrhizobium* sp. Influencia del medio de cultivo. [Tesis de Doctorado]; Universidad de La Habana, 2003.
60. Nápoles, M. C.; Luyten, E.; Dombrecht, B.; Laeremans, T.; Vanderleyden, J.; Costales, D.; Gutiérrez, A. y Corbera, J. Growth media modulating the symbiotic efficiency of *Bradyrhizobium elkanii*. *Symbiosis*, 2005, vol. 38, no.1, p. 87-98.
61. Nápoles, M. C.; Luyten, E.; Dombrecht, B. y Vanderleyden, J. *Bradyrhizobium elkanii* ICA 8001 *gusA*: a new strain to evaluate the nodulation gene expression. *Cultivos Tropicales*, 2003, vol. 24, no. 3, p. 33-37.
62. Nápoles, M. C.; Martínez, J.; Costales, D.; Morales, B.; Martínez, E. y Rogel, M. Avances en la reidentificación de la cepa ICA 8001 (*Bradyrhizobium japonicum*) como perteneciente a *Bradyrhizobium elkanii*. *Biología*, 2006, vol. 20, no.1-2, p. 43-46.
63. Nápoles, M. C.; Gutiérrez, A.; Laeremans, T. y J. Vanderleyden. The analysis of nodulation factors as a tool in the design of new culture media for *Bradyrhizobium japonicum*. *Cultivos Tropicales*, 1999, vol. 20, no.2, p. 79-81.
64. Nápoles, M. C.; Cabrera, J.; Luyten, E.; Dombrecht, B. y Vanderleyden, J. Study of the inducer effect of Molasses and Soybean Cake on synthesis and excretion of nodulation factors in different strain of *Bradyrhizobium japonicum*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 2001, vol. 43, no.1, p. 7-11.
65. Patente de Invención No. 22 797, OCPI, Cuba: "Medio de cultivo para *Bradyrhizobium japonicum*. Biopreparado resultante." 2002.
66. Parekh, S.; Vinci, V. A. y Strobel, R. J. Improvement of microbial strains and fermentation processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2000, vol. 54, p. 287-301.
67. Gómez, G. y Batista, C. Optimización de medios de cultivos para microorganismos, una valiosa estrategia para la producción de biopreparados de interés agrícola. *Cultivos Tropicales*, 2006, vol. 27, no. 3, p. 17-24.

68. Miller, M. y Nassier, B. Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2001, vol. 55, p. 165-199.
69. Zhang, L. Quorum quenching and proactive host defense. *Trends in Plant Sci.*, 2003, vol. 8, p. 238-244.
70. Soto, M.; Fernández-Pascual, M.; Sanjuan, J. y Olivares, J. A fadD mutant of *Sinorhizobium meliloti* shows multicellular swarming migration and is impaired in nodulation efficiency on alfalfa roots. *Mol. Microbiol.*, 2002, vol. 43, p. 371.
71. Loh, J.; Yuen-Tsai, J.; Stacey, M.; Dasharath, L.; Welborn, A. y Stacey, G. Population density-dependent regulation of the *Bradyrhizobium japonicum* nodulation genes. *Molecular Microbiology*, 2001, vol. 42, p. 37-46.
72. Gómez, G. Optimización de la producción de biomasa y factores de nodulación por *Bradyrhizobium elkanii* ICA 8001. [Tesis de de Maestría]; Universidad de La Habana, 2007.
73. Nápoles, M. C.; Martínez, J.; Costales, D.; Gómez, G y Somers, E. Efecto del medio de cultivo en la multiplicación celular de *Bradyrhizobium elkanii*. *Cultivos Tropicales*, 2006, vol 27, no 1, p. 35-38.
74. Diouf, D.; Forestier, S.; Neyra, M. y Lesueur, D. Optimisation of inoculation of *Leucaena leucocephala* and *Acaia mangium* with *Rhizobium* under greenhouse conditions. *Ann. For. Sci.*, 2003, vol. 60, p. 379-384.
75. Zhang, H.; Prithiviraj, B.; Souleimanov, A.; Aoust, F., Charles, T.; Driscoll, B. y Smith, D. The effect of temperature and genistein concentration on lipo-quitooligosaccharide (LCO) production by wild-type and mutant strains of *Bradyrhizobium japonicum*. *Soil Biology and Biochemistry*, 2002, vol. 34, p. 1175-1180.
76. Duzan, H.; Zhou, X.; Souleimanov, A y Smith, D. Perception of *Bradyrhizobium japonicum* Nod factor by soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] root hairs under abiotic stress conditions. *Journal of Experimental Botany*, 2004, vol. 55, no. 408, p. 2641-2646.
77. Poustini, K.; Mabood, F. y Smith, L. D. Low root zone temperature effects on bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants inoculated with *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* preincubated with methyl jasmonate and/or genistein. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B-Plant Soil Science*, 2005, vol. 55, no. 4, p. 293-298.
78. Atti, S.; Bonnell, R.; Prasher, S. y Smith, D. L. Response of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) under chronic water deficit to LCO application during flowering and pod filling. *Irrigation and Drainage*, 2005, vol. 54, no.1, p. 15-30.
79. Coté, F.; Ham, K. S.; Hahn, M. G. y Bergman, C. W. Oligosaccharide elicitors in host-pathogen interactions: Generation, perception, and signal transduction. En: Biswas, B. B., Das, H. (Eds.), *Subcellular biochemistry*, New York: Plenum Press, 1998, p. 385-431.
80. Shibuya, N. y Minami, E. Oligosaccharide signalling for defense responses in plant. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2001, vol. 59, p. 223-233.
81. Spaink, H. P. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.*, 2000, vol. 54, p. 257-288.
82. Day, R. B.; Okada, M.; Ito, Y.; Tsukada, K.; Zaghouani, H.; Shibuya, N. y Stacey, G. Binding site for chitin oligosaccharides in the soybean plasma membrane. *Plant Physiol.*, 2001, vol. 126, no. 3, p. 1162-1173.
83. Charron, D.; Pingret, J. L.; Chabaud, M.; Journet, E. P. y Barker, D. G. Pharmacological evidence that multiple phospholipid signaling pathways link *Rhizobium* nodulation factor perception in *Medicago truncatula* root hairs to intracellular responses, including Ca<sup>2+</sup> spiking and specific *ENOD* gene expression. *Plant Physiology*, 2004, vol. 136, p. 3582-3593.
84. Jeon, Y. J.; Shahidi, F. y Kim, S. K. Preparation of chitin and chitosan oligomers and their applications in physiological functional foods. *Food Rev. Int.*, 2000, vol. 16, no. 2, p. 159-176.
85. Costales, D.; Nápoles, M. C. y Falcón, A. B. Efecto de derivados de quitosana en la simbiosis *Bradyrhizobium-soya*. *Cultivos Tropicales*, 2005, vol. 26, no. 1, p. 83-87.
86. Costales, D.; Nápoles, M. C. y Falcón, A. B. Influencia de oligosacáridos de quitosana y pectina en la interacción simbiótica *Soya-Bradyrhizobium*. *Cuban J. Agric. Science*, 2007, vol. 41 (2-3).
87. Utsunomiya, N.; Kinai, H.; Matsui, Y. y Takebayashi, T. The effects of chitosan oligosaccharides soil conditioner and nitrogen fertilizer on the flowering and fruit growth of purple passion fruit (*Pasiflora edulis* Sims var. *edulis*). *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 1998, vol. 67, p. 567-571.
88. Khan, W.; Prithiviraj, B. y Smith, D. L. Effect of foliar application of chitin and chitosan oligosaccharides on photosynthesis of maize and soybean. *Photosynthetica*, 2002, vol. 40, p. 621-624.
89. Díaz, C. L.; Spaink, H. P. y Kijne, J. W. Heterologous rhizobial lipochitin oligosaccharides and chitin oligomers induce cortical cell divisions in red clover roots, transformed with the pea lectin gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2000, vol. 13, no. 3, p. 268-276.
90. Mal-Tawaha, A.; Seguin, P.; Smith, D. L. y Beaulieu, C. Biotic elicitors as of increasing isoflavone concentration of soybean seeds. *Annals of Applied Biology*, 2005, vol. 146, p. 303-310.
91. Ridley, B. L.; O'Neill, M. A. y Mohnen, D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, 2001, vol. 57, p. 929-967.
92. Aziz, A.; Poinssot, B.; Daire, X.; Adrian, A.; Bézier, A.; Lambert, B.; Joubert, J. M. y Pugin, A. Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 2003, vol. 16, no. 12, p. 1118-1128.
93. Trotel-Aziz, P.; Couderchet, M.; Vernet, G. y Aziz, A. Chitosan stimulates defense reactions in grapevine leaves and inhibits development of *Botrytis cinerea*. *European J. Plant Pathology*, 2006, vol. 114, p. 405-413.
94. Falcón, A.; Cabrera, J. C.; Costales, D.; Ramírez, M. A.; Cabrera, G.; Toledo, V. y Martínez-Télez, M. A. The effect of size and acetylation degree of chitosan derivatives on tobacco plant protection against *Phytophthora parasitica nicotianae*. *World J. Microbiol Biotech.* 2008, vol. 24, p. 103-112.
95. Duzan, H.; Mabood, F.; Zhou, X.; Souleimanov, A y Smith, D. Nod factor induces soybean resistance to powdery mildew. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2005, vol. 43, no. 10-11, p. 1022-1030.

Recibido: 29 de octubre de 2007

Aceptado: 16 de julio de 2008