

INFLUENCIA DE UN ANÁLOGO DE BRASINOESTEROIDE SOBRE LA NODULACIÓN DE PLÁNTULAS DE SOYA (*Glycine max* (L) Merrill)

Daimy Costales[✉], María C. Nápoles, A. Falcón y Miriam Núñez

ABSTRACT. Plant hormones control all developing processes, including the beginning, evolution and efficiency of nitrogen fixation in leguminous root nodules through a self-regulating mechanism. However, the substances involved in regulating nodulation have not been fully identified, due to multiple interactions between phytohormones and other signaling compounds (nitric oxide, reactive-oxygen species, jasmonic acid, salicylic acid, uridin, flavonoids and nodulating factors synthesized by rhizobia). Brassinosteroid analogues have a similar mode of action to natural brassinosteroids in plants. The effect of a brassinosteroid analogue (Biobras-16) on soybean (*Glycine max* L.) seedling *in vitro* nodulation was evaluated in this investigation. Biobras-16 enhanced the response to Bradyrhizobium-soybean symbiotic interaction when soybean seeds were imbibed, thus obtaining similar or higher values than the control in every nodulation variable analyzed at the concentrations tested (0.01, 0.05 and 0.10 mg.L⁻¹). Nevertheless, when the analogue was added to plant culture media, the number of nodules was reduced compared to control plants. Results prove the use of a brassinosteroid analogue to improve the response of Bradyrhizobium-soybean symbiotic interaction by previously imbibing soybean seeds.

RESUMEN. Las hormonas controlan los procesos de desarrollo de la planta, incluyendo la iniciación, el desarrollo y la eficiencia de la fijación del nitrógeno en los nódulos de las raíces de las leguminosas, a través de un mecanismo de autorregulación. Sin embargo, las sustancias involucradas en la regulación de la nodulación no han sido totalmente identificadas, debido a las múltiples interacciones entre las fitohormonas y otros compuestos señalizadores (óxido nítrico, especies reactivas de oxígeno, ácido jasmónico, ácido salicílico, uridina, flavonoides y los factores de nodulación sintetizados por los rizobios). Los análogos de brasinoesteroides tienen similar modo de acción a los brasinoesteroides naturales de las plantas. En el trabajo se evaluó el efecto de un análogo de brasinoesteroides (Biobras-16) sobre la nodulación *in vitro* de plántulas de soya (*Glycine max* L.). El Biobras-16 mejoró la respuesta de la interacción simbiótica Bradyrhizobium-soya cuando se embibieron las semillas de soya, obteniéndose valores similares o superiores al control en todas las variables de nodulación analizadas con las concentraciones ensayadas (0.01, 0.05 y 0.10 mg.L⁻¹). Sin embargo, cuando el análogo fue añadido al medio de cultivo vegetal, se redujo el número de nódulos comparado con las plantas controles. Los resultados justifican el empleo del análogo de brasinoesteroide para mejorar la respuesta de la interacción simbiótica Bradyrhizobium-soya por imbibición previa de las semillas de soya.

Key words: nodulation, soybean, brassinosteroids

Palabras clave: nodulación, soya, brasinoesteroides

INTRODUCCIÓN

El desarrollo vegetal se encuentra regulado por la acción de fitohormonas, que activan o reprimen determinados procesos fisiológicos, interactuando entre sí. Los brasinoesteroides son polihidroxiesteroides de 27-29 átomos de carbono, que se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal a muy bajas concentraciones, aunque pueden ser obtenidos por síntesis química y, por su modo de acción, se consideran actualmente la sexta clase de hormonas vegetales (1).

Se ha observado una amplia variedad de respuestas fisiológicas con el empleo de brasinoesteroides, incluyendo los efectos sobre la elongación, división celular, el desarrollo vascular y reproductivo, la polarización de la membrana y modulación del estrés (2). Además de estos efectos, se han informado otros, como la regulación de la diferenciación de las células xilemáticas, translocación de asimilatos y estimulación de la actividad fotosintética (2). Los brasinoesteroides y sus análogos son considerados hormonas antiestrés, debido al papel protector que ejercen sobre los cultivos sometidos a diferentes estrés, como la deficiencia hídrica, las altas temperaturas, salinidad y acumulación de metales pesados (3, 4, 5, 6, 7, 8). Por otra parte, los brasinoesteroides mejoran el vigor de las semillas y aceleran su proceso germinativo (9).

Daimy Costales, Investigadora; Dra.C. María C. Nápoles y Dr.C. Miriam Núñez, Investigadoras Titulares y Ms.C. A. Falcón, Investigador Auxiliar del Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, San José de las Lajas, La Habana, Cuba, CP 32 700.

✉ daimy@inca.edu.cu

En la interacción simbiótica entre las legumbres y los rizobios se produce un complejo intercambio de señales moleculares, que da lugar a la formación de nódulos en las raíces de la planta y su infección por el microsimbionte (10,11). Los procesos de iniciación, desarrollo y eficiencia de la fijación del nitrógeno en los nódulos, son modulados por reguladores del crecimiento vegetal. Se ha informado que la aplicación exógena de auxinas (ácido indolacético) y citoquininas promueven la nodulación en alfalfa y trébol blanco, respectivamente (12, 13). Otros autores demostraron que tanto la simbiosis como la actividad nitrogenasa en los nódulos desarrollados en el cultivo del maní, fueron beneficiadas en presencia de un brasinoesteroide natural (14).

En Cuba, se han sintetizado químicamente a partir de esteroides naturales, diferentes análogos de brasinoesteroides, que han sido probados en el cultivo *in vitro* para la formación de callos embriogénicos (15, 16, 17, 18). Además, se han obtenido resultados satisfactorios en la estimulación del enraizamiento (19) y los rendimientos de diferentes cultivos (15, 20).

No existen referencias acerca del papel de los análogos de brasinoesteroides en el proceso de simbiosis de rizobios-leguminosas, por lo que el objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de dos formas de aplicación de un análogo espiroestánico de brasinoesteroides (BB-16) sobre la nodulación de plántulas de soya por *B. elkanii*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron dos experimentos en condiciones controladas, para evaluar el efecto de un análogo espiroestánico de brasinoesteroides sobre algunos indicadores de la nodulación de la soya. En ambos experimentos se utilizó el Biobras-16 (BB-16), que es una formulación que tiene como ingrediente activo un análogo espiroestánico de brasinoesteroide y fue suministrado por el Centro de Estudios de Productos Naturales de la Facultad de Química de la Universidad de La Habana. Se emplearon semillas certificadas del cultivar Incasoy-27 (21), las cuales se desinfectaron con etanol (70 %) e hipoclorito de sodio (50 %) durante cinco minutos y se enjuagaron seis veces con agua destilada estéril. En el experimento 1, las semillas se sumergieron durante una hora en soluciones estériles que contenían 0.01, 0.05 y 0.10 mg.L⁻¹ del análogo y en agua como tratamiento control, y posteriormente fueron colocadas directamente en placas Petri sobre medio Agar-agua (0.75 %) para su germinación a 30°C durante tres días en la oscuridad.

Las semillas pregerminadas fueron colocadas en tubos de ensayo que contenían medio Norris y Date semisólido (22). En el caso del experimento 2, se utilizaron dos formas de aplicación del producto, o sea, la inmersión de las semillas durante una hora en soluciones de Biobras-16 (0, 0.05 y 0.10 mg.L⁻¹) y la aplicación del producto directamente, en esas mismas concentraciones, en el medio de cultivo (Norris y Date) para el crecimiento de las plantas.

En ambos experimentos, se colocó una semilla por tubo y se adicionó 1 mL del inóculo obtenido con la cepa ICA 8001 de *B. elkanii* en medio líquido Bradyfact a una concentración celular de 10⁸ UFC.mL⁻¹. Luego, las plantas fueron cultivadas en condiciones de luz/oscuridad de 16/8 horas, a una temperatura de 25°C y humedad relativa del 70 % (23). Cuatro semanas después de la inoculación, en ambos experimentos, se seleccionaron 10 plantas por tratamiento y se analizaron las variables siguientes: número de nódulos (u.planta⁻¹), masa seca nodular por planta (g.planta⁻¹) y porcentaje de efectividad nodular (%) según la coloración en el interior de los nódulos a través del corte transversal de estos y en el primer experimento, además, se evaluó la masa fresca nodular (g.planta⁻¹).

El diseño estadístico empleado, en ambos experimentos, fue completamente aleatorizado y los datos se sometieron a la prueba de normalidad y homogeneidad de varianzas. En el caso específico del experimento 2 se utilizó el método factorial, siendo un factor las concentraciones de Biobras-16 empleadas y el otro factor, las formas de aplicación, o sea, la inmersión de semillas o aplicación en el medio de cultivo. Los datos se analizaron mediante el análisis de varianzas correspondiente y se empleó la prueba de rangos múltiples de Tukey HSD para discriminar las diferencias entre medias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla I se puede apreciar que la concentración de 0.05 mg.L⁻¹ del Biobras-16 incrementó significativamente el número de nódulos por planta en comparación con el control, aunque no difirió del resto de las concentraciones ensayadas. Un comportamiento similar se observó en la masa fresca nodular; sin embargo, las tres concentraciones probadas del análogo acumularon masa seca en los nódulos estadísticamente superiores a la del tratamiento control. La efectividad nodular no fue afectada por los tratamientos, siendo los nódulos desarrollados 100 % efectivos.

Tabla I. Efecto de la inmersión de semillas en soluciones de Biobras-16 durante una hora sobre los indicadores de nodulación de plántulas de soya cultivar Incasoy-27

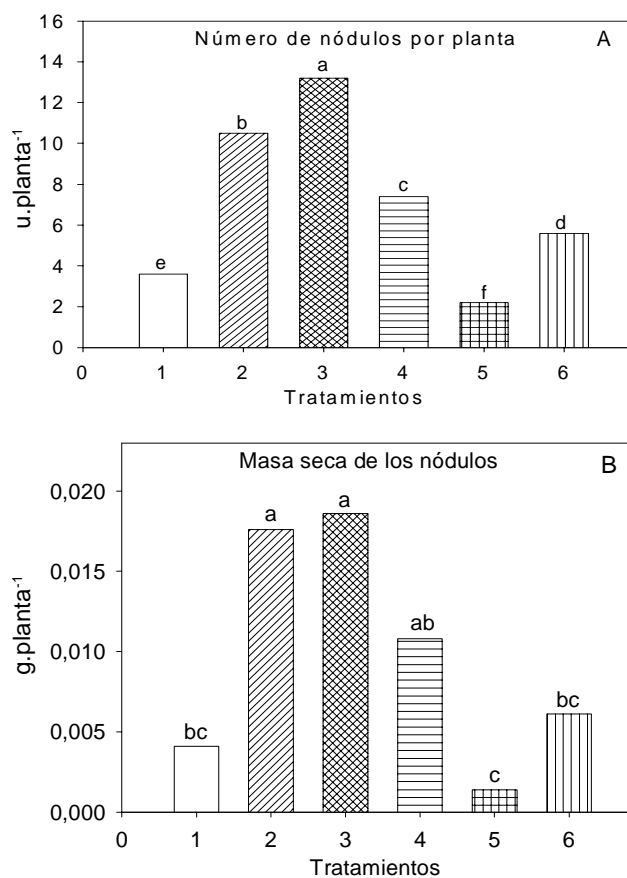
Tratamientos	Número nódulos.planta ⁻¹	Efecto nodular (%)	MF nodular (g.planta ⁻¹)	MS nodular (g.planta ⁻¹)
Imb. en agua	5.00±1.000 b	100	0.012±0.006 b	0.0020±0.0010 b
Imb. BB-16 (0.01 mg.L ⁻¹)	8.11±0.655 ab	100	0.040±0.008 ab	0.0067±0.0009 a
Imb. BB-16 (0.05 mg.L ⁻¹)	12.10±1.620 a	100	0.045±0.011 a	0.0083±0.0015 a
Imb. BB-16 (0.10 mg.L ⁻¹)	9.56±1.334 ab	100	0.038±0.007 ab	0.0091±0.0014 a

Letras iguales no difieren estadísticamente para p<0.05*

Estos resultados indican el efecto positivo que, en los principales indicadores de la nodulación de la soya, tuvo la inmersión de las semillas en el análogo, fundamentalmente en la concentración de 0.05 mg.L^{-1} , con la posterior inoculación de *B. elkanii* en el medio de cultivo vegetal.

Teniendo en cuenta estos resultados, se decidió repetir el experimento con las concentraciones de 0.05 y 0.10 mg.L^{-1} de Biobras-16 y, además, probar otra forma de aplicación del producto, que en este caso fue la adición al medio de cultivo.

Los resultados del análisis estadístico del experimento 2 demostraron que hubo interacción significativa entre las concentraciones de Biobras-16 y sus formas de aplicación, para todas las variables analizadas excepto el porcentaje de efectividad nodular (Figura 1).



Letras iguales no difieren estadísticamente para $p < 0.05^*$

Figura 1. Efecto de dos concentraciones del análogo de brasinoesteroide Biobras-16 (Factor 1) sobre el número de nódulos por plántula de soya variedad Incasoy-27 (A) y la masa seca nodular (B), mediante dos formas de aplicación del producto (Factor 2): imbibición de las semillas durante 1 hora (nivel 1) y adición al medio de cultivo vegetal (nivel 2). T1-Imbibición en agua+*B. elkanii* (Be)N1, T2-Be+BB-16(0.05 mg.L^{-1})N1, T3-Be+BB-16(0.10 mg.L^{-1})N1, T4-*B. elkanii* (Be)N2, T5-Be+BB-16(0.05 mg.L^{-1})N2, T6-Be+BB-16(0.10 mg.L^{-1})N2. Es(A)=1.05, Es(B)=0.002

Al analizar el porcentaje de efectividad nodular, no se encontraron diferencias entre los tratamientos, siendo efectivos en un 100 % todos los nódulos desarrollados en el sistema radical de las plántulas de soya, excepto los nódulos logrados con la aplicación del análogo de brasinoesteroides al medio de cultivo vegetal con un 96 y 88 % para 0.05 y 0.10 mg.L^{-1} respectivamente.

Al observar el comportamiento del número de nódulos (Figura 1A), se puede apreciar que el tratamiento a las semillas con el Biobras-16 (T2 y T3) incrementó significativamente este indicador en comparación con el tratamiento control (T1), destacándose la concentración de 0.1 mg.L^{-1} (T3); mientras que la adición de este producto al medio de cultivo, en las dos concentraciones estudiadas (T5 y T6), inhibió significativamente la formación de nódulos. Es bueno señalar que la imbibición de semillas con agua e inoculadas con *B. elkanii* en ausencia del análogo (T1) afectó la nodulación, en comparación con la inoculación de las plantas sin imbibición previa (T4).

En cuanto a la masa seca nodular (Figura 1B), se destacó igualmente la imbibición de las semillas con cualquiera de las dos concentraciones del análogo (T2 y T3), aunque en este caso, estos tratamientos no difirieron significativamente del tratamiento control no embebido en agua (T4).

Estos resultados indicaron que la forma de aplicación por imbibición de las semillas fue la vía más efectiva de accionar esta hormona con el inóculo de *B. elkanii* ICA 8001, comparado con la adición de esta en el medio de cultivo vegetal (Figura 1).

De esto se infiere que cuando el BB-16 es percibido por la semilla de soya, previo a la germinación, favorece la posterior síntesis nodular en las raíces de la planta; sin embargo, cuando este análogo está en contacto con el sistema radical de la planta durante el proceso de crecimiento, la nodulación es inhibida. El contacto permanente de las raíces con el regulador afecta la síntesis nodular. Adicionalmente, el resultado pudiera estar relacionado con los contenidos endógenos de brasinoesteroides. En este sentido, algunos han demostrado que la aplicación foliar y la inyección de raíces de soya con brasinólida, en mutantes con diferentes contenidos endógenos de brasinoesteroides, influyó diferencialmente en la formación de nódulos(24).

De los resultados se deduce que la imbibición de las semillas en agua por una hora afecta la formación de nódulos. Otros informaron que la imbibición de semillas de leguminosas en agua puede reducir la germinación, el crecimiento inicial y vigor de las plántulas, debido a la disrupción física de las membranas celulares (25, 26, 27), algo que está influenciado por la composición química de la testa y la edad de las semillas (28). Por tanto, estas afectaciones podrían causar también la reducción de la formación de nódulos en las raíces de soya.

Hasta el momento, no hay mucha información acerca del efecto de la aplicación de brasinoesteroides sobre la nodulación en leguminosas.

Algunos han mostrado que tanto la nodulación como la actividad nitrogenasa en los nódulos desarrollados en el cultivo del maní fueron beneficiados en presencia de un brasinoesteroide natural (14). Otros sugieren que la nodulación y el desarrollo radical de las plantas de soya están regulados por brasinoesteroides, en dependencia de la forma de aplicación, el contenido endógeno de esta hormona y la especie vegetal, inhibiendo o induciendo la nodulación (24, 29, 30). Este efecto de los brasinoesteroides sobre la nodulación puede estar relacionado con los cambios en los contenidos endógenos de las poliaminas (espermidina y espermina), ya que se ha informado recientemente que la aplicación de brasinólida en raíces de soya provoca la síntesis de espermidina y esto, a su vez, suprime la formación de nódulos en las raíces (30).

El efecto de los brasinoesteroides sobre la nodulación también está vinculado a la interacción de estos compuestos con otras fitohormonas. Es conocido que hormonas como el etileno, las citoquininas, auxinas y giberelinas están involucradas en el modo de acción de las respuestas simbióticas, fundamentalmente en la organogénesis de los nódulos (31, 32, 33, 34, 35, 36). Varios estudios con plantas mutantes deficientes de las diferentes hormonas han demostrado la complejidad de las interacciones entre ellas, incluyendo los brasinoesteroides en la organogénesis nodular y simbiosis en general (35, 37).

Los resultados de este trabajo, realizado en condiciones controladas, demuestran la utilidad de la imbibición de las semillas de soya cultivar Incasoy-27 con soluciones de 0.05 ó 0.1 mg.L⁻¹ del Biobras-16 durante una hora, para mejorar la respuesta de la interacción simbiótica *Bradyrhizobium-soya*, por lo que de confirmarse esta respuesta en condiciones de campo, sería no solo un resultado de gran interés científico-técnico, sino también de gran importancia práctica, pues contribuiría a incrementar la efectividad del uso del biofertilizante.

La aplicación de biofertilizantes y bioestimulantes a los cultivos es una estrategia importante, para mejorar o preservar las condiciones físicas, químicas y biológicas de los suelos y, por consiguiente, elevar la sanidad y el potencial agroproductivo. Por tanto, resulta válida la utilización de reguladores del crecimiento vegetal u otros compuestos bioactivos, como complemento de los bioinoculantes, para incrementar el proceso de nodulación de la soya. Sin embargo, es importante tener en cuenta la concentración y forma de aplicación más conveniente.

REFERENCIAS

- Zullo, M. A. T. y Gunter, A. Brassinosteroid phytohormones-structure, bioactivity and applications. *Journal Plant Physiol.*, 2002, vol. 14, no. 3, p. 83-121.
- Khripach, V.; Zhabinskii, V. y Groot, A. de. Twenty years of brassinosteroids: steroidal plant hormones warrant better crops for the XXI Century. *Annals of Botany*, 2000, vol. 86, p. 441-447.
- Schneider, B. Pathways and enzymes of brassinosteroid biosynthesis. En: Esser, K; Lutttge, V; Beyschlag, W, Hellwig, F. (Eds), *Progress in Botany*, Benin-Heidelberg: Springer, 2002, vol. 63, p. 286-306.
- Krishna, P. Brassinoesteroid-mediated stress response. *Journal Plant Growth Regulation*, 2003, vol. 22, p. 289-297.
- Dhaubhadel, S.; Browning, K. S.; Gallie, D. R. y Krishna, P. Brassinosteroid functions to protect the translational machinery and heat-shock protein synthesis following thermal stress. *Plant Journal*, 2002, vol. 29, p. 681-691.
- Sam, O.; Núñez, M.; Ruíz-Sánchez, M. C.; Dell'Amico, J.; Falcón, V.; Ros, M. C. de la y Sedane, J. Effects of a brassinoesteroid analogue and high temperature stress on leaf ultrastructure of *Lycopersicon esculentum*. *Biologia Plantarum*, 2001, vol. 44, no. 2, p. 213-218.
- García, A.; Rodríguez, T.; Héctor, E. y Núñez, M. Efecto del análogo de brasinoesteroide MH-5 en el crecimiento *in vitro* del arroz (*Oryza sativa* L.) en condiciones de déficit hídrico. *Cultivos Tropicales*, 2005, vol. 26, no. 1, p. 89-93.
- Núñez, M.; Mazorra, L. M.; Martínez, L.; González, M. C. y Robaina, C. Influencia de la 24-epibrasinólida y un análogo espirostánico de brasinoesteroides en el crecimiento de plántulas de dos variedades de arroz (*Oryza sativa* L.) en medio salino. *Cultivos Tropicales*, 2006, vol. 27, no. 1, p. 75-82.
- Fedearroz. El Tricoderma y su efecto fitoinvigorizador en semillas de arroz. *Revista Arroz*, 2006, vol. 54, p. 464.
- Esseling, J. J.; Lhuissier, F. G. y 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.
- 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 Ca²⁺ spiking and specific *ENOD* gene expression *Plant Physiology*, 2004, vol. 136, p. 3582-3593.
- Gmodien, J. y Zvirnaite, V. Effect of IAA on growth and synthesis of compounds in Lucerne. *Luk. TSR Aukstuju Moquélo Darbai Biologia*, 1971, vol. 17, p. 77-117.
- Vessey, J. K. y Houman, F. Further investigation of the roles of auxin and cytokinin in the NH₄⁺-induced stimulation of nodulation using white clover transformed with the auxin-sensitive reporter *GH3:gusA*. *Physiologia Plantarum*, 2004, vol. 121, no. 4, p. 674-681.
- Vidya, B.; Vardhini, B. V. y Rao, SSR. Effect of brassinosteroids on nodulation and nitrogenase activity in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) seeds. *Indian Journal of Plant Physiology*, 1999, vol. 1, p. 223-224.
- Núñez, M. y Robaina, C. Brasinoesteroides. Nuevos reguladores del crecimiento vegetal con amplias perspectivas para la Agricultura. Documento del Instituto Agronómico de Campiñas (IAC), 2000, no. 68, p. 1-67.
- Moré, O.; Hernández, M. M.; Estévez, A. y González, M. E. Empleo de dos análogos de brasinoesteroides en la formación de callos embriogénicos en papa (*Solanum tuberosum* L.). *Cultivos Tropicales*, 2001, vol. 22, no. 4, p. 29-35.
- González, O.; Hernández, M. H.; Silva, J.; Espinosa, A.; Oliva, E.; Sigarroa, A. y Núñez, M. Evaluación de dos análogos de brasinoesteroides en la formación de callos y la inducción de regenerantes en boniato (*Ipomea batata* L.). *Cultivos Tropicales*, 2003, vol. 24, no. 3, p. 11-18.

18. Núñez, M.; Siquiera, W. J.; Hernández, M.; Zullo, M. A. T.; Robaina, C. y Coll, F. Effect of spirostane analogues of brassinosteroids on callus formation and plant regeneration in lettuce (*Lactuca sativa*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2004, vol. 78, no. 1.
19. Ramírez, A.; Cruz, N. y Franchialfaro, O. Uso de bioestimuladores en la reproducción de guayaba (*Psidium guajava* L.) mediante el enraizamiento de esquejes. *Cultivos Tropicales*; 2003, vol. 23, no. 3, p. 59-63.
20. Corbera, J. y Núñez, M. Evaluación agronómica del análogo de brasinoesteroide BB-6 en soya, inoculada con *B. japonicum* y HMA, cultivada en invierno sobre un suelo Ferralsol. *Cultivos Tropicales*, 2004, vol. 25, no. 3, p. 9-13.
21. Ponce, M.; Fé, C. de la; Ortiz, R. y Moya, C. Incasoy-24 e Incasoy-27: Nuevas variedades de soya para las condiciones climáticas de Cuba. *Cultivos Tropicales*, 2003, vol. 24, no. 3, p. 49.
22. Norris, D. O. y Date, R. A. Legume bacteriology tropical pasteur research. Principles and methods. *C.A.B. Bill*, 1976, vol. 51, p. 134-174.
23. Nápoles, M. C. Inducción de la nodulación en soya (*Glycine max* (L.) Merrill) por *Bradyrhizobium* sp. Influencia del medio de cultivo. [Tesis de doctorado]; Universidad de La Habana, 2003.
24. Yoshida, S.; Suzuki, Y.; Yoneyama, T.; Goto, S.; Fujihara, S.; Terakado, J. y Kuratani, R. Systemic effect of a brassinosteroid on root nodule formation in soybean as revealed by the application of brassinolide and brassinazole. *Soil Science and Plant Nutrition*, 2005, vol. 51, no. 3, p. 389-395.
25. Powell, A. A. y Matthews, S. Deteriorative changes in pea seeds (*Pisum sativum* L.) stored in humid or dry conditions. *Journal of Experimental Botany*, 1978, vol. 28, p. 225-234.
26. Asiedu, E. A.; Powell, A. A. y Stuchbury, T. Cowpea seed coat chemical analysis in relation to storage seed quality. *African Crop Science Journal*, 2000, vol. 8, no. 3, p. 283-294.
27. Yushi, I.; Hiroaki, N.; Yuki, H.; Shao-Hui, Z.; Munetaka, N. y Mari, Ll. Analysis of imbibition damage in soybean seed. *Journal Cryobiology and Cryotechnology*, 2005, vol. 51, no. 2, p. 99-104.
28. Shao, S.; Meyer, C. M.; Ma, F.; Peterson, C. A. y Bernards, M. A. The outermost cuticle of soybean seeds: chemical composition and function during imbibition. *Journal of Experimental Botany*, 2007, vol. 58, no. 5, p. 1071-1082.
29. Ferguson, B. J.; Ross, J. J. y Reid, J. B. Nodulation phenotypes of gibberellins and brassinosteroid mutants of pea. *Plant Physiology*; 2005, vol. 138, no. 4, p. 2396-2405.
30. Terakado, J.; Yoneyama, T. y Fujihara, S. Shoot-applied polyamines suppress nodule formation in soybean (*Glycine max*). *Journal of Plant Physiology*, 2006, vol. 163, no. 5, p. 497-505.
31. Fukuhara, H.; Minakawa, Y.; Akao, S. y Minamisawa, K. The involvement of indole-3-acetic acid produce by *Beilkanii* in nodule formation. *Plant Cell Physiol.*, 1994, vol. 35, p. 1261-1265.
32. Eckardt, N. A. *Medicago truncatula* CRE1 Cytokinin Receptor Regulates Nodulation and Lateral Root Development. *The Plant Cell*, 2006, vol. 18, no. 10, p. 2419.
33. Eckardt, N. A. The role of flavonoids in root nodule development and auxin transport in *Medicago truncatula*. *Plant Cell*, 2006, vol. 18, p. 1539-1540.
34. De Billy, F.; Grosjean, C.; May, S.; Bennett, M. y Cullimore, J. V. Expression studies on aux1-like genes in *Medicago truncatula* suggest that auxin is required at two steps in early nodule development. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2001, vol. 14, no. 3, p. 267-277.
35. Lievens, S.; Goormachtig, S.; Den Herder, J.; Capoen, W.; Mathis, R.; Hedden, P. y Holsters, M. Gibberellins are involved in nodulation of *Sesbania rostrata*. *Plant Physiology*, 2005, vol. 139, p. 1366-1379.
36. Ferguson, B. J. y Mathesius, U. Signalling interactions during nodule development. *J. Plant Growth Regulation*, 2003, vol. 22, no. 1, p. 47-72.
37. Upreti, K. K. y Murti, G. S. R. Effects of brassinosteroids on growth, nodulation, phytohormone content and nitrogenase activity in french bean under water stress. *Biologia Plantarum*, 2004, vol. 48, no. 3, p. 407-411.

Recibido: 2 de noviembre de 2007

Aceptado: 16 de julio de 2008