

**MINISTERIO DE EDUCACIÓN SUPERIOR
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**Inducción de la nodulación en soya (*Glycine max* (L.) Merrill) por *Bradyrhizobium* sp.
Influencia del medio de cultivo.**

Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Biológicas

Autora: Lic. María Caridad Nápoles García

**Tutores: Dr. C. Jorge Martínez Silva
Dra. C. Ana C. Velazco Elizalde
Asesor: Dr. C. Jozef Vanderleyden**

**La Habana
2003**

SÍNTESIS

La inoculación de la soya con rizobios, como muchas otras leguminosas, no siempre resulta exitosa, por lo que la carencia de nitrógeno redundará en cultivos con muy bajos rendimientos. Numerosos factores influyen en el fracaso de esta interacción, pero la producción de factores de nodulación por la bacteria constituye una clave importante en el éxito de esta simbiosis. En la bibliografía consultada nada se ha encontrado acerca del efecto de los medios de cultivo sobre la síntesis de estos lipoquitinolisacáridos. En este trabajo se determinó el efecto de diferentes compuestos y medios de cultivo sobre la producción de los factores Nod y la capacidad de nodulación de la soya. Mediante experimentos de nodulación y cromatografías se demostró el poder inductor de la semilla de soya molinada y la melaza sobre los factores de nodulación de *Bradyrhizobium* sp. Se diseñó y mejoró un nuevo medio de cultivo para la cepa ICA 8001 con la inclusión de estos compuestos en su formulación, lo cual permitió obtener una adecuada multiplicación celular, una elevada síntesis de factores Nod y un inóculo con alta capacidad de nodulación sobre diferentes variedades de soya. Se demostró que elementos hidrosolubles de la semilla de soya pueden actuar como inductores de factores Nod. Los experimentos de campo permitieron validar la superioridad del nuevo medio de cultivo sobre la nodulación, el crecimiento, el desarrollo y los rendimientos del cultivo de la soya. Se demostró la influencia del medio de cultivo sobre la producción de los factores de nodulación en diferentes especies del género *Bradyrhizobium*. Se logró, además, reubicar taxonómicamente a la cepa ICA 8001 dentro de la especie *Bradyrhizobium elkanii* mediante la utilización de la taxonomía polifásica.

1. INTRODUCCIÓN

Indudablemente, el uso de las leguminosas como fuente de fibras y alimentos continuará incrementándose en el futuro. La soya, en particular, se perfila como uno de estos cultivos con grandes posibilidades. Diversos estudios respaldan los "poderes" conferidos a esta semilla que, gracias a la tecnología, ha podido transformarse en gran variedad de productos que proporcionan muchos nutrientes al hombre y los animales (Lacasa, 1990; Carrao y Gontijo, 1995) siendo especialmente rica en proteínas, al punto que muchos países la utilizan como fuente principal de este elemento en lugar de la carne, el huevo o la leche. Las proteínas de soya son completas, consideradas de calidad biológica semejante a la encontrada en las de origen animal. Provee al organismo además de aminoácidos, hierro, calcio y varias vitaminas indispensables para el buen funcionamiento del cuerpo.

Esta leguminosa, cultivada en Asia desde hace 5.000 años, contiene cantidades considerables de fibra, pequeñas proporciones de grasa saturada y, por su origen vegetal, no contiene colesterol. Proporciona además uno de los aceites alimenticios más abundante y menos costoso del mundo (Anónimo, 2002).

Pero más allá de satisfacer las exigencias del mundo macrobiótico, la soya ha dejado asombrada a la comunidad científica al mostrar su amplia gama de propiedades para diversos males que roban el aliento a la humanidad (Varela, 2001). Su eficacia para prevenir el cáncer, los males cardíacos y la osteoporosis son algunas propiedades demostradas ya, aunque no son las únicas afecciones contra las que lucha silenciosamente la soya. Los beneficios adicionales de esta leguminosa alcanzan a quienes padecen de intolerancia a la lactosa, problemas digestivos, fibrosis quística, males renales y diabetes.

Sin embargo, nuevos usos en la agricultura pueden alterar la percepción acerca de estas plantas asociadas a organismos fijadores de nitrógeno y su importancia en los sistemas sostenibles (Vance, 1998). La adopción de nuevos empleos: como la fitoremediación (Shimp y col. 1993; Stomp y col. 1994), la generación de energía eléctrica, así como la elaboración de

productos industriales, farmacéuticos y naturales a partir de estas plantas, entre otros, puede resultar en incrementos sustanciales de la presencia de estas especies en la biosfera e incrementar la diversidad en los sistemas de cultivo.

Más que cualquier otra tecnología energética, la energía proveniente de la biomasa vegetal es capaz de suministrar energía sin contaminación ambiental, pues reduce la producción de cenizas, materiales alcalinos, monóxido de carbono y óxidos de nitrógeno (DeLong y col. 1995).

Las rizobiáceas no pueden fijar el nitrógeno del aire de manera independiente, sino en asociación con las leguminosas. En el proceso simbiótico ambos participantes se benefician pero es altamente costoso para el microasociado. Este fenómeno es la consecuencia de complejas interacciones (señales) moleculares planta-microorganismo, en el cual ambos simbioses determinan el resultado final (Madigan, Martinko y Parker, 2003).

Estos mismos autores indicaron que la interacción de ambos organismos es de gran importancia en la agricultura, pues conlleva a notables incrementos del nitrógeno combinado en los suelos. Dado que frecuentemente aparecen deficiencias de este elemento en suelos sin fertilizar, aquellas leguminosas noduladas poseen ventajas selectivas en estas condiciones y pueden crecer bien en áreas donde otras plantas no pueden hacerlo.

A pesar de que se han obtenido notables avances en el conocimiento molecular y bioquímico de la fijación simbiótica del nitrógeno, éstos no se han traducido en el desarrollo esperado. Mucho queda por hacer para poner los conocimientos en función de una agricultura eficiente y sostenible.

La inoculación de la soya, como muchas otras leguminosas no siempre resulta exitosa, por lo que la carencia de nitrógeno redundará en cultivos con muy bajo rendimiento. Numerosos factores influyen en el éxito de la interacción, pero la producción de factores de nodulación (lipoquitinolisacáridos) pudiera constituir una clave importante en el éxito de esta simbiosis (Hadri y Bisseling, 1998).

Si bien se conoce el papel que pueden desempeñar los medios de cultivo en la obtención de biopreparados (Bowen y col. 1963) y de cómo es posible modificar la expresión genética de un microorganismo en dependencia de la composición de aquellos, nada se ha publicado acerca de su efecto sobre la síntesis de los factores de nodulación. Hasta el presente los medios para inocular la soya solo han 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 importancia de esta planta, así como la necesidad de contar con medios de cultivo que garanticen biopreparados de máxima calidad, se propone la siguiente **hipótesis** de trabajo:

La variación en la capacidad fisiológica del microorganismo, influenciada por el medio de cultivo, incrementa la efectividad de la nodulación en la simbiosis *Bradyrhizobium-soya* (*Glycine max* (L.) Merrill).

Para confirmar o refutar la misma se plantearon los siguientes objetivos de trabajo:

1. Verificar la ubicación taxonómica de la cepa ICA 8001 dentro del género *Bradyrhizobium*.
2. Evaluar la influencia de algunos elementos del medio de cultivo sobre el potencial de nodulación en diversas cepas de *Bradyrhizobium* sp.
3. Diseñar un medio de cultivo para *Bradyrhizobium* sp. con materias primas de producción nacional que posea un buen efecto sobre la nodulación.
4. Determinar la influencia del medio de cultivo para *Bradyrhizobium* sp. sobre la nodulación, el desarrollo y el rendimiento del cultivo de la soya.

Como resultado de este trabajo se alcanzaron las siguientes Novedades científicas:

- Fue reclasificada la cepa ICA 8001 como *Bradyrhizobium elkanii*.
- Por primera vez se informa de la influencia del medio de cultivo sobre la producción de factores de nodulación en Rhizobiaceae.

- Se presenta por vez primera el perfil de factores de nodulación en la cepa ICA 8001.

- Se demostró 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.

Importancia teórica: En el desarrollo de este trabajo se reclasificó la cepa ICA 8001 según la nueva taxonomía propuesta para *Bradyrhizobium* sp. y se determinó el perfil de factores de nodulación producidos por esta cepa. Se demostró que para *Bradyrhizobium* el perfil de factores Nod depende del medio de cultivo.

Importancia práctica: Se demostró la posibilidad de manejar algunas señales moleculares relacionadas con la nodulación en beneficio de la interacción *Bradyrhizobium* - soya. Los resultados de este trabajo permitieron proponer un nuevo biopreparado para la inoculación de la soya, que incluye un medio de cultivo que mejora la multiplicación celular, que es más económico que el medio de Propagación empleado en Cuba. Constituye la Patente de Invención No. 22 797, OCPI, Cuba; cuyo título es: "Medio de cultivo para *Bradyrhizobium japonicum*. Biopreparado resultante." La aplicación de este medio es efectiva para diferentes especies y cepas de *Bradyrhizobium*, así como para diferentes variedades de soya.

Estos resultados han sido publicados en diferentes revistas, presentados en eventos científicos y formaron parte del proyecto: "Desarrollo de tecnologías de biofertilización más eficientes a base de *Rhizobium* sp. mediante la inducción de la síntesis y excreción de los factores de nodulación", correspondiente al PNCT de Biotecnología Agrícola # 00300077.

Esta tesis fue predefendida ante el Consejo Científico de la Facultad de Biología, Universidad de la Habana.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 El cultivo de la soya (*Glycine max* (L.) Merrill)

2.1.1 Distribución en el mundo

Aunque los europeos se enteraron de la existencia de la soya en 1712, por los escritos de Engelbert Kaenfer, botánico alemán que conoció el cultivo mientras vivió en Japón (1691 – 1692), las primeras semillas, traídas desde China, fueron plantadas en 1740 en Paris, en el Jardin des Plantes (Hymowitz y Singh, 1987).

En 1875 y en los años subsiguientes, Frederick Haberlandt, de Viena, trató de difundir este cultivo por Europa pero la producción no se extendió, probablemente por problemas de manejo y pobres condiciones climáticas.

A partir de embarques de grano y productos de soya realizados a Europa cerca de 1908, la especie atrajo la atención del mundo. Un detallado relato sobre las primeras introducciones y el desarrollo del cultivo en los distintos países asiáticos, Australia, África y las Américas ha sido realizado en 1923 por Piper y Morse.

En el continente americano fue introducida por primera vez en Georgia (EE.UU.) en 1765, desde China, vía Londres y, posteriormente, en 1851, en Illinois (EE.UU.), desde donde se multiplicó y diseminó. Sin embargo, la gran expansión del cultivo en ese país se inició en la década del 40, liderando la producción mundial de soya a partir de 1954.

En Brasil fue introducida en 1882, pero su difusión se inició a principios del siglo XX y la producción comercial comenzó en la década del '40 (Fundacao Cargill, 1983), convirtiéndose en la actualidad en el segundo productor mundial de grano de soya (Federación Agraria Argentina, 1996).

Argentina es otro de los grandes productores de este cultivo, donde se comenzó con las primeras plantaciones en 1862 (Pascale, 1989) y se decretó el interés nacional en el cultivo

100 años más tarde. En la actualidad ocupa el cuarto lugar mundial como productor del grano (Giorda y Baigorri, 1997).

2.1.2 Importancia del cultivo

La soya es el grano del cual el hombre obtiene la mayor cantidad de productos, con usos muy diversos para su vida y el medio donde se desenvuelve (Giorda y Baigorri, 1997). De ella se obtienen productos oleaginosos (glicerol, ácidos grasos, esteroides, aceite de soya refinado, productos farmacéuticos, agentes anticorrosivos, combustible ecológico, pinturas, lecitina de soya y otros de usos nutricionales, dietéticos y médicos, también agentes antiespumosos, pinturas y tintas), integrales (bebidas de leche instantánea, soya cocida, harina de soya integral, confituras, productos dietéticos, salsa de soya); proteínicos (pastas alimenticias, comidas para niños, productos cárnicos, reactivos para análisis, antibióticos, pesticidas, alimentos balanceados para animales) y de la cascarilla se producen alimentos balanceados para el ganado lechero, materiales para filtros y pan integral.

Entre la diversidad de productos, como los oleaginosos, integrales y proteínicos, cabe destacar el uso técnico del aceite refinado como combustible ecológico y la repercusión que podría tener en la producción y demanda de soya en el mundo. La soya constituye la fuente de aceite y proteínas vegetales de mayor importancia a nivel mundial (Wicox, 1985).

La proteína de soya se perfila como el único ingrediente comercial producido en volúmenes considerables que se utilizará probablemente en el futuro, tanto para fines nutricionales como funcionales, como sustituto de las proteínas tradicionales de origen animal.

La creciente aceptación de este cultivo responde a sus cualidades inigualables: buenas propiedades alimenticias y funcionales para aplicaciones en alimentos, alto valor nutricional, abundancia, disponibilidad y bajo costo (Sipos, 1990).

En Cuba, la posibilidad de obtener leche directamente a partir del grano de soya, constituyó una valiosa opción para tratar de recuperar la enorme caída de la producción de leche de vaca. Su utilización como extensor en la elaboración de productos cárnicos, como

alimento animal y humano (Pérez y Rábago, 1992; Pérez, 1995 (a y b); Pérez, 1996 (a y b)), que incluye demanda de aceite, han requerido que el país se trace una estrategia para incrementar la producción del cultivo.

Otra ventaja de esta leguminosa es la posibilidad de rotación con cultivos de importancia económica como el arroz, la caña de azúcar y el tabaco, en los que permite suplir gran parte de sus necesidades reales de N, lo que representa un ahorro considerable en los costos de producción en cada campaña (Leyva y Pohlan, 1987).

2.1.3 La soya en Cuba

Desde el año 1905 se tiene el primer informe sobre la aclimatación de 50 variedades del cultivo en el país (Estación Experimental Agronómica de Santiago de las Vegas, 1905). En 1955 se edita el folleto titulado "El cultivo del frijol de soya" (Muller, 1955). Así sucesivamente se fueron realizando trabajos de extensión que en sus primeros objetivos tenían la extracción de aceite para suplir importaciones y el uso de la torta para alimentación del ganado (Díaz, 1996).

A partir de la década del '70 se han venido desarrollando trabajos de mejoramiento genético e introducción con el objetivo de obtener variedades que puedan ser sembradas en diferentes épocas, productoras de granos, forrajes, o ambos, con características apropiadas para la cosecha mecanizada y con buena tolerancia a las principales enfermedades y plagas que atacan al cultivo (Cueto, 1977; Díaz, 1992 y Díaz y col. 1994).

El desarrollo y adaptación de variedades y su potencial agro-fiotécnico se perfeccionaron en la década del '80 al '90, lo que ha sido impulsado con los programas de investigación, el escalado y la producción comercial de inoculantes (López y Pijeira, 1996). De esta forma, la producción de derivados de la soya se ha incrementado sostenidamente, existiendo ya 28 fábricas que producen sus derivados lácteos (Esquivel y col. 1998).

En el año 2001 se inauguró en Santiago de Cuba una planta procesadora del grano, la cual tiene como objetivos principales la introducción de sus derivados en renglones

alimentarios vitales como la leche y el yogurt, la obtención de aceite, lecitinas, harinas para consumo humano y animal y vegetal proteico. (Radio Reloj Internet, 2001).

En la actualidad el cultivo de la soya en Cuba se encuentra en fase de generalización. Los centros de investigación agrícolas continúan trabajando en la evaluación de las variedades para diferentes épocas y ecosistemas, en la producción de semillas básicas y registradas, así como en todo lo referente a las tecnologías del cultivo.

El país tiene interés en ampliar el cultivo comercial de la soya en la medida que se demuestre su factibilidad técnica y económica, debido a la alta demanda nacional y los elevados precios en el mercado internacional.

Por la importancia que para el país tiene el cultivo, en 1995 se creó por el Ministerio de la Agricultura, un Grupo Nacional para acelerar la introducción de la soya en Cuba, en el cual están representados los organismos, institutos de investigaciones y otras entidades relacionadas con esta tarea. Este grupo trabaja regularmente e impulsa la transferencia de tecnologías (investigación, validación, difusión, adopción), sensibiliza a cuadros y productores contribuyendo a buscar las vías para asegurar a los productores el abastecimiento técnico material para la siembra, cosecha y beneficio del grano, así como su comercialización.

Como resultado de lo anterior, anualmente se han sembrado entre 150 y 200 hectáreas de frijol de soya nacionalmente, con rendimientos promedios entre 0.5 a 1.0 t.ha⁻¹, con tendencia a aumentar, en la medida que se va dominando la tecnología, se introducen maquinarias especializadas y se estabiliza el suministro de insumos (Colectivo de autores, 1998).

2.1.4 El nitrógeno como requerimiento fundamental del cultivo

La soya es una especie oleaginosa que presenta una alta acumulación de proteínas en las semillas, lo cual la convierte en el cultivo con la mayor demanda de N y la menor producción de biomasa de semilla por unidad de fotoasimilado producido (Sinclair y Wit, 1975).

El contenido de N en las semillas dependerá de: la tasa de acumulación de N en la planta durante el desarrollo de las semillas, la longitud del período de llenado y la cantidad de N acumulado previamente en los órganos vegetativos, susceptible de ser translocado a las semillas (Quijano y col. 1995). Si no existen limitantes importantes de otra naturaleza (radiación, agua o fósforo), el rendimiento de la soya es función directa de la capacidad de acumular N que exhiba el cultivo.

En su carácter de leguminosa, la soya puede cubrir sus requerimientos de N a partir del aporte del suelo (por la mineralización de N orgánico), la fertilización y el aire, por medio de la fijación biológica de nitrógeno (FBN) (Buttery, Park y Hume, 1991).

El porcentaje de N que aporta la fijación simbiótica depende de las condiciones físicas y químicas del suelo y del suministro de fotoasimilados de la planta. Así, condiciones de alta disponibilidad de nitratos en el suelo son inhibitorias para la fijación biológica de N. La fijación de N es muy susceptible a la deficiencia hídrica en el suelo, cesando la capacidad de reducir N atmosférico cuando el nódulo tiene menos del 80 % del peso fresco del tejido totalmente turgente. Con etapas de sequía, el cultivo deberá tomar un porcentaje mayor de N mineral presente en el suelo. Otro factor importante que reduce la fijación de N es la falta de aireación del suelo, debido a estados de compactación física o a saturación por inundaciones (Raper y Kramer, 1987).

La acumulación de N sigue una función muy similar a la acumulación de materia seca, es decir que al principio del cultivo la tasa de asimilación es baja y luego va incrementándose hasta llegar a un máximo durante el período de floración y establecimiento de los frutos. Cuando comienza el llenado de los granos, la tasa de asimilación de N empieza a declinar. Por ello la acumulación de N en las semillas es función de la acumulación de N en los tejidos vegetativos. El porcentaje de N acumulado en las semillas respecto al N en el resto de la planta en la cosecha (sin considerar las hojas caídas) es de alrededor del 90%, mientras que la partición de materia seca oscila entre el 47 y el 56% (Hume y col. 1989).

Durante el proceso de llenado de las semillas, la demanda de N es muy alta y una importante proporción del N foliar es removilizado hacia las mismas. Una reducida tasa asimilatoria de N, ya sea durante el período vegetativo o durante el llenado de los granos, así como una redistribución incompleta del mismo, determinan pérdidas en el potencial de rendimiento de la soya (Hume y col. 1989). Hanway y Weber (1971) informaron que las semillas son el principal destino de acumulación de nitrógeno proveniente de la removilización de otras partes vegetativas.

2.2 Fijación biológica del nitrógeno (FBN)

Para el año 2025 se espera que la población mundial haya crecido hasta un 40 % (Mannion, 1998). Teniendo en cuenta que aproximadamente 11g de N se consumen por persona cada día (Frink, Waggoner y Ausubel, 1999) y que las plantas aportan hasta el 80% de las necesidades dietéticas en la mayor parte de los trópicos y subtrópicos, se necesitaría para entonces un incremento desmesurado en la producción agrícola mundial.

Deficiencias en N son comunes en los suelos de las regiones tropicales (Graham, 1981; Dakora y Keya, 1997). Por constituir este elemento después de la luz y el agua, el principal factor limitante para los cultivos, su suministro en forma de fertilizante químico alcanza hoy aproximadamente 80 Tg (teragramos, equivalente a 10^{12} gramos) por año en el mundo (Frink, Waggoner y Ausubel, 1999).

El empleo elevado de fertilizante nitrogenado representa una carga medioambiental, que incluye la contaminación del aire, la lluvia ácida, contaminación del agua por nitrato, así como una eutrofización y reducción de la biodiversidad (Socolow, 1999). Grandes aplicaciones de fertilizante nitrogenado para maximizar la producción en los países desarrollados sólo exacerbarán estos problemas, mientras que en los países subdesarrollados el alto costo y los problemas de distribución continuarán siendo las limitantes. Esto indica que la fijación biológica del nitrógeno por microorganismos asociados a las plantas, proporciona una alternativa barata y ecológicamente sana que pudiera evitar la catástrofe hambruna que se nos avecina.

Después de la fotosíntesis, la fijación biológica del nitrógeno -reducción de dinitrógeno (N_2) atmosférico a dos moléculas de amonio-, constituye el proceso biológico más importante sobre la biosfera. En ausencia de fertilizantes modernos o desechos animales, los ecosistemas naturales cuentan con la conversión biológica del dinitrógeno atmosférico a formas asimilables por las plantas. Este proceso es realizado exclusivamente por procariontes, incluyendo muchos géneros de bacterias, cianobacterias y el actinomiceto *Frankia* sp. (Zuberer, 1998).

Los microorganismos fijadores de nitrógeno pueden existir como organismos de vida libre o en asociaciones de diferentes grados de complejidad con otros organismos, plantas y animales. Este rango va desde interacciones menos fuertes como la asociativa hasta asociaciones complejas como la simbiótica, en la que la bacteria y la planta se comunican a un exquisito nivel molecular y comparten funciones fisiológicas (Zuberer, 1998). Esta última ha recibido especial atención por su contribución a la fertilidad de los suelos, a la producción de alimentos para el hombre y los animales y a la economía de fertilizantes nitrogenados (Frioni, 1990).

Este proceso, que comienza con dos organismos de vida libre y termina con una íntima coexistencia celular, permite un intercambio de nutrientes en el cual la bacteria brinda nitrógeno fijado a la planta gracias a la acción de la enzima nitrogenasa y recibe de ésta azúcares y otras sustancias (Long, 2001).

Leguminosas en combinación con el cultivo del arroz fijan anualmente hasta 40 Tg de nitrógeno (Galloway, 1998). Se cultivan en los trópicos para alimento, forrajes, para servir como abonos verdes y tapar cosechas y son utilizados además como suministro de N para otros cultivos (Giller, 2001).

El suministro inadecuado del N en la agricultura constituye uno de los factores más importantes de los que contribuyen al hambre humana. A pesar de ser un elemento abundante,

que compone casi el 80 % de la atmósfera terrestre, constituye una fuente nutritiva muy escasa porque el N atmosférico es inerte y no pueden aprovecharlo la mayoría de los organismos.

La fisiología de las plantas requiere niveles relativamente altos de nitrógeno para producir abundante biomasa o rendimiento. Todas las formas de vida requieren nitrógeno para sintetizar proteínas y este elemento es frecuentemente el nutriente limitante para las plantas y el crecimiento microbiano en el suelo. En sistemas naturales, el nitrógeno necesario a las plantas proviene del suelo, de la lluvia, de otras deposiciones atmosféricas o de la fijación biológica del nitrógeno (Vance, 1998).

La fijación industrial de nitrógeno produce alrededor de 85 millones de toneladas métricas por año (Hauck, 1985; Waggoner, 1994) pero requiere altos insumos de energía, usualmente en forma de gas natural. Sin embargo, se informan valores de nitrógeno fijado biológicamente de alrededor de 100-180 millones de toneladas métricas por año, contribuyendo en un 65% al nitrógeno total utilizado en la agricultura (Burris y Roberts, 1993).

El nitrógeno fijado biológicamente por los microorganismos en simbiosis garantiza una fuente directa de este elemento a ser utilizada por la planta, y de esta manera, menos susceptible a la volatilización, desnitrificación y a la lixiviación.

Aproximadamente el 80% del nitrógeno fijado biológicamente en la agricultura, proviene de la simbiosis entre las leguminosas y las especies de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Allorhizobium* (Vance, 1998). De esta unión se forma, a nivel radicular, un órgano llamado nódulo dentro del cual se transforma el nitrógeno (N_2) del aire en amonio (NH_4^+), que es una forma asimilable por las plantas.

El aporte de la FBN representa un ahorro del N del suelo. El porcentaje acumulado de la planta que proviene de la fijación presenta una relación inversa con la cantidad de N disponible en el suelo, el que constituye la limitación más importante de la FBN (Venturi y Amaducci, 1985).

La mineralización de N orgánico condiciona la magnitud de la FBN a través de un complejo sistema de control ejercido a distintos niveles. Entre estos niveles se mencionan la formación de nódulos, la regulación de la síntesis y la actividad de la enzima Nitrogenasa, presente en todos los rizobios y responsable primaria de la FBN (Postgate, 1982), y por último, el balance energético global de la planta, a la cual le resulta más barato, en términos de energía gastada, absorber N del suelo cuando dicho elemento está disponible, que fijarlo (Atkins, 1984).

Los requerimientos de N de la planta de soya desde la germinación hasta la floración, son bajos. En esta etapa, la acumulación de N está definida por la tasa de crecimiento del cultivo y es independiente de la oferta, debido a la reducida demanda. En la etapa que media entre el comienzo de la fructificación y la plenitud del llenado de los granos, los requerimientos nitrogenados son altos y se observan diferencias en función de la oferta de N, que se manifiesta en la definición del rendimiento (Martínez y Caballero-Mellado, 1996).

Estos autores expresan que hasta el comienzo de los estadios reproductivos del cultivo el suelo puede satisfacer, en líneas generales, los requerimientos de nitrógeno, pero en la segunda etapa es necesaria la participación de la FBN que, cuando es eficiente, realiza su mayor y más importante aporte. El incremento de la FBN durante el llenado de granos aumenta el rendimiento en grano.

Existen diversos factores ambientales que condicionan la FBN. Cualquier evento ambiental (como por ejemplo estrés térmico, sequía, anegamiento prolongado, etc.) que comprometa tanto la FBN como la mineralización de N, compromete la acumulación de este elemento en la biomasa y, como consecuencia, el rendimiento (González, 1994).

El sistema simbiótico *Rhizobium*-soya requiere que no haya limitantes minerales, sea por exceso o por defecto, para el desarrollo normal del cultivo. Las carencias de fósforo (P) disminuyen notablemente la formación de nódulos y por consiguiente la FBN.

El nitrógeno combinado suprime la fijación por inhibición de la síntesis de la nitrogenasa, mediante mecanismos de represión de la expresión de los genes responsables de la síntesis de los componentes de la enzima (genes *nif*). En *Klebsiella pneumoniae* la represión ha sido estudiada en detalle y la molécula crucial es una enzima, la glutamino sintetasa, que cataliza el primer paso en la síntesis de aminoácidos: el amonio reacciona con el glutamato formando otro aminoácido: la glutamina. La mayoría de los otros aminoácidos se forman por transferencia del nitrógeno desde la glutamina a otros compuestos. La glutamino sintetasa es regulada por inhibición “feed-back” o retroalimentación, por distintos productos finales de la síntesis de aminoácidos. Altas concentraciones de glutamina o de algún otro aminoácido disminuye la actividad de la enzima y suprime también la producción de aminoácidos adicionales (Brill, 1977).

La FBN, cuando ocurre normalmente, aporta entre el 25 y el 84% del nitrógeno total absorbido por el cultivo de la soya (Buttery, Park y Hume, 1991). Este aporte es muy variable, ya que depende de diversos factores, como la presencia o no de rizobios y su abundancia en el suelo; el género, especie y cepas de rizobios existentes en el suelo o inoculadas; las características físico-químicas de los suelos y las condiciones ambientales. En la Argentina se citan aportes entre el 30 y el 42% (González, 1994).

2.2.1 Simbiosis Rhizobiaceae-leguminosas

Especies de los géneros bacterianos *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Allorhizobium*, colectivamente denominados como rizobios (Young, 1996; de Lajudie y col. 1998), son conocidos por su relación simbiótica con las plantas de leguminosas. El rizobio infecta el tejido radical de la planta huésped a través de los pelos radicales (aunque se conocen otras vías de infección) e induce la formación de los nódulos. Éstos órganos formados sobre la planta constituyen el nicho ecológico preferido por el rizobio, en los cuales reduce el nitrógeno atmosférico en amonio, poniéndolo a disposición de la planta

hospedera (Spaink, Kondorosi y Hooykaas, 1998; Laeremans y Vanderleyden, 1998; Stougaard, 2000; Luyten y Vanderleyden, 2000).

La simbiosis se caracteriza por un complejo intercambio de señales entre el rizobio y la leguminosa. El rango de hospedero del proceso es determinado por el reconocimiento correcto de estas señales en ambos simbios. La mayoría de los rizobios muestran un rango de hospedero limitado y establecen una simbiosis exitosa solamente con uno o unos pocos tipos de plantas, mientras que otros exhiben un comportamiento más promiscuo. *Rhizobium* sp. NGR234, por ejemplo, constituye una cepa de amplio rango, produciendo la nodulación de 353 especies de leguminosas, representadas en 122 géneros (Pueppke y Broughton, 1999). La promiscuidad también se presenta en el hospedero: *Phaseolus vulgaris*, por ejemplo, es nodulado por diferentes especies de estas bacterias (Michiels y col. 1998).

El proceso simbiótico puede ser dividido para su estudio en tres etapas: la etapa de preinfección (en el suelo), la etapa de infección (en los hilos de infección) y la etapa de fijación (en los nódulos). Durante estas etapas existe una continua interacción y comunicación entre el rizobio y la leguminosa (Dombrecht, 2001).

En el suelo, los rizobios de vida libre encuentran factores bióticos y abióticos que ejercen diferentes efectos sobre sus poblaciones (Vlasak y Vanderleyden, 1997; Sadowsky y Graham, 1998). Los factores abióticos incluyen acidez del suelo, temperatura, disponibilidad de agua, limitaciones de nutrientes, textura del suelo y contenido de materia orgánica. Mientras que los bióticos incluyen la producción de antibióticos y bacteriocinas; número y tipo de microorganismos residentes y predación selectiva por protozoos. Estos factores influyen sobre la capacidad de nodulación de las diferentes poblaciones de rizobios. Adicionalmente, la competitividad de nodulación de *Rhizobium* está determinada por su constitución genética (Sadowsky y Graham, 1998; Niner y Hirsch, 1998; Luyten y Vanderleyden, 2000).

Los rizobios en la rizosfera son quimiotácticamente atraídos hacia las raíces de las leguminosas por ciertos compuestos exudados por la planta, tales como flavonoides,

compuestos fenólicos, azúcares, ácidos dicarboxílicos y aminoácidos (Niner y Hirsch, 1998). A través de la quimiotaxis, los rizobios se adhieren y colonizan la superficie de las raíces.

Algunos flavonoides y no flavonoides, exudados por la raíz, inducen una respuesta específica en el rizobio. Unido a estos compuestos, la proteína Nod D del rizobio activa los genes de nodulación (Long, 1996; Schlaman, Phillips y Kondorosi, 1998; Downie, 1998). Nod D actúa sobre la caja Nod y ésta dispone la transcripción de los genes de nodulación (*nod*, *noe* y *noI*). Estos genes codifican productos de genes que sintetizan y transportan una clase de moléculas llamadas Factores Nod ó lipo-quitin-oligosacáridos, los cuales constituyen morfógenos que inician todo el programa de nodulación en el vegetal y permiten a la bacteria entrar a su nuevo hábitat (Denarié, Debellé y Promé, 1996; Spaink, 1996).

Se desconoce aún como la planta percibe los factores Nod, aunque se han propuesto varias hipótesis (Cullimore, Ranjeva y Bono, 2001), pero se conoce bien que estas moléculas inducen diferentes respuestas sobre las raíces de la leguminosa en un período de tiempo que va desde segundos hasta días (Downie y Walker, 1999; Stougaard, 2000). A nivel microscópico se pueden distinguir tres respuestas claras: la primera es la deformación y enroscamiento de los pelos radicales en crecimiento, justo en la zona posterior al extremo (Figura 1B y C). Segunda: se percibe una reorganización del citoplasma en las células corticales y se forma una estructura de preinfección. Tercera: Las células corticales se diferencian y se concreta la división, se establece el primordio nodular (Figura 1D).

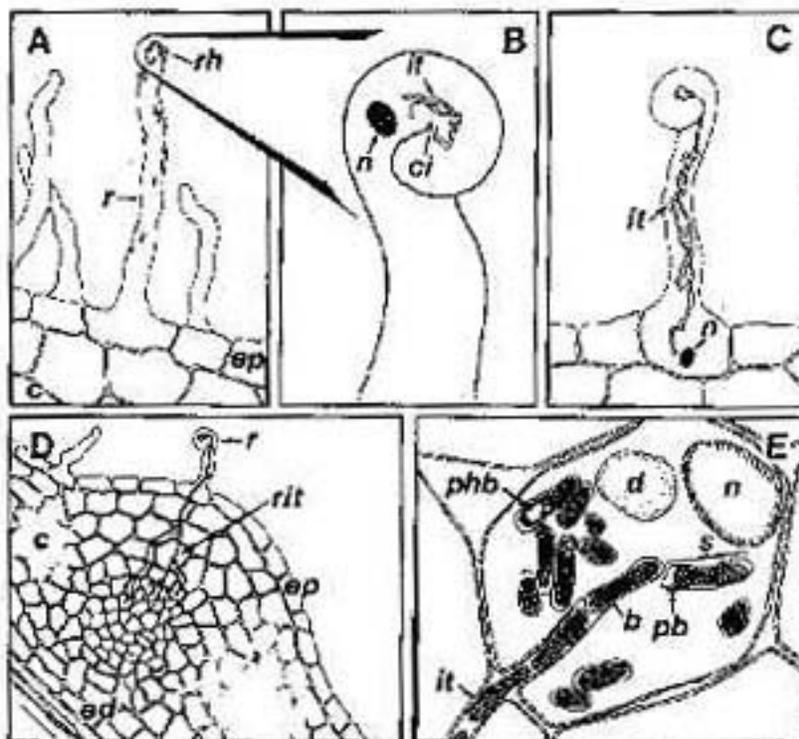


Figura 1. Invasión de la raíz de leguminosa por rizobios (tomado de Perret, Stahelin y Broughton, 2000). rh: rizobio; r: pelo radical; ci: centro de la infección; n: núcleo de la célula vegetal; it: cordón de infección; rit: ramificación del cordón infeccioso; b: bacteroide; s: simbiosoma; phb: gránulos de polihidroxibutirato; pb: membrana peribacteroide (membrana del simbiosoma); c: corteza; d: vacuola digestiva; ep: epidermis; ed: endodermis. Las proporciones relativas de los diferentes elementos no siempre son correctas.

La infección comienza cuando el rizobio que está colonizando la raíz queda atrapado en el enroscamiento del pelo radical (Figura 1A y B) (Brewin, 1998). La bacteria lisa localmente la pared del pelo radical, seguido por una invaginación de la membrana celular de la planta. El rizobio entra a esta estructura invaginada en forma de tubo, constituyéndose el cordón infeccioso (Figura 1B y C). Éste continúa creciendo y penetrando la corteza radical (Figura 1D) hacia las células en división del primordio nodular.

Se plantea que la matriz del cordón infeccioso es rica en H_2O_2 y que en ella aparece en altas concentraciones una glicoproteína relacionada con la interacción planta-patógeno (Wisniewski y col. 2000).

Las leguminosas ejercen su respuesta hipersensible sobre el *Rhizobium* en interacciones incompatibles y en menos frecuentes interacciones compatibles (Santos y col. 2001). Esto se ilustra por la observación de que solo un pequeño porcentaje de los eventos de la infección bacteriana son exitosos y conllevan hacia nódulos infectados (Baron y Zambryski, 1995). β -glucanos, lipopolisacáridos (LPS), exopolisacáridos (EPS) y polisacáridos capsulares (CPS), rodean la bacteria y forman así una barrera estructural que interactúa con la planta durante la adhesión, penetración e invasión. Una simbiosis exitosa, dependerá de una adecuada composición de β -glucanos, LPS, EPS y CPS en las células de *Rhizobium* (Breedveld y Miller, 1998; Becker y Pühler, 1998; Kannenberg y col., 1998; Laeremans y Vanderleyden, 1998).

El primordio nodular continúa dividiéndose y diferenciándose hacia un nuevo órgano en la planta: el nódulo. Se distinguen dos tipos de nódulos: los determinados y los indeterminados (Hadri y Bisseling, 1998). Los indeterminados son típicos de leguminosas de climas templados como el guisante, la alfalfa y el trébol, mientras que los determinados son de leguminosas tropicales como la soya y el frijol.

Las bacterias son liberadas desde el cordón infeccioso al citoplasma de las células del nódulo mediante un proceso parecido a la endocitosis (Figura 1E) (Brewin, 1998; Oke y Long, 1999). En el citoplasma, las bacterias son rodeadas por un plasma derivado de la membrana vegetal, a lo que se le llama membrana peribacteroide o membrana del simbiosoma. Una vez en las células de la planta, la bacteria sufre cambios fisiológicos, estructurales y morfológicos y se diferencia en bacteroides (Quispel, 1998; Oke y Long, 1999). Una célula madura puede contener miles de éstos. Observaciones recientes sugieren que simbiosomas multibacteroides en los nódulos determinados pueden originarse mediante fusión de los simbiosomas (Cermola y col. 2000). Los bacteroides tienen la capacidad de fijar el nitrógeno.

El medio microaerobio del nódulo es la señal que induce la expresión de los genes de fijación de nitrógeno en la bacteria (*nif* y *fix*) (Kaminski, Batut y Boistard, 1998). Los genes *nif* y

fix codifican para la compleja enzima nitrogenasa (y las proteínas accesorias) que catalizan la siguiente reacción:



La planta leguminosa se beneficia de esta simbiosis por la asimilación del nitrógeno fijado, mientras que el rizobio se provee de un hábitat exclusivo, tan largo como la simbiosis dure. Después de algún tiempo, los nódulos degeneran y se vuelven senescentes. Durante la senescencia, la producción de especies de oxígeno reactivas se incrementa significativamente, lo que resulta en un estrés oxidativo para el bacteroide (Becana y col. 2000). Esto causa la muerte de casi todos los bacteroides dentro del nódulo (Brewin, 1998).

No está bien definido si los bacteroides son capaces de continuar el crecimiento vegetativo en el suelo después de la muerte del nódulo (Oke y Long, 1999). La pregunta que se mantiene es cómo el *Rhizobium*, como población, realmente se beneficia desde la simbiosis. Trabajos recientes de Timmers y col. (2000), muestran que parte del rizobio indiferenciado (célula vegetativa) en la estructura nodular puede sobrevivir saprofiticamente, lo que sugiere que sólo se compromete en la simbiosis para crear un hábitat saprofitico en el cual prosperar.

2.2.2 Características de la familia Rhizobiaceae

Hellriegel y Wilfarth (1888) por primera vez establecieron claramente que eran microorganismos los que, en los nódulos radiculares, permitían a las leguminosas obtener nitrógeno atmosférico mientras que otras plantas no podían. En 1890, Beijerinck aisló y cultivó la bacteria a partir de nódulos, denominándola *Bacillus radicola*. Casi al mismo tiempo, Frank (1889) la había denominado como *Rhizobium leguminosarum*, nombre que se mantiene actualmente (Young y Haukka, 1996; Sprent, 2001).

Fred y col. en 1932 editaron un libro acerca del rizobio, donde se hace una revisión exhaustiva de los conocimientos existentes y propusieron una nomenclatura basada en las características fisio-bioquímicas de esta bacteria, que prácticamente no admitió cambios hasta 1982. Ellos reconocieron 6 especies: *Rhizobium leguminosarum*, causante de nodulación en

los géneros *Lathyrus*, *Pisum*, *Vicia* y *Lens*; *R. trifolii* en *Trifolium*; *R. phaseoli* en *Phaseolus*; *R. meliloti* en *Melilotus*, *Medicago*, *Trigonella*; *R. japonicum* en *Glycine max* y *R. lupin* en *Lupinus*. En esta caracterización, lo más importante era el rango de hospedero de la leguminosa, aunque también se describían diferencias morfológicas y fisiológicas entre las especies (Young y Haukka, 1996).

Los métodos moleculares, como la amplificación y la secuenciación de genes del ARN (ácido desoxiribonucleico) 16S ribosómico, así como la homología ADN (ácido nucleico)-ADN revolucionaron la clasificación de los rizobios reconociéndose en el momento las siguientes especies: *Rhizobium leguminosarum*, *R. tropici*, *R. etlii*, *R.(Agrobacterium) rhizogenes*; *Sinorhizobium meliloti*, *S. fredii*, *S. saheli*, *S. teranga*, *S. medicae*, *Rhizobium loti*, *R. huakii*, *R. ciceri*, *R. tianshanens*, *R. mediterraneum*, *R. galegae*, *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii*, *B. liaoningense*, *Bradyrhizobium* sp., *Azorhizobium caulinodans* (adaptado de Young y Haukka, 1996 por Bécquer, 2002). Otras doce especies nuevas han sido propuestas en los últimos cinco años.

De forma general, estas bacterias son bacilos Gram negativos, de 0.5 a 0.9 micras de ancho por 1.2 a 3.0 micras de largo, aislados o en pares, generalmente móviles cuando son jóvenes por flagelos peritricos polares o subpolares. No forman endosporas y sus células contienen gránulos de ácido poli-beta-hidroxibutírico (PHB) que se tiñen de negro con sudán negro y aparecen refráctiles al microscopio de fase. Algunas cepas poseen gránulos metacromáticos de polifosfatos y la mayoría producen abundantes polisacáridos extracelulares mucilaginosos de composición variable según la cepa y el medio de cultivo. Son organismos aerobios, los cuales, sin embargo, son capaces de crecer a una tensión de oxígeno menor de 0.001 atm en las condiciones del nódulo en presencia de la leghemoglobina (Frioni, 1990).

En base a sus propiedades culturales se les puede diferenciar en dos grupos: los de crecimiento rápido, con un tiempo de generación entre 3 y 4.5 horas, acidifican el medio y

liberan abundante cantidad de polisacáridos, y los de crecimiento lento, con un tiempo de generación que oscila entre 6 y 8 horas, producen menos polisacáridos y alcalinizan el medio.

El aspecto de las colonias depende del medio de cultivo y de la especie. En medio de extracto de levadura-manitol-agar (YEM) (Vincent, 1970) las cepas de crecimiento rápido originan colonias de 1 a 5 mm luego de 3 a 5 días de incubación, mientras que las de crecimiento lento no exceden un diámetro de 1 mm en un período de 10 días. Su forma varía desde plana a convexa, su color puede ser de blanco opaco a blanco lechoso, poco gomosas, translúcidas, con abundante cantidad de polisacáridos (Frioni, 1990).

2.2.2.1 Género *Bradyrhizobium*

Desde el punto de vista taxonómico, existen tres especies descritas capaces de nodular la soya y reconocidas a nivel internacional: *B. japonicum* (Jordan, 1982); *B. elkanii* (Kuykendall y col. 1992) y *Sinorhizobium fredii* (Scholla y Elkan, 1984).

Las células bacterianas de este género son bacilos de 0.5-0.9 x 1.2-3.0 μm , aerobias, Gram-negativas, con un flagelo polar o subpolar. Generalmente contienen gránulos de poli- β -hidroxibutirato, los cuales son refráctiles por microscopía de contraste de fase (Holt y col. 1994). Requieren de 3-5 días para provocar turbidez moderada en medio líquido y tienen un promedio de multiplicación de 6-8 h. Su crecimiento en medio sólido enriquecido con levadura es pobre y lento. Son pleomórficas y no forman esporas (Jordan y Allen, 1980). Pueden formar colonias de tipo seco, opacas y frecuentemente punctiformes (La Favre y col. 1991).

La formación de polisacáridos extracelulares es común en *Bradyrhizobium* (Jain, Prévost y Bordeleau, 1990), así como la producción de álcali, lo cual puede estar relacionado con que las cepas de este género son generalmente más tolerantes a los suelos ácidos que las de rápido crecimiento (Bordeleau y Prévost, 1994). Muchas cepas crecen mejor en pentosa como única fuente de carbono (Somasegaran y Hoben, 1994). Elkan y Kuykendall en 1981 señalan que la arabinosa es la fuente de carbono preferida por las especies de este género.

Owen y Wright (1965) afirman que algunas cepas de *Bradyrhizobium* producen un aminoácido llamado rizobiotoxina y está asociado a cierta clorosis de la soya. En tal sentido, Teaney III y Fuhrmann (1993) determinan que la presencia de NO_3^- en el suelo puede reducir el efecto de este aminoácido en la planta. La secreción de la toxina está relacionada con el género (La Favre y Eaglesham, 1986).

El género *Bradyrhizobium* presenta una gran heterogeneidad, la cual ha servido como base para la propuesta de varias especies, como son *B. elkanii* (Kuykendall y col. 1988; 1992), *B. liaoningense* (Young y Haukka, 1996) y *Bradyrhizobium* sp. (Young, 1996).

La taxonomía de *Bradyrhizobium* se encuentra actualmente en un estado de revisión (Young y Haukka, 1996). Según criterios de estos autores, incluso las cepas pertenecientes a *Bradyrhizobium japonicum* son aún muy diversas y se necesita investigar más en ellas y en las que aún se desconocen para ser reconocidas taxonómicamente.

Se reconocen hasta el momento las especies: *Bradyrhizobium japonicum* (Jordan, 1984): rizobio de crecimiento lento en YEM, productor de álcali. Forma nódulos efectivos solamente en *Glycine max.* *B. elkanii* (Kuykendall y col. 1992). Fue propuesto en base al grupo II de cepas de *B. japonicum*. No se ha formulado aún su formal descripción. *B. liaoningense* (Xu y col. 1995). Esta especie se ha definido como un rizobio de crecimiento extra lento, y al igual que el anterior, su caracterización está basada principalmente en análisis de homología del ADN, así como la secuencia de los genes del ARN 16S ribosómico. *Bradyrhizobium* sp. (Young, 1996) abarca aquellas cepas que pertenecen a *Bradyrhizobium*, pero que no forman nódulos en la soya, aunque sí en otras leguminosas. No existen especies definidas aún para este grupo, solamente son conocidas como *Bradyrhizobium* sp. seguido por el género de la leguminosa hospedera en paréntesis (Young y Haukka, 1996).

Otros autores (Bécquer, 1998; Prévost y col. 1998, Bécquer y col. 2000a, 2000b; Bécquer y col. 2002) han aislado y caracterizado cepas a partir de nódulos efectivos en leguminosas forrajeras nativas de Cuba (*Centrosema plumieri*, *C. pubescens*, *C. virginianum*; *Neonotonia*

wightii y *Stylosanthes viscosa*). Se comprobó que estas cepas pertenecen a *Bradyrhizobium*, pero con caracteres fenotípicos y genotípicos a nivel intraespecífico, diferenciados del resto de las especies conocidas, por lo que se infiere la presencia de una nueva especie de *Bradyrhizobium*.

La reclasificación de las cepas mediante técnicas de avanzada, constituye una tendencia mundial para todos los rizobiólogos (Velázquez y col. 2001; Laguerre y col. 2001; Bécquer y col. 2002). La cepa ICA 8001 se ha nombrado como *B. japonicum*, antes de 1990, pero no se ha realizado una caracterización reciente según los nuevos métodos de clasificación, por lo que su ubicación filogenética en esta especie pudiera estar desactualizada.

2.2.2.1.1 Efecto de *Bradyrhizobium* sobre la soya

Las bacterias del género *Bradyrhizobium* inducen la formación de nódulos en las raíces de la soya, sitio donde transforman el N₂ atmosférico en compuestos nitrogenados disponibles para el crecimiento y desarrollo del vegetal. Sin el nitrógeno proporcionado por estas bacterias, los costos de producción de la soya se incrementarían por la necesidad de agregar fertilizante químico para lograr rendimientos aceptables.

Numerosos trabajos refieren los beneficios que le brinda al cultivo la inoculación con estos microorganismos. El estado de Iowa, por ejemplo, refiere una población dadivosa de *Bradyrhizobium japonicum* en la mayoría de sus suelos, siempre que se haya cultivado soya durante los últimos años, ello hace que la respuesta del rendimiento a la inoculación no sea significativa. Sin embargo, condiciones como diluvios pueden reducir la población bacteriana significativamente, por lo que entonces la inoculación representa una forma barata de asegurar la nutrición del cultivo (Whigham, 1994).

Investigaciones realizadas en los estados de Kansas y Ohio, en los Estados Unidos, han demostrado incrementos en los rendimientos a un nivel significativo cuando los cultivos son inoculados con *Bradyrhizobium* (Beuerlein, 2001). En Ohio, siete años de estudios de inoculación de soya indicaron que la inoculación es una práctica altamente aprovechable.

Aunque los resultados no siempre han sido positivos, el resultado a largo plazo es una ganancia de más del 400%.

En Cuba, a partir del año 1995 se incrementa la producción de inoculantes. En 1996 se diversifica en cuatro provincias del país para garantizar, conjuntamente con los factores integrales de manejo, preparación de los productores y la integración agricultura-industria, el incremento sostenido de la siembra de soya. La inoculación permite ahorrar entre 517 500 y 1 069 500 USD por concepto de sustitución del fertilizante nitrogenado (más de 1 000 000 de Kg de nitrógeno aportado al sistema) y facilita el maximizar la producción utilizando la fijación biológica del nitrógeno como una forma natural de fertilización nitrogenada, económicamente ventajosa y ecológicamente deseable (López, 1996).

Muchas compañías y productos han entrado en el mercado, manifestándose un interés renovado en la inoculación de semillas, incluso en campos que tienen una historia de producción del cultivo. Los Laboratorios del estado de Urbana, por ejemplo, son acreedores de una licencia exclusiva para producir y vender una patente a base de *B. japonicum* (Vitosh, 2000).

2.2.3 Factores de nodulación

Los flavonoides liberados en los exudados de la planta se unen a la proteína Nod D presente en la membrana del rizobio y conjuntamente activan la transcripción de los genes de nodulación (Long, 1996; Schlaman y col. 1998; Downie, 1998), genes que codifican para las enzimas involucradas en la síntesis de los factores de nodulación. De esta forma, la interacción flavonoide - NodD representa el primer paso específico para el hospedero en el establecimiento de la simbiosis.

La estructura de los Factores Nod consiste en un oligosacárido de 2 a 6 unidades de *N*-acetil glucosamina unidas por enlace β ,1-4 y llevan una cadena de *N*-acil en el extremo no reductor (Figura 2). Algunos grupos se añaden a la estructura básica mediante la acción de enzimas específicas, determinando la actividad biológica de estas moléculas. Los factores de

nodulación son los principales determinantes del rango de hospedero en la simbiosis: solamente tipos y mezclas específicas de factores Nod permitirán al rizobio nodular determinada leguminosa (Spaink y col. 1995). Relic y col. en 1994 caracterizaron a estas moléculas como “la llave para la puerta leguminosa”.

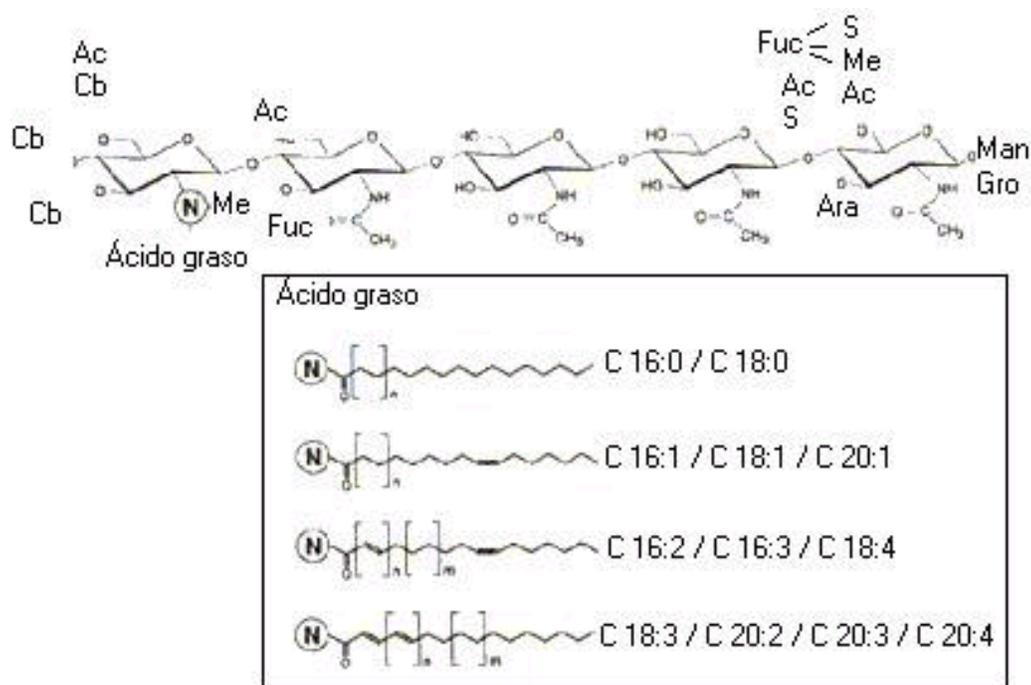


Figura 2. Posibles estructuras del factor Nod (tomado de Bladergroen y Spaink, 1998). Ac: acetilo; Cb: carbamoilo; Me: metilo; Fuc: fucosilo; Man: manosilo; Ara: arabinosilo; Gro: glicerol.

Se ha demostrado que estos factores inducen varias respuestas en la planta, las que incluyen el enroscamiento y deformación de los pelos radicales, la formación del cordón de infección, la despolarización de membranas, la división celular en la corteza, la formación de nuevos flavonoides, la inducción de genes nodulin y la formación de raíces finas y cortas (Vijn y col. 1993; Stokkermans y Peters, 1994; Heidstra y col. 1997).

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 *nod C* (Geremia y col. 1994). 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 (Kamst y col. 1997; 1999). Finalmente una aciltransferasa, codificada por *nod A*, une la cadena acil al carbono C-2 libre de acetilo del terminal no reductor del oligosacárido (Debellé y col. 1996). 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 (Cárdenas y col. 1996; Fernández-López y col. 1996).

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. Perret, Stahelin y Broughton (2000) las han denominado como decoraciones barrocas, ya que ellas resaltan y no sostienen la estructura básica de la molécula.

Cada cepa produce una familia de factores Nod, algunas en mayor medida como *Rhizobium* sp. NGR234, a lo que se le adjudica el amplio rango de hospederos que la caracteriza (Price y col. 1992). Sin embargo, rizobios que muestran un rango de hospedero estrecho también producen mezclas de factores Nod, sugiriéndose que diversas moléculas pueden actuar cooperativamente para inducir la nodulación (Minami y col. 1996).

No se han identificado moléculas con estructura similar a los factores de nodulación en otros organismos. En algún momento esto 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 (Schmidt y col. 1993). Factores Nod purificados son capaces de inducir división celular en protoplastos de este cultivo, activando la respuesta auxínica (Röhrig y col. 1994). En cultivos celulares de tomate estimulan una rápida alcalinización del medio (Staehein y col. 1994) y en determinada línea celular de zanahoria, también han rescatado la posibilidad de formar embriones somáticos (De Jong y col. 1993). Tales estudios demuestran que también algunas plantas no leguminosas son capaces de reconocer y responder ante los factores Nod.

Los lipoquitinolisacáridos caracterizados en *Bradyrhizobium elkanii* varían en el tamaño de su 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. Carlson y col. en 1993 identificaron 10 estructuras diferentes de estas moléculas en *B. elkanii* USDA 61 a partir de varias fracciones obtenidas por cromatografía líquida de alta presión:

NodBj-V(C _{18:1} ,MeFuc)	NodBj-IV(C _{18:1} ,MeFuc)	NodBj-IV(C _{18:1} ,NMe,Fuc,Gro)
NodBj-V(Ac,C _{18:1} ,MeFuc)	NodBj-IV(Cb,C _{18:1} ,MeFuc)	NodBj-IV(Cb,C _{18:1} ,NMe,Fuc,Gro)
NodBj-V(Cb,C _{18:1} ,Nme,MeFuc)	NodBj-IV(C _{18:1} ,Fuc,Gro)	
NodBj-V(Ac,Cb,C _{18:1} ,MeFuc)	NodBj-IV(Cb,C _{18:1} ,Fuc,Gro)	

Stokkermans y Peters en 1994 demostraron que las tres fracciones que contenían estas estructuras ejercían actividad biológica sobre *Glycine soja* Siebold et Zucc. Posteriormente, en 1996 Stokkermans y col., completaron los estudios de caracterización química de los factores Nod producidos por esta cepa, purificando los picos de menor absorbancia. Estructuras similares fueron identificadas, pero con combinaciones singulares de los sustituyentes:

NodBe-V(Cb,C _{16:0} ,MeFuc)	NodBe-V(Cb,C _{16:0} ,Nme,MeFuc)	NodBe-V(C _{18:1} , Fuc,Gro)
NodBe-IV(C _{16:0} ,NMe,Fuc,Gro)	NodBe-IV(Ac,C _{16:0} , Fuc,Gro)	NodBe-V(Ac,C _{18:1} ,MeFuc)
NodBe-V(C _{16:0} , Fuc,Gro)	NodBe-V(Ac,2Cb,C _{18:1} ,MeFuc)	
NodBe-V(2Cb,C _{16:0} ,MeFuc)	NodBe-V(2Cb,C _{18:1} ,MeFuc)	

Esta variabilidad permite potencialmente la formación de al menos 96 estructuras diferentes, de las cuales 23 ya han sido identificadas, demostrando la diversidad metabólica de esta especie (Stokkermans y col. 1996). La significación biológica de la producción de tantas estructuras diferentes por *B. elkanii* y la capacidad de responder de las leguminosas hospederas a todas ellas es algo que aún está por determinarse.

2.2.3.1 Inductores de la síntesis de los factores de nodulación

Se plantea que los principales compuestos con poder de inducción sobre los genes de nodulación en Rhizobiaceae son los flavonoides.

La exudación de flavonoides por las raíces de la planta es el paso inicial en el intercambio recíproco que se establece entre el macro y el microsimbionte en la simbiosis rizobio-leguminosa (Rolfe, 1998; Peters y Verma, 1990). El microsimbionte compatible es capaz de reconocer compuestos flavonoides específicos mediante su proteína Nod D, la cual, como consecuencia, dispara la expresión de los genes de nodulación (Mulligan y Long, 1985). Los flavonoides son intermediarios en las vías para la biosíntesis de compuestos fenólicos en la planta, incluyendo las moléculas de fitoalexinas involucradas en el sistema de defensa (Vickery y Vickery, 1981).

La tabla 1 muestra los principales flavonoides inductores de los genes de nodulación en algunas de las especies de (*Brady*)*Rhizobium*.

Tabla 1. Principales compuestos fenólicos encontrados como fuertes inductores de los genes de nodulación en (*Brady*)*Rhizobium*.

<i>Rhizobium</i> ó <i>Bradyrhizobium</i> spp.	Inductores más potentes	Referencia
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	Apigenina, Naringenina, Luteolina, 7,3',4'-trihidroxiflavona; hesperitina	Dénarié, Debellé y Rosenberg, 1992.
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	Luteolina, Apigenina, 7,4'-dihidroxiflavona	Dénarié, Debellé y Rosenberg, 1992
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	Apigenina, Luteolina, Genisteína, Naringenina	Davis y Johnston, 1990
<i>R. meliloti</i>	Luteolina, 4,4'-dihidroxiflavona; 7,4'-dihidroxiflavanona; 7,3',4'-trihidroxiflavona, 2'-metoxichalcona	Dénarié, Debellé y Rosenberg, 1992; Dharmatilake y Bauer, 1992.
<i>Bradyrhizobium</i>	Genisteína, Daidzeína, Isoliquiritigenina	Stacey y col. 1995 Rao y Cooper, 1995

Además de los flavonoides, se han identificado otros compuestos inductores de los genes de nodulación que no pertenecen a esta clase de compuestos fenólicos. Para *Bradyrhizobium*, por ejemplo, se conoce que compuestos como los ácidos ferúlico y clorogénico, así como el coniferilalcohol, ejercen una actividad de inducción *nod* tan fuerte como el cumestrol. Los ácidos cafeico y cumárico son menos activos, pero aún inductores (Kape, Parniske y Werner, 1991).

Recientemente se ha descubierto una nueva familia de inductores para *Mesorhizobium loti*, *Rhizobium lupini* y *Sinorhizobium melloti*: los ácidos aldónicos (Gagnon e Ibrahim, 1998).

Dado que los flavonoides pueden causar inducción de los genes *nod* a concentraciones en el rango micromolar y nanomolar, los agrónomos pudieran manipular el efecto de estos compuestos mediante su aplicación directa, seleccionando combinaciones de cepas-hospederos que estimulen el incremento en la síntesis y liberación de los inductores. Como resultado de ello podría incrementarse la nodulación, la fijación del nitrógeno y los rendimientos del grano (Dakora, 1995).

En este sentido, Pan, Zhang y Smith en 1998, estudiaron el efecto de la genisteína añadida al medio de cultivo de plántulas de soya y encontraron que la adición de este isoflavonoide incrementó el tamaño de los nódulos, su número y masa por planta y la concentración de nitrógeno en los retoños.

Similares y alentadores resultados fueron encontrados también por Hungria y Stacey (1997) en suelos de Brasil al inocular semillas de soya y frijol sumergidas en una solución 40 μ M de genisteína. Estos tratamientos produjeron plantas con un número de nódulos significativamente superior: 15 y 20 % para soya y frijol, respectivamente.

Abdala (1994) demostró que la irrigación de plantas de soya con compuestos fenólicos también provocó un incremento en la nodulación, así como en la actividad de las enzimas NADH-GOGAT y NADH-GDH.

Estos resultados sugieren que es posible incrementar la nodulación en especies de leguminosas mediante la adición de inductores exógenos de los genes *nod*. Tales inductores pudieran obtenerse a partir de fuentes naturales, dentro de las cuales destacan las semillas y los exudados radicales, o sintetizados químicamente. Teniendo en cuenta que tales compuestos son activos a bajas concentraciones, su adición a los inoculantes pudiera llevarse a cabo con un bajo costo.

2.3 Medios de cultivo

Cada organismo requiere encontrar en su medio todas las sustancias necesarias para la generación de energía y la biosíntesis celular. Los elementos de ese medioambiente que son utilizados para el crecimiento celular se refieren como nutrientes (Todar, 2001). Los requerimientos nutricionales de una célula bacteriana son revelados por su composición elemental, la cual se compone de C, H, O, N, S, P, K, Mg, Fe, Ca, Mn y trazas de Zn, Co, Cu y Mo. Estos elementos se encuentran en forma acuosa, iones inorgánicos, pequeñas moléculas y macromoléculas, las cuales desempeñan un papel estructural o funcional en la célula. Las funciones fisiológicas generales de estos elementos se resumen en la tabla 2.

Los elementos traza son iones metálicos requeridos por ciertas células en cantidades tan pequeñas que resulta difícil detectarlos o medirlos, no es necesario adicionarlos al medio como nutrientes, pues están presentes como “contaminantes” del agua u otros componentes. Actúan como cofactores de reacciones enzimáticas en la célula.

Tabla 2. Principales elementos requeridos por un microorganismo para su crecimiento, porcentaje que representa en la célula, fuente y función fisiológica que desempeña (Todar, 2001).

Elemento	% de la masa seca celular	Fuente	Función
Carbono	50	Compuestos orgánicos o CO ₂	Constituyente fundamental del material celular
Oxígeno	20	H ₂ O, compuestos orgánicos, CO ₂ y O ₂	Constituyente del material celular y el agua en la célula, aceptor de electrones en la respiración aerobia
Nitrógeno	14	NH ₃ , NO ₃ ⁻ , compuestos orgánicos, N ₂	Constituyente de aminoácidos, ácidos nucleicos, nucleótidos y coenzimas
Hidrógeno	8	H ₂ O, compuestos orgánicos, H ₂	Principal constituyente de los compuestos orgánicos y del agua en la célula

Elemento	% de la masa seca celular	Fuente	Función
Fósforo	3	Fosfatos inorgánicos (PO_4^{3-})	Constituyente de ácidos nucleicos, nucleótidos, fosfolípidos, LPS, ácidos teicoicos
Azufre	1	SO_4^{2-} , H_2S , S^0 , compuestos orgánicos sulfurados	Constituyente de cisteína, metionina, glutatión y varias coenzimas
Potasio	1	Sales de potasio	Principal catión inorgánico celular y cofactor de ciertas enzimas
Magnesio	0.5	Sales de magnesio	Catión inorgánico celular y cofactor de ciertas reacciones enzimáticas
Calcio	0.5	Sales de calcio	Catión inorgánico celular, cofactor de ciertas enzimas y componente de endosporas
Hierro	0.2	Sales de hierro	Componente de citocromos y ciertas hierro-proteínas, cofactor de algunas reacciones enzimáticas

Para crecer, ya sea en la naturaleza o en condiciones de laboratorio, las células necesitan de una fuente de energía, de carbono y de otros nutrientes, así como de condiciones tales como concentración de oxígeno, temperatura y pH.

Los medios de cultivo, ya sean preparaciones sólidas, semisólidas o líquidas, constituyen el micromundo de los microorganismos en condiciones de laboratorio, intentando ser un reflejo de su hábitat natural con relación a la satisfacción de sus más vitales y principales necesidades como ser vivo (Herrera, 1985). El diseño de un medio de cultivo responderá entonces a las exigencias del microorganismo en cuestión y a la finalidad que se persigue con su multiplicación.

Dependiendo de su composición o finalidad los medios de cultivo pueden ser clasificados en diferentes categorías: un medio químicamente definido (sintético) es aquel en el cual se conoce la composición química exacta y uno indefinido es aquel en el cual no se conoce. Los medios complejos contienen compuestos de origen biológico tales como sangre, leche, extracto de levadura o extracto de carne, de los cuales, la composición química exacta obviamente es indeterminada. Este tipo de medio frecuentemente proporciona el rango completo de factores de crecimiento que pueden ser requeridos por un organismo (Madigan, Martinko y Parker, 2003).

Los rizobios son organismos heterótrofos (utilizan como fuente de energía compuestos orgánicos), exigentes que se desarrollan en medios ricos, aunque existen gran variedad de cepas que difieren en sus requerimientos nutricionales, necesitando en el medio vitaminas y aminoácidos (Frioni, 1990).

Según la finalidad que se persiga, los medios a emplear para el cultivo de estos microorganismos pueden ser complejos o definidos. Los complejos son los más comúnmente empleados, sobre todo en la preparación de inoculantes. Un ejemplo de este tipo de medio es el Medio YEM (extracto de levadura-manitol-agar) (Vincent, 1970).

Los rizobios de crecimiento rápido utilizan una mayor variedad de fuentes carbonadas, siendo la sacarosa y el manitol los sustratos de preferencia. El glicerol y las pentosas (L-arabinosa, xilosa, ribosa) son preferidas por los rizobios de crecimiento lento (Graham, 1975).

El catabolismo de la glucosa, fructosa, sacarosa, manosa, gluconato y arabinosa fue estudiado en diferentes especies (Arias, Gardiol y Martínez-Drets, 1982), demostrándose en extractos acelulares la presencia de enzimas de las vías Entner-Doudoroff (ED), de pentosa-fosfato (PF) y del ciclo de los ácidos tricarbónicos (ATC) en especies de crecimiento rápido y de enzimas de la vía ED y ATC en especies de crecimiento lento.

Los requerimientos en nitrógeno no son específicos; el nitrato y el amonio pueden ser empleados por la mayoría de las cepas, pero a menudo se obtienen mejores crecimientos con aminoácidos como glutamato y aspartato.

Muchas especies de *Rhizobium* son estimuladas por factores de crecimiento como biotina, tiamina, riboflavina o pantotenato de calcio. El requerimiento es variable y algunas especies y aun cepas se desarrollan mejor sin el agregado de ellos (Frioni, 1990). Para el desarrollo bacteriano se requieren también algunos aniones y cationes como K^+ , Mg^{2+} , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , Cl^- ; además de trazas de Co^{2+} , Ca^{2+} (relacionado con la estructura de la pared).

Los medios definidos, en los cuales el extracto de levadura es reemplazado por compuestos nitrogenados inorgánicos, aminoácidos y cofactores, se emplean para determinar

en esta especie los requerimientos nutritivos, los productos del catabolismo, las vías metabólicas y la identificación de mutantes (Vincent, 1977).

La composición del medio de cultivo puede influir sobre diferentes aspectos en la fisiología del microorganismo: su nutrición, multiplicación, la producción de metabolitos primarios y secundarios (Bernal, Illanes y Ciampi, 2002). Por ello, desde hace muchos años se diseñan medios con fines prácticos: para fermentar poblaciones microbianas, desde levaduras para la obtención de alcohol, lactobacillus para yogurt, virus para vacunas, hasta bacterias radicales para la inoculación de semillas (Bowen y col. 1963).

Gurusiddaiah y Singh en 1988 patentaron la producción del antibiótico Treponemycina a partir de cepas de *Streptomyces albovinaceous*, cuando se cultivan en medio líquido con avena. Villar y Zúñiga (1999) encontraron un marcado efecto de diferentes medios de cultivo sobre la interacción de *Azotobacter-Rhizobium* y su efecto sobre la nodulación, el crecimiento y desarrollo del trébol.

En las investigaciones llevadas a cabo con la cepa ICA 8001 en Cuba comúnmente se ha empleado el medio YEM (Vincent, 1970) y para la producción de inoculantes el medio Propagación (López, 1990), por lo que ambos son considerados como medios tradicionales para el cultivo de esta cepa.

Los medios de cultivo antes mencionados son considerados complejos. En el primero el extracto de levadura le imprime esta característica, mientras que en el medio Propagación la melaza además del extracto de levadura aporta varios compuestos a su complejidad. Ambos medios han permitido durante años la multiplicación celular de la cepa ICA 8001 y la obtención de inóculos con fines prácticos sobre la fertilización de la soya, con resultados satisfactorios. Sin embargo, no se ha tenido en cuenta en el diseño de estos medios de cultivo la posibilidad de inducir a una expresión más elevada los genes de nodulación en la bacteria, lo cual sin dudas, los haría más eficientes.

Por lo anterior se hace necesaria la optimización o diseño de medios de cultivos que tengan como objetivos ambas características: alta obtención de biomasa y de producción de factores Nod.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos fueron realizados en el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), perteneciente al Ministerio de Educación Superior y situado en el Municipio de San José de las Lajas, Provincia de La Habana y en el Centro de Genética Microbiana y de las Plantas (CMPG), perteneciente a La Universidad Católica de Leuven, en Bélgica. Parte del estudio de ubicación taxonómica de la cepa *Bradyrhizobium japonicum* ICA 8001 se llevó a cabo en el Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno de la Universidad Autónoma de México (UNAM).

Material microbiano

Para el desarrollo del trabajo se utilizaron las cepas que se mencionan en la tabla 3.

Tabla 3: Cepas empleadas en el desarrollo del trabajo según su procedencia y hospedero.

Cepas	Procedencia	Hospedero
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> ICA 8001	Cuba	Soya
<i>Bradyrhizobium elkanii</i> LMG 6134	EE.UU.	Soya
<i>Bradyrhizobium elkanii</i> SEMIA 5019	Brasil	Soya
<i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA 76	EE.UU.	Soya
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 136	EE.UU.	Soya
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	EE.UU.	Soya
<i>Bradyrhizobium</i> sp. (cepa 70)	México	Lupinus
<i>Bradyrhizobium</i> sp. (cepa 90)	México	Lupinus

Las bacterias fueron cultivadas en los diferentes medios de cultivo en condiciones de agitación ó estáticos, según lo requiriera el ensayo, a 30 °C. Para su conservación se mantuvieron a 4 °C en medio Manitol extracto de levadura (YEM) (Vincent, 1970) y a –80 °C en medio TY (Behringer, 1974)-glicerol al 50%.

El trabajo con los microorganismos se llevó a cabo en condiciones asépticas, empleando un flujo laminar ANALIS tipo AB 180.

Medios de cultivo

Durante la ejecución de los experimentos se utilizaron los siguientes medios de cultivo:

Medio PY ó TY (Behringer, 1974).

Medio Agar agua (Atlas, 1993).

Medio Manitol Extracto de Levadura (YEM) (Vincent, 1970)

Manitol	10,0 g·L ⁻¹
Extracto de levadura	1,0 g·L ⁻¹
K ₂ HPO ₄	0,5 g·L ⁻¹
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g·L ⁻¹
NaCl	0,1 g·L ⁻¹
CaCO ₃	0,25 g·L ⁻¹
pH	6,8

Medio de Propagación (López, 1990)

Melaza	10,0 g·L ⁻¹
Extracto de levadura	5,0 g·L ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g·L ⁻¹
K ₂ HPO ₄	0,5 g·L ⁻¹
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g·L ⁻¹
NaCl	0,1 g·L ⁻¹
CaCO ₃	1,0 g·L ⁻¹
pH	6,8

Medio de Propagación modificado (este trabajo)

Para el molinado de la soya se tomaron semillas frescas de la variedad Cubasoy 23 y se procesaron en un molino foliar. La melaza utilizada provino del Complejo Agroindustrial Héctor Molina, ubicado en la Provincia La Habana, zafra 1995.

Material Vegetal. Condiciones de crecimiento y desarrollo

Se utilizaron las variedades de soya William'82, procedente de EE.UU.; Cubasoy'23 del INIFAT, Cuba; Incasoy'24 del INCA, Cuba, así como Tapachula de México y Suprema, de Brasil. Se emplearon semillas certificadas provenientes del Banco de Semillas del INCA y las plantas fueron cultivados en dependencia de las condiciones de cada ensayo.

3.1 Caracterización taxonómica de la cepa ICA 8001

Se determinaron las características culturales, morfológicas y tintoriales de la cepa *B. japonicum* ICA 8001 mediante microscopía estereoscópica (microscopio estereoscópico XL11-3) y óptica (microscopio óptico OLYMPUS) según su crecimiento en medio YEM sólido a 30 °C después de 7 días, pH 6.8 y la característica de modificación de pH del entorno en este mismo medio con 0.5 % de indicador bromocresol púrpura en hidróxido de sodio (0.016 N), a pH 5.5.

Para la diferenciación de las células se empleó la tinción de Gram, variante de Jensen (Collins, 1969).

El ADN de las diferentes cepas estudiadas se amplificó por PCR empleando los cebadores fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y rD1 (5'AAGCTTAAGGAGGTCATCCAGCC-3') diseñados por Weisburg y col. 1991, bajo las condiciones de amplificación de van Berkum, Beyene y Eardly (1996). Estos cebadores amplifican para casi todo el ARNr 16S de eubacterias, obteniéndose aproximadamente 1500 pb. Volúmenes de 10 µL de los amplicones fueron chequeados por electroforesis en geles de agarosa al 1 %. Los resultados del PCR se digirieron con las enzimas de restricción *Ddel*, *MspI*, *Sau3AI*, *HinfI*, *RsaI* y *HhaI* y fueron visualizados en geles de agarosa al 3% según se describe por Laguerre y col. en 1994, empleando un marcador (ladder) de 1 kb (100 pb por banda) (Pharmacia Biotech). Como patrones para comparar se emplearon las cepas *B. japonicum* USDA 110, *B. elkanii* USDA 76 y *Bradyrhizobium* sp. (cepas 90 y 70 de *Lupinus*).

El porcentaje de homología entre las cepas, según la distribución de los fragmentos de restricción, fue calculado de forma automatizada utilizando el paquete de programas NTSYS, versión 1.70.

Se obtuvo un dendrograma a partir de los resultados del RFLP, mediante el programa SPSS versión 10.0 para Windows, y se realizó el análisis de la medida de los clusters por el método de enlace de grupos, utilizando como matriz de similitud el coeficiente de Jaccard.

3.2 Ensayos de nodulación *in vitro*

3.2.1 Aspectos generales

Para los estudios de nodulación en condiciones de laboratorio se realizaron experimentos con diseño completamente aleatorizado, en los cuales se utilizaron 10 plantas por tratamiento. Los datos se sometieron a la prueba de normalidad (test de Bartlett) y homogeneidad de varianza (test de Kolmogorov-Smirnov) y se aplicó análisis de varianza de clasificación simple,

utilizando la prueba de rangos múltiples de Duncan ($P < 0.05$) para discriminar diferencias entre medias (Sigarroat, 1985).

Se emplearon semillas de soya de la variedad "William 82", las que se desinfectaron en etanol al 70 % durante 30 segundos y posteriormente en bicloruro de mercurio al 0.2 % (v/v) durante 90 segundos. Se enjuagaron 10 veces con agua destilada estéril y se dejaron reposar por una hora en agua destilada estéril para estimular la germinación. Se colocaron 10 semillas por placa Petri sobre medio Agar agua, se recubrieron con papel de aluminio y se incubaron durante 4 días a 30 °C. Se emplearon 10 placas por experimento.

Las semillas pregerminadas, con aproximadamente 20 mm de raíz emergente, fueron colocadas en frascos de 250 mL de volumen que contenían 150 mL de medio Norris y Date semisólido (Norris y Date, 1976), a razón de una semilla por frasco. Las raíces de las plántulas se inocularon descargando con micropipeta 200 μL de los inóculos obtenidos con la cepa *B. japonicum* ICA 8001 en los diferentes medios de cultivo en concentración celular de 1.5×10^8 UFC.mL⁻¹, correspondiente a D.O = 0.1, $\lambda=600$ nm. Un tratamiento de plantas sin inocular se utilizó como control en cada ensayo.

Las plantas se cultivaron en un cuarto de crecimiento con un fotoperíodo de 12 h luz/12 h oscuridad, a una temperatura día/noche de 26°C/22°C y humedad relativa del 70 %, según la técnica descrita por Michiels y col. en 1998.

Cuatro semanas posteriores a la inoculación, se determinó el número de nódulos por planta, la masa fresca y seca de los nódulos, así como la capacidad de fijación de nitrógeno de las plantas mediante el ensayo de reducción del acetileno, empleando un cromatógrafo de gases (5890 A; Hewlett-Packard, equipado con una columna de CHROMPACK "PLOT" (Porous Layer Open Tubular), 50 metros x 0.32 mm con Al₂O₃/KCl 5.0 μm a 60 °C) según se describe en Dombrecht (2001). La temperatura del horno fue de 130 °C, el flujo de N₂ de 50 mL. min⁻¹ y el de aire e hidrógeno fue de 300 mL. min⁻¹.

Las plantas fueron cortadas dejando sólo el sistema radical con los nódulos. Los frascos se sellaron con tapas herméticas de goma a través de las cuales se inyectaron 10 mL de acetileno. Se incubaron durante 15 minutos para medir entonces la cantidad de etileno formado extrayendo 100 μL de gas e inyectándolo en el cromatógrafo. Como referencia se utilizó un estándar interno de 100 μL de gas propano por frasco. Los valores obtenidos se expresaron como micromoles de etileno producidos por planta por hora ($\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{pl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

3.2.2 Efecto de la semilla de soja molinada (Sm) y de la melaza (M) en diferentes concentraciones en el medio de cultivo en la nodulación

Se utilizaron los siguientes tratamientos:

T1: medio base Manitol-extracto de levadura (YEM)

T2: medio YEM con frijol de soja molinado a la concentración de 5 g.L^{-1} (YEM+Sm/5)

T3: medio YEM con frijol de soja molinado a la concentración de 10 g.L^{-1} (YEM+Sm/10)

T4: medio YEM con frijol de soja molinado a la concentración de 15 g.L^{-1} (YEM+Sm/15)

T5: medio YEM con melaza a la concentración de 5 g.L^{-1} (YEM+M/5)

T6: medio YEM con melaza a la concentración de 10 g.L^{-1} (YEM+M/10)

T7: medio YEM con melaza a la concentración de 15 g.L^{-1} (YEM+M/15)

T8: medio YEM con frijol de soja molinado a la concentración de 10 g.L^{-1} y melaza a la concentración de 5 g.L^{-1} (YEM+Sm/10+M/5)

T9: medio YEM con frijol de soja molinado y melaza a la concentración de 10 g.L^{-1}
(YEM+Sm/10+M/10)

T10: control sin inocular (Control s.i.)

3.2.3 Influencia de diferentes medios de cultivo sobre la nodulación de la soja

Se utilizaron los siguientes tratamientos:

T1: medio Manitol-extracto de levadura (YEM)

T2: medio YEM con genisteína $10 \mu\text{M}$ (YEM+G/10)

T3: medio YEM con frijol de soja molinado a la concentración de 10 g.L^{-1} (YEM+Sm/10)

T4: medio YEM con frijol de soya molinado y tratado enzimáticamente a la concentración de 10 g.L^{-1} (YEM+Sm/10+Ez)

T5: medio YEM con melaza a la concentración de 10 g.L^{-1} (YEM+M/10)

T6: medio Propagación (Propagación)

T7: medio Propagación modificado (P. modificado)

T8: control sin inocular (Control s.i.)

Para el tratamiento enzimático de la soya se empleó como buffer de reacción la mezcla KH_2PO_4 0.1 M y 300 μL de H_2SO_4 (96%), a un pH de 4.0. Se adicionó la soya a razón de 20 g por litro, homogeneizándose dos veces durante 5 minutos a velocidad máxima en licuadora doméstica Osterizer. Se esterilizó esta mezcla en autoclave a 121°C , durante 25 minutos y una vez a temperatura ambiente se añadieron los complejos enzimáticos Ultrazym y Viscozyme (Novozyme) a razón de 1 g y 2 mL, respectivamente. La mezcla de reacción se incubó a 45°C con agitación constante en agitador magnético durante 24 horas. Pasado este tiempo se filtró a través de un embudo con placa filtrante de 0,5 micrones. Este filtrado se adicionó al medio a una concentración final de 10 g.L^{-1} .

3.2.4 Efecto inductor de las células bacterianas o de sus productos metabólicos en la nodulación de la soya

Se emplearon los medios de cultivo Propagación y Propagación modificado para obtener los inóculos según se describe en 3.2.1.

En una parte del experimento, correspondiente a la mitad del total de las plantas, se adicionó el caldo de fermentación completo con las células a cada planta. En la otra mitad se añadió el fermento de cada medio libre de bacterias, para lo cual se filtró el medio fermentado a través de filtros de nitrocelulosa de 0.2 μm .

El experimento se llevó a cabo en condiciones controladas utilizando un experimento con diseño completamente aleatorizado con descomposición factorial en los factores medio de cultivo y presencia o ausencia de células a dos niveles.

3.3 Producción de factores de nodulación por *Bradyrhizobium* en presencia de diferentes sustratos y medios de cultivo

Los factores de nodulación fueron aislados, purificados e identificados siguiendo la metodología descrita por Laeremans y col. (1998). Se marcaron radioactivamente con ácido acético $^{14}\text{C}[2-^{14}\text{C}]$ en forma de sal de sodio para su caracterización mediante cromatografía de capa delgada y para su determinación mediante cromatografía líquida de alta resolución las células fueron cultivadas en 1 litro de medio sin marcaje radioactivo.

3.3.1 Detección de la producción de factores de nodulación en la cepa *B. japonicum* ICA 8001 mediante cromatografía de capa delgada (TLC)

Se estudió el perfil de factores de nodulación producidos y excretados por la cepa *B. japonicum* ICA 8001 en los medios de cultivo YEM, Propagación y Propagación modificado y los sustratos soya molinada y melaza a la concentración de 10 g.L^{-1} y genisteína $10 \mu\text{M}$, añadidos al medio YEM. La soya fue utilizada en las variantes cruda y tratada enzimáticamente. Se utilizó además la genisteína $10 \mu\text{M}$ como amplificador de la respuesta de inducción en todos los extractos.

3.3.2 Detección de la producción de factores de nodulación en la cepa *B. japonicum* ICA 8001 mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase normal

Se determinó la producción de factores de nodulación por la cepa ICA 8001 en los medios YEM, Propagación y Propagación modificado, así como en este último medio con la adición de genisteína como amplificador a la concentración de $10 \mu\text{M}$. Los factores Nod purificados se redisolviaron en 100 % acetonitrilo y se inyectaron en una columna de fase normal Ultropac TSK OH-120 5um LKB con dimensiones de $4.6 \times 250 \text{ mm}$; el flujo del solvente: 1 mL.min^{-1} ; como solventes se emplearon: acetonitrilo (A): agua (B); el detector: un espectrofotómetro UV a 206 nm y una celda de 10 mm , el Gradiente en una bomba Knauer: 0/0 10/0 70/20 t/%B y con una Inyección de $250 \mu\text{L}$ en 100 % de acetonitrilo. El tiempo de corrida en todos los casos fue

de 70 minutos. Se evaluó el perfil cromatográfico de los factores de nodulación producidos según el número, distribución e intensidad relativa de los picos obtenidos.

3.3.3 Efecto de diferentes inductores y sus concentraciones en la producción de los factores de nodulación para cepas de *Bradyrhizobium* de diferentes orígenes

Se determinó mediante cromatografía de capa delgada la producción de factores Nod por las cepas *B. elkanii* SEMIA 5019, *B. japonicum* USDA 136 y *B. japonicum* ICA 8001, en presencia de genisteína 5 y 10 μM , melaza, y soya molinada, ambas a 5 y 10 g.L^{-1} . Se utilizó el medio YEM como base y no se empleó amplificador de respuesta.

3.4 Efecto de diferentes medios de cultivo en la multiplicación celular de *Bradyrhizobium*

Se utilizaron los medios YEM (Vincent, 1970); Propagación (López, 1990) y Propagación modificado para estudiar la dinámica de crecimiento de *Bradyrhizobium* con las cepas *B. japonicum* ICA 8001 y *B. elkanii* LMG 6134. Se evaluó el efecto de los factores medio de cultivo y cepas, con tres y dos niveles respectivamente, empleándose 5 réplicas por tratamiento en un diseño completamente aleatorizado.

Como inóculo estas cepas fueron cultivadas durante 3 días en medio YEM, a 30 °C y en condiciones de agitación. Los precultivos se diluyeron en MgSO_4 (10 mM), hasta un valor de densidad óptica de 0.3 a $\lambda=595$ nm (dilución aproximada de 10 veces; espectrómetro Lambda-2, Perkin Elmer, UV/VIS). Posteriormente, los inóculos con igual número de bacterias, se diluyeron 100 veces en los diferentes medios de cultivo bajo estudio y 300 μL de cada una de las suspensiones bacterianas se inocularon en los pozos de una placa de microtítulo.

Las bacterias se cultivaron a 30°C durante 6 días a 230 rpm y su multiplicación fue medida automáticamente cada 30 minutos en un Bioscreen C (Labsystems, Helsinki, Finlandia), a una longitud de onda de 595 nm. Para cada punto se calculó la densidad óptica promedio y se graficaron los valores cada 120 min, después de lo cual se calculó la velocidad específica de crecimiento μ (h^{-1}) en la fase lineal del crecimiento exponencial según:

$$\mu = \frac{\ln (DO_2 / DO_1)}{(t_2 - t_1)}$$

3.4.1 Influencia de los medios Propagación y Propagación modificado en la producción de factores de nodulación por *B. elkanii* LMG 6134

Se estudió el perfil de factores de nodulación producidos y excretados por la cepa *B. elkanii* LMG 6134 según se describe en 2.3 mediante cromatografía de capa delgada, en los medios de cultivo Propagación y Propagación modificado. No se utilizó amplificador de la respuesta de inducción.

3.5 Extracción de los posibles inductores en varios solventes

Se utilizaron diferentes solventes para obtener extractos de la soya molinada: dimetilsulfóxido (DMSO) al 2% (v/v) (Reagent), metanol y etanol al 75% (v/v) (Merck) y agua destilada. Cada suspensión se homogenizó con agitador magnético durante 2 horas a temperatura ambiente y pH libre.

Los extractos en cada solvente se filtraron por algodón y los filtrados se incluyeron en el medio Propagación modificado en sustitución de la soya molinada en proporción igual a una concentración de sólidos totales iniciales de 10 g.L⁻¹, para estudiar la capacidad de inducción de la síntesis de factores de nodulación en la cepa *Bradyrhizobium japonicum* ICA 8001, según se describe en 3.3.

Diferentes concentraciones del extracto que mostró mayor producción de factores Nod en el medio Propagación modificado se emplearon para evaluar, mediante un diseño completamente aleatorizado de clasificación simple (Sigarroa, 1985), su efecto sobre el crecimiento de la cepa *B. japonicum* ICA 8001, comparándose entre sí y con el frijol de soya molinado íntegro contenido en el mismo medio de cultivo. Se emplearon 5 réplicas por tratamiento y el crecimiento fue seguido por densidad óptica según se describe en 3.4.

3.6 Influencia del medio de cultivo en la nodulación, el crecimiento y desarrollo del cultivo de la soya en condiciones semicontroladas

Se llevaron a cabo dos experimentos, uno con la variedad Suprema y el otro con semillas de la variedad Cubasoy 23, bajo condiciones semicontroladas, en el Área Central del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas durante la época de primavera. En cada uno de ellos se utilizó un diseño completamente aleatorizado con 3 tratamientos y 8 repeticiones cada uno. Los datos se sometieron a la prueba de normalidad y homogeneidad de varianza y se aplicó análisis de varianza simple, utilizando la prueba de rangos múltiples de Duncan ($P < 0.05$) para discriminar diferencias entre medias (Sigarroa, 1985).

Se utilizaron macetas de 5 Kg con suelo Ferralítico Rojo Lixiviado típico éútrico (según Hernández y col. 1999) cuyas características químicas principales se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Algunos componentes de la fertilidad del suelo Ferralítico Rojo Lixiviado típico éútrico del Área Central del INCA. (0-20cm).

MO	pH	P(P ₂ O ₅)	Ca	Mg
(%)	(H ₂ O)	(ppm)	(cmol.Kg ⁻¹)	
3.29	6.6	75.0	10.6	1.8

MO: Materia Orgánica(%): Walkley-Black (Jackson, 1970)

pH(H₂O): potenciométricamente

P(ppm): Oniani, 1964

Cationes intercambiables (cmol.Kg⁻¹): acetato de amonio 1N, pH 7, fotometría de llama. (Jackson, 1970)

La cepa *B. japonicum* ICA 8001 se cultivó en los diferentes medios de cultivo líquidos que se citan a continuación, durante 50 horas a 30 °C, con agitación orbital de 230 rpm. La concentración celular de los caldos se ajustó a 10⁸ UFC.mL⁻¹ de medio en todos los casos y la inoculación se realizó de forma directa sobre la semilla en el momento de la siembra a razón de 1 mL de inóculo por semilla. Los tratamientos ensayados fueron los siguientes:

T1: control sin inocular

T2: medio Propagación

T3: medio Propagación modificado

No se empleó fertilización alguna.

Las plantas se cultivaron hasta la etapa de floración: correspondiente a los 35 días para la variedad Cubasoy 23 y a los 45 días para la variedad Suprema. Se determinó la altura de la

planta, el número de trifoliolos, la masa fresca y seca de la parte aérea y de las raíces, así como el contenido de fósforo y nitrógeno en la parte aérea del vegetal. De los indicadores de la nodulación se evaluaron: número de nódulos, masa fresca y seca nodular, así como su efectividad por planta, según el método visual de la eficiencia de los nódulos (FAO, 1985).

3.7 Efecto del inóculo obtenido en diferentes medios de cultivo sobre el crecimiento y desarrollo de la soya en condiciones de campo

Se realizaron tres experimentos con dos tratamientos cada uno, siguiendo un Diseño de Bloques al Azar con 6, 6 y 4 réplicas, respectivamente. Los dos primeros se llevaron a cabo durante la primavera de 1996 en el área experimental de la Sede Central del INCA (Las Papas), sobre un suelo Ferralítico Rojo Lixiviado típico éutrico, (Hernández y col. 1999), cuyas características principales se describen en la Tabla 5. Se emplearon las variedades Cubasoy 23 e Incasoy 24, respectivamente, y como tratamientos a comparar inóculos procedentes de *B. japonicum* ICA 8001 en los medios Propagación y Propagación modificado, con títulos de 10^8 UFC.mL⁻¹, según la metodología propuesta en el experimento llevado a cabo en condiciones semicontroladas. En estos experimentos no se aplicó fertilización alguna.

Las semillas se inocularon antes de la siembra mediante recubrimiento con los inóculos obtenidos en ambos medios de cultivos e inmovilizados en turba molinada, tamizada y estéril como soporte sólido, según la tecnología descrita por Gómez y col. (1996). Se empleó una dosis de 500 g.ha⁻¹ de producto sólido. Se utilizaron de 25-30 semillas por metro lineal en forma de chorrillo, con distancia de 0.70 m entre surcos, utilizando parcelas con una superficie de 11.2 m² (2.80 m x 4 m) con 4 surcos, tomando los dos centrales (5.6 m²) como área de cálculo. Se evaluó la altura de 10 plantas en la floración y en la cosecha, el número de vainas por plantas, el peso de 100 granos tomados al azar y el rendimiento.

El tercer experimento se desarrolló en el verano de 1996 sobre una extensión de 2 ha de suelo Ferralítico Rojo Lixiviado típico dístrico (según Hernández y col. 1999) (ver características en la Tabla No.5), en la Estación Experimental de Agricultura Sostenible del INCA (Bainoa),

empleándose la variedad Tapachula. Los tratamientos fueron los mismos del ensayo anterior y la inoculación se realizó conforme a dicho experimento.

Se utilizaron parcelas con una superficie de 14 m² (2.80 m x 5 m) con 4 surcos, tomando los dos centrales (7 m²) como área de cálculo. Se empleó superfosfato sencillo como portador de fósforo en el momento de la siembra a razón de 50 Kg.ha⁻¹. Se determinó el efecto de los tratamientos sobre el rendimiento del cultivo.

Los datos obtenidos se sometieron a la prueba de normalidad y homogeneidad de varianza y de acuerdo al diseño empleado, se aplicó análisis de varianza de clasificación simple, utilizando la prueba de rangos múltiples de Duncan (P<0.05) para discriminar diferencias entre medias (Sigarra, 1985).

Tabla 5: Características de los suelos empleados en la ejecución de los experimentos de campo (0-20 cm).

Área agrícola	Tipo de suelo	pH (H ₂ O)	P (ppm)	Materia Orgánica (%)	K	Ca	Mg
					(cmol·Kg ⁻¹)		
Las Papas	Ferralítico Rojo Lixiviado típico éutrico	7.2	417.0	3.2	0.45	11.7	1.60
Bainoa	Ferralítico Rojo Lixiviado típico dístrico	6.6	29.2	3.2	0.23	7.58	1.36

MO: Materia Orgánica (%): Walkley-Black (Jackson, 1970)

pH(H₂O): potenciométricamente

P(ppm): Oniani, 1964

Cationes intercambiables (cmol.Kg⁻¹): acetato de amonio 1N, pH 7, fotometría de llama. (Jackson, 1970)

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización taxonómica de la cepa ICA 8001

Teniendo en cuenta el estado de revisión en que se encuentra la taxonomía de la familia Rhizobiaceae; la importancia de la cepa ICA 8001, utilizada en la mayor parte de los inoculantes para soya producidos en Cuba y el hecho de que su ubicación fue realizada fundamentalmente según criterios de especificidad con el hospedero, se consideró necesario llevar a cabo la caracterización taxonómica de esta cepa. Esto se hizo según el sistema de clasificación actual para rizobios, el cual toma en consideración la taxonomía polifásica, que incluye criterios culturales, morfológicos, bioquímicos, fisiológicos y genéticos.

Se obtuvo lo siguiente: es una bacteria que coloniza y forma nódulos efectivos en soya (*Glycine max.*) Las colonias crecidas en el medio YEM después de siete días de incubación a 30 °C y pH 6,8 se caracterizaron por ser circulares, convexas, muy pequeñas con alrededor de 1 mm de diámetro como promedio, de color blanco a crema. La observación al microscopio óptico de las células teñidas, reveló bacilos pequeños Gram negativos. El crecimiento en medio YEM con bromocresol púrpura, produjo alcalinidad, con un cambio de color en el medio de habano a morado intenso, resultados que coinciden con las características descritas por Holt y col. (1994) para el género *Bradyrhizobium*.

Las características anteriores la diferencian de la otra rizobiácea descrita en ese manual con capacidad para nodular la soya: *Rhizobium fredii* (Scholla y Elkan, 1984), ahora *Sinorhizobium fredii* (de Lajudie y col. 1994), la cual cuando se cultiva en condiciones similares muestra colonias de color beige, circulares, convexas, pero de mayor tamaño con 2-4 mm de diámetro a partir de 3-5 días de incubación. Al crecer en este medio con bromocresol púrpura produce acidez, con un consiguiente cambio de color a amarillo (Holt y col. 1994).

Las pruebas anteriores no conducen a la diferenciación de especies en éstos géneros con cercanía genética tan estrecha y además, en *Bradyrhizobium* se han establecido dos nuevas especies: *B. elkanii* y *B. liaoningense*, la primera de ellas a partir del grupo II de *Bradyrhizobium*

japonicum (Bécquer, 2002). Es por ello que una vez ubicada la cepa dentro del género *Bradyrhizobium*, se hizo necesaria la aplicación de técnicas moleculares para la determinación de la especie.

La amplificación por PCR de los ADN de las diferentes cepas estudiadas ofrecieron productos de amplificación entre 240 y 1480 pb, como era de esperar para los cebadores empleados (Weisburg y col. 1991; Daneshvar y col. 2001; Krasova-Wade y col. 2003).

En la figura 3 se muestran los fragmentos del ARN ribosomal 16S de cada cepa generados por la digestión con la enzima *Dde1*. Se obtuvo un patrón de cinco bandas para *B. japonicum* USDA 110, cuatro para cada una de las dos cepas aisladas de *Lupinus* y seis que coincidieron en posición para la ICA 8001 y *B. elkanii* USDA 76.

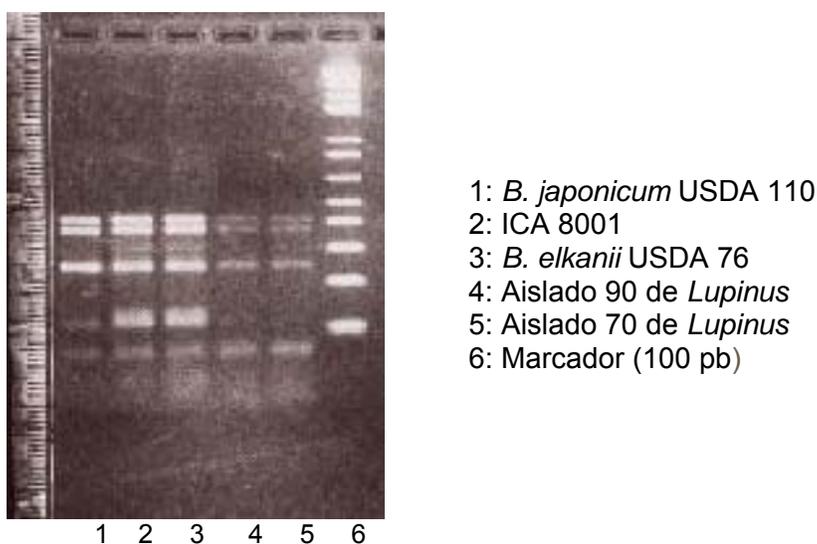


Figura 3. Polimorfismo de los fragmentos de ADN correspondiente al ARNr 16S de diferentes cepas de *Bradyrhizobium* empleando la enzima *Dde1*.

La digestión con las diferentes enzimas de restricción produjo 3 patrones de bandas de restricción que pudieron ser claramente definidos como Grupo I, correspondiente a la cepa USDA 110, Grupo II en el que se encuentran las cepas ICA 8001 y USDA 76 y Grupo III en el que se agrupan las cepas de *Lupinus* (Tabla 6).

Tabla 6. Patrones de restricción determinados mediante análisis de PCR-RFLP al ADN de diferentes cepas de *Bradyrhizobium*.

Enzima de restricción	Cepas			
	Tamaño de los fragmentos de restricción (pb)			
	Grupo I	Grupo II	Grupo II	Grupo III
	<i>B. japonicum</i> USDA 110	ICA 8001	<i>B. elkanii</i> USDA 76	<i>Bradyrhizobium</i> sp. Cepas 70 y 90
<i>Dde1</i>	60, 100, 240, 360, 400	60, 120, 240, 300, 360, 400	60, 120, 240, 300, 360, 400	60, 240, 360, 400
<i>Msp1</i>	80, 150, 210, 300, 500	50, 80, 110, 150, 210, 300, 500	50, 80, 110, 150, 210, 300, 500	50, 80, 150, 210, 300, 500
<i>Sau3A1</i>	60, 80, 180, 210	60, 80, 110, 180, 210, 520	60, 80, 110, 180, 210, 520	60, 180
<i>Rsa1</i>	60, 180, 380	60, 180, 510, 600	60, 180, 510, 600	60, 180
<i>Hinf1</i>	180, 400, 600	180, 250, 380, 400	50, 180, 250, 380, 400	50, 180, 400, 600
<i>Hha1</i>	40, 60, 80, 100, 150, 300, 650	40, 60, 80, 100, 150, 300, 400	60, 80, 100, 150, 300, 400	60, 80, 300, 650

Al hacer un análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción con las diferentes enzimas empleadas, la cepa ICA 8001 mostró un 97 % de homología con la cepa *B. elkanii* USDA 76, un 72 % con la cepa *B. japonicum* USDA 110 y sólo un 59 % con las cepas aisladas de *Lupinus*. Estas homologías y diferencias también se manifiestan en cuanto a plantas hospederas. Así, por ejemplo, las cepas 70 y 90 que corresponden a *Bradyrhizobium* sp., no forman nódulos en la soya, mientras que las cepas USDA 110, ICA 8001 y USDA 76 nodulan este cultivo (Young, 1996).

El dendrograma realizado (Figura 4) a partir de los resultados del RFLP mostró la similitud existente entre las cepas USDA 76 (*B. elkanii*) e ICA 8001 agrupadas en un cluster (Grupo II), en otro diferente las dos cepas de *Lupinus* (Grupo III) y otro grupo bien diferenciado de los anteriores, con la cepa USDA 110 (*B. japonicum*) en el Grupo I. De estos resultados se infiere que la cepa ICA 8001 es cercana taxonómicamente a *B. elkanii* USDA 76, con una diferenciación alta de la cepa *B. japonicum* USDA 110, lo cual refuerza lo demostrado anteriormente en los porcentajes de homología.

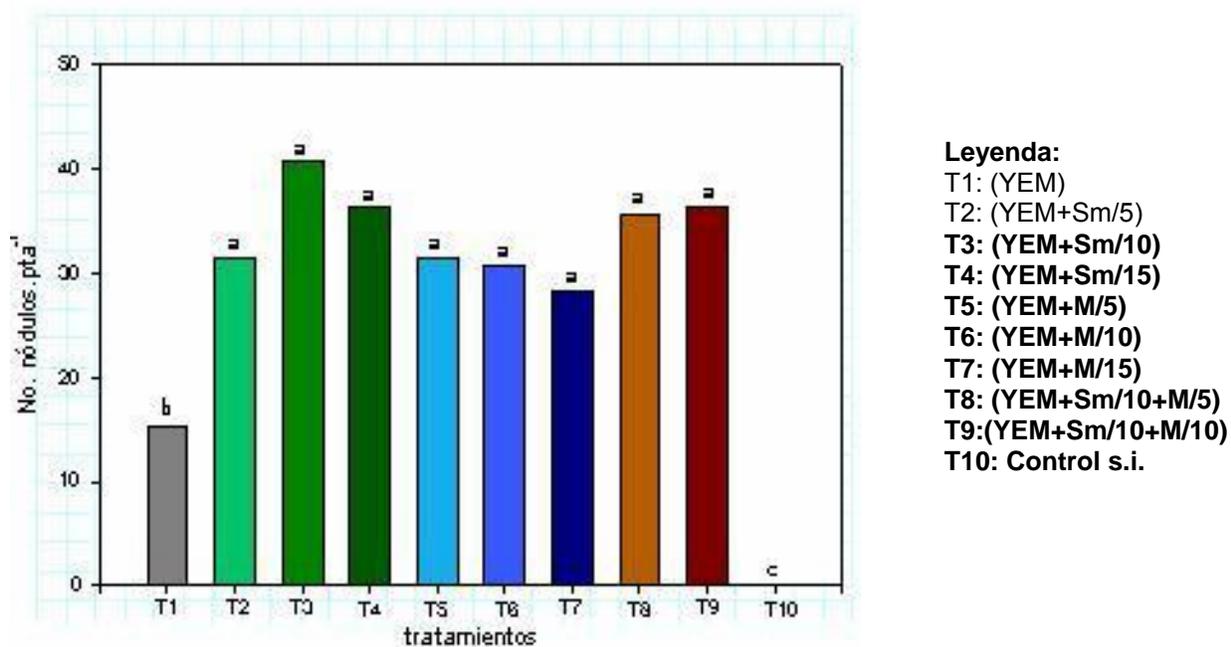


Figura 5. Efecto de la adición al medio YEM de soya y melaza en diferentes concentraciones sobre el número de nódulos de la soya, variedad William´82.

Letras comunes no difieren significativamente (Duncan, $P < 0.05$).

ES*** = 2.4126

n=10

El efecto positivo ejercido por todos los tratamientos con soya y melaza sobre la formación de los nódulos evidenció el poder inductor de estos elementos cuando fueron incorporados, solos ó combinados, al medio de cultivo. Ambos compuestos mostraron una actividad similar de inducción nodular para todas las concentraciones probadas. Al no existir diferencias significativas para las diferentes concentraciones, indica que en ellas se alcanza el máximo poder inductor de estos compuestos. No existen referencias del empleo de la soya y la melaza en función de la inducción de la síntesis de los factores de nodulación.

La figura 6 representa el efecto de los tratamientos sobre la masa fresca nodular. De igual forma que en la variable anterior, el empleo de los diferentes compuestos y sus concentraciones mostraron ser significativamente superiores al medio YEM sólo, sin diferencias significativas entre ellos. Esto sugiere que la presencia de la soya y la melaza en el medio de cultivo le confiere al microorganismo una mayor capacidad para inducir la formación de los nódulos y establecerse dentro de ellos.

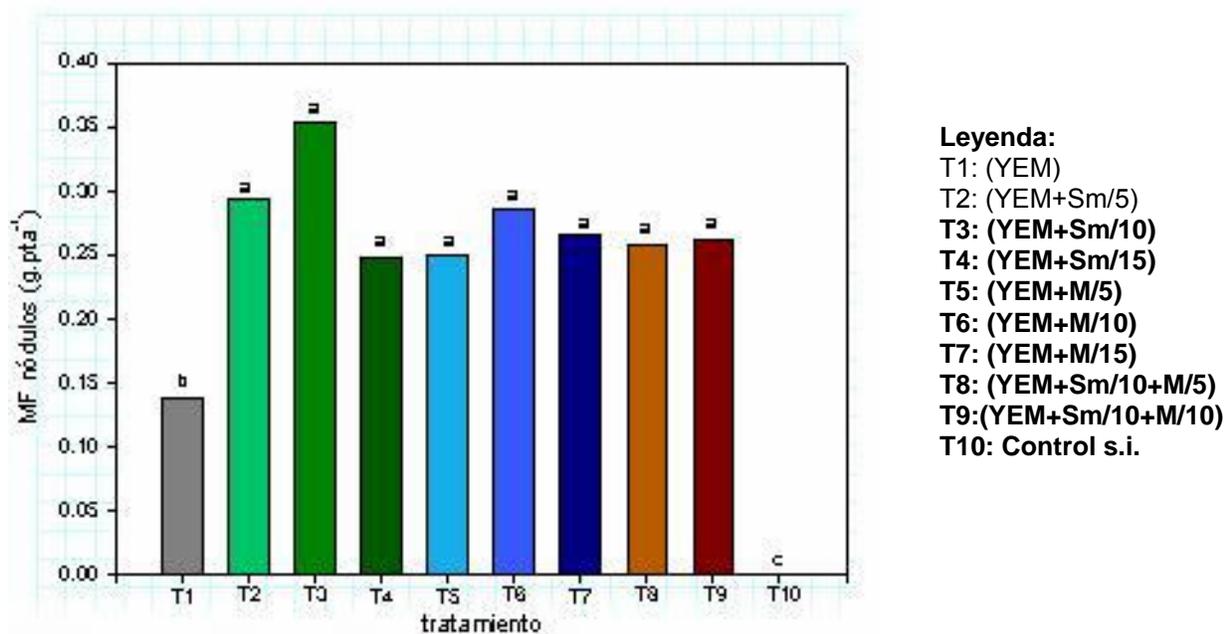


Figura 6. Efecto de la soya y la melaza a diferentes concentraciones en el medio YEM sobre la masa fresca de los nódulos desarrollados en la soya variedad William'82.

Letras comunes no difieren significativamente (Duncan, $P < 0.05$).

ES*** = 0.0177

n=10

El análisis de la masa seca de los nódulos (Figura 7) mostró un comportamiento diferenciado entre los tratamientos. Se destacó en su efecto el tratamiento donde se aplicó la soya a la concentración de 10 g.L^{-1} (T3), significativamente diferente del medio YEM. También resultaron interesantes los tratamientos T8 con soya a 15 g.L^{-1} y la melaza a razón de 10 g.L^{-1} , (T4 y T6, respectivamente), que no se diferenciaron del mejor tratamiento, aunque tampoco lo hicieron del resto, excepto del control absoluto (T10).

La variable masa seca indica esencialmente la proporción de material biológico presente en el nódulo. Por tanto, el hecho de que los tratamientos T2, T5, T7, T8 y T9, que para las variables número de nódulos y masa fresca de los mismos (Figuras 5 y 6), se comportaron superiores al control utilizado (medio YEM), pero que en esta variable no mostraron diferencias significativas con él, sugiere que éstos tratamientos produjeron nódulos más turgentes, con un alto contenido de agua y con menor proporción en biomasa seca.

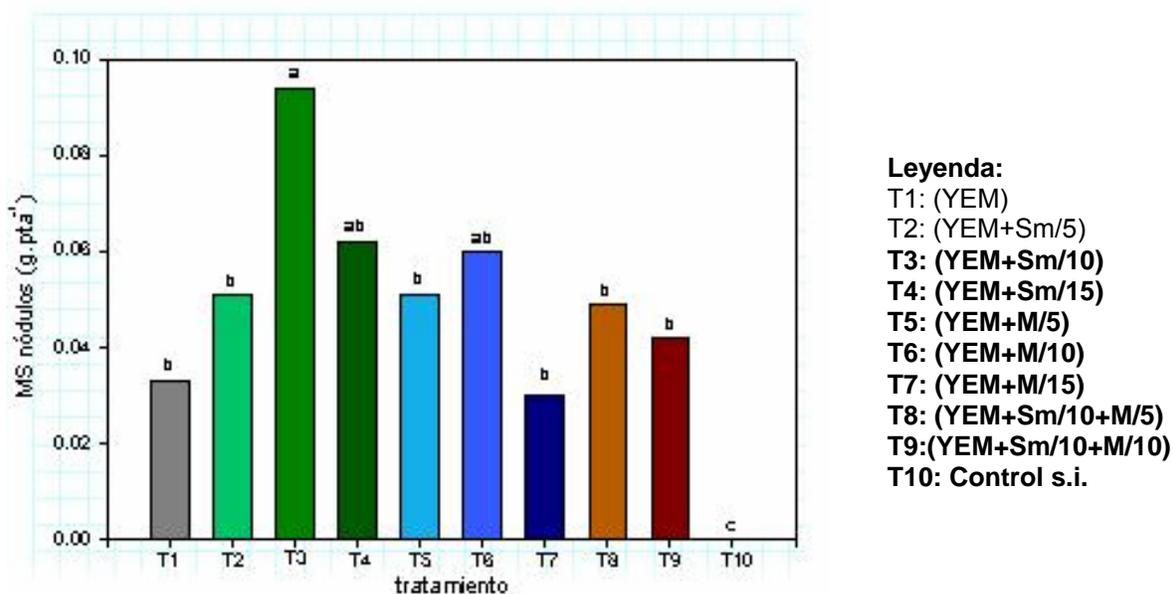


Figura 7. Efecto de la soya y la melaza a diferentes concentraciones en el medio YEM sobre la masa seca de los nódulos desarrollados en la soya variedad William 82.

Letras comunes no difieren significativamente (Duncan, $P < 0.05$).

ES** = 0.0067

n=10

Los resultados correspondientes a la actividad de reducción del acetileno (Figura 8) muestran el efecto destacado del tratamiento donde se aplica la soya a la concentración de 10 g.L⁻¹ (T3), de la melaza a la misma concentración (T6) y de la combinación soya-melaza 10-5 g.L⁻¹ (T8). Estos tratamientos no mostraron diferencias significativas entre sí, pero todos fueron significativamente superiores al resto. Las otras concentraciones y combinaciones no difirieron entre ellos, pero sí con el medio YEM y resultaron en valores de fijación superiores.

Si bien no hubo grandes diferencias en el efecto de la mayor parte de los tratamientos con los compuestos y concentraciones sobre la masa seca de los nódulos desarrollados con respecto al medio YEM solo, su capacidad de fijar nitrógeno sí se vio positivamente aumentada. El efecto de un inductor de los genes de nodulación repercute en la consecuente síntesis de los factores de nodulación y se ha demostrado que estas moléculas influyen positivamente sobre el establecimiento de los bacteroides y la eficiencia en su capacidad de fijación biológica del nitrógeno (Spaink y col. 1995).

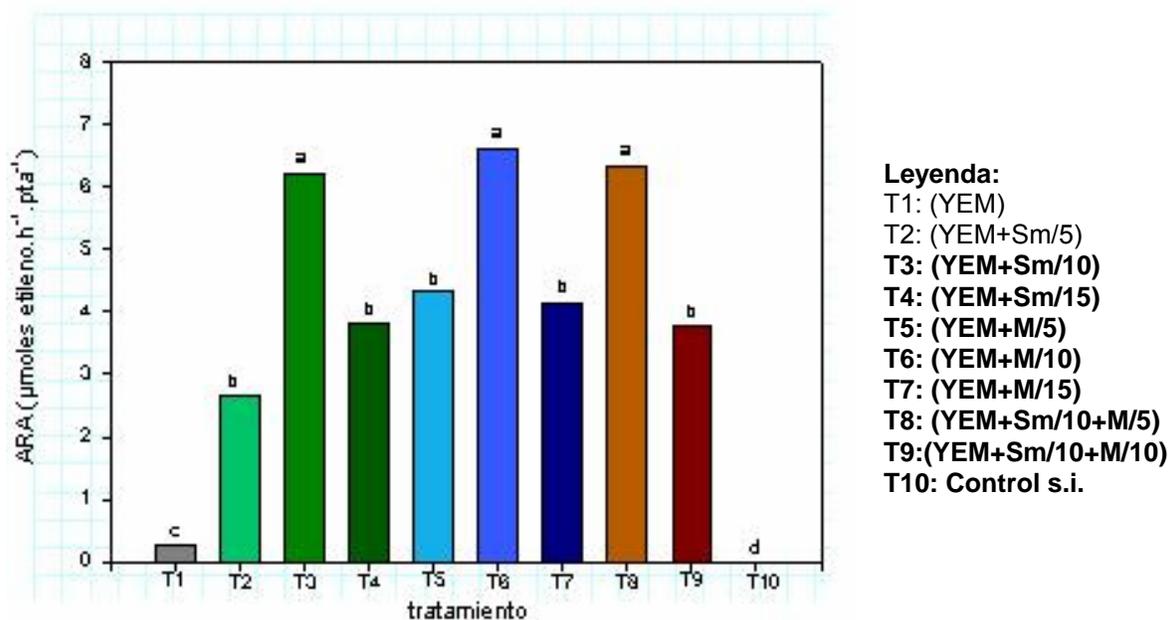


Figura 8. Efecto de las diferentes concentraciones de cada compuesto sobre la actividad de reducción del acetileno.

Letras comunes no difieren significativamente (Duncan, $P < 0.05$).

ES*** = 0.3119

n=10

El tratamiento 4 (YEM + Sm/15), que se destacó por la proporción de material biológico en los nódulos por él desarrollados, evidenció, sin embargo, una menor actividad de fijación de nitrógeno. Mientras que el T8 (YEM + S/10-M/5) tuvo una menor proporción de biomasa, pero con mayor actividad biológica.

A excepción de algunos tratamientos al analizar la masa seca nodular, el resto de las determinaciones demostraron el efecto positivo de la soya y la melaza sobre la inducción nodular y sobre la fijación biológica del nitrógeno, ésta, como variable esencial a tener en cuenta en el éxito de esta interacción.

Se destaca el efecto de la soya y la melaza en el medio de cultivo a la concentración de 10 g.L^{-1} y de la combinación de ambos compuestos a razón de 10 y 5 g.L^{-1} , respectivamente. De manera general en este primer bloque de experimentos se demostró la influencia de la composición del medio de cultivo y el aporte de la soya molinada, la melaza y la combinación

de ambos compuestos sobre la inducción de la nodulación. Los diferentes indicadores muestran que esta influencia es, sobre todo, en el aumento de la capacidad fisiológica del microorganismo para la formación del nódulo y en su actividad de fijación, significativamente diferente de la aportada por el medio YEM solo.

4.2.2 Influencia de diferentes medios de cultivo sobre la nodulación de la soya

La evaluación de la influencia de diferentes medios de cultivo sobre la nodulación de la soya se realizó en un segundo bloque de experimentos (Figuras 9-12) sobre la base de los resultados anteriores. Se diseñó un nuevo medio de cultivo a partir del medio Propagación, en el cual se incluyó la semilla de soya molinada a la concentración de 10 g.L^{-1} , se redujo la melaza a 5 g.L^{-1} y se eliminó el extracto de levadura.

Para el número de nódulos (Figura 9), se encontró, que los tratamientos presentaron diferencias significativas entre sí. Los mejores tratamientos fueron T2 (YEM + genisteína), T3 (YEM + soya molinada) y T4 (YEM + soya tratada enzimáticamente), seguidos por T7 (medio Propagación modificado), que no se diferenció significativamente de T2 y T4. Los tratamientos T5: (YEM+M/10) y T6: (Propagación) fueron inferiores y estadísticamente similares al T1 (medio YEM), quienes sólo superaron al control sin inóculo. El menor número de nódulos en los tratamientos T1 y T6 pudiera estar asociado a la ausencia en ellos de los inductores portados por la soya.

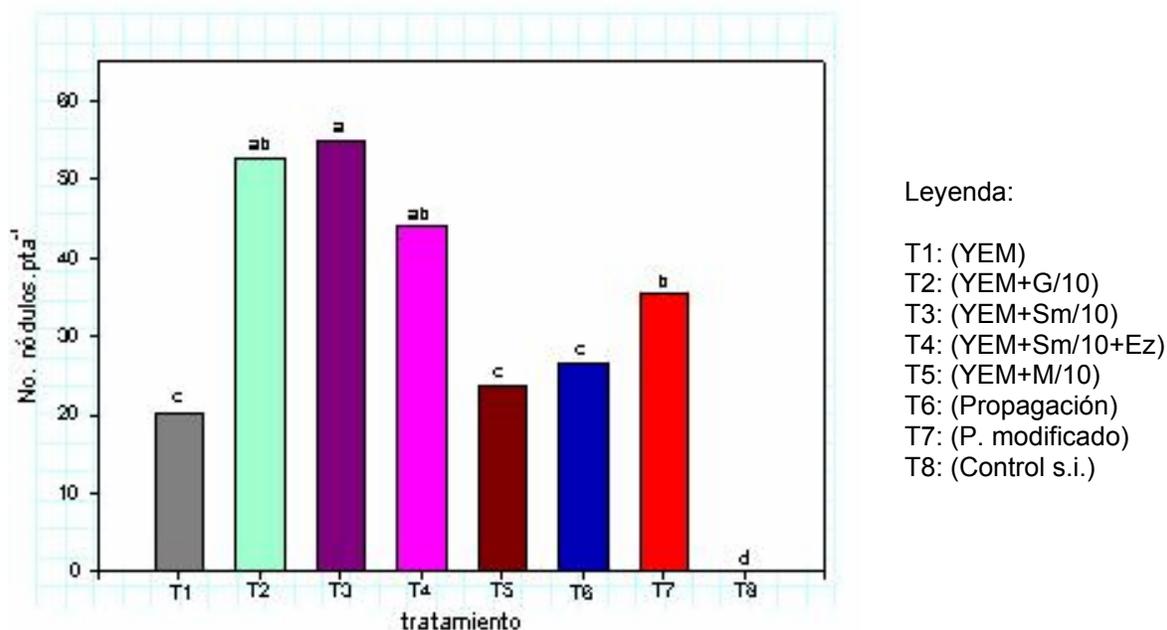


Figura 9. Efecto de diferentes medios de cultivo sobre la nodulación de la soja variedad William 82. Letras comunes no difieren significativamente (Duncan, $P < 0.05$). $ES^{*} = 2.1870$ $n=10$**

Es de destacar que la adición de soja molinada se manifiesta de manera similar a la adición de genisteína al medio de cultivo, alcanzando valores de nodulación similares aunque no diferentes estadísticamente.

La Figura 10 muestra la influencia de los tratamientos sobre la masa fresca nodular. Los mejores resultados se alcanzaron en los tratamientos con genisteína, soja molinada sin tratar enzimáticamente y el medio Propagación modificado, que no difirieron significativamente entre sí. El tratamiento enzimático de la soja disminuyó su efecto sobre esta variable.

A excepción de la soja molinada sin tratar enzimáticamente (T3), los otros tratamientos tampoco se diferenciaron de los T4 (YEM + soja molinada tratada enzimáticamente) y T5 (YEM + melaza 10). Éstos últimos fueron estadísticamente similares, además, a los medios YEM y Propagación quienes sólo superaron al control absoluto.

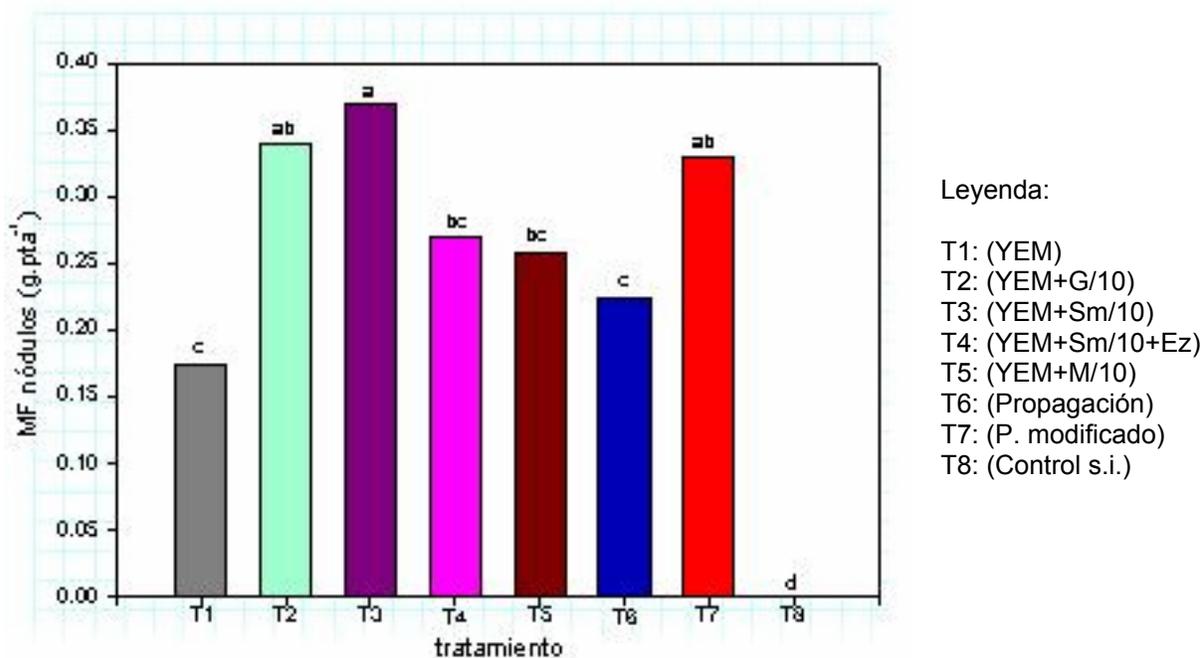


Figura 10. Efecto de diferentes medios de cultivo sobre la masa fresca de los nódulos desarrollados sobre la soja variedad William'82.

Letras comunes no difieren significativamente (Duncan, $P < 0.05$).

ES*** = 0.0172

n=10

Los nódulos desarrollados por el inóculo en el medio Propagación modificado, si bien fueron inferiores en número a los producidos por el tratamiento con soja molinada (Figura 8), mostraron un tamaño mayor, lo que los hace estadísticamente similares al analizar la variable masa fresca nodular (Figura 10).

Cuando se analizó la variable masa seca de los nódulos (Figura 11), resaltaron como superiores los efectos de la adición de genisteína, de la soja sin tratamiento enzimático, de la melaza y del medio Propagación modificado. Los tratamientos T4 (soja tratada enzimáticamente) y T6 (medio Propagación) no difirieron del control YEM (T1) y sólo superaron al control sin inoculación.

El tratamiento enzimático en la soja afectó negativamente su influencia sobre la masa seca nodular.

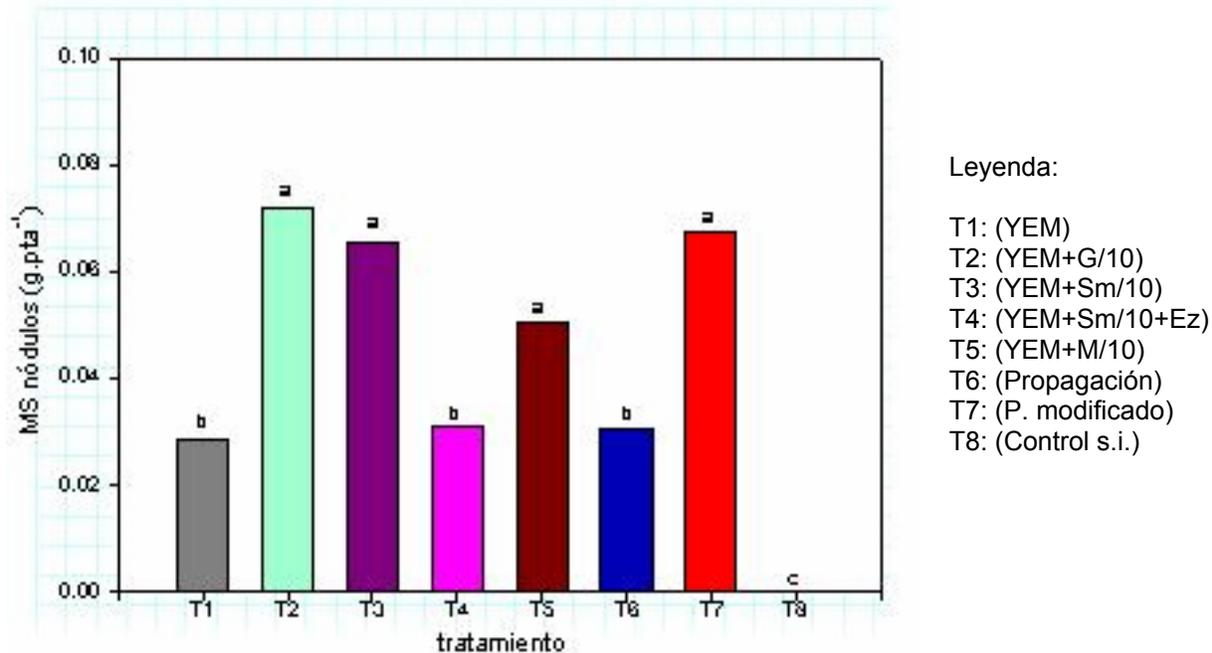


Figura 11. Efecto de diferentes medios de cultivo sobre la masa seca de los nódulos desarrollados sobre la soja variedad William 82.

Letras comunes no difieren significativamente (Duncan, $P < 0.05$).

ES*** = 0.0054

n=10

En cuanto a la actividad de reducción del acetileno (Figura 12), los inductores genisteína, soja sin tratar, melaza y el medio Propagación modificado, mostraron resultados superiores y estadísticamente diferentes al resto de los tratamientos. Una vez más se destaca el efecto de la adición de soja y/o melaza en el medio de cultivo, comparable a la acción de la genisteína, sobre la modificación de la capacidad de la bacteria de fijar nitrógeno, con respecto a otros medios de cultivo.

La digestión enzimática de la soja antes de añadirla al medio de cultivo influyó negativamente sobre la capacidad de fijación biológica, haciéndola significativamente diferente al efecto de la soja sin digerir y similar al de los medios YEM y Propagación.

Al relacionar los resultados con la digestión enzimática de la soja se constató que la misma no afectó el número de nódulos mientras que disminuyó significativamente la masa nodular y su eficiencia. Estos resultados pudieran deberse a que la hidrólisis fue sobre aquellos

inductores o precursores sensibles a este tipo de enzimas, al ser degradado alguno o algunos de los componentes de la semilla de soya que participan en el establecimiento de los bacteroides, mientras que otros componentes de la semilla (Hasler, 1998), que no fueron degradados, pueden también influir en la colonización y efectividad de la cepa bacteriana (Kape, Parniske y Werner, 1991).

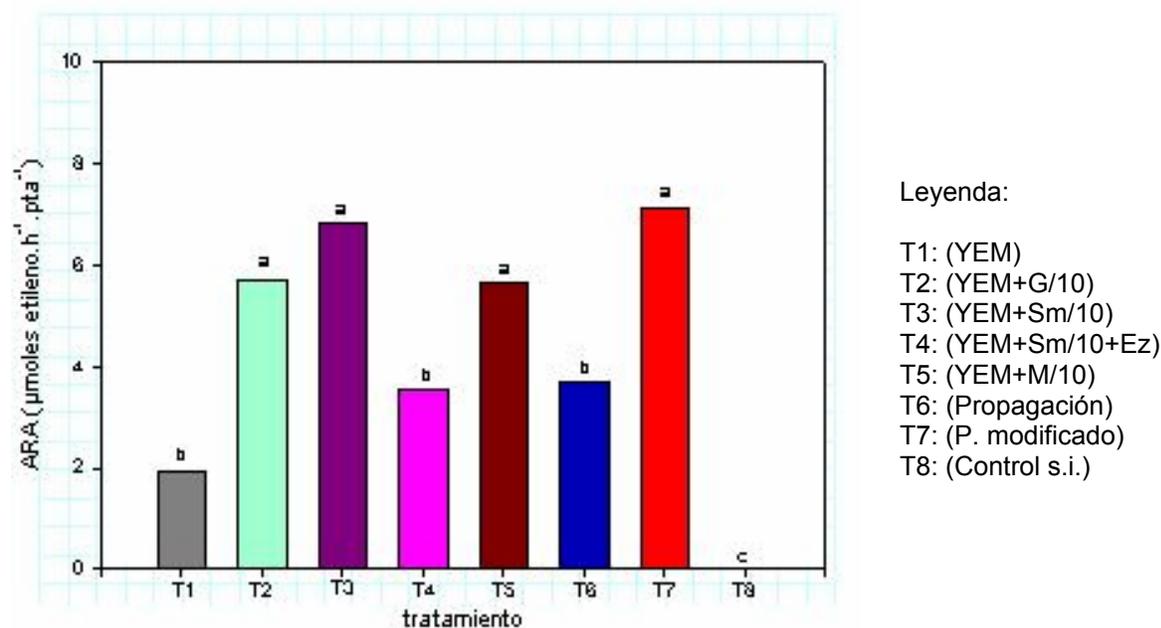


Figura 12. Influencia de diferentes medios de cultivo sobre la fijación nitrogenada en los nódulos desarrollados sobre la soya variedad William 82.

Letras comunes no difieren significativamente (Duncan, $P < 0.05$).

ES*** = 0.3464

n=10

Al comparar la influencia de los tratamientos T5 (YEM con melaza) y T6 (medio Propagación, que contiene melaza en igual proporción) se apreció que sobre el número y masa nodular el comportamiento fue muy similar, pero sobre la fijación del nitrógeno (ARA), el medio YEM con melaza superó al Propagación. Esto indica que no sólo la melaza manifiesta influencia, también hay que tener en cuenta el papel de los otros componentes del medio de cultivo y el posible efecto sinérgico o antagónico que puedan ejercer. Las levaduras, por ejemplo, poseen en su pared polímeros de N acetilglucosamina (Lipke y Ovalle, 1998; Kapteyn, 1999), los que durante el proceso de hidrólisis para la obtención del extracto, pueden ser

liberados como oligómeros y al estar contenidos de esta forma en el medio de cultivo pudieran actuar como precursores de la síntesis de los factores de nodulación por *Bradyrhizobium* (Carlson, Price y Stacey, 1994). De esta forma, incrementos en la producción de determinadas estructuras de estas biomoléculas conducirían a una mayor eficiencia nodular. En el medio Propagación estos compuestos se encuentran en concentración cinco veces más alta que en el medio YEM, lo cual pudiera producir inhibición por exceso de este compuesto.

Es de resaltar la influencia de la melaza en la actividad de reducción del acetileno, similar a lo acontecido en el experimento anterior, donde no ejerció una función destacada en cuanto al número ni masa fresca de los nódulos, pero sí en la masa seca de los mismos y en su actividad de fijación. Esto sugiere que este compuesto influye menos en la inducción de la formación de los nódulos, pero se destaca en el establecimiento de los bacteroides y en su función dentro del nódulo.

En resumen, los resultados sugieren que la integración de la semilla de soya molinada y la melaza en la composición del medio de cultivo Propagación modificado, condujo a la bacteria a un estado fisiológico que se tradujo en resultados significativamente superiores de su actividad biológica sobre la planta de soya, en comparación con los medios tradicionales.

4.2.3 Efecto inductor de las células bacterianas o de sus productos metabólicos en la nodulación de la soya

Al evaluar el efecto de los medios de cultivo con o sin células bacterianas, se apreció que no hubo diferencias significativas para la interacción entre los factores medio de cultivo-presencia o ausencia de células. Se observó un efecto muy significativo del factor medio de cultivo sobre el número de nódulos. Sin embargo, la presencia o no de las células en el momento de la inoculación no diferenció estadísticamente la respuesta de la nodulación.

Estos resultados indican que determinados productos solubles de la fermentación son los responsables de inducir la formación de los nódulos, lo que coincide con lo planteado por algunos autores que adjudican esta función directamente a los lipoquitinolisacáridos o

factores de nodulación producidos por *Rhizobium* (Relic y col. 1994; Bassier, 1999; Day y col. 2000; Loh y col. 2001).

Se conoce además que la quimiotaxis es otro fenómeno que ocurre en la rizosfera y que constituye el eslabón inicial en la asociación planta – rizobacteria promotora del crecimiento de las plantas (PGPR) (Gao y col. 2001). Sobre este fenómeno, Adler, en 1969, demostró que el mecanismo de quimiosensibilidad era explicado a través de quimiorreceptores. En la simbiosis, como expresión más elevada de la asociación planta–PGPR, las señales son emitidas por ambos simbioses con diferente finalidad: los exudados por la planta son para garantizar la especificidad y los producidos por el microsimbionte son para la formación del nicho ecológico de intercambio (nódulo) en el cual él se instalará.

De esta forma, lo más importante para la inducción de la formación de los nódulos en esta interacción es la señal constituida por el factor de nodulación y no necesariamente la presencia celular, que lógicamente desempeñará su papel posteriormente en la infectividad de los nódulos y el proceso de fijación biológica del nitrógeno.

Se corrobora el efecto diferenciado del medio de cultivo sobre la nodulación (Tabla 7) y la producción de los factores Nod, con ventajas para el medio Propagación modificado.

Tabla 7: Efecto de los medios de cultivo sobre la nodulación de la soya.

Medio de cultivo	No. nódulos.pta ⁻¹
Propagación	10.1
Propagación modificado	18.8
Esx	1.09**

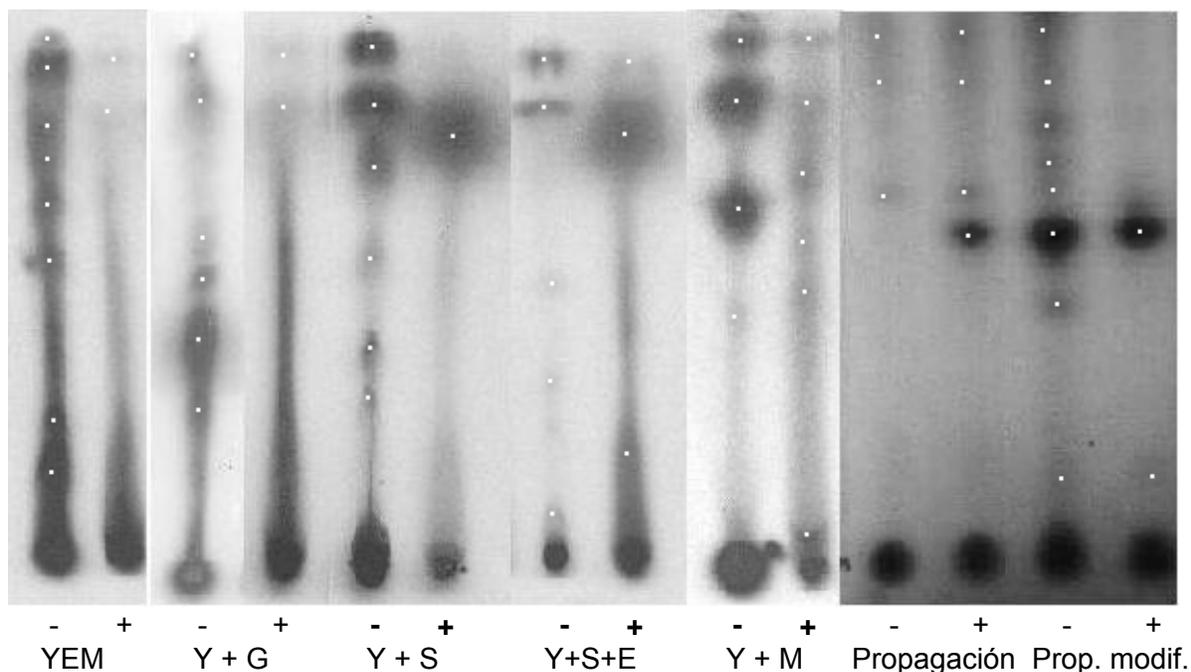
**P<0.01

Los resultados demuestran que una misma cepa, en función del medio de cultivo donde se propague, estará en mejores condiciones para inducir la nodulación y su efectividad; probablemente debido a la producción de diferentes factores de nodulación.

4.3 Producción de factores de nodulación por *Bradyrhizobium* en presencia de diferentes sustratos y medios de cultivo

4.3.1 Detección de la producción de factores de nodulación en la cepa *B. japonicum* ICA 8001 mediante cromatografía de capa delgada (TLC)

Los perfiles de los factores de nodulación producidos por esta cepa ante los diferentes compuestos y medios de cultivos evaluados en el ensayo de nodulación se muestran en la Figura 13. La cepa exhibió una variedad de perfiles según el inductor empleado para la activación de sus genes *nod*.



Leyenda:

-: Extractos sin inducir

+: Extractos inducidos con genisteína 10 μM

YEM: medio Manitol-extracto de levadura

Y+G: medio YEM con genisteína 10 μM

Y+S: medio YEM con frijol de soja molinado a la concentración de 10 g.L^{-1}

Y+S+E: medio YEM con frijol de soja molinado a la concentración de 10 g.L^{-1} y tratado enzimáticamente

Y+M: medio YEM con melaza a la concentración de 10 g.L^{-1}

Propagación: medio Propagación

Prop. modif.: medio Propagación modificado

Figura 13. Perfil de factores Nod producidos por *B. elkanii* ICA 8001 ante diferentes inductores.

El medio YEM solo, indujo la producción de 8 manchas cromatográficas, cuando la genisteína fue utilizada como inductor mostró 6 manchas y se destacaron por su intensidad aquellas con menor movilidad según TLC.

La muestra de soya sin tratar enzimáticamente superó en número e intensidad las manchas cromatográficas de la soya tratada enzimáticamente, lo mismo que sobre algunos caracteres de la nodulación (Figuras 10, 11 y 12). Se presentaron 6 manchas en la soya cruda, todas en igual posición que las que aparecen con la genisteína pero esta vez las de mayor intensidad fueron las de mayor movilidad.

La melaza, por su parte, mostró cuatro compuestos o grupos de compuestos, la mayor parte de ellos en gran concentración y aunque sólo dos en posición similar a los de la soya, coincidentemente los de mayor intensidad correspondieron a los de mayor movilidad.

De igual forma a lo obtenido en los ensayos de nodulación, la soya y la melaza constituyeron compuestos que se destacaron en la producción de metabolitos Nod con la síntesis de un gran número de compuestos con la mayor intensidad.

El medio de Propagación modificado superó marcadamente al medio de Propagación con la producción de 8 entes cromatográficos, algunos de ellos en elevada concentración. Este medio provoca la producción de la mayor parte de los factores Nod mostrados por los restantes inductores por separado, lo que resulta lógico dada su composición química, en la que están incluidos todos ellos.

Al analizar el medio YEM y el medio Propagación se observó que el primero superó al último en cuanto a la producción de estos compuestos, sin embargo, no mostraron diferencias significativas en los resultados de la nodulación.

La mayor producción de factores Nod (evidenciados en el TLC) en el medio YEM no se tradujo en una mayor eficiencia de la nodulación, cuando se compararon estos resultados con los ensayos de nodulación *in vitro*, lo que sugiere que no todas las moléculas representadas

tuvieron idéntica actividad biológica. Se conoce que no todos los factores Nod producidos y excretados poseen una actividad biológica significativa (Spaink y col. 1995), resultado de diferentes modificaciones a una molécula basal o factor Nod común (Carlson, Price y Stacey, 1994). Pero además, pudieran influir otros factores, como la producción de sustancias promotoras del crecimiento vegetal, exopolisacáridos, entre otros, en dependencia del estado fisiológico de la bacteria conferido por el medio de cultivo.

La literatura indica el empleo de la genisteína como amplificador de la inducción para *Bradyrhizobium*, al constituir el mejor inductor informado para esta especie. Sin embargo, los resultados de este trabajo demostraron que su aplicación a una concentración de 10 μM como amplificador de la síntesis de estas biomoléculas tuvo un efecto negativo sobre el 70 % de las muestras ensayadas, lo que es resultado de una inhibición de la producción de estos compuestos. Sólo en aquellos casos que no manifestaron una producción apreciable de factores Nod (soya digerida enzimáticamente y medio Propagación) se presentó el efecto amplificador de la genisteína.

El resto de las muestras que revelaron una clara síntesis de éstas biomoléculas sin la ayuda de la genisteína, exhibieron una represión en su producción cuando este isoflavonoide estuvo presente. Esto se debe, al parecer, a un fenómeno de inhibición por exceso de inductor (similar a lo que ocurre en la inhibición por exceso de sustrato) ejercido por la suma de los inductores contenidos en el medio de cultivo más la genisteína aplicada. No se han encontrado referencias de este fenómeno en la literatura consultada, en la cual siempre estos inductores se utilizan en medios basales, libres de cualquier otra inducción.

De manera general, los resultados de la producción de factores Nod por esta cepa tuvieron relación directa con los ensayos de nodulación.

4.3.2 Detección de la producción de factores de nodulación en la cepa *B. japonicum* ICA 8001 mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase normal

El análisis de los perfiles obtenidos mediante cromatografía líquida reveló marcadas diferencias entre el número de picos cromatográficos y su intensidad relativa para los diferentes medios de cultivo (Figura 14).

En todos los perfiles se presentaron picos menos resueltos en los menores tiempos de retención (t_r), los que corresponden a moléculas más hidrofóbicas.

El menor número de picos se encontró en el medio Propagación (Figura 14 B), seguido por el medio YEM (Figura 14 A). Entre estos medios existe una pequeña diferencia en cuanto a la distribución de picos y al área bajo la curva, con cuatro picos en el medio Propagación y seis en el YEM, de los cuales tres coinciden entre sí.

La mayor cantidad de picos y con mayor área bajo la curva se apreció en el medio Propagación modificado (Figura 14 C). En cada uno de los tres picos mayoritarios el área es mucho mayor que el área total de todos los picos presentes en cada una de las restantes muestras. Esto indica una mayor producción de factores Nod en este medio.

Cuando se añadió genisteína a esta composición de medio de cultivo se observó la depresión de las áreas cromatográficas, o sea que se reprimió la producción de estos factores Nod, además de que se produjo un cambio en la distribución de los picos (Figura 14 D). Bajo estas condiciones desaparecieron algunos picos de los mayoritarios y uno de ellos (el de $t_r = 27, 63$ min) disminuyó a un tercio, mientras que otro (el de $28,8$ min), aumentó diez veces. Dada la similitud en el tiempo de retención para ambas muestras, deben corresponder a similares estructuras de factores Nod presentes en ellas, aunque frente a la genisteína se presentaron en menor concentración.

Resultados diferentes fueron encontrados por Carlson y col. (1993); López-Lara y col. (1995) y Cárdenas y col. (1995), donde perfiles de estas moléculas con mayor número e intensidad de picos caracterizaron las muestras inducidas con genisteína y naringenina,

respectivamente. Las muestras cromatografiadas por ellos, sin embargo, procedían de un medio basal que no contenía inductores, por tanto no se produjo el efecto de represión.

Si bien no es posible establecer una relación exacta entre el número de manchas obtenidas por el TLC y el número de picos hallados mediante HPLC, debido a que el primer método es mucho más específico, pues marca radioactiva y selectivamente los factores Nod, mientras que el HPLC resulta más potente en cuanto a la separación de los productos, los resultados obtenidos por ésta última, confirmaron en general, los encontrados con la cromatografía de capa delgada.

Mediante ambas técnicas se pudo constatar la influencia del medio de cultivo sobre los perfiles de factores de nodulación. También se observó la tendencia a la inhibición o represión de su síntesis en presencia de un exceso de inductor en el medio de cultivo.

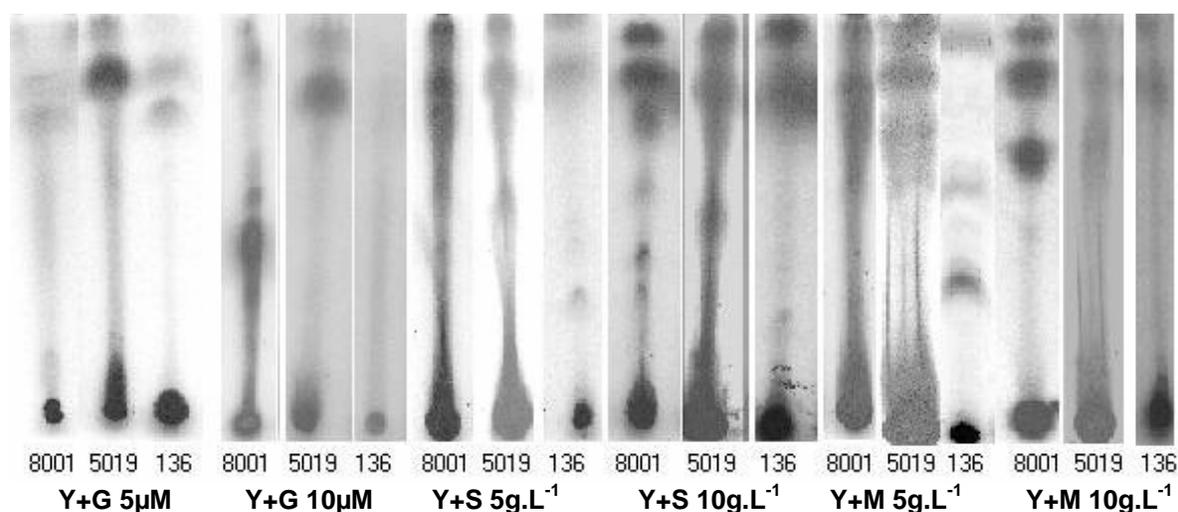
Como la adición de genisteína en el medio de cultivo resulta en una inhibición de la síntesis de los factores Nod, en lo adelante, solo se utilizaron extractos sin amplificador.

4.3.3 Efecto de diferentes inductores y sus concentraciones sobre la producción de los factores de nodulación para cepas de *Bradyrhizobium* de diferentes orígenes

Identificadas la soya y la melaza como elementos inductores en *B. elkanii* ICA 8001, resultó interesante esclarecer su papel inductor sobre otras cepas aisladas de diferentes condiciones edafoclimáticas. Se presenta el efecto de estos compuestos en dos concentraciones (5 y 10 g.L⁻¹) comparados con la genisteína (5 y 10 µM) sobre las cepas de *B. elkanii* ICA 8001, SEMIA 5019, y sobre *B. japonicum* USDA 136 (Figura 15). Se encontró que las diferentes cepas respondieron de manera diferenciada ante los inductores y concentraciones ensayados.

La cepa *B. elkanii* ICA 8001 produjo tres manchas tenues cuando se utilizó la genisteína a la concentración de 5 µM, mientras que se mostraron seis estructuras a la mayor concentración empleada.

El comportamiento para el medio con soya fue similar en ambas concentraciones, con la síntesis de entre cinco y seis estructuras, pero todas las manchas presentes en la concentración de 5 g.L^{-1} del compuesto, aparecieron con mayor intensidad cuando se utilizaron 10 g.L^{-1} . Algo similar se presentó cuando la cepa fue cultivada en ambas concentraciones de melaza. La síntesis de cuatro manchas se mantuvo pero favorecida por la mayor concentración.



Leyenda:

Y+G: medio YEM con genisteína
 Y+S: medio YEM con frijol de soya molido
 Y+M: medio YEM con melaza

Figura 15. Efecto de dos concentraciones de cada inductor sobre la síntesis de factores Nod en tres cepas de *Bradyrhizobium*.

La cepa SEMIA 5019 mostró un comportamiento similar frente a las dos concentraciones de genisteína ensayadas, con la producción de dos manchas en similar intensidad. A su vez produjo 4 manchas frente a las concentraciones de soya y ante la melaza sintetizó al menos 3 productos de movilidad diferente.

En el caso de la USDA 136, cuando se utilizó el inductor genisteína a razón de $5 \mu\text{M}$ mostró una producción de 2 manchas, pero no se encontró inducción frente a la concentración de $10 \mu\text{M}$. Quizás para esta cepa $10 \mu\text{M}$ constituye una concentración elevada e inhibitoria, por lo que resulta necesario evaluar el efecto de menores concentraciones. Zhang y Smith en 1998

encontraron que la adición de 5 μM de este isoflavonoide fue suficiente para incrementar la cantidad de nódulos y la fijación del nitrógeno en *B. japonicum* USDA 110. El comportamiento de esta cepa fue similar ante ambas concentraciones de soya, con la síntesis clara de 4 manchas, aunque fueron menos intensas cuando se empleó la menor concentración de este inductor.

Cuando la cepa USDA 136 se cultivó ante las diferentes concentraciones de melaza mostró una respuesta muy diferente. Se revelaron 6 factores Nod a la menor concentración empleada, mientras que solamente dos manchas se presentaron a la concentración de 10 g.L^{-1} y con movibilidades diferentes a las encontradas anteriormente.

Este estudio muestra que el número de manchas correspondientes a moléculas o grupos de moléculas conocidas como factores Nod, su concentración, masa molecular, polaridad y por consiguiente actividad biológica, dependen del tipo de inductor empleado, de su concentración y de la cepa en cuestión.

La capacidad de inducción de la melaza y la soya es marcada para todas las cepas estudiadas, por lo que constituyen inductores de la producción de factores de nodulación en el género *Bradyrhizobium*, además de la genisteína, que ya se ha informado como uno de los más potentes inductores para este género. Quizás este resultado constituya el punto de partida en el hallazgo de nuevos inductores para estas bacterias.

Sobresale la cepa *B. elkanii* ICA 8001 en su capacidad de síntesis de factores de nodulación, lo que pudiera ser un elemento a su favor en la competitividad por el hospedador y a tener en cuenta en la producción de inoculantes. La gran variedad de factores Nod producidos por esta cepa pudiera ayudar a explicar su capacidad de nodular numerosas variedades de soya (Pijeira y col. 1996).

Aunque los resultados de los experimentos de nodulación no mostraron diferencias significativas entre la combinación de soya-melaza y sus componentes separados (Figuras 5-8), el análisis de la figura 14 demostró una diversificación cualitativa de los factores Nod. Así,

el hecho de que el empleo de la soya en el medio de cultivo induzca diferentes compuestos respecto a la melaza, ofrece la posibilidad de ampliar el rango de hospedador para disímiles cepas cuando estos inductores se emplean combinados en el medio de cultivo. Esto garantizaría una mayor utilización de este biopreparado en diferentes combinaciones cepa - variedades de soya. Además, se demuestra que su uso combinado no produce inhibición de la producción de factores Nod.

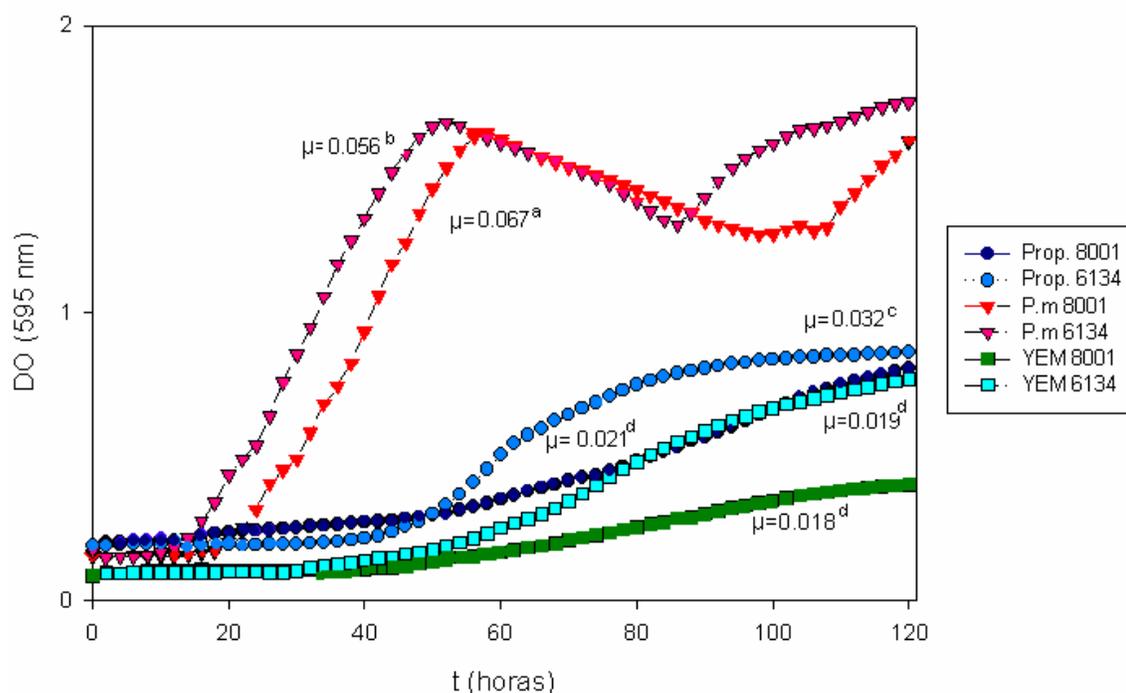
4.4 Efecto de diferentes medios de cultivo en la multiplicación celular de *Bradyrhizobium elkanii*

Al evaluar la dinámica de crecimiento de las cepas *B. elkanii* ICA 8001 y *B. elkanii* LMG 6134 frente a los medios YEM, Propagación y Propagación modificado, se encontró interacción entre los factores medio de cultivo - cepa de *Bradyrhizobium*, con diferencias altamente significativas para el factor medio de cultivo y no significativas para el factor cepa.

El medio nuevo "Propagación modificado" mostró una clara superioridad en su capacidad de permitir una multiplicación celular mayor, con respecto a los medios tradicionales para las dos cepas estudiadas (Figura 16).

Si se comparan los medios tradicionales, para la cepa LMG 6134 el medio Propagación superó en velocidad específica de crecimiento al medio YEM, sin embargo, para la cepa ICA 8001 el comportamiento en estos medios fue similar.

La dinámica de la cepa ICA 8001 en el medio Propagación modificado mostró la fase de latencia entre las 0 y las 8 horas, la exponencial entre las 8 y las 55 horas y la estacionaria a partir de este momento y hasta las 72 horas, tiempo en el cual comienza la fase de declinación o muerte (según otros ensayos realizados no mostrados en este documento). El máximo de población se obtuvo alrededor de las 55 horas de cultivo, con un valor de densidad óptica de 1.60 en longitud de onda 595 nm y la velocidad máxima de crecimiento se observó aproximadamente a las 31 horas.



Leyenda:

Prop: medio Propagación **P.m:** medio Propagación modificado **YEM:** medio YEM

ES*** = 0.0027

P < 0.001

n=5

Figura 16. Dinámica de crecimiento de las cepas ICA 8001 y LMG 6134 en diferentes medios de cultivo.

La velocidad específica del crecimiento para esta cepa en este medio fue de 0.067 h^{-1} , mientras que en los medios tradicionales YEM y Propagación fue de 0.018 h^{-1} y 0.020 h^{-1} , respectivamente.

Se evidenció un comportamiento similar de la cepa 6134 al presentado por la cepa ICA 8001 en cuanto a las diferentes fases del crecimiento frente a todos los medios de cultivo. En el medio Propagación modificado esta cepa alcanzó el máximo de la fase exponencial del crecimiento a las 50 horas del cultivo, con una velocidad específica de 0.0563 h^{-1} .

Al comparar la dinámica de ambas cepas en el medio Propagación modificado se apreció, que si bien la cepa ICA 8001 tuvo una fase de adaptación mayor, fisiológicamente sus enzimas respondieron mejor con un mayor aprovechamiento del sustrato, lo que se expresó en una

velocidad específica del crecimiento superior, resultado que se ratificó para la segunda fase de crecimiento. Se debe tener en cuenta que la velocidad específica de crecimiento es función de la concentración de sustrato dentro de un rango y de las propiedades de cada cepa en cuanto a la utilización del mismo (Monod, 1949), razones que diferencian ambas cepas aunque son de la misma especie.

Para las dos cepas en el medio Propagación modificado se apreció una curva bifásica de multiplicación celular a partir de las 85 horas de cultivo para LMG 6134 y a partir de las 108 horas para ICA 8001. Este perfil bifásico recuerda una curva diáuxica, que pudiera justificarse si se tiene en cuenta que el sustrato soya molinada presenta compuestos complejos que pueden ser utilizados por las células como fuentes de carbono y energía al agotarse las fuentes más asequibles (Madigan, Martinko y Parker, 2003). También este comportamiento pudiera estar relacionado con la formación de mucílago a partir de la fuente carbonada (Jain, Prévost y Bordeleau, 1990) o con la acumulación de poli- β -hidroxibutirato como cuerpos de inclusión (Holt y col. 1994), lo que cambiaría las propiedades ópticas del cultivo, dando lugar a una aparente curva bifásica de multiplicación.

El desplazamiento en tiempo de la aparición de la curva bifásica entre las dos cepas estudiadas puede deberse a la diferencia en la dinámica de multiplicación de las mismas, donde la cepa *B. elkanii* LMG 6134 arriba a los diferentes estadios con antelación, señal, como ya se refirió, de un aprovechamiento diferenciado de los sustratos entre las cepas.

Tampoco se conoce si esta bifase pudo estar relacionada con la respuesta a una expresión genética del microorganismo que se manifestó frente a determinado componente presente en el medio de cultivo Propagación modificado (se supone que la soya molinada sea el efector) y no está presente en los medios YEM y Propagación. La falta de aparición de esta bifásica en estos medios de cultivo pudo deberse a que en ellos la multiplicación celular es más lenta y no llegó a registrarse este momento en los tiempos evaluados, pero no es posible predecir si pudo aparecer más tarde.

Entre los tres medios de cultivo se apreciaron diferencias entre las velocidades específicas de crecimiento, las cuales se considera que se deben a las diferencias en la composición de los mismos. El medio YEM (Vincent, 1970), por ejemplo, contiene la fuente carbonada por excelencia del género *Rhizobium*: el manitol (Frioni, 1990), además de hidrolizado de levadura como componente que brinda nucleótidos, vitaminas y otros probióticos no definidos (Atlas, 1993), los que le permiten crecer y producir factores de nodulación satisfactoriamente.

La menor velocidad de crecimiento y rendimiento en biomasa de este medio con respecto al medio Propagación modificado, puede radicar en la menor eficiencia del manitol frente a la melaza, ya que existen referencias de que aquel, aunque ampliamente utilizado para rizobiáceas, no siempre es quien produce las más altas velocidades de crecimiento o de rendimientos en biomasa (Careaga, 1999, Lasala, 2000).

En el medio Propagación (López, 1990), por su parte, se incrementa la concentración del hidrolizado de levadura y se introducen, con la melaza, muchos azúcares que pueden ser utilizados, como la sacarosa, rafinosa, fructosa y la glucosa, además de aminoácidos, ácidos carboxílicos, vitaminas y proteínas (Biar, Serrano y Conde, 1982), que sin dudas contribuyen al incremento en la velocidad de crecimiento con respecto al medio YEM. Este medio ha sido utilizado tradicionalmente para la producción masiva de inoculantes para soya (López, 1996; López y Pijeira, 1996). En la Figura 17 se muestra por primera vez la producción de factores de nodulación en este medio de producción.

Las diferencias del medio Propagación con respecto al medio Propagación modificado, pueden ser también imputables a la fuente de carbono, pues en el primero se hallan a concentraciones elevadas. Aquí se pudiera explicar mediante el fenómeno de la inhibición por exceso de sustrato (Aiba, Humphrey y Millis, 1973; Colectivo de autores, 1990), dado por los diferentes azúcares que componen las melazas. Por otra parte, en las melazas existen además compuestos como los fenólicos, que presentan actividad inhibitoria sobre el crecimiento de

muchos microorganismos (Herald y Davidson, 1983; Bornemann, 1986), los cuales a tan elevada concentración pudieran también estar influyendo en estos resultados de menor multiplicación.

El medio Propagación modificado, por su parte, contiene extracto de soya en sustitución de la levadura, el cual es rico en lípidos, aminoácidos, proteínas y vitaminas (Smith, 2001) que favorecen la multiplicación celular acortando la fase de adaptación y permitiendo un crecimiento acelerado de los cultivos.

La disminución de la concentración de azúcares en este medio, resultó en valores superiores de multiplicación celular, lo que pudiera deberse a que se eliminó con ello la inhibición por exceso de sustrato y se diluyó el efecto de los inhibidores presentes. Además de que este medio le brinda al microorganismo la posibilidad de aprovechar los otros nutrientes presentes en la soya. Lee en 1996, observó que el suplemento de medios semidefinidos o complejos con compuestos como la triptona, el extracto de levadura, peptona, casaminoácidos, hidrolizado de semillas de algodón, extracto de carne, hidrolizado de caseína, hidrolizado de colágeno o licor de remojo de maíz, aumentan el crecimiento celular de *Escherichia coli*, debido a que dichos sustratos aportan directamente los aminoácidos necesarios para el desarrollo celular y ello supone un ahorro energético para la bacteria.

El medio nuevo propuesto evidenció su superioridad sobre el resto de los medios en permitir una mayor velocidad específica de crecimiento y mayor biomasa, no sólo para la cepa ICA 8001, sino también para la cepa LMG 6134. Otra diferencia notable de este nuevo medio es que produce un perfil de factores de nodulación cualitativa y cuantitativamente diferentes de los otros medios empleados como se pudo apreciar en la Figura 13.

4.4.1 Influencia de los medios Propagación y Propagación modificado en la producción de factores de nodulación por *B. elkanii* LMG 6134

Teniendo en cuenta las diferencias encontradas en la multiplicación celular de *Bradyrhizobium elkanii* con los diferentes medios de cultivo, y los efectos de esos medios sobre la producción de factores de nodulación en la cepa ICA 8001, se estudió la respuesta de la cepa de referencia LMG 6134 en la síntesis de factores de nodulación cuando fue cultivada en los medios Propagación y Propagación modificado. Los resultados para esta cepa corroboraron lo obtenido anteriormente con la ICA 8001 (Figura 17).

Cuando se cultivó la cepa ICA 8001 en el medio de Propagación se obtuvieron 3 manchas tenues correspondientes a factores Nod sintetizados y excretados por la cepa, mientras que en Propagación modificado esta cepa fue capaz de producir 8 lipoquitinolípidos diferentes parcialmente definidos por cromatografía.

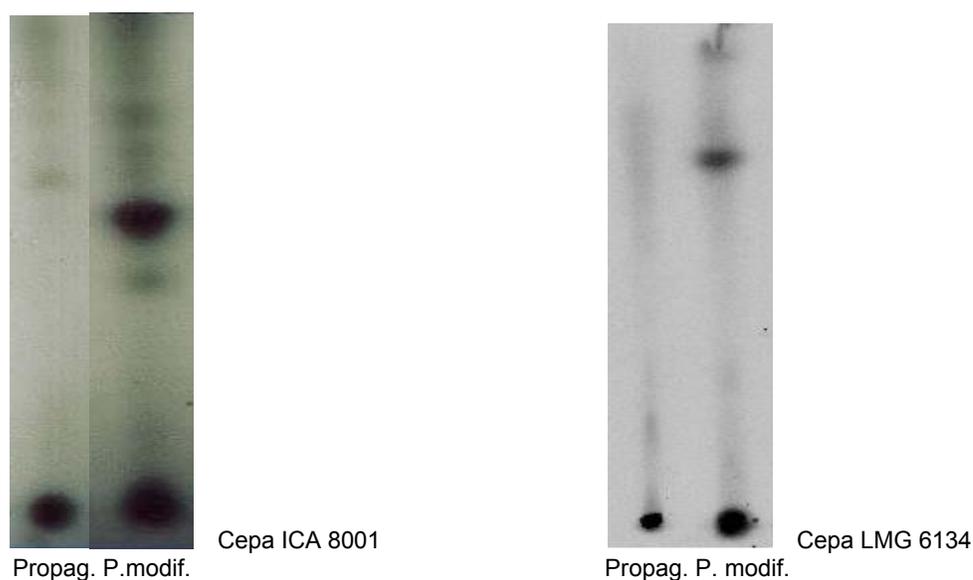


Figura 17. Perfil de factores Nod producidos por *B. elkanii* ICA 8001 y *B. elkanii* LMG 6134 ante los medios de cultivo Propagación y Propagación modificado.

En el caso de *B. elkanii* LMG 6134 el número de factores Nod producidos fue menor que con la ICA 8001. El medio tradicional de Propagación apenas mostró producción de estos

metabolitos Nod, pero el medio Propagación modificado presentó una mancha intensa y otras dos en menor concentración.

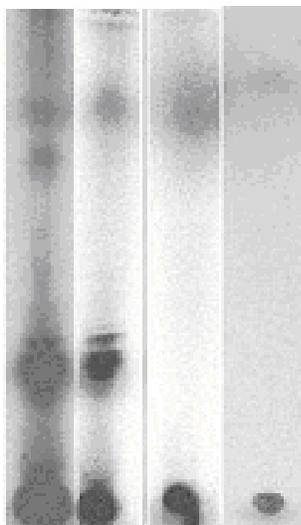
Para ambas cepas el medio Propagación modificado superó al medio Propagación además de en la reproducción celular en la inducción de la producción de factores de nodulación. Ello sugiere que el nuevo medio además de contener elementos nutritivos superiores en calidad para esta especie, contiene elementos inductores de los genes *nod* en cantidades adecuadas que superan los contenidos en el medio Propagación. Estos resultados avalan el empleo efectivo de este nuevo medio no sólo para la cepa que más se utiliza en Cuba, sino también para otras cepas de *Bradyrhizobium* sp.

4.5 Extracción de los posibles inductores en varios solventes

La literatura refiere que entre los componentes de la soya se encuentran sustancias como los ácidos fenólicos (clorogénico, ferúlico, gentísico, isoclorogénico, siríngico, salicílico, vainílico y cinámico), que se encuentran unidos a oligosacáridos como la estaquiosa y la rafinosa, las cuales componen más del 50 % de los compuestos solubles del frijol de soya (Hasler, 1998). Kape, Parniske y Werner (1991), refieren actividad inductora sobre los genes de *Bradyrhizobium*, de algunos elementos solubles de este grano como los ácidos fenólicos.

La soya molinada fue sometida a extracción con solventes que van desde muy polar como el agua hasta menos polares como el metanol y el etanol.

A partir de la Figura 18, que muestra los factores de nodulación producidos cuando *B. elkanii* se cultiva en el medio Propagación modificado con los diferentes extractos, se puede suponer, en primer lugar, que una gran parte de los compuestos inductores presentes en la soya son sustancias solubles en agua. La distribución de manchas cromatográficas indica que en este solvente es donde se alcanza la mayor inducción de estas moléculas, efecto que disminuye según lo hace la polaridad del solvente.



Agua DMSO Metanol Etanol

Leyenda:

Agua: extracto en agua

DMSO: extracto en dimetilsulfóxido

Metanol: extracto en metanol

Etanol: extracto en etanol

Figura 18. Efecto de diferentes extractos de la soya en la producción de factores Nod en *B. elkanii* ICA 8001.

Si se tiene en cuenta que los inductores clásicos (flavonoides e isoflavonoides) son poco solubles en agua, resulta evidente que en el presente caso, son aquellos compuestos polares los que han ejercido su función inductora, ya que el extracto acuoso se destacó con la producción de 9 manchas cromatográficas.

Con el extracto en dimetilsulfóxido se obtuvieron 5 manchas, de las cuales, 4 coinciden en movilidad con las del extracto acuoso, lo cual pudiera implicar coincidencia en las sustancias inductoras extraídas. En el caso del extracto metanólico y en el etanólico se produjo una mancha respectivamente, aunque con mayor intensidad en el primero.

La aparición de manchas con similar movilidad en diferentes extractos sugiere que diferentes solventes pueden extraer iguales inductores. Así, la mancha de mayor intensidad presente en el extracto en metanol también se presentó en el extracto acuoso.

Indudablemente, el extracto acuoso además de resultar el de mayor poder de inducción, representa el solvente idóneo por su disponibilidad, inocuidad y costo. Resulta necesario evaluar entonces la actividad biológica de los factores de nodulación producidos a partir de la inducción con este extracto.

Diferentes concentraciones de este extracto acuoso se utilizaron para evaluar su efecto sobre el crecimiento de *B. elkanii* ICA 8001, comparándose entre sí y con el frijol de soya molinado en el medio Propagación modificado (Figura 19).

Al comparar el extracto acuoso a la concentración de 10 g.L⁻¹ con el nuevo medio contentivo de la soya molinada a igual concentración, se apreció que la velocidad específica de crecimiento del primero fue significativamente superior a la del segundo (0.2186 vs 0.0677 h⁻¹), y por tanto, el tiempo de duplicación en el medio con el extracto fue inferior.

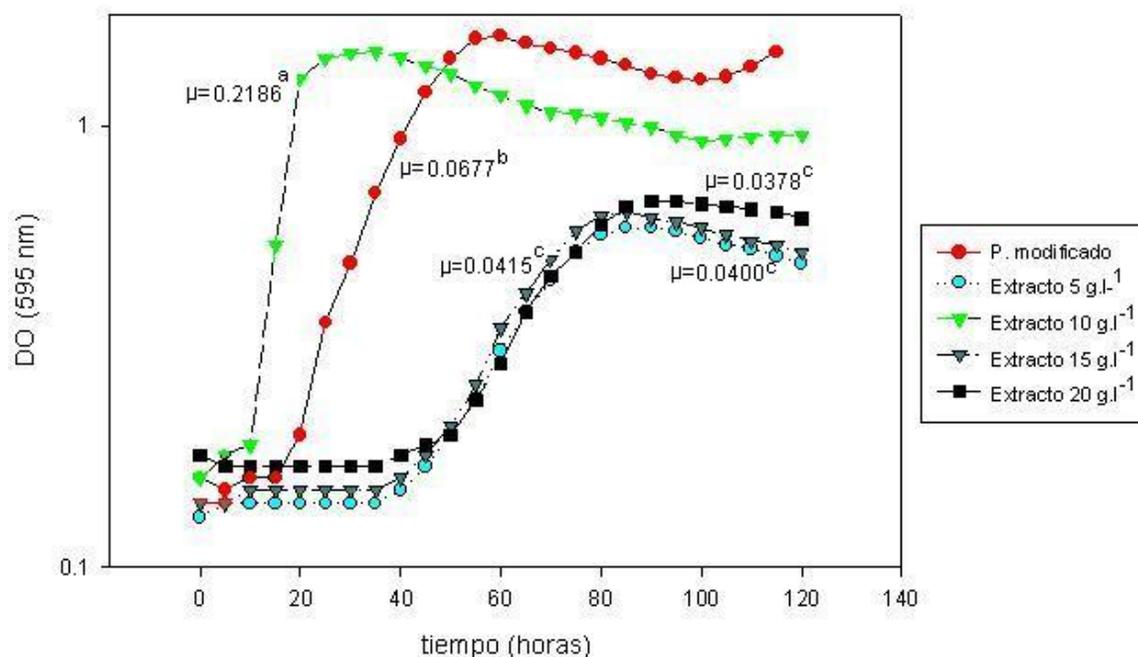


Figura 19. Dinámica de crecimiento de *B. elkanii* ICA 8001 ante diferentes extractos acuosos de la soya y el medio Propagación modificado.

ES*** = 0.0042

P < 0.05

n=5

Parece ser que el óptimo en la concentración del extracto a utilizar se encuentra entre 5 y 15 g.L⁻¹, dado que a estos valores se obtiene una multiplicación celular inferior. Esto refuerza la suposición anterior de la inhibición por exceso de sustrato obtenido con la melaza en el medio Propagación y en este mismo medio Propagación modificado cuando se utilizan concentraciones superiores a 10 g.L⁻¹ de soya.

Este experimento permitió asociar el comportamiento diáuxico con la soya molinada como sustrato, dado que el empleo del extracto acuoso de la misma, eliminó la bifase. Esto indica que el comportamiento diáuxico estaba relacionado con aquellos compuestos menos solubles y de alto peso molecular, que por ende, serían asimilados en una segunda fase de crecimiento.

El máximo de crecimiento celular que se alcanzó a las 55 horas para el medio Propagación modificado, se redujo a 30-35 horas cuando se empleó en este medio la soya en forma de extracto acuoso a 10 g.L⁻¹. Esto reduce considerablemente el tiempo de fermentación, lo que además de abaratar el proceso disminuye el riesgo por contaminación.

Cuando se acotó aún más el rango de concentraciones del extracto acuoso de soya en el medio de cultivo (7.5, 10 y 12.5 g.L⁻¹), se apreció que si bien 5 g.L⁻¹ representa el mínimo en nutrientes y algún elemento de los que aportó no fue aún suficiente, también a 7.5 g.L⁻¹ este efecto se mantuvo, alcanzándose el máximo a la concentración de 10 g.L⁻¹ (Tabla 8).

Tabla 8. Influencia de la concentración del extracto acuoso de la soya molinada sobre la multiplicación celular de *B. elkanii* ICA 8001.

Parámetro	7.5 g.L ⁻¹	10 g.L ⁻¹	12.5 g.L ⁻¹
μ (h ⁻¹)	0.048	0.2186	0.0471
t_d (h)	8.25	1.81	8.40

t_d : tiempo de duplicación

Cuando se empleó 12.5 g.L⁻¹, los valores de la velocidad específica de crecimiento vuelven a ser bajos, lo que indica que el máximo de crecimiento pudiera estar alrededor de 10 g.L⁻¹.

En concentraciones superiores a los 12.5 g.L⁻¹ pudieran intervenir además los factores antinutricionales presentes en la soya, tales como los inhibidores de tripsina, hemaglutininas, y

factores antivitaminicos (Smith, 2001), influyendo negativamente sobre la fisiología del microorganismo. De esta manera, de las concentraciones estudiadas, 10 g.L^{-1} es la que ofrece un mejor desarrollo celular.

Un estudio económico elemental de los costos variables de producción del medio tradicional Propagación y el nuevo medio Propagación modificado se muestra en el Anexo 1.

Aunque el medio tradicional Propagación resulta más barato en moneda nacional con un 40 % menos de costo en reactivos que el nuevo medio Propagación modificado, éste último es mejor porque reduce en un 64.5 % el costo en moneda libremente convertible (Ver Anexo). Si a esto se le suma que con el medio Propagación modificado se reduce casi en la mitad el tiempo de fermentación, el gasto en mano de obra y equipamiento resultan también un 50% menos de lo que costaría la producción con el medio Propagación.

Teniendo en cuenta los diferentes resultados encontrados sobre la dinámica de multiplicación celular y la producción de factores Nod, resulta evidente que el estado nutricional de la célula microbiana se ve afectado por el balance y composición del medio de cultivo donde se desarrolla. Así como que los mismos factores que utiliza para su crecimiento y desarrollo, pueden influir sobre la formación de sustancias como los factores de nodulación, que le permitirán otro tipo de interacción con el ambiente.

Como resultado de este conjunto de experimentos se puede decir, de manera general, que el medio de cultivo Propagación modificado puede ser mejorado con la sustitución de la semilla de soya molinada por su extracto acuoso, lo que mejoraría las condiciones del proceso fermentativo.

4.6 Influencia del medio de cultivo sobre la nodulación, el crecimiento y desarrollo del cultivo de la soya en condiciones semicontroladas

El efecto de los medios de cultivo Propagación y Propagación modificado sobre los caracteres de la nodulación cuando las dos variedades de soya fueron cultivadas en macetas, se muestra en la Tabla 9. Se presentaron diferencias altamente significativas entre los

tratamientos. Se destacó la influencia positiva del medio Propagación modificado en todos los caracteres evaluados para ambas variedades de soya.

Tabla 9. Efecto de diferentes medios de cultivo sobre la nodulación en dos variedades de soya bajo condiciones semicontroladas

Variedad	Tratamiento	Variables		
		No. nódulos.pta ⁻¹	MF nódulos (g. pta ⁻¹)	MS nódulos (g. pta ⁻¹)
Cubasoy 23	T0	93.25 c	0.78 b	0.13 c
	Propagación	145.5 b	1.0 b	0.34 b
	P.modificado	262.5 a	2.47 a	0.71 a
	Esx	21.77***	0.23***	0.07***
Suprema	T0	119.5 c	1.12 c	0.29 c
	Propagación	177.5 b	1.92 b	0.50 b
	P.modificado	262.2 a	2.6 a	0.70 a
	Esx	18.5***	0.19***	0.05***

Leyenda: T0: control sin inocular
 Propag: inóculo en medio Propagación
 P. modif.: inóculo en medio Propagación modificado
 Letras comunes no difieren significativamente.
 Esx: *** significa P<0.001
 n=8

El número de nódulos desarrollados en las dos variedades estudiadas y su masa seca fueron superiores para el medio Propagación modificado, seguidos por el medio Propagación y los resultados inferiores correspondieron al testigo sin inocular. Todos los nódulos fueron efectivos.

La masa fresca nodular se comportó de manera similar cuando se empleó la inoculación, pero para el control sin inóculo la variedad Cubasoy 23 no se diferenció significativamente del medio Propagación.

Es de señalar la nodulación espontánea que se presentó en el control sin inocular para ambas variedades, que si bien fue estadísticamente inferior a lo mostrado por los otros tratamientos, evidenció la presencia de *Bradyrhizobium* en este suelo.

La existencia de nódulos espontáneos demuestra que la cepa exógena tuvo que superar la infectividad y actividad de la cepa endógena que los produjo. Ésta, al estar más adaptada al hábitat, se hallaba en mejores condiciones, por lo que en la competencia intraespecífica que

debió establecerse entre ellas todos estos factores bióticos influyeron marcadamente en el resultado final de la nodulación para cada tratamiento estudiado. Es posible que la cantidad y tipo de los factores Nod producidos por la ICA 8001 le brinden igual o mayores posibilidades en la competencia por el nicho ecológico.

Los resultados de la masa fresca similares para la variedad Cubasoy 23 sin inoculación y con la cepa en el medio Propagación fueron superados cuando se empleó el medio modificado.

La influencia de estos medios de cultivo sobre el crecimiento y desarrollo de ambas variedades se muestra en la Tabla 10.

La variable altura no mostró diferencias significativas entre los tratamientos para la variedad Suprema. En el caso de la variedad Cubasoy 23 las plantas que más crecieron fueron las inoculadas con el medio Propagación modificado, seguidas por el medio Propagación y el control, sin diferencias significativas entre ellos.

El número de trifoliolos no evidenció diferencias significativas para los tratamientos en la variedad Cubasoy 23 y para la variedad Suprema también los mejores resultados correspondieron al medio Propagación modificado. El medio Propagación y el control sin inocular no difirieron significativamente.

Tabla 10. Efecto de diferentes medios de cultivo sobre el crecimiento y desarrollo de dos variedades de soya en condiciones semicontroladas

Variedad	Tto	Evaluación							
		Altura (cm)	No. de trifoliolos	MF Hojas (g)	MS Hojas (g)	MF Raíz (g)	MS Raíz (g)	N en Hojas (%)	P en Hojas (%)
Cubasoy 23	T0	36.50 b	10.75	27.91 a b	5.43 ab	36.30	3.29 ab	3.42 b	0.31 a
	Propag	34.87 b	11.75	24.46 b	4.69 b	29.70	2.48 b	3.62 b	0.28 a
	P. modif.	40.62 a	11.75	34.27 a	6.48 a	39.34	3.66 a	4.10 a	0.26 b
	ESx	0.92**	0.41 ns	1.70**	0.30**	2.0 ns	0.23**	0.09***	0.01*
Suprema	T0	34.00	14.00 b	28.57 b	5.40 b	33.49 b	3.29 b	3.23 b	0.29 a
	Propag	37.25	15.75 b	31.11 a b	5.99 ab	35.04 b	3.49 ab	3.28 b	0.28 a
	P. modif.	38.62	21.50 a	38.59 a	7.08 a	43.52 a	4.92 a	3.77 a	0.21 b
	ESx	0.66 ns	1.17***	1.89**	0.33*	1.84**	0.32**	0.08**	0.01***

Leyenda: T0: control sin inocular
 Propag: inóculo en medio Propagación
 P. modif.: inóculo en medio Propagación modificado
 Letras comunes no difieren significativamente.
 Esx: * significa $P < 0.05$ *** $P < 0.001$
 n=8

En cuanto a las masas fresca y seca de las hojas el comportamiento fue muy similar en ambas variedades para los tratamientos estudiados. Al analizar la variedad Cubasoy 23 en ambas variables, el medio Propagación modificado mostró resultados superiores al medio Propagación, pero no se diferenció significativamente del control. Este último tampoco se diferenció del medio Propagación. La variedad Suprema, sin embargo, no mostró diferencias entre el control y el medio Propagación ni entre este último y el medio Propagación modificado, pero sí entre Propagación modificado y el control.

Por su parte, los valores de masa fresca de la raíz no fueron significativamente diferentes para la variedad Cubasoy 23 y para la Suprema los mejores resultados se ubicaron en el medio Propagación modificado. El medio Propagación y el control sin inoculación no se diferenciaron entre sí. La masa seca de este órgano en la variedad Cubasoy 23 mostró un comportamiento semejante a la masa fresca de las hojas, con diferencias entre los medios Propagación y Propagación modificado. El control se mostró estadísticamente igual a ambos medios de

cultivo.

El contenido de nitrógeno en hojas se comportó igualmente en ambas variedades estudiadas. Los valores más altos correspondieron al medio Propagación modificado, y el medio Propagación y el control no se diferenciaron significativamente entre ellos. El nivel de este elemento es un indicativo de la eficiencia de la fijación biológica realizada por las células bacterianas presentes en el inóculo, de ahí que la mayor cantidad acumulada en las plantas inoculadas con el microorganismo proveniente del medio Propagación modificado responda a una mayor eficiencia de los nódulos desarrollados por ellas ante este tratamiento.

El hecho aparentemente contradictorio, entre los resultados inferiores en cuanto a los índices de la nodulación, hallados para el control con respecto al medio Propagación, y la similitud que ambos tratamientos mostraron en cuanto a la acumulación de nitrógeno, pudiera explicarse teniendo en cuenta que los nódulos desarrollados por el control, aunque en menor cuantía pudieron haber sido tan efectivos como los que se formaron con el medio Propagación. La eficiencia en este proceso biológico depende de la actividad nodular, no del número de estas estructuras.

Ambas variedades respondieron de manera similar en cuanto al porcentaje de fósforo en hojas, pero en este caso, contrario a lo encontrado en el nitrógeno, los mejores resultados correspondieron al control y al medio Propagación, sin diferencias entre ellos y el menor porcentaje de P acumulado apareció en el medio Propagación modificado.

Esto pudiera deberse a que el estado fisiológico de la bacteria, propiciado por el medio Propagación modificado, le confirió condiciones superiores para la fijación de nitrógeno, por lo que ello requirió un consumo más elevado de fósforo en forma de ATP.

Por otro lado, *Bradyrhizobium* como PGPR (Badenoch-Jones y col. 1982; Wang, Wood y Brewin, 1982) tiene entre sus propiedades la de optimización de la asimilación de nutrientes por la planta. Se conoce que durante este proceso existe una mayor acumulación de elementos como P, K, y microelementos y además que cuando las condiciones ambientales no son

favorables para la fijación biológica del nitrógeno, se estimula la optimización de la absorción de estos nutrientes. De cualquier manera los niveles de P son adecuados (Corbera, 1998a), lo que corrobora la efectividad de esta inoculación.

Los niveles adecuados de P en el tratamiento inoculado con el medio Propagación modificado sugieren además, que en él la extracción de este elemento por la planta fue balanceado, debido a que abasteció por los mecanismos de absorción sus necesidades nutricionales así como los requerimientos de este macroelemento para la fijación biológica del nitrógeno por el microsimbionte, proceso que se conoce, es altamente dependiente de ATP.

De forma general no se observó una marcada respuesta entre variedades a la inoculación, lo cual pudo deberse a la ocurrencia de nodulación espontánea que enmascaró el efecto de los tratamientos.

4.7 Efecto de diferentes medios de cultivo sobre el crecimiento y desarrollo de la soya en condiciones de campo

Los experimentos llevados a cabo en condiciones de campo avalan el empleo del medio Propagación modificado con resultados de crecimiento, desarrollo y rendimientos del cultivo superiores al inóculo tradicional (Tabla 11).

Tabla 11. Efecto de los inóculos Propagación y Propagación modificado sobre el crecimiento y rendimiento de dos variedades de soya en un suelo Ferralítico Rojo Lixiviado típico éutrico y condiciones de campo.

Variedad	Inóculo (Medio)	Altura (cm)		No. vainas por planta	Peso de 100 granos (g)	Rendimiento (t.ha ⁻¹)
		Floración	Cosecha			
CUBAsoy23	Propagación P.modificado	66.57	70.67	30.40	12.0 b	1.26 b
		69.37	76.47	40.87	16.0 a	1.46 a
ES x		1.05 ns	1.85 ns	3.29 ns	0.86**	0.04**
INCAsoy 24	Propagación P.modificado	63.67 b	109.92 b	53.40 b	11.75 b	2.08 b
		70.30 a	114.12 a	66.82 a	15.5 a	2.38 a
ES x		1.75*	1.05*	2.92**	1.01*	0.07*

Letras comunes no difieren significativamente.

Esx: * significa P<0.05

** P<0.01

n=6

Para la variedad Cubasoy 23 las variables altura de la planta y número de vainas por planta no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos. Sin embargo, los

resultados difirieron significativamente para el peso de 100 semillas y para el rendimiento, siendo favorables con el empleo del medio Propagación modificado. Con el empleo de este medio de cultivo se superaron en un 15.8% los rendimientos obtenidos con el medio de Propagación, con una diferencia de 0.2 t.ha^{-1} .

Para la variedad Incasoy 24 se presentaron diferencias significativas en todas las evaluaciones realizadas y los mejores resultados correspondieron igualmente al medio Propagación modificado. En este caso, los rendimientos alcanzados empleando el medio Propagación fueron superados en un 14.4% por el medio Propagación modificado, obteniéndose una diferencia de 0.3 t.ha^{-1} .

Las plantas de la variedad Incasoy 24 alcanzaron un mayor tamaño en el momento de la cosecha que las de la variedad Cubasoy 23, con un consecuente incremento en el número de vainas. Si bien el peso de 100 semillas fue similar en ambas variedades, la Incasoy 24 logró incrementar 1.6 veces el rendimiento obtenido en cada medio por la variedad Cubasoy 23.

Se presentó una marcada respuesta entre variedades al proceso de nodulación. La variedad Incasoy 24 presentó una respuesta mayor en las variables estudiadas, lo cual pudo deberse a varios factores bióticos, entre los que se destaca la posible producción diferente cualitativa y cuantitativamente de los factores Nod por la bacteria en los medios de cultivo empleados, que como ya se ha demostrado influyen en la distribución y cantidad de estos factores. También se debe tener en cuenta la especificidad macro – microsimbionte que se establece en esta interacción (Vlassak y Vanderleyden, 1997; Dombrecht, 2001).

El comportamiento de ambos inóculos sobre el rendimiento de la variedad Tapachula en el ensayo sobre una mayor extensión de suelo Ferralítico Rojo Lixiviado típico dístico se muestra en la tabla 12.

Una vez más los inóculos cultivados en el medio Propagación modificado superaron los resultados encontrados para el medio de Propagación, esta vez con un incremento del 34 % en los rendimientos de esta variedad.

Tabla 12. Efecto de los inóculos obtenidos con los medios Propagación y Propagación modificado sobre el rendimiento de la soya variedad Tapachula en una extensión de suelo Ferralítico Rojo Lixiviado típico dístrico.

Tratamientos	Rendimiento (t.ha ⁻¹)
Propagación	2.08
Propagación modificado	2.80
Esx	0.41 *

Valores seguidos por la misma letra no difieren significativamente.

Esx: * significa $P < 0.05$

n=4

Resultó importante que el porcentaje de incremento en los rendimientos fuera mayor en esta localidad, donde la fertilidad del suelo es menor. Esto significa que en estas condiciones la eficiencia de la fijación biológica fue superior gracias a una mejor disposición fisiológica del microorganismo en el medio de cultivo empleado. Una influencia similar fue encontrada por Corbera en 1998b en la misma localidad, donde la co-inoculación con *Bradyrhizobium* sp. y *Glomus* sp. fue capaz de sustituir la aplicación de fuentes minerales de N y P con altos rendimientos del cultivo.

Si se tiene en cuenta que el género Dístrico es un suelo pobre en iones hidroxilo, donde existen por tanto problemas de acidez (Medina, 1980), se puede pensar que la capacidad de *Bradyrhizobium* de producir alcalinidad en su entorno le ofrece a este simbiote ventajas competitivas sobre otros microorganismos acidófilos de la rizosfera, con mayor facilidad de colonización ya que se ve favorecido en las relaciones intra e interespecíficas que se establecen en la rizosfera.

De esta forma, la influencia del medio Propagación modificado sobre el cultivo de la soya se reitera para diferentes variedades de soya.

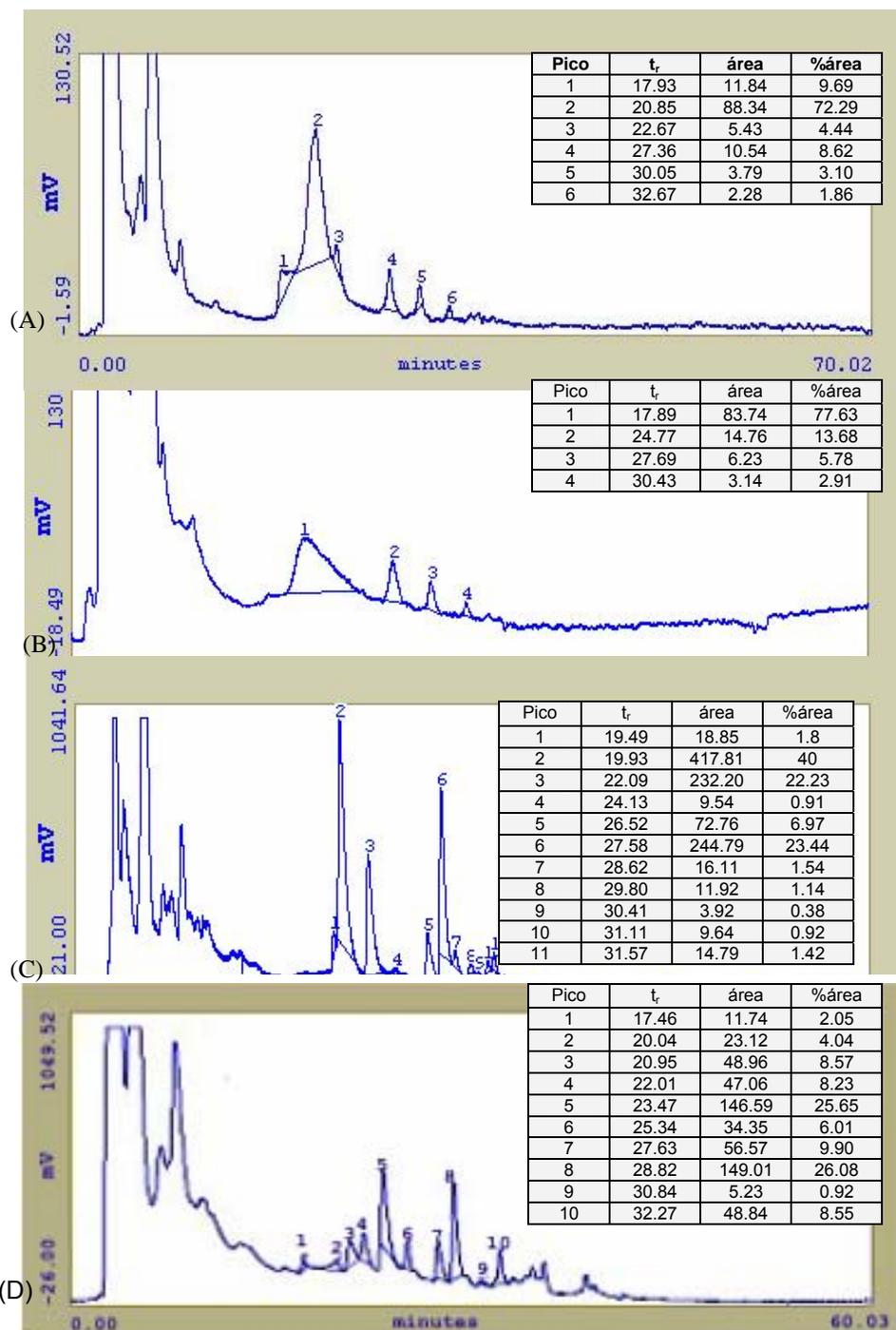


Figura 14. Perfil de elución en fase normal de Factores Nod producidos por *B. elkanii* ICA 8001 en medio YEM (A), Propagación (B), Propagación modificado (C) y Propagación modificado con genisteína 10 μM (D).

5. DISCUSIÓN GENERAL

Una característica distintiva de las bacterias pertenecientes a la familia Rhizobiaceae es su gran diversidad genética, diversificación que ha sido relacionada con la amplia distribución geográfica de estos microorganismos (Martínez y Caballero-Mellado, 1996).

La taxonomía de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* ha sido y está siendo reexaminada aún, por lo que han sido propuestas algunas nuevas especies (Martínez y Caballero-Mellado, 1996; Bécquer, 2002). *Bradyrhizobium japonicum* es la única especie reconocida en el Manual de Bergey de Sistemática en Bacteriología (Holt y col. 1994). Sin embargo, otras dos nuevas especies: *B. elkanii* (Kuykendall y col. 1992) y *B. liaoningense* (Xu y col. 1995) han sido propuestas también como simbioses de la soya.

La relación genética entre los diferentes grupos bacterianos ha sido definida fundamentalmente mediante el análisis de secuencias de genes ribosómicos, los cuales son altamente conservados, permitiendo inferir la filogenia entre los organismos.

En rizobios, el secuenciamiento de genes específicos del ADN (Sanger, Nicklen y Coulson, 1977; Sambrook, Fritsch y Maniatis, 1989), así como del ARN (Young y Haukka, 1996; Laguerre y col. 1997; Wang y col, 1998; Parker, 1999; Parker y Lunk, 2000) se consideran técnicas para un nivel fino de caracterización y desde 1991 el método de secuenciamiento de genes del ARNr 16S es recomendado como el primer método a utilizar en ese nivel (Stackenbrandt y GoodFellow, 1991).

Estudios basados en la secuencia completa de genes ribosómicos 16S, distinguen diferentes grupos de *Bradyrhizobium*, incluyendo *B. elkanii* (van Berkum, Beyene y Eardly, 1996). Otras herramientas útiles para validar la filogenia de *Bradyrhizobium* lo constituyen los mapas de genes, tamaños genómicos y secuencias de genes metabólicos.

La heterogeneidad encontrada dentro de la especie *B. japonicum* sirvió de base a Kuykendall y col. en 1992 para proponer la nueva especie *B. elkanii* a partir del Grupo II de *B. japonicum*.

Como se señaló anteriormente, la cepa ICA 8001 es ampliamente utilizada en Cuba como inoculante, por lo que resulta importante, a la luz de lo anterior conocer su ubicación taxonómica actual. A su vez esto permite una mejor comparación con los resultados informados en la literatura especializada y también los presentados en este trabajo, realizados con otras cepas de *Bradyrhizobium* ubicadas taxonómicamente en fechas recientes.

En este trabajo, los caracteres morfológicos, culturales y tintoriales, unido a su capacidad de nodular la soya permitieron corroborar la clasificación de la cepa ICA 8001 dentro del género *Bradyrhizobium*.

El análisis del polimorfismo de los fragmentos de ADN ribosómico 16S amplificado mediante PCR, generados mediante enzimas de restricción, para diferentes cepas pertenecientes a este género, permitió conocer que la cepa ICA 8001 es cercana taxonómicamente a *Bradyrhizobium elkanii*, a pesar de que había sido clasificada anteriormente como *Bradyrhizobium japonicum*. Se arribó a esta conclusión teniendo en cuenta que esta cepa comparte un 97 % de homología con la cepa patrón utilizada, *B. elkanii* USDA 76, ante 6 enzimas de restricción empleadas. El hecho de compartir un 72 % de similitud con la especie *B. japonicum*, responde a que *B. elkanii* fue justamente propuesto como nueva especie a partir del grupo II de *B. japonicum* (Bécquer, 2002), por lo que es lógico que deben compartir cierto número de características comunes. Los resultados anteriores fueron confirmados mediante un dendrograma que separó de la misma forma a las cepas anteriores en tres clusters claramente definidos.

Estos resultados fueron posteriormente verificados mediante MLEE (Multilocus Enzyme Electrophoresis) según Barrera y col. (1997), los cuales demostraron la similitud de los patrones izoenzimáticos entre las cepas ICA 8001 y USDA 76, bien diferenciados de los de la USDA 110 por una parte, y de los de las cepas de *Lupinus* por otra (Rogel y Martínez, comunicación personal).

Este resultado, además de permitir conocer con qué microorganismo se está trabajando, servirá para establecer, también, una relación entre la especie, los posibles inductores de sus genes de nodulación, el perfil de producción de factores de nodulación y la interacción con los resultados de la literatura.

Los factores de nodulación, sintetizados por las diferentes especies que componen la familia Rhizobiaceae, han sido descritos como señales claves en la interacción con las leguminosas, adjudicándoseles la propiedad de constituir morfógenos que inician todo el programa de desarrollo nodular en la planta, permitiendo la entrada de la bacteria (Dénarié, Debelle y Promé, 1994; Spaink, 1995; Stacey y col. 1999) e influyendo positivamente sobre el desarrollo posterior de los bacteroides y la eficiencia en la fijación nitrogenada (Spaink y col. 1995). De esta forma, es lógico pensar que se puede encontrar una relación directa entre la producción de estas biomoléculas y los caracteres relacionados con la nodulación.

A partir de que fueron identificados los flavonoides como inductores de los genes de nodulación en *Rhizobium* (Davis y Johnston, 1990; Dénarié, Debelle y Rosenberg, 1992; Stacey y col. 1995; Rao y Cooper, 1995), otros compuestos han mostrado tener también un papel en la activación de los genes *nod*. Por ejemplo, Kape, Parniske y Werner en 1991, informaron del papel inductor de los ácidos fenólicos (ácido ferúlico, alcohol coniferílico, ácido clorogénico, ácido cumárico y ácido cafeico) que, aunque débilmente, fueron capaces de inducir los genes de nodulación en *B. japonicum*. Una nueva familia de inductores *nod* ha sido propuesta posteriormente por Gagnon e Ibrahim en 1998. Estos autores hallaron que además de las isoflavonas de *Lupinus*, carbohidratos como los ácidos aldónicos (eritrónico y tetrónico), guiaban a incrementos significativos de la actividad β -galactosidasa como medida de la activación de los genes *nod* en *Mesorhizobium loti*, *Rhizobium lupini* y *Sinorhizobium meliloti*. Adicionalmente, estos autores resaltan el hecho de que estos carbohidratos ejercen un efecto sinérgico con algunos flavonoides.

Los resultados de este trabajo incluyen también a la semilla de soya y la melaza como portadores de inductores para varias cepas de *Bradyrhizobium*, los cuales inducen la producción de factores Nod como moléculas esenciales en el éxito de la simbiosis. Resulta importante señalar el efecto de estos compuestos sobre la capacidad de fijación de nitrógeno, por constituir ésta la máxima expresión del éxito en la nodulación. El efecto de inducción de ambos compuestos supera incluso al ejercido por la genisteína, isoflavonoide que ha sido nominado como el más potente inductor de los genes *nod* en *Bradyrhizobium*. San Juan y col. (1994), encontraron mayor producción de factores Nod al inducir, con extractos de semillas de soya que con la genisteína, en una cepa salvaje de *B. japonicum*. Esto y los resultados encontrados por Gagnon e Ibrahim en 1998, llevan a pensar en la posibilidad de que tanto en la soya como en la melaza coexistan varios elementos con poder de inducción.

Con la digestión enzimática de la soya se pretendía degradar los carbohidratos presentes en la misma, teniendo en cuenta que estas enzimas tienen actividad carbohidrasa y que se recomiendan para degradar paredes celulares de tejidos vegetales (Novozyme). De esta forma, los elementos nutricionales contenidos en la soya podrían ser más asequibles al microorganismo y además el efecto inductor de determinados compuestos en ella incrementarse mediante su liberación.

Contrario a lo esperado, el efecto de la degradación afectó negativamente el comportamiento de la semilla de soya molinada como inductor. La hidrólisis aparentemente escindió alguno(s) de los compuestos, preferentemente carbohidratos, que pudieran ejercer el efecto inductor solo(s) ó sinérgicamente, con los flavonoides u otros inductores (Hasler, 1998). Otra hipótesis pudiera ser el hecho de que la digestión enzimática liberó más inductores y se presentó igualmente un efecto de inhibición por exceso de inducción. Este tratamiento no ha sido informado antes en la literatura.

De conocer qué compuestos en la semilla de soya ejercen específicamente la actividad de inducción, se podría entonces relacionar la actividad ejercida por la enzima con la disminución en el poder inductor.

La determinación cromatográfica de los factores Nod sintetizados, se relacionó directamente con los principales resultados de la nodulación para los diferentes compuestos y medios de cultivo. Aquellos tratamientos que mejor favorecieron la formación de nódulos y que aumentaron la capacidad para fijar nitrógeno, coincidieron con los que indujeron mayor cantidad de compuestos determinados por cromatografía. La soya a 10 g.L^{-1} , la melaza a igual concentración y la combinación de ambas a 10 y 5 g.L^{-1} , respectivamente, en el medio Propagación modificado, ofrecieron los mejores resultados de inducción.

La producción de factores de nodulación evidenció que los inductores presentes en la semilla de soya molinada y la melaza producían una respuesta diferenciada en dependencia de la cepa, lo que sugiere la presencia de diversos inductores que van a actuar sobre diferentes genes en la cepa de *Bradyrhizobium* receptora. Por tanto, resulta necesario tener en cuenta el tipo de inductor a utilizar, su concentración y la cepa a inducir, con el fin de obtener los mejores resultados.

Al analizar comparativamente los tres medios de cultivo ensayados se apreció que el medio YEM indujo algunos factores Nod pero tal vez no aquellas estructuras con una elevada actividad inductora. Esto lo sugiere el hecho de que su efecto sobre la nodulación fue inferior.

Comparando los medios "Propagación" y "Propagación modificado", existió una diferencia marcada en cuanto al perfil y concentración de factores Nod sintetizados. El medio Propagación indujo la producción de 3 manchas definidas mediante cromatografía de capa delgada y 4 picos separados por HPLC, mientras que Propagación modificado indujo 8 y 11 entes diferentes, respectivamente.

El patrón de factores Nod producidos por el nuevo medio de cultivo contuvo los perfiles desarrollados por la soya y la melaza como inductores independientes y su efecto sobre la

nodulación justifica acentuadamente la inclusión de estos compuestos en su composición. Estos elementos confieren a la bacteria mejores condiciones para su crecimiento y para la síntesis de los factores Nod.

La presencia de estructuras diferentes en los perfiles inducidos en medio YEM con soya o con melaza y Propagación modificado, sugiere que éstos contienen otros metabolitos *nod*-inductores diferentes de la genisteína; los cuales pudieran actuar cooperativamente en la activación de la síntesis de los factores Nod. Smith y col. (1992) encontraron que no sólo la daidzeína y la genisteína activaban los genes *nod* en *B. japonicum*, sino que otros compuestos presentes en la semilla y exudados radicales inducían de manera sinérgica la activación de estos genes, guiando a una mayor cantidad de proteína Nod D en la célula. Esos nuevos inductores fueron purificados y caracterizados químicamente como derivados glicosilados de los inductores encontrados anteriormente.

La mezcla de inductores empleados (soya, melaza y otros componentes del medio) manifiestan la capacidad de producción de diferentes combinaciones de factores Nod por la cepa. Esta variabilidad en la producción de factores Nod ofrece la posibilidad de nodulación en un rango más amplio de variedades de soya.

Los perfiles de factores de nodulación producidos al emplear la soya molinada y la melaza, son diferentes (algo que queda demostrado para las diferentes cepas estudiadas). Ello justifica la inclusión de ambos compuestos en el medio Propagación modificado, lo que garantiza un mayor espectro en su actividad biológica.

El esquema de extracción, purificación y detección utilizado para ambas técnicas cromatográficas, responde únicamente a este tipo de moléculas (Carlson y col. 1993; Cárdenas y col. 1995; Laeremans, 1998), por lo que ambos métodos confirman los resultados superiores del medio Propagación modificado en cuanto a la producción de Factores Nod.

Estos resultados explican y corroboran los resultados de la nodulación y la fijación biológica del nitrógeno.

¿Quién pudiera ser el responsable del efecto inductor en estos compuestos?

No está claro aún. Se pudiera pensar en flavonoides, teniendo en cuenta que la daidzeína y la genisteína se encuentran en concentraciones biológicamente relevantes en las semillas y raíces de la soya (Kosslak y col. 1987; José y col. 2002), así como que algunas manchas cromatográficas reveladas en la inducción con soya y genisteína mediante TLC, coincidieron en su movilidad.

En el extracto acuoso y la propia semilla de soya se han identificado otros compuestos muy diversos que van desde isoflavonas, saponinas, azúcares, ácidos urónicos y fenólicos, almidón, hasta lípidos, péptidos, peptonas y proteínas (Huisman, Schols y Voragen, 1998, Hasler, 1998); cualquiera de los cuales pudiera revelarse como inductor. Por otra parte, el efecto de inducción demostrado por el extracto acuoso de la semilla de soya, revela que los compuestos extraídos y con alto poder de inducción para la cepa *B. elkanii* ICA 8001 constituyen compuestos hidrofílicos.

Las melazas contienen fenoles monoméricos (Colectivo de autores, 1990), quienes constituyen débiles inductores *nod* en *B. japonicum* (Kape, Parniske y Werner, 1991). Contienen además otros ácidos libres, por lo que no es erróneo pensar en la posible presencia de ácidos aldónicos, los cuales han sido recientemente descubiertos como una nueva familia de inductores (Gagnon e Ibrahim, 1998). De esta forma, pudiera ser posible pensar en uno o varios de estos compuestos como responsables de tal actividad de inducción.

El diseño del medio de cultivo nuevo “Propagación modificado” se realizó teniendo en cuenta satisfacer los principales requerimientos nutricionales de *Bradyrhizobium* y además la posibilidad de que otros elementos presentes en su formulación pudieran inducir la síntesis de factores de nodulación en la bacteria.

Teniendo en cuenta ambos objetivos y tomando como base el medio “Propagación”, reconocido por garantizar niveles adecuados de multiplicación celular para la cepa ICA 8001, se mantuvo la melaza como fuente de carbono, pero como al introducir la semilla de soya

molinada o su extracto acuoso, la fuente de carbono y energía se potenció, se redujo entonces la concentración de melaza a la mitad.

El extracto de levadura presente en el medio "Propagación" como fuente de aminoácidos y nitrógeno fundamentalmente, se eliminó también por la presencia de la soya, dado el elevado contenido de proteínas de la misma (aproximadamente 50%). De esta manera, la semilla de soya molinada como componente principal del medio "Propagación modificado" garantizaría carbono, nitrógeno y elementos inductores, aspecto ampliamente demostrado.

La melaza aportaría inductores adicionales, además de carbono y otros muchos elementos en mayor y menor cuantía presentes en su composición. El resto de las sales aportarían fósforo, azufre, potasio, magnesio y calcio. Con tal composición se logra un balance de nutrientes, energía y pH que garantiza un adecuado desarrollo celular como se demuestra en los resultados de este trabajo.

"Propagación modificado" garantizó una adecuada reproducción celular no sólo en la cepa ICA 8001, sino también en la cepa LMG 6134 de *Bradyrhizobium elkanii*. El alcance de una alta velocidad específica de crecimiento, así como el acortamiento de las diferentes fases del crecimiento, reflejaron el efecto positivo de los compuestos introducidos en este medio sobre la fisiología del microorganismo. El efecto marcadamente superior del medio Propagación modificado sobre el medio tradicional "Propagación" se evidenció además en la diversidad de producción de los factores de nodulación por la bacteria, lo que indica una acertada inclusión de elementos inductores de la nodulación representados por la soya y la melaza.

Los pasos posteriores para completar el conocimiento de la influencia del nuevo medio sobre la fisiología del microorganismo, incluyeron el empleo de diferentes extractos de la soya molinada. La utilización de un extracto acuoso de la soya a la concentración de 10 g.L^{-1} puede sustituir a la soya molinada en la formulación del medio. Este extracto garantiza una dinámica de multiplicación celular superior, con una mayor velocidad específica del crecimiento y un elevado poder inductor sobre los genes de nodulación, entre otros tres extractos evaluados.

Las ventajas del empleo del medio nuevo en cuanto a la obtención de mayor número de células son evidentes, lo que refleja el efecto positivo de los componentes introducidos en él sobre la fisiología del microorganismo. La soya como fuente de carbohidratos, proteínas y otros elementos (Huisman, Schols y Voragen, 1998), al parecer suministra una buena cantidad de nutrientes que garantizan un elevado desarrollo celular. El aporte de la melaza en azúcares fundamentalmente, pero también en proteínas, aminoácidos y vitaminas (Biar, Serrano y Conde, 1982) ayudan como complemento nutritivo.

Este estudio muestra que la cepa ICA 8001 se comporta de manera diferente y superior en cuanto a la producción de factores Nod con respecto a otras cepas similares empleadas como inoculantes, lo que permite emplear medios más baratos a partir de fuentes de carbono asequibles que a la vez inducen una producción versátil de dichos factores de nodulación.

Los resultados devenidos con el empleo del inóculo libre de células evidenciaron el papel de los factores de nodulación en la formación de los nódulos. Resultó interesante que el inóculo libre de bacterias indujo una nodulación similar al inóculo bacteriano. Según los resultados de la literatura concernientes a la actividad de los factores de nodulación como moléculas claves y responsables de la formación nodular (Vijn y col., 1993; Relic y col., 1994; Stokkermans y Peters, 1994), los nódulos formados por el filtrado libre de células sólo pueden haber sido inducidos por estas biomoléculas. Este resultado confirma la intención de contar con los inductores adecuados en el medio de cultivo.

Los resultados de la investigación, desde los ensayos *in vitro*, hasta los experimentos en campo, reafirman la superioridad del inoculante en el medio "Propagación modificado", con respecto a los medios tradicionalmente empleados para la inoculación de la soya. Diferentes variedades del cultivo, épocas de siembra y tipos de suelo, así lo demuestran.

El estudio económico, aunque preliminar, avala la utilización del nuevo medio que además de superar al medio tradicional en multiplicación celular, producción de factores Nod, nodulación y rendimientos del cultivo, constituye una variante más económica.

6. CONCLUSIONES

1. Los estudios morfológicos - culturales y moleculares demostraron que la cepa ICA 8001 debe ser reubicada taxonómicamente en la especie *Bradyrhizobium elkanii* (Kuykendall, 1992).
2. La utilización en el medio de cultivo para *Bradyrhizobium* de la semilla de soya molinada y la melaza, produce diferentes perfiles de los factores de nodulación. La extracción acuosa de los inductores en la soya molinada ofrece resultados satisfactorios en la síntesis de estas biomoléculas.
3. En el perfil de factores Nod producido por *Bradyrhizobium*, influyen el tipo de inductor, su concentración en el medio de cultivo y la cepa en particular.
4. El tratamiento con enzimas carbohidrasas en la semilla de soya molinada provoca una disminución en su efecto inductor.
5. La adición de la genisteína como amplificador de la inducción de los genes *nod* en *Bradyrhizobium*, cuando existen inductores fuertes en el medio, influye negativamente sobre la producción de los factores Nod.
6. Se obtuvo un nuevo medio de cultivo para *Bradyrhizobium* con el que se alcanzan niveles superiores en la formación de factores de nodulación, la producción de nódulos y los rendimientos del cultivo de la soya. La composición del mismo es: semilla de soya molinada (10,0 g·L⁻¹); melaza (5,0 g·L⁻¹); (NH₄)₂ SO₄ (0,5 g·L⁻¹); K₂HPO₄ (0,5 g·L⁻¹); MgSO₄·7H₂O (0,2 g·L⁻¹); NaCl (0,1 g·L⁻¹) y CaCO₃ (1,0 g·L⁻¹).

7. RECOMENDACIONES

7. Caracterizar los elementos con poder inductor de la síntesis de los factores de nodulación en la semilla de soya y la melaza.
8. Realizar el fraccionamiento e identificación molecular de los factores Nod producidos por *B. elkanii* y determinar su actividad biológica.
9. Evaluar la efectividad del medio “Propagación modificado” con otras cepas aisladas en diferentes condiciones edafoclimáticas y otras variedades de soya.
10. Optimizar el medio de cultivo “Propagación modificado” y extender su utilización en la bioinoculación del cultivo de la soya.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdala, M. H. (1994). Some phenolic compounds enhance nodulation and nitrogen fixation in a soybean-*Bradyrhizobium japonicum* system. **Phyton-Annales Rei Botanicae** **33**: 249-256.

Aiba, S.; Humphrey, A. E. y Millis, N. F. (1973). BIOCHEMICAL ENGINEERING. Capítulo Cinética. Academic Press. New York and London. 92-127.

Adler, J. 1969. Chemoreceptors in bacteria. **Science** **166**: 1588-1597.

Anónimo. (2002). DATOS Y HECHOS ACERCA DE LA PROTEÍNA DE SOYA. <http://www.aces.uiuc.edu/asamex/hechos.html>. Diciembre/2002.

Arias, A.; Gardiol A. y Martínez-Drets. (1982). Transport and catabolism of D-mannose in *Rhizobium melliloti*. **J. of Bacteriol.**, **151**(3). Pp. 1069-1072.

Atkins, C. A. (1984). Efficiencies and inefficiencies in the legume/*Rhizobium* symbiosis. A review. **Plant and Soil** **82**: 273-284.

Atlas, R. M. (1993). "Handbook of Microbiological Media". Edt. Parks, LC. CRC Press. Boca de Raton.

Badenoch-Jones, J.; Summons, R.; Djordjevic, M.; Shine, J. y Rolfe, B. (1982). Mass spectrometric quantification of indole-3-acetic acid in *Rhizobium* culture supernatants: Relation to root hair curling and nodule initiation. **Appl. Environ. Microbiol.** **44**: 275-280.

Baron, C. y Zambryski, P. C. (1995). The plant response in pathogenesis, symbiosis, and wounding: Variations on a common theme? **Ann. Rev. Genet.** **29**: 107-129.

Barrera, L.; Trujillo, M.; Goodfellow, M.; García, F.; Hernández-Lucas, I.; Dávila, G.; Van Berkum, P. y Martínez-Romero, E. (1997). Biodiversity of Bradyrhizobia Nodulating *Lupinus* spp. **International Journal of Systematic Bacteriology**. p. 1086-1091.

Bassier, B. L. (1999). How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. **Curr. Op. Microbiol.** **2**: 582-587.

Becana, M.; Dalton, D. A.; MoranIturbe-Ormaetxe, J. F.; Matamoros, M. A. y Rubio, M. C. (2000). Reactive oxygen species and antioxidants in legume nodules. **Physiol. Plantarum** **109**: 372-381.

Becker, A. y Pühller, A. (1998). Production of Exopolysaccharides. Pages 97-118 in: The *Rhizobiaceae*, molecular biology of model plant-associated bacteria. H. P. Spaink, A. Kondorosi, and P. J. J. Hooykaas, eds. Kluwer academic Publishers, Dordrecht.

Bécquer, C. J. (1998). Diversidad genética y posición taxonómica de rizobios, aislados de leguminosas forrajeras nativas en Sancti-Spiritus, Cuba. Tesis de Maestría. Universidad de La Habana. 75 p.

Bécquer, C. J. (2002). Descripción y clasificación de rizobios: enfoque histórico, métodos y tendencias actuales. **Biología**. (en arbitraje).

Bécquer, C. J.; Prévost, Danielle y Prieto, A. (2000a). Caracterización fisiológica y bioquímica de rizobios, aislados de leguminosas forrajeras. **Biología 14**: 57-65.

Bécquer, C. J.; Prévost, Danielle; Cloutier, J. y Laguerre, Gisele. (2000b). Diversity of rhizobia isolated from forage legumes indigenous to Cuba. 17th North American Conference on Symbiotic Nitrogen Fixation. July 23-28, Québec, Canada. p. 25.

Bécquer, C. J.; Prévost, Danielle y Cloutier, J. (2002). Diversidad genética de rizobios, aislados de leguminosas forrajeras de Sancti-Spiritus. **Biología 16**:130-136.

Beijerinck, M. W. (1890). Künstliche infection von *Vicia faba* mit *Bacillus radicicola*: Ernährungsbedingungen dieser Bacterie. **Botanische Zeitung**. **48**: 837-843.

Beringer, J. E. J. (1974). R-factor in *Rhizobium leguminosarum*. **Gen. Microbiol.** **84**: 188-198.

Bernal, G.; Illanes, A. Ciampi, L. (2002). Isolation and partial purification of a metabolite from a mutant strain of *Bacillus sp.* Electronic Journal of Biotechnology ISSN: 0717-3458 [Vol. 5 No. 1, Issue of April 15, 2002.](#)

Beuerlein, J. (2001). Effect of Soybean Inoculation on Grain Yield in Ohio in 2001. <http://www.oardc.ohio-state.edu/soy2001/inoculationtrials.html>. Julio/2002.

Biart, J.; Serrano, R. y Conde, J. (1982). Estudio de las mieles finales de la caña de azúcar. Editorial Científico-Técnica. C. Habana. Cuba. 98 p.

Bladergroen, M. R. y Spaink, H. P. (1998). Genes and signal molecules involved in the rhizobia-*Leguminosae* symbiosis. **Curr. Opin. Plant Biol.** **1**: 353-359.

Bordeleau, L. M. y Prévost, Danielle. (1994). Nodulation and Nitrogen fixation in extreme environments. **Plant and Soil.** **161**: 115-125.

Bornemann, W. S. (1986). Effect of phenolics monomers on ruminal bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.** **52** (6): 1331.

Bowen, W.; Carroll, W.; Bransford, J. y S. Glenn. (1963). En: Microbiología General y Aplicada. Capítulo XV: Propagación industrial de microorganismos. Salvat Editors. Primera Edición, Barcelona, España. 185-196.

Breedveld, M. W. y Miller, K. J. (1998). Cell-surface beta-glucans. Pages 81-96 in: *The Rhizobiaceae*, molecular biology of model plant-associated bacteria. H. P. Spaink, A. Kondorosi, and P. J. J. Hooykaas, eds. Kluwer academic Publishers, Dordrecht.

Brewin, N. J. (1998). Tissue and cell invasion by *Rhizobium*: The structure and development of infection threads and symbiosomas. Pages 417-429 in: *The Rhizobiaceae*, molecular biology of model plant-associated bacteria. H. P. Spaink, A. Kondorosi, y P. J. J. Hooykaas, eds. Kluwer academic Publishers, Dordrecht.

- Brill, W. J.** (1977). Biological nitrogen fixation. **Scient. Amer.** **236** (3), 68-81.
- Burris, R. H.** y **Roberts, G. P.** (1993). Biological nitrogen fixation. **Annu. Rev. Nutr.** **13**: 317-335.
- Buttery, B. R.;** **Park, S. J.** y **Hume, D. J.** (1991). Potential for increasing nitrogen fixation in grain legumes. **Canadian Journal of Plant Science** **72**: 323-349.
- Carrao, M.** y **Gontijo, J.** (1995). La soja como alimento humano: calidad nutritiva, procesamiento y utilización. En: El cultivo de la soja en los trópicos: Mejoramiento y producción. Colección FAO: Producción y protección vegetal N° 27.
- Cárdenas, L.;** **Domínguez, J.;** **Quinto, C.;** **López-Lara, I.;** **Lugtenberg, B.;** **Spaink, H.;** **Rademaker, G.;** **Haverkamp, J.** y **Thomas-Oates, J.** (1995). Isolation, chemical structures and biological activity of lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals from *Rhizobium etli*. **Plant Molecular Biology** **29**: 453-464.
- Cárdenas, L.;** **Domínguez, J.;** **Santana, O** y **Quinto, C.** (1996). The role of *nodI* and *nodJ* genes in the transport of Nod metabolites in *Rhizobium etli*. **Gene** **173**: 183-187.
- Careaga, Z.** (1999). Producción de poliβhidroxibutirato en un medio simple por una cepa de *Rhizobium tropici*. Tesis de Diploma. Universidad de la Habana. 55p.
- Carlson, R. W.,** **Sanjuán, J.,** **Bhat, U. R.,** **Glushka, J.,** **Spaink, H. P.,** **Wijffjes, H. W.,** **van Brussel, A. N.,** **Stokkermans, T. J. W.,** **Peters, N. K.,** y **Stacey, G.** (1993). The structures and biological activities of the lipo-oligosaccharide nodulation signals produced by Type I and Type II strains of *Bradyrhizobium japonicum*. **J. Biol. Chem.** **268**: 18372-18381.
- Carlson, R. W.,** **Price, N. P.** y **Stacey, G.** (1994). The biosíntesis of rhizobial lipo-oligosaccharide nodulation signal molecules. **Molecular Plant-Microbe Interactions** **6**: 684-695.
- Cermola, M.,** **Fedorova, E.,** **Tate, R.,** **Riccio, A.,** **Favre, R.,** y **Patriarca, E. J.** (2000). Nodule invasión and symbiosome differentiation during *Rhizobium etli*-*Phaseolus vulgaris* symbiosis. **Mol. Plant-Microbe Interact.** **13**: 733-741.
- Colectivo de autores.** (1990). Manual de derivados de la caña de azúcar. Segunda edición. Colección GEPLACEA, GEPLACEA/PNUD, México D. F. P. 59-67.
- Colectivo de autores.** (1998). Manual Técnico: Cultivo y utilización de la soja en Cuba. Holguín, Cuba, noviembre de 1998.
- Collins, C. H.** Métodos microbiológicos. (1969). Ed. Acribia. p. 95.
- Corbera, J.** y **Hernández, A.** (1997). Evaluación de la asociación *Rhizobium*-MVA sobre el crecimiento y desarrollo del cultivo de la soja (*Glycine max* L. Merrill). **Cultivos Tropicales** **18**(1): 10-12.
- Corbera, J.** (1998a). Coinoculación *Bradyrhizobium japonicum*-micorriza vesículo-arbuscular como fuente alternativa de fertilización para el cultivo de la soja (*Glycine max* L. Merrill). **Cultivos Tropicales** **19**(1): 17-20.

Corbera, J. (1998b). Evaluación agronómica de la coinoculación de *Bradyrhizobium japonicum* y Micorrizas arbusculares en el cultivo de la soya (*Glycine max* (L.) Merrill). Tesis presentada en opción al título académico de Maestro en Ciencias en Nutrición de las plantas y Biofertilizantes. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, 63 p.

Cueto, I. (1977). Informe sobre el mejoramiento de la soya. INIFAT. Academia de Ciencias de Cuba. (Informe de Archivo).

Cullimore, J. V., Ranjeva, R., y Bono, J. J. (2001). Perception of lipo-chitooligosaccharidic Nod factors in legumes. **Trends Plant Sci.** **6**: 24-30.

Dakora, F. D. (1995). Plant flavonoids: Biological molecules for useful exploitation. **Australian J. Plant Physiol.** **22**: 87-99.

Dakora, F. D. y Keya, S. O. (1997). Contribution of legume nitrogen fixation to sustainable agriculture in sub-Saharan Africa. **Soil Biol. Biochem.** **29**, 809-817.

Daneshvar, M., Hollis, D., Steigerwalt, A., Whitney, A., Spangler, L., Douglas, M., Jordan, J., Macgregor, J., Hill, B., Tenover, F., Brenner, D. y Weyant, R. (2001). Assignment of CDC Weak Oxidizer Group 2 (WO-2) to the Genus *Pandoraea* and Characterization of Three New *Pandoraea* Genomespecies. **Journal of Clinical Microbiology.** **5**: 1819-1826.

Davis, E. O. y Johnston, A. W. B. (1990). Regulatory functions of the 3 *nodD* genes of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. **Mol. Microbiol.** **4**: 933-941.

Day, R. B.; Loh, J.; Cohn, J. R. y Stacey, G. (2000). Signal exchange involved in the establishment of the *Bradyrhizobium*-legume symbiosis. In Prokaryotic Nitrogen Fixation, a Model System for the Analysis of a Biological Process. Triplet, E., (ed.) Norfolk, UK: Horizon Scientific Press, pp. 385-414.

Debellé, F., C. Plazanet, P. Roche, C. Pujol, A. Savagnac, C. Rosenberg, J.-C. Promé, y J. Dénarié. (1996). The NodA proteins of *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium tropici* specify the N-acylation of Nod factors by different fatty acids. **Mol. Microbiol.** **22**: 303-314.

De Jong, A., Heidstra, R., Spaink, H., Hartog, M., Meijier, E., Hendriks, T., Schiavo, F., Terzi, M., Bisseling, T., Van Kammen, A. y de Vries, S. (1993). *Rhizobium* Lipooligosaccharides Rescue a Carrot Somatic Embryo Mutant. **The Plant Cell** **5**, 615-620.

de Lajudie, P., Willems, A., Pot, B., Dewettinck, D., Maestrojuan, G., Neyra, M., Collins, M. D., Dreyfus, B., Kesters, K. and Gillis, M. (1994). Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. Nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.** **44**: 715-733.

de Lajudie, P., Laurent-Fulele, E., Willems, A., Torck, U., Coopman, R., Collins, M. D., Kersters, K., Dreyfus, B., y Gillis, M. (1998). *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. **Int. J. Syst. Bacteriol.** **48** : 1277-1290.

- DeLong**, M. M.; Oelka, E. A.; Onischak, M.; Schmid, M. R. y Wiant, B. C. (1995). Sustainable biomass energy production and rural economic development using alfalfa as a feedstock, in Proc. Second Biomass Conf. Americas, pp. 1582-1592, National Renewable Energy Laboratory, Department of Energy, Publication NREL/CP-200-8098.
- Dénarié**, J.; Debellé, F. y Rosenberg, C. (1992). Signaling and host range variation in nodulation. **Annu. Rev. Microbiol.** **46**: 497-531.
- Dénarié**, J.; Deballé, F. y Promé, J.C. (1994). *Rhizobium* lipochitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. **Ann. Rev. Biochem.** **65**: 503-535.
- Dénarié**, J., Debellé, F., y Promé, J. C. (1996). *Rhizobium* lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signalling molecules mediating recognition and morphogenesis. **Ann Rev Biochem** **65**: 503-535.
- Dharmatilake**, A. J. y Bauer, W. D. (1992). Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* towards nodulation gene-inducing compounds from alfalfa roots. **App. Environ. Microbiol.** **58**: 1153-1158.
- Díaz**, H. (1992). El cultivo de la soya para granos y forrajes. CIDA. La Habana. 16 p.
- Díaz**, H. (1996). El cultivo de la soya en Cuba. Realidades y perspectivas. En: Memoria Primer Taller Nacional de Soya. La Habana. p. 16-18.
- Díaz**, H.; Velásquez, O.; Busto, I.; Díaz, M.; Uranga, H.; Castro, S.; González, J.; López, M.; García, O. y Placencia, A. (1994). Obtención y desarrollo de variedades cubanas de soya en el INIFAT (1904-1994). En: Fundora, Z.; R. Martínez, y A. Méndez (eds.), 90 años de la Estación Experimental Agronómica de Santiago de las Vegas. p. 33-56. La Habana. Editorial Academia.
- Dombrecht**, B. (2001). The complex regulation and role of the *Rhizobium etli* Rpon regulon in the symbiotic interaction with the common bean plant (*Phaseolus vulgaris* L.). **Dissertaciones de Agricultura**. December 2001. 151 p.
- Downie**, J. A. (1998). Functions of rhizobial nodulation genes. Pages 403-416 in: The *Rhizobiaceae*, molecular biology of model plant-associated bacteria. H. P. Spaink, A. Kondorosi, y P. J. J. Hooykaas, eds. Kluwer academic Publishers, Dordrecht.
- Downie**, J. A. y Walker, S. A. (1999). Plant responses to nodulation factors. **Curr. Opin. Plant Biol.** **2**: 483-489.
- Elkan**, G. H. y Kuykendall, L. D. (1981). Carbohydrate metabolism. In Nitrogen fixation. Vol. II. Edited by Oxford University Press, London.. pp.147-166.
- Esquivel**, M.; Segura, D.; Andérez, M.; Pargas, A.; Coello, E.; Concepción, A. Y Domínguez, R. (1998). Generalización del cultivo y utilización de la soya en la provincia de Holguín. XII Forum de Ciencia y Técnica. Inédito. 24 p.

Estación Experimental Agronómica de Santiago de las Vegas. Cuba (1905). Primer informe anual. La Habana: Imp. La Propagandista. 360 p.

FAO. (1985). Les inoculums de légumineuses et leurs applications. Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture. Roma, 1985. 63 p.

Federación Agraria Argentina. (1996). Soja. Análisis sectorial. **Síntesis Agroeconómica 50:** 11-12.

Fernández-López, M., W. D'Haese, P. Mergaert, C. Verplancke, J.-C. Promé, M. van Montagu, y M. Holsters. (1996). Role of *nodI* and *nodJ* in lipochitooligosaccharide secretion in *Azorhizobium caulinodans* and *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol. 20:** 993-1000.

Frank, B. (1889). Über die Pilzsymbiose der Leguminosen. Ver. Deut. **Bot. Gesell. 7:** 332-346.

Fred, E. B.; Baldwin, I. L.; McCoy, E. (1932). Root nodule bacteria and leguminous plants. Madison, W. I. University of Wisconsin.

Frink, C. R., Waggoner, P. E., y Ausubel, J. H. (1999). Nitrogen fertilizer: retrospect and prospect. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:** 1175-1180.

Frioni, L. (1990). **ECOLOGÍA MICROBIANA DEL SUELO.** Universidad de la República. Departamento de Publicaciones y Ediciones. Colección Reencuentro/8. Capítulo 10. Páginas 205-253. Impreso en los talleres gráficos de Comunidad del Sur-Edinor. Montevideo. 1990. Depósito legal No. 225.493/90.

Fundacao Cargill. (1983). Origem da especie, introducao e disseminacao no Brasil. Pag. 3-10 en: Soja. **Planta, clima, pragas, molestias e invasoras. Vol 1.** 463 pp.

Gagnon, H. e Ibrahim, R. K. (1998). Aldonic Acids: A novel family of nod gene inducers of *Mesorhizobium loti*, *Rhizobium lupini*, and *Sinorhizobium meliloti*. **Mol. Plant. Microbe Interaction 11:** 988-998.

Galloway, J. N. (1998). The global nitrogen cycle: changes and consequences. **Environ. Pollut. 102:** 15-24.

Gao, M., D'Haese, W., De Rycke, R. Y Holsters, M. (2001). Dual control of the *nodA* operon of *Azorhizobium caulinodans* ORS 571 by a nod box and a Nif A-sigma-54-type promoter. **Mol. Genetic. Genomics 265:** 1050-1059.

Geremia, R. A.; Mergaert, P.; Geelen, D.; van Montagu, M. y Holsters, M. (1994). The Nod C protein of *Azorhizobium caulinodans* is an N-acetylglucosaminyltransferase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:** 2669-2673.

Giller, K. E. (2001). Nitrogen Fixation in Tropical Cropping Systems. CABI Publishing.

Giorda, L. y Baigorri, H. (1997). Editores de **EL CULTIVO DE LA SOJA EN ARGENTINA.** Colectivo de autores. INTA. Centro Regional Córdoba. EEA Marcos Juárez-EEA Manfredi. Coordinación Subprograma Soja. SIN: 0329-0077.

Gómez, R.; Fernández, F.; Dominic, María E.; Martínez, M.; Pino, María de los A.; de la Noval, Blanca; Corbera, J. y Cabrera, G. (1996). Principales resultados en la aplicación de biofertilizantes en cultivos de interés económico para Cuba, utilizando la Tecnología de Recubrimiento de Semillas. Programa y Resúmenes X Seminario Científico. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. La Habana. p. 87-89.

González, N. S. (1994). Dinámica de la fijación de nitrógeno en soya, en suelos con alta fertilidad nitrogenada. Tesis de Maestría. Programa de Post-grado en Producción Vegetal. Fac. de Ciencias Agrarias. U. N. De Mar del Plata.

Gurusiddaiah, S. y Singh, S. (1988). **United States Patent 4,759,928**.

Graham, P. H., 1975. Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants. Nutman (ed.), Cambridge Univ. Press.

Graham, P. H., (1981). Some problems of nodulation and symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L.: a review. **Field Crops Res.** **4**, 93-112.

Hadri, A. E. y Bisseling, T. (1998). Responses of the plant to Nod factors. Pages 1102-1156 in: *The Rhizobiaceae, molecular biology of model plant-associated bacteria*. H. P. Spaik, A. Kondorosi, and P. J. J. Hooykaas, eds. Kluwer academic Publishers, Dordrecht.

Hanway, J. J. y Weber, C. R. (1971). N, P and K percentages in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) plant parts. **Agron. J.** **63**: 286-290.

Hasler, C. M. (1998). Soy and Human Health. <http://www.ag.uiuc.edu/cgi-bin/>. Octubre/2002.

Hauck, R. D. (1985). Agronomic and technological approaches to improving the efficiency of nitrogen use by crop plants. Pp. 317-326. In K. A. Malik, S. H. M. Naqvi, and M. I. H. Aleem (eds.), *Nitrogen and the environment*. Nuclear Institute for Agriculture and Biology, Faisalabad, Pakistan.

Heidstra, R., Yang, W., Yalcin, Y., Peck, S., Emons, A., Van Kammen, A. y Bisseling, T. (1997). Ethylene provides positional information on cortical cell division but is not involved in Nod factor-induced root hair tip growth in *Rhizobium*-legume interaction. **Development** **124**, 1781-1787.

Hellriegel, H. y Wilfarth, H. (1888). Untersuchungen über die Stickstoff-Nahrung der gramineen und Leguminosen. Beilageheft zu der Zeitschrift des Vereins der Rübenezucker-Industrie Deutschen Reiche. November 1888, pp. 1-234.

Herald, P. y Davidson, P. (1983). Antibacterial activity of selected hydroxycinnamic acids. **J. Food Sci.** **48**: 1378.

Hernández, A., Pérez, U., Bosch, D. y Rivero, L. (1999). Nueva Versión de Clasificación Genética de los Suelos de Cuba. Instituto de Suelos, AGRINFOR, La Habana, 64 p.

Herrera, A. (1985). Manual de medios de cultivo. Editorial Científico-Técnica. Ministerio de Cultura. C. Habana. Cuba.

Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H., Staley, J. T. y Stanley, T. W. (1994). **BERGEY'S MANUAL OF BACTERIOLOGY**. 9na edición. Williams and Wilkins. 428 East Preston Street, Baltimore. Maryland 21202, USA.

Hume, O.; Feindel, D. E.; Winter, J. P.; Blair, D. y Pararajasingham, S. (1989). Assimilate partitioning in soybean. Pag. 177-182 *in*: Proceedings 1 of the World Soybean Research Conference IV. A. J. Pascale, ed. Orientación Gráfica Editora S.R.L. Buenos Aires. Argentina. 1605 pp.

Hungria, M. y Stacey, G. (1997). Molecular signals exchanged between host plants and rhizobia: basis aspects and potential application in agriculture. **Soil Biol. Biochem.** **29**: 819-830.

Huisman, M.; Schols, M. H. A. y Voragen, A. G. J. (1998). Cell wall polysaccharides from soybean (*Glycine max.*) meal. Isolation and characterization. **Carbohydr Polymers** **37**: 87-95.

Hymowitz, T. y Singh, R. J. (1987). Taxonomy and speciation. Pag 23-48 *in*: Soybeans: improvement, production and uses. 2nd. ed. J. R. Wilcox, ed. Am. Soc. Of Agron. Madison. Wisconsin. EE.UU. 888 pp.

Jackson, M. L. (1970). **ANÁLISIS QUÍMICO DE SUELOS**. Edición Revolucionaria. La Habana. Cuba. 662p.

Jain, D. K.; Prévost, Danielle y Bordeleau, L. M. (1990). Role of bacterial polysaccharides in the derepression of *ex-planta* nitrogenase activity with rhizobia. **FEMS Microbiology Ecology.** **73**:167-174.

Jordan, D. C. (1982). Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. **Int. J. Syst. Bacteriol.** **32**, 136-139.

Jordan, D. C. y Allen, O. N. (1980). Genus *Rhizobium* Frank. In: Buchanan and Gibson (ed.), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th de. The Williams and Wilkins Co.; Baltimore. pp. 128-129.

Jordan, D. C. (1984). Genus II. *Bradyrhizobium* Jordan 1984, 137^{VP}, p. 242. *In* . N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md.

José, I., Chiari, L., Piovesan, N., Barros, E. y Moreira, M. (2002). Correlações entre teores de isoflavonas e de proteína e óleo de sementes de soja. Resumos do II Congresso Brasileiro de soja e Mercosoja 2002.

Kaminski, P. A., Batut, J., y Boistard, P. (1998). A survey of symbiotic nitrogen fixation by rhizobia. Pages 431-460 *in*: *The Rhizobiaceae*, molecular biology of model plant-associated bacteria. H. P. Spaink, A. Kondorosi, and P. J. J. Hooykaas, eds. Kluwer academic Publishers, Dordrecht.

- Kamst**, E.; Pilling, J.; Raamsdonk, L. M.; Lugtenberg, B. J. J. y Spaink, H. P. (1997). *Rhizobium* nodulation protein NodC is an important determinant of chitin oligosaccharide chain length in Nod factor biosynthesis. **J. Bacteriol.** **179**: 2103-2108.
- Kamst**, E.; Bakkers, J.; Quaedvlieg, N. E.; Pilling, J.; Kijne, J. W.; Lugtenberg, B. J. J. y Spaink, H. P. (1999). Chitin oligosaccharide synthesis by rhizobia and zebrafish embryos starts by glycosyl transfer to O4 of the reducing-terminal residue. **Biochemistry** **38**: 4045-4052.
- Kannenberg**, E. L., Reuhs, B. L., Forsberg, L. S., y Carlson, R. W. (1998). Lipopolysaccharides and K-antigens: Their structures, biosynthesis and functions. Pages 119-154 in: *The Rhizobiaceae*, molecular biology of model plant-associated bacteria. H. P. Spaink, A. Kondorosi, and P. J. J. Hooykaas, eds. Kluwer academic Publishers, Dordrecht.
- Kape**, R. ; Parniske, M. y Werner, D. (1991). Chemotaxis and *nod* gene activity of *B. japonicum* response to hydroxycinnamic acids and isoflavonoids. **Appl. Environ. Microbiol.** **57**: 316-319.
- Kapteyn**, J. C. (1999). The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. **Biochimica et Biophysica Acta** **1426** : 373-383.
- Kosslak**, R. M.; Bookland, R.; Barkei, J.; Paaren, H.; y Appelbaum, E. R. (1987). Induction of *Bradyrhizobium japonicum* common *nod* genes by isoflavones isolated from *Glycine max*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **84**: 7428-7432.
- Krasova-Wade**, T.; Ndoye, I.; Braconnier, S.; Sarr, B.; de Lajudie, P. y Neyra, M. (2003). Diversity of indigenous bradyrhizobia associated with three cowpea cultivars (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) grown under limited and favorable water conditions in Senegal (West Africa). **African Journal of Biotechnology** **1**: 1322-1332.
- Kuykendall**, L. D; Roy, M. A.; O'Neill, J. J. y Devine, T. E. (1988). Fatty acids, antibiotic resistance, and deoxyribonucleic acid homology groups of *Bradyrhizobium japonicum*. **Int. J. Syst. Bacteriol.** **38**: 358.
- Kuykendall**, L. D., Saxena, B.; Devine, T. E. y Udell, S. E. (1992). Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. **Can. J. Microbiol.** **38**: 501-505.
- Lacasa**, A. (1990). Utilidad de la torta y proteína de soya en la alimentación animal y humana. Centro de Información y Documentación Agropecuario. Edición y Distribución. Ministerio de la Agricultura. Ciudad de la Habana.
- Laeremans**, T. (1998). The role of the Nod factor sulphation genes in the *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* (L.) interaction. Tesis Doctoral. **Dissertationes de Agricultura**. Abril 1998. 142p.
- Laeremans**, T. y Vanderleyden, J. (1998). Infection and nodulation signalling in *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis. **World J. Microbiol. Biotech.** **14**: 787-808.

- Laeremans**, T., Coolsaet, N., Verreth, C., Snoeck, C., Hellings, N., Vanderleyden, J. y Martínez-Romero, E. (1998). Functional redundancy of genes for sulphate activation enzymes in *Rhizobium* sp. BR 816. **Microbiology**, **143**: 3933-3942.
- La Favre**, A.; Sinclair, M. J.; La Favre, J. S. y Eaglesham, A. R. J. (1991). *Bradyrhizobium japonicum* native to tropical soils: novel sources of strains for inoculants for US-type soybean. **Trop. Agric. (Trinidad)**. **68**:243-248.
- La Favre**, J. S. y Eaglesham, A. R. J. (1986). Rhizobiotoxine: a phytotoxin of unknown function which is commonly produced by bradyrhizobia. **Plant Soil**. **92**: 443-452.
- Laguerre**, G., Allard, M.R., Revoy, F. y Amarger, N. (1994). Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. **Appl. Environ. Microbiol.** **60**: 56-63.
- Laguerre**, G.; Van Berkum, P; Amarger, N. and Prévost, D. (1997). Genetic diversity of rhizobial symbionts isolated from legume species within the genera *Astragalus*, *Oxytropis* and *Onobrychis*. **Appl. Env. Microbiol.** **63**: 4748-4758.
- Laguerre**, G.; Nour, S.; Macheret, V.; Sanjuan, J.; Drouin, P. y Amarger, N. (2001). Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. **Microbiology** **147**: 981-993.
- Lasala**, F. (2000). *Mesorhizobium plurifarum*, una nueva especie productora de polihidroxialcanoatos (PHAs): estudio de la síntesis a escala de zaranda. Tesis de Maestría. Universidad de la Habana. 60p.
- Lee**, S. Y. (1996). Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. **Trends Biotechnol.** **14**: 98-105.
- Leyva**, A. y Pohlan, J. (1987). Problemática y posibilidades de utilización del cultivo de la soya en áreas que se dedican a la caña de azúcar. Reseña. INCA. La Habana. 20 p.
- Lipke**, P. N. y Ovalle, R. (1998). Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. **Journal of Bacteriology** **180 (15)**: 3735-3740.
- Loh**, J.; Yuen-Tsai, J.; Stacey, M.; Dasharath, L.; Welborn, A. y G. Stacey. (2001). Population density-dependent regulation of the *Bradyrhizobium japonicum* nodulation genes. **Molecular Microbiology**. **42**: 37-46.
- Long**, S. R. (1996). *Rhizobium* symbiosis: Nod factors in perspective. **Plant Cell** **8**: 1885-1898.
- Long**, S. R. (2001). Genes and Signals in the *Rhizobium*-Legume Symbiosis. **Plant Physiol**: **125**: 69-72.
- López**, M. (1990). Manual de Tecnologías de Producción del biofertilizante Bio-Rhizo. La Habana: Empresa Cubana de Productos Veterinarios Cuba-Vet. Instituto de Ciencia Animal, Instituto de Investigaciones Pastos y Forrajes.

- López, M.** (1996). Aportes de la FBN en el desarrollo de la soya en Cuba. En: Memorias XVIII Reunión Latinoamericana de Rhizobiología. Sta Cruz de la Sierra. Bolivia. p.387-388.
- López, M.** y Pijeira, L. (1996). Requerimientos nutricionales para la soya en Cuba. La Habana. p. 31-35.
- López-Lara, I.;** Van den Berg, J.; Thomas-Oates, J.; Glushka, J.; Lugtenberg, B. y Spaink, H. (1995). Structural identification of the lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals of *Rhizobium loti*. **Molecular Microbiology** **15**: 627-638.
- Luyten, E.** y Vanderleyden, J. (2000). Survey of genes identified in *Sinorhizobium meliloti* spp., necessary for the development of an efficient symbiosis. **Eur. J. Soil Biol.** **36**: 1-26.
- Madigan, M. T.** Martinko, J. M. y Parker, J. (2003). BROCK BIOLOGY OF MICROORGANISMS. Tenth Edition. Prentice Hall. Pearson Education, Inc. NJ.
- Mannion, A. M.** (1998). Future trends in agriculture: the role of biotechnology. **Outlook on Agriculture** **27**, 219-224.
- Martínez, E.** y Caballero-Mellado, J. (1996). *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity. **Critical Reviews in Plant Sciences** **15 (2)**: 113-140.
- Medina, N.** (1980). Efectos de la acidez del suelo y su enmienda sobre la producción de la caña de azúcar (*Saccharum* sp.) en dos suelos ferralíticos. Tesis de Doctorado. INCA. 89 p.
- Michiels, J.,** Dombrecht, B., Vermeiren, N., Xi, C. W., Luyten, E. y Vanderleyden, J. (1998). *Phaseolus vulgaris* is a non-selective host for nodulation. **FEMS Microbiol. Ecol.** **26**: 193-205.
- Minami, E.,** Kouchi, H., Carlson, R. W., Cohn, J. R., Kolli, V. K., Day, R. B., Ogawa, T., y Stacey, G. (1996). Cooperative action of lipo-chitin nodulation signals on the induction of the early nodulin, ENOD2, in soybean roots. **Mol Plant-Microbe Interact** **9**: 574-583.
- Monod, J.** (1949). The growth of bacterial cultures. **Ann Review of Microbiol.** **3**. p 371.
- Muller, T.** (1955). El cultivo del frijol soya. La Habana. Estación Experimental Agronómica de Santiago de las Vegas. 12 p.
- Mulligan, J. M.** y Long, S. R. (1985). Induction of *Rhizobium meliloti* nod C expresión by plant exudate requires nod D. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **82**: 6609-6613.
- Niner, B. M.** y Hirsch, A. M. (1998). How many *Rhizobium* genes, in addition to *nod*, *nif/fix*, and *exo*, are needed for nodule development and function? **Symbiosis** **24**: 51-102.
- Norris, D.O.** y Date, R.A. (1976). Legume bacteriology Tropical Pasteur Research. Principles and Methods. **C.A.B. Bill** **51**:134-174.
- Oke, V.** y Long, S. R. (1999). Bacteroid formation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. **Curr. Opin. Microbiol.** **2**: 641-646.

- Oniani, O.** (1964). Apridilenie podvishni svedinieni fosfora i Kalia is adnoi bitiashti is krasnosiomnij i podsolisty pochv Gruzii. **Agrojimia** 6: 33-45.
- Owen, L. D.** y **Wright, D. A.** (1965). Rhizobial-induced chlorosis in soybeans: isolation, production in the nodule, and varietal specificity of the toxin. **Plant Physiol.** 40: 927-930.
- Pan, B.;** Zhang, F. y **Smith, D. L.** (1998). Genistein addition to the rooting medium of soybean at the onset of nitrogen fixation increases nodulation. **Journal of Plant Nutrition.** 21(8), 1631-1639.
- Parker, M. A.** (1999). Relationships of Bradyrhizobia from the legumes *Apios americana* and *Desmodium glutinosum*. **Applied and Environ. Microbiol.** 11:4914-4920.
- Parker, M. A.** y **Lunk, A.** (2000). Relationships of bradyrhizobia from *Platypodium* and *Machaerium* (Papilionoideae: tribe Dalbergiae) on Barro Colorado Island, Panama. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 50:1179-1186.
- Pascale, A. J.** (1989). Evolución del cultivo de la soja en Argentina. **Revista de la Asociación Argentina de la Soja. Vol IX (1-2):** 9-17.
- Pérez, R.** (1995a). El frijol de soja y una planta acuática, Lemna para alimentar peces. Carta Agropecuaria Azucarera. No. 95.3.
- Pérez, R.** (1995b). El forraje verde del frijol de soja como fuente proteica. Carta Agropecuaria Azucarera. No. 95.5.
- Pérez, R.** (1996a). Manejo y alimentación de gallinas con recursos locales. Carta Agropecuaria Azucarera. No. 96.1.
- Pérez, R.** (1996b). Cómo cocinar el frijol de soja. Carta Agropecuaria Azucarera. No. 96.1.
- Pérez, R.** y **Rábago, R.** (1992). Manual de la soja. Dpto. Producciones complementarias. La Habana, MINAZ. 19 p.
- Perret, X.;** Stahelin, C. y **Broughton, W.** (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. **Microbiol. and Molecular Biology Reviews.** 64(1): 180-201.
- Peters, N. K.** y **Verma, D. P. S.** (1990). Phenolic compounds as regulators of gene expression in plant-microbe interactions. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 3: 4-8.
- Pijeira, L.;** Treto, E., **Corbera, J.;** Mederos, J. Y **Medina, N.** (1996). Estudio sobre la nutrición de la soja en Cuba y su respuesta a la biofertilización. En: Memorias XVIII Reunión Latinoamericana de Rhizobiología. Sta Cruz de la Sierra. Bolivia. p 105-106.
- Piper, C. V.** y **Morse, W. J.** (1923). The soybean. Mc Graw-Hill. New York. EE. UU. 329 pp.
- Postgate, J. R.** 1982. The fundamentals of nitrogen fixation. Cambridge Univ. Press. Cambridge. 252 pp.
- Prévost, Danielle;** Bécquer, C. J.; **Cloutier, J.** y **Laguerre, Gisele.** (1998). Genetic diversity of rhizobia isolated from forage legumes *Neonotonia* and *Centrosema* spp., native to Cuba.

VIII International Symposium on Microbial Ecology (ISME-8), 9-14 August. Halifax, Canada. Poster N° 33.

Price, N. P. J., Relic, B., Talmont, F., Dénarié, J., Promé, J.-C., y Broughton, W. J. (1992). Broad-host-range *Rhizobium* species strains NGR234 secretes a family of carbamoylated, and fucosylated, nodulation signals that are O-acetylated or sulphated. **Mol Microbiol** **6**: 3575-3584.

Pueppke, S. G. y Broughton, W. J. (1999). *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. freddi* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. **Mol. Plant-Microbe Interact.** **12**: 293-318.

Quijano, A. Morandi, E. N.; Martignone, R. A. y Bodrero, M. L. (1995). Efecto de la época de siembra y de la disponibilidad hídrica sobre la acumulación y partición de nitrógeno en soya. Cap. II. Pag. 249-253 en: Primer Congreso Nacional de Soja y Segunda Reunión Nacional de Oleaginosos. AIANBA, ed. Pergamino. Bs. As. Argentina. 168 p.

Quispel, A. (1998). Evolutionary aspects of symbiotic adaptations, *Rhizobium's* contribution to evolution by association. Pages 487-507 in: The *Rhizobiaceae*, molecular biology of model plant-associated bacteria. H. P. Spaik, A. Kondorosi, and P. J. J. Hooykaas, eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Radio Reloj Internet. (2001). Inauguró Fidel una planta procesadora de soya. <http://www.radioreloj.cu>. Octubre/2001.

Rao, J. R. y Cooper, J. E. (1995). Degradation and modification of *nod* gene-inducing flavonoids by rhizobia. In: Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications. p. 325. Tikhonovich, I.; Proorov, N. A.; Romanov, V. and Newton, W. E. Eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. The Netherlands.

Raper, C. D.(Jr.) and Kramer, P. J. (1987). Stress physiology. Pag. 589-641 in: Soybeans: improvement, production and uses. J. R. Wilcox, ed. Am. Soc. Of Agron. Madison. Wisconsin. EE.UU.

Relic, B., Perret, X., Estradarcía, M. T., Kopcinsca, J. y Golinowski, W. (1994). Nod factors of *Rhizobium* are the key to the legume door. **Mol. Microbiol.** **13**: 171-78.

Rolfe, B. G. (1998). Flavones and isoflavones as inducing substances of legume nodulation. **Biofactors** **1**: 3-10.

Röhrig, H., Schmidt, J., Wieneke, U., Kondorosi, E., Barlier, I., Schell, J. y John, M. (1994). Biosynthesis of Lipooligosaccharide Nodulation Factors: *Rhizobium* NodA Protein is Involved in N-Acylation of the Chitooligosaccharide Backbone. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **91**, 3122-3126.

Sadowsky, M. J. y Graham, P. H. (1998). Soil biology of the *Rhizobiaceae*. Pages 155-172 in: The *Rhizobiaceae*, molecular biology of model plant-associated bacteria. H. P. Spaik, A. Kondorosi, and P. J. J. Hooykaas, eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Sambrook, J.; Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor. N.Y.

Sanger, F; Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 74: 5463-5467.

San Juan, J.; Grob, P.; Göttfert, M.; Hennecke, H. y Stacey, G. (1994). NodW is essential for full expression of the common nodulation genes in *Bradyrhizobium japonicum*. **MPMI** 7(3): 364-369.

Santos, R., Herouart, D., Sigaud, S., Touati, D. y Puppo, A. (2001). Oxidative burst in alfalfa-*Sinorhizobium meliloti* symbiotic interaction. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 14: 86-89.

Scholla, M. H. y Elkan, G. H. 1984. *Rhizobium fredii* sp. Nov., a fast-growing species that effectively nodulates soybeans. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 34, 484-486.

Schlaman, H. R. M., Phillips, D. A. y Kondorosi, E. (1998). Genetic organization and transcriptional regulation of rhizobial nodulation genes. Pages 361-386 in: The *Rhizobiaceae*, molecular biology of model plant-associated bacteria. H. P. Spaink, A. Kondorosi, and P. J. J. Hooykaas, eds. Kluwer academic Publishers, Dordrecht.

Schmidt, J., Röhrig, H., John, M., Wieneke, U., Koncz, C., Gary, S. y Schell, J. (1993). Alteration of plant growth and development by *Rhizobium nodA* and *nodB* genes involved in the synthesis of oligosaccharide signal molecules. **Plant J.** 4 651-658.

Shimp, J. F.; Tracy, J. E.; Davis, L. C.; Lee, E.; Huang, W.; Erckson, L. E. y Schnoor, J. L. (1993). Beneficial Effects of Plants in the Remediation of Soil and Groundwater Contaminated with Organic Materials. **Crit. Rev. Envir. Sci. Technol.** 23, 41-47.

Sigarroa, A. (1985). BIOMETRÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL. Editorial Pueblo y Educación. Ciudad de la Habana.

Sinclair, T. R. y Wit, C. T. (1975). Comparative analysis of photosintate and N requirements in the production of seeds by various crops. **Science** 189: 565-567.

Sipos, E. (1990). Usos comestibles de la proteína de soja. **Soya Noticias** 220: 1-18.

Smith, G.; Puvanesarajah, V.; Carlson, R.; Barbour, W. y Stacey, G. (1992). *Bradyrhizobium japonicum nod D1* can be specifically induced by soybean flavonoids that do not induce the nod YABCSUIJ operon. **The Journal of Biological Chemistry** 267(1): 310-318.

Smith, K. (2001). Advances in Feeding Soybean Meal. <http://www.soymeal.org/ksmith1.html>. Marzo/2002.

Socolow, R. H. (1999). Nitrogen management and the future of food: lessons from the management of energy and carbon. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 96: 6001-6008.

Somasegaran, P; y Hoben, H. J. (1994). Handbook for rhizobia. Springer- Verlag, New-York. 441 p.

Spaink, H. P. (1995). The molecular basis of infection and nodulation by rhizobia: the ins and outs of sympathogenesis. **Ann. Rev.** 345-368.

- Spaink**, H. P. (1996). Regulation of plant morphogenesis by lipo-chitin oligosaccharides. **Critical Reviews in Plant Sciences 15(5y6)**: 559-582.
- 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. (1995). Host specificity of *Rhizobium leguminosarum* is determined by the hydrophobicity of highly unsaturated fatty acyl moieties of the nodulation factors. **MPMI 8(1)**: 155-164.
- Spaink**, H. P., Kondorosi, A., y Hooykaas, P. J. J. (1998). The *Rhizobiaceae*, molecular biology of model plant-associated bacteria. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Sprent**, J. I. (2001). Nodulation in legumes. **Royal Botanic Gardens, Kew**. 146 p.
- Stacey**, G.; Sanjuan, J.; Luka, S.; Dockendorff, T. y Carlson, R. W. (1995). Signal exchange in the *Bradyrhizobium*-soybean symbiosis. **Soil Biology and Biochemistry 27**, 473-483.
- Stacey**, G.; Day, R.; Cohn, J.; Koh, S.; McAlvin, C. y Loh, J. (1999). Nod Signal recognition. In Biology of Plant-Microbe Interactions. Vol. 2. Editado por de Wit, P.; Bisseling, T. Y Stiekema, W. Proceedings of the 9th International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions. Amsterdam, the Netherlands, July 25-30, 1999.
- Stackenbrandt**, E. y Goodfellow, M. (1991). Nucleic acid techniques in Bacterial Systematics. John Wiley and Sons, New York.
- Stahelin**, C., Granado, J., Müller, J., Wiemken, A., Mellor, R., Felix, G., Regenaas, M., Broughton, W. y Boller, T. (1994). Perception of *Rhizobium* nodulation factors by tomato cells and inactivation by root chitinases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 2196-2200.
- Stokkermans**, T. J. W., y Peters, N. K. (1994). *Bradyrhizobium elkanii* lipo-oligosaccharide signals induce complete nodule structures on Glycine soja. **Planta 193**: 413-420.
- Stokkermans**, T. J. W., Ron, O., Kumar, V. S., C. W. Rusell, y N. K. Peters. (1996). Biological activities and structures of *Bradyrhizobium elkanii* low abundance lipo-chitin-oligosaccharides. **Mol Plant-Microbe Interact 9**: 298-304.
- Stomp**, A. M.; Han, K. H.; Wilbert, S.; Gordon, M. P. y Cunningham, S. D. (1994). Genetic strategies for Enhancing Phytoremediation. In Recombinant DNA Technology II, **Ann. N. Y. Acad. Sci. 721**, 481-491.
- Stougaard**, J. (2000). Regulators and regulation of legume root nodule development. **Plant Physiol. 124**: 531-540.
- Teaney III**, G. B. y Fuhmann, J. J. (1993). Soybean response to nodulation by Rhizobitoxine-producing bradyrhizobia as influenced by nitrate application. **Plant and Soil. 154**: 219-225.
- Timmers**, A. C. J. ; Soupene, E. ; Auriac, M. C. ; de Billy, F. ; Vasse, J. ; Boistard, P. y Truchet, G. (2000). Saprophytic intracellular rhizobia in alfalfa nodules. **Mol. Plant-Microbe Interact. 13**: 1204-1213.

- Todar, K.** (2001). Nutrition and Growth of bacteria.
http://www.bact.wisc.edu/Bact303/NutritionandGrowth_Agosto/2002.
- van Berkum, P.;** Beyene, D. y Eardly, B. D. (1996). Phylogenetic relationships among *Rhizobium* species nodulating the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Int. J. Syst. Bacteriol.** **46**: 240-244.
- Vance, C. P.** (1998). Legume symbiotic nitrogen fixation: agronomic aspects: In: Spaik, H. P., et al. (Eds.). The Rhizobiaceae. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 509-530.
- Varela, I.** (2001). La Nación Digital _ dic. htm
<http://www.nacion.co.cr/dominical/2001/enero/07/dominical4.html>. **Diciembre/2002**.
- Velázquez, E.;** Martínez-Romero, E.; Rodríguez-Navarro, D.; Trujillo, M.; Daza, A.; Mateos, P.; Martínez-Molina, E. y van Berkum, P. (2001). Characterization of Rhizobial Isolates of *Phaseolus vulgaris* by Staircase Electrophoresis of Low-Molecular-Weight RNA. **Applied and Environmental Microbiology** **67** (2): 1008-1010.
- Venturi, G.** y Amaducci, M. T. (1985). La soja. Edagricole. Bologna. Italia. 255 pp.
- Vickery, M. L.** y Vickery, B. (1981). Secondary Plant Metabolism. Macmillan Press, London, United Kingdom.
- Vijn, I.,** das Neves, L., van Kammen, A., Franssen, H. y Bisseling, T. (1993). Nod factors and nodulation in plants. **Science** **260**: 1764-1765.
- Villar, C.** y Zúñiga, D. (1999). Microbial interaction between *Azotobacter* spp. and *Rhizobium* spp., and their influence on plant growth of clover associated to rye grass. En <http://www.ag.auburn.edu/argentina/pdfmanuscripts/villararteaga.pdf>. **Noviembre/2002**.
- Vincent, J.M.** (1970). A manual for the practical study of root-nodule bacteria/J.M. Vincent.- En: International Biological Programme Handbook. No. 15. Blackwele scientific publications, Oxford, England.
- Vincent, J. M.** (1977). *Rhizobium*: general microbiology. En A. Treatise on Dinitrogen Fixation, vol III (Biology), Hardy y Silver (eds.), Wiley and Sons, Nueva York, pp.227-354.
- Vitosh, M. L.** (2000). Soybean Inoculation In Michigan.
<http://www.msue.msu.edu/msue/imp/mods1/fact9708.html#TOC>. Julio/2002.
- Vlasaak, K. M.** y Vanderleyden, J. (1997). Factors influencing nodule occupancy by inoculant rhizobia. **Crit. Rev. Plant Sci.** **16**: 163-229.
- Waggoner, P. E.** (1994). How much land can ten billion people spare for nature? Council on Agricultural Science and Technology, **Report 121**, Ames, Ia.
- Wang, T.;** Wood, E. y Brewin, N. (1982). Growth regulators, *Rhizobium* y nodulation in peas: the cytokinin content of a wild type and a Ti-plasmid-containing strain of *R. leguminosarum*. **Planta** **155**: 350-355.
- Wang, E. T.;** van Berkum, P.; Beyene, D.; Sui, X. H.; Dorado, O.; Chen, W. X. y Martínez-Romero, E. (1998). *Rhizobium huatlense* sp. nov., a symbiont of *Sesbania herbacea* that

has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galegae*. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 48:687-699.

Weisburg, W. G.; Barns, S. M.; Pelletier, D. A. y Lane, D. J. (1991). 16 S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **J. Bacteriol.** 173: 697-703.

West, T. D. y Griffith, D. R. (1992). Effect of strip-intercropping Corn and Soybean on yield and profit. **Journal of Production Agricultural** 5, 107-110.

Whigham, K. (1994). Should soybeans be inoculated?
<http://www.ipm.iastate.edu/ipm/icm/1994/4-15-1994/inoculate.html>. Julio/2002.

Wicox, J. R. (1985). Soybeans protein and oil quality. Purdue University. W. Lafayette. Indiana. EE.UU.

Wisniewski, J. P., Rathbun, E. A., Knox, J. P. y Brewin, N. J. (2000). Involvement of diamine oxidase and peroxidase in insolubilization of the extracellular matrix: Implications for pea nodule initiation by *Rhizobium leguminosarum*. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 13: 413-420.

Xu, L. M. ; Ge, C. ; Cui, Z. ; Li, J. y Fan, H. (1995). *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 45: 706-711.

Young, J. P. W. (1996). Phylogeny and taxonomy of rhizobia. **Plant and Soil** 186: 45-52.

Young, J. P. W., y Haukka, K. E. (1996). Diversity and phylogeny of rhizobia. **New Phytol.** 133: 87-94.

Zhang, F. y Smith, D. L. (1998). Genistein addition to the rooting Medium of soybean at the onset of nitrogen fixation increases nodulation. **J. Plant Nutrition** 21: 1631-1639.

Zuberer, D. (1998). **PRINCIPLES AND APPLICATIONS OF SOIL MICROBIOLOGY.** Capítulo 13 de: Edited by David, M. Sylvia; Jeffry, J. Fuhrmann; Peter, G. Hartel and David, A. Zuberer. New Jersey. 295-321.

AUTOBIBLIOGRAFÍA

Artículos científicos:

- Comportamiento de una cepa de *Bradyrhizobium japonicum* en nuevos medios de cultivo que contienen inductores de la síntesis de los factores de nodulación. (1998). Cultivos Tropicales, 19 (1): 25-27. **María C. Nápoles**, A. Gutiérrez y M. Varela.
- Quimiotaxis de *Bradyrhizobium japonicum* ICA 8001 hacia ácidos orgánicos y exudados de semillas de soya. (1998). Cultivos Tropicales, 19 (2): 27-29. **María C. Nápoles**, A. Gutiérrez y M. Varela.
- The analysis of nodulation factors as a tool in the design of new culture media for *Bradyrhizobium japonicum*. (1999). Cultivos Tropicales 20 (2): 79-81. **María C. Nápoles**, A. Gutiérrez, T. Laeremans y J. Vanderleyden.
- Monografía: Desarrollo de tecnologías de biofertilización más eficientes a base de *Rhizobium* spp. mediante la inducción de la síntesis y excreción de los factores de nodulación. (2000). **María C. Nápoles**, J. Corbera, R. Iglesias, Inés Reinaldo, M. Varela, G. Hernández, R. Hernández y E. Bordallo. ICT-INCA.
- Evaluación agronómica de la coinoculación de *Bradyrhizobium japonicum* y hongos micorrizógenos arbusculares en el cultivo de la soya sobre suelo ferralítico rojo compactado. (2000). J. Corbera y **María C. Nápoles**. Cultivos Tropicales 21 (1): 21-25.
- Study of the inducer effect of some compounds on synthesis and excretion of nodulation factors in different strains of *Bradyrhizobium japonicum*. (2001). **María C. Nápoles**, J. C. Cabrera, Ellen Luyten, B. Dombrecht and J. Vanderleyden. Revista Latinoamericana de Microbiología. 43 (1): 7-11.
- The *Rhizobium etli* gene *iscN* is highly expressed in bacteroids and required for nitrogen fixation. (2002). B. Dombrecht, M. Z. Tesfay; Christel Verreth; C. Heusdens, **María Caridad Nápoles**; J. Vanderleyden and J. Michiels. Molecular Genetics and Genomics. 267: 820-828.
- Growth media modulates symbiotic efficiency of *Bradyrhizobium elkanii*. (2002). **María C. Nápoles**, T. Laeremans, Ellen Luyten, B. Dombrecht, J. Vanderleyden, A. Gutiérrez and J. Corbera. Enviado a la Revista Symbiosis.
- *Bradyrhizobium elkanii* ICA 8001 *gusA*: a new strain to evaluate the nodulation genes expression. (2003). **María C. Nápoles**, Ellen Luyten, B. Dombrecht y J. Vanderleyden. Cultivos Tropicales 24 (3): 33-37.
- *Rhizobium etli* *iscN* is highly expressed in bacteroids and required for nitrogen fixation. (2002). Dombrecht, B., Tesfay, M., Verreth, C., Heusdens, C., **Nápoles, M.**, Vanderleyden, J. And Michiels, J. Abstracts Volume, First International Conference on Legume Genomics and Genetics: Translation to Crop Improvement, June 2-6, Minneapolis-St. Paul, MN (US).

Patentes.

“Medio de cultivo para *B. japonicum*. Biopreparado resultante”. Certificado Nro. 22 797. Concedido por resolución No. 556/2002. **María C. Nápoles**, A. Gutiérrez y J. Corbera.

Eventos científicos.

- XI Forum de Ciencia y Técnica de Base y Municipal. (1996). “Efecto de nuevos medios de cultivo sobre la síntesis y excreción de los factores de nodulación en *B. japonicum*”. Premio Relevante y Destacado.
- X Seminario Científico INCA. (1996). “Diseño de nuevos medios de cultivo y formulado de Biofertilizantes manipulando la síntesis de los factores Nod en *B. japonicum*”.
- Evento por el 25 Aniversario de la estación Liliana Dimitrova. (1997). “Nuevos biopreparados a base de *B. japonicum*”.
- XI Seminario Científico del INCA. (1998). “La composición del medio de cultivo modula

la síntesis de los factores Nod”.

- Taller Internacional de Biotecnología Vegetal BioVeg´99. (1999). “Los factores de nodulación: señales moleculares inducidas por el medio de cultivo”.
- III Taller Internacional de Biotecnología “TIB´99”. (1999). “Síntesis de factores Nod por *B. japonicum*. Influencia de las condiciones de cultivo”.
- XII Seminario Científico del INCA. (2000). “Efecto de diferentes inductores sobre la síntesis y excreción de factores de nodulación en diferentes cepas de *B. japonicum*”.
- XIV Forum de Ciencia y Técnica Base, Municipal, Provincial. (2002). “Tecnología para la obtención de nuevos biopreparados para leguminosas potenciados en factores de nodulación”. Premios Relevante.
- XIV Forum de Ciencia y Técnica de Base y Municipal. (2002). “*Bradyrhizobium elkanii* ICA 8001 *gus* A: una nueva cepa para evaluar la expresión de los genes de nodulación”. Premio Relevante y Destacado.
- XIV Forum de Ciencia y Técnica Nacional. (2003). “Tecnología para la obtención de nuevos biopreparados para leguminosas potenciados en factores de nodulación”. Premio Mención.
- First International Conference on Legume Genomics and Genetics: Translation to Crop Improvement. Minneapolis-St. Paul, MN (US). June 2-6 (2002). “*Rhizobium etli iscN* is highly expressed in bacteroids and required for nitrogen fixation”.