

# FIJACION SIMBIOTICA DE NITROGENO: ESTADO ACTUAL Y PERSPECTIVAS\*

por

Gerardo Pérez Gómez\*\*

## Resumen

Pérez, G.: Fijación simbiótica de Nitrógeno: estado actual y perspectivas. Rev. Acad. Colomb. Cienc. 17 (66):477-487, 1990. ISSN 0370-3908.

Se presenta una síntesis del proceso destacando los avances realizados durante los últimos años en el conocimiento de las etapas de infección por *Rhizobium*, fijación del N atmosférico y asimilación de N por las plantas. Se plantean posibilidades de desarrollo futuro.

## Introducción

Se celebra este año el centenario del aislamiento por Beijerinck de bacterias del género *Rhizobium* a partir de nódulos de leguminosas. El uso de estas plantas para fertilizar el suelo se conoce desde la antigüedad y ya Catón (s III A.C.) recomendaba el uso de lupinus como abono verde. Las bases científicas de esta práctica agrícola comenzaron a ser estudiadas a partir del hallazgo de Beijerinck y muy pronto se hizo evidente la importancia del proceso conocido como Fijación de Nitrógeno. Se calcula que anualmente se incorporan a la biomasa  $230 \times 10^6$  tons. de  $N_2$  que provienen de Nitrógeno atmosférico fijado como  $NH_3$ ; de esta cantidad un 30% se fija a través de una simbiosis entre leguminosas y *Rhizobium* con unos costos energéticos muy inferiores a los requeridos para la síntesis industrial del  $NH_3$  usado como materia prima para la producción de fertilizantes.

La crisis energética de la década del 70 y los problemas de contaminación asociados al uso indis-

criminado de fertilizantes nitrogenados dieron un nuevo impulso a las investigaciones sobre la Fijación Simbiótica de Nitrógeno centrándose la atención sobre el sistema *Rhizobium*-leguminosa que constituye una importante alternativa para la producción agrícola de leguminosas de grano y forrajeras.

En este trabajo se presenta un panorama resumido de nuestros conocimientos actuales sobre este sistema biológico y se señalan algunos campos donde previsiblemente se harán avances significativos en un futuro cercano.

## Etapas del proceso

Consideraremos tres etapas:

- Infección de la leguminosa por el *Rhizobium*
- Fijación del Nitrógeno atmosférico
- Asimilación del Nitrógeno por la planta

## Infección

Los estudios ultraestructurales de Callaham y Torrey (1981) y Newcomb (1981) han permitido una descripción detallada de los complejos pasos que ocurren en esta etapa.

Ella comienza por una colonización de la rizosfera por las bacterias presentes en el suelo que por

\* Estudio científico leído en el recinto de la Academia el 22 de junio de 1988 con ocasión de su posesión como académico correspondiente.

\*\* Laboratorio de Bioquímica, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

quimiotaxis se dirigen a las cercanías de la raíz donde la concentración de nutrientes exudados por la misma es mayor. Se presenta entonces una adhesión sobre la superficie del pelo radicular que parece ser específica (Caetano-Anollés y Favelukes, 1986) acompañada de modificaciones en el mucigel (Greaves y Darbyshire, 1972). Esta preinfección es seguida por una unión del *Rhizobium* a la superficie del pelo que está caracterizada por un alto grado de especificidad de modo que una especie dada de *Rhizobium* infecta una cierta especie de leguminosa (ej: *Rhizobium leguminosarum*—*Pisum sativum*; *Rhizobium meliloti*—*Medicago sativa*, etc.); esta especificidad ha servido para clasificar operacionalmente las especies de *Rhizobium* y tiene una base genética.

La unión específica de la bacteria causa un redireccionamiento del crecimiento de la pared celular del pelo radicular apareciendo deformaciones y un encrespamiento marcado del mismo; como resultado el *Rhizobium* queda atrapado en la curvatura del pelo y allí las condiciones locales favorecen un incremento de las concentraciones de eventuales metabolitos y enzimas que pueden modificar la pared celular del hospedero. En este contexto es interesante la hipótesis de Hubbell (1981) que propone una interacción de componentes superficiales de la bacteria y del pelo conducente a los diferentes tipos de deformación observados. A continuación el *Rhizobium* penetra la pared celular del pelo y provoca una resíntesis de la misma quedando encapsulado en lo que se conoce como el hilo de infección, al interior del cual van proliferando las bacterias; paralelamente ocurre una migración del núcleo del pelo hacia la base orientando el desarrollo del hilo de infección en dirección de las células corticales.

En seguida el hilo comienza a atravesar las capas externas de células corticales induciendo la formación de tejido meristemático en las próximas capas; una vez que llega allí el *Rhizobium*, las células al ser infectadas dejan de dividirse y empieza la división en la próxima capa lo cual va formando el tejido nodular. En esta zona cortical el hilo es intra o intercelular y con frecuencia aparece ramificado; su crecimiento y la disposición de nueva pared celular es un proceso muy bien regulado.

Al infectar la célula los *Rhizobium* se desprenden del extremo del hilo de infección que allí no tiene pared y ocasionan un considerable aumento en el volumen de la célula, proliferando en su interior separadas del citoplasma por una membrana peribacterial, dando origen a los bacteroides cuyas características morfológicas y funcionales son diferentes a las de las bacterias en vida libre. Morfológicamente los cambios más notables residen en la variedad de formas, el adelgazamiento de la pared celular y la acumulación polar de polihidroxibutirato en ciertas especies de *Rhizobium*. Funcionalmente los bacteroides maduros poseen una Nitrogenasa muy activa, excretan  $\text{NH}_3$ , tienen una alta rata de

síntesis de proteínas provocando una acumulación de leghemoglobina y dependen de la planta para la obtención de energía.

El desarrollo del tejido nodular origina varias capas bien diferenciadas:

- la corteza que es una región con tejido vascular
- el meristema
- la zona de infección
- la zona con bacteroides inmaduros
- la zona con bacteroides funcionales
- tejido senescente

El proceso se detiene cuando el nódulo alcanza una masa y morfología bien definidas para cada especie y después de varias semanas comienza una degradación del tejido acompañada de la muerte de los bacteroides.

### Fijación de Nitrógeno

El sistema enzimático bacterial que reduce el Nitrógeno fue establecido inicialmente en fijadores asimbióticos (*Clostridium pasteurianum*) y se ha demostrado que está presente en todos los microorganismos fijadores de Nitrógeno. En el nódulo, los bacteroides expresan un conjunto de enzimas que transportan los electrones, cedidos por diferentes metabolitos, hasta el Nitrógeno como aceptor final. Las características de estas enzimas se presentan en la Tabla 1. En todas hay un "grupo" de áto-

TABLA 1

### Propiedades de Ferredoxina y Nitrogenasa de *Rhizobium*

	Mr (Kd)	E (volts)	Metal	"Grupo"	Subunid.
Ferredoxina	6	-0.43	II 4 Fe	7 Fe 7 S	
Dinitrogenasa reductasa (Kp)	55 - 65	-0.25	III 3 Fe 4 Fe	4 Fe 4 S	2
Dinitrogenasa (Kp)	56 ( $\alpha$ ) 60 ( $\beta$ )		2 Mo 24 - 26 Fe	20 - 36 S 24 - 36 Fe	2 2

mos de Fe íntimamente asociados a S lábil, cuya estructura no ha sido establecida, participando el Fe (y Mo en la Dinitrogenasa) en el transporte electrónico; la Dinitrogenasa reductasa y la Dinitrogenasa forman en conjunto la Nitrogenasa (Nasa). La secuencia de reacciones se indica en la Fig. 1; el ATP, que proviene de la planta (fotosíntesis), forma un complejo con  $\text{Mg}^{+2}$  y ocasiona un cambio conformacional en la Dinitrogenasa reductasa y disminuye su  $E^{10}$  a  $-0.490$  V. Esta proteína y la Dinitrogenasa son muy sensibles al  $\text{O}_2$  que desempeña un papel regulador muy importante en la fijación (Bothe, 1985). Concomitantemente con la reducción de Nitrógeno, la Nasa reduce protones produ-

ciendo H<sub>2</sub> y consumiendo ATP (Fig. 1); esto implica una reducción en la eficiencia de utilización de energía del 25%.

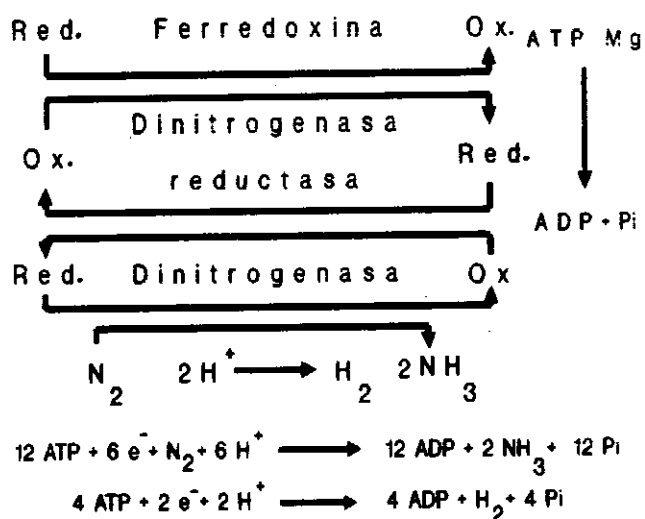


Figura 1. Secuencia del transporte de electrones en la fijación de Nitrógeno.

En algunas especies de *Rhizobium* se ha demostrado la presencia de una Hidrogenasa que recicla el H<sub>2</sub> permitiendo recuperar el ATP consumido (enzima hup) (Fig. 2) (Sprent, 1984); las leguminosas infectadas por *Rhizobium* poseedoras de esta Hidrogenasa, tienen una mayor productividad. Esta proteína es reprimida por concentraciones intermedias de sustratos carbonados (provenientes de la fotosíntesis) y por aire.

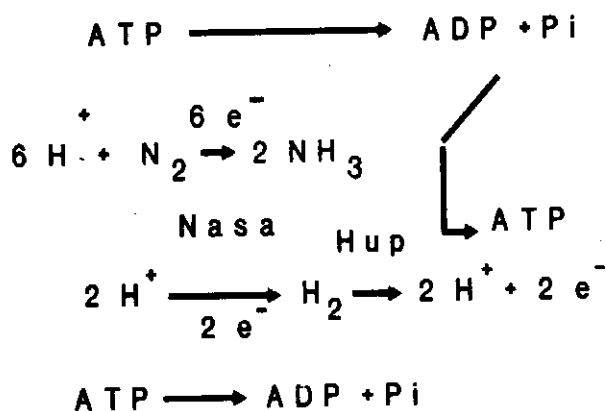


Figura 2. Reciclaje de H<sub>2</sub> por hidrogenasa hup (Sprent, 1984).

Adicionalmente, se encuentran en el nódulo ca. 20-30 proteínas específicas del mismo que son codificadas por el genoma de la planta; la síntesis de estas nodulinas es estimulada por el *Rhizobium* de manera coordinada durante el desarrollo del nódulo y son expresadas antes de la Nitrogenasa y aún en nódulos inefectivos (incapaces de fijar N<sub>2</sub>). en soya (Auger y Verma, 1981) y en arveja (Go-

vers et al, 1985). La nodulina más abundante es la Leghemoglobina (con cuatro clases estructurales) cuya cadena polipeptídica está especificada por genes de la planta y cuyo grupo heme es sintetizado por el bacteroide; esta proteína tiene una gran afinidad por el O<sub>2</sub> por lo cual se ha postulado que actúa transportándolo a los bacteroides y tamponando la concentración de este gas para evitar daños a la Nitrogenasa.

La expresión diferencial de las nodulinas es independiente del grado de desarrollo de los bacteroides, de la excreción del grupo heme por bacteroides y de la fijación de Nitrógeno, con excepción de una nodulina que no aparece si no hay fijación. Basándose en esta expresión diferencial, Govers et al. (1985) han propuesto como funciones posibles para las nodulinas la formación de tejido nodular luego de la diferenciación y proliferación de las células corticales (nodulinas de expresión temprana), el transporte de sustratos a los bacteroides y la asimilación del NH<sub>3</sub> excretado por los bacteroides (nodulinas de expresión tardía).

### Asimilación de Nitrógeno

Las leguminosas de zonas templadas (arveja, frijol, alfalfa etc.) incorporan el NH<sub>3</sub> producido en los bacteroides a los sustratos carbonados resultantes de la fotosíntesis por medio de reacciones de transaminación (Fig. 3) formando Gln (Glutamina sintetasa específica del nódulo) y Asn que son exportadas del nódulo al resto de la planta donde proporcionan el Nitrógeno necesario para la síntesis de aminoácidos.

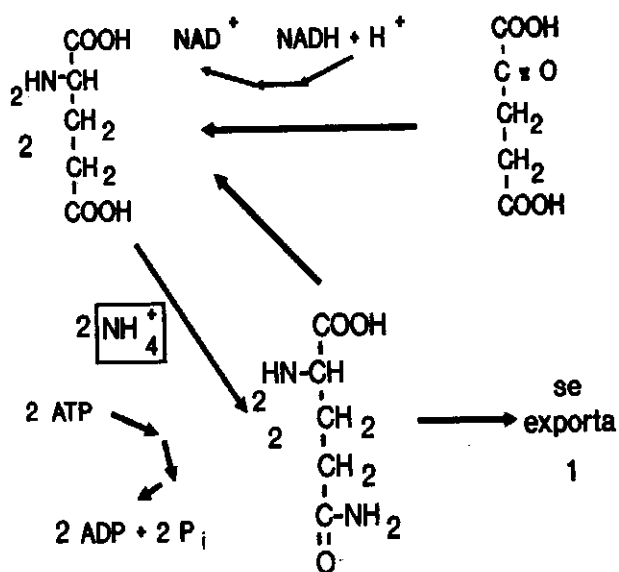


Figura 3. Vía de la Glutamina para la asimilación del Nitrógeno fijado (Sprent, 1984).

En las leguminosas tropicales (soya, maní) la asimilación de Nitrógeno involucra la formación de

ureidos (Fig. 4) como alantoína y ácido alantóico quienes actúan como transportadores del Nitrógeno fijado. En la síntesis de ureidos los esqueletos carbonados también provienen de la fotosíntesis y algunas de las enzimas que intervienen son nodulinas (uricasa, por ej.).

**Genes nif *Klebsiella pneumoniae***

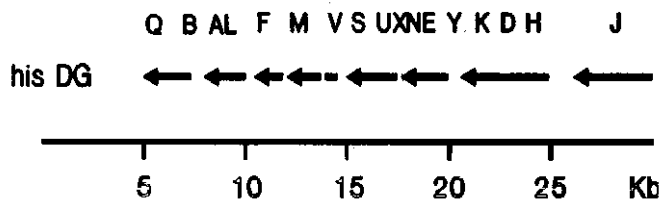


Figura 5. Mapa de los genes fijadores de Nitrógeno (nif) en *Klebsiella pneumoniae* (Ausubel y Cannon, 1981). La longitud de las flechas indica el tamaño relativo de cada gen.

- Los 17 genes constituyen una unidad reguladora (regulón) ligada al operón his.
- Los genes están organizados en 8 unidades transcripcionales; la función de la mayoría de sus productos ha sido establecida (Tabla 2). Los genes H, D, K codifican las subunidades de la Dinitrogenasa reductasa y de la Dinitrogenasa, el gen F codifica la ferredoxina y el procesamiento y síntesis del factor FeMoCo se realizan por los transcritos de varios genes. Los genes L y A actúan como reguladores; el producto de nifA (NIFA) se necesita para la expresión de todos los genes nif (salvo nifA y nifL) y el producto de nifL (NIFL) modula la actividad de NIFA y es afectado por altos niveles de NH<sub>3</sub> y de O<sub>2</sub>.

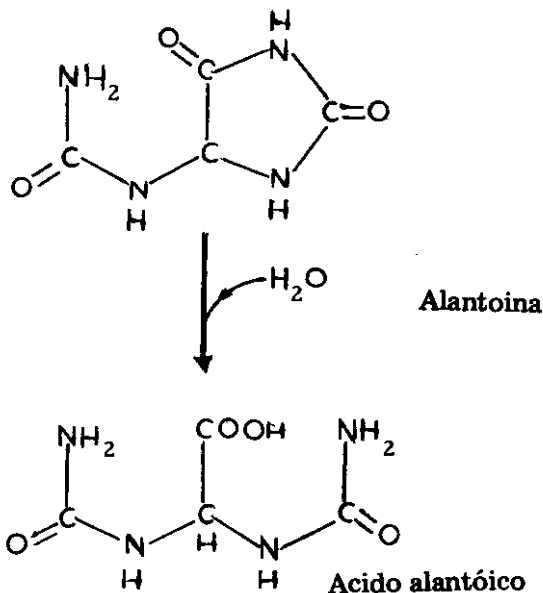
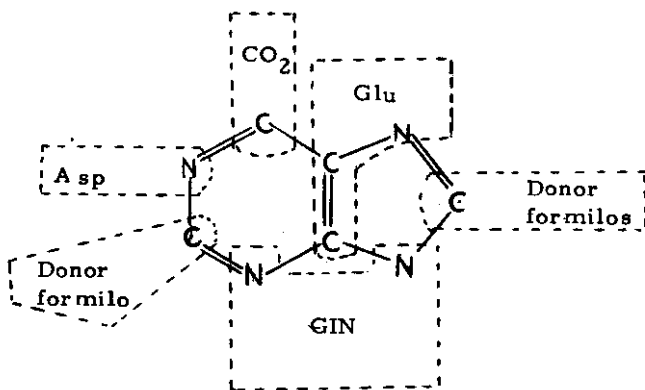


Figura 4. Asimilación del Nitrógeno fijado a través de la formación de ureidos (Sprent, 1984).

**Genética y regulación de Rhizobium**

**Genética de la fijación**

La genética molecular de los organismos fijadores de Nitrógeno ha sido establecida utilizando como modelo el fijador libre *Klebsiella pneumoniae*. El grupo de Ausubel y Cannon, (1981) determinó el mapa de los genes responsables de la fijación (genes nif) que presenta las siguientes características (Fig. 5):

- Los genes necesarios para la síntesis de los integrantes del sistema enzimático y los genes reguladores están agrupados en una misma región del cromosoma.

TABLA 2

Genes nif de *Klebsiella Pneumoniae* y su función

Gen	Proteína (Kd)	Función
J	120	Piruvato-flavodoxina oxidoreductasa
H	35	Sint. dinitrogenasa reductasa (pr Fe)
D	56	Sint. sub. dinitrogenasa (pr Fe-Mo)
K	60	Sint. sub. dinitrogenasa (pr Fe-Mo)
Y	21	?
E	46	Sint. factor FeMoCo (dinitrogenasa)
N	50	Sint. factor FeMoCo (dinitrogenasa)
X	18	?
U	25-32	?
S	45	?
V	42	?
M	28	Procesamiento de proteína NIFH
F	17	Transp. e <sup>-</sup> a dinitrogenasa (Ferredoxina)
L	45	Represor de proteína NIFA
A	57	Regulación transcripción
B	?	Sint. regulación factor FeMoCo
Q	?	?

En *Rhizobium* los genes nif están localizados en un plásmido de gran tamaño (plásmido sym) que hibridiza con los genes nif de *Klebsiella pneu-*

*moniae* ya que hay una homología interespecies muy marcada (Ruvkun et al., 1981). Se ha establecido la presencia de dos clases de genes (Fig. 6):

**Genes nif y fix R. mel.**

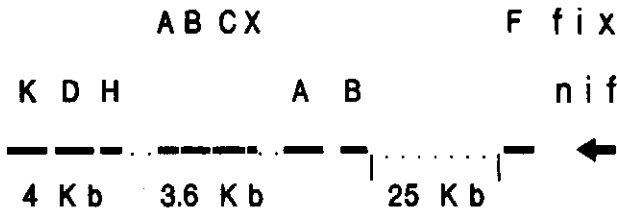


Figura 6. Mapa de los genes nif y fix de *Rhizobium meliloti* (Ausubel et al., 1985; Szeto et al., 1987; Beynon et al., 1988).

- Los genes nif, análogos estructural y funcionalmente a los genes nif de *K. pneumoniae*; en esta clase se han localizado los genes nifHDK (Ausubel et al., 1985), nifA (Beynon et al., 1988) y nifB (Buikema et al., 1987).
- Los genes fix, necesarios para la fijación del Nitrógeno, no tiene homólogos en *K. pneumoniae* y su función es desconocida.

Se han identificado los genes fixABC en *Rhizobium meliloti* (Earl et al., 1987) y en *Bradyrhizobium japonicum* (Gubler y Hennecke, 1986), fixF (Aguilar, et al., 1985) y fixX (Earl et al., 1987) en *R. meliloti*.

Los productos de los genes nifHDK son muy similares a los de *Klebsiella* y constituyen la Nitrogenasa cuya expresión está regulada por nifA que se encuentra en todas las especies de *Rhizobium*. En la proteína NIFA la región N-terminal no es esencial para su actividad y a diferencia de NIFA de *Klebsiella*, la proteína de *R. meliloti* es sensible al O<sub>2</sub> (Beynon et al., 1988).

Es de notar que el gen regulador nifL sólo se ha detectado en dos especies de *Klebsiella* y de existir en *Rhizobium* no tendría similitud estructural con los de *Klebsiella*.

Los genes fixABC no tienen homología con ninguno de los 17 genes de *K. pneumoniae* y son incapaces de complementar los mutantes nif- de esta especie. El gen fixF está cerca de la región con los genes responsables de la nodulación pero no tiene relación con la infección; su ausencia no impide la expresión de la Nasa y es activado por los productos de nifA de *K. pneumoniae* y de *R. meliloti*.

**Regulación de la fijación**

En los últimos años se ha comenzado a entender cómo opera la regulación de la transcripción de los genes nif en *Klebsiella pneumoniae* en respuesta

a ciertas concentraciones de Nitrógeno fijado y de O<sub>2</sub>.

Se sabe que la regulación opera en dos niveles:

- Una regulación específica, mediada por los genes nifA y nifL, que están dentro del grupo de genes fijadores; y
- Una regulación general, en la que intervienen genes del tipo ntr que actúan controlando muchos operones en respuesta a fuentes externas de Nitrógeno; en *K. pneumoniae* se han identificado los genes ntrA, ntrB, ntrC y glnA que se encuentran lejos del grupo de genes nif.

El modelo actual propuesto por Dixon et al (1987) (Fig. 7) reúne los genes ntrB, ntrC y glnA en una unidad (regulón) en la cual ntrC expresa una proteína bifuncional (NTRC) que actúa como activador o inhibidor de la transcripción uniéndose en el primer caso a un segmento de DNA ca. 100 kb arriba del gen promotor de nifLA; su actividad es modulada por el producto de ntrB (NTRB) que en presencia de un exceso de Nitrógeno inactiva NTRC y por ende la transcripción de nif.

**Regulación genes nif Klebsiella**

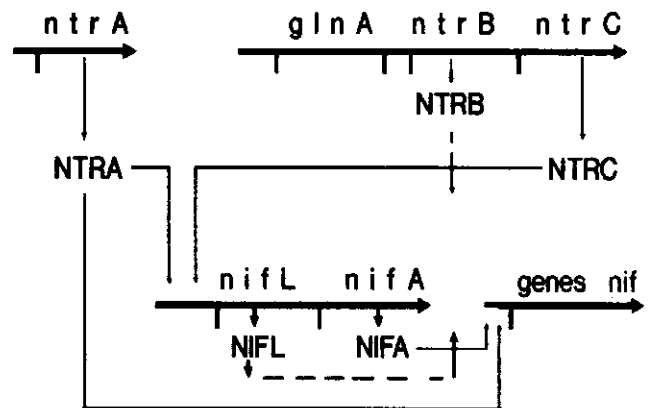


Figura 7. Modelo de regulación de la fijación de Nitrógeno. (Dixon et al., 1987) en *Klebsiella pneumoniae*.

El gen ntrA, localizado en una región alejada del regulón, produce una proteína identificada como un factor sigma 60 de la RNA polimerasa que tiene dos regiones capaces de unirse al DNA; esta proteína (NTRA) actúa sobre el promotor de nifLA y sobre los promotores de los restantes genes nif. El gen ntrA tiene un efecto pleiotrópico y actúa sobre muchos operones regulados por Nitrógeno.

El producto de nifA (NIFA) es una proteína activadora requerida para la transcripción de los genes nif. En presencia de un exceso de Nitrógeno fijado o de O<sub>2</sub>, es inactivado por NIFL observándose una represión muy rápida de la síntesis de Nasa y de las otras proteínas codificadas por los genes nif.

En conjunto el sistema regulador evidencia una capacidad de ajuste muy fina y el esclarecimiento de los sitios y mecanismos de acción de cada una de las proteínas involucradas (Dixon et al., 1987) permitirá comprender cómo opera la regulación global frente a las fuentes externas de Nitrógeno.

**Genética de la infección**

Existen en *Rhizobium* genes responsables de los diferentes pasos de la infección que culmina exitosamente en la formación de un nódulo; estos genes de nodulación (nod) han sido particularmente bien estudiados en *R. meliloti*. En el megaplásmido sym (1500 kb) de esta especie se han identificado dos grupos de genes nod:

- los genes comunes para nodulación (cng)
- los genes específicos en la infección (hsn)

Los genes comunes están presentes en todas las especies de *Rhizobium* y tienen entre sí un alto grado de homología estructural y funcional no siendo responsables del reconocimiento específico (Fischer et al., 1985). Se encuentran organizados en dos unidades transcripcionales divergentes (nodABC) y (nodD) (Figs. 8 y 9) que son estimuladas por productos presentes en exudados de la raíz; son necesarios para el encrespamiento del pelo radicular (Hac+) y para la inducción de la organogénesis del nódulo. En el proceso de infección el primer signo visible es la formación de una mancha refráctil en la curvatura interna del pelo encrespado donde se acumulan las bacterias; esto es dependiente de los genes nodABC que también controlan la inducción de la organogénesis (Debelle et al., 1986).

Los genes específicos (Figs. 8 y 9) son característicos de cada especie de *Rhizobium* y en *R. meliloti* están como dos unidades divergentes: nodFEG (o hsn ABC) y nodH (o hsnD), localizadas entre la región de los genes nod comunes y la re-

gión de genes nif (Putnoky y Kondorosi, 1986). Los genes nodFE controlan el desarrollo del hilo de infección en la planta homóloga y nodH controla positivamente el encrespamiento junto con nodABC y su especificidad resulta de que no es complementado por nodH de otras especies de *Rhizobium*; en hospederos heterólogos estos genes ejercen un control negativo previniendo la infección (Debelle et al., 1986). La transferencia de los genes específicos implica la transferencia de especificidad en la infección.

**Genes nod *R. meliloti***

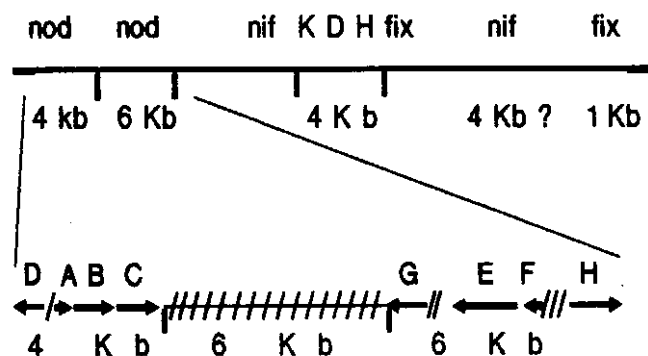


Figura 8. Mapa de los genes comunes y específicos responsables de la nodulación (nod) en *Rhizobium meliloti* (Horvath et al., 1986; Schmidt et al., 1986; Rossen et al., 1987). La longitud de las flechas indica el tamaño relativo de cada gen.

**Genes nod *Rhizobium***

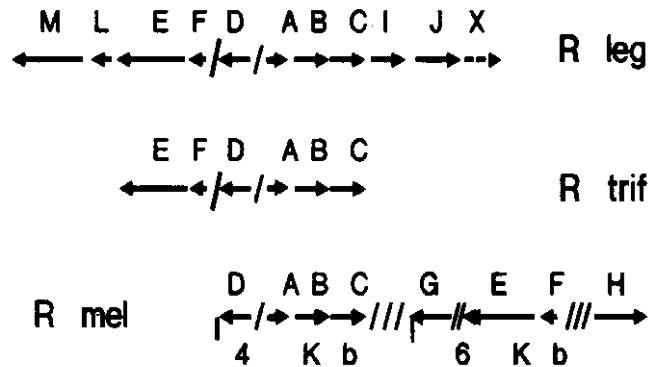


Figura 9. Mapa de los genes nod comunes y específicos en algunas especies de *Rhizobium* (Horvath et al., 1986; Shearman et al., 1986; Schmidt et al., 1986; Rossen et al., 1987). La longitud de las flechas indica el tamaño relativo de cada gen.

En otras especies de *Rhizobium* se encuentran adicionalmente otros genes nod comunes cuyos fenotipos han sido parcialmente determinados.

Las funciones y algunas propiedades de los transcritos de los genes nod se indican en la Tabla 3. La proteína de nodA se encuentra en el citoplasma, tiene un papel en el encrespamiento y es inducida por exudados de raíz como la luteolina y la trigonelina (Schmidt et al., 1986). La proteína de nodC está asociada a la membrana externa de *R. meliloti* y durante el desarrollo nodular su precursor de 46.8 Kd es procesado a un polipéptido de 34 Kd. La secuencia de los genes nodFEGH y el PM de sus transcritos han sido determinados por Horvath et al. (1986) y una comparación de las secuencias muestra una homología parcial de nodF con la proteína transportadora de grupos acilo.

El único gen regulador en infección identificado hasta ahora es nodD quien activa la transcripción de nodABC y para ello requiere la presencia de exudados de raíz; el gen es funcionalmente equivalente en diferentes especies de *Rhizobium* y parece que interactúa específicamente con el inductor del hospedero normal. Shearman et al. (1986) demostraron que en *R. leguminosarum*, la inducción de nodFE requiere la proteína de nodD y exudado de raíz; esta proteína se uniría a la región de DNA altamente conservada en nodABC.

TABLA 3  
GENES nod de *Rhizobium* y su función

Genes comunes	Proteína (Kd)	Localización prot.	Fenotipo	Función
A	21.8	Citoplasma	Ha $\bar{c}$	Encresp.— Organog.
B			Ha $\bar{c}$	Encresp.— Organog.
C	34.0	Membrana	Ha $\bar{c}$	Encresp.— Organog.
D			Ha $\bar{c}$	Regulación
I		Membrana		Retraso nodulación
J				Retraso nodulación
L			?	
M			?	
X			Nod $^+$	Nod. arveja Afghan.
<b>Genes específicos</b>				
F	9.7	Citopl. (PTA)	Hac, $^+$ Inf $\bar{}$	Desarr. hilo inf.
E	41.7		Hac, $^+$ Inf $\bar{}$	Desarr. hilo inf.
G	26.7	Deshidrog.	Hac, $^+$ Inf $\bar{}$	Retraso nodulación
H	28.6		Hac, $^-$ Inf $\bar{}$	Especificidad y desarrollo hilo

#### Acción de exudados de raíz

Los trabajos de Bhuvanewari y Solheim (1985) mostraron que en los exudados hay factores que inducen deformaciones del pelo radicular similares a las producidas en las etapas iniciales de la infección; algunos de estos factores son termoestables, con bajo PM y la deformación ocurre rápidamente (ca. 90 min.). Los componentes activos son del tipo de las flavonas o flavanonas como la luteolina y la 7,4 dihidroxiflavona (Peters et al., 1986; Redmond et al., 1986). Estudios con análogos estructurales de la luteolina mostraron que la actividad depende de la presencia de hidroxilos o glicósidos en las posiciones 7 (anillo A) y 4' (anillo B); los más potentes actúan a concentraciones  $10^{-7}$  —  $10^{-8}$  M siendo algunos poco específicos (luteolina) y otros bastante específicos (hesperitina para *Rhizobium leguminosarum*).

En *Rhizobium* temperados la inducción de los genes nod puede ser bloqueada por acción de isoflavonas o flavanoles a concentraciones similares a las existentes durante la germinación (5–10  $\mu$ M) (Firmin et al., 1986). Debido a la similitud estructural entre inductores y anti-inductores se cree que actúan competitivamente frente a la proteína de nodD.

El conjunto de resultados recientes ha sido integrado en un modelo (Downie y Johnston, 1986) que describe los factores que intervienen en los pasos iniciales de nodulación. Sin embargo persisten muchas preguntas sobre el papel que desempeñan

en la infección diversos compuestos y algunas de ellas se discuten en la próxima sección.

#### INCOGNITAS

##### Papel de exopolisacáridos y glucanos

La función de los exopolisacáridos (EPS) secretados por el *Rhizobium* ha sido frecuentemente reevaluada ya que se han aislado mutantes cuyos fenotipos son muy diferentes; algunos de los deficientes en EPS son Nod $^-$ , otros son Nod $^+$  Fix $^-$  y otros Nod $^+$  Fix $^+$ . Los genes responsables de la síntesis de EPS estarían en un plásmido diferente al plásmido portador de los genes nod/nif y se detectó un gen en el plásmido sym de *R. phaseoli*, que inhibe la producción de EPS en bacteroides (Borthakur et al., 1985). Su gran diversidad estructural (Jansson, 1979; Jansson et al., 1979; Somme 1985; Robertsen et al., 1981), es intrigante si se tiene en cuenta su ocurrencia en especies que actualmente se consideran como biovariedades debido a su alto grado de homología genética. Actualmente se cree que los EPS juegan un papel durante la invasión y no durante el desarrollo del nódulo.

La importancia de los glucanos  $\beta$ 1, 2 ha sido relevada recientemente por Geremia et al. (1987) quienes encontraron un mutante incapaz de sintetizar este polisacárido (y que curiosamente tiene el doble de EPS habitualmente presente), que forma seudonódulos inefectivos y cuyas propiedades son similares a las de mutantes avirulentos chvB de *Agrobacterium tumefaciens*. Simultáneamente se

ha encontrado una alta capacidad de complementación de los genes *chvB* de *A. tumefaciens*, causantes de la virulencia, con los genes *nvd* de *Rhizobium*.

#### Papel de las lectinas

Una característica de la simbiosis es la especificidad que se manifiesta en la interacción entre el *Rhizobium* y su planta hospedera. Dado que en la rizosfera existe un gran número de bacterias diferentes del *Rhizobium* y que sólo ciertas cepas son capaces de infectar una leguminosa dada, debe existir un mecanismo muy preciso que permita determinar la selectividad.

La frecuente ocurrencia de lectinas en las leguminosas, sus propiedades funcionales (Goldstein y Hayes, 1978; Lis y Sharon, 1981; Liener et al., 1986) y la evidencia previa obtenida por Hamblin y Kent (1973) y Bohlool y Schmidt (1974) condujeron a Albersheim y Anderson-Prouty (1975) a proponer que el reconocimiento se realiza a través de la interacción lectina del hospedero con los polisacáridos presentes en la superficie bacteriana.

En el sistema trébol -*Rhizobium trifolii* Dazzo y Hubbell (1975) demostraron que las raíces de trébol y las bacterias infectivas poseen antígenos superficiales comunes y que la lectina extraída de las semillas de trébol se une específicamente al *R. trifolii*. Con base en estos resultados estos investigadores propusieron que la lectina actúa como un puente entre el pelo radicular y la bacteria. Posteriormente Dazzo y Brill (1977) aislaron de las raíces de trébol una lectina (Trifolina A) que se une tanto a las bacterias como a las raíces; la proteína, presente preferencialmente en los pelos radiculares, fue caracterizada encontrándose que la 2-deoxiglucosa inhibe la unión. Dada la presencia de Trifolina A en los exudados de raíz (Dazzo y Hrabak, 1981) el modelo ha sido reelaborado adecuándolo al propuesto por Solheim. Este investigador considera que una vez que la lectina es excretada por la raíz, reconoce la bacteria y este complejo se une a un receptor de la superficie radicular.

El sistema modelo soya -*Rhizobium japonicum* permitió a Bohlool y Schmidt (1974) demostrar que la lectina de soya se une específicamente con 22 (de un total de 25) cepas de *R. japonicum* sin que haya interacciones con *Rhizobium* no nodulantes de soya. El grupo de Bauer confirmó estos resultados y observó que los sitios receptores en la bacteria son transitorios dependiendo su presencia de la fase en que se encuentre el cultivo del microorganismo. Esto se explicó más tarde al encontrar que la composición del polisacárido capsular cambia con la fase de crecimiento. Estos receptores se pueden inducir cultivando las bacterias en presencia de exudados de soya o asociadas a las raíces. La revisión más reciente de los resultados obtenidos en este sistema ha sido publicada por Bhuvaneshwari

(1981) y en ella se apoya el modelo dinámico propuesto por Bauer (1981) según el cual la interacción bacteria-hospedero desencadena una serie de respuestas recíprocas iniciadoras de la infección.

A pesar de la evidencia acumulada en favor de la hipótesis que postula a las lectinas como responsables del reconocimiento, ésta es objeto de controversia ya que es necesario considerar los siguientes hechos:

- Cepas de *Rhizobium* provenientes de todos los grupos de inoculación se unen con lectinas de plantas que no son infectadas por la cepa en cuestión (rizobio heterólogo) (Law y Strijdom, 1977) y en muchos casos los rizobios que nodulan su hospedero normal (rizobio homólogo) no se unen con la lectina aislada de las semillas de ese hospedero (Chen y Phillips, 1976).
- Se ha demostrado (Su et al, 1980) la ausencia de lectina en semillas de 6 variedades de soya que son noduladas por *R. japonicum*. Estas variedades son portadoras del gen recesivo "le le" y en ellas no se ha logrado detectar lectina en las raíces.
- En el sistema *R. meliloti*-lectina de alfalfa Handelsman et al. (1984) encontraron que cepas nodulantes y no nodulantes se unen a la lectina. Paradójicamente entre las cepas nodulantes son más competitivas aquellas que presentan el menor grado de interacción (aglutinabilidad) con la lectina.

La controversia existente en este campo impulsó al Grupo de Bioquímica (Depto. Química, U. Nacional) que estudia la bioquímica de la infección a realizar estudios para precisar la especificidad de la interacción lectina-*Rhizobium*; en síntesis los resultados obtenidos (Luque, 1981; de Navarro, 1982; Orjuela, 1984; Pérez, 1985) permiten:

- Corroborar la influencia de las condiciones de crecimiento y de incubación, validando por microscopía de fluorescencia las conclusiones obtenidas en los ensayos de bactoaglutinación directa.
- Establecer la no-dependencia entre bactoaglutinación y unión lectina-*Rhizobium* tanto en sistemas homólogos como heterólogos.
- Introducir un nuevo criterio para definir la "ausencia de interacción lectina-*Rhizobium*" como la ausencia simultánea de bactoaglutinación y de unión detectable por microscopía de fluorescencia.

El conjunto de resultados referentes a la interacción evidencian que la unión de la lectina al *Rhizobium* se realiza en forma inespecífica y no apo-

yan la intervención de la lectina como un agente selectivo en el reconocimiento de la bacteria por parte de la planta. Dado el desconocimiento actual sobre la forma como los componentes de la rizosfera afectan la composición de la superficie bacterial y sobre las condiciones locales que prevalecen durante la interacción en condiciones naturales, es necesario ahondar en la investigación de estos factores.

Están por ser resueltas varias preguntas:

- ¿En qué medida es válida la hipótesis que postula la lectina de la planta como la responsable del reconocimiento de la cepa homóloga (simbionte natural) de *Rhizobium*?
- ¿Son aplicables a lectinas de raíz los resultados obtenidos con lectinas de semilla? Esta pregunta es crucial para la evaluación de los modelos propuestos y tiene plena vigencia pues la evidencia disponible además de escasa es contradictoria. Desafortunadamente generalmente se asume a priori que las dos lectinas son idénticas y se extrapolan al proceso de infección los resultados obtenidos con lectinas de semilla. Los datos obtenidos por nuestro grupo (Luque, 1981; de Navarro, 1982; Maldonado, 1982) indican diferencias estructurales y funcionales importantes entre los dos tipos de lectinas.
- De acuerdo con la hipótesis de Dazzo y Hubbell (1975) es dable pensar que las lectinas de raíz deben ser componentes superficiales situados en las células epidérmicas. ¿Cómo se transportan (y/o procesan) estas proteínas al exterior? ¿Cuál es el tipo de unión entre estas proteínas y los constituyentes de la pared celular o del mucigel? ¿Cómo se afecta la infección cuando se tratan las raíces con procedimientos encaminados a remover las lectinas de la superficie?

#### Pectinasas en infección

Una de las hipótesis que explica la penetración del pelo radicular por el *Rhizobium* postula la participación de enzimas pectolíticas y celulolíticas. Esta hipótesis se apoya en la presencia de enzimas hidrolíticas producidas por las raíces (Fahraeus y Salman, 1976; Verma y Zogbi, 1978) o por algunas especies de *Rhizobium* (Martínez-Molina et al, 1979; Martínez-Molina y Olivares, 1982; Plazinski y Rolfe, 1985); la evidencia ultraestructural aportada por Callaham y Torrey (1981) muestra la degradación de la pared celular durante la infección.

Sin embargo diversos autores (Lillich y Elkan, 1968; McMillan y Cooke, 1969; Vance, 1983) refutan la hipótesis propuesta. Recientemente nuestro grupo ha iniciado un estudio (Martínez, 1987) para detectar bajos niveles de pectinasas y determinar si en filtrados de cultivos de *R. meliloti* existe activi-

dad pectolítica. Además de establecer los métodos de detección, se ha puesto en evidencia la facilidad de inactivación de la enzima, lo cual podría explicar los resultados contradictorios obtenidos por los diversos autores.

#### PROBABLES DESARROLLOS FUTUROS

En el campo de la fijación el establecer la estructura molecular del grupo de átomos de Fe y S que participan en los sitios activos de la Dinitrogenasa reductasa y de la Dinitrogenasa, así como la forma en que el Fe y el Mo interactúan para reducir el Nitrógeno, reviste mucha importancia pues podría dar lugar al diseño de catalizadores con gran capacidad reductora. Es por ello que actualmente se trabaja en la síntesis de compuestos bioinorgánicos que simulen funcionalmente estas agrupaciones.

También en este campo el conocimiento de la estructura, función y regulación de los genes que codifican la Hidrogenasa hup, posibilitaría su inserción en cepas de *Rhizobium* que carecen de ellos. Esto implicaría la disponibilidad de cepas energéticamente más eficientes y por ende de mayores rendimientos en las cosechas de leguminosas de grano y forrajeras.

Actualmente sólo se conocen muy parcialmente las reacciones metabólicas que gobiernan la asimilación de Nitrógeno fijado, la interdependencia de la fijación con la fotosíntesis y muchos aspectos fisiológicos de las plantas en que ocurre la fijación. Este es un amplio campo en el cual se está experimentando activamente.

Es en el campo de la genética molecular donde probablemente se den los avances más notables. El funcionamiento de los genes en microorganismos como *Agrobacterium tumefaciens*, que presenta ventajas para el manejo experimental y posee muchos genes análogos a los de *Rhizobium*, es objeto de intensos estudios; en particular el análisis de los genes vir (causantes de la virulencia) ha evidenciado su inducción por isoflavonas o flavonoles a través del bloqueo de nodD. Estos genes también están involucrados en la síntesis de los glucanos  $\beta$ 1, 2, que intervienen en la formación de tumores vegetales, existiendo intrigantes similitudes con la organogénesis del nódulo en *Rhizobium*.

La regulación de la aparición y número de sitios de infección, hasta hoy inexplicada, probablemente tiene que ver con la competencia entre "inductores" (flavonoides) y "anti-inductores" (isoflavonas) respecto a la proteína producida por nodD. Conocer los mecanismos de unión de estos compuestos a la proteína y las modificaciones conformacionales resultantes ayudará a entender esta regulación.

La secuenciación en varias especies de *Rhizobium* de los genes nod responsables de la especifici-

dad, podría conducir, en un mediano plazo, al diseño de un gen sintético que permitiera eliminar la barrera de la especificidad que actualmente es una limitante tecnológica importante.

Por último es fundamental, y ya se están dando los primeros pasos, conocer cuáles genes de la

planta y de qué manera intervienen en el establecimiento de una simbiosis eficiente. Debido a la complejidad del sistema, no obstante el desarrollo de la biología molecular, éste será un avance a un plazo más largo que será de capital importancia para la tecnología agrícola del futuro.

## BIBLIOGRAFIA

- AGUILAR, O.M., KAPP, D. & PUHLER, A. 1985. Characterization of a *Rhizobium meliloti* fixation gene (fixF) located near the common nodulation region. *J. Bacteriol.*, 164: 245-254.
- ALBERSHEIM, P. & ANDERSON-PROUTY, A.J. 1975. Carbohydrates, proteins, cell surfaces and the biochemistry of pathogens. *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 26: 31-52.
- AUGER, S. & VERMA, D.S.P. 1981. Induction and expression of nodule-specific host genes in effective and ineffective root nodules of soybean. *Biochemistry*, 20: 1300-1306.
- AUSUBEL, F.M., CANNON, F.C. 1981. Molecular genetic analysis of *Klebsiella pneumoniae* nitrogen-fixation (nif) genes. *Cold Spring Harbor Symp. Quantit. Biol.*, 45: 487-492.
- AUSUBEL, F.M., BUIKEMA, W.J., EARL, C.D., KLINGENSMITH, J.A., NIXON, B.T. & SZETO, W.W. 1985. Organization and regulation of *Rhizobium meliloti* and *Parasponia bradyrhizobium* nitrogen fixation genes in "Nitrogen fixation research progress", Evans H.J., Bottomley P.J., Newton W.E., (eds), Martinus Nijhoff, Dordrecht, págs. 165-179.
- BAUER, W.D. 1981. Infection of legumes by Rhizobia. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 32: 407-449.
- BEYNON, J.L., WILLIAMS, M.K. & CANNON, F.C. 1988. Expression and functional analysis of the *Rhizobium meliloti* nifA gene *EMBO J.*, 7: 7-14.
- BHUVANESWARI, T.V. 1981. Recognition mechanisms and infection process in legumes. *Economic Botany*, 35: 204-223.
- BHUVANESWARI, T.V. & SOLHEIM, B. 1985. Root hair deformation in the white clover *Rhizobium trifolii* symbiosis. *Physiol. Plant.* 63: 25-34.
- BOHLOOL, B.B. & SCHMIDT, E.L. 1974. Lectins: A possible basis for specificity in the *Rhizobium-legume* root nodule symbiosis. *Science*, 185: 269-271.
- BORTHAKUR, D., DOWNIE, J.A., JOHNSTON, A.W.B. & LAMB, J.W. 1985. psi, a plasmid-linked *Rhizobium phaseoli* gene that inhibits exopolysaccharide production and which is required for symbiotic nitrogen fixation. *Mol. Gen. Genet.*, 200: 278-282.
- BOTHE, H. 1985. The role of oxygen in biological nitrogen fixation. *Period. Biol.*, 87: 111-120.
- CAETANO-ANOLLES, G. & FAVELUKES, G. 1986. Host-symbiont specificity expressed during early adsorption of *Rhizobium meliloti* to the root surface of alfalfa. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52: 377-382.
- CALLAHAM, D.A. & TORREY, J.G. 1981. The structural basis for infection of root hairs of *Trifolium repens* by *Rhizobium*. *Can. J. Bot.*, 59: 1647-1664.
- CHEN, A.P.T. & PHILLIPS, D.A. 1976. Attachment of *Rhizobium* to legume roots as the basis for specific interactions. *Physiol. Plant.*, 38: 83-88.
- DAZZO, F.B. & HUBBELL, D.H. 1975. Cross reactive antigens and lectin as determinants of symbiotic specificity in the *Rhizobium-clover* association. *Appl. Microbiol.*, 33: 1017-1033.
- DAZZO, F.B. & BRILL, W.J. 1977. Receptor site on clover and alfalfa roots for *Rhizobium*. *Appl. Microbiol.*, 33: 132-136.
- DAZZO, F.B. & HRABAK, E.M. 1981. Presence of trifolin A, a *Rhizobium*-binding lectin in clover root exudate. *J. Supramol. Struct. Cell Biochem.*, 16: 133-138.
- DEBELLE, F., ROSENBERG, C., VASSE, J., MAILLET, F., MARTINEZ, E., DENARIE, J. & TRUCHET, G. 1986. Assignment of symbiotic developmental phenotypes to common and specific nodulation (nod) genetic loci of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.*, 168: 1075-1086.
- DIXON, R.A., AUSTIN, S., BUCK, M., DRUMMOND, M., HILL, S., HOTEL, A., MACFARLANE, S., MERRICK, M. & MINCHIN, S. 1987. Genetics and regulation of nif and related genes in *Klebsiella pneumoniae*. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 317: 147-158.
- DOWNIE, J.A. & JOHNSTON, A.W.B. 1986. Nodulation of legumes by r.: The recognized root? *Cell*, 47: 153-154.
- EARL, C.D., RONSON, C.W. & AUSUBEL, F.M. 1987. Genetic and structural analysis of the *Rhizobium meliloti* fixA, fixB, fixC and fixX genes. *J. Bacteriol.*, 169: 1127-1136.
- FAHRAEUS, G. & SAHLMAN, K. 1976. The infection of root hairs of leguminous plants by nodule bacteria. *Ann. Acad. Regiae Sci. Upps.* 20: 103-129.
- FIRMIN, J.L., WILSON, K.E., ROSSEN, L. & JOHNSTON, A.W.B. 1986. Flavonoid activation of nodulation genes in *Rhizobium* reversed by other compounds present in plants. *Nature*, 324: 90-92.
- FISHER, R.F., TU, J.K. & LONG, S.R. 1985. Conserved nodulation genes in *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium trifolii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49: 1432-1435.
- GEREMIA, R.A., CAVAIGNAC, S., ZORREGUIETA, A., TORO, N., OLIVARES, O. & UGALDE, R. 1987. A *Rhizobium meliloti* mutant that forms ineffective pseudonodules in alfalfa produces exopolysaccharide but fails to form  $\beta(1\rightarrow2)$  glucan. *J. Bacteriol.*, 169: 880-884.
- GLUBER, M. & HENNECKE, H. 1986. fixA, B and C genes are essential for symbiotic and free-living microaerobic nitrogen fixation. *FEBS Lett.*, 200: 186-192.
- GOLDSTEIN, I.J. & HAYES, C.E. 1978. The lectins: Carbohydrate-binding proteins of plants and animals. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 35: 127-340.
- GOVERS, F., GLOUDEMANS, T., MOERMAN, M., van KAMMEN, A. & BISSELING, T. 1985. Expression of plant genes during the development of pea root nodules. *EMBO J.*, 4: 861-867.
- GREAVES, M.P. & DARBYSHIRE, J.F. 1972. The ultrastructure of the mucilaginous layer on plant roots. *Soil Biol. Biochem.*, 4: 443-449.

- HAMBLIN, J. & KENT, S.P. 1973. Possible role of phytohemagglutinin in *Phaseolus vulgaris* L. *Nature*, 245: 28-30.
- HANDELSMAN, J., UGALDE, R.A. & BRILL, W.J. 1984. *Rhizobium meliloti* competitiveness and the alfalfa agglutinin J. B. *Bacteriol.*, 157: 703-707.
- HORVATH, B., KONDOROSI, E., JOHN, M., SCHMIDT, J. TOROK, I., GYORGYPAL, Z., BARABAS, I., WIENEKE, U., SCHELL, J. & KONDOROSI, A. 1986. Organization, structure and symbiotic function of *Rhizobium meliloti* nodulation genes determining host specificity for alfalfa *Cell*, 46: 335-343.
- HUBBELL, D.H. 1981. Legume infection by *Rhizobium*: a conceptual approach *Bioscience*, 31: 832-837.
- JANSSON, P.E., KENNE, L., LINDBERG, B., LJUNGGREN, H., LONNGREN, H., RUDEN, U. & SVENSSON, S. 1977. Demonstration of an octasaccharide repeating unit in the extracellular polysaccharide of *Rhizobium meliloti* by sequential degradation. *J. Am. Chem. Soc.*, 99: 3812-3815.
- JANSSON, P.B., LINDBERG, B. & LJUNGGREN, H. 1979. Structural studies of the *Rhizobium trifolii* extracellular polysaccharides. *Carbohydr. Res.* 75: 207-220.
- LÁW, I.J. & STRIJDOM, B.W. 1977. Some observations on plant lectins and *Rhizobium* specificity *Soil Biol. Biochem.*, 9: 79-84.
- LIENER, I.E., SHARON, N. & GOLDSTEIN, I.J. (eds). 1986. The lectins. Academic Press, Orlando.
- LILLICH, T.T. & ELKAN, G.H. 1968. Evidence countering the role of polygalacturonase in invasion of root hairs of leguminous plants by *Rhizobium spp.* *Can. J. Microbiol.*, 14: 617-625.
- LIS, H. & SHARON, N. 1981. Lectins in higher plants in "The Biochemistry of plants", Vol. 6, Marcus A., (ed), Academic Press, New York, págs. 371-447.
- LUQUE, E. 1981. Estudio de la eventual interacción *Rhizobium*-lectina de *Pisum sativa*. Tesis, Magister en Ciencias, Universidad Nacional, Bogotá.
- MALDONADO, C.E. 1982. Estudio comparativo de lectinas presentes en semillas y raíces de algunas leguminosas. Tesis, Químico, Universidad Nacional, Bogotá.
- MARTINEZ-MOLINA, E., MORALES, V.M. & HUBBELL, D.H. 1979. Hydrolytic enzyme production by *Rhizobium* *Appl. Environ. Microbiol.*, 38: 1186-1188.
- MARTINEZ-MOLINA, E. & OLIVARES, J. 1982. A note on evidence for involvement of pectolytic enzymes in the infection process of *Medicago sativa* by *Rhizobium meliloti* *J. Appl. Bacteriol.*, 52: 453-455.
- MARTINEZ, P. 1988. Detección de actividad pectolítica en el filtrado de cultivo de algunas cepas de *Rhizobium meliloti*. Tesis, Magister en Ciencias, Universidad Nacional, Bogotá.
- McMILLAN, J.D. & COOKE, R.C. 1969. Evidence against involvement of pectic enzymes in the invasion of root hairs by *Rhizobium trifolii* *Can. J. Microbiol.* 15: 643-645.
- NAVARRO, DE Y. 1982. Estudio de la eventual interacción *Rhizobium*-lectina de *Vicia faba*. Tesis, Magister en Ciencias, Universidad Nacional, Bogotá.
- NEWCOMB, W. 1981. Nodule morphogenesis and differentiation en "Biology of the Rhizobiaceae", Giles K.L., Atherly A.G. (eds), Academic Press, New York, págs. 247-298.
- ORJUELA, S. 1984. Influencia del medio de cultivo en la interacción lectina-*Rhizobium*. Tesis, Químico, Universidad Nacional, Bogotá.
- PEREZ, G. 1985. Interacciones lectina *Rhizobium* y su relación con el proceso de infección. Trabajo de promoción. Universidad Nacional, Bogotá.
- PETERS, N.K., FROST, J.W. & LONG, S.R. 1986. A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Science*, 233: 977-980.
- PLAZINSKI, J. & ROLFE, B.G. 1985. Analysis of the pectolytic activity of *Rhizobium* and *Azospirillum* strains isolated from *Trifolium repens* *J. Plant Physiol.*, 120: 181-187.
- PUTNOKY, P. & KONDOROSI, A. 1986. Two gene clusters of *Rhizobium meliloti* code for early essential nodulation functions and a third influences nodulation efficiency *J. Bacteriol.*, 167: 881-887.
- REDMOND, J.W., BATLEY, M., DJORDJEVIC, M.A., INNES, R.W., KUEMPEL, P.L. & ROLFE, B.G. 1986. Flavones induce expression of nodulation genes in *Rhizobium* *Nature*, 323: 632-635.
- ROBERTSEN, B.K., AMAN, P., DARVILL, A.G., McNEIL, M. & ALBERSHEIM, P. 1981. Host symbiont interactions. V. The structure of acidic extracellular polysaccharides secreted by *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium trifolii*. *Plant. Physiol.*, 67: 389-400.
- RUVKUN, G.B., LONG, S.R., MEADE, M.D. & AUSUBEL, F.M. 1981. Molecular genetics of symbiotic nitrogen fixation. Cold Harbor Spring Symp. Quant. Biol., 45: 492-499.
- SCHMIDT, J., JOHN, M., WIENEKE, U., KRUSSMANN, H-D. & SCHELL, J. 1986. Expression of the nodulation gene *nodA* in *Rhizobium meliloti* and localization of the gene product in the cytosol *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 9581-9585.
- SHEARMAN, C.A., ROSSEN, L., JOHNSTON, A.W.B. & DOWNIE, J.A. 1986. The *Rhizobium leguminosarum* nodulation gene *nodF* encodes a peptide similar to acyl-carrier protein and is regulated by *nodD* plus a factor in pea root exudate. *EMBO J.* 5: 647-652.
- SOMME, R. 1985. The structure of the acidic, exocellular polysaccharide produced by *Rhizobium trifolii*, *Bart A Carbohydr. Res.* 137: 167-171.
- SPRENT, J.I. 1984. Nitrogen fixation en "Advanced plant physiology", Wilkins M.B.; (ed), págs. 249-276, Pitman, London.
- SU L.C., PUEPPKE, S.G. & FRIEDMAN, H.P. 1980. Lectin and the soybean-*Rhizobium* symbiosis. Immunological investigations, of soybean lines, the seeds of which have been reported to lack the 120,000 dalton soybean lectin. *Biochim. Biophys. Acta*, 629: 292-304.
- SZETO, W.W., NIXON, B.T., RONSON, C.W. & AUSUBEL, F.M. 1987. Identification and characterization of the *Rhizobium meliloti* *ntrC* gene: *Rhizobium meliloti* has separate regulatory pathways for activation of nitrogen fixation genes in free-living and symbiotic cells. *J. Bacteriol.*, 169: 1423-1432.
- VANCE, C.P. 1983. *Rhizobium* infection and nodulation: A beneficial plant disease? *Ann. Rev. Microbiol.*, 37: 399-424.
- VERMA, D.P.S. & ZOGBI, V. 1978. A cooperative action of plant and *Rhizobium* to dissolve the host cell wall during development of root nodule symbiosis. *Plant Sic. Lett.*, 13: 137-142.