

# El Proceso de Infección de las Leguminosas por *Rhizobium*

David H. Hubbell \*

¿Por qué estamos interesados en los eventos biológicos del proceso de infección de las raíces de leguminosas por *Rhizobium*?

El establecimiento de una asociación simbiótica de fijación de nitrógeno entre *Rhizobium* y una planta huésped, leguminosa, puede separarse en tres etapas que son más o menos distintas: (1) infección de las raíces de las plantas, (2) inducción o formación de nódulos dentro de las raíces y (3) fijación de nitrógeno dentro de los nódulos. Nodulación y subsecuentemente fijación de nitrógeno dependen en el éxito de la etapa de infección. Es obvio que sería muy importante tener un sistema rizobia-leguminosa en el cual las infecciones de las raíces ocurran temprano y en gran número. Esto resultaría en la formación de nódulos y fijación de nitrógeno en una etapa crítica en la vida de la planta. Esta fuente de nitrógeno puede aumentar la sobrevivencia y el crecimiento de las plantas y por ende el rendimiento bajo condiciones limitantes de nitrógeno del suelo, lo cual es el objetivo final de la inoculación de leguminosas con *Rhizobium*.

Es por esta razón que estudiamos el proceso de infección de las raíces de leguminosas por *Rhizobium*. Cuando comprendamos mejor la biología de ese proceso es posible que podremos manipularlo con más eficiencia bajo condiciones de campo y así amplificar la fijación de nitrógeno por las leguminosas cultivadas.

Aunque el proceso de infección viene siendo estudiado desde el siglo pasado, este no fue descrito en forma completa y

---

\* Professor, Soils Department, University of Florida, Gainesville, Florida 32611, U.S.A.

ordenada hasta después de Fahraeus (1957) diseñó la técnica que se ha popularizado como el método de Fahraeus para el estudio de la infección de las raíces por el *Rhizobium*. Hasta ese momento, se habían hecho pocos estudios en los aspectos biológicos de la simbiosis. Los trabajos se habían concentrado en los aspectos más prácticos de la nodulación como eran la selección de cepas y el desarrollo de sistemas de inoculación que aseguraran una buena nodulación y por lo tanto un buen suministro de nitrógeno para los cultivos.

Después de la aparición de los estudios de Fahraeus, hubo un aumento en el número de publicaciones acerca de la biología de la infección que aún persiste. Actualmente disponemos de varias excelentes revisiones de literatura entre las cuales están las de Dart (1974, 1975 y 1977), Fahraeus y Sahlman (1977), y Dazzo (1978b).

En este momento sabemos cuales son los eventos que ocurren durante la infección pero no sabemos qué los causa; en otras palabras, ¿cuáles son los mecanismos bioquímicos de esos eventos?

En la presente revisión vamos a enfatizar en los descubrimientos más recientes que se han hecho al nivel molecular acerca del proceso de infección, sin tratar de ser exhaustivos. Por supuesto que una buena parte de la discusión va a ser a nivel puramente especulativo puesto que todavía no se tiene suficiente información.

El primer paso en la infección es la colonización de la rizósfera por el rizobio. El estímulo del crecimiento de la bacteria en la rizósfera parece no ser específico para cepas capaces de infectar la leguminosa sino general, para muchos microorganismos (Peters y Alexander, 1966). Sin embargo se han descrito casos en los cuales las secreciones radicales estimulan selectivamente a las cepas de *Rhizobium* del grupo infectivo asociado con la planta, como ocurre con las secreciones de homoserina por las raíces de alverja, sustancia que es utilizada preferencialmente por *R. leguminosarum* (Egeraat, 1975). Además de esto, se ha demostrado, que algunos rizobios presentan quimiotaxis positiva hacia las raíces de ciertas plantas, aunque no exclusivamente por leguminosas (Currier y Strobel, 1977).

Al mismo tiempo de estar siendo colonizada la raíz por el rizobio, se presenta el fenómeno de la adsorción del *Rhizobium* a las raíces. Hay varios mecanismos por los cuales los microorganismos se adhieren a las raíces. Unos son generales y otros son específicos para ciertas cepas y ciertas plantas. El tema ha sido recientemente revisado por Dazzo (1978a).

En un tipo de adsorción están involucradas las lectinas, que son proteínas o glicoproteínas que tienen la capacidad de reconocer y unirse a ciertos azúcares en una forma muy específica. La participación de las lectinas en la adsorción selectiva del rizobio a las raíces de las leguminosas fué sugerido por primera vez por Bohlool y Schmidt (1984) en sus estudios de la nodulación de soya por *R. japonicum*. De acuerdo con el modelo propuesto por Dazzo y Hubbell (1975a) para explicar la especificidad de infección en trébol, una lectina, llamada trifoliin, reconocería y se uniría a un antígeno común presente tanto en la superficie de la bacteria como en la pared celular vegetal (Dazzo, 1978a; Dazzo et al., 1978). La lectina sería al menos bivalente de modo que formaría un puente entre dos antígenos comunes absorbiendo la bacteria a la superficie de la raíz (Dazzo, 1978b). Otro modelo propuesto por Solheim (1975) indica que la pared celular del pelo radical posee un "factor estabilizante" que es liberado yendo a unirse a un "factor deformador" en la superficie de la bacteria. La combinación de los dos factores sería la que le conferiría a la bacteria afinidad por ciertos sitios receptores en la pared del pelo radical.

La selectividad de la adsorción del *Rhizobium* infectivo a las células de la leguminosa homóloga ha sido demostrada en soya (Bal et al., 1978; Bohlool y Schmidt, 1974), trébol (Dazzo et al., 1976) y guisante (Sanders et al., 1978). En leguminosas tropicales, sin embargo, parece que la adsorción no es un fenómeno que contribuya fundamentalmente a la selectividad de la infección (Dazzo y Hubbell, 1975b).

La adsorción del rizobio a la superficie de las células vegetales es necesaria para la infección pero no es el único factor involucrado en la selectividad de la nodulación (Dazzo, 1978b). Por ejemplo, híbridos de *Azotobacter vinelandii* obtenido por transformación con DNA de *Rhizobium trifolii* y que poseen el receptor para trifoliin pueden adsorverse a la superficie de los pelos radicales de trébol pero no pueden infectarlo (Bishop et al., 1977).

A medida que el rizobio crece en la rizósfera produce sustancias que deforman los pelos radicales. Hay varias categorías de deformación, como lo explican Yao y Vincent (1976): deformación moderada, ramificación y deformación extrema. La deformación moderada no es específica; puede ser causada por rizobios heterólogos, y en la producción de la cual parecen estar involucradas hormonas de crecimiento sintetizadas por el rizobio. La ramificación de los pelos radicales parece ser producida por un polipéptido pequeño (p.m. 5000) muy difusible y extremadamente activo (Ljunggren, 1969; Yao y Vincent, 1976; Solheim y Raa, 1973). Este tipo de deformación es más específico que el primero mencionado pero también, a veces, se observa en combinaciones no homólogas. La deformación extrema consiste en el torcimiento en 180 grados de la punta del pelo radical formando lo que se conoce como el "cayado del pastor". Esta deformación extrema es observada únicamente en las combinaciones homólogas *Rhizobium*-leguminosa y es producida por un factor que no difunde o sea que parece estar unido a la superficie de la bacteria (Yao y Vincent, 1976).

El siguiente paso en la infección es la formación del hilo infectivo. El comienzo del hilo infectivo fué (y todavía lo es hasta cierto punto) un tema debatido. Tres teorías se lanzaron para tratar de explicar esta etapa de la infección. Una de ellas, propuesta por Dart y Mercer (1964), indicaba que habían formas pequeñas, cocoideas y multiflageladas del *Rhizobium* que pasaban a través de intersticios entre las microfibrillas de celulosa de la pared del pelo radical y eran las causantes de la infección. Nutman (1956) propuso que el hilo infectivo es el efecto de una invasión del crecimiento del pelo radical. De alguna forma el rizobio influiría en el mecanismo regulador de la síntesis de la pared celular para dirigir su crecimiento hacia adentro. Según esta teoría no hay ruptura de la pared celular sino una invaginación de ella. Ljunggren y Fahraeus (1961) propusieron que el rizobio produciría un polisacárido determinado que inducía la producción de poligalacturonasa por la planta con el consecuente ablandamiento de la pared del pelo radical y formación del hilo infectivo. Esta inducción específica de la producción de poligalacturonasas por la planta no pudo ser comprobada por otros investigadores (Lillich y Elkan, 1968; Mc-Millan y Cooke, 1969; Solheim y Raa, 1971). Sin embargo, en trabajos recientes se han obtenido resultados positivos apoyando la teoría de Fahraeus de la inducción específica de la pro-

ducción de poligalacturonasas por la planta inducida por *Rhizobium* homólogos (Palomares, 1975; Olivares et al., 1977).

Recientemente nosotros demostramos que el *Rhizobium* creciendo en forma libre es capaz de producir enzimas pectolíticas (Hubbell et al., 1978). Esta búsqueda se había hecho anteriormente (McCoy, 1932; Smith, 1958; Ljunggren, 1969) pero el método utilizado en estos experimentos no tenía la sensibilidad necesaria para detectar las cantidades mínimas de enzima que se producen. Nosotros utilizamos el método de pocillos en placas de petri el cual tiene mucho mayor sensibilidad.

Algunos trabajos de microscopía electrónica del proceso infectivo (Napoli y Hubbell, 1975; Chandler, 1978) indican que hay cierta destrucción de la pared celular vegetal cercana a las bacterias invasoras. Además en el caso de la infección de las raíces de maní, estudiadas por Chandler (1978), el rizobio penetra la raíz intercelularmente y solo algo adentro de la corteza radical es cuando viene a introducirse dentro de las células. Durante esta primera etapa intercelular se observa una hidrólisis de la lamela media. Estas observaciones sugieren la idea de que no sólo deben producirse pectinasas durante el proceso de infección sino también celulasas y tal vez hemicelulasas. Se ha demostrado, hace poco en nuestro laboratorio, que el rizobio también produce celulasas y otra enzima, la cual aún no ha sido bien caracterizada, pero que sospechamos es hemicelulasa (Martínez-Molina et al., en publicación). Las celulasas producidas son del tipo denominado Cx.

Se ha observado diferencias en el tipo y las cantidades de enzimas celulíticas producidas entre *Rhizobium* de crecimiento rápido y lento. Esta observación refleja las diferencias en el sistema de infección entre ambos grupos de microorganismos.

El estudio de la producción de enzimas hidrolíticas por el rizobio está en su etapa inicial. No se ha comprobado aún que jueguen un papel en el proceso de infección aunque es fácil imaginar que sí. En el caso de aceptar esta hipótesis, ¿cuál sería la función de estas enzimas?

Después o durante la colonización de la raíz el rizobio se adhiere a la pared celular del pelo radical a través del puente

formado por la lectina la cual se une específicamente al antígeno común rizobio-leguminosa. Una sustancia no difusible causa la distorsión extrema del pelo radical con la formación del "cayado del pastor". La punta del pelo radical, completamente distorsionada, encierra *Rhizobium* permitiendo el aumento de concentración de algunos metabolitos, entre ellos las enzimas hidrolíticas, que debilitarían la pared celular incrementando el paso de sustancias o sea estableciendo una comunicación bioquímica más íntima entre la bacteria y la leguminosa. Este intercambio daría como resultado la relocalización e inversión del crecimiento de la pared celular lo cual causaría la formación del hilo infectivo. La naturaleza de las sustancias que se intercambiarían ya se ha convertido en un tópico de discusión en nuestro laboratorio y probablemente lo sea durante algún tiempo. Estos metabolitos pueden ser proteínas similares a las que funcionan en la regulación y dirección de la biosíntesis de la pared celular o quizás que activarían genes en la planta que hasta ese momento no se habían expresado. También pueden ser, porque no, ácidos nucleicos que serían transcritos por la planta en una forma semejante a lo que ocurre en las infecciones por *Agrobacterium*.

Otra función de estas enzimas hidrolíticas podría ser la liberación de las lectinas de la pared celular aumentando la rapidez de la etapa de adherencia. Se ha comprobado que las enzimas pectinolíticas liberan proteínas que están unidas a la pared celular vegetal (Strand et al., 1976).

La deformación pronunciada puede ser causada, al menos en parte, por alguna de estas enzimas. Las poligalacturonasas, por ejemplo, generalmente se presentan fuertemente adheridas a la superficie bacteriana, lo que las hace muy poco difundibles, son producidas en muy pequeñas cantidades y ciertamente tienen que causar algún efecto en las puntas de los pelos radicales los cuales están compuestos casi exclusivamente por pectina.

Un paso más avanzado en el proceso de nodulación es la salida del *Rhizobium* del hilo infectivo, ya en la corteza radical, con la formación de las vesículas bacteroidales; el cual puede ser causado por un nuevo balance en la concentración de las diferentes enzimas hidrolíticas.

El concepto de especificidad de la nodulación podría ser investigado desde el punto de vista de la especificidad enzima-

sustrato de estas hidrolasas. La variedad de las enzimas hidrolíticas es enorme. Algunas atacan los extremos de las moléculas y otras cortan en el centro de ellas. Unas actúan con cierto grado de esterificación como es el caso de las pectinesterasas o con cierto grado de hidrólisis o sustitución como es el caso de las celulasas Cx. Además de esto, la síntesis de éstas enzimas está regulada por una variedad de controles. Algunas son producidas constitutivamente mientras que otras son inducidas por ciertas sustancias y reprimidas por otras (véase Rexova-Benkova y Markovic, 1976; Whitaker, 1971; Dekker y Richards, 1976). La capacidad de un microorganismo para degradar un polisacárido dependería de su capacidad de producir el grupo completo de enzimas hidrolíticas, y la velocidad de degradación dependería de la cantidad de enzimas producidas y del balance de concentración de estas enzimas. Existe un buen cúmulo de evidencia a favor del papel de la especificidad de las enzimas, que degradan los componentes de la pared celular producidas por un patógeno, en la especificidad de infección. Pequeños cambios en la composición de la pared celular que hacen estas enzimas inoperantes dan como resultado una planta resistente a la infección (Albersheim et al., 1969). Hay que tener en cuenta que ningún organismo que produzca ya sea enzimas pectinolíticas, celulícas o hemicelulíticas produce un solo tipo de ellas y a veces no solo produce varios tipos de enzimas sino un grupo de isoenzimas de cada uno de ellas.

En conclusión, si la característica de estas enzimas es la variedad, lo más probable es que vayamos a encontrar la misma variedad cuando estudiemos más a fondo la producción de enzimas hidrolíticas por *Rhizobium* y tal vez se encuentre que operen como otro punto de selección en la nodulación de las leguminosas además del de adherencia a través de una lectina.

Estos estudios recientes del proceso de infección tienen un potencial considerable para aplicación práctica en relación al mejoramiento de la metodología de inoculación como ya existe. Por ejemplo, sabemos que las enzimas hidrolíticas extracelulares de *Rhizobium* son inducibles. Si se crece el inoculante bacteriano bajo condiciones de inducción de esas enzimas, en unión a fuentes apropiadas de carbono en el medio de crecimiento, entonces las enzimas críticas para la infección están ya presentes en las células cuando se formula el inoculante y esas células son altamente infectivas. También, es posible añadir materiales

inducibles a la turba para asegurar que las células se mantengan en una condición altamente infectiva hasta el momento de la inoculación. De la misma manera, es posible añadir materiales inductores al pegante, como la goma arábica, que se usa para aplicar inoculante de turba a la superficie de las semillas de leguminosas antes de sembrarlas. Así podemos asegurar la presencia de rizobios infectivos en la rizósfera de la semilla ya germinada.

#### REFERENCIAS

- ALBERSHEIM, P., T. M. Jones, and P. D. English. 1969. Biochemistry of the cell wall in relation to infective processes. *Ann. Rev. Phytopathol.* 7:171-194.
- BAL, A. K., S. Shantharam, and S. Ratnam. 1978. Ultrastructure of *Rhizobium japonicum* in relation to its attachment to root hairs. *J. Bacteriol.* 133:1393-1400.
- BISHOP, P.E., F. B. Dazzo, E. R. Appelbaum, R. J. Maier, and W. J. Brill. 1977. Intergeneric transfer of genes involved in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Science* 198:938-940.
- BOHLOOL, B.B. and E. L. Schmidt. 1974. Lectins: possible basis for specificity in the *Rhizobium*-legume root nodule symbiosis. *Science* 185:269-271.
- CHANDLER, M.R. 1978. Some observations on infection of *Arachis hypogaea* L. by *Rhizobium*. *J. Exp. Bot.* 29:749-756.
- CURRIER, W. W. and G. A. Strobel. 1977. The chemotactic behavior of trefoil *Rhizobium*. *FEMS Microbiol. Letters* 1:243-246.
- DART, P. J. 1974. The infection process. In "Biological nitrogen fixation." (A. Quispel, ed.) pp 381-429. North Holland Publish. Co. Amsterdam.
- DART, P. J. 1975. Legume root nodule initiation and development. In "The development and functions of roots." (J. G. Torrey and D. T. Clarkson, eds.) pp 467-506. Academic Press. London.
- DART, P. J. 1977. Infection and development of leguminous nodules. In "A treatise on dinitrogen fixation. Section III. Biology." (R.W.F.



- Hardy and W.S. Silver, eds.) pp 367-473. John Wiley and Sons. New York.
- DART, P. J. and F. V. Mercer. 1964. The legume rhizosphere. Arch. Microbiol. 47:344-378.
- DAZZO, F. B. 1978a. In "Adsorption of microorganisms to surfaces." (G. Bitton and K. C. Marshall, eds.) John Wiley and Sons. New York.
- DAZZO, F. B. 1978b. Infection processes. Presented at the International Legume Conference, Royal Botanic Gardens, Kew, England.
- DAZZO, F. B. and D. H. Hubbell. 1975a. Cross-reactive antigens and lectin as determinants of symbiotic specificity in the *Rhizobium*-clover association. Appl. Microbiol. 30:1017-1033.
- DAZZO, F.B. and D. H. Hubbell. 1975b. Concanavalin A: Lack of correlation between binding to *Rhizobium* and specificity in the *Rhizobium*-legume symbiosis. Plant Soil 43:713-717.
- DAZZO, F. B., C.A. Napoli, and D.H. Hubbell. 1976. Adsorption of bacteria to roots as related to host specificity in the *Rhizobium*-clover symbiosis. Appl. Environ. Microbiol. 32:166-171.
- DAZZO, F.B., W.E. Yanke, and W.J. Brill. 1978. Trifoliin: A *Rhizobium* recognition protein from white clover. Biochem. Biophys. Acta 539:276-286.
- DEKKER, R.F.H. and G.H. Richards. 1976. Hemicellulases: Their occurrence, purification, properties, and mode of action. Adv. Carbohydrate Chem. Biochem. 32:277-352.
- EGERAAT, A.W.S.M. van 1975. The growth of *Rhizobium leguminosarum* on the root surface and in the rhizosphere of pea seedlings in relation to root exudates. Plant Soil 42:367-379.
- FAHRAEUS, G. 1957. The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. J. Gen. Microbiol. 16:374-381.
- FAHRAEUS, G. and K. Sahlman. 1977. The infection of root hairs of leguminous plants by nodule bacteria. Annis. Acad. Reg. Sci. Upsalensis 20:103-131.

- HUBBELL, D.H., V.M. Morales, and M. Umali-García. 1978. Pectolytic enzymes in *Rhizobium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 35:210-213.
- LILLICH, T.T. and G.H. Elkan. 1968. Evidence countering the role of polygalacturonase in invasion of root hairs of leguminous plants by *Rhizobium* spp. *Can. J. Microbiol.* 14:617-625.
- LJUNGGREN, H. 1969. Mechanism and pattern of *Rhizobium* invasion into leguminous root hairs. *Physiol. Plant. supplement V.* 86 pp.
- LJUNGGREN, H. and G. Fahraeus. 1961. The role of polygalacturonase in root hair invasion by nodule bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 26:521-528.
- McCOY, E. 1932. Infection by *Bact. radicolica* in relation to the microchemistry of the host's cell walls. *Proc. Roy. Soc. (London), Series B.* 110:512-533.
- McMILLAN, J. D. and R. C. Cooke. 1969. Evidence against involvement of pectic enzymes in the invasion of root hairs by *Rhizobium trifolii*. *Can. J. Microbiol.* 15:643-645.
- NAPOLI, C.A. and D. H. Hubbell. 1975. Ultrastructure of *Rhizobium* induced infection threads in clover root hairs. *Appl. Microbiol.* 30:1003-1009.
- NUTMAN, P. S. 1956. The influence of the legume in root-nodule symbiosis. *Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc.* 31:109-151.
- OLIVARES, J., E. Montoya, and A. Palomares. 1977. Some effects derived from the presence of extrachromosomal DNA in *Rhizobium meliloti*. In "Recent developments in nitrogen fixation." (W. Newton, J. R. Postgate, and C. Rodríguez-Barrucco, eds.) pp. 375-385. Academic Press. New York.
- PALOMARES, A. J. 1975. Estudio sobre la producción de poligalacturonasa en la asociación *Rhizobium*-leguminosa. Tesis doctoral (Universidad de Granada, España).
- PETERS, R. J. and M. Alexander. 1966. Effect of legume exudates on the root nodule bacteria. *Soil Science* 102:380.

- REXOVA-Benkova, L and O. Markovic. 1976. Pectic enzymes. Adv. Carbohydrate Chem. Biochem. 33:323-385.
- SANDERS, R.E., R.W. Carlson, and P. Albersheim. 1978. A *Rhizobium* mutant incapable of nodulation and normal polysaccharide secretion. Nature 271:240-242.
- SMITH, W.K. 1958. A survey of the production of pectic enzymes by plant pathogenic and other bacteria. J. Gen. Microbiol. 18:33-41.
- SOLHEIM, B. 1975. Proc. NATO Conf. Specificity in plant diseases. Advance Study Institute, Sardinia.
- SOLHEIM, B. and J. Raa. 1971. Evidence countering the theory of specific induction of pectin-degrading enzymes as basis for specificity in *Rhizobium*-leguminosae associations. Plant Soil 35:275-280.
- SOLHEIM, B. and J. Raa. 1973. Characterization of the substances causing deformation of root hairs of *Trifolium repens* when inoculated with *Rhizobium trifolii*. J. Gen. Microbiol. 77:241-247.
- STRAND, L.L., C. Richtoris, and M. Mussell. 1976. Polygalacturonase release cell-wall-bound proteins. Plant Physiol. 58:722-725.
- WHITAKER, D.R. 1971. Cellulases. In "The enzymes". (P. D. Boyer, ed). Vol. 5, pp 273-296. Academic Press, New York.
- YAO, P. Y. and J. M. Vincent. 1976. Factors responsible for the curling and branching of clover root hair by *Rhizobium*. Plant Soil 45:1-16.

## **PUBLICACIONES RECIENTES DE LA EAP**

La Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, pone a la venta cuatro publicaciones editadas recientemente a través de su Proyecto Manejo Integrado de Plagas en Honduras (MIPH).

### **GUIA PARA EL DIAGNOSTICO Y CONTROL DE ENFERMEDADES DE PLANTAS**

**Vol. I**

*Mario Contreras y Octavio Ramírez*  
*MIPH—EAP No. 35. 1986. 98 p.*

Este volumen presenta un enfoque básico sobre los conceptos generales de enfermedades y los patógenos que las provocan. También hace una descripción de las categorías taxonómicas en que se agrupan los patógenos y se incluye información sobre la manera de obtener muestras y aislar los patógenos.

Además, contiene 25 hojas informativas ilustradas sobre igual número de enfermedades que afectan diferentes cultivos, estas hojas permiten el reconocimiento de los patógenos, sus síntomas y daños. También se explica el proceso de desarrollo de las enfermedades en diferentes condiciones ambientales, así como las medidas de prevención y control.

La información por cada enfermedad está publicada en hojas informativas independientes con su respectiva ilustración, que pueden ser retiradas o colocadas en carpetas con anillo, para un fácil manejo. Esto permitirá al usuario incorporar el segundo volumen de la Guía que estará disponible próximamente.