



Ofrenda, 1984

Los árboles fijadores de nitrógeno y sus mecanismos biológicos

◆ Carlos Acosta



La fijación biológica de nitrógeno es el resultado de una simbiosis entre una planta y una bacteria, relación en la que la planta aporta estructuras físicas (nódulos) para el desarrollo del ciclo vital de la bacteria que a su vez toma el nitrógeno atmosférico (N_2) y lo convierte en formas aprovechables para el crecimiento de la planta como el amonio (NH_4). Este hecho nos permite considerar la posibilidad de utilizar esta relación en beneficio de la agricultura, eliminando el uso de fertilizantes químicos, lo que reduce considerablemente la contaminación del suelo y del agua en nuestro entorno. Para ello es necesario conocer los mecanismos involucrados en el proceso de fijación biológica de las plantas anuales y de los árboles. Muchos de los árboles forestales de México son leguminosas, nodulan con bacterias de los géneros *Rhizobium* o *Bradyrhizobium* y tienen la capacidad de fijar el nitrógeno que se encuentra en la atmósfera en forma de gas. Existen más de 18 000 especies de leguminosas de las cuales cerca del 40% son arbóreas. De las especies arbóreas sólo el 18% ha sido analizado en cuanto a su capacidad de nodulación y se ha encontrado que el 94% de la subfamilia *mimosidae-papilionidae* nodulan y sólo el 34% de la *ceasalpinoidea* presentan nodulación.¹

En la búsqueda de sistemas de cultivo que reemplacen o mejoren los métodos tradicionales que ayuden al desarrollo de métodos ecológicamente estables, los Árboles Fijadores de Nitrógeno (AFN) juegan un papel muy importante. Sirven para reciclar nutrientes y agua desde la profundidad del suelo, para la fijación atmosférica de N y para reducir la temperatura del suelo, así como la evaporación del agua del mismo. Los AFN pueden crecer en asociación con otros cultivos en sistemas agroforestales, donde sirven como fuente de leña, alimento animal, restauradores de la fertilidad del suelo y para reducir la erosión.²

Las bacterias fijadoras de Nitrógeno (*Rhizobia*)

Filogenéticamente el género *Rhizobium* pertenece a la subdivisión alfa de las Proteobacterias. Originalmente el género *Rhizobium* fue clasificado como dos géneros, el *Rhizobium* que agrupa las cepas de rápido crecimiento y el *Bradyrhizobium* creado para incluir a las cepas de crecimiento lento. Posteriormente ha aumentado de manera considerable el número de aislamientos de bacterias de diferentes plantas en todo el mundo y se han caracterizado por métodos modernos de taxonomía, lo que ha llevado a la descripción de

¹ O. N. Allen y E. K. Allen. *The Leguminosae: a source book of characteristics, uses and nodulation*. Madison, USA, The University of Wisconsin Press, 1981.

² S. K. A. Danso, G. D. Bowen y N. Sanginga. *Biological nitrogen fixation in trees in agroecosystems. Plant and soil*, 1992, pp. 141, 177-196.

◆ Profesor-Investigador, Facultad de Ciencias Agropecuarias



nuevos géneros y especies. El género *Rhizobium* es una bacteria que presenta un gran número de especies de rápido crecimiento que forman colonias gomosas y translúcidas en agar-manitol-levadura y con capacidad de establecer una relación simbiótica con las plantas de la familia *Leguminosae*, que se caracteriza por la formación de nódulos en las raíces. Los nódulos son de formas, tamaños y apariencias diversas que dependen específicamente de la especie vegetal. La bacteria dentro del nódulo se transforma en “bacteroide”. La característica principal de este “bacteroide” es la capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico que puede ser utilizado por la planta en sus procesos de crecimiento y desarrollo, además de que propicia el aumento de la fertilidad de un suelo, beneficiando a todo tipo de plantas que crecen en él, aunque no sean de la familia de las leguminosas, al tomar el nitrógeno del aire y convertirlo en lo que se puede llamar fertilizante biológico.

El mecanismo de la simbiosis

La simbiosis inicia con un intercambio de señales moleculares entre ambos organismos. La planta genera compuestos químicos del grupo de los flavonoides e isoflavonoides, los cuales son detectados por la bacteria causando la activación de un grupo específico de genes llamado “genes de nodulación”. Los productos de los genes de nodulación sintetizan y ayudan a secretar los llamados factores *nod*, que están constituidos

por compuestos químicos que contienen lipoquinaoligosacáridos (LCOs).³ Las bacterias tienen hospederos específicos y cada especie de bacteria puede infectar sólo uno o un limitado número de especies de plantas, implicando la especificidad del hospedero. Por lo que las bacterias han sido clasificadas en grupos de inoculación cruzada en función de la especificidad del hospedero. Se ha demostrado que la naturaleza química exacta de los factores *nod* secretados por cada especie de bacteria juega un papel importante en la determinación de la especificidad del hospedero y en el inicio del proceso de nodulación.⁴

Estructura y biosíntesis de los factores *nod*

La estructura fundamental común a todos los factores *nod* conocidos es una cadena formada por proteína unida a una fracción de ácido graso. La naturaleza exacta de estos compuestos varía grandemente según la especie de bacteria de *Rhizobium*. Los genes bacterianos de nodulación determinan la estructura final de los factores *nod*. Los genes de nodulación se indican en la nomenclatura genética como “*nod*”, “*noe*” o “*noI*”. Para simplificar, el grupo total de genes de nodulación se designa genéricamente como “genes *nod*”. En la mayoría de las bacterias fijadoras, los genes *nod* están localizados en una estructura de la célula conocida como “plásmido simbiótico (Sym)”, y en otras se encuentran en el cromosoma. Los genes *nod* (*nodA*, *nodB*, *nodC* y *nodD*) están presentes en todos los *Rhizobia* estudiados. El

³ H. P. Spaink y B. J. J. Lugtenberg. “Function of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* nodulation genes involved in the determination of host specificity”, en *Molecular Biology of the Rhizobium-legume symbiosis*. T. Ruiz-Argueso. Madrid, Fundación Juan March, 1991, pp. 15-18.

⁴ I. J. Sprent. *Nodulation in legumes*. Royal Botanical Gardens. Great Britain, The Cromwell Press Ltd, 2001.

gene *nodD* codifica a un factor que se activa por flavonoides secretados por la planta y la proteína *nodD* regula la expresión de los otros genes *nod*. Estos tres genes siempre están localizados en una estructura que ordena su aparición, esta estructura se conoce como “operón”. La función de las proteínas *nod* restantes es el transporte y la secreción de factores *nod*, o catalizan la formación de intermediarios en la biosíntesis de substituyentes determinando de este modo, el rango del hospedero de la bacteria, o también pueden tener una función en la efectividad del proceso de infección. La actividad combinada de las diferentes proteínas *nod* en una cepa de *Rhizobium* determina la composición química exacta de los factores *nod* secretados, un importante aspecto de la especificidad del hospedero por la cepa.

Efecto de los factores *nod* en las plantas

Aunque el receptor químico de la planta aún no se ha identificado completamente, el efecto de los factores *nod* en las plantas ha sido extensamente estudiado y es todavía un objeto de mayor atención. Los genes *nod* no están activos después de la diferenciación de *Rhizobium* dentro de los nódulos a formas fijadoras de nitrógeno (bacteroides), aunque se han encontrado factores *nod* dentro de los hilos de infección y en el citoplasma de células en el área de prefijación y en el área de fijación dentro de los nódulos.

El resultado de la detección de los factores *nod* por la planta hospedera y los cambios resultantes

en los patrones de la expresión genética en la inducción de una serie de cambios morfológicos preparan y facilitan la entrada de bacterias en la planta. El primer cambio detectado es una rápida despolarización del plasma de la membrana del pelo radical, mismo que depende de los cambios en el contenido de calcio del pelo radical. Subsecuentemente ocurre la deformación del pelo radical, la formación del hilo de preinfección, las divisiones de células de la raíz y por último se lleva a cabo la formación de un primordio de nódulo. El hecho de que la planta pueda formar un nódulo completo en la ausencia de *Rhizobium*, como en el caso de la alfalfa, demuestra que los genes de las plantas poseen la información genética necesaria para la formación del nódulo y que los factores *nod* son simplemente el detonante para los cambios morfológicos de la planta. En respuesta a la infección por *Rhizobium*, las plantas leguminosas expresan genes llamados “de nodulación temprana” (genes ENOD) los cuales están implicados en los estados iniciales de la nodulación. La función exacta de estos genes aún no es muy clara.

Infección y desarrollo de nódulo

La infección de la raíz y el desarrollo del nódulo incluye la colonización del área cercana a la raíz conocida como “rizósfera”, su enlace con la raíz al sitio de la infección y la absorción de flavonoides de la planta por el *Rhizobium*. Estas acciones modifican la expresión genética para iniciar la producción de factores específicos para que ocurra la infección



y la nodulación. El *Rhizobium* induce cambios específicos en el desarrollo de la pared celular de la planta y en ese estado la bacteria está posibilitada para cruzar la barrera de la pared celular. Existen dos mecanismos de infección. En uno, *Rhizobium* invade los pequeños pelos radicales que inician el crecimiento causándoles un enrollamiento del pelo que encierra a una microcolonia de *Rhizobium*. De esta manera induce la producción de un hilo de infección con la célula del pelo radical. El hilo de infección crece en las células corticales de la raíz llevando al *Rhizobium*.

El otro, ocurre a través de las células epidérmicas, las cuales no han formado pelos radicales, usualmente en el rompimiento de la integridad de la corteza causada por la emergencia de una raíz lateral. El *Rhizobium* invade la raíz creciendo en los espacios intercelulares, una microcolonia causa el adelgazamiento de la pared de células corticales y crece alrededor de la bacteria, depositando materiales de la pared celular en la superficie interna de la pared y la bacteria parece crecer a través de esta barrera.

La mayoría de los nódulos de árboles parecen desarrollarse desde el hilo de infección y también se caracterizan por un meristemo terminal, el cual forma las células para el crecimiento del nódulo. A un lado del meristemo la expansión de células está invadida por hilos de infección liberados por el *Rhizobium*. El cual entonces se divide y se multiplica, al mismo tiempo que permanece encerrado en una membrana derivada

de la planta. Esta membrana puede contener uno o varios bacteroides, los cuales pueden tener forma de bastón pero por algunas asociaciones pueden ser muy alargados o pleomórficos. Los nódulos perennes pueden ser muy grandes (más de tres centímetros de largo), con frecuencia con varios meristemos desarrollados del original, dando al nódulo una apariencia de collar.

Existen diferencias entre las procedencias geográficas y la efectividad con ciertas cepas de bacterias. El suelo contiene muchos tipos de *Rhizobium*; y en algunos suelos, las poblaciones de cepas apropiadas de *Rhizobium* pueden estar ausentes o ser pequeñas como para que la nodulación ocurra. El género *Bradyrhizobium* es de lento crecimiento en medio de cultivo en laboratorio, pero es el tipo predominante en la mayoría de los suelos tropicales, nodulando efectivamente muchas plantas tropicales. Se pensaba que todas las familias de leguminosas arbóreas eran noduladas por *Bradyrhizobium* pero recientemente se han encontrado otros géneros.⁵

Algunas veces los suelos contienen cepas de bacterias que nodulan pero que no son muy efectivas en la fijación de nitrógeno. En esta situación, la inoculación de las plantas con una cepa superior puede suplantar a la población indígena del suelo en la formación de nódulos. Esto no es fácil porque sólo un pequeño número de bacterias puede ser agregado al suelo, comparado con la gran población de *Rhizobium* existente en el mismo. Para superar la competencia de la población indígena la cepa

⁵ C. M. Acosta y E. Martínez Romero. *Diversity of rhizobia from nodules of the leguminous tree Gliricidia sepium, a natural host of Rhizobium tropici*. Arch. Microbiol, 2002, pp. 178, 161-164.

del inóculo necesita tener una habilidad intrínseca para competir en la formación de nódulos y ser capaz de colonizar la raíz rápidamente, así que la cepa debe estar presente en la zona de la raíz susceptible a la nodulación.

Control del número y la senescencia de nódulos

El desarrollo de un nódulo en la raíz involucra un complejo y continuo intercambio de señales entre la planta hospedera y la bacteria. Es una interacción finamente armónica y el proceso puede abortar en cualquier momento. La nodulación está bajo control genético de ambos compañeros pero se conoce poco de la forma en que cada simbiote modifica la expresión de genes en el otro.

La existencia de nódulos en una raíz parece influenciar la formación de otros nódulos. En la soya esto parece ser a través de un factor que trasloca a la raíz y produce menor nodulación. Para algunas especies de árboles el nivel de este control varía de planta a planta y entre especies. Así, el número de nódulos en acacia puede variar de alrededor de 200 en plantas de ocho meses de edad a varios miles de nódulos en plantas más viejas. La extensiva nodulación en algunas plantas pudiera ser desfavorable y causar un aspecto de fatiga en las plantas, lo que no se observa que en aquellas que tienen pocos nódulos.

Para algunas especies hay un crecimiento cíclico de los nódulos en la estación lluviosa seguida por la senescencia en la estación seca. La senescencia

inicia en la base del nódulo en las células más viejas, cambiando a verde o café debido a cambios en la hemoglobina.⁶ La degeneración continúa hacia el meristemo y entonces el nódulo drena el contenido dejando una cáscara vacía, la cual se desprende de la raíz liberando el *Rhizobium* de regreso al suelo. Los nódulos se forman otra vez cuando se desarrollan nuevas raíces. Se conoce poco acerca de los factores que provocan la senescencia del nódulo o de la permanencia en forma perenne de otros nódulos. El tipo de la nodulación está influenciado a cierta extensión por la cepa de *Rhizobium*, algunas cepas menos efectivas forman nódulos que mueren más pronto, pero el proceso parece estar determinado por la planta hospedera.

Muchos nódulos de los árboles de leguminosas se caracterizan por una gruesa cáscara como capa de protección que contiene una lámina periférica de células duras y gruesas. Las células de la cáscara también contienen muchos taninos. Ambas características son presumiblemente adaptaciones protectoras contra la desecación y el ataque de plagas. Poco se conoce de la tolerancia de especies arbóreas a los niveles de nitrógeno en el suelo, aunque la nodulación es estimulada por pequeñas cantidades de fertilizante nitrogenado y es inhibida por grandes cantidades. La adición de pequeñas cantidades de fertilizante nitrogenado (30-50 Kg/Ha) puede aumentar el crecimiento de las plántulas y produce una nodulación más extensiva.

⁶ J. Homchan, R. Date y R. J. Roughley. *Responses to Inoculation with root-nodule bacteria by Leucaena leucocephala in soils of NE Thailand*. Tropical glasslands, 1989, pp. 23, 92-97.