



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica  
y del Medio Natural

SIMBIOSIS ENTRE *Rhizobium* Y LEGUMINOSAS PARA  
LA MEJORA DE LA CALIDAD DEL SUELO FRENTE A  
SITUACIONES ADVERSAS

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Jiménez Nieto, Nuria

Tutor/a: Pallotti Sagripanti, Claudia Gabriela

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022

# SIMBIOSIS ENTRE *Rhizobium* Y LEGUMINOSAS PARA LA MEJORA DE LA CALIDAD DEL SUELO FRENTE A SITUACIONES ADVERSAS

Introducción .....	1
1. Objetivos .....	3
1.1 Objetivo general .....	3
1.2 Objetivos específicos .....	3
2. Metodología .....	4
2.1 Criterios de inclusión .....	4
2.2 Búsqueda inicial y final.....	4
2.3 Análisis Bibliométrico en el software VosViewer .....	5
3. Resultados y Discusiones .....	5
3.1 Análisis bibliométrico en el software VosViewer.....	5
3.2 Caracterización taxonómica de <i>Rhizobium</i> .....	9
3.3 Especies simbióticas del género <i>Rhizobium</i> .....	10
3.3.1 <i>Rhizobium leguminosarum</i> .....	11
3.3.2 <i>Rhizobium etli</i> .....	12
3.3.3 <i>Rhizobium phaseoli</i> .....	13
3.4 Nodulación .....	13
3.5 Principales especies de Fabaceae que establecen simbiosis con.....	15
<i>Rhizobium</i> .....	15
3.6 Objetivo de la simbiosis entre <i>Rhizobium</i> - Fabáceas.....	17
3.7 Los factores abióticos que influyen en el rendimiento de la simbiosis entre <i>Rhizobium</i> - Fabáceas.....	20
3.8 Estrategias de la Biotecnología para la mejora de la tolerancia de especies vegetales ante situaciones de estrés abiótico .....	22
3.8.1 Regulación en la expresión de genes .....	25
3.9 Simbiosis entre <i>Rhizobium</i> , micorrizas y especies vegetales.....	29
4. Conclusiones .....	30
Bibliografía .....	32

## Lista de figuras y tablas

<b>Figura 1.</b> Análisis Bibliométrico de coocurrencia sobre estudios relacionados con la simbiosis entre <i>Rhizobium</i> y especies vegetales .....	6
<b>Figura 2.</b> Análisis Bibliométrico de coocurrencia sobre estudios relacionados con la simbiosis entre <i>Rhizobium</i> y especies vegetales, coocurrencia de palabras con “Simbiosis” .....	6
<b>Figura 3.</b> Análisis Bibliométrico de coocurrencia sobre autores principales relacionados con la simbiosis entre <i>Rhizobium</i> y especies vegetales .....	7
<b>Figura 4.</b> Análisis Bibliométrico de coocurrencia sobre autores principales relacionados con la simbiosis entre <i>Rhizobium</i> y especies vegetales. Autores relacionados entre sí .....	7
<b>Figura 5.</b> Análisis Bibliométrico de coocurrencia sobre principales líneas de investigación relacionadas con la simbiosis entre <i>Rhizobium</i> y especies vegetales.....	8
<b>Figura 6.</b> Análisis Bibliométrico de coocurrencia sobre las futuras líneas de investigación relacionadas con la simbiosis entre <i>Rhizobium</i> y especies vegetales .....	9
<b>Figura 7.</b> Observación macroscópica de colonias de <i>Rhizobium</i> en medio de cultivo YEMA-CR, (A) colonias después de 5 días de incubación y (B) colonias después de 8 días post incubación (Rubiano, 2015) .....	10
<b>Figura 8.</b> Mapa filogenético de <i>Rhizobium leguminosarum</i> (NCBI, 2020) .....	11
<b>Figura 9.</b> Mapa filogenético de <i>Rhizobium etli</i> (NCBI, 2020) .....	12
<b>Figura 10.</b> Mapa filogenético de <i>Rhizobium phaseoli</i> (NCBI, 2020) .....	13
<b>Figura 11.</b> Simbiosis entre <i>Medicago truncatula</i> - <i>Sinorhizobium meliloti</i> . Desarrollo de nódulos radiculares y sus secciones (A). Tinción con Syto9 de endosimbiontes (B) ...	19
<b>Figura 12.</b> Simbiosis entre <i>Prosopis chilensis</i> y <i>Rhizobium</i> en condiciones de estrés salino. Formación de nódulos(A), corte longitudinal del nódulo(B) (Scambato, 2013).....	19
<b>Tabla 1.</b> Especies de <i>Rhizobium</i> y planta huésped (Paredes, 2013) .....	10

## Resumen

La biotecnología es una ciencia interdisciplinaria que integra técnicas de la genética molecular, la biología, la microbiología; el análisis de la microbiota del suelo y progresos del estudio de la genómica en la transformación genética de especies vegetales, que permiten dar respuesta a los problemas que presenta actualmente el sector agrícola, especialmente el déficit de macronutrientes del suelo.

Una de las estrategias propuestas para el manejo integral de la agricultura podría resultar de la simbiosis entre *Rhizobium*- especies vegetales (*Fabaceae*), que permiten dar solución a las situaciones adversas de salinidad, estrés hídrico y sequía.

La simbiosis entre *Rhizobium*- *Fabaceae* influye positivamente en el desarrollo de características ecofisiológicas o fenómeno alelopático y mejora de la calidad del suelo, convirtiéndose en una estrategia de la biotecnología que tiene como objetivo sustituir el uso indiscriminado de fertilizantes químicos, que han dejado a su paso impactos negativos como el deterioro de la calidad del suelo tanto química como físicamente.

Esta revisión bibliográfica tiene como fin documentar datos de investigaciones empíricas y teóricas de la simbiosis entre *Rhizobium* y especies vegetales utilizadas como alternativa de la biotecnología en la mejora de la calidad del suelo frente a situaciones desfavorables. El análisis de la revisión bibliográfica centrará su atención en documentos teóricos y artículos científicos empíricos que cumplan con un criterio de inclusión de un periodo de publicación entre los años 2011-2021. Además, dicha revisión se realizará sobre estudios referentes a la caracterización taxonómica de *Rhizobium*, estructura, características y funcionamiento de la simbiosis, el desarrollo de la nodulación, fijación biológica del nitrógeno (FBN), las principales especies de *Fabaceae* que establecen simbiosis con *Rhizobium*, los factores abióticos que influyen en el rendimiento de la simbiosis entre *Rhizobium*- Fabáceas, las estrategias de la biotecnología para la mejora de la tolerancia de especies vegetales ante situaciones de estrés abiótico (regulación de la expresión de genes, mejora genética de especies vegetales y *Rhizobium*)

Finalmente, con esta revisión se pretende tener una visión general sobre los beneficios de la simbiosis entre *Rhizobium*- Fabáceas como alternativa para la sustitución del uso indiscriminado de fertilizantes químicos y encaminados hacia una agricultura sostenible.

Palabras clave: simbiosis; factores abióticos; mejora genética; tolerancia.

## Abstract

Biotechnology is an interdisciplinary science that integrates techniques from molecular genetics, biology, microbiology, the analysis of the soil microbiota, and progress in the study of genomics in the genetic transformation of plant species, which make it possible to respond to the problems that currently presents the agricultural sector, especially the deficit of soil macronutrients.

One of the strategies proposed for the comprehensive management of agriculture could result from the symbiosis between *Rhizobium*- plant species (*Fabaceae*), which allow a solution to adverse situations of salinity, water stress and drought.

The symbiosis between *Rhizobium- Fabaceae* has a positive influence on the development of ecophysiological characteristics or allelopathic phenomenon and improvement of soil quality, becoming a biotechnology strategy that aims to replace the indiscriminate use of chemical fertilizers, which have left in their wake negative impacts such as the deterioration of soil quality both chemically and physically.

This bibliographic review aims to document data from empirical and theoretical research on the symbiosis between *Rhizobium* and plant species used as an alternative to biotechnology in improving soil quality in unfavorable situations. The analysis of the bibliographic review will focus its attention on theoretical documents and empirical scientific articles that meet the inclusion criteria of a publication period between the years 2011-2021. In addition, the said review will be carried out on studies referring to the taxonomic characterization of *Rhizobium*, structure, characteristics and functioning of the symbiosis, the nodulation process, biological nitrogen fixation (BFN), the main species of *Fabaceae* that establish symbiosis with *Rhizobium*, the abiotic factors that influence the performance of the symbiosis between *Rhizobium-Fabaceae*, biotechnology strategies to improve the tolerance of plant species in situations of abiotic stress (regulation of gene expression, genetic improvement of plant species and *Rhizobium*)

Finally, with this review it is intended to have an overview of the benefits of the symbiosis between *Rhizobium- Fabaceae* as an alternative to replace the indiscriminate use of chemical fertilizers and aimed at sustainable agriculture.

Keywords: Symbiosis; abiotic factors; genetic improvement; tolerance.

## Introducción

La biotecnología aplicada al sector agrícola ha generado grandes avances en los últimos tiempos, abarcando problemáticas como: pérdidas de recursos del suelo, salinidad en campos de producción, erosiones hídricas, disminución del rendimiento, reducción de la calidad de la cosecha, pérdidas de cultivos a causa de microorganismos patógenos como hongos o bacterias, enfermedades víricas, plagas de insectos, aves o roedores, entre otros. Por ello es considerada como una herramienta para la agricultura, que permite el incremento de la calidad de las especies vegetales y mejora el rendimiento de los cultivos, sustituyendo técnicas tradicionales como el uso de insecticidas, fungicidas y herbicidas de origen químico (Garciglia et al., 2007).

Para abordar problemáticas actuales de la industria agrícola, la biotecnología aplica conocimientos de otras áreas como la ingeniería genética, la biología molecular, la bioquímica, bases de la biología y la microbiología, con el fin de proveer especies vegetales de mejor calidad, capaces de hacer frente a condiciones de estrés biótico y abiótico. Existen innumerables estrategias con diversos fines agrícolas, dentro de las cuales cabe destacar el uso de las técnicas del cultivo de tejidos vegetales para la regeneración celular, la conservación en bancos de germoplasma y la transformación del genoma que genera a su vez variabilidad genética a partir de técnicas como el cultivo de tejidos vegetales, la producción de mapeos de ligamientos genéticos y el descubrimiento de genes que permiten la mejora de características de determinada especie vegetal y que son de utilidad para el ser humano (Valdés et al., 2012).

La calidad de las cosechas depende de muchos factores, tales como: las condiciones del suelo, el genotipo de la especie vegetal, el manejo integral del cultivo, las condiciones edafoclimáticas y la calidad del agua (Luna Riquelme, 2013). Factores tales como el genotipo y las condiciones del suelo, se pueden tratar por dos vías:

1. La biotecnología y los métodos moleculares: mediante la inserción de genes de interés para obtener líneas celulares con características mejoradas, la estabilidad del gen foráneo en el genoma de la especie vegetal, la transformación genética (Transferencia mediada por el plásmido de *Agrobacterium tumefaciens*, biobalística, microinyección, transferencia por vectores virales o protoplastos y electroporación), micropropagación y regeneración in vitro, con el fin último de obtener cultivares que se adapten a las condiciones adversas actuales (Joao et al., 2021; Indacochea et al 2020).
2. La biotecnología y la interrelación biológica: las asociaciones que presentan microorganismos con especies vegetales generan cambios favorables para los cultivos. La simbiosis es un tipo de asociación que favorece la productividad y la calidad del cultivo, actuando de manera sinérgica, influyendo en el funcionamiento del entorno debido al aporte de factores que favorecen el desarrollo y el crecimiento del cultivo como los nutrientes esenciales (Cuautle, 2021). La interrelación biológica mediada por asociaciones como la simbiosis entre microorganismos y plantas, es un área de investigación de la biotecnología de importancia para la industria agrícola ya que permite la mejora de la calidad del suelo frente a situaciones adversas. Los microorganismos juegan un papel muy importante en la mejora de los agroecosistemas, los beneficios van desde

promover el desarrollo y crecimiento hasta la protección de las especies vegetales. Uno de los temas de mayor interés es el beneficio que promueve la asociación entre *Rhizobium* y leguminosas, la interrelación mejora la fijación de fósforo y nitrógeno, así como la asimilación de los bioelementos secundarios por la especie vegetal (Spagnoletti et al., 2013; Osorio Menéndez, 2019).

Ante el estrés abiótico, la biotecnología proporciona estrategias que influyen en el rendimiento, calidad y producción de los cultivos, las investigaciones también incluyen la modificación genética de especies vegetales y microorganismos para establecer características que aumenten la tolerancia al estrés hídrico o salino. Esto a su vez permite contribuir con los sistemas de defensas ante moléculas oxidantes o especies reactivas del oxígeno que mitigan la senescencia de los nódulos radiculares (Quiñones et al., 2011).

El presente trabajo, de tipo revisión bibliográfica, se enfocó en la recopilación y análisis de material de producción científica reportado en los últimos 10 años. Dicho material bibliográfico está relacionado con la biotecnología y la simbiosis entre *Rhizobium* y leguminosas que permita la mejora de la calidad del suelo, ante situaciones adversas.

Estudios e investigaciones sobre los factores que influyen en el desarrollo de las especies vegetales y las estrategias que puede ofrecer la biotecnología para obtener especies resistentes a situaciones adversas ha adquirido mayor importancia en la actualidad.

La simbiosis entre Fabáceas y especies de *Rhizobium* favorece la fijación biológica de nitrógeno (FBN) atmosférico permitiendo el desarrollo de cultivos con óptimos rendimientos ante las situaciones adversas que se presentan en diferentes zonas demográficas.

Las principales especies evidenciadas durante la recopilación de información fueron: *Rhizobium leguminosarum*, *R. etli* y *R. phaseoli*, sin embargo, algunos estudios demuestran que cuando la simbiosis se da entre microorganismo- especie vegetal y micorrizas, los resultados en porcentajes de rendimientos son mayores en comparación a la simbiosis entre *Rhizobium*- leguminosa.

El principal objetivo de la simbiosis entre *Rhizobium*- *Fabaceae*, según las investigaciones, está relacionado con la capacidad de infección y formación de nódulos radiculares que permita la asimilación del nitrógeno necesario para el desarrollo de la planta. La disponibilidad de este macronutriente se ve reflejada en el crecimiento en longitud de tallos, cantidad foliar, grosor de la hoja, menor incidencia en la aparición de síntomas de carencias, como la clorosis, mayor rendimiento y productividad de los cultivos.

Dentro de los factores abióticos que limitan el establecimiento de la simbiosis microorganismo-planta, se encuentran suelos con exceso de cadmio, suelos con altas concentraciones salinas, problemas de eutrofización. La disponibilidad de agua y la temperatura son otros de los factores que limitan el establecimiento de la simbiosis, afectando directamente el desarrollo de los pelos radiculares.

Es por ello que la biotecnología vegetal y agrícola ha establecido estrategias que aporten soluciones a las situaciones adversas que se presentan en los cultivos. Entre otras estrategias se pueden mencionar: el cultivo de tejidos vegetales, análisis de los

genes involucrados con los factores Nod y la enzima nitrogenasa reductasa, identificación de los microorganismos capaces de establecer simbiosis en condiciones adversas como: suelos salinos, presencia de metales pesados o suelos pobres en nutrientes esenciales para el crecimiento. Así mismo, la genética aplicada a la modificación de especies vegetales y de microorganismos busca obtener especies capaces de establecer simbiosis en presencia de estos factores abióticos adversos, que permitan incrementar el rendimiento de los cultivos.

## 1. Objetivos

### 1.1 *Objetivo general*

Compilar, seleccionar, analizar y sintetizar toda la información de investigaciones científicas sobre la mejora de la calidad del suelo proporcionada por la simbiosis entre *Rhizobium*- leguminosas y otras especies vegetales, aportada en los últimos 10 años de producción científica, mediante el establecimiento de criterios de inclusión y exclusión de documentos científicos y el desarrollo de ecuaciones de búsqueda para la exploración de bases de datos científicas.

### 1.2 *Objetivos específicos*

-Permitir la descripción de especies de *Rhizobium* de importancia para el establecimiento de la simbiosis con especies de fabáceas.

-Describir los mecanismos más estudiados para el establecimiento de la nodulación.

-Exponer los factores abióticos que influyen en la simbiosis.

-Compilar información acerca de las investigaciones sobre la expresión y regulación de genes involucrados en la nodulación y en la síntesis de proteínas con acción catalítica para el desarrollo del proceso de la FBN; así como la descripción de complejos de genes de interés relacionados con la eficiencia del desarrollo de la simbiosis.

-Analizar la simbiosis mediada por *Rhizobium*- HMA- especies vegetales.

-Realizar un análisis bibliométrico para evidenciar la importancia de estudio de la simbiosis entre *Rhizobium*- *Fabaceae*.



## 2. Metodología

En la presente revisión bibliográfica sobre aspectos relacionados con la simbiosis entre *Rhizobium* y especies vegetales y la mejora de la calidad del suelo, se estableció una ecuación de búsqueda construida a partir de palabras claves para realizar una exploración inicial en la literatura científica de tipo empírico y teórico encontrada en las bases de datos Science Direct, Pubmed, Scopus, Google Scholar y Web of Science. A su vez se realizó un análisis bibliométrico que permitió la visualización de mapeos por coocurrencia de palabras mediante el uso del software de VosViewer.

### 2.1 Criterios de inclusión

Para la selección de los documentos científicos y organización de la información se establecieron 6 criterios de inclusión:

- Selección de documentos científicos empíricos y teóricos respecto a la simbiosis entre *Rhizobium* y leguminosas.
- Documentos relacionados con la mejora de la calidad del suelo ante las condiciones de estrés abiótico.
- Artículos y documentos dentro de un periodo de publicación científica entre los años 2011-2021.
- Documentos relacionados con la caracterización taxonómica de *Rhizobium*, estructura, características y funcionamiento de la simbiosis, el proceso de nodulación, las principales especies de *Fabaceae* que establecen simbiosis con *Rhizobium*, los factores abióticos que influyen en el rendimiento de la simbiosis entre *Rhizobium*-Fabáceas.
- Documentos científicos relacionados con estrategias de biotecnología vegetal y biología molecular para la mejora genética de especies vegetales y transformación genética de *Rhizobium* con fines benéficos para la industria agrícola.
- Artículos científicos que reporten simbiosis entre *Rhizobium*, micorrizas y otras especies vegetales.

### 2.2 Búsqueda inicial y final

La exploración inicial se realizó a partir de las palabras claves: “simbiosis”, “factores abióticos”, “mejora genética”, “tolerancia”, incluyendo las palabras: “*Rhizobium*” y “especies vegetales”.

Para realizar la búsqueda más precisa se combinaron las palabras claves por medio de operadores o conectores booleanos, obteniendo como resultados dos ecuaciones de búsqueda:

1. Primera ecuación de búsqueda: ((Symbiosis) OR (Association)) AND (*Rhizobium*) AND (vegetable species), para un total de 3.870 documentos científicos empíricos y teóricos.
2. Segunda ecuación de búsqueda: se agregan las palabras “interrelación biológica” y

“mejora genética”, obteniendo como ecuación final; ((*Rhizobium*) AND (vegetable species) AND (Tolerance)) AND ((genetic improvement) OR (biological interrelationship) OR (Symbiosis)), para un total de 706 documentos científicos empíricos y teóricos.

Una vez terminada la exploración final se aplicaron los criterios de inclusión y se seleccionó un total de 61 artículos científicos y documentos teóricos encontrados en bases de datos como Science Direct, PubMed, Scopus, Google Scholar y Web of Science dentro de un periodo de producción científica de 10 años, con relevancia para el desarrollo de la presente revisión bibliográfica.

### **2.3 Análisis Bibliométrico en el software VosViewer**

Se recopiló un total de 1.497 documentos científicos encontrados en la base de datos de PubMed, mediante el uso de la segunda ecuación de búsqueda: ((*Rhizobium*) AND (especies vegetales) AND (Tolerancia)) AND ((mejora genética) OR (Interrelación Biológica) OR (Simbiosis)). El formato compilado se utilizó como parámetro de entrada al software VosViewer, disponible en; [www.vosviewer.com](http://www.vosviewer.com), el cual permite el análisis, construcción y visualización de mapeos bibliométricos establecidos por la coocurrencia de palabras a partir de la metodología del “full counting”.

Por otra parte, se analizaron los resultados obtenidos con el software VosViewer, cuya fuente de información ha sido extraída desde la colección principal de Web of Science, para realizar mapeo de ecuaciones sobre autores principales, las líneas principales de investigación y las futuras líneas de investigación.

## **3 Resultados y Discusiones**

### **3.1 Análisis bibliométrico en el software VosViewer.**

Mediante el análisis bibliométrico de coocurrencia de palabras claves a partir del software VosViewer, se realizó el mapeo de 1.497 documentos científicos encontrados en la base de datos de PubMed. Esto permite la visualización de los principales temas de interés en el estudio de las interrelaciones simbióticas entre *Rhizobium* y leguminosas. En la figura 1 se observa que la mayor parte de investigaciones se centran en la fijación de nitrógeno, el segundo componente más importante para el desarrollo de cualquier especie vegetal. Las bacterias diazotróficas mayormente estudiadas pertenecen al género *Rhizobium*, del Phylum Proteobacteria, las cuales tienen mayor afinidad por establecer relaciones simbióticas con especies vegetales de la familia *Fabaceae* (Pulido Suárez, 2017).

En la figura 2 se observan los principales temas de interés en el estudio de simbiosis entre microorganismo-especie vegetal, relacionados con: estrés fisiológico, géneros de bacterias de interés como *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* y *Rhizobium leguminosarum*, caracterizada por establecer relaciones simbióticas mutualistas con especies de legumbres, influyendo beneficiosamente en la capacidad de fijar biológicamente nitrógeno (Nápoles-García et al., 2021).

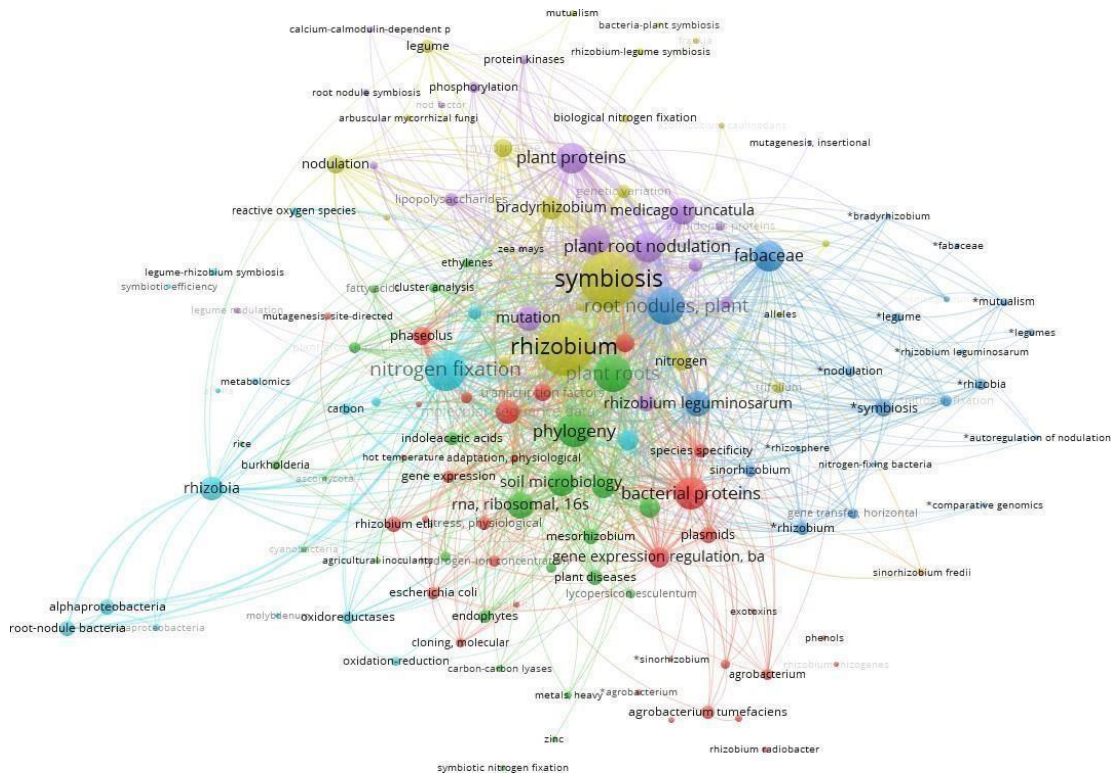


Figura 1. Análisis Bibliométrico de coocurrencia sobre estudios relacionados con la simbiosis entre *Rhizobium* y especies vegetales. Fuente: propia.

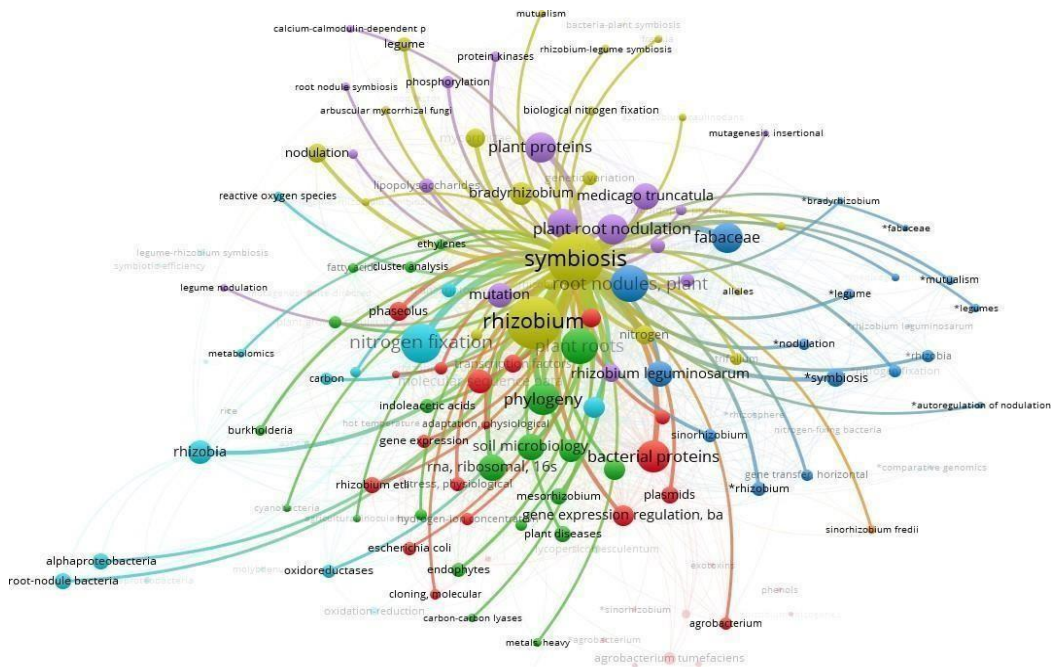
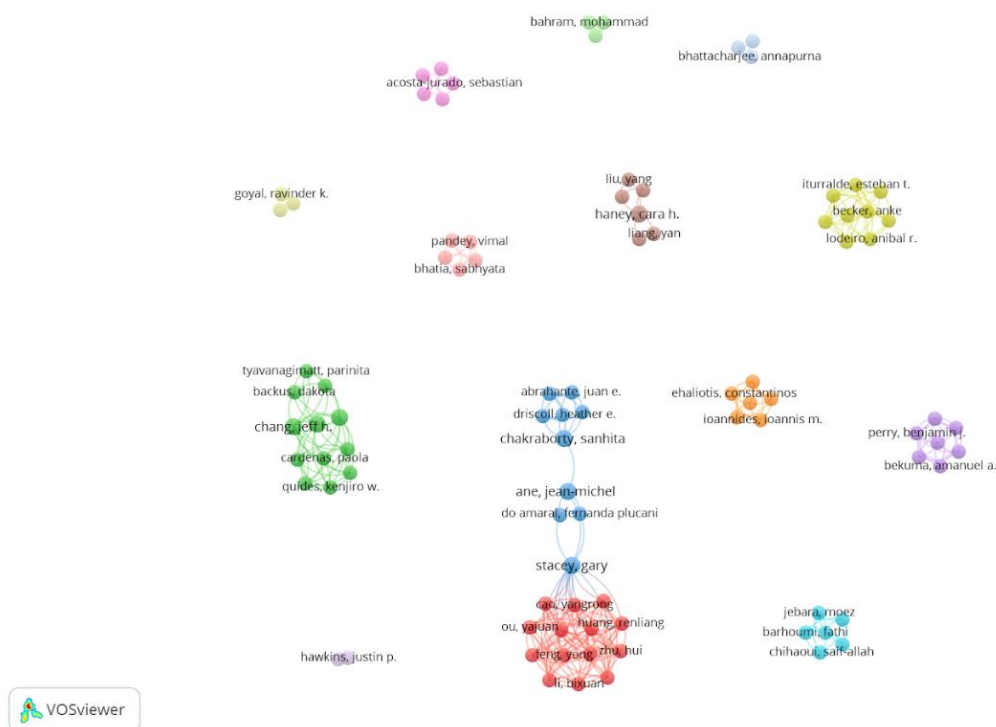


Figura 2. Análisis Bibliométrico de coocurrencia sobre estudios relacionados con la simbiosis entre *Rhizobium* y especies vegetales, coocurrencia de palabras con “Simbiosis”. Fuente: propia.

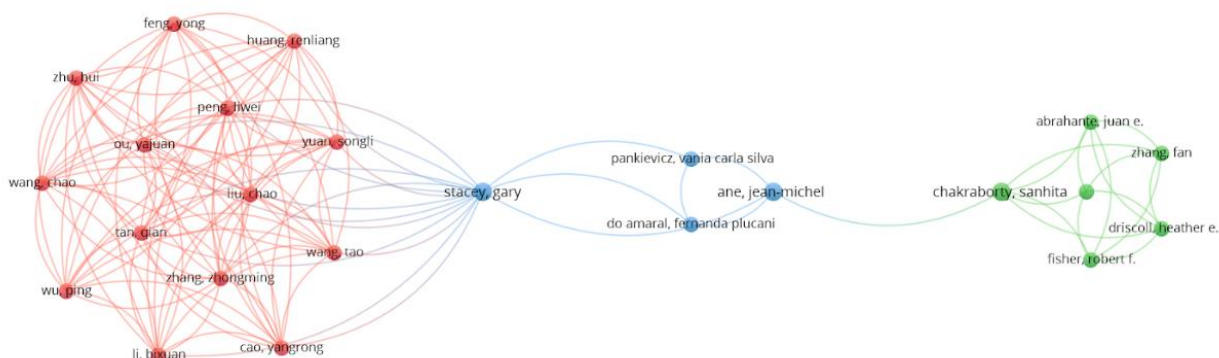
A continuación, se presentan resultados analizados con el software VosViewer cuya fuente de información ha sido extraída desde la colección principal de Web of Science para realizar mapeo de ecuaciones sobre autores que mencionan las palabras: “Symbiosis”, “*Rhizobium*” y “Association”.

La fuente ha sustraído la cantidad de 309 autores de los cuales solo 91 cumplen el umbral, empleando el tipo de análisis “Co-autorship” y la unidad de análisis “Authors”. El número mínimo de documentos de un autor es 1, y el número de veces que se cita a un autor es 2. El resultado da una cantidad de 91 autores, representados en la Figura 3.



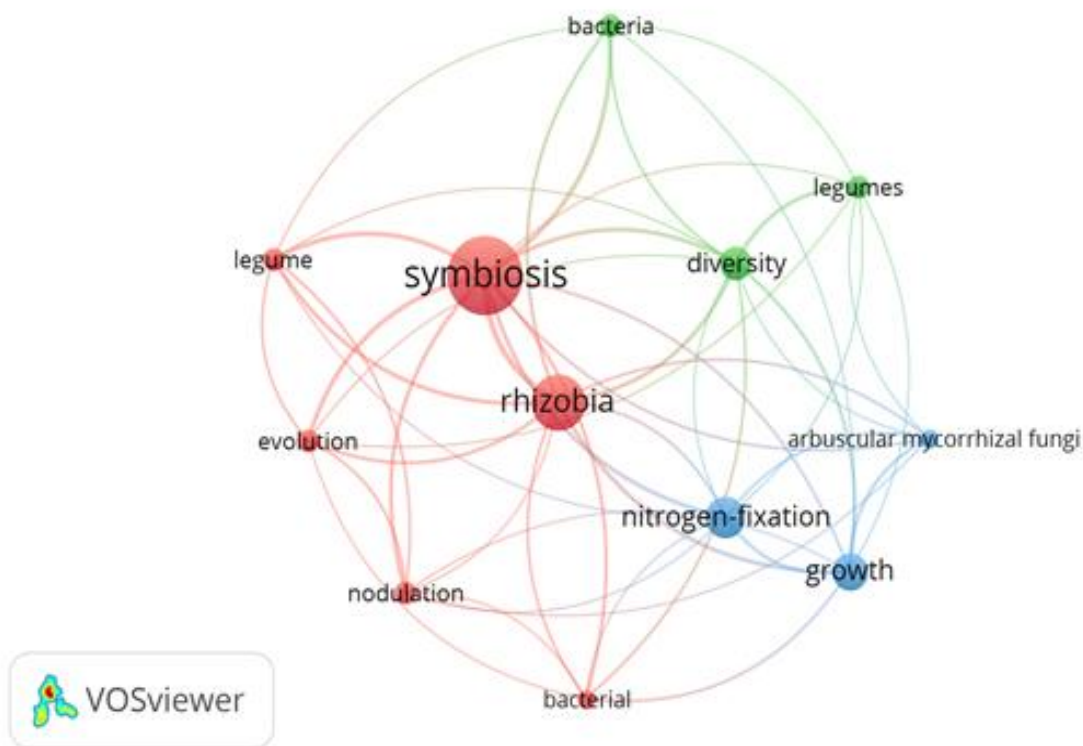
**Figura 3.** Análisis Bibliométrico de coocurrencia sobre autores principales relacionados con la simbiosis entre *Rhizobium* y especies vegetales. Fuente: propia.

También podemos obtener solo la cantidad de autores que se encuentran relacionados entre sí, que en total son 24.



**Figura 4.** Análisis Bibliométrico de coocurrencia sobre autores principales relacionados con la simbiosis entre *Rhizobium* y especies vegetales. Autores relacionados entre sí. Fuente: propia.

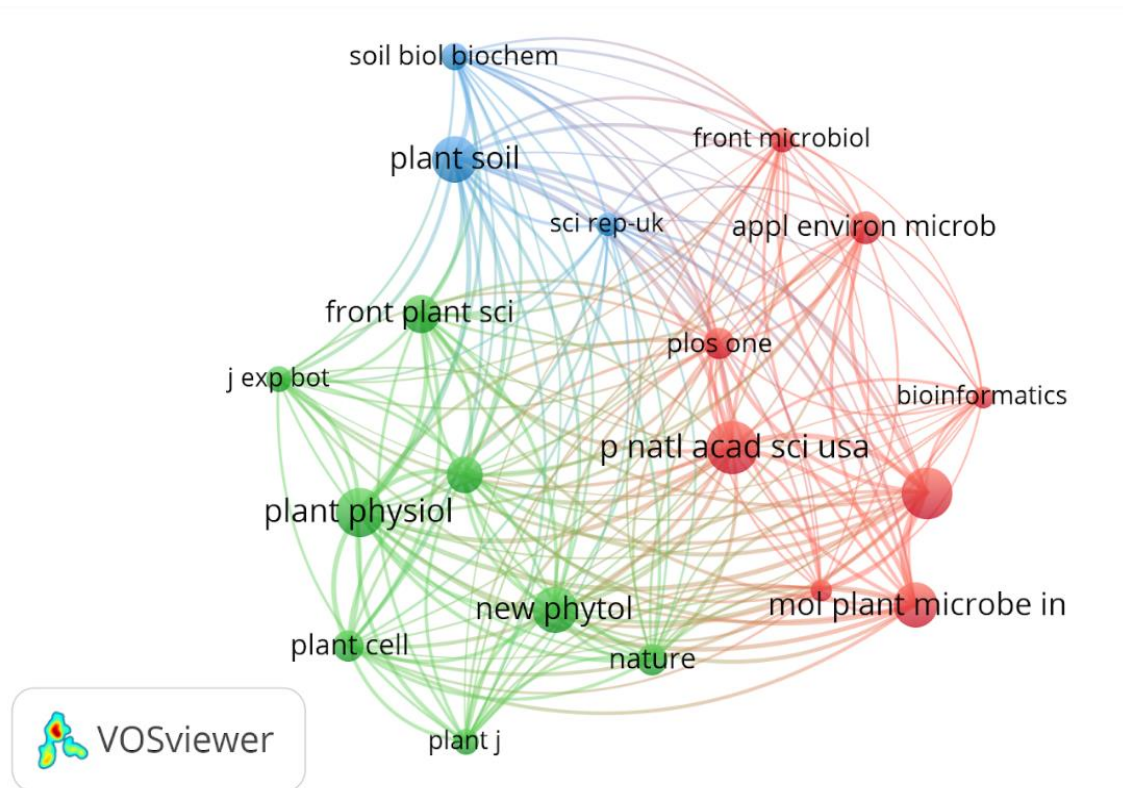
A continuación, se presentan resultados analizados con VosViewer cuya fuente de información ha sido extraída desde Web of Science para realizar mapeo de ecuaciones sobre las líneas principales de investigación relacionadas con: “Symbiosis”, “*Rhizobium*” y “Association”, “Vegetable species”, “Tolerance”, “Genetic improvement” y “Biological interrelationship”.



**Figura 5.** Análisis Bibliométrico de coocurrencia sobre principales líneas de investigación relacionadas con la simbiosis entre *Rhizobium* y especies vegetales. Fuente: propia.

Para poder mostrar las futuras líneas de investigación se calcula la fuerza total de los enlaces de cocitación (40 citaciones) con otras fuentes relacionadas, dando como resultado 19 frases, las cuales se muestran en mapa (Figura 6) unas más intensas que otras. Por ejemplo, plant front sci (Frontiers in Plant Science), es una revista líder cuyas publicaciones están rigurosamente revisadas por pares, y avanza en nuestra comprensión de los modelos de plantas, cultivos y ecosistemas. Esto traduce la investigación en nuevos avances tecnológicos.





**Figura 6.** Análisis Bibliométrico de coocurrencia sobre las futuras líneas de investigación relacionadas con la simbiosis entre *Rhizobium* y especies vegetales. Fuente: propia.

### 3.2 Caracterización taxonómica de *Rhizobium*

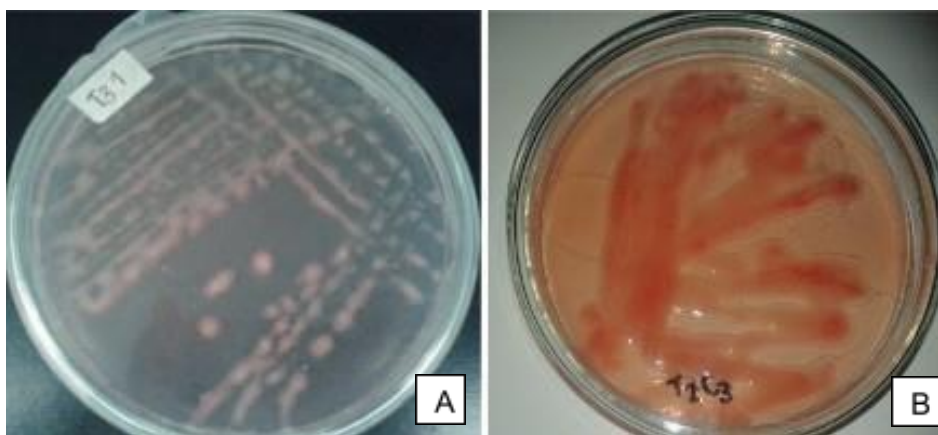
Según Bergey's se han identificado 6 géneros de bacterias con la capacidad de establecer simbiosis, pertenecientes al orden *Rhizobiales*, familia *Rhizobiaceae*. Estos géneros son: *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Carbophilus*, *Chelatobacter*, *Ensifer*, *Sinorhizobium*.

*Rhizobium* es un género perteneciente a la clase  $\alpha$ - Proteobacteria, de la familia Rhizobiaceae, conformado por las subramas:

1. Subrama primera: compuesta por las especies de *Rhizobium huautlense* y *R. galegae*.
2. Subrama segunda: conformada por las especies de *Rhizobium rhizogenes* y *R. leguminosarum* (Wang et al., 2001).

Dentro del género *Rhizobium* se incluyen bacilos gramnegativos con características microscópicas definidas por la presencia de 1-6 flagelos que le confiere la capacidad de movilidad en disposición subpolar o peritral, con dimensiones entre 0,5 - 0,9 por 1,2 - 3,0  $\mu\text{m}$  (ancho/longitud) y constan de pared celular (López-Alcocer et al., 2017).

En cuanto a las características macroscópicas, las colonias presentan color beige o blanco y son convexas, circulares, opacas o semi traslúcidas y de aspecto mucilaginoso, con diámetro entre 2-4 mm evidenciados a los 3-5 días post incubación, tienen facilidad para crecer y desarrollarse en medios de cultivos basados en extracto de levadura manitol en agar rojo Congo o medio de cultivo YEMA-CR (figura 7) (López-Alcocer et al., 2017).



**Figura 7.** Observación macroscópica de colonias de *Rhizobium* en medio de cultivo YEMA-CR, (A) colonias después de 5 días de incubación y (B) colonias después de 8 días post incubación. (Rubiano, 2015)

Son organismos quimiorganótrofos, por lo cual crecen en medios de cultivos ricos en carbohidratos y en ácidos orgánicos, algunos requerimientos nutricionales se basan en la adición de ácido nicotínico, biotina, tiamina y pantotenato, esenciales como factor de crecimiento en este género (Wang et al., 2001).

Las especies del género de *Rhizobium* tal como: *Rhizobium gallicum*, *R. galegae*, *R. leguminosarum*, *R. etli*, *R. giardinii*, *R. mongolense*, *R. hainanense*, *R. tropici* y *R. huautlense*, tienen la capacidad de nodular en diversas especies vegetales de la familia de leguminosas o fabáceas, especialmente en áreas geográficas tropicales o templadas (Wang et al., 2001).

La filogenia polifilética de la especie *R. giardinii* se encuentra distante en el mapa filogenético en relación con las especies *R. huautlense* y *R. galegae*, las cuales poseen una relación cercana con *Agrobacterium*. Las especies de *R. huautlense* y *R. etli* son de importancia en investigación debido a que se encuentran presentes en los nódulos de suelos con condiciones adversas especialmente en los inundados (Wang et al., 2001).

### 3.3 Especies simbióticas del género *Rhizobium*

Las especies de *Rhizobium* son capaces de establecer relaciones simbióticas con especies vegetales de fabáceas. La formación de nódulos les permite desarrollar la FBN que favorece el crecimiento de la planta (tabla 1).

Especie	Especie vegetal huésped
<i>Rhizobium phaseoli</i>	Especies de <i>Phaseolus</i> de clima templado
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	<i>Pisum</i> , <i>Vicia</i> , <i>Lens</i> , <i>Lathyrus</i>
<i>Rhizobium meliloti</i>	<i>Medicago</i> , <i>Melilotus</i> , <i>Trigonella</i>
<i>Rhizobium trifolii</i>	<i>Trifolium</i>
<i>Rhizobium lupini</i>	<i>Lupinus</i> , <i>Ornithopus</i>
<i>Rhizobium japonicum</i>	<i>Glycine max</i>

**Tabla 1.** Especies de *Rhizobium* y planta huésped (Paredes, 2013).

El complejo de especies que conforman el género de *Rhizobium* es muy amplio, en el presente apartado abordaremos las especies de mayor incidencia e importancia para la comunidad científica en estudios relacionados con la nodulación, fijación de nitrógeno, metabolismo, biofertilizantes y genes de importancia en la mejora de la rizosfera de especies vegetales.

### 3.3.1 *Rhizobium leguminosarum*

*Rhizobium leguminosarum* es un complejo de especies comprendidas por 429 secuencias de genomas diferentes, su taxón similar es *Rhizobium anhuiense*. El mapa filogenético de *Rhizobium leguminosarum* según la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica, NCBI, presenta 3 subgrupos de genopecies: *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* y *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* (figura 8) (NCBI, 2020).

Este complejo de especies, también denominadas bacterias presentes en el nódulo de la raíz, poseen la característica de especificidad de huésped, dada por la presencia de plásmidos transmitidos entre las cepas. Además, presenta gran diversidad genética que cuenta con una característica importante tal como: su relación con la nodulación y la fijación del nitrógeno (Young, 2021).



Figura 8. Mapa filogenético de *Rhizobium leguminosarum* (NCBI, 2020).

Algunos autores afirmaron que el uso de *R. leguminosarum* en suelos alcalinos junto con la adición de fertilizante promueve el desarrollo y crecimiento de habas. Esto indica que la relación sinérgica establecida entre los dos factores, *Rhizobium*-fertilizante, mejora las propiedades físicas de suelos con problemas de fertilidad (Abd-Alla et al., 2014).

Ramachandran et al., (2011), evidenciaron la importancia del gen pRL8 encontrado en *R. leguminosarum* Rlv3841. Esta cepa presenta el complejo de genes involucrados en la nodulación y fijación del nitrógeno (pRL7-pRL12), específicos en la rizosfera de *Pisum sativum* (guisante), aumentando la productividad y fertilidad de los suelos, ofreciendo un mejor soporte a la especie vegetal.

Otro estudio realizado en las especies vegetales *Daucus carota* L. (zanahoria) y *Lactuca sativa* L. (lechuga), demostró que la cepa PEPV16 de *R. leguminosarum*, confirió a las plantas la capacidad de crecer y desarrollarse, así como se incrementó la masa seca de raíces y brotes y aumentó el N y P disponible en el suelo, siendo considerado por los autores como una cepa apta para su uso en biofertilizantes para estas especies vegetales (Flores-Félix et al., 2013).



### 3.3.2 *Rhizobium etli*

El mapa filogenético de *Rhizobium etli* según la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica, NCBI, presenta 8 cepas de importancia dentro de la especie, entre las cuales se encuentran: *Rhizobium etli* bv. *trifolii*, *Rhizobium etli* CNPAF512, *Rhizobium etli* GR56, *Rhizobium etli* IE4771, *Rhizobium etli* CIAT 652, *Rhizobium etli* CNF 42, *Rhizobium etli* bv. *mimosae* str. IE4771, *Rhizobium etli* bv. *mimosae* str. *Min1* (figura 9) (NCBI, 2020).

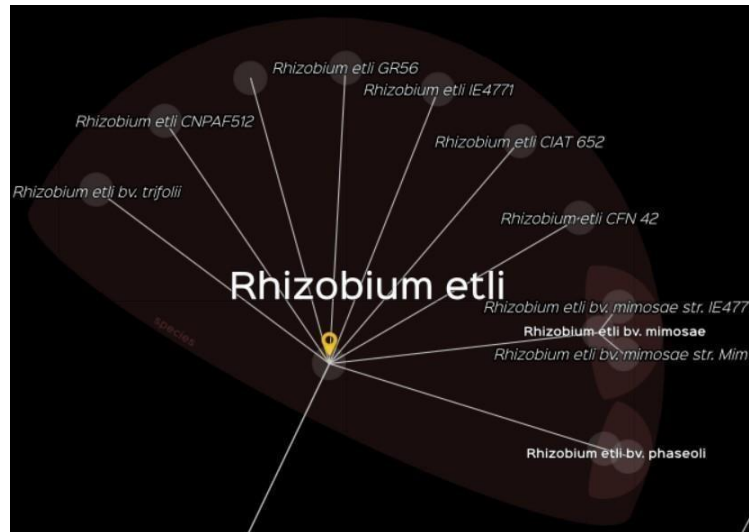


Figura 9. Mapa filogenético de *Rhizobium etli* (NCBI, 2020)

*Rhizobium etli* ha sido motivo de estudios científicos por su capacidad de soportar tensiones osmóticas de sequías fluctuantes y variaciones térmicas, así como capacidad de adaptarse a los nódulos favoreciendo el intercambio de nutrientes con la especie vegetal en la que esté presente, durante el desarrollo de la infección. *Rhizobium etli*, mediante sus mecanismos de adaptación, promueve la expresión de genes relacionados con la síntesis de la trehalosa (O- $\alpha$ -D-glucosil-[1 $\rightarrow$ 1]- $\alpha$ -D- glucósido), un soluto compatible que establece un equilibrio osmótico protegiendo a la célula vegetal de situaciones adversas como la desecación, congelación, radicales libres del oxígeno y altas temperaturas (Reina-Bueno et al., 2012).

La trehalosa juega un papel importante en la adaptación, crecimiento y rendimiento de las especies vegetales en presencia de estrés abiótico especialmente altas temperaturas y desecación. Por dicho motivo podría considerarse que la manipulación genética de especies de *Rhizobium etli* generaría un impacto positivo en el sector agronómico, especialmente en leguminosas (Reina-Bueno et al., 2012).

Otra especie de interés científico es *Rhizobium etli* *Min1*, la cual presenta un sistema de secreción que le permite interactuar con células eucariotas y procariontas. El denominado sistema de secreción T6SS, actúa como transporte de proteínas efectoras o proteínas antibacterianas que protegen a la planta cuando esta se encuentra en simbiosis con *Rhizobium etli* *Min1*. Según Salinero et al., (2019), el sistema de secreción T6SS que ofrece esta especie vegetal en simbiosis con *Phaseolus vulgaris*, en su estado activo, promueve el crecimiento y rendimiento óptimo de la planta (Salinero-Lanzarote et al., 2019).

Lacroix & Citovsky, (2016), demostraron que la importancia de *R. etli* no solo se basa en su capacidad de nodular y fijar nitrógeno, sino también lo han catalogado como una

especie bacteriana con maquinaria molecular (plásmido p42a), capaz de transferir información de ANDt a células eucariotas. Esto lo convertiría en la primera maquinaria diferente a *Agrobacterium*, con la capacidad de realizar modificación genética estable en especies vegetales.

*Rhizobium etli* CFN42, por su parte, cumple un papel fundamental en la meteorización mineral, ciclo y nutrición del suelo. Algunos estudios presentan el comportamiento de células de *Rhizobium etli* CFN42 en presencia de feldespato potásico, demostrando la capacidad de desarrollo y crecimiento sobre superficies minerales de Al, Si y K (Chen et al., 2016).

### 3.3.3 *Rhizobium phaseoli*

El mapa filogenético de *Rhizobium phaseoli* según la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica, NCBI, presenta 2 cepas de importancia de la especie, dentro de las cuales se encuentran: *Rhizobium phaseoli* Ch24-10 y *Rhizobium phaseoli* Brasil 5 (figura 10) (NCBI, 2020).

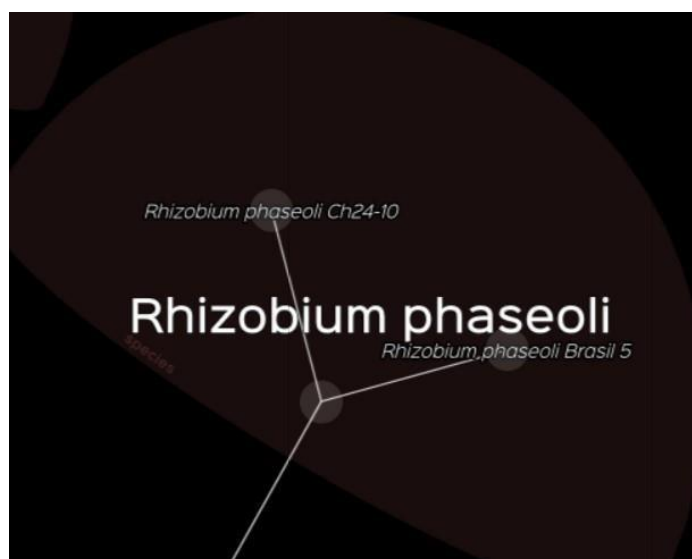


Figura 10. Mapa filogenético de *Rhizobium phaseoli* (NCBI, 2020)

La importancia de *Rhizobium phaseoli* a nivel agrícola y biotecnológico se basa en su capacidad de fijar nitrógeno. Estudios demuestran que la influencia positiva de *Rhizobium phaseoli* es de carácter fenológico con efectos de desarrollo, crecimiento y rendimiento de los cultivos de *Phaseolus vulgaris* (Ndlovu, 2015).

Ndlovu, (2015), demostró que la inoculación de los cultivos con esta especie de *Rhizobium* promovió en un 50% la madurez y la floración. Esto produjo un incremento del grano en relación con el rendimiento que fue de 1657 kg / Ha y 25 47 kg / Ha en los periodos del 2011-2012 y del 2012-2013, en la variedad de frijol rojo moteado, logrando un porcentaje de aumento de 16,15% y 27, 50%, respectivamente.

### 3.4 Nodulación

Los mecanismos a partir del cual los rizobios llegan a las raíces de leguminosas son tres:

3. Uso de hilos que infectan a los pelos radicales
4. Ingreso por lesiones de la especie vegetal (crack entry)

## 5. Ingreso mediante las células epidérmicas que conforman la raíz (Bianco, 2020)

El primer mecanismo consiste en el intercambio de señales entre el huésped y el microorganismo simbiote mediante exudados de secreción de la raíz como primer paso. Entre los exudados radiculares se encuentran: fenoles, flavonoides, aminoácidos, carbohidratos y ácidos dicarboxílicos. Las especies vegetales, como método de defensa ante cualquier lesión u organismo extraño, inducen las vías de producción de metabolitos secundarios (flavonoides y fenoles). En respuesta a ello, las especies de *Rhizobium* inducen la vía de síntesis de lipochitoooligosacáridos también denominados factores Nod, los cuales generan un conjunto de respuestas de nivel celular como: el flujo de calcio y cambio de la estructura de los pelos radicales, ocasionando la formación de un bucle que captura a los rizobios, causando deformación y doblamiento de los pelos radicales (Bianco, 2020).

Las especies de *Rhizobium* capturadas en el bucle inician el desarrollo y división para la formación de colonias de bacterias como focos de infección. De ese modo comienza el alargamiento de los hilos de infección que penetran y se ramifican dentro del nódulo que emerge. La membrana peribacteroidal separa los rizobios, que se encuentran dentro del nódulo, del citoplasma celular, permitiendo que se inicie la división celular de forma sincronizada, alterando la morfología de los microorganismos y dando paso a la diferenciación celular en bacteroides, con expresión de actividad nitrogenasa. De esta forma se establece una infección en el nódulo dando lugar a la FBN. El transporte de nitrógeno se realiza desde los nódulos mediante el xilema hasta la parte superior de la planta, el microorganismo por su parte asimila el amonio en forma de aminos o ureidos (Bianco, 2020).

El segundo mecanismo de ingreso de las especies de *Rhizobium*, denominado crack entry, es el ingreso por medio de lesiones de la planta en las raíces adventicias o laterales, permitiendo la entrada del microorganismo con invasión de las áreas intercelulares. Los rizobios colonizan la corteza de la raíz y los tejidos subepidérmicos, ocasionando la lisis de las células corticales por el mecanismo de acción de los factores Nod. Este tipo de mecanismo de infección es común en la especie vegetal *Neptunia plena*. (subclase; *Mimosoideae*), *Adermia bicolor*, *Aeschynomene americana* y *Arachis hypogaea* (familia *Fabaceae*) (Bianco, 2020).

Una especie vegetal de gran interés, en estas investigaciones, es *Sesbania rostrata*, capaz de crecer y desarrollarse en condiciones de suelos inundados o húmedos. Dicha capacidad estaría indicando que la nodulación es parte de la adaptación a situaciones adversas, esta puede darse por mecanismos de crack entry o por hilos de infección (Bianco, 2020).

El tercer mecanismo de ingreso se realiza mediante las células epidérmicas que conforman la raíz, sin la creación de hilos de infección, común en las especies de los géneros de *Lupinus sp.*, *Genisteae*, *Retama monosperma* y *Mimosa scabrella*. Cuando las especies de *Rhizobium* logran ingresar a las raíces de las leguminosas se da inicio a la vía de organogénesis, que permite la formación del nódulo radical (Sprentet., 2017).

Los nódulos pueden ser de crecimiento indeterminado o determinado, a su vez pueden tener diversas estructuras y formas:

a) Nódulos de crecimiento determinado: en las células subepidérmicas ubicadas en la superficie de la corteza ocurren las primeras divisiones de forma sincronizada y en un tiempo determinado se produce la muerte celular. Este tipo de nódulo tiene una vida de pocas semanas, es decir, la actividad meristemática es temporal y cuando se llega al

periodo de senescencia, se producen nódulos en las áreas más jóvenes de la raíz. La forma de este tipo de nódulos es esférica y comprende diámetros desde 2-5 mm. Transportan el nitrógeno en forma de amidas.

b) Nódulos de crecimiento indeterminado: en las células subepidérmicas ubicadas en el interior de la corteza ocurren las primeras divisiones sucedidas por divisiones en el periciclo y la endodermis. La actividad meristemática es prolongada y el periodo de senescencia ocurre lentamente.

La forma de este tipo de nódulos es alargada y su longitud es igual o mayor a 3 mm, estos pueden ser ramificados y no ramificados (Sprent et al., 2013).

Según Sprent et al., (2017), existen otros tipos de nódulos que no se incluyen en la clasificación anterior por sus características únicas:

- a) Nódulos tipo aeschymenoide determinados: tienen forma oblonga y se encuentran en raíces adventicias o laterales, son comunes en géneros de *Dalbergieae*, *Aeschynomeneae* y *Adesmiae*.
- b) Nódulos tipo desmoide determinados: son de forma esférica y poseen lenticelas. Son comunes en los géneros *Phaseoleae* y *Loteae*.
- c) Nódulos tipo lupinoide indeterminados: conforman un aro o collar que rodea la raíz de las especies de *Lupinus sp.* y *Listia sp.*
- d) Nódulos no ramificados e indeterminados: se presentan en la subclase de Mimosoideae.
- e) Nódulos con pocas ramificaciones e indeterminados: característico en las subclases de *Papilionoideae*.
- f) Nódulos con demasiadas ramificaciones e indeterminados: se encuentran en todas las subclases.

Los estudios actuales se centran en el conocimiento de los genes involucrados en la síntesis de los factores de nodulación. La simbiosis entre *Fabaceae* - *Rhizobium*, activa las vías de síntesis de metabolitos que inducen la expresión de los genes involucrados en la transcripción de proteínas Nod, que conlleva a la formación de nódulos y favorece la FBN

Una de las especies bacterianas de gran interés es *Rhizobium tropici* CIAT 899 debido a su capacidad de sintetizar factores Nod en condiciones adversas como estrés salino. Esta especie bacteriana es capaz de establecer simbiosis con fabáceas como: *Leucaena leucocephala*, *Phaseolus vulgaris*, *Lotus buttij* y *Lotus japonicus*, en situaciones de estrés salino o estrés osmótico o cuando se encuentra presente el manitol, donde el microorganismo es capaz de expresar los genes que transcriben para los factores de nodulación (Cerro Sánchez, 2019).

### **3.5 Principales especies de Fabaceae que establecen simbiosis con Rhizobium**

La formación de nódulos es importante para la relación simbiótica entre especies de *Rhizobium* y fabáceas, por lo cual los factores y estructuras que influyen en las etapas de dicho proceso han sido de importancia para las investigaciones científicas o el sector agrícola. Como se mencionó en el apartado anterior, la formación de hilos de infección en los pelos radicales influye positivamente en el proceso de FBN. Las especies de fabáceas de la subclase *Papilionoideae*, de interés agrícola, estudiadas en detalle, en cuanto a genes de expresión involucrados en el desarrollo de la nodulación han sido: *Mimosa pudica* y *Mimosa diplotricha*, *Medicago truncatula*, *Medicago sativa*, *Lotus japonicus* (Dupont et al.,

2012) y *Robinia pseudoacacia* (Chen et al., 2013).

Los estudios han demostrado que la nodulación es de mayor incidencia en las subclases de *Papilionoideae* y *Mimosoideae*, en relación con la nodulación que presentan las especies de la subclase *Caesalpinioideae*.

En el caso de la subfamilia *Mimosoideae*, formada por 78 géneros y 3270 especies incluyendo arbustos y árboles de áreas subtropicales, tropicales y secas, presentan capacidad de formar nódulos indeterminados con diferentes rangos de ramificación e infección mediante los pelos radicales. Las especies vegetales de *Albizia lebbek*, *Acacia Senegal*, *Enterolobium cyclocarpum* y *Anadenanthera colubrina*, son de importancia para la obtención de madera de calidad, drogas alucinógenas, forraje y como sistema de sombra para otras especies vegetales (Sprent J. I., 2013; Sprent J. I., 2017).

El género *Prosopis* presenta especies de importancia para el estudio e investigación científica por su capacidad de tolerar suelos salinos y épocas de sequía, por lo tanto, son usadas para la recuperación de suelos. Para el sector industrial son de importancia en la producción de miel, madera, medicinas, y taninos (Bianco, 2020).

La investigación realizada por Sprent et al 2017, evidencia que el desarrollo de la nodulación tiene lugar en la gran mayoría de los géneros de la subfamilia *Papilionoideae*, mediante diferentes mecanismos de ingreso e infección, así como la diferente morfología de sus nódulos. Las especies de mayor relevancia dentro de esta subclase son: *Xanthocercis madagascariensis*, *Andira inermis*, *Swartzia madagascariensis*, *Hymenolobium excelsum* y *Robinia pseudoacacia*, de importancia industrial en la producción de drogas medicinales, taninos, carbón y frutos comestibles (Sprent J. I., 2013; Sprent J. I., 2017).

A la subfamilia de *Papilionoideae* pertenece la especie *Phaseolus vulgaris* de gran interés agrícola, ya que representa el 87% de leguminosas consumidas en el mundo. Las variedades de esta especie poseen requerimientos nutricionales estrictos respecto a las concentraciones de nitrógeno en el suelo. A través de biofertilizantes y, mediante el desarrollo variable de nodulación y fijación de nitrógeno se consiguen cultivos con buen rendimiento y calidad, cuando la planta dispone del sustrato requerido. Según lo mencionado anteriormente, la especie de *Phaseolus vulgaris*, presenta baja capacidad asimilar nitrógeno por sí sola, para lo cual, posee la capacidad de establecer simbiosis con especies de bacterias del género *Sinorhizobium* y *Rhizobium*. Los autores afirman que el establecimiento de esta relación simbiótica depende de factores como la práctica de manejo agronómico y condiciones ambientales favorables (Cántaro-Segura et al., 2019).

La asociación simbiótica se debe a un factor crucial relacionado con el grado de especificidad que poseen ciertas cepas del género de *Rhizobium* con la leguminosa hospedante, en el cual la reducción en el número de especies bacterianas compatibles y efectivas se considera una limitante en el desarrollo de la FBN (Cántaro-Segura et al., 2019).

Según Cántaro-Segura et al., (2019), las leguminosas poseen la capacidad de establecer relaciones simbióticas con especies de *Rhizobium* de las cepas LMT10 y LMT15. Dicha investigación científica reportó un incremento en los rendimientos, en las variedades de *Phaseolus vulgaris* de Blanco Molinero y Canario Centenario, con 2636 Kg / Ha y 2523 kg / Ha, demostrando que la relación simbiótica, su efectividad y su especificidad, influyen positivamente en la producción de cultivos de estas especies, reflejándose en los parámetros de rendimiento y morfofisiológicos.

La relación simbiótica entre Fabáceas-*Rhizobium* se debe a un factor de dependencia

denominado conjunto de intercambio de señales, el cual se establece durante toda la etapa de simbiosis. El desarrollo eficaz depende de la mediación de señales correctas. Las plantas en situaciones de estrés inducen la vía de la producción de metabolitos secundarios como los flavonoides, los cuales son reconocidos por *Rhizobium*, como señal para la inducción de genes Nod, responsables de la formación de nódulos y FBN. Basados en este fundamento, muchos estudios se han centrado en el uso de agentes inductores de metabolitos como los polifenoles que influyen en el mecanismo de respuesta de los genes involucrados en el proceso (Nápoles García et al., 2016).

Se demostró que la relación simbiótica entre especies de *Phaseolus vulgaris* - *Rhizobium leguminosarum*, inducidas con isoflavona genisteína, para incrementar las señales y la expresión de genes de nodulación, es una alternativa viable para el sector agrícola, ya que promueve el aumento en el número de nódulos y en la concentración de clorofila presente a nivel celular de la especie de *Phaseolus vulgaris* (Nápoles García et al., 2016).

*Phaseolus vulgaris* L. es considerada como la especie de principal interés mundial debido a su capacidad de establecer relaciones simbióticas con diversas especies del género de *Rhizobium*, utilizadas como biofertilizantes. Los estudios demuestran mayor especificidad y eficiencia en la formación de nódulos, biomasa vegetal y nodular cuando se inoculan especies bacterianas como: *Rhizobium leguminosarum* COL6, *Rhizobium etli* PIN1 y *Rhizobium mesoamericanum* NAM1, las cuales promueven el incremento en las tasas de FBN en *Phaseolus vulgaris* L., a su vez el estudio evidencia el incremento en el número de nódulos cuando se inoculan cepas de *Rhizobium tropici* CB1 y *Rhizobium tropici* CB2 (Iván Granda Mora et al., 2016).

Azcárate, (2014), describe la importancia de la simbiosis entre *Rhizobium leguminosarum* - *Pisum sativum* en el metabolismo del azufre e indica que la síntesis de cisteína está regulada por la OAcetilserina(tiol)lasi (OASTL), la cual incrementa su expresión y actividad en los nódulos radiculares.

### **3.6 Objetivo de la simbiosis entre *Rhizobium*- Fabáceas**

La agricultura atraviesa grandes desafíos cuando su fin es la sostenibilidad. Entre otros, destacar, la producción de cultivos de calidad a partir del uso mínimo de fertilizantes químicos que permitan la conservación de las propiedades del suelo, pero que a su vez les permita obtener un alto rendimiento en cuanto a producción de cosechas por hectáreas (Biała-Leonhard, 2021).

Existen nutrientes esenciales que contribuyen al crecimiento, desarrollo y rendimiento de los cultivos, dentro de los cuales se encuentran el nitrógeno, que influye en el crecimiento y desarrollo de las plantas; el fósforo, que se encuentra presente en pequeñas cantidades en el suelo y es necesario para el desarrollo de las raíces, semillas, flores y frutos (Biała-Leonhard, 2021).

El nitrógeno es un nutriente indispensable en la producción de cultivos de ciclo corto tal como: soja, maíz, hortalizas y arroz, donde el objetivo de los agricultores es mejorar el rendimiento con una producción a bajo costo.

Según Dobermann & Fairhurst, (2015), el nitrógeno es un nutriente esencial para síntesis de ácidos nucleicos, aminoácidos y clorofila, el cual influye en el aumento del número de macollos y la longitud de la planta, así mismo incrementa la cantidad de espiguillas

porcada panoja, el grosor y diámetros de la hoja y la concentración de moléculas proteicas en el grano. Debido a esto es el responsable del rendimiento del cultivo, la cantidad presente en las hojas le permite a la planta incrementar la fotosíntesis y por lo tanto la obtención de biomasa vegetal.

La demanda de fósforo y potasio viene dada por la disponibilidad de nitrógeno suficiente en el suelo para el desarrollo del cultivo. Sin embargo, esto representa un problema medioambiental, ecológico y agrícola cuando se trata del uso de fertilizantes químicos para suplir las necesidades del cultivo y las deficiencias que presentan los suelos agrícolas. El coste medioambiental al que han sido sometidos los suelos agrícolas va desde la pérdida total o parcial de la fertilidad, la reducción de la ecología microbiana beneficiosa presente en estos, hasta la contaminación de los diversos ciclos naturales (Dobermann & Fairhurst, 2015).

La investigación realizada por Rodríguez et al., (2017), evidencia que el nitrógeno es considerado el bioelemento más importante en la bioquímica de las plantas ya que es requerido en elevadas cantidades y su disponibilidad en el suelo en ciertas ocasiones es escasa, siendo considerado el componente limitante para la producción y rendimiento de los cultivos.

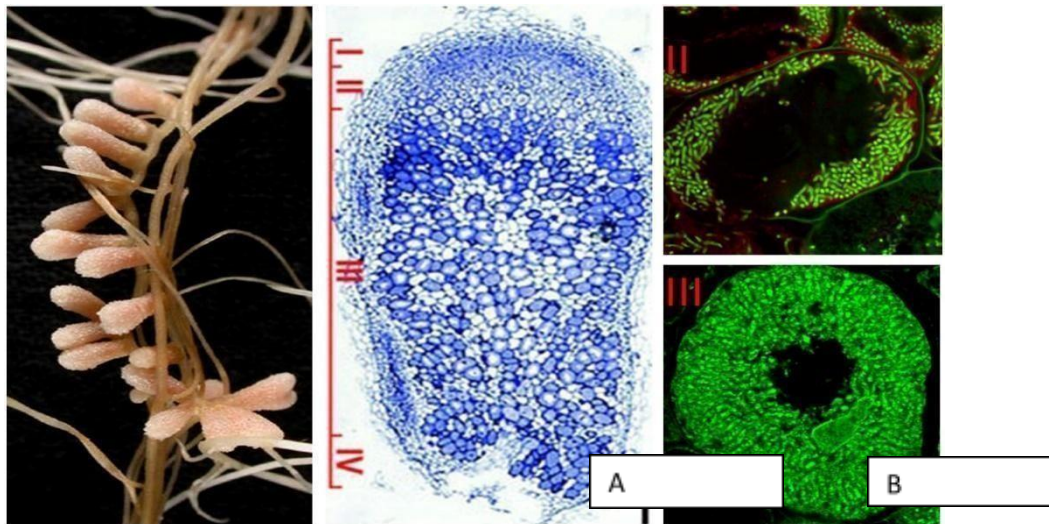
La Biotecnología agrícola ha establecido alternativas que permitan reducir el uso de fertilizantes químicos, mediante la fijación de nitrógeno a través de microorganismos benéficos. La FBN es desarrollada por bacterias, hongos y algas, mediante la maquinaria enzimática encargada de transformar el nitrógeno elemental a amonio que es asimilable por las plantas y convertido, mediante reacciones de oxidación, a nitratos por acción de las bacterias aerobias fijadoras de nitrógeno encontradas en el suelo (Rodríguez et al., 2017).

El nitrógeno es indispensable en cultivos como la soja. Según Fontanetto & Keller, (2016), la demanda de nitrógeno en dicha especie vegetal es de 80 kg / ton, su deficiencia ocasiona reducción en el crecimiento, así como problemas de clorosis que inicia en las hojas inferiores y concluye con daños directos a toda la planta. Por dicho motivo las investigaciones se centran en los mecanismos de asimilación, fijación y absorción del Nitrógeno mediante microorganismos (Fontanetto & Keller, 2016).

La agricultura actual utiliza el mecanismo de FBN mediante la simbiosis entre especie vegetal-microorganismo, lo cual les permite lograr el propósito de reducir los costos de producción e incrementar los rendimientos del cultivo (Urzúa, 2015).

El objetivo principal de la simbiosis entre microorganismos del género *Rhizobium* con Fabáceas es la FBN que tiene como propósito el crecimiento, desarrollo y rendimiento de especies vegetales como es el caso de *Medicago truncatula* (figura 11).



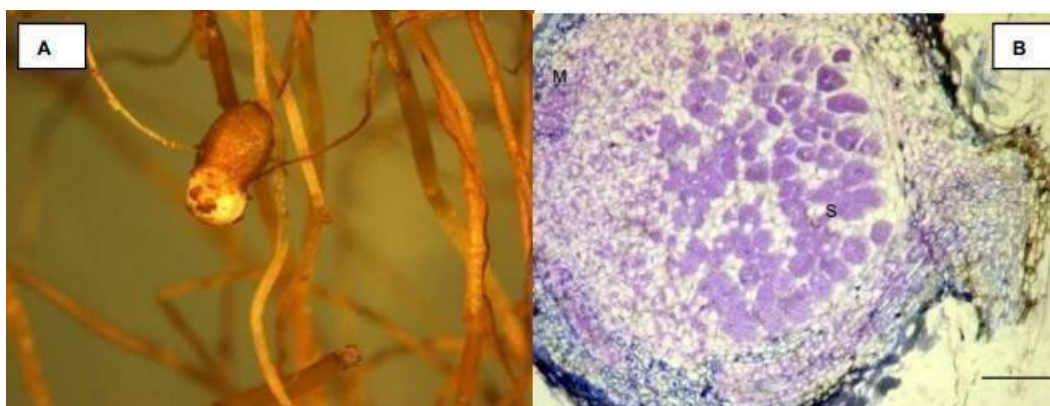


**Figura 11.** Simbiosis entre *Medicago truncatula*- *Sinorhizobium meliloti*. Desarrollo de nódulos radiculares y sus secciones (A). Tinción con Syto9 de los endosimbiontes (B) (Maróti et al., 2014).

La formación de nódulos por su parte es la clave para el manejo no solo de nutrientes en cuanto a la fijación de nitrógeno, sino también como sistema de acumulación de metales pesados que resultan ser tóxicos para especies vegetales de Fabáceas (Stambulska & Bayliak, 2020).

Los suelos salinos representan un gran desafío para la agricultura siendo uno de los factores con mayor impacto en el establecimiento de cultivos debido a su condición de suelos poco productivos, (Cerro Sánchez P. D., 2019).

Por lo tanto, la tolerancia al estrés salino es otro de los objetivos de la simbiosis entre *Rhizobium* y fabáceas. Según Scambato, (2013), el género *Prosopis*, es capaz de crecer, adaptarse y desarrollarse en suelos poco fértiles, así mismo los estudios demuestran que el género de *Rhizobium* poseen la capacidad para crecer y cohabitar en condiciones de estrés salino (Figura 12).



**Figura 12.** Simbiosis entre *Prosopis chilensis* y *Rhizobium* en condiciones de estrés salino. Formación de nódulos(A), corte longitudinal del nódulo(B) (Scambato, 2013)

Uno de los objetivos de las investigaciones ha sido la determinación de especies de *Rhizobium* capaces de tolerar concentraciones elevadas de sales.



Cerro, (2009), demostró que *Rhizobium tropici* CIAT899 es capaz de tolerar 300mM de NaCl, a pesar de una larga fase de latencia para su adaptación, se produjo un incremento exponencial en la curva de crecimiento. Esto indicaría que el microorganismo responde ante situaciones de estrés, siendo un dato interesante para el desarrollo de la agricultura en este tipo de suelos.

Es de gran importancia agronómica el establecimiento de simbiosis entre *Rhizobium*-micorriza- leguminosa, la cual puede resultar en un incremento en la capacidad fotosintética de las plantas, gracias al incremento en la disponibilidad de nutrientes asimilables y a factores hormonales debido a la acción de los endófitos. Las especies vegetales que han evidenciado una mejora en el rendimiento a partir del establecimiento de este tipo de simbiosis son: *Robinia pseudoacacia*, *Medicago sativa*, *Acacia auriculiformis* y *Acacia mangium* (Scambato, 2013).

### **3.7 Los factores abióticos que influyen en el rendimiento de la simbiosis entre *Rhizobium*- Fabáceas.**

Existen factores ambientales que afectan el rendimiento de la simbiosis entre microorganismo y especie vegetal, limitando la capacidad de FBN. La nodulación es un proceso mediante el cual la planta se provee de nutrientes esenciales para el desarrollo y crecimiento durante las diferentes etapas del cultivo, los endófitos presentes en los nódulos son los responsables de la fijación y asimilación de estos nutrientes nitrogenados. Cuando la nodulación se ve limitada por la carencia o exceso de diversos compuestos minerales, el rendimiento simbiótico entre especies vegetales y microorganismos también se ve afectada. Como es el caso del molibdeno, un metal de transición que es parte constituyente de la enzima nitrogenasa reductasa, por lo que su deficiencia afecta directamente al mecanismo de la simbiosis (García, 2011).

Saz, (2016), indicó que la presencia de cadmio afecta el crecimiento a nivel radicular de la planta. Mediante el uso de diversas concentraciones de CdCl<sub>2</sub>, observó que las concentraciones de 0.5 y 0,7 mg/L, permitían la formación de nódulos y las concentraciones mayores a los 0,7 mg/L limitaban el proceso de nodulación. Como consecuencia la simbiosis entre los microorganismos fijadores de nitrógeno y la alfalfa se vio afectada (Saz Navarro, 2016).

Las investigaciones realizadas por Edulamudi et al, (2019), en simbiosis entre *Macrotyloma uniflorum* y *Rhizobium* demostraron que la concentración alta de metales pesados reduce la tasa fotosintética con la consecuente disminución en la eficiencia de la nodulación y desarrollo de la simbiosis. Esto representa un factor limitante para el crecimiento de las especies vegetales.

Otro factor limitante es la temperatura, la cual tiene un efecto directo en la simbiosis y por ende en el rendimiento de los cultivos. Un incremento de la temperatura produce un aumento en los procesos de respiración celular, disminuyendo la disposición de carbono para el desarrollo de la simbiosis. Así mismo a temperaturas menores que 7°C la simbiosis se ve afectada debido a una reducción del número de pelos radiculares (García, 2011).

La FBN se ve limitada por la disponibilidad de agua y por la presencia de luz, imprescindible para el desarrollo de la fotosíntesis, mediante la cual se obtienen los hidratos de carbono importantes en el funcionamiento y desarrollo de la nodulación (García, 2011).

La lixiviación es un fenómeno producido por las altas precipitaciones, mediante el cual los elementos como hierro, molibdeno, calcio, fósforo, zinc y cobalto pasan a las capas bajas del suelo hasta llegar a las aguas subterráneas, generando una deficiencia en la disponibilidad de elementos esenciales en los suelos agrícolas e impidiendo el desarrollo de la nodulación, debido a que afectan el correcto funcionamiento de los microorganismos fijadores de nitrógeno (García, 2011).

Otro factor limitante del desarrollo de las especies vegetales son las enfermedades causadas por virus, hongos y entomopatógenos, que afectan el sistema de defensa de la planta, así como la producción de los metabolitos de señalización involucrados con el proceso de infección y formación del nódulo (García, 2011).

El factor principal que reduce el rendimiento está relacionado con el estrés abiótico, especialmente en suelos pobres en nitrógeno, el daño repercute especialmente en la FBN y en el mecanismo de simbiosis entre especies de *Rhizobium* y especies vegetales. Para ello, la biotecnología ha creado diversas estrategias que les permita a las plantas y a los microorganismos adquirir tolerancia frente a diversas condiciones de estrés abiótico. Una limitante es el estudio de los genes encargados de la codificación de enzimas relacionadas con la concentración de osmolitos, lo que les permitirá a las especies vegetales incrementar su capacidad de tolerancia frente a estrés hídrico y salino (Quiñones et al., 2011).

La forma en que actúan los estreses abióticos en las especies vegetales es mediante la afectación directa del sistema de infección de los rizobios a los pelos radiculares, impidiendo la formación de nódulos. Así mismo interfieren directamente en la capacidad enzimática encargada de la asimilación biológica de nitrógeno y en el metabolismo de hidratos de carbono y aminoácidos (Quiñones et al., 2011).

En las zonas semiáridas y áridas el desarrollo de cultivos se ve afectado por la poca disponibilidad de nutrientes y de recursos hídricos. Esto reduce la productividad y el rendimiento, creando, como consecuencia, la necesidad del uso de fertilizantes químicos y sistemas de riego que generan graves consecuencias a medio y largo plazo en el medio ambiente, suelos agrícolas (pérdidas de suelos y biodiversidad edáfica, salinización, eutrofización, entre otras) y en la economía (Quiñones et al., 2011).

En los suelos mediterráneos la disponibilidad de nitrógeno asimilable en los suelos es una gran limitante, ya que cumple con una función crítica en el desarrollo y rendimiento de la producción agraria y de los ecosistemas naturales (Quiñones et al., 2011).

Los problemas generados por los factores abióticos anteriormente mencionados son la consecuencia del desarrollo de actividades industriales, mineras, el uso indiscriminado de fertilizantes químicos y las malas prácticas agrícolas, los cuales contaminan el recurso hídrico y los suelos mediante la concentración de componentes tóxicos para los animales y las plantas (Quiñones et al., 2011).

Dentro de los principales síntomas tóxicos que generan los factores abióticos como es el caso de los metales pesados (Hg, Cd) a las plantas son: reducción de la capacidad fotosintéticas, disminución del crecimiento, problemas en la respiración celular, clorosis, tamaño reducido de las hojas raíces y pérdidas de los cultivos (Quiñones et al., 2011).

### **3.8 Estrategias de la Biotecnología para la mejora de la tolerancia de especies vegetales ante situaciones de estrés abiótico**

La Biotecnología es una tecnología relativamente “nueva” que últimamente ha sido cada vez más estudiada. Es considerada como una disciplina con un gran potencial, ya que puede ser aprovechada de distintas maneras para lograr mejores condiciones, tanto económicas como sociales en beneficio de la población (Villavicencio-Carbajal, 2015). Una de las razones principales por las que ésta disciplina científica ha tenido gran auge y gran aplicación es debido a que los procesos biológicos, los organismos, las células y sus componentes son utilizados para el desarrollo de nuevas tecnologías y herramientas aplicadas en la agricultura, industria y el área clínica, para ayudar a mejorar la vida del ser humano y la sostenibilidad del planeta. Tiene varias y diversas ramas relevantes como lo son la Biotecnología roja (salud humana y animal), Biotecnología azul (marina), Biotecnología verde (plantas), Biotecnología blanca (industrial), Biotecnología gris (ambiente). En este caso, el enfoque o rama principal de este proyecto es la Biotecnología verde, en consecuencia, su aplicación al campo agrícola y vegetal (Orozco-Ugarriza, 2019)

Debido a que la agricultura es la principal manera de suplir una de nuestras primeras necesidades que es la alimentación, cada vez se buscan alternativas para hacerla más eficiente y menos dañina para el medioambiente. Se trata de un reto de enormes proporciones debido al constante crecimiento de la población, a los profundos cambios en la demanda de alimentos y a la amenaza de la migración masiva de jóvenes del medio rural en busca de una vida mejor. Por otro lado, la urbanización, los aumentos de la población y el crecimiento de los ingresos están impulsando una fuerte demanda de alimentos, convirtiéndose en el momento en que la agricultura se enfrenta a los problemas sin precedentes de la limitación de los recursos naturales y el cambio climático. Además, la urbanización y el crecimiento de la riqueza están impulsando en los países en desarrollo una “transición nutricional” hacia un consumo más elevado de proteínas animales. La agricultura y los sistemas alimentarios deben adaptarse considerablemente para ser más productivos y diversificados (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2017).

La biotecnología agrícola provee propuestas y soluciones para varios de los problemas presentados en el ejercicio de la agricultura, como es el deterioro del suelo, la presencia de nuevas plagas y enfermedades, la baja resistencia a factores bióticos y abióticos en algunas especies vegetales, entre otros. La domesticación de plantas, primera manipulación genética de los organismos vivos y origen de la agricultura representa la mayor contribución de la biotecnología al desarrollo de la humanidad (Melgarejo et al; 2014); así como estrategias dirigidas a la detección de patógenos, la obtención y mantenimiento de cultivares libres de patógenos, y nuevas estrategias para el control de enfermedades para las que no existen vías convencionales.

En este sentido, la ingeniería genética ofrece alternativas basadas en genes capaces de potenciar aspectos relativos a reacciones de hipersensibilidad, resistencia sistémica adquirida, etc.

La mejora vegetal reproduce los mecanismos evolutivos de generación de variabilidad, complementando la selección natural realizada de forma consciente o inconscientemente por las personas, teniendo como fin la obtención de cultivares más productivos, adaptados

a distintas condiciones de cultivo y resistentes o tolerantes a estreses bióticos y abióticos, que permitan la satisfacción de las necesidades humanas (alimentos inocuos y nutritivos). Además, la Biotecnología Vegetal ha permitido evolucionar desde la estricta producción de alimentos a aspectos más amplios que se contemplan en lo que hoy denominamos Bioeconomía (Melgarejo et al; 2014).

Una importante actividad de la biotecnología vegetal es el cultivo in vitro de tejidos y células vegetales, la cuál es una es una fuente alternativa para la producción de valiosos compuestos activos a partir de plantas. El cultivo de células indiferenciadas ha sido objeto de numerosas investigaciones, sin embargo, un gran interés ha despertado en el cultivo de raíces y órganos durante los últimos años. Diferentes estrategias in vitro han sido desarrolladas con el objetivo de incrementar el contenido de metabolitos secundarios en plantas e incluso han permitido la obtención de nuevos compuestos de gran interés, especialmente para la industria farmacéutica (Jiménez, 2011)

Entre los principales problemas a los cuales se intenta hacer frente mediante la Biotecnología agrícola se encuentran el estrés salino, la remoción de metales pesados del suelo y la remediación de suelos pobres. Una de las herramientas mediante la cual se enfoca la solución a estos problemas es la simbiosis entre bacterias fijadoras de nitrógeno, como *Rhizobium* y leguminosas.

La salinización de los suelos es reconocida como la principal amenaza de los recursos medioambientales y afecta entre el 7 a 10 % de la extensión continental. Un suelo es considerado salino cuando la concentración de iones interfiere el crecimiento de especies de interés agrícola y alcanza una conductividad eléctrica  $>4 \text{ dS m}^{-1}$  (aproximadamente 36 mM de NaCl), determinados en la pasta del suelo a 25 °C. La presencia de sales en el suelo es de origen pedogénico (meteorización) o antrópico (agua de irrigación o fertilización) y se exagera cuando las precipitaciones son insuficientes para lixiviar los iones del perfil del suelo, o cuando las tasas de evaporación son altas (Sanchez López et al, 2016) por ende, la salinidad disminuye la producción agrícola en la mayoría de los cultivos por la afectación de las propiedades físico-químicas del suelo y balance ecológico del área cultivada. La biotecnología puede ayudar a equilibrar el nivel de iones, para que así el suelo consiga un nivel apropiado de sales (la mayoría de veces a partir de aplicación de microorganismos); así como lo muestra el estudio de Sánchez y colaboradores, en donde encontraron que las cepas *Bacillus amyloliquefaciens* KISA 34 y *Bacillus subtilis* KISA 71, aisladas de la rizosfera del pasto *Pennisetum clandestinum*, tienen la capacidad de soportar altas concentraciones de sal en condiciones in vitro como in vivo, y la inoculación con las mencionadas cepas, promueven el crecimiento del pasto *P. clandestinum* bajo condiciones de estrés por salinidad.

Otro trabajo, que respalda el uso de microorganismos para optimización del cultivo en estrés salino, es el realizado por Zazueta y colaboradores (2021), en el cual se concluyó que el incremento de la salinidad a 100 mM en agua de riego posterior a la floración aumenta significativamente atributos organolépticos y fitoquímicos en frutos de tomate, como los fenoles, flavonoides y licopeno; donde el HMA *R. irregularis* aporta un incremento de carbohidratos totales en esta condición tanto en frutos color naranja como en frutos color rojo, mientras que al incrementar la concentración de salinidad disminuye la colonización radicular del HMA.

La actividad minera, agrícola y otras actividades desarrolladas por el ser humano, generan metales pesados como el plomo que pueden estar ambientalmente biodisponible y causar daño a los organismos vivos (biota) de los ecosistemas expuestos. Entre las soluciones más destacadas para estos problemas está la biorremediación y fitorremediación (uso de algas o plantas) que consiste en el uso de microorganismos y algas o plantas para la remoción, reducción, degradación o inmovilización de toxinas (Méndez et al; 2017). En un trabajo realizado por Méndez y colaboradores (2017), se concluyó que la planta de tabaco cimarrón (*Nicotiana glauca*) se puede utilizar en el proceso de fitorremediación, ya que se ha reportado viable en suelos contaminados con metales pesados en Loma de Carrizales en el distrito de Ilo, departamento de Moquega. Otra alternativa es específicamente el uso de basidiomicetes para la remoción de metales con respecto a los métodos tradicionales, básicamente porque la biomasa actúa como un intercambiador natural al remover metales en solución. Un estudio realizado por Coello y Burgos (2012), mediante el uso del hongo *Pleurotus ostreatus* como biorremediador en suelos contaminados con metales pesados demostró que el hongo *Pleurotus ostreatus* es más efectivo para remover específicamente concentraciones de Co, Cd, y en menor proporción Pb y Cu.

La simbiosis es una de las interacciones más útiles e importantes que ocurre en los seres vivos; una de las simbiosis más conocidas es la que existe entre especies vegetales con microorganismos, especialmente las que se establecen entre especie vegetal -hongos, llamadas Micorrizas; y entre especie vegetal- bacterias.

Uno de los procesos principales que ocurren y que representa la principal consecuencia de la simbiosis es la FBN. Este es un proceso agrícola y ecológicamente crucial que realizan los procariontes en dos grupos ecológicos: (1) por células de vida libre a menudo en estrecha asociación con plantas o (2) por rizobios que fijan nitrógeno durante una relación endosimbiótica con legumbres. La fijación de gas  $N_2$  en amoníaco por parte de las bacterias de los nódulos de la raíz (rizobios) se conoce como fijación simbiótica de  $N_2$  (SNF), y es un proceso más eficiente en términos de suministro de nitrógeno a la planta. En resumen, la simbiosis se inicia luego de un intercambio de señales entre las raíces de la planta y los rizobios de vida libre en el suelo próximo a las raíces (la rizosfera). A medida que se desarrolla el tejido del nódulo de la raíz, los rizobios ingresan a este tejido especializado a través de un hilo de infección extracelular. A medida que estos hilos, que crecen hacia adentro, alcanzan las células de los nódulos diferenciados, las bacterias quedan rodeadas por una membrana derivada de la planta y son absorbidas por el citosol, donde se desarrollan como bacteroides. Los bacteroides luego experimentan importantes cambios morfológicos y transcripcionales, lo que lleva a la fijación activa de  $N_2$  (diCenzo et al; 2019).

En otra investigación realizada por Nápoles y colaboradores (2022), se realizaron dos experimentos en los que se utilizaron 10 cepas de rizobios de diferentes procedencias, y dos cultivares de café; uno se realizó en condiciones controladas y otro en canteros pregerminadores. Se observó que, en condiciones controladas, la inoculación de cepas Rpr11, Rpr12, 1-2, ICA8001 y Can3 incrementaron el porcentaje de germinación; y en los canteros pregerminadores, los inoculantes a base de las cepas Rpr2 y Rpr11 produjeron los mayores porcentajes de emergencia y de energía de germinación; por ende, se pudo concluir que las cepas Rpr2 y Rpr11 de *Rhizobium*, incrementaron la germinación de las semillas de dos variedades de café.

A pesar de que los rizobios son más conocidos por la nodulación de las raíces de las leguminosas y la fijación de nitrógeno atmosférico para el huésped a cambio de fotosintatos;

la mayoría de las diversas cepas de rizobios no forman nódulos en las leguminosas, a menudo porque carecen de los sitios de reconocimiento claves para inducir la nodulación. Los rizobios no noduladores son heterótrofos robustos que pueden persistir en el suelo, prosperar en la rizosfera o colonizar las raíces como endófitos, pero su papel en el mutualismo leguminosa-rizobio sigue sin estar claro (Gano et al; 2016)

La Biotecnología se ha venido enfocando en el estudio de cepas que portan los genes relacionados con la nodulación y con la enzima nitrogenasa reductasa; así como demuestra el estudio realizado por Wang y colaboradores (2019) en el que se aisló una bacteria aerobia, con forma de bastoncillo y tinción de Gram negativa, designada CL12T, de raíces de *Glycine max* (Linn. Merr.). A dicha bacteria CL12T se le realizó un análisis filogenético, y se encontró que era del género *Rhizobium*. A pesar de ello, como resultado de otros análisis, se observó que esta cepa no tenía los genes de nodulación ni el gen de la nitrogenasa reductasa, por lo cual no podía formar nódulos en la soja. Se concluyó que se había encontrado una nueva especie de *Rhizobium*, nombrado como *Rhizobium glicinendophyticum* sp.

En una investigación realizada por Gano y colaboradores (2016) se observó que las cepas no nodulantes eran capaces de coinfectar nódulos de leguminosas en presencia de cepas nodulantes. Los datos obtenidos sugieren que las cepas no nodulantes atenúan con mayor frecuencia el mutualismo *Acmispon-Bradyrhizobium* y que esto ocurre a través de interacciones competitivas en la interfaz raíz-suelo en lugar de en la planta.

En el estudio realizado por Liu y colaboradores (2017), se exploró la base genética de la simbiosis promiscua de *Sophora flavescens* con diversos rizobios. Para determinar el impacto de los factores Nod (NF) en la simbiosis de *S. flavescens*, se generaron mutantes de genes relacionados con la nodulación de cepas de rizobios representativas. Las cepas con mutaciones en genes de nodulación comunes (nodC, nodM y nodE) no lograron nodular *S. flavescens*, lo que indica que la nodulación promiscua de esta planta depende estrictamente de la estructura básica de NF. Las mutaciones de los genes de decoración NF nodH, nodS, nodZ y noel no afectaron la nodulación de *S. flavescens*, pero sí afectaron la eficiencia de fijación de nitrógeno de los nódulos.

Esto sugirió que las mutaciones habían interrumpido un regulador negativo que evita la nodulación de *S. flavescens*, lo que lleva a una nodulación inespecífica para los mutantes. En resumen, el mecanismo de simbiosis promiscua de *S. flavescens* con rizobios podría estar relacionado con su reconocimiento inespecífico de estructuras NF, y la especificidad de huésped también puede estar controlada por genes relacionados con la nodulación actualmente desconocidos.

Además de esto se ha encontrado que la nodulación ya no está restringida al grupo tradicional de 'rizobios' luego de la aparición de los nuevos rizobios beta como nodulantes potenciales de varias leguminosas autóctonas. Algunas ideas sobre el estado del concepto de especificidad del huésped leguminosa-rizobio y la pérdida de esta especificidad en varias asociaciones simbióticas, pone en un dilema el dogma de la especificidad del huésped de la simbiosis leguminosa rizobio (Hassen et al, 2020).

### **3.8.1. Regulación en la expresión de genes**

El conocimiento acerca de los genes implicados tanto en el proceso de nodulación

como en el proceso de expresión de proteínas es de importancia para el área agrícola, debido a que, a partir del funcionamiento, regulación de la expresión génica y modificación genética se puede establecer un buen funcionamiento de la simbiosis. El conocimiento específico de la interrelación entre *Fabaceae-Rhizobium* es primordial, debido a que los microorganismos reconocen por medio de receptores quimiotácticos los exudados procedentes de la raíz (flavonoides), metabolitos secundarios que la planta segrega en respuesta ante la presencia de un organismo externo o lesión. Esto hace que especies como *Rhizobium* sintetizen y segreguen factores de nodulación (lipochitoligosacáridos) (Cea Torrescassana, 2019).

Los factores Nod inician cascadas de transducción de señales que resultan en la formación del hilo de infección, mediante el cual los rizobios llegan hasta las células del córtex de la raíz, formando los nódulos, estructuras en las que albergan a los microorganismos fijadores de nitrógeno (Cea Torrescassana, 2019).

Los sistemas de secreción de los microorganismos Gramnegativos han sido ampliamente estudiados, debido a que son los encargados de la transferencia de efectores desde el citoplasma hasta el citoplasma de la célula vegetal a través de nanotúbulos, dentro de los cuales se pueden identificar: sistemas de secreción tipo III o T3SS, sistema de secreción tipo IV o T4SS y sistema de secreción tipo VI o T6SS (Cea Torrescassana, 2019).

Los sistemas de secreción son importantes ya que a través de ellos se produce el movimiento de sustancias desde la bacteria hasta la célula hospedadora. Algunos presentan actividad antimicrobiana y antivírica, así como capacidad de capturar metales, factores que podrían afectar la simbiosis. Los sistemas de secreción se conforman de conjuntos de genes de expresión de moléculas estructurales "core components" (Cea Torrescassana, 2019).

Existen estudios que indican el establecimiento de un intercambio de moléculas químicas como señales de reconocimiento, que favorecen la formación del hilo de infección, cuando la planta se encuentra en condiciones adversas por déficit de nitrógeno. El análisis genético de diversas especies de *Rhizobium* permitió conocer aquellas que nodulan predominantemente en *Phaseolus vulgaris*, observándose que las especies que contienen el alelo  $\alpha$  presente en el gen nodC son más eficientes en el establecimiento y desarrollo de la simbiosis, en comparación con aquellas que contienen el alelo  $\delta$  en dicho gen (Clúa, 2018).

Los factores relacionados con la adhesión para la formación de biofilm o ciertos sustratos, son de importancia en el establecimiento de simbiosis entre *Rhizobium leguminosarum* y fabáceas, lo cual incrementa la adhesión de las bacterias a sustratos presentes en el suelo, así como el aumento en la formación de biofilms. Esto representa un fenómeno de importancia para la agricultura ya que incrementa la eficiencia de la simbiosis entre *Rhizobium leguminosarum* y las fabáceas (Vozza, 2012).

En investigaciones sobre la regulación de los genes implicados en la síntesis de factores de nodulación (factores Nod) en condiciones adversas y no adversas de especies de *Rhizobium*, así como el mecanismo de simbiosis con Fabáceas como *Leucaena leucocephala*, *Phaseolus vulgaris*, *Lotus burttii* y *Lotus japonicus*, se encontró que los genes CIAT 899 encargados de la nodulación son inducidos por señales químicas de flavonoide apigenina en condiciones de estrés salino o de manitol, lo cual indicó que la expresión de genes que expresan factores Nod en condiciones adversas, son de importancia para el

establecimiento de mecanismo de simbiosis en áreas geográficas donde la producción de cultivos se ve inhibida por condiciones adversas como suelos salinos (Cerro Sánchez P. , 2019).

Guasch-Vidal, (2013), indica que las altas concentraciones de cloruro de sodio inducen la expresión de los genes Nod, en ausencia de señales químicas como los flavonoides. El estudio basado en la expresión de los genes Nod de *Rhizobium tropici* CIAT 899 cuando estos presentan la deficiencia de biomoléculas del metabolismo secundario de las plantas como los flavonoides, reportó que a concentraciones de 300mM de cloruro de sodio los genes de nodulación se expresan (gen nod apigenina), a su vez se evidenció que a concentraciones más altas los genes lacZ y genes de guiño se fusionaron, es decir se dio paso a la creación de pseudonódulos radicales de *Phaseolus vulgaris*. Los investigadores concluyeron que la deficiencia de inductores o metabolitos secundarios y el incremento del NaCl, influye positivamente en la expresión de genes de nodulación y los factores Nod.

Se realizaron estudios sobre la función proteica ante la respuesta al estrés sHSP de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* UPM791 cuando establece simbiosis con especies vegetales de *Lens culinaris* y *Pisum sativum*. Se logró la identificación de 100 proteínas que expresan según el huésped en el cual se encuentran, dentro de las cuales se encontraban las proteínas de choque térmico o sHSP, que estarían relacionadas con el mecanismo de respuesta bacteriana ante situaciones adversas o de estrés. Los resultados de la investigación demostraron que cuando se sobre expresa para sHSP252 y sHSP851, se influye en la protección del carácter de viabilidad de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* UPM791 en condiciones adversas como el estrés a peróxido de hidrógeno en concentraciones de 3 mM en lapsos de 15-30 min (Alejandre Villalobos, 2020).

Gómez et al., (2011), Identificó los genes nirK y norC de *Rhizobium etli* CFN42 encargados de la expresión de proteínas con acción nitrato reductasa importantes en la asimilación de nitrato para los procesos de respiración celular, así mismo encontró que el gen NnrR que se expresan en condiciones de microaerofilia influyen en la regulación de la respuesta de *Rhizobium etli* CFN42 ante el óxido nítrico.

En condiciones microaerófilas, se requiere la presencia de especies de *Rhizobium* que contengan el complejo de genes FixNOQP los cuales expresan para las proteínas con acción catalítica de citocromo oxidasa, con afinidad por el oxígeno necesario para la fosforilación oxidativa. Las especies identificadas con el complejo de genes FixNOQP son: *Rhizobium leguminosarum*, *Sinorhizobium meliloti*, las cuales presentan porcentajes de afinidad mayor al 90%, precedidas de especies evolutivas como *Bradyrhizobium* y *Rhodopseudomonas*. Las investigaciones sugieren que la presencia del complejo de genes en especies fijadoras de nitrógeno permitiría que las bacterias se adapten a sistemas microaerófilos desde áreas como la rizosfera, agregados del suelo y los nódulos radiculares (Kopat, 2017).

Se ha evidenciado que la tendencia científica se orienta al estudio de genes involucrados en la expresión de proteínas que permitan la eficiencia del establecimiento de la relación simbiótica, así como el desarrollo de simbiosis en situaciones de estrés. Este interés científico se debe al cambio medioambiental que está sufriendo todo el planeta, especialmente en lo que respecta a la pérdida de suelos cultivables, lo cual ha hecho que la ingeniería agrícola y la biotecnología sean herramientas que permitan el desarrollo de cultivos productivos, mediante el establecimiento de simbiosis con especies como *Rhizobium*. Según Díaz, (2019), en su estudio establece como objetivo el uso de la cepa



*Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2T como bioinoculante en especies vegetales diferentes a *Populus alba*, ya que se encontró relación simbiótica, entre dicha cepa microbiana y especies vegetales de *Phaseolus vulgaris*, *Medicago sativa* y *Trifolium repens*.

Existen proteínas involucradas en la relación específica y compleja, que da paso a la organogénesis de los nódulos y el mecanismo de infección entre *Rhizobium* y especies vegetales.

Se ha reportado la existencia de una vía involucrada en el proceso de infección y de nodulación, mediante la expresión de mRNA de PvNF-YA9 y PvNF-YA1, por el contrario, su inhibición afectaría el proceso de simbiosis. La sobreexpresión permitió evidenciar que PvNF-YA1 está relacionado con la eficiencia en los procesos de selección de especies de *Rhizobium* formadores de nódulos. Existen otros datos importantes que se refieren a la expresión de SIN1, una proteína del grupo GRAS, que estaría relacionada con procesos de crecimiento de las raíces laterales, importantes para la creación de los nódulos y el proceso de infección del rizobio. De estos estudios se concluye que tanto las proteínas GRAS y NF-Y, representan grupos de transcripción multiméricos que permiten a las especies vegetales defenderse y desarrollarse en presencia de diversas situaciones ambientales (Rípodas, 2015).

Existen investigaciones sobre la regulación de genes relacionados con la expresión de la O-acetil-serin(tiol)liasa o OASTL, proteínas implicadas en la formación de nódulos en situaciones de déficit de minerales como el azufre y de estrés hídrico.

La OASTL presentaba actividad específicamente en hojas y raíces en especies vegetales cultivadas a condiciones óptimas. En condiciones de deficiencia de azufre, se observó un incremento de la actividad enzimática de la OASTL en su isoforma citosólica en hojas, evidenciando que su expresión génica no se ve afectada. Cuando las especies vegetales fueron sometidas a estrés hídrico, la actividad catalítica se vio inhibida, porque los genes OASA (isoforma citosólica) no se expresaron. De estos estudios se concluyó que la expresión de los genes OASTL y el incremento en los niveles de la actividad enzimática favorecen la FBN en ausencia de azufre (Muñoz Azcárate, 2014).

Por otra parte, los estudios genéticos de nodulación en *Aeschynomene* evenia realizados por Quilbé y colaboradores (2021) muestran que los genes de señalización simbiótica AePOLLUX, AeCCamK, AeCYCLOPS, AeNSP2 y AeNIN son necesarios para desencadenar la nodulación de la raíz y el tallo.

El estudio de la expresión y regulación de genes involucrados en la nodulación y en la síntesis de proteínas con acción catalítica importantes en el proceso de la FBN, especialmente en situaciones de estrés biótico y abiótico, representan un avance para la ingeniería agrícola en la producción de cultivos eficientes y con óptimos rendimientos. Por ese motivo, la mayoría de los estudios están basados en la sobreexpresión, la regulación de las vías de síntesis de proteínas, análisis e identificación de especies de *Rhizobium* que posean los complejos enzimáticos capaces de establecer simbiosis y la búsqueda o descubrimiento de los genes implicados en el proceso de nodulación.

### 3.9 Simbiosis entre *Rhizobium*, micorrizas y especies vegetales

La contaminación como consecuencia de las actividades industriales ha generado un desgaste a nivel ambiental y agrícola. Dicha degradación va desde el aire, mantos freáticos, hasta el suelo. La generación de elementos no degradables ocasiona un alto grado de contaminación y la reducción de la capacidad del suelo. Dentro de los metales podemos encontrar el níquel y el vanadio, su grado de contaminación depende de las concentraciones, las condiciones ambientales y la forma como elemento químico en la cual se presente.

Por lo tanto, existen investigaciones centradas en la búsqueda de estrategias que permitan reducir el efecto tóxico de estos metales tal como: la fitorremediación mediada por la simbiosis entre especies vegetales- micorrizas- *Rhizobium*. Como lo demuestra Villegas (2011), en su estudio sobre la respuesta que ejercen las especies vegetales de *Leucaena leucocephala* en presencia del fenantreno y la capacidad simbiótica de *Rhizobium-Leucaena-Glomus*, se evidencia que el fenantreno influyó en la estimulación de la nodulación, pero redujo la colonización de la especie de micorriza. Aun así, se demostró que la simbiosis de las tres especies aumentó la acción de la enzima nitrogenasa, debido a la presencia de alto contenido de fósforo y nitrógeno. El autor concluye que la simbiosis tripartita entre las especies de *Rhizobium-Leucaena-Glomus* permiten la degradación de fenantreno en suelo y la asimilación de nitrógeno a partir de la nitrogenasa, lo cual favorece la FBN y la fitorremediación de suelos contaminados.

Osorio, (2019), investigó sobre la relación simbiótica tripartita entre especies de *Rhizobium*, hongos micorrícicos arbusculares y la especie de *Cajanus cajan*, demostrando que las especies vegetales obtuvieron un incremento en la eficiencia de los parámetros agronómicos, especialmente la cepa C4, la cual presentó un aumento en la producción en relación con la biomasa, longitud y capacidad de adaptarse a la relación simbiótica. Otro dato importante de la investigación trata del incremento en la capacidad de la formación de esporas micorrícicas, debido a que este parámetro influye positivamente en el desarrollo de la simbiosis.

Spagnoletti et al., (2013), afirma que los microorganismos de las especies de *Rhizobium* son de importancia en el establecimiento de ecosistemas sostenibles. La inoculación en especies vegetales brinda ventajas en desarrollo e incremento de la producción agrícola. Sin embargo, la simbiosis tripartita entre *Rhizobium*- micorrizas arbusculares, permite el incremento en el crecimiento, efectividad en los sistemas de infección y mejora de la nutrición mineral en las especies de interés agronómico. Los autores indican que en el estadio denominado precolonización, se inician las interacciones simbióticas entre las especies de *Sinorhizobium meliloti-Glomus intraradices*-alfalfa. Se evidencia una elevada colonización de hongos micorrícicos arbusculares, la presencia de órganos como vesículas, apresorios e hifas de infección e indicios de formación de esporas en los nódulos en su estructura interior y exterior.

Martín & Ramírez, (2015), mediante su investigación sobre la co-inoculación de hongos micorrícicos arbusculares (*Glomus cubense*), *Rhizobium* (Can2, Can3, Can4 y Can5) en *Canavalia ensiformis*, en suelos con condiciones Ferralíticos Rojo Lixiviado, encontraron, que la especie vegetal establece simbiosis efectiva con *Rhizobium* y el HMA. Sin embargo,

afirman que la simbiosis está mediada por la especificidad genética que posea la especie vegetal hacia el microorganismo gramnegativo, debido a que las cepas de Can3, presentan mejor capacidad en el establecimiento de la simbiosis y en el desarrollo de la planta.

El estudio realizado por Quintana et al., (2014), determinó que la inoculación de especies de *Rhizobium loti* V-4033 y hongos micorrícicos, proporcionó un 85% de colonización en las raíces de la especie vegetal, indicando el incremento en el rendimiento de factores agronómicos como biomasa seca, concentración de proteína y fósforo. El estudio deja abiertas líneas futuras de investigación y el establecimiento de propuestas metodológicas, que sean alternativas para el desarrollo de la simbiosis entre *Rhizobium*-micorriza- *Leucaena leucocephala*, cuya finalidad sea contribuir al desarrollo sostenible, incrementar el rendimiento de obtención de biomasa seca y la reducción de la fertilización química.

#### 4. Conclusiones

La recopilación de información presente en documentos científicos permitió la descripción de especies de importancia para el establecimiento de la simbiosis con especies de Fabáceas de gran interés para la ingeniería agrícola como: *Rhizobium leguminosarum*, *R. etli*, y *R. phaseoli*.

La nodulación, implicada en la FBN de importancia para el incremento en la producción de los cultivos, es uno de los mecanismos más estudiados y se establece mediante tres mecanismos: hilos de infección, ingreso por lesiones e ingreso por célulasepidérmicas.

Existen factores bióticos y abióticos que afectan el rendimiento de la simbiosis entre microorganismo-leguminosa, especialmente en los procesos de nodulación, como exceso o carencia de algunos compuestos minerales (molibdeno, cloruro de cadmio y cobre). Las altas temperaturas afectan los procesos de respiración celular debido a su alta demanda de carbono. Otro factor limitante del desarrollo de las fabáceas son las enfermedades causadas por hongos, virus y entomopatógenos, los cuales influyen negativamente en el sistema de defensa de la planta y en la producción de los metabolitos de señalización involucrados con el proceso de infección y formación del nódulo. El cambio en los ecosistemas, especialmente en los suelos debido a problemas ambientales, también trae consecuencias para el establecimiento de la agricultura.

La Biotecnología y la Ingeniería Agrícola, han establecido herramientas que permiten la obtención de cultivos eficientes, mediante la inoculación de especies de *Rhizobium* en otras Fabáceas con capacidad de producir moléculas de interés, sobreexpresión génica de los factores Nod o sobreexpresión genética de las vías que favorecen la simbiosis.

Las investigaciones sobre la expresión y regulación de genes involucrados en la nodulación y en la síntesis de proteínas con acción catalítica han sido de gran interés para el desarrollo del proceso de la FBN mediada por especies de *Rhizobium*, especialmente en situaciones de estrés biótico y abiótico. La gran mayoría de investigaciones están basadas en la sobreexpresión, la regulación de las vías de síntesis de proteínas, análisis e identificación de especies de *Rhizobium* que posean los complejos enzimáticos capaces de establecer simbiosis y la búsqueda de los genes implicados en el proceso de nodulación.

Los complejos de genes de gran interés descritos en el presente documento son:

- Genes involucrados en los sistemas de secreción tipo IV encontrados en *Rhizobium etli Mim*, como un sistema modulado por los promotores: PHcp y PTssA, los cuales se inducen cuando las condiciones son diversas.
- Gen nodC relacionado con la eficiencia del establecimiento y desarrollo de la simbiosis.
- Genes CIAT 899 importantes en la nodulación, los cuales son inducidos por señales químicas de flavonoide apigenina en condiciones adversas de estrés salino y osmótico.
- Genes nirK y norC de *Rhizobium etli CFN42* los cuales expresan proteínas con actividad nitrato reductasa importantes en la asimilación de nitrato para los procesos de respiración celular.
- Genes que expresan las proteínas GRAS y NF-Y, las cuales interfieren en los procesos de selección específica en el establecimiento de la simbiosis entre especies de *Rhizobium*- especies vegetales.
- Genes relacionados con la expresión de la O-acetil-serin(tiol)liasa o OASTL, proteínas implicadas en la formación de nódulos en ambientes con deficiencia de minerales como el azufre y estrés hídrico.

Otra línea de investigación se refiere al establecimiento y análisis de la simbiosis mediada por *Rhizobium*- HMA- especies vegetales, los fines científicos se relacionan con la fitorremediación, incremento de la capacidad de rendimiento del suelo, asimilación de metales y la FBN en ambientes adversos.

Se ha evidenciado el establecimiento de simbiosis entre especies de *Leucaena leucocephala* en presencia del fenantreno y la capacidad simbiótica de *Rhizobium-leucaena- glomus*, lo cual permite la degradación de fenantreno presente en suelos y la asimilación de nitrógeno, favoreciendo la FBN y la fitorremediación de suelos contaminados. También se ha evidenciado el incremento en los parámetros agronómicos mediante el establecimiento de relaciones simbióticas entre: *Rhizobium*, HMA y especies de *Cajanus cajan*, y la simbiosis tripartita entre HMA (*Glomus cubense*), *Rhizobium* (Can2, Can3, Can4 y Can5) y *Canavalia ensiformis*. Ambos estudios permiten concluir que la simbiosis está mediada por la especificidad genética que posea la especie vegetal hacia el microorganismo.

Por último, el desarrollo de la simulación en el software VosViewer, mediante el análisis de mapeos bibliométricos de 1497 documentos científicos encontrados en la base de datos de PubMed, evidencia la importancia del estudio de la simbiosis entre *Rhizobium*- *Fabaceae* como herramienta para la solución de problemas ambientales y agrícolas enfocados al desarrollo sostenible. El mapeo evidencia que los géneros de mayor interés científico son: *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* y *Rhizobium leguminosarum*, capaces de establecer relaciones simbióticas mutualistas con especies de legumbres, y aumentar la productividad debido a su capacidad de fijar el nitrógeno necesario para el desarrollo de la planta.

## Bibliografía

Abd-Alla, M. H.-E. (2014). Synergistic interaction of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and arbuscular mycorrhizal fungi as a plant growth promoting biofertilizers for faba bean (*Vicia faba* L) in alkaline soil. *Microbiological research*, 169(1), 49-58.

Amaro-Rosales, M., & Villavicencio-Carbajal, D. H. (2015). Incentivos a la innovación de la biotecnología agrícola-alimentaria en México. *Estudios sociales (Hermosillo, Son.)*, 23(45), 33-45.

Azcárate, O. M. (2014). Metabolismo del azufre en la simbiosis guisante-rhizobium. Doctoral dissertation, Universidad Pública de Navarra, 15-16.

Biała-Leonhard, W. Z. (2021). Identificación de un transportador de isoflavonoides necesario para el establecimiento de nódulos de la interacción simbiótica *Rhizobium-Fabaceae*. *Fronteras en la ciencia de las plantas*, 12.

Bianco, L. (2020). Principales aspectos de la nodulación y fijación biológica de nitrógeno en Fabáceas. *Idesia (Arica)*, 38(2), 21-29.

Cantaro-Segura, H., Huaranga-Joaquín, A., & Zúñiga-Dávil, D. (2019). Efectividad simbiótica de dos cepas de *Rhizobium* sp. en cuatro variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en Perú. *Idesia (Arica)*, 37(4), 73-81.

Cerro Sánchez, P. D. (2019). Caracterización de genes de *Rhizobium tropici* CIAT 899 implicados en la biosíntesis de los factores de nodulación independiente de la activación por flavonoides e inducidos por estrés osmótico. Universidad de Sevilla, 100-139.

Chen, H., Chou, M., Wang, X., Liu, S., Zhang, F., & Wei, G. (2013). Profiling of differentially expressed genes in roots of *Robinia pseudoacacia* during nodule development using suppressive subtractive hybridization. *PLoS One*, 8(6), e63930.

Chen, W., Luo, L., He, L. Y., Wang, Q., & Sheng, X. F. (2016). Distinct mineral weathering behaviors of the novel mineral-weathering strains *Rhizobium yantingense* H66 and *Rhizobium etli* CFN42. *Applied and environmental microbiology*, 82(14), 4090-4099.

Coello, J. M., & Burgos, F. (2012). Aplicación del hongo *Pleurotus ostreatus* como alternativa para la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados.

Cuautle, C. C. (2021). Mutualismo y simbiosis. Conferencia de la Asociación Poblana de Ciencias Microbiológicas (pág. 1). Puebla, México: Instituto de Ciencias BUAP.

diCenzo, G. C., Zamani, M., Checcucci, A., Fondi, M., Griffiths, J. S., Finan, T. M., & Mengoni, A. (2019). Multidisciplinary approaches for studying rhizobium-legume symbioses. *Canadian Journal of Microbiology*, 65(1), 1-33.

Dobermann, A., & Fairhurst, T. (2000). Manejo del nitrógeno en arroz. *Revista Informaciones Agronómicas*, 68(58), 1-6.

Dupont, L., Hérouart, D., Alloing, G., Hopkins, J., Pierre, O., Frendo, P., & El Msehli, S. (2012). The legume root nodule: from symbiotic nitrogen fixation to senescence (pp. 137-157). London: INTECH Open Access Publisher.

Edulamudi, P., Zakkula, V., Vanga, U. R., & Konada, V. M. (2019). Copper effect on photosynthetic performance, symbiotic efficiency and biosorption of rhizobia associated with Horse gram [*Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc.]. Cuban Journal of Agricultural Science, 53(4).

Fazili, M. A., Bashir, I., Ahmad, M., Yaqoob, U., & Geelani, S. N. (2022). In vitro strategies for the enhancement of secondary metabolite production in plants: a review. Bulletin of the National Research Centre, 46(1), 1-12.

Flores-Félix, J. D., Menéndez, E., Rivera, L. P., Marcos-García, M., Martínez-Hidalgo, P., Mateos, P. F., ... & Rivas, R. (2013). Use of *Rhizobium leguminosarum* as a potential biofertilizer for *Lactuca sativa* and *Daucus carota* crops. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 176(6), 876-882.

Fontanetto, H., & Keller, O. (2006). Consideraciones sobre el manejo de la fertilización de la soja. INTA, Estación Experimental Agropecuaria Rafaela. Información Técnica de cultivos de verano. Campaña, 45-79.

Forrester, N. J., & Ashman, T. L. (2018). The direct effects of plant polyploidy on the legume-rhizobia mutualism. Annals of botany, 121(2), 209-220.

Gano-Cohen, K. A., Stokes, P. J., Blanton, M. A., Wendlandt, C. E., Hollowell, A. C., Regus, J. U., ... & Sachs, J. L. (2016). Nonnodulating *Bradyrhizobium* spp. modulate the benefits of legume-rhizobium mutualism. Applied and environmental microbiology, 82(17), 5259-5268.

García, S. C. (2011). Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno. Cuadernos del Tomás, (3), 173-186.

Garciglia, R. S., Gómez, R. L., Pacheco, M. M. M., & Chávez, A. G. (2007). Biotecnología de plantas. Ciencia Nicolaitia, 48, 65-78.

González, C. A. B., Negrín, Y. F., Forte, I. H., & Espinos, R. R. (2022). Beneficios del intercalamiento de canavalia inoculada con hongos micorrízicos y *Rhizobium* en *Coffea canephora*. Agronomía Mesoamericana, 33(2), 13-14.

Granda Mora, K.I., Nápoles García, M.C., Robles Carrión, A.R., Alvarado-Capó, Y. y Torres Gutiérrez, R. (2016). Respuesta de *Phaseolus vulgaris* cv. Mantequilla a la inoculación de cepas de *Rhizobium* nativas de Ecuador en casas de cultivo. Centro Agrícola, 43(4), 49-56.

Hassen, A. I., Lamprecht, S. C., & Bopape, F. L. (2020). Emergence of  $\beta$ -rhizobia as new root nodulating bacteria in legumes and current status of the legume-rhizobium host specificity dogma. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 36(3), 1-13.

Indacochea, B., Castro, C., Marcillo, C., Ayón, F., Indacochea, J., Parrales, J., ... & Alvarez, S. (2020). Contribuciones de la UNESUM a la biotecnología vegetal.

João, A. A., Ferreira, L. F. M., Corrêa, P. H. F., Luiz, R. D. C. P., & de Oliveira Neto, S. S. (2021). Biotecnologia vegetal 4.0: uma abordagem sobre "Speed Breeding". *Research, Society and Development*, 10(12), e87101220120-e87101220120.

Lacroix, B., & Citovsky, V. (2016). A functional bacterium-to-plant DNA transfer machinery of *Rhizobium etli*. *PLoS pathogens*, 12(3), e1005502.

Liu, Y. H., Jiao, Y. S., Liu, L. X., Wang, D., Tian, C. F., Wang, E. T., ... & Chen, W. F. (2018). Nonspecific symbiosis between *Sophora flavescens* and different rhizobia. *Molecular plant-microbe interactions*, 31(2), 224-232.

López-Alcocer, J. D. J., Lépiz-Ildefonso, R., González-Eguiarte, D. R., Rodríguez-Macias, R., López-Alcocer, E., & Olalde-Portugal, V. (2017). Caracterización morfológica y bioquímica de cepas de *Rhizobium* colectadas en frijol común silvestre y domesticado. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 40(1), 73-81.

Luna Riquelme, M. C. (2013). Influencia de los factores pre y postcosecha en la calidad de la lechuga IV Gama. *Proyecto de investigación*, 47-57.

Melgarejo, P., Romagosa, I., & Durán-Vila, N. (2014). Biotecnología agrícola. *Arbor*, 190(768), 152-152.

Méndez, S., Amachi, F., Vera, M., & Espinosa, I. (2017). Fitorremediación al plomo asimilable, una biotecnología promisorio. *revista ciencia y tecnología-para el desarrollo-UJCM*, 2(4), 73-77.

Nápoles García, M. C., Cabrera Pino, J. C., Onderwater, R., Wattiez, R., Hernández Forte, I., Martínez González, L., & Núñez Vázquez, M. (2016). Señales producidas por *Rhizobium leguminosarum* en la interacción con frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Cultivos Tropicales*, 37(2), 37-44

Nápoles-García, M. C., Cabrera-Pino, J. C., Wegria, G., Onderwater, R., Wattiez, R., Costales-Menéndez, D., ... & González-Anta, G. (2021). Inducción de señales en *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* y su actividad biológica en arveja (*Pisum sativum* L.). *Cultivos Tropicales*, 42(3).

Nápoles-Vinent, S., Milanés-Riquene, S., Hernández-Forte, I., Morales-Mena, B., & Nápoles-Garcías, M. C. (2022). Rhizobia increases the germination of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* seeds. Second evidence in Cuba. *Agronomía Mesoamericana*, 33(1).

Navarrete, E. N. C., Arteaga, C. A. C., Gaibor, J. D. R., Vasquez, G. E. G., Velez, M. V. U., & Aragoné, D. X. S. (2017). Eficiencia agronómica del arroz INIAP-17 con niveles de fertilización química y biológica en el Litoral Ecuatoriano. *Journal of science and research: Revista Ciencia e Investigación*, 2(6), 10-15.

NCBI. (23 de abril de 2020). Life Map. Obtenido de <http://lifemap-ncbi.univ-lyon1.fr/>

Ndlovu, T. J. (2015). Effect of *Rhizobium phaseoli* inoculation and phosphorus application on nodulation, growth and yield components of two drybean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars (Doctoral dissertation). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la

- Agricultura. (2017). El estado mundial de la agricultura y la alimentación.
- Orozco-Ugarriza, M. E. (2019). Reflexiones sobre la Biotecnología en Colombia. RIADS: Revistas de Investigación Agropecuaria y Desarrollo Sostenible, 4(1), 7-8.
- Osorio Menéndez, D. D. (2019). Establecimiento de la simbiosis Rhizobium-Micorrizas en fréjol de palo *Cajanus cajan*, bajo condiciones controladas. Bachelor's thesis, Facultad de Ciencias Agrarias Universidad de Guayaquil.
- Paredes, M. C. (2013). FBN en leguminosas y gramíneas. Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Católica Argentina, 15.
- Pulido Suárez, L. M. (2017). FBN en el Parque Nacional del Teide: simbiosis *Spartocytisus supranubius*-Rizobios. Tenerife, España: Tesis de fin de Grado. Universidad de la laguna.
- Quilbé, J., Lamy, L., Brottier, L., Leleux, P., Fardoux, J., Rivallan, R., ... & Arrighi, J. F. (2021). Genetics of nodulation in *Aeschynomene evenia* uncovers mechanisms of the rhizobium-legume symbiosis. Nature communications, 12(1), 1-14.
- Quiñones, M. A., Coba de la Peña, T., Ruiz Díez, B., Ochoa-Hueso, C. R., García de la Torre, V. S., Cordero, I., ... & Herrera-Cervera, J. A. (2011). Estrategias para mejorar la tolerancia a estreses abióticos de la simbiosis Rhizobium-leguminosa.
- Ramachandran, V. K., East, A. K., Karunakaran, R., Downie, J. A., & Poole, P. S. (2011). Adaptation of *Rhizobium leguminosarum* to pea, alfalfa and sugar beet rhizospheres investigated by comparative transcriptomics. Genome biology, 12(10), 1-12.
- Reina-Bueno, M., Argandoña, M., Nieto, J. J., Hidalgo-García, A., Iglesias-Guerra, F., Delgado, M. J., & Vargas, C. (2012). Role of trehalose in heat and desiccation tolerance in the soil bacterium *Rhizobium etli*. BMC microbiology, 12(1), 1-17.
- Rodríguez, J. C. (2017). Eficiencia agronómica del arroz INIAP-17 con niveles de fertilización química y biológica en el Litoral Ecuatoriano. Journal of science and research: revista ciencia e investigación, 10-15
- Rubiano, M. C. (2015). Cartilla para docentes del Instituto Pedagógico Nacional sobre simbiosis y procesos biotecnológicos: el biofertilizante Rhizobium sp como alternativa para la simbiosis con *Phaseolus vulgaris*. Bio-grafía, 8(14), 85-99.
- Salinero-Lanzarote, A., Pacheco-Moreno, A., Domingo-Serrano, L., Durán, D., Ormeño-Orrillo, E., Martínez-Romero, E., ... & Rey, L. (2019). The Type VI secretion system of *Rhizobium etli* Mim1 has a positive effect in symbiosis. FEMS microbiology ecology, 95(5), fiz054.
- Saz Navarro, D. D. (2016).. Efecto del cadmio en la simbiosis de *Ensifer meliloti* y *E. medicae* con *Medicago sativa* Universidad de Sevilla, 18.
- Scambato, A. A. (2013). Influencia de la simbiosis con micorrizas arbusculares y rizobios sobre el crecimiento y la tolerancia a estrés salino en especies forestales de Prosopis. Doctoral dissertation, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias, 110-112.



Spagnoletti, F. N., Fernandez di Pardo, A., Tobar Gómez, N. E., & Chiocchio, V. M. (2013). Las micorrizas arbusculares y *Rhizobium*: una simbiosis dual de interés. *Revista argentina de microbiología*, 45(2), 131-132.

Sprent, J. I., Ardley, J. K., & James, E. K. (2013). From North to South: a latitudinal look at legume nodulation processes. *South African Journal of Botany*, 89, 31-41.

Sprent, J. I., Ardley, J., & James, E. K. (2017). Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen-fixing symbionts. *New Phytologist*, 215(1), 40-56.

Stambulska, U. Y., & Bayliak, M. M. (2020). Legume-rhizobium symbiosis: secondary metabolites, free radical processes, and effects of heavy metals. *Co-Evolution of Secondary Metabolites*, 291-322.

Urzúa, H. (2005). Beneficios de la fijación simbiótica de nitrógeno en Chile. *Ciencia e investigación agraria: revista latinoamericana de ciencias de la agricultura*, 32(2), 133-150.

Valdés-Infante Herrero, J., Rodríguez Medina, N. N., González, L., Velázquez Palenzuela, J. B., Rivero Rodríguez, D., Sourd Martínez, D. G., ... & Rodríguez Rodríguez, J. A. (2012). La biotecnología como herramienta para la propagación, conservación y el mejoramiento genético del guayabo. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(2), 7-19.

Wang, C., Li, A., Yuan, T., Bao, G., Feng, G., & Zhu, H. (2020). *Rhizobium glycinendophyticum* sp. nov., isolated from roots of *Glycine max* (Linn. Merr.). *Antonie van Leeuwenhoek*, 113(1), 147-154.

Wang, D., Yang, S., Tang, F., & Zhu, H. (2012). Symbiosis specificity in the legume-rhizobial mutualism. *Cellular microbiology*, 14(3), 334-342.

Young, J. P. W., Moeskjær, S., Afonin, A., Rahi, P., Maluk, M., James, E. K., ... & Tian, C. F. (2021). Defining the *Rhizobium leguminosarum* species complex. *Genes*, 12(1), 111.

Zazueta-Avitia, A., Burboa-Meza, C. Y., Ramírez-Alvarado, D., Flores-Martínez, H., Segura-Castruita, M. Á., & Gómez-Leyva, J. F. (2021). Characterization of tomato fruits (*Solanum lycopersicum*) on plants colonized by the arbuscular mycorrhizal fungi *Rhizopagus irregularis* under salt stress conditions. *Acta universitaria*, 31.