An. R. Acad. Nac. Farm., 2004, 70: 727-742

Revisión

Aspectos físico-químicos de los contrastes radiológicos iodados y sus posibles reacciones secundarias *

ÁLVARO DOMÍNGUEZ GIL
Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo es exponer un grupo de compuestos iodados con tres y seis átomos de iodo en su molécula que son derivados del ácido benzoico y son utilizados en Radiología como medios de contraste de gran interés clínico.

Se estudian sus constantes físico-químicas y las ventajas que presentan los contrastes no iónicos sobre los iónicos.

Se describen también los posibles efectos colaterales indeseables en un pequeño pero importante número de pacientes que pueden producirse por su inyección intravascular.

Palabras clave: Contraste iodado.— Iónico.— No iónico.— Ácido diatrizoico.— Iohexol.

ABSTRACT

Physical and chemical aspects of the iodine radiological contrasts and its possible secondary reactions

The aim of the present work is to expose a group of compounds with three and six atoms of iodine in its molecule, which is derived from the benzoic acid and are used in radiology as means of contrast of a great clinical interest.

* Discurso pronunciado en su toma de posesión como Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia el día 29 de mayo de 2003.

Physical and chemical constants are studied and also the advantages that the non ionic contrasts present over the ionic ones.

The possible undesirable collateral effects due to an intravenous injection are described in a small but important number of patients.

Key words: Iodine contrast.— Ionic.— No ionic.— Diatrizoic Acid.— Iohexol.

EXTENSIVE ABSTRACT

The aim of the radiological contrasts has the mission to visualize the internal structures of our organism that are not generally visible to the rays X for having a radiological density to the next tissues.

To avoid the toxicity of the free iodine, in the radiological compounds the iodine is joined to the ring benzoic, so the atom of iodine remains strongly joined to other atoms, being avoided its sensitive aggressiveness.

The most used organic compounds are acids with three or six atoms of iodine, being those that confer him the opacity. The density, viscosity, solubility and tolerance will depend on the radicals that have been incorporated.

Chemically, a benzoic ring constitutes all of them whose positions, 2, 4 and 6 have three atoms of iodine. In position 1, they have a group COOH partially responsible of the product's solubility. In positions 3 and 5, they have two radicals on which, it depend the toxicity and tolerance.

There are been studied of preference the acids Diatrizóic, Iotalámic and Metrizóic, as well as the acids Ioxaglic and Iocarmic among the ionic ones. Among those no ionics, the Metrizamida and the Iohexol.

The intravascular injection of the iodine contrasts mediums, especially the ionic ones due to their hyper tonicity, they can produce undesirable collateral effects in a small but important number of patients. When such reactions are serious, they constitute a risk for the patient and therefore to be able to predict them. Then, to know them and to treat is very important for the radiologists that carry out these explorations.

The possible secondary reactions are classified in three levels: Light, moderate and serious.

INTRODUCCIÓN

El objetivo de los contrastes radiológicos iodados tiene como misión visualizar estructuras internas de nuestro organismo que generalmente no son visibles a los rayos X por tener una densidad radiológica similar a los tejidos próximos.

Normalmente en la exploración radiológica sólo se diferencian bien aquellas estructuras que tienen muy distinta opacidad, tal sucede con los huesos (más opacos), o el tejido pulmonar (menos

opaco). Hay sin embargo una serie de órganos (corazón, riñón y cerebro) y de conductos (arterías, venas, tubo digestivo y uréteres) que no es posible observarlos de no ser rellenados con alguna sustancia de elevada opacidad a los rayos X, que nos ofrezca la imagen de la estructura o cavidad interior. La opacidad de un elemento es mayor cuanto más elevado sea su número atómico. Hay elementos como el plomo y el mercurio que tienen una elevada opacidad, pero son muy tóxicos y por lo tanto impiden su utilización.

Otros como el torio, es muy radiopaco, pero al ser radioactivo y no eliminarse, tampoco puede ser utilizado.

Existen, sin embargo, otros elementos que alcanzan una opacidad aceptable y tienen una tolerancia muy superior a los mencionados anteriormente. Son el bario y el iodo. Las soluciones hidrosolubles de bario tienen una elevada toxicidad, pero el sulfato de bario que no es hidrosoluble, permite preparar suspensiones estables no absorbibles para visualizar el tracto gastrointestinal, sin que aparezcan reacciones tóxicas, aunque debido a su baja sensibilidad (66%) limita sus indicaciones en favor de otros procedimientos diagnósticos como la endoscopia o la medicina nuclear. Con el iodo se pueden formar compuestos orgánicos de baja toxicidad, que se pueden administrar por vía parenteral a elevadas dosis permitiendo la visualización de la mayor parte de las estructuras de nuestro organismo.

Para evitar la toxicidad del iodo libre, en los compuestos radiológicos va unido al anillo bencénico, de modo que el átomo de iodo queda fuertemente unido a otros átomos, evitándose de esta manera su sensible agresividad. Los compuestos orgánicos más utilizados son ácidos con tres o seis átomos de iodo, siendo estos los que le confieren la opacidad. De los radicales que se incorporen dependerá la densidad, viscosidad, solubilidad y tolerancia. Entre las combinaciones de iodo orgánico conocidas existe un grupo de derivados yodados hidrosolubles que debido a su empleo en Radiología urinaria y vascular han tenido y siguen teniendo un extraordinario interés clínico.

Este grupo al cual nos referimos es el de los radiopacos utilizados para urografías, colecistografías y arteriografías cerebrales. Químicamente todos ellos están constituidos por un anillo bencénico en cuyas posiciones 2, 4 y 6 tienen tres átomos de iodo. En posición 1 tienen un grupo COOH responsable parcialmente de la solubilidad

del producto. En las posiciones 3 y *5* tienen dos radicales de los cuales dependerá su toxicidad y tolerancia (Figura 1).

El primer producto iodado utilizado por vía intravenosa fue el ioduro sódico en 1918 por **E. H. Weld,** antes había sido utilizado por vía uretral por **D. F. Cameron.** El producto no dio resultado por dar malas imágenes y por su toxicidad y su uso fue desechado.

El desarrollo de los ácidos benzoicos iodados como agentes de contraste opacos a los rayos X tiene sus inicios en la observación de **Swick** en 1933, de que la sal sódica del ácido o- iodo hipúrico (ácido 2 iodo benzamido acético) podría ser un excelente agente de contraste en urografía, si bien unos años antes y en colaboración con **Binz** y **Von Lichtemberg,** en Berlín (1919), había desarrollado derivados iodados de piridonas, uno de los cuales, la sal sódica del ácido 5 iodo 2 piridona N.acético fue comercializado bajo el nombre de **Uroselectan** (Figura 2). Sin embargo, fueron necesarios veinte años más hasta que, en colaboración con **Wallindford,** desarrollan en 1953 el primer agente de contraste para urografía derivado del ácido 2,4,6 triiodo benzoico, el ácido acetrizoico (Figura 3).

La introducción de un segundo grupo acetamido en el anillo bencénico del ácido acetrizoico condujo al ácido diatrizoico (1954), ácido 3,5 diacetilamino, 2,4,6 triiodo benzoico (Figura 4) que representó un importantísimo avance sobre aquél como agente urográfico y angiográfico.

Casi paralelamente (1955) con el ácido diatrizoico fue desarrollado el isómero, ácido iotalámico (Figura 5) y posteriormente en 1960 el ácido metrizoico, 2,4,6 triiodo, 3 metil acetamido benzoico (Figura 6). Estos tres últimos compuestos están conceptuados como los agentes de contraste standard, y siguen utilizándose masivamente en los departamentos de radiología.

Dada la absoluta insolubilidad en agua de estos ácidos benzoicos triiodados para su inyección intravascular en las diferentes técnicas radiográficas se utilizan en forma de sales. Estas sales han de presentar una elevada hidrosolubilidad (superior al 50%) junto con una escasa toxicidad y una adecuada viscosidad. Sin embargo, algunas de estas propiedades, que son deseables para estos agentes intravasculares, son incompatibles entre sí, por lo que en la mayor parte de los casos es necesario optar por soluciones de compromiso.

CONTRASTES IODADOS IÓNICOS

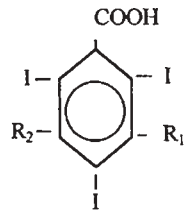

Figura 1

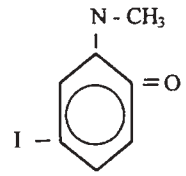

Figura 2. Selectan

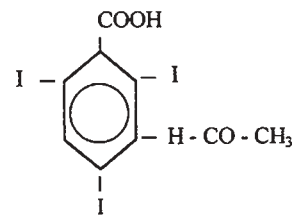

Figura 3. Acido acetrizoico

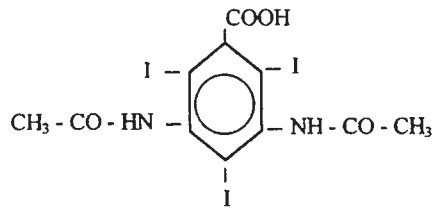

Figura 4. Acido diatrizoico

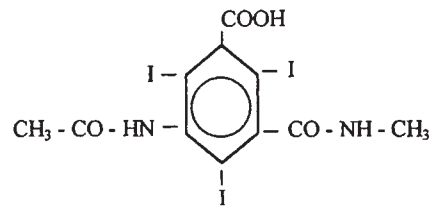

Figura 5. Acido iotalamico

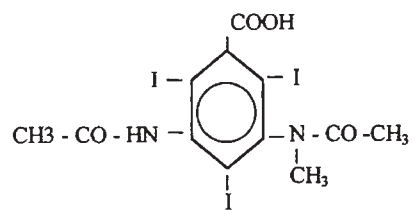

Figura 6. Acido metrizoico

Los factores que se consideran imprescindibles son la inercia farmacológica, que proporciona seguridad de uso, y la alta solubilidad de la sales. Solamente las sales sódica, metilglucamínica y cálcica de estos ácidos pueden proporcionar las altas concentraciones de iodo necesarias para producir la opacidad, pero su uso conduce necesariamente a soluciones muy hipertónicas, del orden de 1.500 a

2.000 mOs/Kg de agua, cuando la osmolaridad de la sangre, con la que va a entrar en contacto, es aproximadamente de 300. Esta elevada hipertonicidad de las soluciones de medio de contraste es la responsable de gran parte de los efectos secundarios que se producen, y es una de las cuestiones a resolver por el farmacéutico preparador.

Un requisito, asimismo importante, es que el medio de contraste debe mostrar un alto grado de estabilidad química, es decir, que no libere iodo por degradación química o metabólica. Esta condición es cumplida por los compuestos del ácido diatrizoico y a ella se debe el éxito que tiene después de tantos años en la clínica.

En resumen, podemos concretar que el agente de contraste a los rayos X ideal deberá reunir las siguientes condiciones:

Máxima opacidad a los rayos X.
Inercia farmacológica.
Estabilidad química.
Efectos osmóticos mínimos.
Rápida eliminación.
Adecuada viscosidad.

Las soluciones acuosas de los contrastes clásicos de primera generación citados anteriormente, son generalmente bien tolerados por el paciente. En algunos casos pueden producirse efectos adversos que van desde náuseas, manifestaciones anafilácticas, hasta efectos cardiovasculares respiratorios y neurológicos, como veremos más adelante.

Las toxicidades experimental y clínica de estos compuestos se ha demostrado que están directamente relacionadas con los tres factores siguientes:

Quimiotoxicidad del agente.
Hipertonicidad.
Carga eléctrica.

La quimiotoxicidad depende de su estructura química, ésta juntamente con la hipertonicidad, producen efectos aditivos indeseables, por lo que un medio de contraste intravascular mejorado debe tratar de obviar, dentro de lo posible, estas características, de forma

que la hipótesis de trabajo ha de consistir en la búsqueda de un contraste biológicamente inerte, entendiendo como tal que cumpla las siguientes condiciones:

- Baja presión osmótica, la más cercana posible al plasma.
- Marcado carácter hidrofílico para evitar su quimiotoxicidad.
- Ausencia de cargas eléctricas para no interferir en el balance electrolítico del cuerpo y con el tejido nervioso, es decir, el medio de contraste debe de ser no iónico.

Además de estas tres características integrantes de lo que hemos llamado inercia biológica, debe tener una adecuada viscosidad.

La viscosidad es uno de los factores determinantes de la toxicidad de los radiopacos yodados, ya que afecta al tiempo durante el cual un órgano o vaso está expuesto a los efectos del agente, también es determinante para la facilidad y rapidez de la administración del contraste. Una elevada viscosidad puede ser problemática, si se emplean catéteres de pequeño calibre interior. Como alta concentración y baja viscosidad están inversamente relacionadas, en muchos casos hay que llegar a situaciones intermedias.

La osmolaridad de las soluciones acuosas de los contrastes iónicos es directamente proporcional al número de partículas disueltas, cuanto menor sea este número, menor será la presión osmótica ejercida por la solución. La introducción en el organismo de una solución hiperosmolar produce un aumento de la osmolaridad plasmática con deshidratación intracelular y una perturbación de electrolitos de la sangre.

Las soluciones acuosas de las sales sódica y meglumínica de los ácidos benzoicos triiodados se disocian, dando un anión triiodado de gran tamaño y un catión no iodado, de forma que la relación de átomos de iodo/partículas totales en solución es 3/2.

Tanto el anión iodado como el catión contribuyen cada uno al 50% de la osmolaridad de la solución. Para reducir la presión osmótica es preciso disminuir el número de partículas disueltas, pero esta reducción no puede efectuarse eliminando el anión iodado, ya que éste es el responsable de la información radiológica. El problema se ha resuelto sintetizando compuestos no iónicos en los cuales la hi-

drosolubilidad necesaria se puede alcanzar mediante la conversión del grupo carboxilo del ácido benzoico en un grupo carboxamido y la introducción en el anillo bencénico de grupos hidrosolubles. De esta forma, en comparación con los compuestos iónicos y para aproximadamente el mismo peso molecular *y* contenido en iodo, un compuesto no iónico reduce en un 50% el número de partículas en solución la relación de átomos de iodo/partículas totales en solución es 3/1. Esta fue la idea básica de la que partieron **Almen** y colaboradores a principios de los años setenta y que tuvo como resultado el desarrollo del producto Metrizamida (Figura 9).

La carga iónica del medio de contraste es responsable de ciertas reacciones tóxicas, principalmente en coronariografías, neurografías y mielografías. La solución clínica en estos casos es el empleo de contrastes no iónicos.

En cuanto a la toxicidad (DL 50) de los contrastes clásicos, diatrizoico, metrizoico e iotalámico es baja. La DL 50 para el diatrizoico es de 10 gs/Kg de peso en ratón. La dosis utilizada en la clínica está muy por debajo de esta cifra, del orden de 0,2 gs/Kg de peso en las urografías y de 0,5-2 gs/Kg en las angiocardiografías.

Además de los contrastes iónicos comentados anteriormente, se utilizan en la clínica el ácido ioxáglico (Figura 7), químicamente es un dímero monoácido que permite reducir la hipertonía de las soluciones de contraste, y el ácido iocármico (Figura 8), dímero dicarboxílico derivado del ácido iotalámico. En estos dos dímeros, al tener seis átomos de iodo en lugar de tres, se reduce la relación de partículas disociadas y átomos de iodo 2/6, reduciéndose la hipertonía.

Otro contraste iónico triiodado es el ácido iopanoico que se emplea para colecistografía por vía oral, debido a su alto peso molecular y ser capaz de unirse a las proteínas plasmáticas en proporción elevada. Se elimina sólo el 10% por el riñón y el 90% a través del hígado.

CONTRASTES IODADOS IÓNICOS

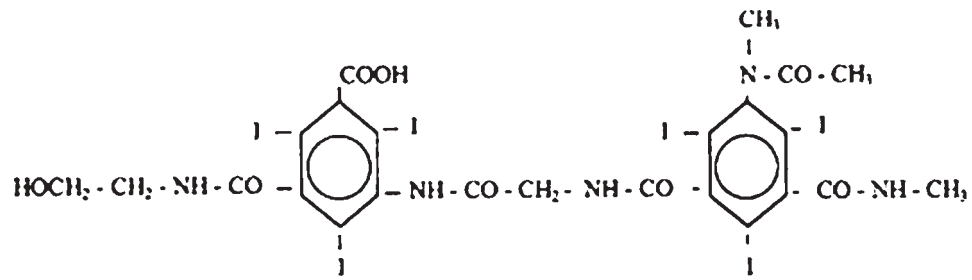

Figura 7. Ácido ioxáglico

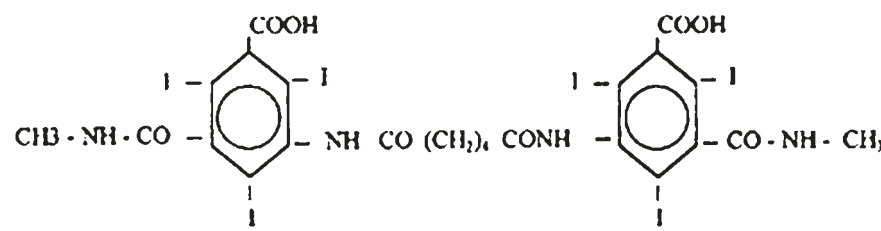

Figura 8. Ácido iocármico

Contrastes no iónicos

Los más genuinos representantes son la Metrizamida y el Iohexol.

La Metrizamida (Figura 9) es la amida entre el ácido metrizoico y la glucosamina. Tiene un contenido en iodo del 48,2% y todas las ventajas anteriormente citadas sobre los contrastes iónicos. Tiene un inconveniente, que es la poca estabilidad que presentan sus soluciones, solamente unas pocas horas. Esta inestabilidad en solución es debida a que el compuesto presenta un radical polihidroxilado unido por un enlace amida que es susceptible a la hidrólisis. Debido a esto, se presenta en forma liofilizada para preparar su solución en el momento de ser inyectada, este inconveniente ha reducido su empleo en la clínica.

Un contraste no iónico que ha tenido y sigue teniendo un gran éxito por sus grandes ventajas sobre los demás es el Iohesol (Figura 10) con un contenido en iodo del 46,36%, tiene una osmolaridad intermedia entre la metrizamida y el ácido metrizoico y una estabilidad suficiente para poderse suministrar en soluciones esterilizadas por autoclavado listas para su uso.

CONTRASTES IODADOS NO IÓNICOS

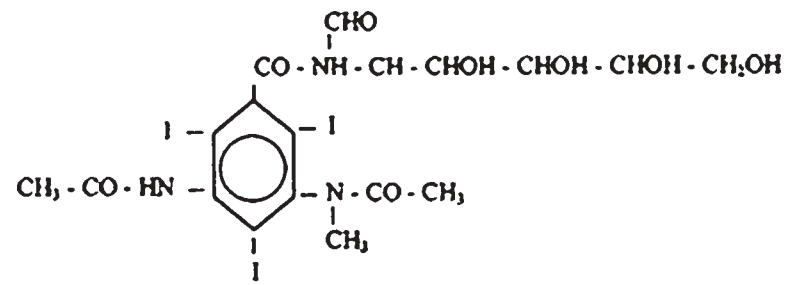

Figura 9. Metrizamida

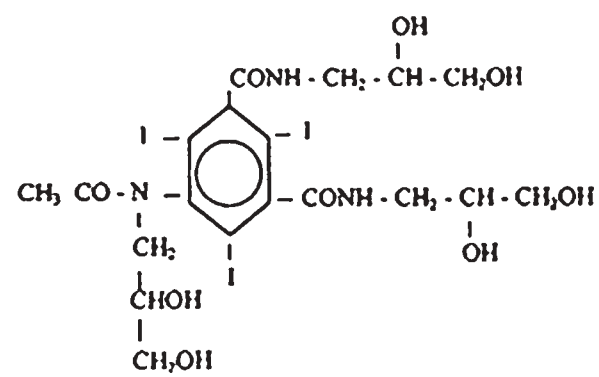

Figura 10. Iohexol

Iohexol no se disocia en solución acuosa, sino que forma una disolución en la cual cada molécula triiodada constituye una sola partícula, siendo de esta forma la relación átomos de iodo/partículas

totales: 3/1. Debido a que es altamente soluble en agua por sus seis grupos oxidrilos de su molécula, es uno de los contrastes preferidos en la actualidad, siendo indicado su empleo para realizar angiografías, artrografías e isterosalpincografías.

En tomografía computarizada (TAC) es el apropiado para detección de tumores y otras lesiones de la cavidad craneal.

En mielografía se ha ensayado paralelamente con la metrizamida. Con los dos medios de contraste, la imagen fue igualmente buena, pero los efectos secundarios fueron aproximadamente el doble de frecuentes con metrizamida que con iohexol, según **P. Nakstadd** y colaboradores del **Hospital Nacional de Oslo.**

El iohexol es rápidamente excretado a través del riñón, el 90% del inyectado se encuentra en la orina a las tres horas de la inyección y el 99% a las veinticuatro.

Su viscosidad es ligeramente más alta que la de las sales sódicas de un contraste iónico y comparable a la de las sales meglumínicas. Su unión a proteínas plasmáticas es del orden del 1,5%, inferior a la de la metrizamida, que es del 4%, y la del ioxaglato, que es del 7,5%. Las ventajas fundamentales de este medio de contraste comparado con los convencionales iónicos son los siguientes:

Toxicidad aguda menor y mejor tolerancia tisular.

Reacciones alérgicas raras, menor neurotoxicidad y efectos hemodinámicos y cardiovasculares.

Igual o mejor visualización radiográfica, dada la posibilidad de poder inyectar mayores volúmenes debido a su menor toxicidad.

Por su baja quimiotoxicidad es el contraste ideal para niños y ancianos y personas alérgicas, ya que libera menos histamina que los demás, así como también su empleo está indicado en personas que padecen insuficiencia renal.

Como resumen, podemos decir que debido a sus características fisicoquímicas y farmacológico-tóxicas se aproxima en gran medida a lo que se ha definido como el agente de contraste ideal iodado.

La Resonancia Magnética (2) también emplea sustancias para mejorar la calidad de la información anatómica conseguida. No se

trata de contrastes al estilo de la radiografía, sino agentes conteniendo átomos paramagnéticos, como el Gadolinio, elemento de las tierras raras, que alcanzan un momento magnético relativamente grande al ser sometidos a un campo magnético. Esto afecta a la respuesta de los núcleos de hidrógeno de los átomos de agua próximos al agente paramagnético e incrementa la señal, mejorando la calidad de la información.

La RM se ha consolidado como una modalidad diagnóstica desde su introducción en la práctica clínica a principios de la década de los ochenta, especialmente en el campo de la neuroradiología. Sin embargo, el principal avance de la RM en la exploración del sistema nervioso central y en otras aplicaciones sólo se produjo tras la aparición en 1988 de medios de contraste que contenían Gadolinio.

Por otro lado, el empleo de los radiofármacos se ha generalizado, entrando de pleno en las técnicas diagnósticas hospitalarias.

Efectos secundarios de los contrastes radiológicos iodados

La inyección intravascular de los medios de contraste iodados, especialmente los iónicos debido a su hipertonicidad, pueden producir efectos colaterales indeseables en un pequeño pero importante número de pacientes. Cuando son graves tales reacciones constituyen un riesgo bien conocido para el paciente y por lo tanto el poder predecirlas, conocerlas y tratarlas es de capital importancia para todos los radiólogos que realizan estas exploraciones con fines diagnósticos.

Como consecuencia de inyectar un contraste hipertónico en sangre, se eleva la osmolaridad y viscosidad de ésta, se produce agregación de hematíes y también se producen alteraciones de la permeabilidad vascular que permite la extravasación del contraste y pueden producir efectos secundarios.

El Servicio de Radiología del **Hospital Civil de Basurto** en **Bilbao** (3) realizó un estudio de reacciones adversas producidas por medios de contraste sobre 815 pacientes (323 mujeres y 492 hombres), durante un año y a los que se les practicó urografía intravenosa. Los pacientes presentaban patologías diversas, entre ellas,

cólicos nefríticos, prostatismo, cálculos, tuberculosis renal y carcinomas. Se utilizaron medios de contraste iónicos clásicos, diatrizoatos de sodio *y* de meglumina e iotalamato de meglumina.

El tanto por ciento de reacciones fue del 4,53%, que está dentro del intervalo 2-8%, recogido en la literatura, siendo la mayoría de las veces efectos leves o moderados, solamente en un caso se requirió tratamiento de urgencia por aparición de convulsiones. A pesar de que el grupo de niños fue escaso, la incidencia de efectos adversos representó un porcentaje elevado: 16%, que va disminuyendo a medida que aumenta la edad hasta que, a partir de los sesenta años, vuelve a aumentar. Los niños menores de un año y los ancianos de más de ochenta representan un grupo de elevado riesgo. En cuanto al sexo, no se encontraron diferencias en las reacciones entre hombres y mujeres, siendo semejante el porcentaje de reacciones adversas que afectó a ambos.

Los síntomas de intolerancia se presentan generalmente entre el primero y tercer minuto de la inyección, y virtualmente todos aparecen dentro de los primeros diez minutos. Las reacciones tardías suelen ser raras. Los efectos secundarios directamente atribuibles al contraste pueden ser debidos a:

a) *Naturaleza del ácido iodado*

Los primeros ácidos iodados eran peor tolerados que los actuales considerados como clásicos, concretamente el ácido diatrizoico, metrizoico e iotalámico que tienen buena tolerancia.

b) *Características de la sal*

La sal meglumínica es la mejor tolerada debido al elevado volumen de la molécula, ya que por este motivo no se extravasa con facilidad. La sal sódica se tolera peor por su agresividad sobre territorio cerebral, cardíaco y renal. La sal cálcica empleada a las dosis adecuadas aumenta la tolerancia del contraste.

Los mecanismos a través de los cuales se manifiestan los efectos secundarios no están absolutamente aclarados, y se justifican a través

de distintas teorías. En unas ocasiones pueden ser atribuidas a la liberación de histamina (4), en otras a mecanismos alérgicos, en ocasiones a que atraviesan la barrera hematoencefálica y aún en ocasiones se piensa pueden ser debidas a una idiosincrasia o respuesta especial de determinadas personas, también la ansiedad puede ser un factor importante de algún tipo de reacción, según algunos autores.

Las manifestaciones de los efectos secundarios de los contrastes iodados pueden clasificarse en tres niveles:

Leves

Se manifiestan en forma de sofocación, sensación de calor, mareos, náuseas, cefaleas, palpitaciones, etc., y se caracterizan por no precisar actuación terapéutica por parte del médico. Son el 99%.

Moderadas

Aparición de vómitos, manchas en la piel, urticaria, prurito, habones, convulsiones, taquicardia, que precisan la actuación médica aplicando antihistamínicos o corticosteroides. Constituyen el 1% de las reacciones adversas.

Graves

Cuando aparecen edema laríngeo, hipotensión, fibrilación, convulsiones, fracaso renal agudo, shock, que en ocasiones pueden llegar a ser mortales. La morbilidad está situada entre uno y dos por millón de exploraciones. Sobre las alteraciones de carácter leve es muy importante el papel que juega el componente psicológico (5). Si el paciente se encuentra tranquilo y con confianza en las personas que van a realizar la exploración, la incidencia de efectos es pequeña. Por el contrario, cuando el paciente no está adecuadamente preparado o incluso tiene información de los problemas que han sufrido otras personas, los efectos secundarios aumentan en frecuencia e intensidad.

En otras ocasiones, efectos de carácter leve o moderados, son atribuidos al contraste, y pueden estar producidos por las técnicas de exploración (cateterismo de las arterias o del corazón), ambientales (contaminación) o residuos de óxido de etileno en los equipos de perfusión que han sido esterilizados con este gas.

Pruebas previas

Desde los albores de la urografía de excreción se han repetido los intentos de conseguir pruebas de sensibilización para determinar por adelantado qué pacientes podrían presentar más probablemente reacciones. Las pruebas intradérmicas, subcutáneas, oculares, sublinguales o intravenosas han sido sugeridas y abandonadas sucesivamente por falta de validez. La prueba más ampliamente utilizada ha sido la inyección intravenosa de contraste de 0,5 a 1 ml, pocos minutos antes de la inyección de la dosis completa.

Fischer y **Doust** (6) encontraron al revisar las experiencias de 347 hospitales universitarios de los Estados Unidos, que el 75% de los radiólogos realizaban prueba previa, de manera rutinaria o en casos específicos, y que el 96% de éstas eran realizadas por vía intravenosa.

El análisis de sus datos sugiere una posible correlación entre una prueba positiva y reacciones de tipo alérgico, ligeras o intermedias, pero estas observaciones no han sido confirmadas por otros estudios. Todos los autores están de acuerdo en que no se ha encontrado una diferencia significativa en la incidencia de reacciones graves o muertes entre los pacientes que fueron sometidos a estas pruebas previas. Hoy día existe el criterio unánime de que estas pruebas no son necesarias, ya que no solucionan nada, y se hacen directamente las exploraciones.

Según estadísticas de los años cincuenta, la incidencia de muertes era 8,6 por millón de exploraciones realizadas.

Actualmente con las posibilidades terapéuticas, las técnicas de reanimación y que la mayoría de estas exploraciones se realizan en centros hospitalarios, la mortalidad ha descendido notablemente. Según los decesos relatados y publicados por autores como **Kataya-**

ma, Yagamuchi y **Takashima** (7) oscilan alrededor de uno en un millón de exploraciones.

Como resumen de lo expuesto, actualmente con las mejoras tecnológicas introducidas por la industria farmacéutica, se fabrican contrastes iodados de gran seguridad que cumplen ampliamente las especificaciones exigidas por las farmacopeas de los distintos países en lo que respecta a los límites de iodo inorgánico libre, amina aromática libre y metales pesados, responsables de algunas de las reacciones indeseables que hemos mencionado, proporcionando una gran seguridad para el paciente y para el radiólogo.

En la actualidad, España es el único país fabricante de ácido diatrizoico con una capacidad de producción de más de ochocientas toneladas/año. Gran parte de esta producción es exportada a países como Alemania, Estados Unidos e Italia. Este es el mejor aval de calidad del producto fabricado. Por último, quiero expresar mi gratitud y satisfacción a la industria farmacéutica por haber trabajado en ella, y especialmente al Laboratorio Juste donde desarrollé gran parte de mi labor profesional.

BIBLIOGRAFÍA

(1) DOMÍNGUEZ GIL A. (1980) *Pharmaceutical Anal*. Vol. 92, 353.
(2) Panorama actual del medicamento. Agentes de diagnóstico (2002) 26 (E) 102.
(3) LACASA DÍAZ C. (1988) *Farmacia Clínica* Vol. 5, n.º 4, 288-294.
(4) LASSER, E.C.; WALTERS, A.J.; LANG, J.H. (1974) *Radiology* 110: 49-59.
(5) LALLY, A.F. (1974) *Radiology* 122: 267-271.
(6) FISCHER, H.W.; DOUST, U.L. (1972) *Radiology* 103: 497-501.
(7) KATAYAMA, H.; YAGAMUCHI, K.; TAKASHIMA, T. (1990) *Radiology* 175-261.

An. R. Acad. Nac. Farm., 2004, 70: 743-776

Revisión

Interacciones microorganismos-suelo-planta en la preservación del Medio Ambiente y la Salud *

M.ª ROSARIO DE FELIPE ANTÓN
Académica Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia

Directora del Centro de Ciencias Medioambientales del CSIC. Madrid

RESUMEN

Se pone de relieve la importancia de los microorganismos del suelo, que establecen simbiosis con las plantas como biofertilizantes y su aplicación en el control biológico de patógenos. Las interacciones beneficiosas: bacteria-planta y hongo-planta tienen gran interés por su impacto en la Agricultura, Silvicultura y Medioambiente y constituyen una alternativa a la aplicación de fertilizantes químicos que actúan como contaminantes de suelos y aguas con gran perjuicio para la salud. Las bacterias fijadoras de nitrógeno y los hongos micorrizógenos se encuentran entre los simbiontes de plantas más extendidos y ecológicamente más importantes. El potencial de los microorganismos del suelo parece ilimitado. Corresponde a la ciencia realizar el estudio profundo de las interacciones de organismos autóctonos del suelo con las plantas, con el fin de que éstas puedan autoabastecerse y autodefenderse en condiciones ambientales adversas, y además se cumpla con el deber de mantener nuestro planeta en óptimas condiciones de salud ambiental para las generaciones futuras.

* Discurso pronunciado en su toma de posesión como Académica Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia el día 26 de junio de 2003.

Palabras clave: Biofertilizantes.— Control biológico.— Fijación biológica de N_2.— Rhizobiaceas.— Simbiosis hongo-planta.— Micorrizas.— Rizosfera.— Rizobacterias.

ABSTRACT

Plant-soil-microorganisms interactions on the protection of the Environment and Health

Soil microorganisms stablish beneficious symbiosis with plants and can be considered as biofertilizers and also useful in biological control applications. The beneficious symbiosis: «bacteria-plant» and «fungy-plant», have great interest for its great impact in Agriculture, Forestry and Environment and constitute an alternative to the application of chemical fertilizers, avoiding its negative effects at health and environmental level. The nitrogen-fixing bacteria and mycorrizal fungi are among the plant symbionts more extended and ecologycally more important. The potential of soil microorganisms is unlimited. It is necessary to study more deeply the interaction between endogenous organisms with plant roots, to get a better knowledge of them. With these technologies we are trying both: the self-supplying and self-defending of the plants under adverse environmental conditions and to let to our planet in good health for the future generations.

Key words: Biofertilizers.— Biological control.— Biological N_2 fixation.— Rhizobiaciae.— Symbiosis fungi-plants.— Rhizosphere.— Rhizobacteria.

EXTENSIVE ABSTRACT

This dissertation deals at a field of increasing interest, the interactions between microorganisms, soil and plants, which needs to be studied more deeply, since given its complexity, our knowledge is still very limited. It starts with a previous comments on the soil, as a living agent, the fundamental role played by soil microorganisms on the soil structure, growth of the plants and C and N cycles. Between all ecosystems, the soil presents the major richness of species, living together a great amount of microorganisms as bacteria, fungi, virus, protozoae, and algae. From all of these groups, the bacteria is one of the most abundant and diverse, possibly because they are able of a rapid growth by using a great amount on nitrogen and carbon sources. The bacteria interact with plant roots and colonize the root surface that has a high concentration of nutrients.

Plant life is conditioned by the presence of these wide range of microorganisms associated to the roots which can alter the nutrient absorption, by direct effect on the roots, on the environment or by competition for soil nutrients. The plant rhizosphere is considered as a zone with intense microbial activity surrounding the root surface and stimulating the plant growth. The microbial density in the rhizosphere is higher with respect to the rest of the soil. It is a dinamic and changeable zone with different characteristics to the rest of the soil.

There is an increasing interest for the use of microorganisms as biofertilizers, to achieve the dream of a sustantaible agriculture and silviculture to exclude the use of phitosanitary products that are expensive and toxic for human health. These microorganisms can be clasified as beneficious or harmful and infective and non infective. The beneficious infective microorganisms include the N_2 fixing bacteria, Gram-negatives, from the Rhizobiaceae family, including the genera *Rhizobium, Bradyrhizobium Azorhizobium, Sinorhizobium* and *Mesorhizobium,* all of them living in symbiosis with legume roots. The actinomicete *Frankia* fix N_2 in some trees and bushs such us *Alnus, Myrica, Eleagnus, Casuarina*, etc. The ectomycorrhiza fungi stablish simbiosis with a great number of trees, while the arbuscular mycorrhiza (AM) stablish simbiosis with most of the higher plants.

Between the non-symbiotic fixing bacteria are the eubacteria *Rhodobacter* and some cyanobacteria and green-bleu algae as *Azolla, Anabaena and Nostoc*, specially important in flooding soils cultures as rice, by permiting a notable saving of nitrogen fertilizers and avoiding soil contamination.

Some beneficious non-infective microorganisms have developed the ability to colonize the plant root surface and they are known as promoting growth plant rhizobacteria (PGPRs). They stimulate plant growth throught different ways: by hormon secretion, by inhibiting phitopatogenes or by activating nutrients assimilation, mainly nitrogen and phosphorous. The genera *Pseudomonas* and *Bacillus* (*B. thuringensis*) are good examples of rhizobacteria.

The dissertation also focuses on the great interest of legume plants in agriculture and environment for being able to fix N_2 in arid and semiarid zones under symbiosis with the *Rhizobiacea*e family increasing nitrogen content in these areas. The legumes are divided in three subfamilies: *Cesalpinoideae, Mimosoideae and Papilionoideae*, there are about 750 genera and 18000 to 19000 species. The 88% of the examined species from the three families, form N_2-fixing nodules in their roots infected by *Rhizobium*. The process of nitrogen fixation is controlled by the plant from the initiation of the infection by the bacteria, and succesful nodulation depends on the availability of the combined nitrogen and the adequated photosynthetic energy. As the whole process is governed by genes, the genetic programmes that order the symbiotic compartments, infection thread and symbiosomes, are discussed in the text, as also the programmes controlling the nodule histogenesis, nodule autoregulation and differentation of bacteria in bacteroids. It is also mentioned some biotecnology strategies to obtain more efficient and competitive strains as good nitrogen fixers.

Besides the symbiosis bacteria-plant, it is described briefly the symbiosis fungi-plant which is carried out by the mycorrhizal fungi of the soil. Most of the plants present mycorrhized roots, helping to them to obtain mineral nutrients and water from the soil, as complementary roots and inducing resistence against pathogens. Two types of mycorrhiza fungi are described: the ectomycorrhiza, of great value in forestry since they help to the growth and development of the trees and are of great economical interest for industry by the commercialization of the fungi carpophores (musrhoms). The other type, the arbuscular mycorrhiza stablish symbiosis with agricultural plants acting as biofertilizers of crops under stress conditions.

The potential of soil microorganisms is unlimited. However, it will be necessary to study more deeply the interactions between the soil endogenous organisms with plant roots, to get a better knowledge of them. Food in undeveloping countries depends on a monoculture as rice, corn, wheat etc., and the use of fertilizers can be expensive for farmers. Our challenge nowadays is to extend nitrogen fixation to non-legumes plants. With these biotechnologies, we are trying both: the self-supplying and self-depending of the plants under adverse environmental conditions and to let to our Planet in good health for the future generations.

«Entremos más adentro en la espesura»

San Juan de la Cruz

INTRODUCCIÓN

La ciencia en general surge de un interrogarse el hombre desde sus comienzos en este planeta. Podría decirse que el científico se parece a un explorador que al recorrer montañas desconocidas tras las que aparecen siempre otras más altas y lejanas envueltas en una creciente niebla, no puede dejar de preguntarse por lo que hay más allá. Pues las grandes leyes que sigue la naturaleza son como picachos que asoman sobre nubes brumosas en una incitación apremiante a buscar lo que hay detrás.

Mi discurso va a versar sobre un campo de interés creciente, las interacciones microorganismos-suelo-planta, que necesita ser investigado en profundidad, dada su complejidad, pues a pesar de los muchos estudios que se han realizado, nuestro conocimiento es todavía muy limitado. Los estudios que he llevado a cabo en este campo a nivel de Fisiología y Bioquímica Vegetal los he complementado siempre con técnicas histoquímicas para lograr un mejor conocimiento de estos mecanismos mediante la interrelación estructura-función.

Así pues, la aportación de mis investigaciones a las interacciones estudiadas han ido dirigidas en gran parte al conocimiento de las estructuras vegetales implicadas y a la localización de los compo-

nentes químicos *in situ* para poder comprender mejor la función que ambos realizan en la interacción.

Las técnicas histoquímicas disponibles en la actualidad se han desarrollado ampliamente, constituyendo un potencial muy eficaz para el estudio complementario de los mecanismos bioquímicos y moleculares de un determinado proceso, y han alcanzado un gran nivel paralelamente al desarrollo de la Genética y la Biología Molecular.

Hagamos unas consideraciones previas:

Si miramos atentos, con mirada profunda, constatamos la perfección de la creación, pues el mundo macroscópico que vemos está formado por micro unidades microscópicas integradoras de los seres vivos, relacionadas entre sí y entrelazadas, siguiendo una perfecta armonía, lo que nos lleva a pensar, a menudo, en la creación de un planeta armónico, capaz de autodefenderse y autorregularse por sí mismo, siguiendo las leyes de la naturaleza en cada uno de sus componentes.

La humanidad desde hace siglos, y por voluntad del Creador, tiene colgada su existencia del misterioso hilo de sucesos que se producen cuando las semillas se alojan en el generoso seno del suelo, que convierte en realidad el misterio, en potencia, del equipo hereditario. El suelo es un arca mágica, un sistema complejo, que alberga entre otros componentes, el misterio de las membranas radiculares, capaces de unir el mundo vivo y el mundo muerto.

Si consideramos la diversidad de fenómenos inorgánicos y orgánicos que se producen en el suelo y las variaciones de todos los órdenes a que está sujeto, podríamos decir que el suelo es la capa viviente de transformación de la esfera sólida terrestre, surgida bajo el influjo de la vida y de las especiales condiciones ambientales de un hábitat biológico que está sometido a un constante cambio y desarrollo peculiar (26). Puesto que el suelo surge bajo la influencia del desarrollo de la vida, es necesario tener ésta muy en cuenta, pues el proceso de desarrollo corre paralelo generalmente al de colonización del suelo por los organismos (microorganismos, vegetación, animales y el hombre). Pero son muchos los factores que intervienen en su formación, y por ello en cada caso el suelo es una individua-

lidad, un conjunto resultante de acciones variadísimas, entre las que las condiciones ambientales juegan un papel clave. Si la vida ejerce (directa o indirectamente) tan gran influjo sobre el suelo, éste delimita las condiciones de vida. De ahí la estrecha relación entre las Ciencias del Suelo, y la Biología, y existen métodos de estudio del suelo análogos a los biológicos, como es, por ejemplo, la micromorfología del suelo, introducida en España por el profesor Kubiena, que estudia el suelo *in situ* en preparaciones de cortes delgados para conocer sus componentes, de un modo similar a los métodos histológicos que informan de la composición anatómica de un tejido.

El profesor Albareda tuvo una visión muy amplia cuando creó nuestro Instituto en 1942, relacionando las Ciencias del Suelo con la Fisiología Vegetal y la Ecología. La filosofía de su creación se fundamentó en que planta y suelo constituyen una unidad, con las más extensas interacciones, de las que brotaran conocimientos de ciencia natural pura y aplicaciones agrícolas y forestales.

EL SUELO, AGENTE DE VIDA

Rocas y sedimentos geológicos han sufrido alteraciones durante la formación del suelo por factores geológicos, topográficos, climáticos, físicos, químicos y biológicos, para formar una entidad viviente, compuesta de una asociación de partículas inorgánicas o minerales, entrelazadas con materia orgánica y gases difundidos. Cuando el suelo es humedecido con agua, este complejo sistema se transforma en un sustrato fértil, donde brota la vida en el planeta. Esta es la zona de la pedosfera, que sostiene la vida sobre la tierra y que es biológicamente un medio activo y estructurado al servicio de su verdadera función, como es su aprovechamiento para el desarrollo de los seres vivos.

En su estado natural, el suelo constituye una entidad biológica, regulada por sí misma, que evoluciona lentamente en el tiempo. Podría compararse a una esponja, regulando y amortiguando el suministro de nutrientes y agua para el crecimiento de la macro y microflora, y de la fauna, y determinando el reparto del agua, entre la que fluye por la superficie hacia los ríos y lagos y la que percola para reponer los acuíferos y reservorios de aguas subterráneas.

Pero el suelo no solamente sirve para promover y sostener la vida en sus formas variadas, sino que también actúa como un filtro viviente de los restos generados por hombres y animales. En este papel, limpia, purifica, recicla y disminuye el daño de muchas toxinas y patógenos que de otro modo irreparablemente contaminarían y degradarían el ambiente. Algunos de sus componentes (los microorganismos) producen antídotos, que controlan las infecciones y enfermedades de las raíces. Pero la manipulación del hombre puede romper esta autorregulación y puede conducir a situaciones difíciles para la vida, ya que el suelo es un recurso no renovable que hay que mantener y proteger.

Los organismos juegan un papel fundamental en la estructura del suelo, crecimiento de las plantas y ciclos del carbono y del nitrógeno. El suelo es de entre todos los ecosistemas terrestres el que presenta una mayor riqueza en especies. En él conviven una gran cantidad de microorganismos, como bacterias, hongos, virus, protozoos y algas. Pero de todos los grupos anteriormente enumerados, uno de los más abundantes y diversos es el constituido por bacterias, posiblemente por ser capaces de crecer más rápidamente y poder utilizar una gran variedad de compuestos como fuentes de carbono y de nitrógeno. Las bacterias se localizan en la superficie de las partículas del suelo, pudiendo interaccionar con las raíces de las plantas, ya que hay una alta concentración de nutrientes en esa zona. Las bacterias además poseen, quizá más que otros organismos, una gran adaptabilidad, tanto fisiológica como genética (transferencias horizontales y verticales), elevada tasa de mutación, variación de fase, etc., frente a la variación de las condiciones del suelo. Por el contrario, muchos microorganismos pueden no tener la capacidad de adaptarse a ese ambiente, y no llegan a sobrevivir en él, de ahí que no prosperen ciertas inoculaciones con bacterias, usadas en prácticas biotecnológicas.

Los avances en biología molecular que han hecho posible el estudio de organismos que crecen en el laboratorio en medios de crecimiento seleccionados deberían hacer posible el crecimiento de las poblaciones del suelo en estos medios para poder identificarlas y tener un mayor conocimiento de sus propiedades y poder manipularlas en nuestro beneficio. Se calcula que existen en el suelo unas 30.000 especies de bacterias y 1.500 especies de hongos, de las cua-

les sólo han sido identificadas un 8 y un 1%, respectivamente. En el suelo se encuentran un gran número de bacterias viables, que no son cultivables. Así pues, la biología del suelo se encuentra todavía en un periodo de infancia.

Los microorganismos que crecen alrededor de las raíces de las plantas constituyen la biomasa mayor de nuestro planeta. Las bacterias son, sin duda alguna, el grupo de organismos metabolicamente más significativos de los organismos del suelo. En cuanto a los hongos, son los organismos más dominantes por los múltiples procesos que realizan y por su gran biomasa.

En algunos suelos la biomasa de los hongos excede la formada por todos los demás organismos combinados, siendo su papel la descomposición y mineralización de compuestos de origen vegetal y animal (celulosa, hemicelulosa, lignina y quitina) y también su implicación en simbiosis beneficiosas con raíces de plantas, a las que capacitan para vivir en condiciones limitantes de nutrientes o de agua e incluso aumentan su resistencia a patógenos, los cuales causan billones de euros en pérdidas de los cultivos.

LA RIZOSFERA

La vida de las plantas está condicionada por la existencia de esta amplia gama de microorganismos que viven asociados con ellas, los cuales pueden alterar la absorción de nutrientes por efecto directo sobre las raíces, por efecto sobre el medio y por competir directamente por los nutrientes del suelo. Estos microorganismos, actuando principalmente desde la rizosfera, condicionan la nutrición y la salud de las plantas y por tanto el correcto funcionamiento de toda la biosfera. Se considera a la rizosfera como una zona de intensa actividad microbiana alrededor de las raíces, cuya influencia estimula el crecimiento y aumenta la densidad de microorganismos entre 10^2 a 10^3 respecto al resto del suelo. Esta zona es dinámica y cambiante, y tiene unas características físicas, químicas y biológicas diferentes del resto del suelo. En 1904 Hiltner definió la rizosfera como aquella porción de suelo en torno a las raíces, con una mayor actividad microbiana, resultante de la alta concentración de carbono y otros nutrientes existentes en esta zona, ampliándose este concep-

to en la actualidad hasta considerar como rizosfera la porción de suelo influida por las raíces vivas.

El interés cada vez mayor de utilizar microorganismos para lograr el sueño de una agricultura y silvicultura sostenibles donde se excluya el uso de fitosanitarios caros y nocivos, conduce a una mayor atención sobre la manipulación más efectiva de la rizosfera. Desde que Hiltner la definió, ha habido bastantes avances en reconocimiento al importante papel de los microorganismos sobre el crecimiento de las plantas. Son muchos los trabajos realizados (3, 4, 38 y 31), destacando sobre todos ellos los llevados a cabo por Rovira y su grupo en Australia, llegando a denominarse «efecto rizosfera» a la influencia de la planta sobre el suelo, aunque a medida que los trabajos han ido progresando, podemos considerar el «efecto rizosfera» más que como un efecto, como un sistema natural con propiedades, elementos y fronteras definidas en el que se identifican tres zonas:

a) La ectorizosfera: región del suelo en contacto directo con la raíz.

b) El rizoplano: región radical que está en contacto directo con el suelo.

c) La endorizosfera: región del tejido cortical de la planta colonizada por microorganismos.

La mayoría del conocimiento sobre la existencia física de la rizosfera se deriva de la microscopía electrónica de transmisión y barrido (13, 14). Estos estudios han mostrado que las células epidérmicas de las raíces están recubiertas de polisacáridos de doble origen, vegetal y microbiano, de grosor variado, en el cual las colonias de microorganismos están incluidas y asentadas. Los azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, etc., son responsables de las especies, variedades y número de microorganismos que en ella viven. Un componente puede estimular el crecimiento de un microorganismo y puede ser neutral o inhibidor para otros. Así, los sideróforos exudados por gramíneas del mismo modo a los excretados por ciertas bacterias, pueden inhibir el crecimiento de algunos microorganismos, llegando a reducir la disponibilidad del hierro en la rizosfera.

Las condiciones ambientales de crecimiento de la planta influyen decisivamente sobre estos exudados en cantidad y composición. Las raíces cambian física y fisiológicamente con la edad y el medio que las rodea, por lo que las sustancias excretadas son diferentes, siendo la producción de aminoácidos, siempre mayor cerca de la cofia, zona muy metabólica y de mayor absorción de agua y nutrientes.

El mucilago que rodea la cofia de las raíces y se extiende a lo largo de los primeros centímetros de la raíz (18) juega un importante papel en el dinamismo de la zona rizosférica. Durante mi estancia en la Universidad de California (1964), colaboré con los profesores Jenny y McLaren en el esclarecimiento del origen de la capa mucilaginosa de las raíces, ya que en dicha Universidad había dos teorías. Los partidarios de que su formación se debía exclusivamente a los exudados de las raíces (Departamento de Suelos y Nutrición Vegetal) y los que opinaban que su origen era exclusivamente microbiano (Departamento de Microbiología). Utilizando plantas estériles y no estériles y analizando la rizosfera por microscopia óptica y electrónica concluimos que la capa mucilaginosa es producto de la planta y de las excrecciones de microorganismos que viven sobre ella.

A pesar de muchos años de aislamiento de microorganismos de la rizosfera, nuestro conocimiento real es fragmentario. Los métodos tradicionales de cultivo *in vitro* recobran solamente un pequeño porcentaje de los organismos reconocidos previamente por el microscopio y los contados directamente. La temperatura de incubación y la riqueza del medio juegan un papel importante para el organismo aislado y especialmente la composición del medio de cultivo tiene un papel primordial. Así las *Pseudomonas* fluorescentes han sido calificadas como el mayor grupo bacteriano de la rizosfera, lo que obedece únicamente a que dado el interés de estas bacterias para su uso como protectores de plantas, se han buscado medios selectivos para su aislamiento (25).

Pero si se conocieran las características específicas que controlan el crecimiento y supervivencia de las especies, sería posible modificarlas para favorecer el crecimiento de los microorganismos deseables y eliminar a los indeseables. El interés de la manipulación se basa también en que las raíces colonizadas pueden ser un vector eficaz de introducción de bacterias con características adecuadas para procesos de Bioremediación de suelos contaminados (5).

TIPOS DE ORGANISMOS DEL SUELO

Los microorganismos del suelo pueden ser separados en beneficiosos o perjudiciales e infectivos y no infectivos. Los organismos beneficiosos infectivos incluyen los fijadores de nitrógeno, bacterias Gram negativas, tales como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, que viven en simbiosis con leguminosas. El actinomiceto *Frankia* que fija nitrógeno en determinados árboles y arbustos, tales como *Alnus*, *Myrica*, *Eleagnus, Casuarina*, etc., los hongos ectomicorricos que establecen simbiosis con un gran número de árboles, y las micorrizas arbusculares (AM), que se asocian a las raíces de la mayoría de las plantas superiores excepto con las *Brasicaceas* y *Quenopodiaceas*.

Otros fijadores de nitrógeno en asociación no simbiótica han demostrado gran capacidad para sustituir a los fertilizantes nitrogenados y contribuir a la sostenibilidad de los sistemas agrícolas, siendo pioneros en su utilización algunos países como Brasil, en cultivos de caña de azúcar y maíz, caracterizándose Brasil por ser uno de los países menos contaminados por fertilizantes sintéticos. Los organismos responsables de este tipo de fijación se encuentran en estado libre en el suelo, obteniendo la energía requerida para la fijación de nitrógeno de la fotosíntesis o de la oxidación de productos orgánicos del suelo.

Entre los fijadores libres fotosintéticos se encuentran eubacterias fototrofas como *Rhodobacter* y algunas cianoficeas, algas verdes azuladas: *Azolla, Anabaena* y *Nostoc,* que fijan el nitrógeno en células especiales llamadas «heterocistos». Estas algas son particularmente importantes en cultivos de suelos encharcados como el arroz, donde la fijación puede alcanzar 30 kg de nitrógeno por hectárea y año, permitiendo un notable ahorro de fertilizantes nitrogenados y evitando la contaminación de estos suelos.

Los organismos heterotróficos no-fotosintéticos fijan el nitrógeno obteniendo la energía de compuestos del suelo excretados por las raíces. Estas bacterias pertenecen al género *Clostridium* (anaeróbicos), *Azotobacter, Azospirillum* y *Beijerinckia* (aeróbicos). Mediante técnicas de N^{15} ha sido posible seguir la contribución significativa del nitrógeno fijado por *Clostridium* en suelos forestales caracteriza-

dos por pHs bajos (19). Las cantidades de nitrógeno fijadas por estas bacterias permiten suponer que se pueden alcanzar los 100 kg.de N por hectárea y año. Son asociaciones de gran potencial agronómico, presentando especial interés la asociación de *Azospirillum* con cultivos forrajeros tropicales *(Panicum maximun)* y con cultivos de maíz, caña de azúcar, trigo, centeno y sorgo.

BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL

Una parte de los microorganismos beneficiosos, no infectivos, ha desarrollado la habilidad de colonizar la raíz, y se conocen en su conjunto como rizobacterias. Las rizobacterias beneficiosas que promueven el crecimiento de las plantas, bien específicamente mediante la secreción de hormonas o indirectamente inhibiendo organismos fitopatógenos o activando la asimilación de nutrientes, se conocen como bacterias promotoras del crecimiento (PGPRs) y a su identificación y mecanismos de acción ha contribuido el profesor Gutiérrez Mañero y su grupo de la Universidad San Pablo-CEU, con los cuales hemos colaborado en los últimos años en proyectos comunes.

Aunque la interacción de estos microorganismos con las plantas ha sido convenientemente estudiada, aún estamos lejos de entender las complejas interrelaciones metabólicas y ecológicas que resultan en efectos beneficiosos o perjudiciales para los cultivos, y uno de los mayores retos es conseguir una descripción precisa y completa de estos complejos sistemas. Este conocimiento permitiría responder a la pregunta, de gran interés práctico, sobre si podemos manipular los microorganismos o las plantas para conseguir una óptima asociación que resulte en mejoras de la productividad y salud de los cultivos.

BIOTECNOLOGÍAS LIMPIAS EN AGRICULTURA

El suelo es un recurso natural con una función primordial, soportar una vegetación, y en él se deben dar las condiciones necesarias para el desarrollo permanente de la misma. La salud del suelo está estrechamente relacionada con la alimentación humana a través de la producción agrícola y ganadera.

El hombre puede perturbar este recurso natural, bien sobreexplotando la productividad del sistema, que incapaz de regenerarse se empobrece y degrada, o mediante el vertido de residuos en una proporción muy superior al que el medio puede absorber y transformar. El deterioro del medio hace peligrar lo que habitualmente denominamos «calidad de vida», pero el agotamiento de los recursos naturales, por encima del nivel de sostenibilidad, lo hace sobre el «nivel de vida».

Sin embargo, las prácticas agrarias que se han venido utilizando en las últimas décadas para conseguir un aumento de la producción, mediante el uso de especies vegetales con una alta respuesta a la fertilización química, han conducido a la contaminación de los suelos y han causado graves problemas de eutrofización en las aguas de bebida, en ríos, lagos, lagunas y aguas subterráneas con grave repercusión sobre la salud humana.

Se hace necesario producir evitando efectos nocivos, mantener limpia la naturaleza sin pensar en grandes producciones, sino más bien atendiendo a la calidad del producto obtenido y sobre todo intentando una agricultura más respetuosa con el medio. Todo ello conduce a una «Nueva Agricultura» a una Agricultura Sostenible con capacidad de mantenerse y prolongarse en la agricultura del futuro.

Las prácticas biotecnológicas ofrecen una posible solución, de manera responsable, para mejorar la producción agrícola, atendiendo a las nuevas tendencias ambientales, impulsando el estudio de nuevas tecnologías que permitan aumentar la producción agrícola y forestal en el marco de una agricultura y silvicultura sostenibles.

El Convenio sobre la Diversidad Biológica (1992) definió la biotecnología como toda aplicación tecnológica que utiliza sistemas biológicos y organismos vivos, o sus derivados, para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos. Abarca una amplia gama de tecnologías diferentes, como el empleo de biofertilizantes, agentes de biocontrol y además incluye la manipulación, transferencia de genes o clonación de plantas, que ha llevado a la selección de genotipos de forma más rápida y selectiva.

Una alternativa complementaria a la utilización de los OMGs es la potenciación del aprovechamiento de organismos nativos del sue-

lo, bacterias y hongos (24), su incidencia en la nutrición y protección vegetal y su interés, especialmente en países subdesarrollados, con baja productividad agrícola y con dificultades económicas.

Se abre así un campo de investigación de gran importancia, que requiere ser estudiado en profundidad, atendiendo a sus posibles repercusiones bióticas y abióticas sobre el Medio Ambiente y la Salud. Las simbiosis «bacteria-planta» y «hongo-planta» han sido estrechamente estudiadas.

Las bacterias fijadoras de nitrógeno y los hongos micorrícicos están entre los endosimbiontes de plantas más extendidos y ecológicamente más importantes, y a ellos nos vamos a referir a continuación.

Fijación biológica de nitrógeno (FBN)

El nitrógeno, después del agua, es el principal nutriente limitante para el desarrollo de las plantas. Precisamente por esta razón en el periodo entre 1950 y 1990 se incrementó diez veces en España el uso de fertilizantes nitrogenados, lo cual llevó a un aumento sin precedentes de la productividad en los cereales. Sin embargo, la aplicación de estos fertilizantes y otras acciones industriales y antrópicas han alterado las condiciones básicas del ciclo natural del nitrógeno y han contribuido a la contaminación por nitratos de los ecosistemas terrestres y acuáticos con grave riesgo para la salud humana. Los efectos sobre la salud han sido puestos de manifiesto en diversos estudios epidemiológicos y clínicos, estudios que han demostrado que la ingestión de nitratos en el agua de bebida o en alimentos conduce a la aparición de metahemoglobinemia e incluso se han relacionado con la aparición de cáncer. El nitrato se transforma en el organismo en nitrito que oxida el Fe^{2+} ferroso de la hemoglobina a Fe^{3+} férrico, que es incapaz de fijar el oxígeno y transportarlo a los tejidos; es lo que se llama enfermedad azul de los lactantes. Otro producto secundario resultante de los nitratos son las nitrosaminas, cuyo carácter cancerígeno fue demostrado por Mirvish en 1981.

El nitrógeno es el elemento más abundante de la atmósfera terrestre y sin embargo es una fuente nutritiva muy escasa. Esta paradoja se debe a que el nitrógeno atmosférico es inerte y no puede

ser aprovechado por la mayoría de los seres vivos, únicamente se incorpora a los sistemas biológicos cuando ha sido fijado por organismos fijadores o combinado con ciertos elementos como el hidrógeno o el oxígeno, en forma de nitrato o de amonio.

La FBN aporta la mayor parte del nitrógeno fijado a los ecosistemas terrestres. La fijación global se estima en unos 275 millones de toneladas de nitrógeno al año. De esta cantidad, 30 millones se fijan por causas naturales como descargas eléctricas, erupciones volcánicas, etc.; 70 millones se fijan mediante fijación industrial en el proceso de Haber-Bosch, en el cual se gasta gran cantidad de energía procedente del petróleo, y 175 millones de toneladas se fijan mediante fijación biológica. De estos 175 millones, 35 se fijan mediante fijación en vida libre y 140 mediante fijación simbiótica (40).

Así pues, la Fijación Biológica de Nitrógeno representa una alternativa a la fertilización nitrogenada, y está restringida a organismos procariontes, capaces de reducir el nitrógeno molecular a amoniaco, tanto en vida libre como en simbiosis.

LAS LEGUMINOSAS

A partir de las experiencias de Hellriegel en 1886 se han intensificado los estudios dirigidos al importante papel que juegan las leguminosas en el medioambiente y la salud. Las leguminosas son base de la dieta mediterránea y tienen un papel crítico en los ecosistemas naturales, en la agricultura y en el sector agroforestal, donde su habilidad para fijar nitrógeno en simbiosis hace de ellas excelentes colonizadoras en medios deficientes de nitrógeno. Existen alrededor de 750 géneros y entre 18.000 a 19.000 especies distribuidas en tres subfamilias: *Caesalpinodeae,* con numerosas especies tropicales; *Mimosoideae,* con especies arbóreas como *Acacia* sp., y *Papilionoideae,* con especies de elevada importancia agricola. El 88% de las especies examinadas forman en sus raíces nódulos con *Rhizobium* (12).

El éxito adaptativo de las leguminosas les permite colonizar suelos pobres en nutrientes. La abundancia de sus raíces hace también posible la mejora de las características fisicoquímicas de suelos de zonas áridas y semiáridas. Su uso para pasto y mejora de suelos data

de los romanos, que recomendaban en los tratados de Agricultura el cultivo alternativo de gramíneas y leguminosas, con el fin de aumentar la producción de trigo y cebada. En 1932, Fred y col., en su libro titulado *Root nodule bacteria and leguminous plants,* incluyen una cita de Varro (37 BC) que dice: «las legumbres deben plantarse en suelos, no tanto por su importancia como cultivo, sino como por sus buenos efectos sobre los cultivos sucesivos».

Las bases científicas de este proceso fueron presentadas primeramente por Boussingault a mediados del tercer decenio del siglo XIX en Francia. En 1907, en el libro de Primera Enseñanza Superior de Forcadell se puede leer: «Los agrónomos han clasificado las plantas en dos grupos: reparadoras y esquilmadoras. Las primeras en lugar de empobrecer el suelo lo enriquecen, por nutrirse más de la atmósfera que de los jugos de la tierra...», propiedad relativa a las plantas leguminosas.

El proceso de fijación biológica de nitrógeno, que hermana a las leguminosas con las bacterias, estableciendo un diálogo entre los dos simbiontes, constituye una de las biotecnologías más sorprendentes y excepcionales, por su gran repercusión en el sector sanitario y agroalimentario. Se estima que aproximadamente 100 leguminosas agrícolamente importantes contribuyen anualmente con casi la mitad del nitrógeno fijado biológicamente. En el mundo se estima que sólo las leguminosas grano ocupan cerca de 150 millones de hectáreas con una producción anual de 200 millones de toneladas grano.

La simbiosis *Rhizobium*-leguminosa y la actinomicorrícica se originaron en el cretácico cuando los suelos eran pobres en N combinado. La fuerte presión por la captación de N favoreció a estas plantas para establecer simbiosis con microorganismos del suelo. Su antigüedad data de 60 a 70 millones de años, cuando las familias mayores de angiospermas se separaron (11).

Según algunos autores, la simbiosis entre las leguminosas y *Rhizobiaceas* existía ya antes de que el oxígeno existiera en la tierra. Según Oparín y Haldane, la primitiva atmósfera sólo contaba con agua, CO_2 y NH_4, y ésta puede ser la causa de las condiciones de anaerobiosis que requiere este proceso.

Las leguminosas pueden realizar asociaciones simbióticas tanto con bacterias del suelo como con hongos micorrícicos. Investigacio-

nes actuales apuntan a que los mecanismos de reconocimiento de uno u otro microsimbionte por las leguminosas son similares a nivel genético. El estudio de estos mecanismos comunes en el establecimiento de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa y micorriza-planta permitirá no sólo la mejor comprensión de ambos procesos, sino también la mejor utilización de su potencial en una Agricultura Sostenible, respetuosa con el Medio Ambiente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA FORMACIÓN DEL NÓDULO DE LEGUMINOSAS

El establecimiento de la simbiosis *Rhizobium-leguminosa* comienza con el reconocimiento específico entre la bacteria y su planta hospedadora. La especificidad de la interacción simbiótica viene dada por el intercambio inicial de señales químicas entre la planta y el rizobio, que activan programas genéticos específicos de nodulación en ambos simbiontes.

Los exudados radiculares de las leguminosas, azúcares, aminoácidos, así como compuestos flavonoides (flavonas, isoflavonas, chalconas y flavononas) atraen a las bacterias que emigran hacia sus raíces. La respuesta bacteriana, mediada por la proteína NodD constitutiva, emite a su vez señales de nodulación, el Factor Nod, para la activación y transcripción de genes implicados en el proceso simbiótico, que origina la curvatura de los pelos radiculares, la formación de células meristemáticas en la corteza de la raíz (primordio nodular) y la expresión de genes de nodulinas tempranas (ENOD12 y ENOD20). Los factores Nod son reguladores de desarrollo muy potentes, ya que su efecto se expresa a concentraciones de 10^{-8} a 10^{-12} M. Se trata de un lipo-chito-oligosacárido que induce los estadios más tempranos de la nodulación y cuya composición química difiere según el tipo de interacción.

La infección comienza con la digestión localizada de la pared del pelo radicular por *Rhizobium* y la formación del canal de infección, siendo las bacterias liberadas por endocitosis en el citosol de las células corticales.

La raíz aísla a las bacterias recién liberadas, facilitándoles la membrana peribacteroidal, de origen vegetal, formada a expensas de

cisternas de retículo endoplásmico y vesículas de Golgi. En el interior de la membrana peribacteroidal las bacterias se diferencian en bacteroides, de mayor tamaño que las bacterias en vida libre, dando lugar al «simbiosoma» o unidad fijadora de nitrógeno formada por uno o más bacteroides rodeados por la membrana peribacteroidal. El simbiosoma es un orgánulo subcelular exclusivo de raíces de leguminosas. La síntesis del enzima nitrogenasa es inmediatamente inducida en los bacteroides (genes *Nif*), que les capacita para reducir el nitrógeno atmosférico a amonio con un gran coste de energía para la planta.

En algunos nódulos, en su mayoría indeterminados, los bacteroides se dividen dentro de los simbiosomas, paralelamente a la multiplicación de las células infectadas para crear la zona infectada. Finalmente se llega a la formación del nódulo en el que la zona infectada está rodeada de una corteza interna y externa de donde parten los haces vasculares que transportan los fotosintatos de la planta al nódulo, y los compuestos nitrogenados en forma de amidas o ureidos elaborados por el nódulo a la parte aérea de la planta. En nódulos indeterminados (trébol, guisante, alfalfa, etc.) existe un meristemo apical responsable del crecimiento continuo del nódulo, que no poseen los nódulos determinados (soja).

La infección de las raíces por las bacterias puede realizarse de modo diferente al canal de infección, aunque ésta es la forma más frecuente. Otras formas de infección se realizan por heridas producidas en la emergencia de las raíces laterales, como ocurre en el género *Arachis* (cacahuete), en *Sylosanthes, Aeschinomene* y en otras plantas. En simbiosis primitivas de la familia Cesalpinoideas (p.e., en *Cassia*), y también en las papilonáceas leñosas *Andyra* e *Hymenolobium,* las bacterias no eran liberadas del canal de infección, la fijación de nitrógeno se realizaba en estas estructuras o «canales de fijación».

Aunque la interacción *Rhizobium*-planta es bastante específica, lo que significa que cada planta será nodulada por su rizobio o rizobios característicos, sin embargo, una misma cepa bacteriana es capaz de establecer simbiosis con diferentes leguminosas como *R. leguminosarum,* que puede nodular *Pisum* y *Cicer*. El caso extremo es la especie de amplio rango de hospedador *Synorhizobium* sp. NGR234, que puede establecer simbiosis con 353 leguminosas. A su vez, una

misma planta puede ser nodulada por diferentes rizobios, como ocurre en soja, que es nodulada por *B. japonicum* y *Sinorhizobium fredii.*

En todo momento, el establecimiento de la simbiosis está controlado por la planta. Es la planta la que determina que se inicie o no la infección, en función de la disponibilidad de nitrógeno combinado y de la energía fotosintética adecuada.

EVOLUCIÓN DE LAS ESTRUCTURAS SIMBIÓTICAS

La simbiosis entre leguminosas y bacterias rizobiaceas es el sistema mejor estudiado en el marco de las interacciones planta-microorganismo. Estas bacterias son simbiontes facultativos, cultivados fácilmente ex-planta y accesibles a su investigación por métodos genéticos y moleculares modernos.

Todo el proceso de la fijación de nitrógeno está gobernado por genes y el uso de mutantes, defectuosos en componentes estructurales, ha sido de gran ayuda para esclarecer las distintas etapas de iniciación y desarrollo del nódulo.

Los nódulos representan un modelo apropiado para estudiar un amplio rango de funciones clave en las plantas, incluyendo la señalización inicial entre los simbiontes, diferenciación celular y organogénesis, así como expresión de genes responsables del desarrollo del nódulo y su envejecimiento. Usando mutantes de diferentes leguminosas (guisante, soja, alfalfa, trébol, judía, etc.), se han identificado alrededor de 100 genes responsables del desarrollo del nódulo. De ellos, más de 40 genes han sido identificados en *Pisum sativum,* que sigue siendo uno de los modelos más adecuados.

Los análisis genéticos pueden ser de gran utilidad para diferenciar los estadios más significativos de la simbiosis, cuando cada uno de ellos está controlado por uno o varios genes. De este modo se ha podido hacer un seguimiento del proceso de infección en *Medicago sativa* desde la iniciación del canal de infección, crecimiento en el interior del pelo radical y su avance en la corteza de la raíz, mediante mutantes de *Rhizobium meliloti*, defectuosos en diferentes componentes de exopolisacaridos, e igualmente se ha seguido la liberación de las bacterias en la corteza radicular, diferenciación en bacteroides y formación del joven nódulo.

La secuencia funcional de los genes simbióticos de la planta, identificados mediante el uso de genotipos mutantes, coincide en general con la ordenación de los estadios de desarrollo identificados en los genotipos silvestres. Sin embargo existe una excepción muy notable: las mutantes defectuosas en la autorregulación sistemática de la nodulación, usualmente retienen la capacidad fijadora de nitrógeno, por lo que la respuesta a la autorregulación no debe ser considerada como elemento a valorar en el proceso «escalonado» del desarrollo de los compartimientos simbióticos. Esto también sucede en la formación histológica del nódulo, ya que algunas mutantes de alfalfa forman estructuras pseudonodulares sin haber sido inoculadas con *Rhizobium* (8).

Todos estos datos sugieren que el programa integral del desarrollo del nódulo no está formado por una cadena lineal de etapas sucesivas, sino por diferentes subprogramas, que son implementados en cierto grado, independientemente uno de otro, pudiendo cada subprograma, a su vez, constar de varios pasos sucesivos.

El más importante es el subprograma genético que ordena el desarrollo de los compartimentos simbióticos: canal de infección y simbiosomas, que separa las bacterias del citosol vegetal y asegura un diálogo íntimo entre ellos. En paralelo, los subprogramas que controlan la histogénesis del nódulo, la autorregulación de la nodulación y la diferenciación de las bacterias en bacteroides, ocupan también un especial relieve.

La identificación de los subprogramas mencionados no es en todos los casos un resultado específico de la investigación con mutantes. Es evidente que con independencia del desarrollo de los componentes simbióticos, las mutantes defectuosas en la síntesis de exopolisacáridos y lipopolisacáridos, componentes específicos del nódulo, no infectan usualmente las raíces, pero inducen la formación de pseudonódulos. También se ha evidenciado que cuando los factores Nod purificados son añadidos, pueden inducir a la formación del primordio nodular e incluso estados iniciales de la estructura nodular. Sin embargo, para estudiar la inducción de los genes que se expresan en los estadios iniciales de la infección por *Rhizobium* y los genes *Nif* de fijación de nitrógeno es necesario el empleo de bacterias mutantes.

Los genes simbióticos identificados, usando sus productos moleculares, son las llamadas «nodulinas» y a su estudio ha cooperado el doctor Bisseling y su grupo del *Department of Molecular Biology* de la Universidad de Agricultura de Wageningen. Estos componentes pueden representar más de la mitad del contenido de proteínas de los nódulos. Para identificar estos genes se ha comparado la expresión de proteínas (RNAs) de plantas noduladas con raíces no inoculadas y nódulos Fix^+ y Fix^-. Este abordaje ha permitido diferenciar entre «nodulinas tempranas», activadas antes de la aparición de la fijación de nitrógeno, y «nodulinas tardías», que aparecen durante y después del comienzo de la fijación de nitrógeno. Nuestro laboratorio ha contribuido al estudio de una de estas nodulinas tardías, la «leghemoglobina» o «hemoglobina» de las plantas.

Algunas nodulinas están relacionadas con la formación de estructuras simbióticas, por ejemplo, la nodulina temprana ENOD2, activamente sintetizada en el parénquima nodular, mientras que las nodulinas ENOD5 y ENOD12 están localizadas en las paredes del canal de infección (Mylona y col., 1995). La nodulina N-26, sintetizada durante la liberación de las bacterias del canal de infección, es un componente de la membrana peribacteroidal y puede estar relacionada con el transporte de nutrientes entre los simbiontes. La nodulina ENOD40 está relacionada con el balance hormonal durante los estadios iniciales del establecimiento del nódulo. Esta nodulina parece controlar el cociente auxinas/citoquininas que se altera enormemente después de la inoculación con *Rhizobium* y juega un papel importante en la formación del primordio nodular y anatomía general del nódulo (16, 29).

MECANISMOS DE DEFENSA A LA INFECCIÓN

Inmediatamente después de la inducción de la nodulación, se inician las reacciones propias del endosimbionte en la planta hospedadora, en la que tiene especial relieve las interacciones previas a la separación de las bacterias del citosol de las células infectadas. Podrían asemejarse estos mecanismos a las reacciones de defensa de las plantas contra patógenos, que incluyen la síntesis de muchos compuestos, como ácido salicílico, quitinasa, peroxidasa, callosa,

extensinas, proteínas de defensa, etc. En la nodulación las reacciones no son tan intensas como durante la patogénesis y están estrechamente relacionadas con la especificidad de la simbiosis. La síntesis de factores de defensa es mucho más baja, no inactivando a las bacterias, pero sí controlando su número y desarrollo en los compartimientos simbióticos. El balance final de la interacción dependerá del contenido de polisacáridos exo y lipo y de los glucanos cíclicos, componentes de las paredes bacterianas. Estas moléculas de superficie pueden inhibir los sistemas de defensa de la planta o bien hacer que las bacterias resistan a estos mecanismos. La alteración de los mecanismos de defensa comienza ya en estadios iniciales de la infección, en los cuales ocurren interacciones entre los exopolisacáridos de *Rhizobium* y los receptores de la planta. En ausencia de exopolisacáridos, estos receptores pueden ser afectados por algunos elicitores (p.e., productos de la degradación de la pared celular), induciendo una intensa respuesta inmune (33). Intensas reacciones de defensa pueden también estar sumamente implicadas en el desarrollo de los canales de infección, gran parte de los cuales son bloqueados o abortados en tempranos estados de preinfección (6, 7). El grupo del profesor Olivares Pascual ha contribuido al estudio de estos mecanismos de defensa en plantas de alfalfa inoculadas con *Rhizobium* incompatibles (28).

Además de los mecanismos que controlan al endosimbionte en la planta hospedadora, las leguminosas tienen la capacidad de autorregular el número de nódulos formados en sus raíces mediante señales sistemáticas hipersensibles que se comunican entre las raíces y la parte aérea de la planta. Así por ejemplo, se han seleccionado ciertos mutantes de autorregulación negativa, como plantas supernodulantes Nod^{++} que generalmente mantienen la nodulación en presencia de altas dosis de nitrato (fenotipos tolerantes al nitrato) que inhibirían la simbiosis en las plantas silvestres. El aborto de excesivos canales de infección en las células corticales de alfalfa vía un mecanismo similar de reacción hipersensible puede ser también consecuencia de la respuesta de autorregulación de la planta (41).

SIMBIOSIS *LUPINUS-BRADYRHIZOBIUM*$_{sp}$

Por ser la simbiosis mayormente estudiada en nuestro laboratorio y por tener características propias, voy a hacer una reseña muy breve de algunos de los resultados obtenidos en estos trabajos.

El lupino o altramuz es una leguminosa de origen mediterráneo con gran potencialidad agrícola debido al alto contenido de proteínas en sus semillas que le asemeja a la soja, y su potencial como oleaginosa. Este género corresponde a la tribu *Geneistae, subtribu Lupininae,* de la que es el único representante.

Respecto a su nodulación, el lupino presenta diversas características propias que le diferencia de otras leguminosas. El nódulo de lupino es un subtipo especial y único dentro de los nódulos indeterminados, por lo que se le ha llamado «lupinoide», carece de meristemo terminal, presentando el meristemo una localización basal-lateral. Es la única leguminosa de clima templado que transporta el N fijado en las raíces a la parte aérea, en forma de amidas, y es nodulada por bacterias del género *Bradyrhizobium*.

El proceso de infección es diferente, no sigue el patrón estandar, no observándose cordones de infección. Al conocimiento de esta infección «peculiar» ha contribuido recientemente nuestro grupo de investigación, mediante la realización de una tesis doctoral que se presentará en breve en la Universidad Autónoma de Madrid.

Nuestra aportación a la estructura-función de esta simbiosis se ha dirigido al estudio de las características estructurales del nódulo y su funcionamiento fisiológico. Una de nuestras aportaciones más significativas se refiere al estudio de los mecanismos de regulación de O_2, dado el interés del control de su concentración en el proceso simbiótico. Mediante técnicas inmunocitoquímicas localizamos específicamente la leghemoglobina, de composición similar a la hemoglobina de la sangre en el citosol de las células infectadas (42). Esta proteína es mayoritaria en el nódulo y uno de los reguladores de O_2 más importantes. Transformándose en oxileghemoglobina transporta este elemento a los bacteroides para su respiración, manteniendo una atmósfera microaeróbica. Su presencia es imprescindible para el comienzo de la fijación de nitrógeno. También identificamos otro componente de la regulación de O_2 en los nódulos, la barrera mor-

fológica de resistencia a la difusión de O_2 en la corteza interna del nódulo (21) a nivel de sus componentes estructurales y localización de ciertas glicoproteínas que regulan su operación en condiciones de estrés de la planta (17, 20), resultando el lupino una planta adecuada para estos estudios.

Otras aportaciones de interés han ido dirigidas a conocer el papel de los plastidios en el desarrollo nodular mediante la localización de proteínas de hierro en estos orgánulos, como ferritina, cuyo contenido aumenta con la senescencia, regulando la concentración de hierro catalítico en las células infectadas y retrasando la senescencia nodular (22). Deseo también destacar por su importancia la localización del enzima nítrico óxido sintasa, identificada por vez primera en raíces de lupino en nuestro laboratorio (9).

También nuestro grupo ha sido pionero en la localización de alcaloides *in situ* en las semillas de varias especies de lupino, mediante la obtención y utilización de anticuerpos específicos tipo lupanina (36), en colaboración con el doctor Greirson del *Chemical Centre*, Perth (Australia).

ESTRATEGIAS BIOTECNOLÓGICAS

Los estudios de genética molecular sobre bacterias fijadoras de nitrógeno van dirigidos a obtener cepas más eficientes y competitivas, que sean buenas fijadoras de N_2. También es necesario que la planta huésped esté bien desarrollada para aportar suficiente energía para la realización del proceso simbiótico. Las condiciones óptimas de los dos simbiontes, planta y microorganismo, van a ser decisivas para lograr la máxima productividad y calidad de la legumbre.

Poco a poco las empresas del sector agrícola van interesándose por la producción de inoculantes de *Rhizobium* para transferir a la agricultura esta biotecnología.

Se investiga la obtención de cepas con genes capaces de reciclar el hidrógeno que se desprende en el proceso de la FBN, construyendo cepas con hidrogenasas oxidativas que reciclan el hidrógeno (genes *hup*), que se han caracterizado ya en *B. japonicum* y en *R. leguminosarum*, pero que todavía se enfrentan a diversos problemas,

siendo el profesor Ruiz Argüeso y su grupo, de la Universidad Politécnica de Madrid, laboratorio de referencia para estos estudios (39).

Además de los genes *hup* se han descrito también otros métodos que mejoran la efectividad de las cepas. Se han obtenido mutantes de *B. japonicum* por mutagénesis química, con capacidad superior a las cepas silvestres, o cepas de *R. leguminosarum,* resistentes a la acidez. La adición exógena de flavonoides a los inoculantes es otro de los procedimientos prometedores para aumentar la nodulación de los inoculantes comerciales.

La competitividad entre cepas representa un problema económico importante. Es primordial que la cepa de *Rhizobium* seleccionada sea efectiva, frente a las autóctonas, en condiciones de campo. Una de las estrategias actuales es construir leguminosas que restrinjan la nodulación de cepas nativas y permitan el establecimiento de las cepas inoculadas, o la utilización de cepas que produzcan antibióticos para inhibir la nodulación de las cepas nativas. Sin embargo una seria objeción al uso de esta estrategia reside en su impacto sobre las poblaciones microbianas de la *Rhizosfera,* ya que pueden inhibirse bacterias Gram (–) beneficiosas para el agrosistema.

Los mayores esfuerzos para potenciar la simbiosis se han centrado en las bacterias, pero la mejora de la simbiosis se obtendrá por la manipulación de la planta hospedadora. Por ello se hace necesario conocer la biología de las leguminosas a nivel básico, y elucidar los componentes genéticos de la planta que determinan la interacción. Estos avances han culminado el año 2002 con el clonaje posicional de genes de las leguminosas *Medicago* spp. *Lotus japonicus* y *Glycine max*, y es de esperar que a partir de ahora, un mayor número de investigadores hagan uso de herramientas genéticas y genómicas para profundizar en el proceso simbiótico.

Hasta aquí nos hemos referido a la simbiosis bacteria-planta. A continuación pasamos a hacer un breve resumen de la simbiosis hongo-planta o simbiosis micorrícica.

SIMBIOSIS MICORRÍCICA

La mayoría de las plantas presentan micorrizadas sus raíces. El hongo, una vez que alcanza la rizosfera, coloniza la corteza de la raíz y desarrolla un micelio externo que a modo de sistema radical complementario ayuda a la planta a adquirir nutrientes minerales y agua. Puede considerarse a estos hongos como los componentes metabólicamente más activos para la captación de nutrientes.

Las ectomicorrizas tienen un gran valor en el ámbito forestal, permitiendo el establecimiento de plantas leñosas en zonas degradadas. Aunque las plantas ectomicorrizadas ocupen solamente del 3 al 5% del total, dada la importancia de éstas en la masa de la producción arbórea, no pueden pasar desapercibidas, ya que constituyen los bosques que cubren la tierra, que corresponden a las familias Pinaceae, Fagaceae, Betulaceae, Salicaceae y Myrtaceae, así como muchos miembros de otras familias, como las Rosaceae, Leguminosae, Ericaceae, Junglaceae y otras. Estos hongos tiene un valor añadido en cuanto a la comercialización de sus carpóforos, comúnmente llamados setas en la industria de la alimentación. Algunas especies tienen interés en medicina como, por ejemplo: *Calocybe gambosa,* seta de San Jorge, con propiedades hipoglucémicas; *Lactarius deliciosus,* el apreciado níscalo, puede utilizarse como indicador de la función renal; *Coprinus atramentarius,* para combatir el alcoholismo, etc.

En suelos marginales, el potencial de micorrización suele disminuir drásticamente, e incluso desaparecer. Es conveniente micorrizar las plantas antes de ser transferidas a los suelos que se pretende remediar con inóculos de hongos que además incluyan otros organismos beneficiosos. En esta dirección nuestro laboratorio está realizando trabajos de establecimiento de plantas micorrizadas de *P. halepensis* en zonas degradadas del sudeste de la comunidad de Madrid, enriqueciendo estos suelos con micorrizas autóctonas, una vez que han sido identificadas, y con bacterias promotoras del crecimiento vegetal.

En los sistemas agrícolas la mayoría de las plantas forman simbiosis con micorrizas arbusculares (AM), que facilitan la absorción de agua y nutrientes, principalmente P y algunos micronutrientes. Estas simbiosis son mucho más ancestrales que la fijación de N_2 y

son características de la gran mayoría de plantas contemporáneas y biológica de otras ya desaparecidas. La hipótesis de una evolución coevolutiva de la tierra por plantas y hongos sugiere que el origen de las plantas terrestres ocurrió debido a una integración con hongos que les suministraban agua y nutrientes (10).

Dados los efectos de las micorrizas arbusculares y ectomicorrizas como biofertilizantes y como bioprotectores de los cultivos, su uso apropiado puede reducir la aplicación de fertilizantes y fitosanitarios. El laboratorio del profesor José Miguel Barea de la EEZ del CSIC en Granada, es grupo de referencia en la aplicación de las micorrizas arbusculares en la agricultura. Una de sus características más importantes consiste en que las plantas micorrizadas pueden superar situaciones de estrés, sobre todo en suelos degradados por la erosión, escasez de nutrientes, estrés hídrico, salinidad, suelos contaminados con metales pesados, escombreras, etc.

Es especialmente relevante su interés en fitoremediación. Inmovilizan los metales pesados en las hifas del hongo reduciendo su traslocación a la parte aérea de la planta y eliminando su paso a la cadena trófica. En la revegetación de antiguas zonas mineras, la micorrización permitio el crecimiento de plantas como *Andropogon gerardii* y *Festuca rubra*. También se ha observado su beneficio en suelos salinos incrementando la tolerancia de las plantas a la salinidad (1). Se han sugerido varios mecanismos para justificar este comportamiento, como inducción de cambios hormonales en la planta y mejora en la capacidad de captación de agua y nutrientes.

Aunque la micorrización aparece como una práctica atractiva, sin embargo, para lograr una verdadera eficacia es necesario identificar de antemano las micorrizas autóctonas de la zona de estudio, ya que se trata de enriquecer la rizosfera con algunos de los hongos indígenas que manifiestan una acción específica en el desarrollo y adaptación de la planta a esas condiciones ambientales.

La dificultad de las micorrizas arbusculares estriba en que ninguna de las cerca de 150 especies del orden *Glomales* ha podido ser cultivada en condiciones axénicas, por lo que no ha sido posible la preparación de inoculantes comerciales. A esto hay que añadir que se trata de simbiontes obligados, y para la obtención del inóculo se hace necesario utilizar una planta hospedadora. Por el contrario, la

inoculación con ectomicorrizas presenta ventajas experimentales, ya que estos hongos pueden ser cultivados *in vitro* a partir de esporas o de micelios crecidos en medios sólidos o líquidos.

SIMILITUD ENTRE NODULACIÓN Y MICORRIZACIÓN

En la simbiosis micorriza-planta, al igual que en la simbiosis «Rhizobium-leguminosa» se pone de manifiesto un intercambio de señales de reconocimiento y aceptación entre los simbiontes, mediado por la expresión de genes. Básicamente en el desarrollo de las micorrizas arbusculares se producen etapas similares a la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa: las hifas infectivas colonizan las células corticales y forman arbúsculos muy ramificados rodeados por membranas periarbusculares de origen vegetal. El contenido de RE y vesículas de Golgi también aumenta considerablemente para asegurar la síntesis de membranas periarbusculares (2), al igual que ocurre en la simbiosis con *Rhizobium* para la formación de la membrana peribacteroidal.

Por aceptar las leguminosas los dos tipos de simbiosis, se han utilizado mutantes de *Rhizobium* defectuosos en el desarrollo del nódulo para el estudio del control genético de las micorrizas. Este procedimiento ha conducido a la identificación de mutantes Nod^- y Myc^- (15). Las Myc^- han sido identificadas con las mutantes de guisante, en las cuales el canal de infección aborta en el interior de los pelos radiculares. Después de la inoculación con el *hongo,* estos mutantes forman micelios intercelulares, pero no llegan a formarse ramificaciones arbusculares.

La micorrización estimula la síntesis de proteínas *de novo, micorrizinas,* ausentes en plantas no inoculadas (2), algunas de ellas comunes en nódulos y micorrizas. Estos productos comunes incluyen algunas proteínas constitutivas de las membranas peribacteroidal y periarbuscular, algunas nodulinas tempranas (ENOD 2, NOD 11, ENOD 12 y ENOD 40) e incluso la leghemoglobina del nódulo, que también es sintetizada en las células colonizadas por arbúsculos.

Similitud entre nodulación y micorrización es también evidente por el hecho de que los factores *Nod* estimulan el desarrollo de los hongos micorrícicos (43). También los factores de defensa de la planta contra ambas infecciones son similares, originándose la sín-

tesis de componentes líticos que desarticulan la estabilidad de ambos microsimbiontes durante la infección.

Un rango de genes comunes han sido identificados para nódulos de leguminosas y micorrizas arbusculaes. Al menos parte del sistema genético de la planta que controla el desarrollo del nódulo fue originado durante la coevolucíón de las plantas arcaicas con los hongos micorrízicos (35). Estos genes ancestrales se han ido adaptando en las leguminosas durante la evolución de la nodulación. Esta preadaptación puede incluir la capacidad de las plantas para tolerar la presencia de bacterias en la corteza radical y formar compartimentos subcelulares simbióticos. En este contexto resulta altamente interesante la existencia de genes *nif* en hongos endomicorrízicos (30), (32). La naturaleza de estas preadaptaciones será probablemente clarificada mediante análisis moleculares comparativos, usando como planta modelo *Lotus japonicus* (27), cuyo genoma ha sido determinado.

El análisis de las micorrizas arbusculares y de los nódulos fijadores de N_2 sugiere que las plantas disponen de sistemas universales para controlar sus afinidades por los microorganismos que pueden ser mutualistas o antagonistas, dependiendo del simbionte, de las condiciones ambientales y de los caracteres genéticos del organismo. Estos sistemas reguladores fueron aparentemente muy importantes para la aparición en la tierra de las interacciones beneficiosas y han contribuido en gran medida al potencial adaptativo de las plantas terrestres (37).

Por último, permítanme ustedes una breve mención del papel de los microorganismos del suelo sobre el control biológico.

BIOCONTROL

La mayoría de las prácticas de control de enfermedades de plantas se ha basado, bien en la resistencia genética de la planta, al manejo de la planta en su medio ambiental y sobre todo al uso de pesticidas síntéticos. Pero se hace necesario crear alternativas a estos pesticidas corrientemente usados, ya que muchos de ellos no podrán utilizarse, bien debido a reglamentaciones sanitarias o al desarrollo de resistencias por parte de los patógenos del suelo.

El reto en este campo está en buscar nuevas soluciones que logren un control efectivo, minimizando las consecuencias negativas para la salud humana y el medio ambiente. El control biológico por microorganismos ofrece una poderosa alternativa al uso de compuestos fitosanitarios. La rica diversidad de microorganismos del suelo promete una fuente inagotable para este propósito. Se trata de que el incremento de un determinado microorganismo en la rizosfera permita suprimir una enfermedad concreta de la planta sin afectar al resto de los microorganimos de la comunidad rizosférica o a otros organismos del ecosistema.

Las rizobacterias Gram (–), como la *Pseudomonas fluorescens*, son de las más estudiadas, produciendo un amplio rango de metabolitos con capacidad antimicrobiana, confiriendo a la planta resistencia sistémica inducida, y produciendo sideroforos que secuestran el hierro en la rizosfera.

También las bacterias Gram (+) han resultado muy útiles en el control de enfermedades. Entre ellas merece destacarse el *B thuringensis,* que en los estadios de esporulación produce *endotoxinas,* dotadas de propiedades bioinsecticidas. El maíz Bt es un maíz que ha sido modificado genéticamente para protegerlo contra los insectos, plaga conocida como taladro (géneros *Ostrinia* y *Sesania)*, gracias a las proteínas del *B. thuringensis*.

Para lograr una mayor eficacia en su utilización es necesario investigar más a fondo estas interacciones para conocer sus mecanismos de acción, antagonismo con el patógeno y respuesta de la planta, y conseguir formulaciones adecuadas para su aplicación.

CONSIDERACIONES FINALES

El potencial de los microorganismos del suelo parece ilimitado. La naturaleza, en su sabiduría, ha creado las soluciones para resolver todos los problemas, que aseguren la permanencia de la vida sobre la Tierra sin alterar la armonía natural del Planeta.

Corresponde a la ciencia estudiar más profundamente el potencial de organismos autóctonos del suelo, que nos han sido dados gratuitamente, como el aire, el agua y la luz del sol. Con estas tecnologías se pretende, por un lado, que las plantas puedan autoabastecerse y auto-

defenderse en condiciones ambientales adversas, allí donde se desarrollen, y por otro cumplir con el deber moral de cuidar nuestro planeta y dejarlo en buen estado a las generaciones venideras.

Que las interacciones beneficiosas citadas sean cada vez más entendidas y puedan repercutir: en la mejor calidad de las cosechas y en el aumento de la productividad en países en desarrollo. Cerca de 190 millones de personas, un tercio de la población de África, son susceptibles de carecer definitivamente de alimentos. En este sentido, el reto de extender la simbiosis a plantas como maíz y arroz, cultivos básicos en países subdesarrollados, que dependen únicamente de estos monocultivos, es todavía una utopía, pero estamos seguros que dejaría de serlo si estamos convencidos que no habrá paz en el mundo si el desarrollo y el bienestar no llegan a todos los países de la Tierra, pues, «O hay futuro para todos, o no hay futuro».

BIBLIOGRAFÍA

(1) AZCON, R. y EL-ATRASH, F. (1997) Influence of arbuscular mycorrhizae and phosphorus fertilization on growth, nodulation and N_2 fixation in *Medicago sativa* at four salinity levels. *Biol. Fert. Soil.,24:* 81-86.

(2) BARKER, S.J.; TAGU, D. y DELP, G. (1998) Regulation of root and fungal morphogenesis in mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiol., 116:* 1201-1207.

(3) BOWEN, G.D. y ROVIRA, A.D. (1991) The Rhizosphere: The hidden half of the hidden half. In: «Plant Roots: The hidden half». (Y. Waisel A. Eshel and U. Kafkafi. eds.) pp. 641-669. Marcel Dekker, New York. 641-649.

(4) BOWEN, G.D. y ROVIRA, A.D. (1999) The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Advances in Agronomy. 66:* 1-102.

(5) BRAZIL, G.M.; KENEFICK, L.; CALLANAN, M.; HARO, A.; DE LORENZO, V.; DOWLING, D.N. y O'GARA, F. (1995) Construction of a Rhizosphe Pseudomonad with potential to degrade polychlorinated biphenyls and detection of *bpn* gene expression in the Rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology, 61 (5):* 1946-1952.

(6) BREWIN, N.J. (1998) Tissue and cell invasion by *Rhizobium*: the structure and development of infection threads and symbiosomes. In: The Rhizobiaceae (Spaink H., Kondorosi A. y Hooykaas P. J.J., eds.), pp. 417-429. Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publisher.

(7) BROUGHTON, W.J. y PERRET, X. (1999) Genealogy of legume-*Rhizobium* symbiosis. *Curr. Opin. Plant Biol., 2:* 305-311.

(8) CAETANO-ANOLLÉS, G., JOSHI, P. y GRESSHOFF, P.M. (1992) Nodulation in the absence of *Rhizobium*. In: Plant Biotechnology Development (Gresshoff P.M., ed.) pp. 61-70. Boca Raton, FL: CRC Press.

(9) Cueto, M.; Hernández, O.; Martín, R.; Ventura, M.L.; Rodrigo, J.; Lamas, S. y Golvano, M.P. (1996) Presence of Nitrico oxide synthase activity in roots and nodules of *Lupinus albus. FEBS Letters, 398*: 159-164.

(10) Douglas, A.E. (1994) Symbiotic Interactions. 148 pp. Oxford, New York, Toronto, Oxford University Press.

(11) Doyle, J.J. y Doyle, J.L. (1997) Phylogenetic perspectives on the origins and evolution of nodulation in the legumes and allies. In: Biological Fixation of Nitrogen for Ecology and Sustainable Agriculture (Legocki A., Bothe H. and Puhler A., eds.), NATO ASI Series G. Ecological Science, Vol. 39, pp. 307-312. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.

(12) De Faria, S.M.; Lewis, G.P.; Sprent, J.I. y Sutherland, J.M. (1989) Occurrence of nodulation in the leguminosae. *New Phytol., 111:* 607-6129.

(13) Foster, R.C. (1986) The ultraestructure of the rhizoplane and the rhizosphere. *Ann. Rev. Phytopath. 24:* 211-234.

(14) Foster, R.C.; Rovira, A.D. y Cock, T.W. (1983) Ultraestructure of the root-soil-interface, p. 157. The American Phytopathological Society, St Paul, MN.

(15) Gianinazzi-Pearson, V. (1996) Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: getting to the roots of the symbiosis. *Plant Cell, 8:* 1871-1883.

(16) Hirsch, A.M. y La Rue, T.A. (1997) Is the legume nodule a modified root or stem or an organ *«sui generis»? Crit. Rev. Plant Sci., 16:* 361-392.

(17) Iannetta, P.P.M.; De Lorenzo, C.; James, E.K.; Fernández Pascual, M.; Sprent, J.I.; Lucas, M.M.; Witty, J.F.; De Felipe, M.R. y Minchin, F.R. (1993) Oxygen diffusion in lupin nodules. I: visualization of diffussion barrier operation. *J. Exp. Bot., 44:* 1461-1467.

(18) Jenny, H. y Grossenbacher, K.A. (1963) Root soil boundary zone as seen in the electron microscope. *Soil Sci. Soc. Am. J., 27:* 273-277.

(19) Jurgensen, M.F. y Davey, C.B. (1971) Nonsymbiotic nitrogen-fixing microorganisms in forest and tundra soils. *Plant and Soil, 34:* 341-356.

(20) De Lorenzo, C.; Iannetta, P.P.M.; Fernández Pascual, M.; James, E.K.; Lucas, M.M.; Sprent, J.I.; Witty, J.F.; Minchin, F.R. y De Felipe, M.R. (1993) Oxygen diffusion in lupin nodules II: Mechanisms of diffussion barrier operation. *J. Exp. Bot., 4:* 1469-1474.

(21) De Lorenzo, C. (1992) Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Madrid. E.T.S.I. Agrónomos.

(22) Lucas, M.M.; Van de Sype, G.; Hérouart, D.; Hernández, M.J.; Puppo, A. y De Felipe, M.R. (1998) Inmunolocalization of ferritin in determinate and indeterminate legume root nodules. Protoplasma 204: 61-70.

(23) Kloepper, J.W.; Leong, J.; Schroth, M.N. y Teintz, M. (1980) Pseudomonas siderophoros: a mechanism explaining disease-suppressive soils. *Curr. Microbiol., 4:* 317-320.

(24) Kloepper, J.W.; Zablotowicz, R.M.; Tipping, EM. y Lifshitz, R. (1986) Emergence-promoting rhizobacteria: description and implication for agriculture. In: Swinburne TR ed. Iron, Siderofores and Plant Diseases. New York: Plenum Press, 155-164.

(25) Kloepper, J.W.; Tuzun, S. y Kuc, J.A. (1992) Proposed definitions related to induced disease resistance. *Biocontrol Sci. Technol., 2:* 349-351.

(26) KUBIENA, W. (1944) Suelo y formación del suelo desde el punto de vista biológico. Nuevas Gráficas. Madrid. 1944.

(27) LARSEN, K.; BORISOV, A.Y.; SANDAL, N.; MADSEN, L.K.; TSYGANOV, V.E.; VOROSHILOVA, V.A.; BATAGOV, A.O.; STOUGAARD, J. y TIKHONOVICH, I.A. (2001) The first example of a use of achievements in model legumes to clone symbiotic genes of traditional legumes identified by means of chemical mutagenesis. Pea (*Pisum sativum* L.) gene *Sym* 35 is likely homologous to the gene *Nin* of *Lotus japonicus*. In: Abstracts of the 13th International Congress on Nitrogen Fixation. Hamilton. Canada. pp. 101.

(28) MARTÍNEZ ABARCA, F.; HERRERA-CERVERA, J.A.; BUENO, P.; SANJUÁN, J.; BISSELING, T. y OLIVARES, J. (1998) Involvement of salicylic acid in the establishment of the *Rhizobium* meliloti-alfalfa symbiosis. *MPMI.* 11(2): 153-155.

(29) MATHESIUS, U.; SCHLAMAN, H.R.M.; SPAINK, H.P.; SAUTER, C.; ROLFE, B.G. y DJORDJEVIC, M.A. (1998) Auxin transport inhibition precedes root nodule formation on white clover roots and is regulated by flavonoids and derivatives of chitin oligosaccharides. *Plant J., 14:* 23-34.

(30) MINERDI, D.; FANI, R.; GALLO, R.; BOARINO, A. y BONFANTE, P. (2001) Nitrogen fixation genes in an endosymbiotic *Burkholderia* strain. *Appl. Environ. Microbiol., 67:* 725-732.

(31) MOLINA, J.A.E.; CLAPP, C.E.; LINDEN, D.R.; ALLMARAS, R.R.; LAYESE, M.F.; DOWDY, R.H. y CHENG, R.H. (2001) Modeling the incorporation of corn (*Zea mays* L.) carbon from roots and rhizodeposition into soil organic matter. *Soil Biol. Biochem., 33:* 83-93.

(32) MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B. y BOIVIN-MASSON, C. (2001) Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. *Nature, 411*: 948-950.

(33) NIEHAUS, K.; ALBUS, U.; BAIER, R.; SCHIENE, K.; SCHROEDER, S. y PUHLER, A. (1998) Symbiotic suppression of the *Medicago sativa* plant defence system by *Rhizobium meliloti* oligosaccharides. In: Biological Nitrogen Fixation for 21th century (Elmerich, C.; Kondorosi, A. y Newton, W., eds.) pp. 225-226. Dordrecht, Boston, London: Kluwer. Academic Publishers.

(34) PAUL, A. y CLARK, F.E. (1989) Occurrences and distribution of soil organics. In: Soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press, San Diego, 81-84.

(35) PARNISKE, M. (2000) Intracellular accomodation of microbes by plants: a common developmental program for symbiosis and disease? *Curr. Opin. Plant Biol., 3:* 320-328.

(36) POZUELO, J.M.; LUCAS, M.M.; DE LORENZO, C.; FERNÁNDEZ PASCUAL, M.; MALDONADO, S. y DE FELIPE, M.R. (2001) Inmunolocalization of alkaloids and X-Ray microanalysis of elements in lupin seeds. *Protoplasma, 218*, 104-111.

(37) PROVOROV, N.A.; BORISOV, A.Y.; TIKHONOVICH, I.A. (2002) Developmental genetics and evolution of symbiotic structures in nitrogen-fixing nodules and arbuscular mycorrhiza. *J. Theor. Biol., 214:* 215-232.

(38) ROVIRA, A.D. (1956) Plant root excretions in relation to the rizosphere effect. I. The nature of root exudate from oats and peas. *Plant and Soil, 7:* 178-194.

(39) RUIZ-ARGÜESO, T.; PALACIOS, J.M.; IMPERIAL, S. (2000) Uptake hydrogenases in root nodule bacteria. In: E. Triplett (ed.): «Prokaryotic Nitrogen Fixation:

A model system for the analysis of a biological process». Horizon Scientific Press, Wymondham, U.K.

(40) Sevillano, F. y Rodríguez Barrueco, C. (1987) Sistemas simbióticos fijadores de nitrógeno de interés aplicado en agricultura. En: Avances en la biología de la fijación de nitrógeno atmosférico. Eds: M. Megías y I. Ruiz, pp. 9-29. Universidad de Sevilla. Jurgensen y Davey. 1970.

(41) Vasse J.; De Billy F. y Truchet G. (1993) Abortion of infection during *Rhizobium* meliloti-alfalfa symbiotic interaction is acompanied by a hypersensitive reaction. *Plant J., 4*, 555-566.

(42) Vivo, A.; Andreu, J.M.; De la Viña, S.; De Felipe, M.R. (1989) Inmunogold localization of leghmoglobin in plants of *Lupinus albus* L. cv Multolupa. *Plant Physiology, 90:* 452-457.

(43) Xie, Z.P.; Muller, J.; Wiemken, A.; Broughton, W.J. y Boller, T. (1997) Nod factors and Tri-iodobenzoic acid stimulate mycorrhizal colonization and affect carbohydrate partitioning in mycorrhizal roots of *Lablab purpurus*. *New Phytol., 139:* 361-366.