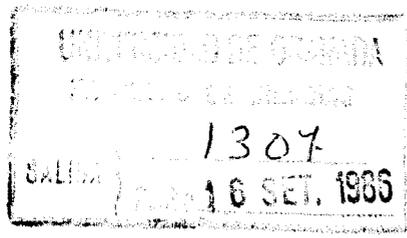


4/134

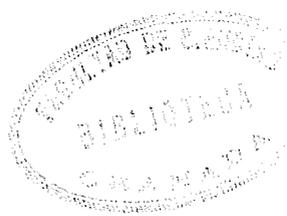
R. 32.545

FACULTAD DE CIENCIAS



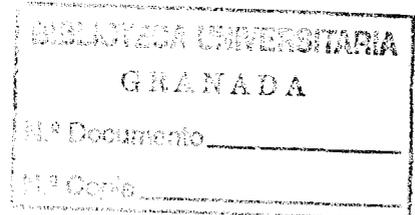
"ESTUDIOS FISIOLÓGICOS Y GENÉTICOS DE ESTIRPES DE  
RHIZOBIUM MELILOTI CON VISTAS A LA  
 PRODUCCION DE INOCULANTES"

Dulce N. Rodríguez Navarro



UNIVERSIDAD DE GRANADA

1986



"ESTUDIOS FISIOLÓGICOS Y GENÉTICOS DE ESTIRPES DE  
RHIZOBIUM MELILOTI CON VISTAS A LA  
PRODUCCION DE INOCULANTES"

MEMORIA presentada para aspirar al  
grado de Doctor en Ciencias por la  
Licenciada D<sup>a</sup>. Dulce N. Rodríguez  
Navarro.

*J. Casadesús*

Prof. Dr. D. Josep Casadesús Pursals

Director de la Tesis

*Antonio J. Palomares*

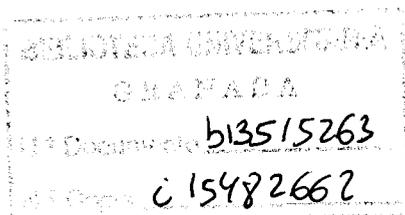
Prof. Dr. D. Antonio J. Palomares Díaz

Co-director de la Tesis

*Dulce N. Rodríguez*

Dulce Nombre Rodríguez Navarro

Aspirante al grado de Doctor en Ciencias



Granada, Junio de 1986.

Esta Tesis Doctoral fue leída el 12 de Julio de 1986 en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, siendo los miembros del Tribunal:

Presidente: Prof. D. Enrique Montoya Gómez

Vocales: Prof. D. José Olivares Pascual

Prof. D<sup>a</sup> Carmen Lluch Plá

Prof. D. José E. Ruiz Saiz

Secretario: Prof. D. Manuel Mejías Guijo

Obtuvo la calificación de Apto "cum laude".

Mi agradecimiento

Al Servicio de Investigación Agraria, de la Dirección General de Investigación y Extensión Agrarias de la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía, por las facilidades otorgadas para la realización de esta Tesis en las instalaciones de la Finca Experimental "La Rinconada", S. José de La Rinconada (Sevilla). Así como por la ayuda económica prestada durante la realización de este trabajo de investigación.

Mi más sincero y especial agradecimiento a los Directores de esta Tesis, Prof. Dr. Josep Casadesús Pursals, Profesor Titular de Genética de la Facultad de Biológicas de la Universidad de Sevilla y, al Prof. Dr. Antonio Palomares Díaz, Profesor Adjunto de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla. Por su constante ayuda y orientación, haciendo realidad este trabajo.

Mi agradecimiento lo hago extensivo a D. Francisco Temprano Vera, Jefe de Equipo y a D. Rafael Orive Echevarrieta, Jefe de Proyectos del Servicio de Investigación Agraria. En ambos su sincera amistad y capacidad profesional, han significado una ayuda insustituible en la realización de la presente Memoria.

Igualmente quiero dar las gracias a mis compañeros, personal técnico y auxiliar, de la Finca Experimental "La Rinconada" por su comprensión y la asistencia prestada.

Mi agradecimiento al Dr. Eduardo O. Leidi, por su inestimable ayuda en la tarea de mecanografiar, labor fotográfica y constante apoyo durante la realización de esta Tesis. A todos ellos mi sincero agradecimiento.

El presente trabajo ha sido realizado en los laboratorios e instalaciones de la Finca Experimental "La Rinconada", S. José de La Rinconada (Sevilla), del Servicio de Investigación Agraria, Dirección General de Investigación y Extensión Agrarias, Junta de Andalucía.

Ha sido suvencionado por los siguientes organismos:

- Instituto Nacional de Asistencia y Promoción del Estudiante
- Comisión Asesora Científica y Técnica
- Dirección General de Investigación y Extensión Agrarias de la Junta de Andalucía

A mi madre.

INDICE

	<u>Pag.</u>
OBJETO DEL TRABAJO	11
INTRODUCCION	14
Algunas consideraciones energéticas	24
Costo de la fijación biológica de nitrógeno	26
Fisiología y metabolismo de <u>Rhizobium</u> en cultivo	32
1. Fuentes de carbono	32
2. Fuentes de nitrógeno	35
3. Vitaminas	37
4. Requerimientos nutritivos y adaptación ecológica	37
Polisacáridos extracelulares bacterianos	39
Funciones de los polisacáridos extracelulares	40
1. Almacenamiento y reserva	40
2. Virulencia	40
3. Protección frente a depredadores	41
4. Protección frente a la desecación	42
5. Papel del exopolisacárido en las interacciones iónicas	43
6. Papel del exopolisacárido en la fijación de N <sub>2</sub>	43
Polisacáridos extracelulares de <u>Rhizobium</u>	44
1. Exopolisacáridos	44
2. Lipopolisacáridos	48
3. Glucanos	49
Reconocimiento y especificidad en la asociación <u>Rhizobium</u> -leguminosa	52
Papel del polisacárido extracelular "ex-planta"	
Inoculantes	56
Producción de inoculantes	58
1. Selección de las estirpes de <u>Rhizobium</u>	58
2. Estabilidad genética	63
3. Obtención de caldos de cultivo	64
4. Soportes para inoculantes	65
Inoculantes a base de turba	67
1. Preparación de la turba	67
1.1. Desecación	67

1.2. Neutralización	68
1.3. Esterilización	68
1.3.1. Calor húmedo	69
1.3.2. Irradiación gamma	69
1.3.3. Esterilización química	69
1.4. Envasado	70
Control de calidad	70
1. Control del caldo de cultivo	71
2. Control del inoculante	71
Métodos de inoculación	72
 MATERIAL Y METODOS	 74
Microorganismos	75
Plantas	75
Bacteriófagos	75
Medios de cultivo	76
Medio triptona-extracto de levadura	78
Medios selectivos	78
Solución nutritiva para plantas	78
Aislamiento de estirpes de <u>R.meliloti</u> a partir de nódulos	79
Obtención de mutantes de <u>R.meliloti</u> alterados en la síntesis de polisacárido extracelular. Mutagénesis con nitrosoguanidina	80
Selección de mutantes espontáneos resistentes a antibióticos	80
Enriquecimiento de las suspensiones de fagos	81
Titulación de las suspensiones de fagos	82
Fagotipado de estirpes de <u>R.meliloti</u>	82
Curvas de crecimiento	82
Utilización de diversas fuentes de carbono y nitrógeno	83
Producción de polisacárido extracelular por estirpes de <u>R.meliloti</u>	83
Análisis cualitativo de los polisacáridos extracelula- res	84
Cultivo aséptico de plantas	84
Esterilización y germinación de semillas	84

Cultivo hidropónico	85
Cultivo en vermiculita	85
Cultivo en agar	85
Cultivo en "jarros-botella" de Leonard	85
Determinación del grado de infectividad	86
Determinación del coeficiente de competitividad	87
Estudios de adhesividad	87
Medidas de la efectividad en la fijación de N <sub>2</sub>	88
1. Peso seco	88
2. Nitrógeno total	88
3. Reducción de acetileno a etileno	88
Preparación de inoculantes a base de turba	89
Medio de cultivo	89
Soporte	89
Supervivencia de estirpes de <u>R.meliloti</u> en inoculan tes adicionados de polisacárido extracelular	90
Curvas de sensibilidad a la radiación ultravioleta	91
Determinación de la susceptibilidad a la desecación	91
Métodos estadísticos	91
RESULTADOS Y DISCUSION	92
Utilización de fuentes de carbono por estirpes de <u>Rhizobium meliloti</u>	93
Efecto de la concentración de sacarosa sobre el cre cimiento de estirpes de <u>Rhizobium meliloti</u>	96
Utilización de diversas fuentes de nitrógeno por estirpes de <u>Rhizobium meliloti</u>	96
Efecto de la concentración de nitrato potásico sobre el crecimiento de estirpes de <u>Rhizobium meliloti</u>	98
Efecto de la concentración de biotina y de distintas fuentes de nitrógeno sobre el crecimiento de estir- pes de <u>R.meliloti</u>	101
Determinación del crecimiento de estirpes de <u>Rhizobium meliloti</u> en dos medios de cultivo	103
Aislamiento de mutantes alterados en la producción de polisacárido extracelular	107

Análisis de la producción de polisacárido extracelular por mutantes de <u>Rhizobium meliloti</u> alterados en la morfología colonial	110
Fagotipo de mutantes de <u>Rhizobium meliloti</u> alterados en la producción de polisacárido extracelular	118
Detección de actividad de despolimerasas de polisacárido inducidas por fagos	121
Sensibilidad de mutantes Exo <sup>C</sup> a la radiación ultravioleta	124
Características simbióticas de los mutantes de <u>Rhizobium meliloti</u> alterados en la producción de polisacárido extracelular	126
Determinación del coeficiente de competitividad de mutantes Exo <sup>C</sup> , Exo <sup>-</sup> y "compactos" de <u>Rhizobium meliloti</u>	130
Determinación del grado de infectividad de mutantes Exo <sup>C</sup> , Exo <sup>-</sup> y "compactos" de <u>Rhizobium meliloti</u>	132
Estudios de adhesividad a las raíces de <u>M.sativa</u> y competitividad entre mutantes de <u>R.meliloti</u> alterados en la producción de polisacárido extracelular	134
Estudios de supervivencia de estirpes de <u>R.meliloti</u> en turba	140
Mantenimiento de las características simbióticas de la estirpe JC4004 de <u>R.meliloti</u> en inoculantes a base de turba	140
Correlación entre el número de rizobios viables y los parámetros simbióticos (Nº de nódulos) y fisiológicos (peso seco de la parte aérea)	142
Supervivencia en turba de estirpes Exo <sup>-</sup> y Exo <sup>C</sup> de <u>R.meliloti</u>	144
Inoculantes preparados con distinto contenido de polisacárido extracelular	147
Efecto de la producción de PSE sobre la resistencia a la desecación	150
Estudio de la eficiencia simbiótica de estirpes de <u>R.meliloti</u> con varias especies y ecotipos de <u>Medicago</u>	152
CONCLUSIONES	164
BIBLIOGRAFIA	166

## ABREVIATURAS Y SIMBOLOS USADOS EN ESTA MEMORIA

Con A, Concanavalina: lectina de Canavalia ensiformis

D.O., Densidad óptica

EPS o PSE, Exopolisacárido o polisacárido extracelular

E.T.S.I.A., Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos

Exo<sup>C</sup>, Mutantes superproductores de exopolisacárido

Exo<sup>-</sup>, Mutantes no productores de exopolisacárido (rugosos)

FBN, Fijación Biológica de Nitrógeno

Fd<sub>red</sub>, Ferredoxina reducida

Fd<sub>ox</sub>, Ferredoxina oxidada

FITC-Con A, Tioisocianato de fluoresceína-Concanavalina

FITC-SBL, Tioisocianato de fluoresceína-lectina de soja

Fix<sup>+</sup>, Fenotipo fijador

Fix<sup>-</sup>, Fenotipo no fijador

Fla<sup>-</sup>, Fenotipo no flagelado

GDH, Glutamato deshidrogenasa

GS/GOGAT, Glutamina sintetasa/Glutamato sintasa

Ha, Hectárea

HPLC, Cromatografía líquida de alta resolución

Hup<sup>+</sup>, Fenotipo hidrogenasa positivo

Hup<sup>-</sup>, Fenotipo hidrogenasa negativo

KDO, Acido 3-desoxi-D-manoctulosónico

LPS, Lipopolisacárido

M<sup>+</sup>, Fenotipo multiplicador de fagos

M<sup>-</sup>, Fenotipo no multiplicador de fagos

MDS, Mínima diferencia significativa

Mot<sup>-</sup>, Fenotipo no móvil

PSC, Polisacárido capsular

Qm, Quintal métrico (100 Kilogramos)

Rif, Rifampicina

SBL, Lectina de soja

Str, Estreptomicina

Tc, Tetraciclina

Tm, Tonelada métrica (1000 Kilogramos)

u.f.c., Unidad formadora de colonia

OBJETO DEL TRABAJO

Esta Memoria describe una serie de investigaciones cuyo fin último es el diseño de estirpes y condiciones óptimas para la fabricación de inoculantes para leguminosas. Los objetivos concretos que se han abordado son los siguientes:

1. Diseño de un medio de cultivo que, ajustándose a los requerimientos nutritivos de Rhizobium meliloti, sea lo más económico posible. Téngase en cuenta que pequeñas diferencias en el precio de los productos empleados, diferencias que serían irrelevantes en un laboratorio de investigación, adquieren importancia a escala industrial y obviamente repercuten en el precio de venta.

2. Aislamiento de mutantes de R.meliloti alterados en la producción de polisacárido extracelular. En la literatura existen numerosos datos que sugieren que los polisacáridos extracelulares de Rhizobium participan en el establecimiento de la simbiosis. Por tanto sería interesante determinar cuáles son las características óptimas de composición y nivel de producción de polisacárido, con el fin de diseñar estirpes de infectividad máxima. Pero además, de cara a la utilización de esas estirpes para la fabricación de inoculantes a escala industrial, hay que asegurarse de que la introducción de mutaciones beneficiosas no afecta a la capacidad de supervivencia en el soporte (téngase en cuenta que los inoculantes son almacenados durante semanas o meses, antes de ser utilizados). De ahí que en esta Memoria se hayan incluido estudios de supervivencia de las estirpes elegidas como óptimas.

3. Estudio de interacciones entre estirpes bacterianas y ecotipos y/o variedades de leguminosas huésped. Aunque una determinada especie de Rhizobium sea capaz de infectar una gran variedad de plantas (que definen su "grupo de inoculación"), puede haber diferencias en la eficiencia simbiótica a causa de fenómenos de adaptación (ej. selección de genotipos bacterianos óptimos por la leguminosa huésped). Con esta filosofía, se puede abordar el estudio de la eficiencia simbiótica de diferentes estirpes de R.meliloti frente a distintas leguminosas-huésped, con el fin de determinar qué estir-

pes son más apropiadas para un determinado cultivar o ecotipo.

INTRODUCCION

El ritmo actual de crecimiento de la población mundial se ha estimado en un 2,7% anual en los países en vías de desarrollo y en un 0,9% en los países desarrollados; ello significa que en el próximo siglo, si continúa la misma tasa de crecimiento, la población mundial será de 11.000 millones de habitantes. En contraste, la tasa de producción de alimentos crece a un ritmo anual del 3%, de modo que sería deseable duplicar o incluso triplicar los actuales rendimientos agrícolas para satisfacer los requerimientos de una población creciente. Si tenemos en cuenta que más del 70% de las proteínas necesarias son de origen vegetal, principalmente de leguminosas y cereales, y que la producción animal requiere forrajes, grano y/o leguminosas, es obvio que habrá que incrementar los rendimientos de estas fuentes de proteína mientras que otras fuentes naturales o sintéticas no estén disponibles a gran escala.

El aumento de la productividad agrícola en los últimos 25 años ha estado estrechamente relacionado con las innovaciones tecnológicas, el uso de pesticidas y con la introducción de variedades mejoradas, fundamentalmente de arroz, trigo,

cebada y maíz. En los ambientes naturales existe un delicado equilibrio entre la tasa de crecimiento vegetal y el aporte de nitrógeno. La velocidad de acumulación de este elemento, a través de la fijación de  $N_2$  y los procesos de amonificación y nitrificación, junto con las pérdidas por lixiviación y desnitrificación, determinan la cantidad de N disponible en el suelo. Pero bajo condiciones de cultivo intensivo, el N orgánico (fijado en el material vegetal) es retirado en cada cosecha y no se recicla. Por esta razón los sistemas agrícolas son altamente dependientes de la aplicación de fertilizantes nitrogenados, que hasta ahora han sido una fuente de N apropiada y económica.

Se ha estimado que el volumen de N que anualmente se reretira del suelo como consecuencia de la actividad agrícola es de  $140 \times 10^6$  Tm/año. Puesto que la aplicación de fertilizantes nitrogenados es de  $25-60 \times 10^6$  Tm/año, de las cuales se aprovechan menos del 50%, la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) y el estercolado deben aportar del orden de 100 millones de Tm de N/año.

Como ilustración de lo que decimos, puede observarse en la Figura 1 la evolución del consumo de fertilizantes en España durante las dos últimas décadas. Se observa una tendencia a aumentar el uso de fertilizantes nitrogenados, mientras que para el mismo período el de fosforados y potásicos permanece constante. Los gastos económicos derivados del empleo de estos productos se han elevado desde 10.690 millones de pesetas en 1965 a 107.076 millones en 1983. Los costes de productos fitosanitarios han evolucionado desde 2.170 a 25.910 millones de pesetas y los de Energía (Electricidad más Carburantes) se han multiplicado por 25, según los datos recogidos en el Anuario de Estadística Agraria de 1983. Hay que añadir el impacto ambiental, no fácilmente estimable, derivado de la síntesis industrial y utilización irracional de fertilizantes.

Hoy por hoy, la fuente principal de proteínas para consumo humano y animal procede de las leguminosas y cereales.

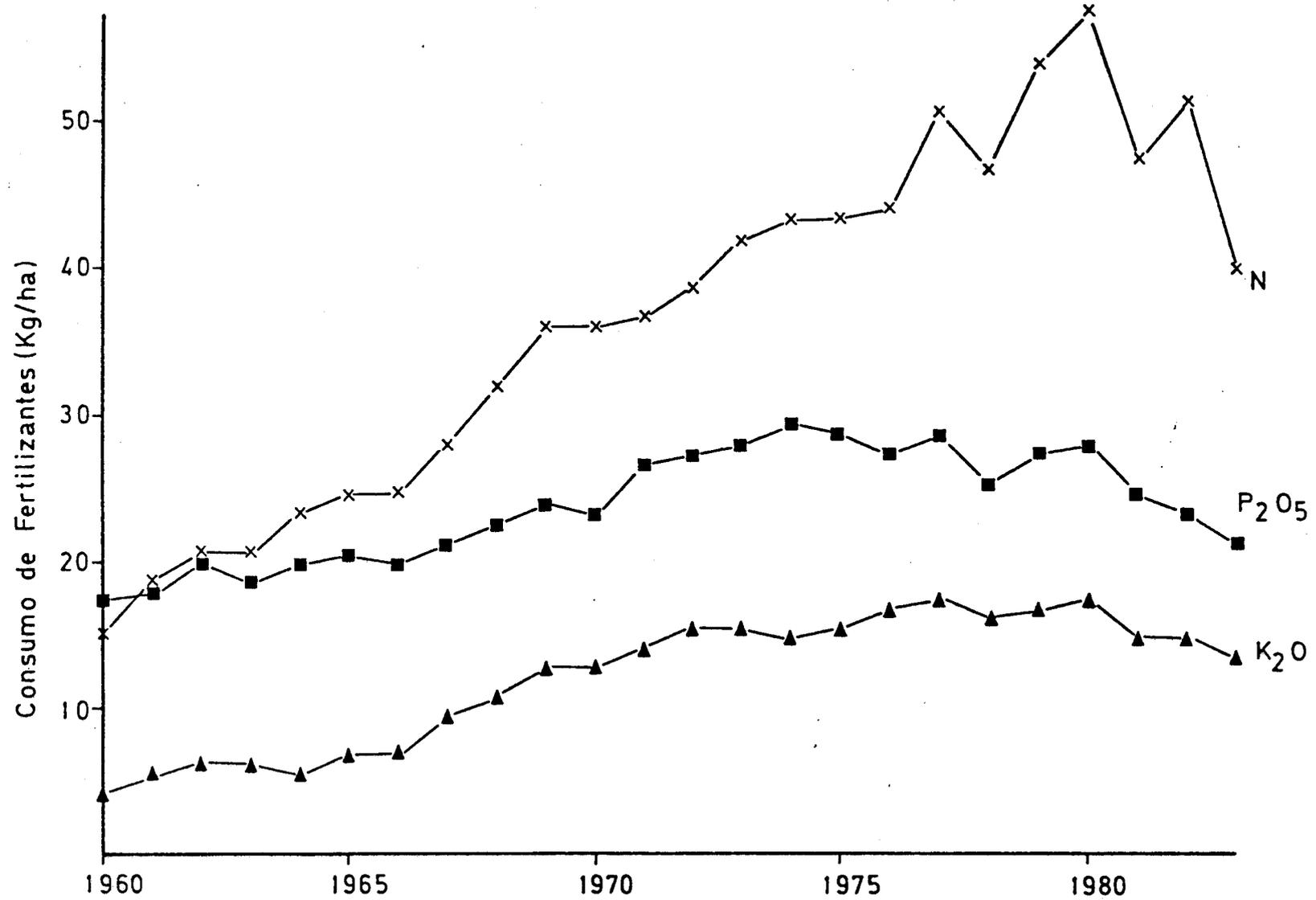


Figura 1.

Evolución del consumo de fertilizantes en España.

Mientras los programas de mejora vegetal han afectado de forma positiva a los últimos, las leguminosas, con mayor contenido en proteínas (la mayoría sobrepasa el 20% en sus semillas), se siguen cultivando de forma tradicional y con cultivos poco seleccionados. Las únicas excepciones son la soja y el cacahuete, que han sido objeto de una extraordinaria labor de selección para incrementar la proporción de grasa. Conviene recordar aquí que en los cereales existe un equilibrio (correlación negativa) entre producción y contenido en proteínas, que no ocurre en las leguminosas (salvo en soja). Ello permitiría una selección que elevara el contenido proteico sin que la producción se viera afectada (de Haro, 1983).

La mayor atención prestada a los cereales queda parcialmente reflejada en la Figura 2, donde se comparan los datos históricos de superficie y rendimiento del cultivo de trigo frente a los de leguminosas de grano, excluida la soja. En el mejor período, al principio de la década de los sesenta, la superficie total destinada a leguminosas grano (judías secas, habas secas, lentejas, garbanzos, guisantes secos, veza, almortas, altramuz, algarrobas y yeros) era una cuarta parte de la dedicada a trigo. Por otro lado, los rendimientos de trigo en las últimas décadas se han duplicado, mientras que los de las leguminosas de grano se han mantenido prácticamente constantes desde los años setenta. Igual comentario podría hacerse con respecto al maíz.

En España el cultivo de la soja se introdujo en la década de los 70; la máxima superficie dedicada ha sido 24.752 hectáreas (en 1974), y desde entonces el cultivo está en franca regresión: 1.062 Ha en el año 1983. Ese mismo año se importaron casi 3 millones de Tm de grano por un valor superior a las exportaciones de cítricos y aceite de oliva juntos. En muchas ocasiones se ha dicho que las importaciones de soja y maíz bastan para hacer deficitaria a nuestra balanza agrícola. Obviamente no se ve la posibilidad de suprimirlas a corto o medio plazo, pero sí de compensarlas en parte con el cultivo de leguminosas de grano, incluyendo la soja en aque-

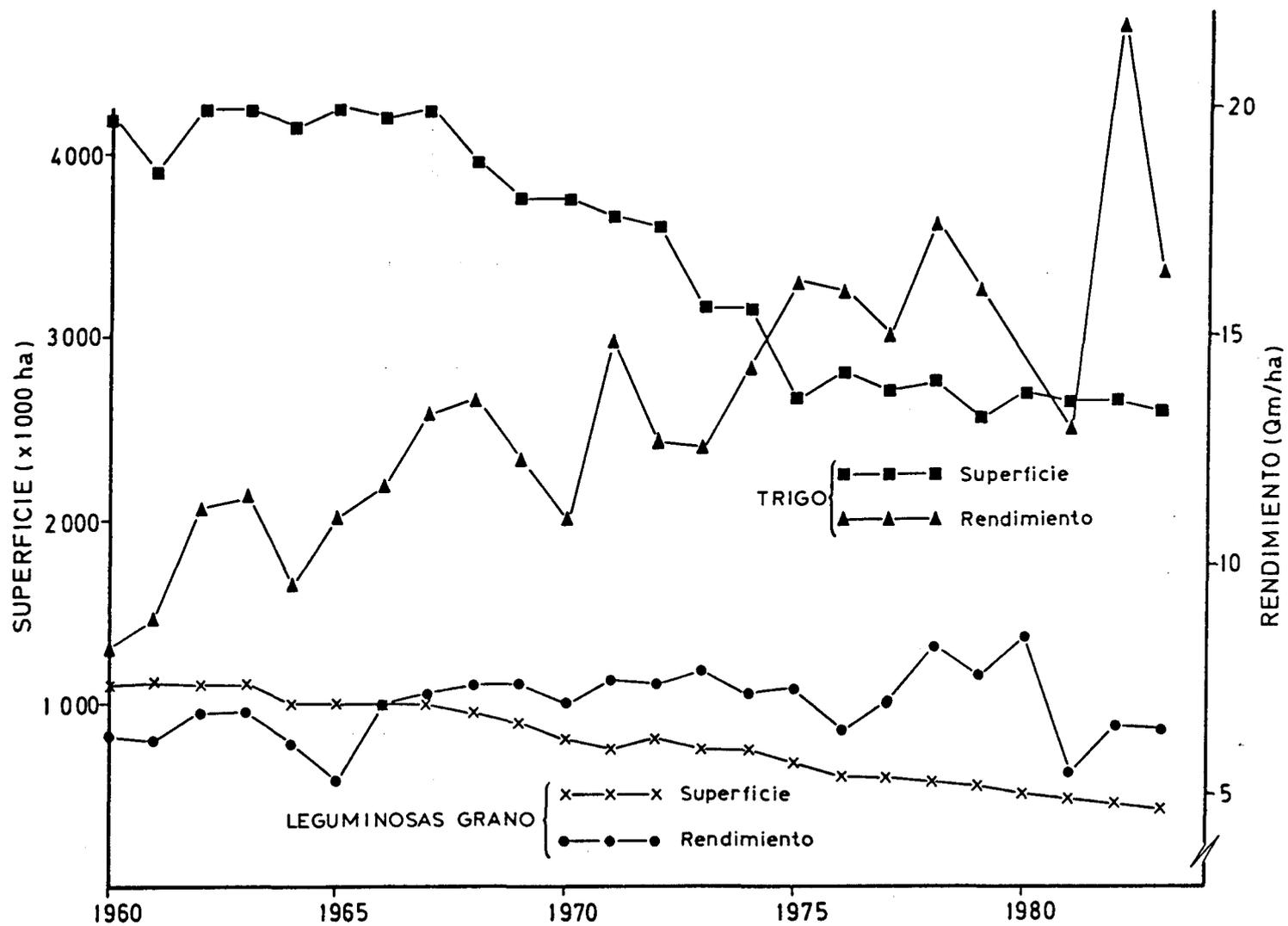


Figura 2.

Superficie sembrada y rendimiento de los cultivos de trigo y leguminosas grano en España.

llas zonas donde se demuestre su conveniencia. Otras posibles vías de actuación suponen: mejora de la relación calidad-precio de las leguminosas, para que ofrezcan al agricultor una interesante alternativa de cultivo desde el punto de vista económico; racionalización de la rotación de cultivos, con una mayor presencia de las leguminosas, lo que conllevaría un aumento de la fertilidad del suelo.

El aporte real de N por parte de las leguminosas se ha cuestionado en repetidas ocasiones, dado que la mayor parte del N fijado se acumula en el grano. Sin embargo, existen indicios de una contribución real en la alternancia "leguminosa-cereal"; según los resultados de Schroder y Hinson (1975), el cultivo de soja contribuyó con 20 Kg N/Ha al siguiente cultivo de centeno. En otro ensayo similar de rotación de cultivos, se comprobó que el beneficio del altramuz (Lupinus angustifolius) al cultivo posterior de trigo fue equivalente a 80 Kg N/Ha (Herridge, 1982).

Por último, para paliar en parte nuestra fuerte dependencia de importación de proteínas y a su vez potenciar la utilización de leguminosas de grano autóctonas, sería conveniente adecuar la formulación de los piensos preparados a base de grano. Ello es posible desde el punto de vista técnico, en particular con las habas; otras (altramuz) tienen problemas de tóxicos que podrían solventarse con la utilización de variedades adecuadas ("dulces") o con un proceso industrial de destoxificación (Moreno, 1983).

Otra partida importante de alimento para la producción animal la constituyen los forrajes. La superficie (cosechada) destinada al cultivo de alfalfa y a praderas polifitas se ha duplicado desde el año 1960 hasta principios de la década de los ochenta (Figuras 3 y 4). En este período los rendimientos se han incrementado en un 10 y un 20% respectivamente; sin embargo, en los últimos años se han estabilizado. En el caso del trébol no sólo puede observarse una paulatina disminución de la superficie, sino también de los rendimientos (Figura 5).

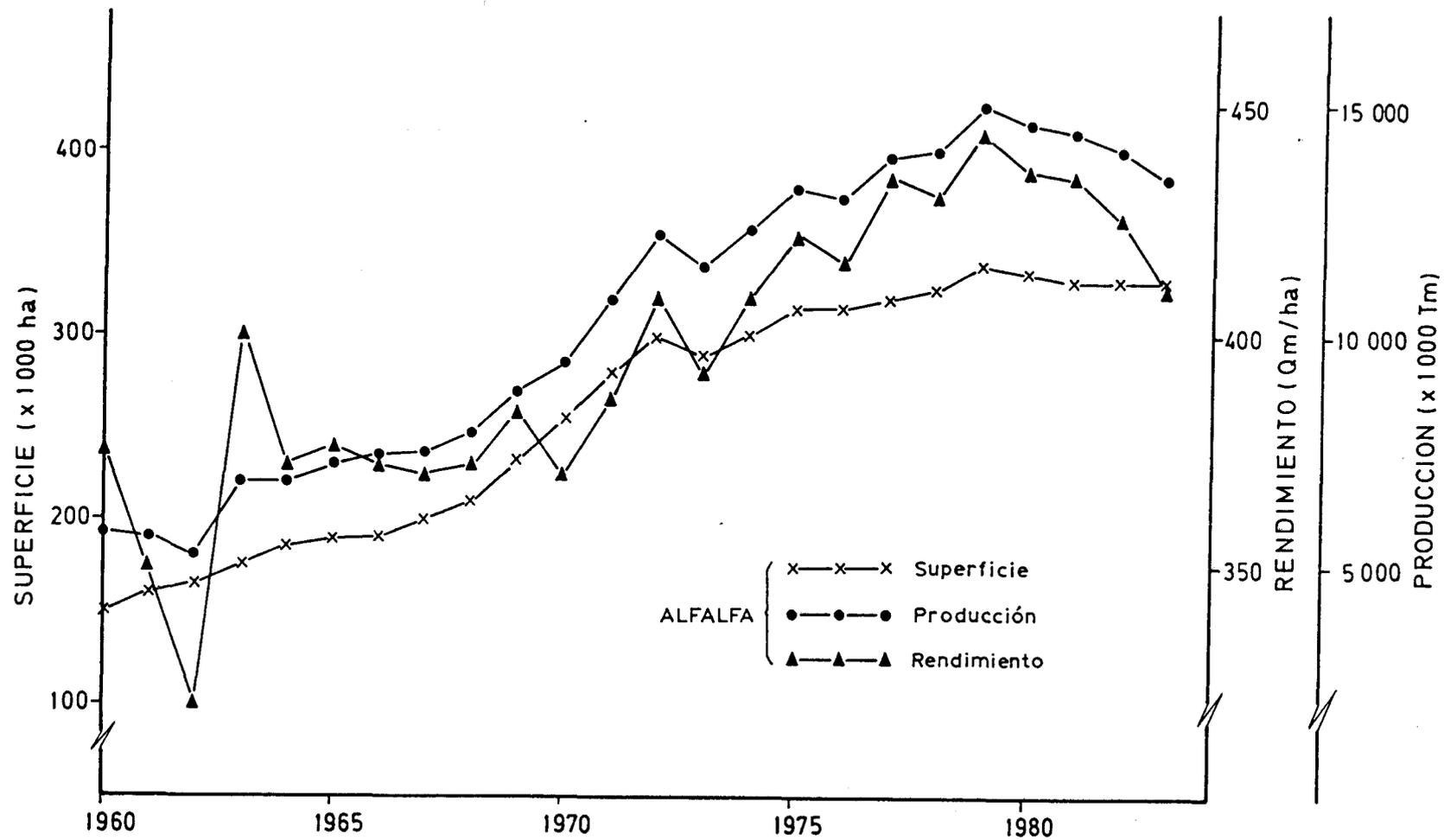


Figura 3.

Evolución de la superficie, producción y rendimiento del cultivo de alfalfa en España.

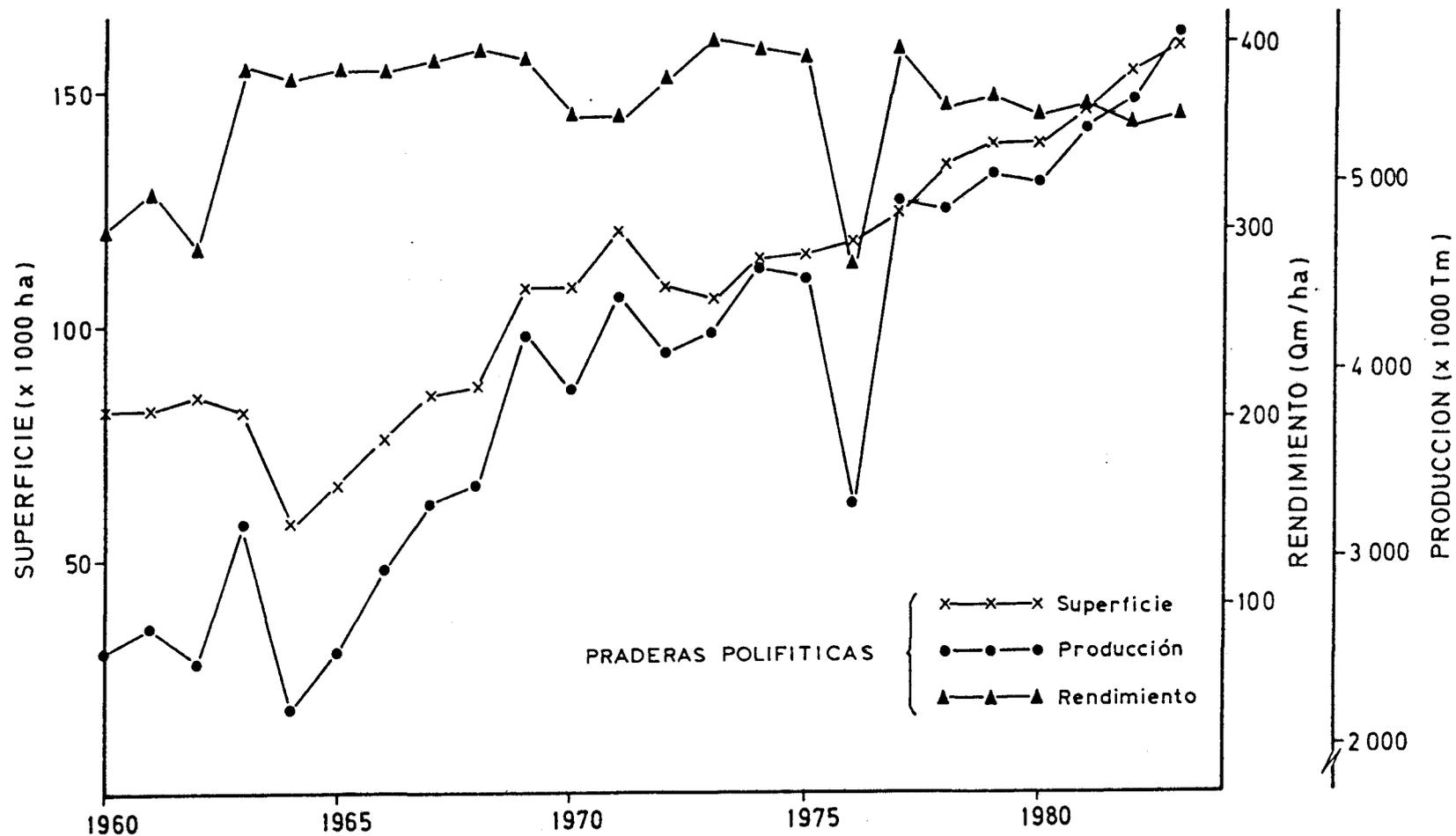


Figura 4.

Evolución de la superficie sembrada, producción y rendimiento de praderas polifíticas en España.

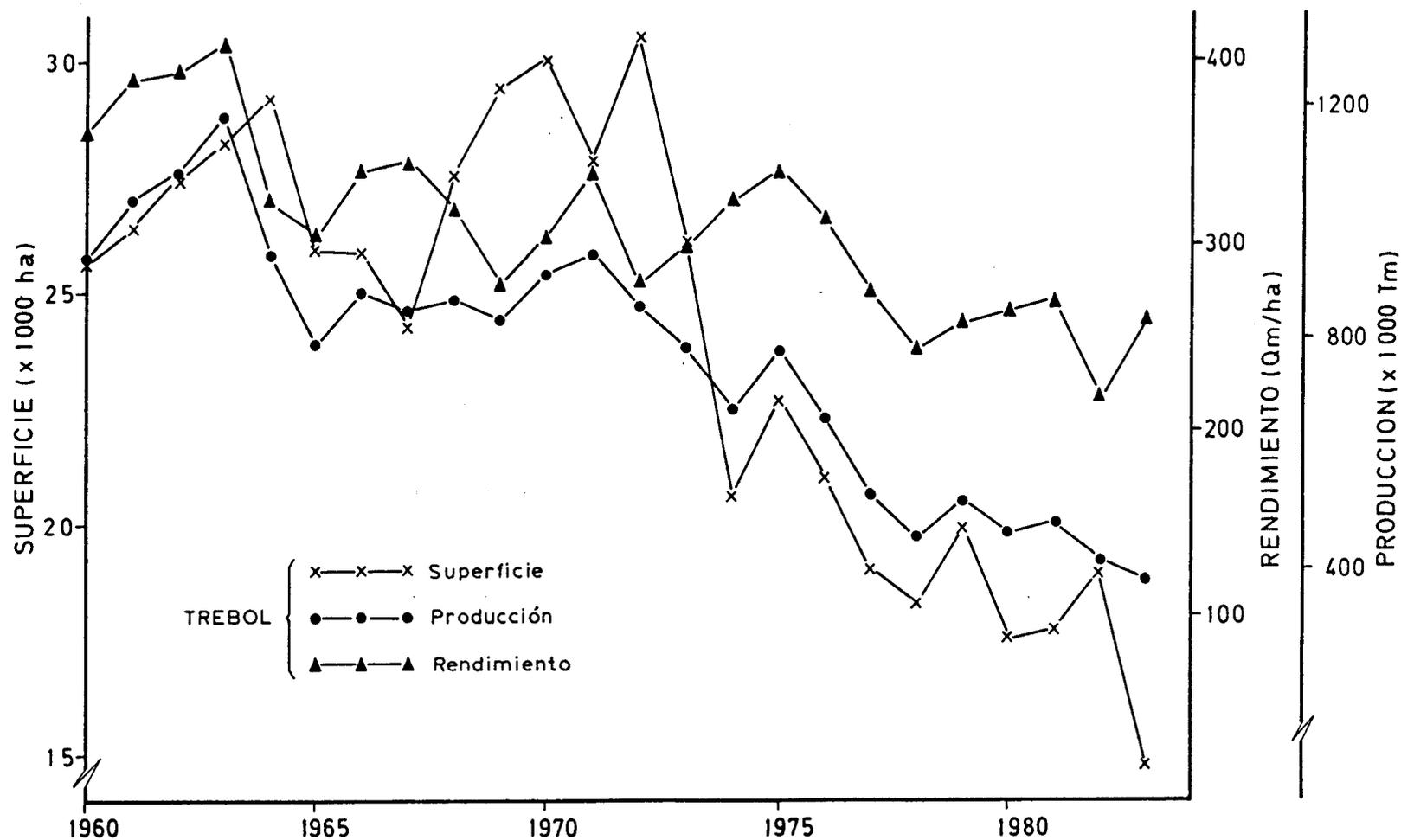


Figura 5.

Evolución de la superficie sembrada, producción y rendimiento del cultivo de tréboles en España.

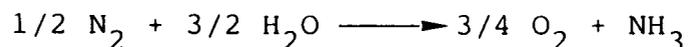
Una de las causas de la falta de aumento en los rendimientos de la alfalfa puede ser la utilización indiscriminada y en ocasiones incorrecta de las variedades disponibles en el mercado comercial. Esta utilización motiva, en algunos casos, fracasos o falta de persistencia en diferentes zonas con características peculiares y determinantes, como son las del SO. de la península ( L. Olea, comunicación personal).

Por los motivos señalados, la Fijación Biológica de Nitrógeno adquiere un máximo interés como medio económico y no contaminante de fijar nitrógeno, siendo cuantitativamente el proceso más importante de todos los implicados en el aporte de N a los sistemas agrícolas (Burris, 1977). Según recientes estimaciones, la FBN contribuye con un 69% al total de N fijado ( $275 \times 10^6$  Tm/año) mientras que la síntesis industrial de fertilizantes supone un 15%. De la proporción atribuible a la FBN, más del 70% se debe a las asociaciones Rhizobium-leguminosa. En la Tabla 1 se indican las estimaciones de la Fijación de  $N_2$  de algunos cultivos de leguminosas más representativos.

#### ALGUNAS CONSIDERACIONES ENERGETICAS

La fijación industrial de nitrógeno es un proceso altamente consumidor de energía, estimándose en  $3 \times 10^8$  barriles de petróleo el consumo de gas natural destinado anualmente a la síntesis de amonio anhidro por el método Haber-Bosch. Aunque la reducción química de  $N_2$  por  $H_2$  es exergónica, el alto consumo de energía en la producción de  $NH_3$  se debe a la obtención de  $H_2$ .

Los procesos de fijación de nitrógeno, tanto industrial como biológica, pueden esquematizarse mediante la siguiente ecuación:



Ambos procesos dependen de aportes energéticos, gas na-

Tabla 1.- Fijación de N<sub>2</sub> atmosférico en algunos cultivos de leguminosas más representativos.

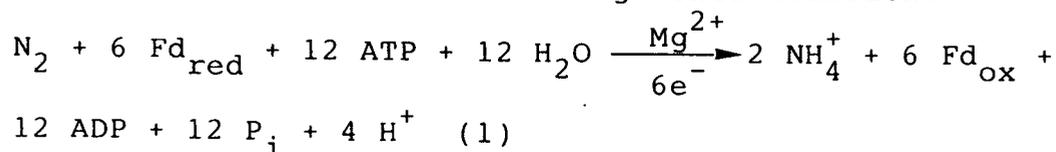
<u>Leguminosa</u>	<u>Kg N Ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup></u>	<u>Referencia</u>
<u>Pratenses:</u>		
Tréboles perennes	45-673	Nutman, 1976
Tréboles anuales	45-336	Nutman, 1976
Lotus	116	Nutman, 1976
Alfalfa	56-463	Nutman, 1976
	128-300	Burns y Hardy, 1975
	270-300	Phillips, 1980
Veza	73-100	Nutman, 1976
<u>L.de grano:</u>		
Altramuz	150-169	Burns y Hardy, 1975
Guisante y lenteja	85	Burns y Hardy, 1975
	52-69	Phillips, 1980
Judia	64	Phillips, 1980
Soja	57-97	Burns y Hardy, 1975
<u>Tropicales:</u>		
Leucaena	277	Nutman, 1976
Lotononis	62	Nutman, 1976
Sesbania	542	Nutman, 1976
Siratro	291	Nutman, 1976
Cacahuete	47	Burns y Hardy, 1975

tural o energía química. Se ha estimado que el rendimiento de la fijación industrial de nitrógeno es del 50% con respecto al ideal termodinámico (Finneran y Czuppon, 1979). El costo energético de la fijación simbiótica de  $N_2$  ha sido estimado como el 17% del fotosintato producido, aproximadamente 10 Kg de carbohidratos por Kg de  $N_2$  fijado. Aparentemente la fijación industrial es tan costosa, en términos energéticos, como la fijación simbiótica (Michin y Pate, 1973). Sin embargo, otros autores han indicado que el proceso industrial supera en coste a la FBN cuando se tienen en cuenta los gastos derivados del transporte y aplicación de los fertilizantes (Schubert, 1982).

#### COSTO DE LA FIJACION BIOLOGICA DE NITROGENO

La reducción biológica de  $N_2$ , catalizada por el complejo enzimático nitrogenasa/nitrogenasa reductasa, requiere energía en forma de ATP y un agente reductor de bajo potencial como la ferredoxina reducida ( $Fd_{red}$ ).

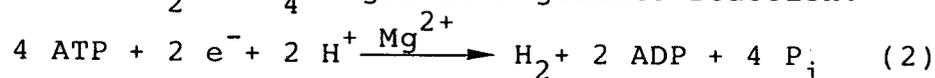
Presumiblemente, la energía libre procedente de la hidrólisis del ATP a ADP es esencial para alcanzar la energía de activación de la reacción. Bajo condiciones óptimas, el complejo nitrogenasa/nitrogenasa reductasa requiere un mínimo de dos moléculas de ATP por cada electrón que se transfiere al sustrato reducido (Orme-Johnson *et al.*, 1977). Así la reacción estequiométrica de la reducción biológica de  $N_2$  puede representarse mediante la siguiente ecuación:



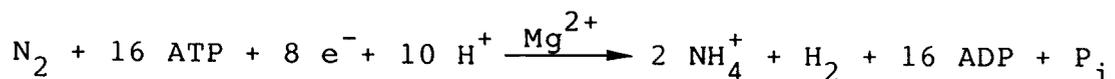
Según la ecuación precedente, se requiere un equivalente a 174 Kcal. ( $6 Fd_{red} + 12 ATP$ ), energía liberada en la oxidación completa de 0,25 moles de glucosa, suponiendo la existencia de un perfecto acoplamiento entre las reacciones de Glicolisis y el Ciclo de los ácidos tricarbónicos con la síntesis de ATP a través de la cadena transportadora de

electrones. En realidad, la eficiencia del proceso es del 40% y son necesarios al menos 0,33 moles de glucosa para sintetizar las 12 moléculas de ATP empleadas por cada molécula de N<sub>2</sub> reducido. A su vez, la glucosa sirve como fuente de equivalentes reductores necesarios para reciclar la ferredoxina, por lo que el costo teórico de la reducción de un mol de N<sub>2</sub> es de 400 Kcal., equivalentes a 0,58 moles de glucosa.

Las nitrogenasas de todos los orígenes catalizan también la reducción de protones a hidrógeno molecular, acoplada a la reducción de N<sub>2</sub> a NH<sub>4</sub><sup>+</sup> según la siguiente reacción:



La relación exacta entre el desprendimiento de H<sub>2</sub> y la reducción de N<sub>2</sub> no está bien definida, pero son dos reacciones estrechamente relacionadas (Mortenson, 1978). Así, se ha definido el "coeficiente de reparto de electrones" como el obtenido por la relación entre los electrones transferidos al sustrato reducible exógeno y los transferidos conjuntamente al ión hidronio y al sustrato reducible. Cuando este coeficiente es igual a la unidad, significa que no hay desprendimiento de hidrógeno (como ocurre al utilizar acetileno como sustrato). Las determinaciones del coeficiente de reparto en presencia de N<sub>2</sub> a niveles fisiológicos permiten obtener valores de 0,75. Empleando este coeficiente, Dixon (1978) calculó que eran necesarias 16 moléculas de ATP por cada mol de N<sub>2</sub> reducido. De las ecuaciones (1) y (2), obtenemos la ecuación representativa de las reacciones catalizadas por la nitrogenasa:



Como el metabolismo del hidrógeno en Rhizobium no está completamente aclarado, las estimaciones de los requerimientos de ATP para la reducción de N<sub>2</sub> incluyen el ATP utilizado para la reducción del ión hidronio (H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>). Aparentemente las condiciones ambientales (intensidad luminosa, concentración relativa de CO<sub>2</sub> y de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en el medio de cultivo), y las del huésped (estado fisiológico) determinan el desprendimiento

de  $H_2$ , principalmente en las estirpes  $Hup^-$  (Bethlenfalvay y Phillips, 1977 a y b; Edie, 1983).

En algunas leguminosas noduladas, el desprendimiento de  $H_2$  dependiente de ATP puede consumir del 20 al 40% de la energía suministrada por la planta para la reducción de  $N_2$  (Schubert y Evans, 1976; Evans et al., 1979). Sin embargo, algunas razas de Rhizobium han desarrollado un sistema para reciclar el hidrógeno (Dixon, 1978; Ruiz-Argüeso et al., 1978) pero no han perdido la capacidad de producirlo, lo que indicaría que se trata de una reacción primitiva e inevitable. El sistema de recuperación de  $H_2$  permite conservar parte de la energía que de otro modo se hubiera perdido por desprendimiento del gas.

Dixon (1972) propuso que la presencia de una hidrogenasa activa en Rhizobium permitiría además retirar el  $O_2$  (protegiendo así a la nitrogenasa) y el  $H_2$  evitando la inhibición de la nitrogenasa por este gas. En la actualidad, la búsqueda de estirpes de Rhizobium que contengan los genes hup (hydrogenase uptake), que determinan la presencia de hidrogenasa, es una herramienta complementaria para seleccionar razas más efectivas (Albrecht et al., 1979; Zablotowicz et al., 1980) mejorándose así la eficiencia global del proceso de fijación simbiótica de  $N_2$  (Schubert et al., 1978; Albrecht et al., 1979; Hanus et al., 1981). Sin embargo, son escasas las estirpes que presentan un fenotipo  $Hup^+$ : un 25% de las razas de R.japonicum, pero hasta el momento ninguna de R.trifolii o R.meliloti (Eisbrenner y Evans, 1983).

Durante el proceso de fijación simbiótica de nitrógeno en las asociaciones Rhizobium-leguminosa existe un consumo adicional de energía para el mantenimiento de los nódulos, asimilación del amonio y transporte del nitrógeno reducido (Rainbird et al., 1984). Por otra parte, se ha descrito un sistema de fijación de  $CO_2$  a través de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa nodular, que contribuiría con el 25% del C consumido por los nódulos de alfalfa durante la fijación

de  $N_2$  (Vance et al., 1984). Dada la dificultad de hacer un balance real de los costes energéticos en los sistemas simbióticos, debido al número de reacciones bioquímicas (fuente/sumidero de energía) implicadas, a los procesos de transporte y asimilación del N fijado, así como los derivados de la formación y mantenimiento de nuevos tejidos (nódulos), se han intentado otras aproximaciones basadas en estudios comparativos de crecimiento. Estas estimaciones asumen que, dado que los productos derivados de la fijación fotosintética de  $CO_2$  (Fotosintato) constituyen los sustratos para el desarrollo completo de la planta, cualquier consumo de C o energía superior al necesario para la asimilación de formas combinadas de nitrógeno se reflejará en una disminución del crecimiento de la planta que crece en asociación simbiótica. En base a este argumento, se han realizado numerosos estudios en los que se ha comparado el crecimiento de diversas leguminosas con diferentes fuentes de N versus el crecimiento en asociación simbiótica. Estos estudios incluyen experimentos de campo con cantidades crecientes de fertilizante y ensayos en condiciones controladas, con un riguroso control de la disponibilidad de nutrientes. En ambos casos, los resultados obtenidos son extremadamente variables y sólo reflejan la dificultad de esta estimación indirecta. Así, en ensayos de campo, las comparaciones pueden verse distorsionadas si los niveles de N del suelo son suficientemente elevados como para inhibir la fijación simbiótica de nitrógeno en los controles no fertilizados.

De varios estudios de campo con soja (Glycine max, L.) recopilados por Mahon (1983) puede deducirse que la fijación simbiótica es menos efectiva que el uso de nitrato. Sin embargo, en condiciones controladas, Gibson (1966) comparó la tasa relativa de crecimiento de Trifolium subterraneum creciendo en simbiosis o con  $NO_3NH_4$ , no encontrando diferencias significativas en los requerimientos de carbohidratos entre las plantas noduladas y las que crecían con nitrato. Ryle et al. (1979) encontraron una estimulación del crecimiento de G.max, Vigna unguiculata y Trifolium repens por  $NO_3NH_4$ , mien

tras que Broughton (1979) observó una inhibición del crecimiento en G.max y V.unguiculata a niveles de nitrato tan bajos como 10-20 mM. En este estudio, ni la tasa relativa de crecimiento ni la tasa neta de asimilación de N fueron significativamente afectadas por la adición de nitrato.

Gran parte de la confusión puede deberse al efecto múltiple que el nitrógeno combinado tiene sobre las diversas asociaciones simbióticas. Por ejemplo, Hoglund (1973) observó una respuesta bimodal a los incrementos de fertilizante: con niveles bajos se estimula tanto la fijación como el crecimiento de las plantas, y a niveles elevados hay una inhibición de la fijación y estimulación del crecimiento. Otros investigadores han señalado que durante la fase previa al establecimiento de la nodulación hay un período de limitación de N y en esta etapa la aplicación de N mineral estimula el crecimiento, proporcionando una ventaja que se refleja en la tasa de crecimiento precoz. Sin embargo, Gibson (1976) encontró pocos cambios en la tasa relativa de crecimiento de G.max y Lupinus cuando crecían a bajas concentraciones (7mM) de  $\text{NO}_3\text{K}$ .

Otra causa de estos resultados contradictorios radica en la distinta respuesta de las leguminosas, incluso entre variedades de una especie, al N combinado. Por último, las distintas vías metabólicas implicadas en la asimilación de diferentes formas de N, pueden responder de manera diferente a las condiciones ambientales. Plantas creciendo en condiciones desfavorables para el establecimiento de la nodulación pueden estar limitadas por la disponibilidad de nitrógeno, más que por el aporte de energía. En consecuencia, los estudios comparativos de crecimiento deben realizarse eliminando las diferencias relacionadas con períodos de limitación de N, de cara a evaluar la eficiencia energética de los dos procesos: asimilación de N gaseoso y de N combinado (Mahon, 1983).

Como en las leguminosas la FBN está limitada por la dis

ponibilidad de energía (Hardy y Havelka, 1976), sería conveniente incrementar la productividad primaria (fotosintética) de estas plantas y explotar las mejores asociaciones Rhizobium-leguminosa. Por otro lado, se podría implantar en otros cultivos de gran interés agrícola, sobre todo cereales, la capacidad de fijar nitrógeno, bien modificando directamente la planta o por medio de relaciones simbióticas con microorganismos fijadores. Las nuevas técnicas desarrolladas por la ingeniería genética, tales como la recombinación artificial de ADN y fusión de células, pueden proporcionar los medios para conseguir algunos de esos objetivos.

FISIOLOGIA Y METABOLISMO DE RHIZOBIUM EN CULTIVO

Desde los trabajos de Graham (1964) y Elkan y Kwik (1968) se postulaba que las diferencias nutricionales existentes entre los denominados rizobios de crecimiento rápido (R.meliloti, R.trifolii, R.leguminosarum y R.phaseoli) y los de crecimiento lento (R.japonicum y R.lupini) constituían, junto con otras características, un argumento para separar taxonómicamente ambos tipos de especies. En la 1ª Edición del Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, se describen como dos géneros bien diferenciados : Rhizobium y Bradyrhizobium cuyas características metabólicas se resumen a continuación.

1.- Fuentes de carbono

Las estirpes del género Rhizobium utilizan una gran variedad de carbohidratos, particularmente manitol, glucosa, arabinosa, fructosa, galactosa y sacarosa (Vincent et al., 1979) y sales de ácidos orgánicos como fuente de carbono, sin formación de gas. Normalmente producen una reacción ácida moderada cuando crecen en un medio de sales minerales y manitol u otros carbohidratos. En contraste, las estirpes del género Bradyrhizobium prefieren pentosas como arabinosa y xilosa, produciendo una reacción alcalina en tales medios. Cuando se emplean intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos como fuente de carbono, debe añadirse al medio basal  $Ca^{++}$  y  $Mg^{++}$  en cantidad suficiente para contrarrestar la capacidad quelante de esos compuestos.

La vía principal del metabolismo de los carbohidratos parece ser la Entner-Doudoroff y el ciclo de las pentosas fosfato (Martínez de Drets y Arias, 1972; Mulongoy y Elkan, 1977; Ronson y Primrose, 1979). La vía Embden-Meyerhof-Parnas probablemente no tenga importancia fisiológica, aunque se ha descrito la presencia de fructosa-1,6 bifosfato aldolasa y de 6-fosfofructoquinasa en muy baja concentración.

Burris et al. (1942) señalaron que los azúcares-alcohol

son metabolizados por Rhizobium por vía oxidativa, siendo inducibles las enzimas correspondientes. Más recientemente, Martínez de Drets y Arias (1970) han demostrado que los azúcares D-manitol, D-arabitol y D-sorbitol son metabolizados por la NAD-sorbitol deshidrogenasa (que oxida el sorbitol) y la NAD-arabitol deshidrogenasa (que oxida tanto al manitol como al arabitol) en R.meliloti, R.trifolii y R.leguminosarum, existiendo una inducción cruzada de ambas enzimas por los tres sustratos. La glucosa y fructosa inhiben estas actividades enzimáticas.

Respecto al metabolismo de la fructosa, estos autores han demostrado que la enzima hexoisomerasa, que transforma la fructosa en glucosa, no existe en R.meliloti; sin embargo, pusieron de manifiesto la existencia de otra capaz de fosforilar la D-fructosa, una fructoquinasa dependiente de ATP.

Según Martínez de Drets y Arias (1972), además de las diferencias en la utilización de carbohidratos, existe una base enzimática que apoyaría la subdivisión, ya mencionada, del género Rhizobium. De acuerdo con las observaciones de Katznelson y Zagallo (1957) y Keele et al. (1969), se detecta actividad NADP-glucosa 6-fosfato-deshidrogenasa (primer enzima de la vía de las pentosas fosfato) en todas las estirpes estudiadas, pero la actividad es mayor en el grupo de especies de rápido crecimiento. Entre las estirpes de crecimiento lento no se detectó actividad NADP-6 fosfogluconato-deshidrogenasa, otra enzima de la ruta oxidativa de la glucosa. La baja o nula actividad de la fructosa-difosfatasa sugiere que la vía Embden-Meyerhof-Parnas (Glucolisis) no opera en Rhizobium. En cambio, las enzimas de la vía Entner-Doudoroff están presentes en los extractos de todas las estirpes estudiadas, con actividades específicas más altas en los rizobios de crecimiento rápido.

Elkan y Kwik (1968) demostraron la gran variabilidad que existe dentro de una misma especie (R.japonicum) respecto a sus requerimientos nutricionales. De 22 fuentes de carbono probadas, la mayoría de las estirpes crecieron bien en gluco

nato, galactosa, glucosa, glicerol y manosa; mientras que compuestos como citrato, malato, lactato y propionato no fueron utilizados por ninguna estirpe. Por el contrario, Cha krabarti et al. (1981) en un estudio exhaustivo sobre los requerimientos nutricionales de 85 estirpes de Rhizobium pertenecientes a 5 especies, destacan que muy pocas estirpes de R.japonicum y R.lupini crecen bien en glucosa como fuente de carbono. No obstante, basándose en la preferencia por los distintos azúcares empleados, establecieron 6 grupos entre las estirpes de R.japonicum estudiadas.

La importancia de la elección de la fuente de carbono para el cultivo de Rhizobium fue puesta de manifiesto por Kuykendall y Elkan (1976), quienes observaron que la estirpe 311b110 de R.japonicum formaba al menos cuatro tipos diferentes de colonias, de las cuales dos crecían mal con manitol. Los tipos de colonias capaces de crecer con este azúcar eran inefectivos en simbiosis con plantas de soja. En este sentido, los trabajos de Mazza et al. (1979) en R.japonicum demuestran que el crecimiento en manitol induce una serie de cambios citológicos y retrasa la división celular con respecto al crecimiento en glicerol; sin embargo, no encontraron diferencias en cuanto a efectividad entre los cultivos obtenidos con una u otra fuente de carbono.

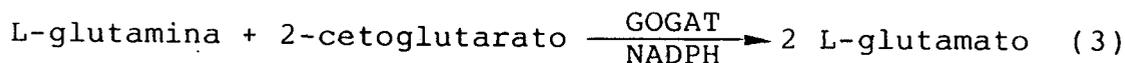
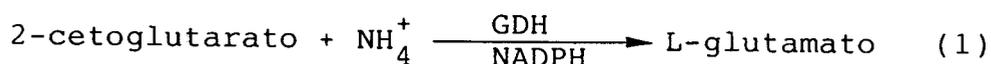
Se han descrito mutantes de R.meliloti deficientes en succinato-deshidrogenasa (Gardiol et al., 1982) y  $\alpha$ -cetoglutarato-deshidrogenasa (Duncan y Faenkel, 1979) incapaces de fijar  $N_2$  eficientemente. Así mismo, los mutantes de R.leguminosarum (Glenn y Brewin, 1981; Finan et al., 1983) y de R.trifolii (Ronson et al., 1981) alterados en el metabolismo y transporte del succinato forman simbiosis inefectivas con sus respectivos huéspedes. Estas observaciones sugieren que es necesario el funcionamiento completo del ciclo de ácidos tricarboxílicos para el establecimiento de simbiosis efectivas. Por el contrario, mutantes de R.meliloti deficientes en glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa y por tanto incapaces de crecer en manosa, glucosa, fructosa, ribosa y xilosa, son eficientes simbióticamente (Cerveñansky y Arias, 1984). De

forma similar, estirpes de R.trifolii que no crecen en glucosa, fructosa o sacarosa mantienen las características simbióticas de la estirpe silvestre (Ronson y Primrose, 1979).

## 2.- Fuentes de nitrógeno

El estudio de los requerimientos nitrogenados de las especies de Rhizobium spp. en medio de cultivo ha recibido menos atención que el de las fuentes de carbono. El aspecto más importante es la presencia de la enzima inducible nitrogenasa, por la cual estas bacterias reducen el N<sub>2</sub> atmosférico a amonio. Salvo en condiciones muy especiales, la nitrogenasa no se expresa en vida libre (Gibson et al., 1976).

Existen dos sistemas enzimáticos generales de asimilación de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, uno catalizado por la glutamato-deshidrogenasa (GDH) y otro por la glutamina sintetasa/glutamato sintasa (GS/GOGAT). Estas vías metabólicas fueron descritas en Enterobacterias, y el funcionamiento de una u otra depende del nivel de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> disponible. Ludwig (1978) resumió estas reacciones de la siguiente forma: con exceso de amonio, la GDH, mediante la aminación reductora del 2-cetoglutarato, da lugar a glutamato (Reacción 1); mientras que con poco amonio, la GS/GOGAT operan de forma coordinada para obtener el mismo resultado (Reacciones 2 y 3).



La actividad glutamina sintetasa (GS) parece ser necesaria para la fijación simbiótica de N<sub>2</sub> (Kondorosi et al., 1977; Ludwig y Signer, 1977); los mutantes auxótrofos para la glutamina forman nódulos inefectivos.

Algunas estirpes pertenecientes al grupo "cowpea" o de R.japonicum son capaces de expresar su nitrogenasa en vida li

bre, pero necesitan una fuente de N combinado para mantener su crecimiento. Sin embargo, Dreyfus et al. (1983) han demostrado que una estirpe de Rhizobium aislada de nódulos caulinares de Sesbania rostrata es capaz de expresar su nitrógeno in vitro creciendo a expensas del  $N_2$  atmosférico como única fuente de nitrógeno.

Además de fijar  $N_2$ , muchas estirpes de Rhizobium spp. pueden utilizar  $NO_3^-$  o  $NH_4^+$  como única fuente de N, si bien la combinación de una fuente orgánica y una inorgánica permite alcanzar un crecimiento superior (Elkan y Kwik, 1968; Chakrabarti et al., 1981). Bergersen (1961) obtuvo un crecimiento relativamente pobre con R. trifolii empleando  $NO_3^-$  como fuente de nitrógeno, en contraste con los resultados obtenidos por Vincent (1962). Ambos autores coinciden en señalar el escaso crecimiento obtenido con amonio, bien como  $NO_3NH_4$  o  $SO_4(NH_4)$ .

Algunas estirpes de crecimiento lento son capaces de reducir  $NO_3^-$ , bajo condiciones anaerobias (Zablotowicz et al., 1978). Las estirpes que no crecen con fuentes inorgánicas de nitrógeno suelen hacerlo si se añade al medio algún aminoácido. Elkan y Kwik (1968) han demostrado que sólo cuatro aminoácidos (ácido glutámico, aspártico, prolina e histidina) permitían el crecimiento de estirpes de R. japonicum cuando se añadían como única fuente de nitrógeno. No obstante, las combinaciones de aminoácidos (agrupados en base a su similitud metabólica) que permitieron un buen crecimiento fueron aquellas en las que figuraban : ácido glutámico, aspártico, alanina, prolina, ornitina, citrulina, arginina, lisina o histidina. Sin embargo, todas las estirpes crecían mejor con hidrolizado de caseína libre de vitaminas, que con cualquiera de las combinaciones de aminoácidos ensayadas. Vincent (1977) sugirió que el hidrolizado de caseína era superior a las combinaciones de aminoácidos, probablemente debido a la presencia de un factor de crecimiento (péptido). También la peptona es una fuente de nitrógeno pobre, pero puede sustituir al extracto de levadura en el cultivo de estirpes de Rhizobium spp. de Lotononis.

Se han detectado elevados niveles de aspartato-amino transferasa y alanina-aminotransferasa en Rhizobium, cuando crece en presencia de sales de amonio, y en bacteroides (Fotrell y Mooney, 1969). Las concentraciones de estas enzimas y de GDH dependían de la fuente de nitrógeno en el medio; mientras que cada aminoácido fracasa en estimular la síntesis de su propia transferasa, cada enzima es estimulada por amonio y en menor grado por nitrato.

### 3.- Vitaminas

En los medios de cultivo de Rhizobium el aporte de vitaminas procede del extracto de levadura. Elkan y Kwik (1968) demostraron que la mayoría de las estirpes de R.meliloti no requieren ninguna vitamina para crecer, pero aquellas que responden a la adición de vitaminas presentan una gran diversidad, de modo que sería necesario un estudio detallado en cada caso.

Graham (1963) examinó los requerimientos vitamínicos de 63 estirpes de Rhizobium. Veintiseis de treinta y una estirpes del grupo de R.leguminosarum, R.trifolii y R.phaseoli, respondieron a la adición de biotina, tiamina y/o pantotenato cálcico. Las estirpes de R.meliloti y las de crecimiento lento a veces sólo responden a la adición de biotina. Elkan y Kwik (1968) también confirmaron que las estirpes de R.japonicum utilizan sólo biotina, de más de 10 vitaminas ensayadas. Las estirpes de R.lupini fueron estimuladas en su crecimiento por la mezcla de todas las vitaminas o bien por el extracto de levadura. En general, el crecimiento de estas estirpes se vio retardado cuando se omitió el pantotenato de calcio de la mezcla de vitaminas.

### 4.- Requerimientos nutritivos y adaptación ecológica

Caben algunas consideraciones con respecto a la gran variabilidad en los requerimientos nutritivos exhibida por Rhizobium spp., sobre todo por las estirpes de R.japonicum. Las estirpes que presentan unas mínimas exigencias vitamíni-

cas y son capaces de utilizar una amplia gama de fuentes de carbono y nitrógeno podrían tener ventajas ecológicas en la colonización del suelo y la rizosfera, frente a las estirpes que muestran un alto grado de especificidad en sus requerimientos nutritivos (Brockwell et al., 1968; Parker et al., 1977).

Por otra parte, la capacidad de las diferentes plantas-huésped de proporcionar factores de crecimiento esenciales o un tipo particular de sustrato carbonado o nitrogenado a Rhizobium durante el desarrollo de los nódulos puede ser uno de los factores más importantes en la determinación de la efectividad simbiótica (Holl, 1975).

## POLISACARIDOS EXTRACELULARES BACTERIANOS

En contraste con el volumen de conocimientos sobre la composición y estructura de los exopolisacáridos de origen microbiano, se sabe relativamente poco sobre las funciones biológicas que desempeñan tales macromoléculas.

Se ha sugerido que los polisacáridos bacterianos tienen un papel biológico pasivo (Wold, 1971), pero deben tener alguna función en el mantenimiento de la bacteria en su ambiente ya que sería sorprendente que tales organismos, sometidos a grandes presiones de selección y con una elevada tasa de reproducción, sintetizaran sustancias no funcionales con el consiguiente gasto de sustratos y energía (Krause, 1972). Los polisacáridos extracelulares pueden proporcionar a las células bacterianas una superficie con carga negativa e hidrofílica. Incluso si esta función se considera pasiva, la localización de estas macromoléculas en la parte más externa de la célula tendría gran importancia, al constituir los mediadores inmediatos entre el microorganismo y su ambiente (Cheng y Costerton, 1975).

Antes de comentar las posibles funciones de los exopolisacáridos, hay que señalar que se sabe poco sobre su producción en ambientes naturales. Parece obvio que la producción de polisacárido extracelular o la presencia de cápsula no es esencial para la viabilidad de los microorganismos que los producen. Además, se observa que la producción de polisacárido capsular varía según las condiciones de cultivo. No obstante, en ambientes naturales, la presencia de exopolisacárido debe tener alguna ventaja sobre la supervivencia de los organismos (Costerton et al., 1974 a). Existen indicios, directos e indirectos, de que los microorganismos del suelo producen polisacáridos en su ambiente natural. Añadiendo al suelo glucosa, dextranos u otros materiales carbonados marcados radioactivamente se observa que estos compuestos son incorporados a los polisacáridos microbianos (Oades y Wagner, 1971). Por otro lado, el examen al microscopio óptico o electrónico muestra que las bacterias del suelo poseen cápsula in situ (Bae et

al., 1972).

## FUNCIONES DE LOS POLISACARIDOS EXTRACELULARES

### 1.- Almacenamiento y reserva:

La gran mayoría de los microorganismos productores de polisacáridos extracelulares parecen ser incapaces de utilizarlos como fuente de carbono, de modo que estos polímeros no sirven como fuente de carbono de reserva. Sólo algunos grupos son capaces de despolimerizar sus propios exopolisacáridos: por ejemplo, los estreptococos del grupo viridans sintetizan dextranos y levanos extracelulares a partir de sacarosa (Schachtele et al., 1972), y aunque poseen las enzimas que degradan estos polímeros, no hay indicios de que puedan utilizar los dextranos como sustrato carbonado cuando crecen in vitro (Sidebotham, 1974).

En cambio, se ha descrito que Azotobacter vinelandii, Beijerinckia indica y una estirpe de Rhizobium no específica emplean sus polisacáridos extracelulares para crecer (Proctor, 1959; López y Becking, 1968; Patel y Gerson, 1974); por tanto estos microorganismos tienen la capacidad de emplear sus polisacáridos como material de reserva. Otros microorganismos son capaces de degradar los polisacáridos extracelulares de otras bacterias no relacionadas. El caso mejor conocido es el de Bacillus palustris, que sintetiza enzimas depolimerasas de los polisacáridos capsulares de pneumococos del grupo III y VIII (Torriani y Pappenheimer, 1962). Estirpes de Pseudomonas de origen marino son capaces de crecer a expensas de los polisacáridos extracelulares de especies de Azotobacter, Rhizobium y Arthrobacter como única fuente de carbono (Mitchell y Nevo, 1965).

### 2.- Virulencia:

Existen numerosos estudios que indican que las bacterias patógenas (Salmonella typhi, Escherichia coli, y estrep

tococos beta-hemolíticos del grupo A, Neisseria gonorrhoeae y Haemophilus pertussis, entre otros), siempre son capsuladas o poseen antígenos de superficie especiales (generalmente carbohidratos) en contraste con las variantes no capsuladas que son avirulentas. La cápsula parece ejercer un papel protector frente a la ingestión por células fagocíticas y factores bactericidas del suero.

### 3.- Protección frente a depredadores:

En ambientes terrestres y acuáticos, las bacterias están sometidas a predación, ejercida por protozoos, hongos y bdellovibrios (Starr y Huang, 1972). Existen indicios de que los polisacáridos extracelulares protegen a algunas especies bacterianas, al menos en determinadas circunstancias. Sin embargo se ha señalado que no existe una relación clara entre la presencia de cápsula o producción de polisacárido extracelular por bacilos del suelo y su susceptibilidad a protozoos. Diecisiete estirpes de Rhizobium, pertenecientes a 5 especies diferentes, mostraron en general un alto grado de resistencia al ataque de protozoos; no obstante, tres estirpes de R.trifolii de las ocho ensayadas y dos de R.meliloti fueron parcialmente englobadas. Cuando se mezcló el polisacárido extracelular de una estirpe resistente de R.leguminosarum con bacterias susceptibles al ataque, el polisacárido no tuvo ningún papel protector, sugiriendo que estas estructuras protegen sólo a los microorganismos que las producen.

Hay menos información sobre el papel protector del exopolisacárido y la cápsula frente a myxobacterias y hongos. Se sabe que los bacilos del género Rhizobium son muy resistentes a la acción lítica de las myxobacterias; pero no se ha podido establecer una correlación positiva entre la resistencia y la composición y estructura de los polisacáridos (Dudman, 1968 y 1976).

Por último, las bacterias pertenecientes al género Bde-

Bdellovibrio predan otras bacterias gramnegativas. Parker y Grove (1970) aislaron bdellovibrios capaces de parasitar a R.meliloti, R.trifolii, Agrobacterium tumefaciens y A.radiobacter. Sin embargo, no han sido detectados bdellovibrios capaces de atacar a R.lupini (Keya y Alexander, 1975). La base molecular de la distinta susceptibilidad de las estirpes de Rhizobium no ha sido determinada, pero los rizobios de crecimiento lento R.lupini, R.japonicum y los del grupo "cowpea" difieren de los de rápido crecimiento, entre otras características, porque sintetizan polisacáridos extracelulares de composición más heterogénea y a menudo, pero no siempre, contienen azúcares metilados (Dudman, 1976; Kennedy, 1976). Sería interesante saber si existe alguna correlación entre estos restos no usuales y menos hidrofílicos y la resistencia a la predación.

#### 4.- Protección frente a la desecación:

En determinados ambientes naturales, por ejemplo el suelo, las bacterias pueden estar sometidas temporalmente a condiciones de desecación. La supervivencia en estas condiciones depende de varios factores: la especie microbiana de que se trate, el número de células presentes, el estado nutritivo, la naturaleza del medio en el que están suspendidas antes de la desecación y la temperatura a la que son sometidas. Desde los primeros estudios de Microbiología del suelo, se sabe que las bacterias productoras de "goma" tienen ventaja frente a las no mucosas en condiciones de desecación. No obstante, en estudios más recientes bajo condiciones extremas de desecación, no se han realizado comparaciones entre formas capsuladas y no capsuladas. Por otro lado, se ha demostrado ampliamente que la humedad relativa tiene gran importancia en la supervivencia bacteriana y, que índices intermedios (30-50%) de humedad son los más adecuados. Se ha sugerido que los exopolisacáridos tienen una función protectora porque "prestan" moléculas de agua a las estructuras proteicas de la célula durante la desecación, manteniendo así su funcionalidad.

5.- Papel del exopolisacárido en las interacciones iónicas:

Consideraciones de carácter físico hacen suponer que los polisacáridos extracelulares podrían modificar el flujo de moléculas cargadas hacia dentro y/o fuera de las células bacterianas. Se ha propuesto que la pared celular y los ácidos teicoicos de la membrana mantienen una elevada concentración de cationes divalentes, especialmente  $Mg^{++}$ , para suplir las demandas de las enzimas unidas a la membrana. En las especies bacterianas que no poseen ácidos teicoicos, los polisacáridos de carácter ácido que contienen ácidos urónicos pueden ejercer la misma función (Heptinstall et al., 1970).

Los polisacáridos extracelulares pueden unirse a iones metálicos y actuar como barrera de entrada a la célula (Friedman y Dugan, 1968). En presencia de iones metálicos tóxicos, se ha comprobado que Azotobacter chroococum y A. vinelandii incrementan la síntesis de polisacárido capsular en los bordes de las zonas de inhibición (Den Dooren de Jong, 1971). También se ha demostrado la unión entre metales pesados y los exopolisacáridos de estirpes marinas de Pseudomonas (Corpe, 1975).

Además los exopolisacáridos pueden unirse a partículas de arcilla, protegiendo a la bacteria de los rayos X y las altas temperaturas (Marshall, 1975).

6.- Papel del exopolisacárido en la fijación de  $N_2$ :

La síntesis de polisacárido extracelular es una característica importante de algunos microorganismos fijadores de  $N_2$  atmosférico: Azotobacter, Beijerinckia, Derxia y Rhizobium.

Se ha demostrado en estirpes de Beijerinckia una correlación positiva entre la producción de exopolisacárido y la fijación de  $N_2$  (Barooah y Sen, 1964). Jensen et al. (1960) también observaron que la reducción de acetileno sólo tenía lugar en colonias muy mucosas de Derxia gummosa e interpreta-

ron que este material mucoso, presente en los cultivos fijadores, podría disminuir la permeabilidad al O<sub>2</sub>, y en consecuencia, permitir la actividad de la nitrogenasa. Este mismo sentido tienen los trabajos de Hill (1975) en Klebsiella pneumoniae.

Otras posibles funciones de estas estructuras de superficie son: regulación y protección de reacciones enzimáticas, adhesividad en ambientes acuáticos y reconocimiento en interacciones microbio-planta (que se detallarán en relación a la simbiosis Rhizobium-leguminosa).

#### POLISACARIDOS EXTRACELULARES DE RHIZOBIUM

Desde el punto de vista químico, los polisacáridos de superficie que sintetiza Rhizobium pueden agruparse en tres categorías: Exopolisacáridos (PSE o EPS), Lipopolisacáridos (LPS) y Glucanos.

##### 1.- EXOPOLISACARIDOS

los exopolisacáridos, de carácter ácido, se encuentran en la parte más externa de la célula y normalmente son excretados al medio de cultivo (Sutherland, 1977). Los EPS de los denominados "rizobios de crecimiento lento" tienen tendencia a unirse más intensamente a la superficie celular formando parte del material de la cápsula. En general, en cuanto a la composición de azúcares, los exopolisacáridos de Rhizobium son similares a los producidos por otras bacterias Gramnegativas. Los PSE de varias estirpes de R.trifolii y R.leguminosarum tienen una estructura casi idéntica (Jansson et al., 1979; Sømme, 1980; Robertsen et al., 1981). Diferentes estirpes de R.meliloti sintetizan un PSE muy similar al producido por Agrobacterium tumefaciens, pero es bastante diferente al producido por otras estirpes de crecimiento rápido (Bjorndal et al., 1971; Zevenhuizen, 1973). Los rizobios de crecimiento lento como R.japonicum producen un EPS diferente al de las estirpes de crecimiento rápido antes mencionadas (Dudman, 1976 y 1978).

Yu et al. (1983) clasificaron las especies de Rhizobium de crecimiento rápido en dos grupos, basándose en la composición de sus EPS. En el primer grupo incluyeron estirpes de R.meliloti. Los esqueletos carbonados estaban constituidos por azúcares neutros -glucosa y galactosa- y diferentes cadenas laterales de igual longitud con dos sustituyentes ácidos. Algunas estirpes de R.meliloti pueden producir más de un tipo de PSE. Por ejemplo, la estirpe 201 es capaz de sintetizar 2 PSE bien definidos que contienen glucosa, manosa y ácido glucurónico en proporción 3:3:2 y glucosa, galactosa, manosa y ácido pirúvico 4:3:3:1, respectivamente.

Las estirpes de R.leguminosarum, R.phaseoli y R.trifolii comparten un mismo tipo de PSE, cuya unidad de repetición está formada por dos moléculas de ácido glucurónico adyacentes. En este grupo de exopolisacáridos, las cadenas laterales son de longitud variable y poseen restos pirúvicos; todas excepto la más corta contienen además un segundo sustituyente ácido.

Los PSE de R.japonicum y Rhizobium spp. "cowpea" son diferentes de los de las especies de crecimiento rápido antes mencionadas. La unidad de repetición es más corta y las cadenas laterales están formadas por azúcares metilados.

En la estirpe 0403 de R.trifolii sólo los cultivos en fase exponencial temprana y en fase estacionaria de crecimiento (pero no en el período entre ambas fases ni en la fase estacionaria tardía), reaccionaban con suero anti-raíz de trébol (Dazzo et al., 1979). Estudios posteriores (Urbano y Dazzo, 1980) han indicado que la cantidad relativa de cuatro monosacáridos y el contenido de sustituyentes O-acetil y O-piruvato varía según la edad de los cultivos de donde se aíslan los polisacáridos. Estos cambios químicos se pueden correlacionar con las variaciones en la unión a la lectina de trébol en diferentes etapas del cultivo, e indican un posible carácter transitorio de los receptores de lectinas. Cadmus et al. (1982) describen igualmente alteraciones en la composición de los exopolisacáridos de diferentes especies

de crecimiento rápido, señalando que los sustituyentes O-acetil y pirúvico varían de una estirpe a otra dentro de una misma especie, e incluso con la edad del cultivo. En R.trifolii y R.leguminosarum los restos O-acetil aumentan con la edad del cultivo, mientras que en R.meliloti disminuyen y en R.phaseoli permanecen constantes. Los restos pirúvicos aumentan en las cuatro especies estudiadas. Si los PSE funcionan como factores determinantes del reconocimiento entre ambos simbioses, los cambios en el contenido de estos restos pueden afectar la especificidad de la simbiosis y, en consecuencia, la competitividad del microsimbionte.

Todos los trabajos de Dazzo y su grupo subrayan la localización capsular del polisacárido reactivo. Sin embargo, Dazzo y Brill (1979) detectaron en extractos de material capsular de R.trifolii al menos dos heteropolisacáridos ácidos reactivos, uno de los cuales contenía 3-desoxi-D-manooctulosónico, Lipido A y heptosa, componentes característicos del Lipopolisacárido. Si los receptores de las lectinas en R.trifolii son las moléculas de LPS, cabe preguntarse por qué las células no capsuladas no reaccionan con las lectinas o con suero anti-raíz de trébol.

La estructura del heteroexopolisacárido de R.meliloti también ha sido determinada y se ha descrito que el PSE parcialmente purificado y los filtrados estériles de cultivos de R.meliloti inducen la deformación de los pelos radicales e incrementan la actividad poligalacturonasa en raíces de alfalfa (Hubbell, 1970; Palomares et al., 1978). Olivares et al. (1984) han demostrado que el PSE de estirpes de R.meliloti altamente infectivas incrementan la infectividad de otras menos invasivas. Este efecto no puede ser atribuido a hormonas que estuvieran presentes en los extractos crudos del PSE ni a otras sustancias inespecíficas, ya que la adición del PSE de R.leguminosarum, obtenido de la misma forma, no alteró la capacidad infectiva de las estirpes de R.meliloti ensayadas. Al mismo tiempo, describen que al añadir PSE hidrolizado junto con el inóculo, las células de

Rhizobium no eran capaces de adherirse a las raíces, produciéndose una inhibición total de la nodulación de las plantas de alfalfa, aparentemente debida a una saturación de las lectinas.

Con respecto al PSE de R.japonicum, se ha observado que presenta reactividad con las lectinas de soja (Bhuvanewari y Bauer, 1978). El polisacárido capsular (PSC) incrementó la nodulación cuando las raíces de soja fueron pretratadas con este polímero antes de ser inoculadas. También se ha descrito que oligosacáridos purificados pueden inducir este efecto. Además, un potente hapteno, o inhibidor de la unión a las lectinas, la N-acetilgalactosamina, también aumenta la nodulación de las raíces de soja, mientras que la N-acetilglucosamina no provoca aumento alguno. Estas observaciones sugieren que ambos fenómenos -unión a lectinas y nodulación- pueden estar relacionados. Estudios de microscopía electrónica (Bal et al., 1978; Calvert et al., 1978) han revelado que la lectina de la soja marcada con ferritina se une a la cápsula de algunas estirpes de R.japonicum; las células parcialmente provistas de cápsula o no capsuladas no presentan en su membrana externa estructuras capaces de reaccionar con las lectinas, descartando así al Lipopolisacárido como molécula receptora. Estos resultados coinciden con los de Kamberger (1979), que observó bandas de precipitación entre el PSE de R.japonicum y las lectinas de soja, pero no con el LPS de la misma estirpe.

Los análisis comparativos de los PSE y PSC de R.japonicum demuestran que ambos polímeros están muy relacionados pero no son exactamente iguales, y varían de forma específica según la edad del cultivo (Mort y Bauer, 1980). El contenido de galactosa disminuye cuando los cultivos alcanzan la fase exponencial de crecimiento, y la concentración de 4-O-metilgalactosa aumenta de forma paralela. La disminución de la capacidad para reaccionar con las lectinas de soja, a medida que aumenta la edad de los cultivos, se ha relacionado con el incremento en restos 4-O-metilgalactosa de los PSE. La

cantidad relativa de otros monómeros no experimenta ninguna variación, por lo que se ha postulado que el PSE presente en los cultivos filtrados procede de la cápsula. Un aumento similar del contenido de restos metílicos en el PSE con la edad del cultivo se ha descrito en estirpes de Rhizobium aisladas de Acacia decurrens (Jackson et al., 1980) pero no se ha correlacionado con la unión a las lectinas correspondientes.

Un segundo tipo de PSE de R. japonicum no contiene galactosa o análogos estructurales como galactosamina, N-acetilgalactosamina o fucosa que puedan servir como puntos específicos de unión a la lectina de soja. Estudios de ultraestructura celular han demostrado que sólo una pequeña proporción de células son capsuladas (Bal et al., 1978); ahora bien, cuando crecen en asociación con raíces de soja sintetizan un polisacárido con una cadena lateral de galactosa que forma una microcápsula y reaccionan con las lectinas (Bhuvanewari y Bauer, 1978).

El descubrimiento de una nueva lectina específica del ácido 4-O-metilglucurónico en las semillas de varios cultivos de soja (Dombrink-Kurtzman et al., 1983) apoya la hipótesis de las lectinas y la participación de los PSE que contienen este compuesto en los procesos de reconocimiento previos a la infección de la leguminosa. Así ocurre con estirpes de Rhizobium aisladas de Acacia albida, Vigna radiata y Desmodium spp., que son capaces de nodular plantas de soja (Jackson et al., 1983).

## 2.- LIPOPOLISACARIDOS

Este segundo tipo de polisacáridos se encuentra en la parte externa de la pared celular de las bacterias Gramnegativas, constituyendo los determinantes antigénicos más importantes de la pared celular (antígeno O). En Rhizobium, los estudios del LPS se han llevado a cabo en un número reducido de estirpes, en su mayoría de crecimiento rápido (Graham y O'Brien, 1968; Humphrey y Vincent, 1969; Carlson et al., 1978; Planqué et al., 1979; Zevenhuizen et al., 1980). Estos estu-

dios revelan una composición a base de azúcares neutros, hexosaminas, ácido 3-desoxi-D-manooctulosónico (KDO), ácidos urónicos y, en menor proporción, azúcares metilados y heptosa. Esta composición es similar a la del LPS de otras bacterias Gramnegativas. Al mismo tiempo, se sabe que la composición química e inmunológica de los LPS de Rhizobium varía de una estirpe a otra dentro de una misma especie, y por supuesto a nivel interespecífico. El significado biológico de esta variabilidad en la composición química no está claro y sugiere que el lipopolisacárido no determina la especificidad de huésped.

No se han hecho estudios que involucren al LPS en la formación de los pelos radicales, inducción de poligalacturonasa, efecto sobre la nodulación o adhesión a las raíces, pero se ha descrito que el LPS de algunas estirpes puede reaccionar específicamente con las lectinas de la leguminosa hospedadora (Wolpert y Albersheim, 1976; Planqué y Kijne, 1977; Kato et al., 1979; Kamberger, 1979; Dazzo y Brill, 1979; Bhagwat y Thomas, 1980). En algunos de estos estudios la pureza de las preparaciones de LPS es cuestionable y no se han empleado haptenos como control para eliminar los posibles errores debidos a interacciones inespecíficas.

### 3.- GLUCANOS

Rhizobium produce varios tipos de glucanos neutros. Este grupo de polisacáridos se describió por primera vez en cultivos líquidos de Agrobacterium (Mc Intire et al., 1942) y más tarde en estirpes de Rhizobium (Dedonder y Hassid, 1964; Wolpert y Albersheim, 1976; Zevenhuizen y Scholten-Koerselman, 1979; York et al., 1980). La estirpe USDA135 de R. japonicum parece sintetizar únicamente este tipo de polisacáridos (Watanabe et al., 1982).

Los glucanos de tipo beta-1,2 parecen exclusivos de la Fam. Rhizobiaceae; son polímeros de glucosa de bajo pm (3000-3600 d.), que pueden extraerse por precipitación con etanol a partir de los extractos fenólicos crudos de Rhizobium. La

producción de varios tipos de glucanos con diferentes tamaños moleculares varía de una estirpe a otra, y parece estar relacionada con la estructura del PSE correspondiente (Hisamatsu et al., 1983).

Planqué y Kijne (1977), después de fraccionar el LPS de R.leguminosarum en Sephadex G-50, identificaron una fracción (PS I) con un contenido del 87-96% de glucosa, capaz de reaccionar específicamente con las lectinas de guisante. Este efecto no fue observado con el PSE o con otras fracciones del LPS. Con anterioridad, Humphrey y Vincent, (1975) habían observado en R.meliloti la presencia de un polisacárido con carácter antigénico, de naturaleza diferente al antígeno O o al PSE, capaz de impedir la aglutinación específica de las células por enmascarar al antígeno O. Zevenhuizen y Scholten-Koerselman (1979) y Zevenhuizen (1981) describen el aislamiento de glucanos de varias estirpes de Rhizobium de crecimiento rápido; los glucanos se encuentran intensamente unidos a las células pero, al contrario que el LPS, su síntesis está influenciada por las condiciones de cultivo: constituyen el 10% del peso de la célula en medios ricos en carbohidratos, pero no pueden ser utilizados como material de reserva.

Otro tipo de glucano extracelular se ha descrito en estirpes de R.trifolii que crecen habitualmente formando flóculos (Deinema y Zevenhuizen, 1971). Estos polímeros pueden contribuir a la adhesión no específica de Rhizobium a los pelos radicales.

En R.meliloti L5-30 se han descrito polisacáridos neutros que forman fibrillas polares unidas a la bacteria o que constituyen una red de fibras dispersas en el medio. Ambas estructuras tienen una naturaleza común (glucanos beta-1,2); aunque no se conoce la relación exacta entre la biosíntesis de los dos polímeros, puede pensarse que inicialmente se encuentran unidos a la superficie de las células de donde se van liberando a lo largo del período de cultivo (Da Costa Castro et al., 1983).

Existen indicios a favor de la participación de los be

ta-glucanos en la nodulación. Law et al. (1982) correlacionaron el aumento en la capacidad de formar nódulos de dos es tirpes de R.japonicum deficientes en la síntesis de PSE con la presencia de un polisacárido compuesto principalmente de glucosa. La referencia más directa de la función de los glucanos en la simbiosis fue obtenida por Abe et al. (1982) quienes emplearon beta-glucanos purificados de R.trifoli y obtuvieron un incremento significativo en la formación de ca nales de infección. En cambio, Zevenhuizen y Van Neerven (1984) describen la síntesis de un polisacárido gelificante en R.leguminosarum y R.trifolii compuesto por D-galactosa, D-glucosa y D-manosa (4:1:1), pero no le han asignado ningún papel biológico.

En conclusión, los resultados contradictorios obtenidos por diferentes investigadores trabajando con asociaciones Rhizobium-leguminosa similares pueden explicarse bien por las distintas metodologías empleadas en la extracción y determinación de los receptores de lectinas o porque la mediación de éstas no sea un fenómeno universal. Por ejemplo, exis ten líneas de soja no productoras de lectinas (genotipo le le) que son noduladas eficientemente por estirpes de R.japo nicum (Pueppke, 1981).

El principal indicio en contra del modelo que propone que la expresión de la especificidad ocurre a nivel de la unión de Rhizobium a la superficie del pelo radical por un antígeno específico es el hecho de que una estirpe concreta puede formar nódulos efectivos con un número limitado de le guminosas, pero puede infectar a una gran variedad de plantas formando nódulos inefectivos. Esto se ha demostrado con la estirpe TA1 (NZP574) de R.trifolii, que forma nódulos efecti vos en T.repens e inefectivos en Prosopis chilensis, Sophora flavescens, Robinia pseudoacacia y Phaseolus vulgaris entre otras. Sería muy improbable que todas estas especies vegetales tuvieran en sus raíces un determinante antigénico idéntico al de la lectina de trébol (Robertson et al., 1981). Otros posibles mecanismos, como la simple interacción a nivel de

polisacáridos de superficie, no deberían descartarse como base de la especificidad, tal como ocurre en otros procesos de infección similares, como los que llevan a cabo Agrobacterium (Whatley et al., 1976) y Xanthomonas (Morris et al., 1977).

#### Reconocimiento y especificidad en la asociación Rhizobium-leguminosa:

El término "reconocimiento" se emplea cuando una célula u organismo muestra una respuesta selectiva o específica frente a otra célula u organismo. En las interacciones planta-microorganismo patógeno o simbiote, la hipótesis más difundida postula que las lectinas de la planta reaccionan selectivamente con carbohidratos del microorganismo, constituyendo los determinantes de la especificidad.

Las lectinas son glucoproteínas que se unen de forma característica a carbohidratos específicos (receptores) de manera análoga a la unión antígeno-anticuerpo; por tanto tal unión es no covalente, reversible, de gran afinidad y depende estrechamente de la estructura particular y conformación estérica del carbohidrato receptor. Las lectinas fueron descritas como proteínas presentes en extractos de tejidos vegetales y eran capaces de aglutinar glóbulos rojos: de ahí su primitiva denominación de fitoglutininas o fitohemoaglutininas (Hamblin y Kent, 1973).

Entre las muchas funciones de las lectinas en las plantas (Barondes, 1981), su posible participación en la unión de las bacterias fijadoras de nitrógeno a las raíces de leguminosas ha sido objeto de numerosos trabajos. Hamblin y Kent (1973), demostraron que células de R.phaseoli incubadas en extractos crudos de Phaseolus vulgaris L. eran capaces de aglutinar eritrocitos y éstos se unían a los pelos radicales y raíces laterales (posibles lugares de infección), en mayor proporción que a otras zonas de la raíz. Bohlool y Schmidt (1974) trabajando con lectinas de semilla de soja (SBL) obtuvieron el primer indicio directo de que la unión de las lec-

tinias de la leguminosa hospedadora a la superficie del Rhizobium específico está estrechamente correlacionada con la especificidad de infección exhibida por estas bacterias. Estos autores estudiaron la unión de la SBL parcialmente purificada y marcada con tioisocianato de fluoresceína (FITC-SBL) a 48 estirpes de Rhizobium representativas de varias especies, observando que la interacción tenía lugar con 22 de las 25 estirpes de R.japonicum estudiadas, pero no era detectable en ninguna de las restantes estirpes incapaces de nodular la soja.

En la asociación trébol-R.trifolii también se ha observado una correlación positiva entre la unión a lectinas y la infectividad (Dazzo y Hubbell, 1975 b). Estos autores describieron estructuras antigénicas comunes tanto en la superficie del microsimbionte como en las raíces de la planta hospedadora. La presencia de estos antígenos se determinó por técnicas de inmunofluorescencia, aglutinación y radioinmunoensayo, observando que el título del suero anti-raíz de trébol era, en la mayoría de los casos, superior frente a estirpes infectivas de R.trifolii que frente a estirpes no infectivas.

Diferentes investigadores han examinado otros sistemas Rhizobium-leguminosa para tratar de establecer una correlación similar. Dazzo y Hubbell (1975 a) estudiaron la unión de la lectina de Canavalia ensiformis (Concanavalina, Con A), a 19 estirpes de Rhizobium demostrando que la FITC-Con A purificada reaccionaba con todas las estirpes independientemente de su capacidad de nodular dicha leguminosa. Law y Strijdom (1977) abordaron el mismo tipo de ensayo con lectinas de Pisum sativum, Phaseolus vulgaris, Glycine max, Lotononis bainesii y Aspalathus linearis, y varias especies de Rhizobium, observando igualmente que no existía una relación directa entre la capacidad de nodular determinadas plantas y la unión a las lectinas de las mismas. Chen y Phillips (1976) estudiaron la adhesión de varias especies de Rhizobium marcadas con  $P^{32}$  a las raíces de diferentes leguminosas para averiguar si existía una unión preferencial a la planta hospeda

dora homóloga. Los resultados negativos pusieron de manifiesto una vez más la ausencia de tal correlación y la de cualquier patrón específico en la unión a las lectinas correspondientes.

Es difícil evaluar el significado de los resultados expuestos anteriormente, ya que en la mayoría de ellos no se describen las condiciones, composición y edad de los cultivos. Según Bhuvanewari et al. (1977) y Bhuvanewari y Bauer (1978), estos parámetros son de gran importancia, pudiendo condicionar los resultados in vitro. Otros problemas adicionales que pueden enmascarar los resultados derivan de la pureza y actividad de las preparaciones marcadas de lectinas. Además, estas moléculas pueden dar lugar a reacciones inespecíficas, de modo que habría que recurrir al empleo de haptenos como única forma de asegurar que la unión observada se debe a una interacción lectina-carbohidrato.

La hipótesis de las lectinas, pese a los resultados contradictorios, supone el primer intento de establecer las bases moleculares del proceso de reconocimiento y unión específica de Rhizobium a las raíces de la leguminosa hospedadora. Sin embargo, se ha sugerido que el punto de reconocimiento no tiene por qué estar necesariamente relacionado con el proceso de adsorción específica (Broughton, 1978; Schmidt, 1979; Bauer, 1981).

La identidad bioquímica de los receptores de las lectinas, (hipotéticos componentes de la superficie bacteriana responsables de la especificidad) ha sido objeto de numerosos trabajos, centrados sobre todo en los polisacáridos de superficie. La bibliografía correspondiente ya ha sido descrita en un apartado anterior.

#### Papel del polisacárido extracelular "ex planta":

Desde que se tuvo conocimiento de que cultivos puros de Rhizobium podían fijar nitrógeno en ausencia de la planta, diversos autores han tratado de establecer las condiciones

óptimas necesarias para desreprimir la nitrogenasa (Keister, 1975; Kurz y La Rue, 1975; Mc Comb et al., 1975; Pagan et al. 1975; Tjepkema y Evans, 1975).

Hasta ahora, los resultados positivos se han limitado a unas pocas estirpes de crecimiento lento: Bradyrhizobium japonicum y Rhizobium spp. del grupo "cowpea", no siendo posible desreprimir la nitrogenasa en estirpes de R.leguminosarum, R.meliloti, R.phaseoli y R.trifolii, con algunas excepciones (Bedmar y Olivares, 1979; Skotnicki et al., 1979). Estos últimos autores observaron que la resistencia a espectinomina permitía la expresión de la nitrogenasa en cultivos puros de Rhizobium de lento y rápido crecimiento.

La observación empírica de que algunas estirpes de Bradyrhizobium capaces de reducir acetileno in vitro eran menos productoras de exopolisacárido que las estirpes incapaces de desreprimir su nitrogenasa, condujo a Agarwall y Keister (1983) a realizar una serie de estudios encaminados a establecer la relación entre la síntesis de polisacárido extracelular y la actividad nitrogenasa ex planta. Estos autores de muestran que bajo condiciones de microaerofilia no existen diferencias en la síntesis de exopolisacárido y que las estirpes capaces de desreprimir su nitrogenasa producen significativamente menos polisacárido que aquellas que no presentan actividad fijadora in vitro. Esta correlación sugiere que la búsqueda de fenotipos poco mucosos puede ser un método apropiado para seleccionar estirpes de Rhizobium con actividad nitrogenasa ex planta.

## INOCULANTES

En 1895 Nobbe y Hiltner (Fred et al., 1932) patentaron en Inglaterra y Estados Unidos la comercialización de cultivos puros de Rhizobium, bajo el nombre de "Nitragin". Los primeros inoculantes comerciales consistían en un cultivo puro de la estirpe de Rhizobium deseada, crecida en frascos de vidrio sobre un soporte sólido a base de sacarosa, asparagina, gelatina y un extracto acuoso de la leguminosa para la cual iba destinado el cultivo.

El deseo de disponer de un único producto comercial, destinado a varias especies de leguminosas, condujo a la elaboración de los denominados "cultivos universales" (Fred et al., 1932). En algunos casos llegaron a mezclarse rizobios específicos de los grupos de leguminosas más representativos. Aunque con este tipo de inoculantes se lograba la formación de nódulos, los resultados eran muy variables. En la actualidad, la mayoría de las empresas productoras de inoculantes ponen a la venta inoculantes a base de una sola estirpe de Rhizobium. No obstante, Nitragin Co. comercializa en Estados Unidos un inoculante con estirpes de R.meliloti y R.trifolii y otro producto comercial destinado a varias leguminosas pertenecientes al grupo de inoculación de R.leguminosarum. De acuerdo con los resultados de Clark (1980), empleando una sola estirpe de R.phaseoli recomendada para un determinado cultivar se obtienen tasas superiores en la fijación de N<sub>2</sub> que con inoculantes comerciales mixtos.

Actualmente los inoculantes para leguminosas se emplean con dos objetivos. En primer lugar, la inoculación es requerida para el establecimiento de cultivos de leguminosas en nuevos habitats donde no existen los rizobios específicos. En estos casos el incremento en los rendimientos del cultivo es muy importante si se logra una buena nodulación y el contenido de nitrógeno del suelo es bajo. Hickey et al. (1974) obtuvieron incrementos del 92%, en comparación con los controles sin inocular, en la producción del cacahuete (Arachis hypo-

gaea L.) cuando se inoculó el Rhizobium específico en suelos donde nunca se había cultivado esta leguminosa. Otros estudios con soja (Weber et al., 1971; Okon et al., 1979) y cacahuete (Reddy y Tanner, 1980) confirman la necesidad de inocular cuando no existe en el suelo el microsimbionte específico. En ensayos de campo con Lupinus sp. llevados a cabo en dos localidades de la provincia de Sevilla, el incremento en los rendimientos (peso de grano) fue tres veces superior, como consecuencia de la inoculación de la semilla con R.lupini, con respecto a los controles sin inocular en suelos donde no existía una población autóctona. En la localidad donde estaba establecida una población natural de R.lupini, las producciones fueron del mismo orden que los controles sin inocular (F. Temprano, comunicación personal).

Un segundo objetivo de la inoculación es desplazar una población de rizobios inefectiva por otra de mayor eficiencia simbiótica. En este caso el éxito de la inoculación depende de un conocimiento previo de las características de la población natural en términos de competitividad, efectividad y tamaño (Reyes y Schmidt, 1979; Ham, 1980; Robert y Schmidt, 1983). Por ejemplo, en un estudio sobre la nodulación en soja fue necesario emplear una dosis de inoculación mil veces superior al tamaño de la población indígena para conseguir el establecimiento del inóculo (Weaver y Frederick, 1974). Sin embargo, Meade et al. (1985) trabajando con R.leguminosarum no lograron introducir la estirpe deseada en un suelo que contenía aproximadamente  $3 \times 10^4$  rizobios por gramo e incluso empleando dosis de  $1 \times 10^8$  bacterias por semilla sólo lograron un 33% de ocupación de los nódulos. Los rizobios del suelo, aún siendo poco efectivos pueden ser altamente competitivos en la formación de nódulos, precisamente por estar mejor adaptados a las condiciones ambientales y edáficas locales (Winarno y Lie, 1979).

En otras circunstancias, la efectividad simbiótica de la población natural puede ser muy variable y la inoculación de las semillas puede contribuir a estabilizar las tasas de

fijación de nitrógeno e incrementar los rendimientos del cultivo. No obstante, existen numerosos informes que señalan la ausencia de una respuesta significativa a la inoculación con estirpes mejoradas de Rhizobium (Kapusta y Rouwenhorst, 1973; Weaver y Frederick, 1974; Nelson et al., 1978; Boonkerd et al., 1978; Dunigan et al., 1980). Para afrontar estas situaciones se realizan estudios de competitividad durante el proceso de selección de estirpes y se diseñan distintas estrategias de inoculación y manejo de suelos (Brockwell, 1981).

### PRODUCCION DE INOCULANTES

#### 1.- Selección de las estirpes de Rhizobium:

Hay tres características importantes que deben tenerse en cuenta con vistas a la selección de estirpes Rhizobium destinadas a la producción de inoculantes. En primer lugar la estirpe debe ser capaz de infectar las raíces de la leguminosa específica (Infectividad). Además, las estirpes deben ser altamente efectivas en la fijación de nitrógeno atmosférico (Efectividad). Por último, la estirpe a seleccionar deberá ser capaz de competir en la formación de nódulos con otras estirpes que colonizan el suelo (Competitividad).

Las características simbióticas de Efectividad e Infectividad se determinan en condiciones controladas, debido a la facilidad y rapidez con que se puede comparar un gran número de estirpes a bajo coste. Las técnicas de selección son bien conocidas (Vincent, 1970), y consisten básicamente en el cultivo de plantas en medio aséptico y libre de nitrógeno. Las plantas se inoculan con las estirpes específicas de Rhizobium a ensayar y, transcurrido el tiempo necesario para el establecimiento y desarrollo de la simbiosis se aplican diferentes metodologías para evaluar la efectividad en la fijación de nitrógeno.

Uno de los métodos directos de determinación de la eficiencia simbiótica es el análisis del contenido de N total

acumulado por la planta y del N proteico y no proteico (Bergersen, 1980). La determinación del peso seco de la planta es otro índice para estimar la efectividad de la fijación (Sadykov et al., 1983). DeJong et al. (1981) han señalado que la superficie foliar es un parámetro fisiológico muy representativo de la capacidad de fijar  $N_2$  en la asociación R. leguminosarum-Pisum sativum.

Entre las estimaciones indirectas de la fijación de  $N_2$ , la reducción de acetileno ( $C_2H_2$ ) a etileno ( $C_2H_4$ ) se considera un método de ensayo simple, económico y muy sensible. Aunque el  $C_2H_4$  puede medirse colorimétricamente (La Rue y Kurz, 1973) o por espectrometría de masas (Dilworth, 1966), la detección por cromatografía gaseosa (Hardy et al., 1968) es la más común y sensible.

Recientemente, Bedmar et al. (1984) evaluaron la fiabilidad de la técnica de reducción de acetileno por cromatografía gaseosa en los ensayos de rutina de selección de estirpes y, concluyeron que la aplicación de esta metodología estaría reservada sólo a aquellos casos donde las diferencias en la efectividad superen las desviaciones entre repeticiones. Las causas de la gran variabilidad observada provienen del hecho de que la medida de la actividad nitrogenasa por esta técnica es una estimación puntual, que puede verse afectada por distintos factores: tiempo de establecimiento de la simbiosis, temperatura, luz, presión parcial de  $O_2$  y concentración de  $CO_2$ , entre otros (Dixon y Blunder, 1983).

El concepto de competitividad fue introducido en 1942 por Nichol y Thornton, y ha sido objeto de numerosos estudios a nivel de laboratorio o de campo (Amarger, 1981; Jansen van Rensburg y Strijdom, 1982; Robert y Schmidt, 1983; Meade et al., 1985).

Los factores implicados en la determinación de la competitividad aún no están bien definidos, pero es posible que incluyan características de la planta y de Rhizobium. Algunas

podrían ser:

- a) El número relativo de las estirpes en el inóculo y en la superficie de la raíz.
- b) La tasa relativa de crecimiento de las estirpes competidoras.
- c) El estado fisiológico de las células de Rhizobium en el momento de la inoculación.
- d) Los factores ambientales como: acidez del suelo, temperatura, nivel de nutrientes, humedad, etc.
- e) La compatibilidad entre la planta huésped y Rhizobium.

En determinadas circunstancias, la escasa competitividad de la estirpe que se pretende introducir puede superarse adicionando un elevado número de bacterias en el inóculo (Weaver y Frederick, 1974; Bohlooly Schmidt, 1973), pero en la práctica resulta difícil obtener una concentración tan elevada como para desplazar a la población natural. No obstante, Hale (1981) aplicando inoculantes líquidos y granulares, directamente al suelo, consiguió incrementar el número de nódulos formados por la estirpe inoculada (más efectiva) y en consecuencia aumentar la producción de materia seca de las plantas. Otra posible estrategia consiste en el empleo de genotipos vegetales capaces de restringir la nodulación de ciertas estirpes muy persistentes e inefectivas (Keyser, 1985).

Jansen van Rensburg y Strijdom (1982 b) estudiaron la competitividad de varias estirpes de R.meliloti y concluyeron que la capacidad competitiva era un fenómeno complejo, no relacionado con propiedades o condiciones específicas de la simbiosis Rhizobium-leguminosa. Así las estirpes más competitivas no eran necesariamente las más efectivas. Resultados similares fueron descritos por Franco y Vincent (1976).

Tampoco la capacidad de persistir en el suelo parece estar relacionada con la competitividad de cada estirpe. En este sentido, los trabajos de Moawad et al. (1984) y Moawad y Bohlool (1984) en soja y Leucaena respectivamente, ponen de manifiesto que no existe una correlación directa entre una mayor colonización de la rizosfera por una estirpe y su pos-

terior presencia en los nódulos formados. Resultados similares se han obtenido con estirpes de R.phaseoli (Robert y Schmidt, 1983) Y R.leguminosarum (Bohlool et al., 1984).

La relación entre la tasa de crecimiento de las estirpes competidoras y su capacidad competitiva se ha estudiado sobre todo en los sistemas simbióticos de leguminosas tropicales. Franco y Vincent (1976) en un estudio con Macroptilium atropurpureum y Stylosanthes guianensis, encontraron que estirpes de crecimiento lento o estrechamente relacionadas, eran más competitivas entre sí que estirpes de crecimiento rápido. La mayor capacidad de las estirpes de lento crecimiento para colonizar la rizosfera no era afectada por la planta huésped, sino que era una característica de la estirpe. Hay que señalar que, en este estudio, la estirpe de crecimiento rápido era inefectiva y por tanto pudo haber algún tipo de selección de la estirpe efectiva por parte de la planta, como se ha sugerido en otras asociaciones (Robinson, 1969).

Algunos estudios han señalado que determinadas características del microsimbionte pueden tener un papel importante en la colonización de la rizosfera y sobre la posterior formación de nódulos. Puesto que las bacterias pertenecientes al género Rhizobium son bacilos móviles en vida libre, se ha sugerido que la movilidad puede ser importante en alguna etapa del proceso previo a la formación de nódulos. Ames y Bergman (1981) demostraron que una estirpe silvestre de R.meliloti era más competitiva que dos mutantes, uno no flagelado ( $\text{Fla}^-$ ) y otro flagelado pero no móvil ( $\text{Mot}^-$ ). Esta ventaja competitiva permite que los bacilos puedan moverse por un gradiente de sustancias atractantes (exudados radicales) (Rovira, 1965; Gitte et al., 1978; Gaworzewska y Carlile, 1982) y aumentar la probabilidad de entrar en contacto con la planta huésped. Otra posible ventaja competitiva podría deberse a la presencia y actividad de determinados enzimas hidrolíticos producidos por Rhizobium (Hubbell et al., 1978; Martínez-Molina et al., 1979).

En otras ocasiones se ha determinado la importancia de

los factores ambientales sobre la capacidad competitiva de estirpes de R.japonicum (Kosslak y Bohlool, 1985). Por ejemplo la temperatura del suelo alteró la competitividad de las estirpes de R.trifolii (Hardarson y Jones, 1979). Russell y Jones (1975) demostraron que el pH del suelo condicionaba la presencia de determinadas estirpes, de forma que las más efectivas eran más competitivas en condiciones de acidez. A su vez, Jansen van Rensburg y Strijdom (1982 a) observaron que conforme aumentaba la acidez del suelo había un cambio significativo en la proporción relativa de las estirpes que constituían el inóculo.

El tipo de planta huésped elegida para determinar la competitividad de las estirpes también puede modificar esta característica. Muchos trabajos señalan la gran variabilidad existente en las asociaciones entre un mismo microsimbionte y distintas plantas huésped (Hardarson et al., 1981, 1982). Estas diferencias en la compatibilidad microbio-planta no solo se reflejan en una distinta eficiencia simbiótica (Mc Gregor et al., 1983), sino que también determinan que estirpe formará la mayoría de los nódulos cuando se aplica un inóculo mixto. En ocasiones, estas diferencias se ponen de manifiesto incluso entre cultivares de una misma especie (Russell y Jones, 1975; Mc Loughlin y Dunican, 1985).

En contraste, otros autores (Bromfield, 1984) no han encontrado ninguna preferencia por una estirpe particular entre distintos cultivares de Medicago sativa, tanto en suelos que contenían una población natural de rizobios como en condiciones controladas. No obstante, se observó una gran variación entre plantas individuales dentro de un mismo cultivar. La disminución de este tipo de variabilidad permitiría una nodulación más uniforme de la estirpe aplicada en el inóculo y en consecuencia, un aumento de la eficiencia simbiótica.

Otros criterios adicionales de selección de estirpes de Rhizobium podrían ser: la capacidad para formar nódulos tempranamente, la persistencia en el suelo, la competitividad saprofítica, la tolerancia a las condiciones desfavorables de

acidez o alcalinidad, la tolerancia a pesticidas, etc., dependiendo de las necesidades concretas en cada caso.

## 2.- Estabilidad genética:

En general, el subcultivo frecuente de las estirpes y la presencia de altas concentraciones de algunos aminoácidos en el medio de cultivo aumentan la frecuencia de variación genética.

Herridge y Roughley (1975) observaron variaciones en el rendimiento de peso seco de plantas de Macroptilium atropurpureum cuando se emplearon distintos subcultivos de la estirpe CB756 de Rhizobium "cowpea". Asimismo, Roughley y Pulsford (1982) detectaron alteraciones a lo largo del tiempo en la efectividad de algunas estirpes de R.trifolii, variaciones en la morfología colonial y tiempo de infección de la estirpe WU425 de R.lupini, y alteraciones en el tipo de colonia en dos estirpes de R.meliloti. Estos datos son ejemplos ilustrativos de la necesidad de comprobar regularmente las características simbióticas de las estirpes destinadas a la producción de inoculantes. La conservación de las características y pureza de los cultivos es uno de los puntos cruciales del proceso.

Entre los métodos de conservación, la desecación a vacío en una solución de sacarosa al 10% y peptona al 5% permite el mantenimiento de la viabilidad sin alteración de las propiedades simbióticas después de varios años de conservación a temperatura ambiente (Roughley y Pulsford, 1982). Los cultivos de Rhizobium se conservan poco tiempo (1 año) en tubos con agar provistos de tapón de rosca, pero se puede aumentar el tiempo a 2-3 años añadiendo una solución de glicerol al 20% y manteniéndolos congelados.

La liofilización es otro método para garantizar la viabilidad de los cultivos tras una conservación prolongada, pero hay riesgo de contaminación durante la preparación y en el momento de recuperar las bacterias.

En un trabajo reciente, Crist et al. (1984) demostraron que diversas estirpes de R.japonicum y del grupo "cowpea" de crecimiento lento eran capaces de mantener la infectividad después de un período prolongado (más de 1 año) en suspensión en agua purificada y desionizada. Incluso el inóculo inicial se multiplica hasta alcanzar concentraciones de  $10^6$ - $10^7$  bacterias/ml. Sin embargo, estirpes de crecimiento rápido de R.meliloti, R.trifolii y Rhizobium spp. (Leucaena) pierden, en las mismas condiciones, la viabilidad a las dos semanas. Los autores sugieren que este método de conservación no sólo ahorra tiempo y trabajo, sino que minimiza el riesgo de alteraciones genéticas derivadas del subcultivo continuo de las estirpes.

### 3.- Obtención de caldos de cultivo:

A pesar de la gran variabilidad en los requerimientos nutritivos de las estirpes de Rhizobium, en general para la multiplicación industrial se emplea un medio a base de sales minerales, extracto de levadura y una fuente de C, habitualmente manitol o sacarosa. El mayor crecimiento que puede obtenerse utilizando una fuente de C específica para cada estirpe no compensa los costes económicos a nivel industrial.

La concentración de extracto de levadura debe ser baja, ya que concentraciones superiores al 0,3% pueden llegar a inhibir el crecimiento o producir deformaciones celulares (Skinner et al., 1977).

Aunque Rhizobium puede crecer en cultivos estáticos, se obtienen mejores rendimientos con una buena aireación. El flujo de aire, según la literatura, varía entre 0.5-120 l de aire/l de medio/hora. Una aireación de 5 l de aire/l de medio/hora es adecuada (Roughley, 1968).

La temperatura de incubación de Rhizobium no es un factor muy crítico. Los rizobios de crecimiento lento son más exigentes que los de crecimiento rápido; en general, temperaturas entre 26-30°C son adecuadas para todas las especies.

La multiplicación en medio líquido puede hacerse en fer

mentadores industriales de gran capacidad (1.000-2.000 litros). En el Servicio de Investigación Agraria de San José de La Rinconada (Sevilla), la multiplicación de las distintas estirpes de Rhizobium para la elaboración de inoculantes a gran escala, se lleva a cabo en cilindros estancos de acero inoxidable (fermentadores) de 80 litros de capacidad total y 60 litros útiles. Están provistos de dos entradas (de aire e inóculo), una salida de aire y un grifo para el vaciado. No disponen de un sistema mecánico de agitación (que sería necesario para mayores volúmenes). El aire estéril, que se suministra para satisfacer la demanda de O<sub>2</sub>, proporciona a la vez una agitación del caldo de cultivo (Labandera et al. 1978).

El tamaño del inóculo que inicia la multiplicación varía entre un 0.1-1%, debiendo proporcionar entre 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> bacterias/ml de medio de cultivo. Un inóculo grande reduce el tiempo de incubación requerido para alcanzar el máximo número de rizobios viables y, en consecuencia, disminuye el riesgo de contaminación.

Los rizobios de crecimiento rápido (con tiempos de generación medios de 4 horas) alcanzan la máxima densidad de población en 36-72 horas, en comparación con las 108-192 horas que necesitan los de crecimiento lento (con 6-12 horas de tiempo de generación).

#### 4.- Soportes para inoculantes:

En determinadas circunstancias se emplean inoculantes líquidos consistentes en suspensiones acuosas de inoculantes a base de turba o cultivos líquidos de Rhizobium (Scudder, 1975; Leffler, 1976; Hely et al., 1976; Brockwell et al., 1980). También se han preparado, con buenos resultados, inoculantes a base de suspensiones oleosas de cultivos liofilizados (Kremer y Peterson, 1982 y 1983). Sin embargo, el método más generalizado de preparar inoculantes para leguminosas consiste en la adsorción de cultivos líquidos de Rhizobium sobre soportes sólidos de naturaleza orgánica o inorgánica. dado que estas bacterias no presentan formas de resis-

tencia, el empleo de un soporte garantiza una mejor supervivencia del inóculo hasta el momento de su aplicación.

El soporte empleado con más frecuencia y mejores resultados es la turba (Roughley, 1976; Strijdom y Deschodt, 1976; Date y Roughley, 1977; Brockwell, 1977), y es utilizada por la mayoría de las firmas comerciales: LIPHA (Francia), NODULAID (Australia), NITRAGIN y LEGUME-AID (Estados Unidos) y España. Otras empresas emplean otros soportes como montmorillonita y kaolinita (DORMAL, Estados Unidos) o cultivos concentrados y congelados (HY-RHIZE, Estados Unidos).

Sin embargo, la turba no es fácil de encontrar en todas las regiones. En países en vías de desarrollo se ha intentado usar otros soportes alternativos como restos de cosecha u otro tipo de material vegetal (hojas, cáscaras de trigo o cahuete, bagazo, fibra de coco, etc.) (Liederman, 1971; Tilak y Suba Rao, 1978; Sparrow y Ham, 1983), soportes minerales como arcillas, arena y suelos (Hiltbod et al., 1980; Chao y Alexander, 1984), diversos tipos de carbones (Crawford y Berryhill, 1983), vermiculita (Sparrow y Ham, 1983), geles de poli acrilamida (Dommergues et al., 1979) o la mezcla de varios soportes como los "CBL carriers": 40% de carbón, 40% de bentonita y 20% de harina de alfalfa (Strijdom y Deschodt, 1976).

Algunos de estos soportes resultan difíciles de manejar ya que requieren un proceso previo de adecuación, y la falta de homogeneidad fisico-química de muchos de ellos puede dar lugar a inoculantes de dudosa calidad. Únicamente en aquellos países donde no se pueda disponer de turba de buena calidad se justifica el empleo de materiales alternativos (Roughley, 1970; Strijdom, 1981).

No obstante, los inoculantes a base de suspensiones oleosas de cultivos liofilizados han dado, en ocasiones, mejores resultados que inoculantes a base de turba (Kremer y Peterson, 1983), no sólo en cuanto al porcentaje de ocupación de los nódulos, sino en términos de rendimiento de cosecha y supervivencia a altas temperaturas. Dommergues et al. (1979)

demonstraron que los inoculantes a base de geles de poliacrilamida permiten una mayor supervivencia de estirpes de R. japonicum a 4°C y 30°C, que los correspondientes a base de turba.

### INOCULANTES A BASE DE TURBA

Resulta difícil a priori establecer la idoneidad de una turba como soporte para la fabricación de inoculantes, ya que se trata de un sustrato orgánico de naturaleza compleja, que puede afectar a la multiplicación de Rhizobium y a su viabilidad.

Los soportes que van a ser utilizados para impregnar los cultivos de Rhizobium deben tener una alta capacidad de retención de agua, de forma que admitan un gran volumen de caldo, y proporcionar unos nutrientes que permitan la multiplicación y supervivencia del inóculo durante el almacenamiento y sobre la superficie de las semillas. Al mismo tiempo, el soporte sirve de protección frente a determinados factores bióticos y abióticos, incluyendo los compuestos tóxicos liberados por las semillas, que pueden afectar negativamente a la viabilidad de Rhizobium. El único modo de selección de una turba es realizar ensayos previos con las estirpes que se van a emplear, siguiendo la evolución de la población microbiana bajo distintas condiciones de esterilidad y almacenamiento, durante el tiempo que se estime que pueda estar en vigor el uso del producto.

#### 1.- Preparación de la turba:

##### 1.1.- Desecación

Cuando se extrae de las turberas, la turba presenta un alto contenido de agua (70-90%). La primera manipulación consiste en desecarla. En ocasiones también es necesario eliminar restos vegetales groseros o disgregar grumos. La temperatura de desecación no debe exceder los 90°C, ya que

se puede producir una degradación de la turba con liberación de sustancias tóxicas que podrían afectar el crecimiento y/o la supervivencia de Rhizobium.

### 1.2.- Neutralización

La mayoría de los depósitos de turba son de naturaleza ácida, por lo cual es necesario hacer una neutralización. El  $\text{CO}_3\text{Ca}$  es el agente neutralizante más apropiado y se añade en proporción variable según la acidez de la turba, hasta obtener un pH de 6.5-7.0. Otros productos como el  $\text{NH}_4\text{OH}$ ,  $\text{CO}_3\text{K}$  y  $\text{CO}_3\text{Na}$  limitan el crecimiento y la posterior supervivencia de Rhizobium. El neutralizante se adiciona normalmente a la turba antes de molerla hasta un tamaño de partícula inferior a 80 nm (200 mesh).

Un problema adicional que pueden presentar algunas turbas es un alto contenido en cloruro de sodio, que puede provocar pérdidas en la viabilidad de los rizobios. La cantidad de sal puede variar de un año a otro y a lo largo del año, dependiendo del régimen de lluvias. En otros casos, el lavado de la turba con agua de bajo contenido en sales puede reducir el contenido de  $\text{ClNa}$  a niveles satisfactorios.

### 1.3.- Esterilización

La esterilización del soporte proporciona inoculantes de mayor calidad, ya que Rhizobium sobrevive más satisfactoriamente en turba estéril que no estéril.

Los inoculantes a base de turba estéril generalmente se almacenan durante un período de 4-5 semanas después de la inoculación a  $20^\circ\text{C}$ - $27^\circ\text{C}$ , para permitir un aumento de la población de rizobios (maduración o curación del inoculante) (Burton, 1976 y 1981). Según Burton (1976) este proceso permite la adaptación de Rhizobium al soporte.

La elección del método de esterilización depende del tipo de envase que se emplee para distribuir el inoculante, del número de cultivos que se preparen y de la tecnología disponible.

### 1.3.1.- Calor húmedo

El autoclavado proporciona una esterilidad absoluta del soporte, pero tiene un inconveniente derivado del tipo de material que debe emplearse en el envasado: vidrio o bolsas autoclavables. En el primer caso, los costes de producción aumentan; en el segundo, las bolsas de polipropileno o polietileno de alta densidad pueden limitar la difusión de O<sub>2</sub> al inoculante.

### 1.3.2.- Irradiación gamma

Cuando las condiciones lo permiten, el tratamiento con radiaciones gamma es el mejor método de esterilizar la turba, ya que no hay riesgo de que se desnaturalice. La turba se empaqueta en bolsas de polietileno de baja densidad y se irradia a una dosis de 5 a 7 megarads; con este nivel de radiación no queda totalmente estéril aunque el número de contaminantes permanece muy bajo frente a elevadas concentraciones de Rhizobium (superiores a 10<sup>9</sup>/g) después de 12 meses.

### 1.3.3.- Esterilización química

Se ha empleado óxido de etileno o bromuro de metilo (Deschodt y Strijdom, 1975) con resultados muy variables, debido a las dificultades de penetración y posterior eliminación del gas, lo que resulta difícil de lograr si el soporte está embolsado o se trata de grandes volúmenes.

En el proceso denominado "flash drying", la turba se calienta hasta 650°C durante 2-3 minutos como máximo. El contenido de humedad se reduce hasta un 7-9% y la microflora contaminante queda prácticamente eliminada; debido a la rapidez del proceso la turba no se degrada.

La esterilización del soporte aumenta de forma considerable los costes de producción de los inoculantes, ya que supone un gasto adicional, sobre todo en mano de obra para la manipulación e impregnación en condiciones estériles. Si no se esteriliza, como es habitual a escala industrial, la impregnación se lleva a cabo en una mezcladora hasta conseguir un producto uniforme, y a continuación se embolsa. En este caso

los inoculantes no se dejan madurar, para evitar que crezca la flora contaminante, sino que se almacenan a 4°C hasta el momento de su distribución; en consecuencia, para la obtención de inoculantes de calidad los caldos de impregnación deben contener al menos  $10^9$  rizobios por mililitro, ya que la población inicial no se multiplica.

#### 1.4.- Envasado

Con respecto a la forma de distribución de los inoculantes, ésta ha evolucionado desde botellas de vidrio o latas selladas de los primeros productos comerciales, hasta las bolsas de polietileno de media o baja densidad que se emplean actualmente. Existe sin embargo, una gran controversia sobre la capacidad de intercambio de gases de los distintos envases y su efecto sobre el crecimiento y la supervivencia de Rhizobium. Según Roughley (1968) las bolsas de polietileno o poliamida con un 6% de capacidad de intercambio gaseoso son los materiales más adecuados para el envasado y distribución de los inoculantes.

#### CONTROL DE CALIDAD

La calidad de un inoculante está determinada por la concentración de rizobios y su efectividad en la fijación de nitrógeno en el cultivo al que va destinado. No obstante, las diferentes situaciones ambientales condicionan el comportamiento de un inoculante o la respuesta a la inoculación, de modo que sería irreal establecer a priori unos patrones rígidos de calidad. La experiencia en diferentes países en la práctica de la inoculación sugiere que, cuando no existe una población natural de Rhizobium en el suelo, 100 bacterias por semilla constituyen un inóculo satisfactorio. Pero cuando las condiciones del suelo son desfavorables para la supervivencia del inóculo y/o existe un gran número de rizobios inefectivos, son necesarios niveles superiores a  $10^6$  células por semilla para garantizar el efecto positivo debido a la inoculación (Ireland y Vincent, 1968). En este sentido pueden

hacerse algunas modificaciones en la inoculación, como la humectación de las semillas y el empleo de sustancias adhesivas (goma arábica, carboximetilcelulosa, sacarosa, etc.,). En suelos ácidos, la adición de yeso, carbonato o fosfato de calcio realizando una pildorización de la semilla, favorece el establecimiento y persistencia de la estirpe que se pretende introducir.

#### 1.- Control del caldo de cultivo:

Antes de utilizar el caldo en la impregnación de la turba hay que comprobar que la pureza y concentración del cultivo alcanzan unos niveles mínimos. Normalmente, es suficiente la observación en fresco al microscopio de contraste de fase y la tinción de Gram.

Una primera aproximación de la concentración del caldo se obtiene por turbidimetría y recuento total de células al microscopio, lo cual permite tomar decisiones sobre la continuación del proceso de fabricación. La concentración real del caldo se mide por recuento de viables en placa.

Para la impregnación de la turba deben utilizarse caldos con  $5 \times 10^8$  -  $100 \times 10^8$  o más bacterias vivas por mililitro, sobre todo cuando se emplea turba sin esterilizar, pues el número de bacterias en el momento de la aplicación del inoculante va a depender exclusivamente de la supervivencia de Rhizobium en la turba.

#### 2.- Control del inoculante:

Los controles cuantitativos, previos a la distribución, habrán de determinar las poblaciones rizobianas de los inoculantes de modo que superen unos niveles establecidos. Estos niveles dependen de varios factores, como son las cepas utilizadas, la esterilidad del soporte, la temperatura de almacenamiento y, en general, de las condiciones de empleo del inoculante.

Se suelen dar dos concentraciones mínimas de la pobla-

ción rizobiana del inoculante: una para el momento de la fabricación y otra después de distribuirlo y antes de usarlo.

En España los criterios de calidad exigen  $10^9$  rizobios por gramo de inoculante en la fecha de fabricación y  $10^8$  en el momento de su utilización. El nivel de contaminación no debe superar el 0,1% de la población microbiana. En la mayoría de los países, el control de calidad de los inoculantes lo realizan agencias gubernamentales; sin embargo, en USA, al no existir una normativa federal que regule la calidad de los inoculantes, cada industria regula y controla sus productos. Los controles de calidad están basados en estudios del comportamiento de los inoculantes en relación a la planta huésped; se inoculan las semillas, según las recomendaciones del productor, y se siembran en condiciones estériles en arena o vermiculita. Después de 5-6 semanas se examina la nodulación de las raíces. Si el 90% de las plantas tiene uno o más nódulos en la raíz principal, el inoculante es considerado satisfactorio; aquellos inoculantes que inducen nodulación en un porcentaje de plantas inferior al 67% no se consideran satisfactorios. En estas pruebas, el número de rizobios viables por gramo de inoculante puede ser sorprendentemente bajo.

#### METODOS DE INOCULACION

El método de inoculación más difundido consiste en la aplicación del inoculante sobre la semilla antes de la siembra o simultáneamente, mezclando la semilla y el inoculante en la tolva de la sembradora. Algunas firmas comercializan la semilla preinoculada, aunque la viabilidad de Rhizobium sobre la semilla es baja y algunas semillas liberan sustancias tóxicas (Hale y Mathers, 1977). Vincent y Smith (1981) evaluaron la viabilidad de Rhizobium en semillas preinoculadas de alfalfa y trébol, concluyendo que muchas de las muestras comerciales no contenían un nivel óptimo de rizobios viables. Por otra parte, el peleteado de las semillas favoreció la supervivencia del inóculo en semillas preinoculadas

de alfalfa, pero no hubo diferencias entre las semillas de trébol peleteadas o no.

La técnica del peleteado de las semillas ha sido recomendada en Australia, y presenta las siguientes ventajas:

- a) Modificación del ambiente del suelo en las inmediaciones de la semilla.
- b) Aplicación de un elevado número de rizobios por semilla.
- c) Protección de Rhizobium frente a sustancias inhibidoras liberadas por la semilla o combinadas con ella en el momento de la siembra (fertilizantes, pesticidas, etc.,).

Sin embargo, existen situaciones en las que se recomienda la aplicación directa del inoculante al suelo, como en aquellos casos en los que las semillas están recubiertas de productos tóxicos para Rhizobium, cuando el tamaño de la semilla es demasiado pequeño como para admitir una cantidad mínima de inoculante o cuando se pretende introducir una elevada concentración de rizobios más efectivos en suelos que ya contienen estirpes inefectivas. Para estas circunstancias especiales se aconseja emplear inoculantes líquidos (suspensiones acuosas de inoculantes a base de turba o suspensiones acuosas u oleosas de cultivos concentrados de Rhizobium) inmediatamente antes de la siembra (Brockwell et al., 1980; Gault et al., 1982) o inoculantes granulares que se aplican en el momento de la siembra (Bezdicsek et al., 1978; Burton, 1981).

MATERIAL Y METODOS

### Microorganismos

Rhizobium meliloti, estirpes silvestres GR4, GRO13, GRO15, GRO19, GRO27, GRB1 (Sección de Microbiología, Estación Experimental, del Zaidín, Granada), IS3 (SU-277/1, Dr. Labandera, Uruguay), IS120 e IS122 (733 y 782, E.T.S.I.A., Madrid), 793, 795 y 797 (102F51, 102F58 y 102F65, Nitragin, Milwaukee, USA), RS96 (B251, Dra. Shiel, Argentina), RCR2001 (AH2, Rothamsted, UK), AN3 (Dr. Lesley, Canadá).

R.meliloti, aislamientos propios M-2, M-3, M-4, M-7, M-8, M-11, M-12, M-13, M-16, A-1, A-2 (Melilotus spp., Sevilla), M-17, M-18, M-19, M-20 (Medicago polymorpha, Sevilla), M-21, ..., M-30 (Medicago polymorpha, Badajoz), M-34, ..., M-40 (Medicago polymorpha, Cáceres), MM-M (Medicago marina, Portugal).

R.meliloti GR4C, "curada" por tratamiento de la silvestre GR4 con Naranja de acridina (Palomares et al., 1978).

R.meliloti GRC60, "rugosa", derivada de GR4C por tratamiento con nitrosoguanidina (Olivares et al., 1980).

R.meliloti Rm2, se comporta como sensible a los bacteriófagos DF2, AL1, LO0, FAR y f2D (Corral, 1980).

R.meliloti, mutantes alterados en la síntesis de polisacárido extracelular obtenidos durante la realización del presente trabajo, por tratamiento con nitrosoguanidina: ISM101, ISM102, ISM103, ISM104, ISM105, ISM106, ISM107, ISM108, ISM109, ISM110 y JC4004. Todos derivan de la silvestre GR4. En la sección "Resultados y Discusión" se describen con detalle.

### Plantas

Medicago sativa L. ecotipos Aragón y Tierra de Campos.

Medicago polymorpha ecotipos Terebellum e Inermis.

Medicago scutellata ecotipo Sava.

### Bacteriófagos

DF2, AL1, LO0, FAR y f2D, específicos de R.meliloti (Corral, 1980). Han sido proporcionados por el Dpto. de Microbiología de la Facultad de Ciencias de Granada.

Medios de cultivo

El medio base utilizado para el aislamiento y posterior conservación de las estirpes de Rhizobium en el laboratorio, ha sido el medio M-79 de Vincent (1977), cuya composición es la siguiente:

PO <sub>4</sub> HK <sub>2</sub> .....	0,4 g
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K .....	0,1 g
ClNa .....	0,1 g
SO <sub>4</sub> Mg . 7 H <sub>2</sub> O .....	0,2 g
Cl <sub>2</sub> Fe . 4 H <sub>2</sub> O .....	0,004 g
Cl <sub>2</sub> Ca .....	0,04 g
Manitol (Difco) .....	10,0 g
Extracto de levadura (Difco) .....	1,0 g
Agar (Difco) .....	15,0 g
Agua destilada .....	1.000,0 ml

El pH se ajusta a 6,8-7,0 y se esteriliza a 115 °C durante 20 minutos.

Para los recuentos de microorganismos viables en los inoculantes, se empleó este medio adicionado de Rojo Congo (1:40.000). Este colorante facilita la identificación de Rhizobium en presencia de contaminantes e inhibe el crecimiento de bacterias grampositivas.

Para los estudios fisiológicos de utilización de diversas fuentes de carbono y nitrógeno, se empleó el siguiente medio base:

PO <sub>4</sub> HK <sub>2</sub> .....	0,8 g
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K .....	0,2 g
ClNa .....	0,2 g
SO <sub>4</sub> Mg . 7 H <sub>2</sub> O .....	0,18 g*

Cl <sub>2</sub> Ca .....	0,10 g*
Biotina .....	50,0 µg**
Tiamina .....	100,0 µg**
Agua destilada .....	1.000,0 ml

pH 6,8-7,0

Esterilización 115°C durante 20 minutos.

\*Estas sales se esterilizaron independientemente, separadas de los demás componentes del medio para evitar la turbidez del mismo.

\*\*Las soluciones acuosas de vitaminas se esterilizaron por filtración (tamaño de poro: 0,20µm).

Las fuentes de carbono ensayadas fueron: maltosa, manitol, glutamato sódico, glicerol, galactosa, glucosa, lactosa y sacarosa, a una concentración final del 1 %. Las soluciones acuosas de los distintos azúcares se esterilizaron independientemente de los demás componentes del medio, y se añadieron en condiciones estériles.

Los distintos compuestos de nitrógeno ensayados se añadieron a las siguientes concentraciones:

NO <sub>3</sub> K .....	1,0 g/l
ClNH <sub>4</sub> .....	0,5 g/l
Glutamato Na .....	1,8 g/l
Urea .....	0,3 g/l*
Extracto de levadura .....	1,0 g/l
Extracto de malta .....	1,0 g/l
Agua de levadura .....	100,0 ml/l**
Peptona .....	0,8 g/l

El empleo de distintas cantidades está en función del contenido en N total de cada compuesto, para obtener en cada

medio la misma concentración final de nitrógeno.

\* La solución de urea se esterilizó por filtración (tamaño de poro 0,20 $\mu$ m).

\*\*El agua de levadura es el líquido decantado de la mezcla de 100 g de levadura de panadería en 1.000 ml de agua.

Medio triptona-extracto de levadura (TY) (Beringer, 1974)

Triptona (Oxoid) .....5,0 g  
Extracto de levadura (Difco).....3,0 g  
Cl<sub>2</sub>Ca .....0,84 g  
Agar (Difco) .....15,0 g  
Agua destilada .....1.000,0 ml  
pH 7,0-7,2

Esterilización 115 °C durante 20 minutos.

Medios selectivos

Se empleó el medio M-79 suplementado con distintos antibióticos. Las soluciones acuosas se esterilizaron por filtración (poro: 0,20 $\mu$ m) y se añadieron en condiciones estériles al medio de cultivo para obtener las siguientes concentraciones finales:

Sulfato de estreptomicina (Sigma)...500 mg/l  
Sulfato de kanamicina (Sigma).....25 mg/l  
Tetraciclina base (Sigma).....10 mg/l  
Rifampicina (Sigma) .....30 mg/l

Solución nutritiva para plantas

Para los ensayos de infectividad y efectividad, así como para los diferentes estudios que conllevan la inoculación de plantas , se empleó una solución nutritiva cuya concentración en macronutrientes fue similar a la indicada por

Rigaud y Puppo (1975) y el aporte de micronutrientes siguió las recomendaciones de Hewitt (1952).

Macronutrientes

$\text{PO}_4\text{HK}_2$ .....	200	mg
$\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ .....	200	mg
ClK .....	200	mg
$\text{SO}_4\text{Ca}$ .....	120	mg

Micronutrientes

$\text{SO}_4\text{Mn} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ .....	22	mg
$\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ .....	2,4	mg
$\text{SO}_4\text{Zn}$ .....	3	mg
Sequestrene 138 Fe (Ciba-Geigy)....	250	$\mu\text{g}$
$\text{BO}_3\text{H}_3$ .....	18,6	mg
$\text{MoO}_4\text{Na}_2$ .....	350	$\mu\text{g}$
Agua destilada .....	1.000	ml

pH 7,0-7,2

Esterilización a 115 °C durante 20 minutos.

Aislamiento de estirpes de R.meliloti a partir de nódulos

Para comprobar la estabilidad de los fenotipos (mucoso o rugoso) de los mutantes alterados en la síntesis de PSE, después del pase por plantas de alfalfa, y para la identificación de cada estirpe en los ensayos de competitividad se procedió al aislamiento a partir de los nódulos.

Los nódulos seleccionados se separan de la raíz dejando una parte de la misma adherida para facilitar su manipulación. Se sumergen en etanol al 95 % durante 30 segundos y a continuación en una solución acidificada de bicloruro de mercurio al 0,1 % durante 3 minutos. Se lavan repetidas veces con agua corriente estéril (al menos 6 veces), se añade a cada uno una

gota de solución salina y se aplastan asépticamente con una varilla de vidrio. Con un asa de platino se toca en el jugo resultante y se hace una estria sobre un medio nutritivo apropiado (según los casos, con o sin antibiótico).

Obtención de mutantes de R.meliloti alterados en la síntesis de polisacárido extracelular. Mutagénesis con nitrosoguanidina

La mutagénesis se realizó siguiendo la técnica descrita por Cerdá-Olmedo y Hanawalt (1967), adaptada a R.meliloti. Se utilizó un cultivo de la estirpe GR4 Rif<sup>r</sup> en fase logarítmica (densidad óptica = 0,3-0,5). Después de centrifugar, el cultivo se resuspendió en tampón Tris-maleato. Se añadió N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (Sigma) a una concentración de 150 mg/l y se incubó a 35 °C durante 30 minutos sin agitación. Transcurrido el tiempo de contacto, el cultivo se centrifugó y se lavó tres veces con tampón Tris-maleato. El sedimento se resuspendió en caldo M-79 y se realizó un recuento de microorganismos para determinar el porcentaje de supervivientes tras el tratamiento. Finalmente, el cultivo se diluyó a la mitad y se incubó durante 6-8 horas a 28 °C para permitir la segregación de los hipotéticos mutantes.

A partir del cultivo mutagenizado, se sembraron unas 100 cajas con medio M-79, convenientemente diluido para obtener colonias bien separadas. Se seleccionaron visualmente unas 120 colonias de aspecto y morfología anómala. Estos posibles mutantes se purificaron tras sucesivas siembras en medio M-79 adicionado de rifampicina (30 mg/l). Sólo se conservaron y propagaron como estirpes aquellos que mantenían de forma estable una morfología colonial alterada.

Selección de mutantes espontáneos resistentes a antibióticos

A partir de un cultivo líquido de la estirpe GR4 (u otra) en fase exponencial de crecimiento, se sembraron cajas con medio complejo M-79 adicionado de Rojo Congo y del antibiótico

correspondiente a las concentraciones ya señaladas. Se siembran 0,1 ml de una dilución apropiada para obtener unas 30 colonias por caja, teniendo en cuenta que la frecuencia de obtención de mutantes espontáneos resistentes a antibióticos es de  $10^{-6}$ - $10^{-9}$ , dependiendo del antibiótico y de la estirpe. Normalmente las colonias aparecen al cabo de 5-7 días de incubación a 28 °C, dependiendo de la tasa de crecimiento de cada estirpe. Una vez desarrolladas las colonias se transfieren a tubos con medio M-79 y se conservan a 4 °C.

#### Enriquecimiento de las suspensiones de fagos

Se llevó a cabo según la técnica de la doble capa (Adams, 1966) utilizando medio de Vincent, tanto para la capa base como para la capa superior de medio semiblando.

Esta técnica consiste en mezclar 0,1 ml de la suspensión del fago con 0,2 ml de un cultivo saturado de la estirpe sensible en tubos que contienen 5 ml de medio semiblando, mantenidos en sobrefusión a 45 °C en un baño de agua. La mezcla se vierte a continuación sobre la capa base, y una vez solidificada se incuban las placas a 28 °C. Si la proporción fago-bacteria ha sido apropiada, a las 24 horas la lisis será total o subtotal (placas líticas confluentes).

Se recogió la capa superior con una espátula estéril, y se maceró con 3-5 ml de agua destilada sobre un embudo de vidrio provisto de una gasa. El agua de lavado se centrifugó a 5.000 rpm con el fin de precipitar los restos celulares y el agar. El sobrenadante se esterilizó por filtración (poro de  $0,20 \mu\text{m}$ ). Las suspensiones de fagos así obtenidas se almacenan a 4 °C añadiéndoles una gota de cloroformo para evitar posibles contaminaciones.

El enriquecimiento de las suspensiones de fagos siempre se realizó en medio sólido, pues los títulos que se obtienen son superiores en 100-1.000 veces a los que se consiguen en medio líquido. La estirpe bacteriana utilizada fue Rm2.

### Titulación de las suspensiones de fagos

Se realizó siguiendo la técnica anteriormente descrita, pero haciendo la dilución apropiada de la suspensión del fago, de modo que se obtengan placas líticas separadas y contables.

### Fagotipado de estirpes de R.meliloti

Las pruebas de sensibilidad o resistencia a los distintos fagos empleados se han realizado según la técnica derivada de la anteriormente descrita. Las estirpes de R.meliloti se cultivaron en medio líquido M-79 a 28 °C con agitación, hasta alcanzar una concentración de  $10^8$  células/ml. Se tomó 1 ml de estos cultivos y se inocularon tubos con 5 ml de medio semiblando, fundido y mantenido a 45 °C en baño de agua.

La mezcla se vertió directamente sobre placas estériles, sin la capa de medio base, dejando transcurrir unos minutos hasta que estuvieran totalmente solidificadas. Se depositaron gotas de las distintas suspensiones de bacteriófagos y se incubaron a 28 °C sobre una superficie horizontal para evitar que las gotas se mezclaran entre sí.

Este método tiene la gran ventaja de su rapidez, ya que en 24 horas pueden leerse los resultados y además permite ensayar un buen número de estirpes con un escaso gasto de material. La única precaución es que el título de las suspensiones de fagos debe ser como mínimo de  $10^6$  unidades formadoras de placa /ml. Por último y como precaución adicional, en todos los ensayos de fagotipado se prepararon placas inoculadas con la estirpe Rm2 que sirvieron de control de la pureza y título de las suspensiones de los distintos bacteriófagos.

### Curvas de crecimiento

Se ha seguido la técnica usual, empleando tubos de 18 x 200 mm, con 9 ml de medio líquido M-79 inoculados con 1 ml de un cultivo en fase logarítmica de crecimiento ( $10^7$

células/ml). Se incubaron en agitación a 28 °C extrayéndose alicuotas de 1 ml cada 2 horas. Los recuentos se han realizado en el mismo medio solidificado.

#### Utilización de diversas fuentes de carbono y nitrógeno

Se prepararon series de tubos de ensayo de 18 x 200 mm con 9 ml de medio base líquido (ver "Medios de cultivo"). Las distintas fuentes de carbono y nitrógeno se esterilizaron independientemente y se añadieron antes de la inoculación.

Los tubos se inocularon con 1 ml de células lavadas procedentes de un cultivo saturado de cada estirpe a ensayar. Periódicamente se registraron las densidades ópticas de los caldos a una longitud de onda de 540 nm. Se hicieron tres repeticiones por tratamiento (azúcar o compuesto nitrogenado) y unos controles inoculados en el mismo medio pero carentes de nitrógeno y carbono.

Tras estos ensayos cualitativos, se realizaron una serie de estudios encaminados a determinar la concentración óptima de las fuentes de carbono y nitrógeno seleccionadas, así como la concentración mínima de biotina requerida para formular un medio de cultivo definido.

#### Producción de polisacárido extracelular por estirpes de R. meliloti

Para evaluar la producción de polisacárido extracelular (PSE) de los diferentes mutantes obtenidos tras mutagénesis con nitrosoguanidina, se utilizaron cultivos de 7 días en matraces de 250 ml que contenían 100 ml de medio líquido M-79. Se siguió la técnica descrita por Amarger et al. (1967) y que esquemáticamente consta de los siguientes pasos:

- Centrifugación del cultivo a 5.000 rpm durante 30 minutos (en ocasiones fue necesario repetir este paso varias veces, debido a la alta densidad de los cultivos).

- Adición al sobrenadante de dos volúmenes de acetona.
- Obtención del precipitado tras agitación intensa con una varilla de vidrio y secado del mismo.

El material se deseca con una corriente de aire caliente y posteriormente se coloca en un desecador al vacío. A las 24 horas se pesa.

También se determinó la producción de PSE según la fuente de carbono del medio de cultivo. Las fuentes de carbono ensayadas se esterilizaron a parte de los demás componentes del medio y se añadieron a la concentración final del 1 %.

#### Análisis cualitativo de los polisacáridos extracelulares

Para el análisis cualitativo, los extractos secos de PSE se rehidrataron en agua destilada (2 mg/ml) y se hidrolizaron con  $\text{SO}_4\text{H}_2$  1 N durante 10-12 horas. Después de neutralizar con  $\text{CO}_3\text{Ca}$ , el hidrolizado se filtró y se concentró por evaporación. La identificación de los azúcares se realizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizando un cromatógrafo Millipore Lambda-Max, modelo 481.

#### Cultivo aséptico de plantas

#### Esterilización y germinación de las semillas

Las semillas de alfalfa y de especies anuales de Medicago se esterilizaron según las indicaciones de Vincent (1970): las semillas intactas, una vez humedecidas con etanol al 95%, se sumergen durante 5-7 minutos en  $\text{Cl}_2\text{Hg}$  al 2% acidificado con  $\text{ClH}$  puro (5 ml/l). Se agitan vigorosamente para garantizar una buena esterilización superficial y a continuación se lavan unas 6-10 veces con agua destilada estéril. Las semillas estériles se colocan en cajas de Petri con una capa de agar-agua, se distribuyen asépticamente y se invierten para obtener plántulas con radículas derechas y uniformes. Se ponen a germinar a 28°C durante 20-24 horas.

### Cultivo hidropónico

Se ha empleado la técnica descrita por Olivares (1964). Una vez que las plántulas han alcanzado 1-2 cm de longitud, son transferidas en condiciones de esterilidad a tubos de 20 x 200 mm (4 plantas/tubo) que contienen 10 ml de solución nutritiva y un soporte de papel de filtro.

Los tubos se colocan en la cámara de crecimiento para plantas a 20 °C y en condiciones controladas de luz y temperatura. La parte inferior de los tubos se protege de la luz y al cabo de dos semanas las plantas se encuentran en condiciones de ser inoculadas.

Esta técnica se utilizó en los estudios para la determinación del coeficiente de infectividad y rutinariamente cuando fue necesario de disponer de plantas noduladas.

### Cultivo en vermiculita

Para los estudios de competitividad entre estirpes de R.meliloti, las plantas se cultivaron en tubos de 30 x 250 mm con vermiculita humedecida con solución nutritiva. Se sembraron 2 plantas por tubo; una vez inoculados los tubos se colocaron en condiciones controladas de crecimiento: T<sub>a</sub> máx. 25°C, T<sub>a</sub> mín. 20°C, 14 horas de luz y 70% de humedad relativa.

### Cultivo en agar

Para los ensayos de adhesividad y colonización de las raíces se emplearon tubos de 20 x 200 mm que contenían 10 ml de solución nutritiva para plantas agarificada (10 g agar/l) y formando un pico de flauta. Este diseño permite que las raíces crezcan en la superficie del agar y facilita la posterior manipulación de las mismas y el desarrollo de los nódulos.

### Cultivo en "jarros-botella" de Leonard

El sistema empleado para el cultivo estéril de plantas

tiene las siguientes características:

- La mitad superior de la unidad de cultivo consiste en una botella desfondada de cerveza, de 1 litro de capacidad, tamaño que permite cubrirla con una caja de Petri. El uso de botellas de color ambar hace innecesario tener que proteger las raíces de la luz.

- La parte inferior (reservorio), destinada a contener la solución nutritiva, es un frasco de vidrio cuyas dimensiones permiten que la botella invertida encaje perfectamente y que el cuello de la misma penetre hasta 2-4 cm del reservorio.

Se emplea una mecha de gasa, ajustada con algodón al cuello de la botella, de manera que la solución nutritiva ascienda desde el frasco inferior a la botella donde se desarrollan las plantas.

La mitad superior se rellena con vermiculita hasta 4 cm del borde, se humedece con 250 ml de solución nutritiva y se acopla con la otra unidad. El conjunto se une con una tira de papel impermeable, asegurándolo con bandas elásticas o cinta adhesiva. Los "jarros-botella" así preparados se esterilizan en autoclave a 120 °C durante 1 hora.

Las semillas estériles y germinadas se siembran en las botellas y se trasladan a la cámara de crecimiento. Tras la inoculación de las plantas a las 48 horas de la siembra y una vez que su desarrollo se ve limitado por las cajas de Petri, éstas se retiran y se extiende una capa (2-3 cm) de arena parafinada estéril, para evitar contaminaciones ambientales y desecación de la vermiculita.

#### Determinación del grado de infectividad

Se siguió la metodología descrita por Olivares et al. (1980). El ensayo consiste en la inoculación de dos series de tubos, donde crecen plantas de alfalfa (Medicago sativa var. Aragón) con un sistema radicular bien desarrollado. Una vez inoculadas, se añade un antibiótico al cual sean suscepti

bles las estirpes (tetraciclina, a una concentración final de 10 mg/l), a una de las series de tubos 48 horas después de la inoculación. De esta forma se detiene el proceso de infección. Transcurridas 2 semanas, se contabiliza el número de nódulos formados por cada estirpe en presencia y ausencia del antibiótico. La mayor reducción en el número de nódulos en presencia del antibiótico indica una menor velocidad al infectar las raíces, es decir, un menor grado de infectividad.

#### Determinación del coeficiente de competitividad

Se siguió la metodología descrita por Amarger (1981). Se inoculan plantas de alfalfa (Medicago sativa var. Aragón) con inóculos dobles constituidos por la estirpe a ensayar y otra de referencia  $\text{Fix}^-$ . La identificación de los nódulos producidos por cada estirpe del inóculo se realiza visualmente; en contraste con el método clásico que requiere el empleo de estirpes marcadas (normalmente a antibióticos) y el análisis de un elevado número de nódulos.

Para ello se cultivaron plantas de alfalfa en tubos con vermiculita (Véase el apartado "Cultivo aséptico de plantas") a razón de 2 plantas/tubo. Las estirpes cultivadas en medio líquidos M-79 se mezclaron en proporción 4:1 ( $\text{Fix}^-/\text{Fix}^+$ ) en el momento de la inoculación (tamaño de inóculo:  $10^8$  rizobios /tubo). A los 21-27 días de crecimiento en condiciones controladas se extrajeron las plantas y se procedió al recuento de nódulos de cada tipo, fijadores (rosas) y no fijadores (blancos).

#### Estudios de adhesividad

Las plántulas de alfalfa (M. sativa, var. Aragón), previamente germinadas a partir de semillas estériles, se colocan en tubos con agar inclinado semiblando (1 %) preparado con solución nutritiva. Se inocularon  $10^5$  células /tubo (y en los inóculos mixtos  $10^5$  células de cada estirpe). A diversos tiempos se extraen las plántulas y se colocan en tubos de tampón

fosfato (pH 7). Después de una agitación vigorosa, las plántulas se desechan y la suspensión bacteriana se utiliza para sembrar cajas de M-79. Aunque los mutantes  $\text{Exo}^{\text{C}}$  y  $\text{Exo}^-$  tienen una morfología colonial característica, fácilmente distinguible del tipo silvestre (y obviamente entre sí), para los ensayos de adhesividad con inóculos mixtos se emplearon estirpes marcadas ( $\text{Str}^{\text{r}}$  o  $\text{Rif}^{\text{r}}$ ). El marcaje facilita la identificación y no altera las características simbióticas.

### Medidas de la efectividad en la fijación de $\text{N}_2$

#### 1. Peso seco

En algunos ensayos se determinó el peso seco de la parte aérea de las plantas a las 24 horas de secado en estufa a  $90^{\circ}\text{C}$ .

#### 2. Nitrógeno total

Las muestras de la parte aérea secas y molidas se sometieron a mineralización Kjeldahl. El mineralizado se destiló en corriente de vapor y el amonio se recogió sobre una solución de ácido bórico que contenía verde de bromocresol y rojo de metilo como indicadores de pH. La valoración se realizó con  $\text{ClH } 0,2 \text{ N}$ .

#### 3. Reducción de acetileno a etileno

Para la determinación de la actividad nitrogenasa de las diferentes estirpes de R. meliloti estudiadas, se ha seguido la técnica descrita por Koch y Evans (1966) de reducción de acetileno ( $\text{C}_2\text{H}_2$ ) a etileno ( $\text{C}_2\text{H}_4$ ).

Las determinaciones se llevan a cabo en raíces noduladas intactas, que se introducen en frascos de volumen conocido provistos de tapones de caucho herméticos (Subba-Seal). Se retira de los frascos el 10 % de su volumen total y se

reemplaza seguidamente por un volumen igual de acetileno. Las raíces se incuban a temperatura ambiente hasta el momento de la toma de muestras, que se realiza rutinariamente a los 30 y 60 minutos de la inyección de acetileno.

La actividad nitrogenasa se estimó como el etileno formado por reducción del acetileno en un cromatógrafo VARIANT AEROGRAPH, modelo 1400, equipado con un detector de ionización de llama. Se ha empleado una columna Poropack R, malla 80-100, de 150 cm de longitud y 0,32 cm de diámetro interno, a 50° C de temperatura. Como gas portador se empleó nitrógeno a un flujo de 50 ml/minuto. El volumen inyectado de las muestras problema fue en todos los casos de 500  $\mu$ l.

#### Preparación de inoculantes a base de turba

La metodología que se ha seguido para la preparación de inoculantes experimentales es básicamente la misma que se emplea en la fabricación de inoculantes comerciales en las instalaciones del Servicio de Investigación Agraria, Estación Experimental "La Rinconada" (San José de La Rinconada, Sevilla). El proceso se describe a continuación:

Medio de cultivo:

Las estirpes se multiplicaron en medio líquido M-79 durante 3 días en agitación a 28° C.

Soporte:

Como soporte sólido para la preparación de los inoculantes se empleó turba procedente de El Padul (Granada), neutra, finamente molida (malla 200) y seca.

Se prepararon bolsas de 50 g de inoculante mezclando, la turba y el cultivo bacteriano en la proporción adecuada según el contenido de humedad que se desee conseguir, de acuerdo con la fórmula:

$$H = \frac{t \times h + c}{c + t} \times 100$$

- H, humedad final del inoculante  
t, peso de turba (g) .  
h, humedad residual de la turba  
c, volumen de cultivo bacteriano (ml)

La turba se empaquetó en bolsas de polipropileno (Pryphane) de 30 micras de galga, que pueden esterilizarse en autoclave y permiten el intercambio de gases pero no pérdidas de humedad.

Tras el proceso de secado a 80 °C durante 24 horas, la turba tiene un 8 % de humedad residual y un 10 % después de autoclavarla a 115 °C durante 30 minutos. En los tratamientos a base de turba estéril, el inóculo bacteriano se inyecta en condiciones estériles en las bolsas, con la ayuda de una jeringa. A continuación se sella el punto de inyección y las bolsas se masajean vigorosamente hasta que la impregnación de la turba sea homogénea. Por último, se almacena a la temperatura elegida hasta el momento de su utilización.

#### Supervivencia de estirpes de R.meliloti en inoculantes adicionados de polisacárido extracelular

La metodología seguida en la preparación de los inoculantes fue esencialmente la ya descrita; sólo se modificaron los caldos de impregnación. En un caso, el cultivo bacteriano se centrifugó a 5.000 rpm, se eliminó el sobrenadante y las células se recogieron en medio líquido de Vincent libre de nitrógeno y carbono. Los demás tratamientos se prepararon añadiendo soluciones acuosas de PSE estériles al caldo de modo que las concentraciones finales en el inóculo fueran 25, 50 y 100 % más de la cantidad de PSE que la estirpe produce normalmente. Así mismo, se siguió la evolución de la población de rizobios en un inoculante preparado de forma habitual, con un cultivo crecido sin centrifugar y sin adicionarle PSE.

Todos los inoculantes se almacenaron a temperatura ambiente, contenían un 35 % de humedad y se prepararon con turba estéril y no estéril.

#### Curvas de sensibilidad a la radiación ultravioleta

La exposición a la radiación ultravioleta se realizó en medio líquido, con una lámpara Sylvania de 15 W. Los cultivos irradiados se diluyeron antes de sembrar cajas de medio M-79, que se incubaron en la oscuridad para evitar la foto-reactivación.

#### Determinaciones de susceptibilidad a la desecación

Se utilizaron cultivos saturados en medio M-79, con los que se impregnaron recortes de 1 cm<sup>2</sup> de papel Whatman nº 4. Los papeles, colocados en cajas estériles, se incubaron a 28 °C y se rehidrataron a diversos tiempos para determinar el número de células viables.

#### Métodos estadísticos

- Análisis de la varianza: Diseño estadístico completamente al azar.
- Análisis de la varianza: Diseño estadístico factorial 2 x 2.
- Comparación múltiple: Mínima diferencia significativa (Test de Waller-Duncan).
- Correlación lineal: Coeficiente de correlación y ecuación de regresión.
- Test de homogeneidad: Prueba de  $\chi^2$ .

Se ha consultado el Manual de Steel y Torrie (1980) para la aplicación de estos métodos.

RESULTADOS Y DISCUSION

Utilización de fuentes de carbono por estirpes de *Rhizobium meliloti*.

De acuerdo con la literatura, las estirpes de *Rhizobium* son capaces de utilizar una gran variedad de fuentes de carbono; incluso algunas estirpes pueden crecer autotróficamente en presencia de  $H_2$  y  $CO_2$  como única fuente de carbono (Hanus et al., 1979). Otros sustratos carbonados que pueden ser metabolizados por *Rhizobium* son: mono y disacáridos, ácidos del Ciclo de Krebs, aminoácidos y compuestos aromáticos. Las mayores diferencias nutricionales se establecen entre el grupo de especies de *Rhizobium* denominado de crecimiento rápido (Graham, 1964; Elkan y Kwik, 1968) que son menos exigentes respecto al sustrato carbonado, siendo capaces de metabolizar numerosas pentosas, hexosas, disacáridos y ácidos orgánicos; los rizobios de crecimiento lento crecen preferentemente con pentosas.

Para el estudio de los requerimientos carbonados se han utilizado cuatro estirpes de *R.meliloti* cuyas características de crecimiento se detallan en la Tabla 2. Las fuentes de carbono ensayadas fueron: glicerol, manitol, glucosa, galactosa, maltosa, lactosa, sacarosa y glutamato sódico a una concentración final del 1%. Los resultados correspondientes a este ensayo se presentan en la Tabla 3. Se comprobó que las medidas de crecimiento basadas en la densidad óptica de los cultivos reflejaban el número de células viables (unidades formadoras de colonias), incluso en el caso de la estirpe supermucosa JC4004. Los recuentos de viables no se incluyen en las Tablas.

Puede observarse que todas las estirpes presentaron un crecimiento muy uniforme, destacando la mejor utilización del glutamato, tal vez debido al aporte simultáneo de carbono y nitrógeno. No existen diferencias notables entre la utilización de los monosacáridos manitol y galactosa y los disacáridos maltosa, lactosa y sacarosa. Por otro lado, las fuentes de carbono peor utilizadas por todas las estirpes fueron la glucosa y el glicerol.

Tabla 2.

CARACTERISTICAS CULTURALES DE LAS ESTIRPES DE R.meliloti  
EMPLEADAS EN LOS ENSAYOS FISIOLÓGICOS.

Estirpe	Morfología	Tiempo de generación (horas) g	Duración fase exponen cial (horas) E	Población máxima G x 10 <sup>9</sup>
GR4	Mucosa	2,6	21	6,0
GR4C	Compacta	2,6	21	5,0
JC4004	Supermucosa	3,0	25	5,0
GRO27	Mucosa	2,6	21	6,0

Tabla 3.

UTILIZACION DE DIVERSAS FUENTES DE CARBONO POR ESTIRPES DE Rhizobium meliloti.

Fuentes de carbono	GRO27	GR4	GR4C	JC4004	$\bar{x}$
Control	0,39	0,34	0,37	0,39	0,37
Glutamato-Na	6,38	4,95	6,38	2,69	5,10
Manitol	2,86	2,81	2,44	2,76	2,72
Sacarosa	2,94	2,73	2,26	2,68	2,65
Lactosa	2,79	2,59	2,41	2,41	2,55
Maltosa	2,52	2,41	2,16	2,37	2,37
Galactosa	2,39	2,41	1,97	2,33	2,28
Glicerol	2,08	2,00	2,06	1,79	1,98
Glucosa	2,08	2,20	2,00	1,37	1,91
M.D.S. 0,05					0,92

Las medidas de densidad óptica ( $\lambda = 540$  nm) son media de 3 repeticiones.

El tratamiento Control no contiene azúcar.

En consecuencia, se eligió la sacarosa como fuente de carbono para la formulación de un medio definido para el cultivo de estirpes de R.meliloti, no sólo por el buen crecimiento que es capaz de mantener, sino por ser una fuente de carbono muy económica (lo cual es importante con vistas a la multiplicación de las estirpes de Rhizobium a escala industrial).

#### Efecto de la concentración de sacarosa sobre el crecimiento de estirpes de Rhizobium meliloti.

Para determinar la concentración óptima de la fuente de carbono, se realizó un ensayo en el cual se evaluó el crecimiento (D.O.) de cuatro estirpes de R.meliloti cultivadas en medio líquido con cantidades crecientes de sacarosa (Tabla 4). Se ensayaron las siguientes concentraciones: 0, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 y 20.0 gramos/litro. De los datos de la Tabla 4 se deduce que sin fuente de carbono el crecimiento es prácticamente nulo. Concentraciones crecientes de sacarosa hasta 10.0 g/l producen incrementos proporcionales del crecimiento; cantidades superiores de azúcar no se traducen en un aumento significativo de la densidad celular de los cultivos. En consecuencia, se eligió esta concentración (10.0 g/l) como la idónea para ensayos posteriores.

#### Utilización de diversas fuentes de nitrógeno por estirpes de Rhizobium meliloti.

Rhizobium spp. puede crecer con fuentes de nitrógeno muy diversas, inorgánicas (sales de amonio, nitrato, urea, etc.) u orgánicas como aminoácidos, extracto de levadura y de malta, hidrolizado de caseína e incluso peptona (Vincent, 1962). En general el crecimiento con nitrógeno inorgánico es satisfactorio, pero más pobre que cuando se utilizan aminoácidos; una combinación de ambos tipos de fuente nitrogenada da lugar a un crecimiento óptimo (Elkan y Kwik, 1968).

---

Tabla 4.

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE SACAROSA SOBRE EL CRECIMIENTO DE ESTIRPES DE Rhizobium meliloti.

---

Concentración (g/l)	GRO27	GR4	GR4C	JC4004
0	0,09	0,05	0,10	0,10
1	0,84	0,76	0,84	0,66
2	1,22	1,27	1,25	0,86
5	2,00	1,66	1,93	1,48
10	2,00	1,66	1,82	1,52
20	2,00	1,66	1,93	1,57

---

M.D.S. 0,05

0,07

---

Las medidas de densidad óptica ( $\lambda = 540$  nm) son media de 3 repeticiones.

En este estudio se han empleado las siguientes fuentes de nitrógeno: nitrato potásico, cloruro amónico, urea, glutamato sódico, extractos de levadura y malta, agua de levadura y peptona. Las concentraciones se han indicado en el apartado correspondiente de "Material y Métodos".

Los resultados permitieron descartar algunas de las fuentes de nitrógeno como el extracto de malta y la urea, por no permitir un crecimiento adecuado. Los medios en los que se alcanzaron densidades ópticas más altas, en estas condiciones de cultivo, fueron aquellos que contenían glutamato sódico y nitrato potásico. El extracto y agua de levadura permitieron un crecimiento muy uniforme en las cuatro estirpes ensayadas. El cloruro de amonio y la peptona también permitieron un crecimiento satisfactorio (Tabla 5).

Estos resultados aconsejan utilizar nitrato potásico para la multiplicación de estirpes de R.meliloti con fines industriales, debido a que las concentraciones celulares que se alcanzan con esta fuente nitrogenada son del mismo orden que las obtenidas con glutamato, agua y extracto de levadura, y su coste es inferior.

#### Efecto de la concentración de nitrato potásico sobre el crecimiento de estirpes de Rhizobium meliloti.

Una vez determinada la fuente de nitrógeno más apropiada para el cultivo de las estirpes de R.meliloti, se llevó a cabo un ensayo para establecer su concentración óptima. Se emplearon las siguientes cantidades por litro: 0, 0.2, 0.5, 1.0 y 2.0 gramos.

Como cabía esperar, la ausencia de nitrógeno en el medio no permite un crecimiento sustancial de ninguna estirpe (Tabla 6). A medida que aumenta la cantidad de nitrato en el medio el crecimiento de la población bacteriana mejora, pero concentraciones superiores a 1 g/l no se reflejan en un crecimiento superior; por tanto, se eligió esta concentración para posteriores formulaciones del medio de cultivo definido.

Tabla 5.

UTILIZACION DE DIVERSAS FUENTES DE NITROGENO POR ESTIRPES DE Rhizobium meliloti.

Fuentes de nitrógeno	GRO27	GR4	GR4C	JC4004	$\bar{x}$
Control	0,14	0,13	0,12	0,14	0,13
NO <sub>3</sub> K	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
ClNH <sub>4</sub>	1,63	1,52	—*	1,48	1,54
Urea	0,68	—	—	0,57	0,62
Glutamato-Na	2,00	2,00	2,00	1,93	1,98
Extracto de levadura	1,70	1,70	1,70	1,70	1,70
Extracto de malta	0,15	0,09	0,18	0,16	0,14
Agua de levadura	1,70	1,63	1,55	1,52	1,60
Peptona	1,30	1,11	1,22	1,16	1,20
M.D.S. 0,05					0,09

Las medidas de densidad óptica ( $\lambda = 540$  nm) son media de 3 repeticiones.

\*Ausencia de crecimiento.

Tabla 6.

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE NITRATO POTASICO SOBRE EL CRECIMIENTO DE ESTIRPES DE Rhizobium meliloti.

Concentración (g/l)	GRO27	GR4	GR4C	JC4004
0	0,20	0,08	0,18	0,11
0,2	1,25	1,07	1,15	1,11
0,5	1,52	1,42	1,48	1,27
1,0	2,00	1,63	1,78	1,45
1,5	2,00	1,67	1,78	1,50
2,0	2,00	1,70	2,00	1,52
M.D.S. 0,05		0,10		

Las medidas de densidad óptica ( $\lambda = 540$  nm) son media de 3 repeticiones.

Efecto de la concentración de biotina y de distintas fuentes de nitrógeno sobre el crecimiento de estirpes de *R. meliloti*

Los requerimientos vitamínicos se han determinado para muchas especies de *Rhizobium*: en general, las estirpes de *R. trifolii*, *R. meliloti* y *R. leguminosarum* sólo requieren vitaminas del grupo B: biotina, tiamina y pantotenato cálcico (Elkan y Kwik, 1968).

Se realizó un ensayo preliminar para determinar los factores de crecimiento necesarios para el cultivo de las estirpes de *R. meliloti* utilizadas. Para ello se observó la aparición de halos de crecimiento en torno a discos de papel de filtro impregnados separadamente con soluciones acuosas de biotina, tiamina y pantotenato cálcico. Cada disco contenía aproximadamente 1  $\mu\text{g}$  de vitamina. Con las estirpes estudiadas sólo se observó estimulación del crecimiento alrededor del disco de biotina, y en menor grado en torno al de tiamina. Por tanto en posteriores ensayos el medio de cultivo sólo se suplementó con biotina.

Para poder determinar si las concentraciones más altas obtenidas con extracto de levadura eran debidas al efecto de las vitaminas que este extracto aporta, se estudió el efecto de la concentración de biotina en combinación con aquellas fuentes de nitrógeno que resultaron más eficientes (nitrato potásico, extracto de levadura y glutamato sódico).

Las concentraciones de biotina ensayadas fueron: 0, 20, 50, 100 y 200  $\mu\text{g}/\text{l}$ , y las de cada compuesto nitrogenado fueron las mismas que en los estudios anteriores.

Cuando no se añade biotina al medio de cultivo, la única fuente de nitrógeno que permite un crecimiento apropiado es el extracto de levadura (probablemente aporta, entre otras vitaminas, una cantidad suficiente de biotina); además no se observaron diferencias sustanciales del crecimiento al suplementar este medio con cantidades crecientes de biotina (Tabla 7).

Tabla 7.

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE BIOTINA Y FUENTES DE NITROGENO SOBRE EL CRECIMIENTO DE ESTIRPES DE Rhizobium meliloti.

Biotina ( $\mu\text{g/l}$ )	$\text{NO}_3\text{K}$		Extr. levadura		Glutamato-Na	
	GR4	GRO27	GR4	GRO27	GR4	GRO27
0	1,10	1,00	1,57	1,62	1,10	1,00
20	1,45	1,72	1,45	1,59	1,40	1,72
50	1,50	1,72	1,55	1,62	1,50	1,72
100	1,45	1,67	1,57	1,57	1,45	1,77
200	1,35	1,67	1,52	1,62	1,42	1,77
M.D.S. 0,05	-0,05-		-0,10-		-0.07-	

Las medidas de densidad óptica ( $\lambda = 540 \text{ nm}$ ) son media de 3 repeticiones.

Para alcanzar un crecimiento óptimo en los medios a base de nitrato o glutamato, es necesario añadir biotina (20  $\mu\text{g/l}$ ); concentraciones superiores a 50  $\mu\text{g/l}$  no tuvieron un efecto estimulador del crecimiento (Tabla 7).

Determinación del crecimiento de estirpes de Rhizobium meliloti en dos medios de cultivo.

Tras los ensayos cualitativos y cuantitativos preliminares con diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, se formuló un medio de cultivo definido a base de sacarosa y nitrato potásico. Dado que estos estudios fisiológicos se habían llevado a cabo con un número reducido de estirpes, muy relacionadas entre sí, se evaluó la idoneidad de este medio versus el medio complejo M-79 para el cultivo de otras estirpes de R.meliloti de distinta procedencia, incluyendo mutantes alterados en la síntesis de PSE que se describen más adelante.

En la Tabla 8 se presentan los datos correspondientes al crecimiento de las distintas estirpes ensayadas en ambos medios de cultivo (D.O.). Asimismo se determinó el número de rizobios viables en aquellos casos en los que no fue posible diferenciar por turbidimetría el crecimiento alcanzado en uno u otro medio. A primera vista, puede descartarse el empleo del medio definido para el cultivo de las estirpes IS120, 797, 795, M-13, M-12, ISM104 e ISM110, por no presentar un crecimiento satisfactorio en comparación con el medio estándar de cultivo. En contraste, las estirpes GRO27, RS96, IS122, JC4004, ISM102, ISM105 e ISM108, alcanzaron una mayor concentración celular en el medio a base de sacarosa y nitrato. En el caso de las estirpes IS3 e ISM103, el crecimiento fue superior en el medio complejo, pero no se puede descartar totalmente el empleo del medio definido.

Por otro lado, para un grupo de estirpes (GRO15, GRO13, RCR2001, 793, GRC60 e ISM106) no hubo diferencias entre la población alcanzada en uno u otro medio. Por último, no existen

Tabla 8.

EVALUACION DEL CRECIMIENTO DE ESTIRPES DE R.meliloti EN UN MEDIO DE CULTIVO COMPLEJO Y DEFINIDO.

Estirpes	Medio Complejo		Medio Definido	
	D.O.	R.V.x10 <sup>7</sup>	D.O.	R.V.x10 <sup>7</sup>
GRO15	1,52	407	1,55	353
GRO13	1,57	517	1,70	587
RCR2001	1,52	477	1,52	543
793	1,70	447	1,40	453
GRO27	1,63	405*	1,70	517*
GRO19	1,70	387**	1,66	273**
RS96	1,70	505**	1,70	953**
IS122	1,70	483**	1,82	877**
GRC60	1,49	336	1,47	240
GR4	1,46	527**	1,64	183**
JC4004	1,60	336**	1,52	750**
ISM105	1,60	143**	1,82	657**
ISM102	1,70	567**	1,82	787**
ISM103	1,52	—	1,22	—
ISM104	0,80	—	0,08	—
ISM110	1,40	—	0,77	—
ISM108	1,52	147**	1,82	820**
ISM106	1,52	307	1,46	220
ISM107	1,46	377**	1,40	103**
IS3	1,52	—	1,22	—
IS120	1,21	—	0,07	—
797	1,40	—	0,18	—
795	1,70	—	0,07	—
M-13	0,68	—	0,00	—
M-12	0,96	—	0,02	—

Los resultados son media de tres repeticiones.

\*, Recuentos de viables que difieren a nivel de  $p < 0,05$ .

\*\* , Recuentos de viables que difieren a nivel de  $p < 0,01$ .

diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre el crecimiento de las estirpes cuando se cultivan en el medio complejo M-79. En resumen, puede afirmarse que de las 25 estirpes ensayadas 7 crecieron mejor en el medio definido y otras 6 alcanzaron un crecimiento similar en ambos medios; por tanto el medio definido a base de nitrato-sacarosa es adecuado para el cultivo de la mayoría de las estirpes estudiadas.

Con algunas de las estirpes que presentaron un bajo rendimiento con nitrato potásico se ensayaron otras fuentes inorgánicas de nitrógeno (cloruro de amonio y glutamato sódico) y se comparó el crecimiento en estas fuentes con el alcanzado en el medio M-79 (Tabla 9).

En el caso de las estirpes 797 e IS120, la mejor fuente de nitrógeno fue el extracto de levadura; las densidades celulares en los medios con nitrato potásico y cloruro amónico fueron del mismo orden y, el glutamato sódico favoreció ligeramente el crecimiento de la estirpe 797. En las otras estirpes (IS3, 793 y 795) se realizó además un recuento de viables. Las nuevas fuentes de nitrógeno favorecieron el crecimiento de la estirpe 795; sin embargo, el número de rizobios viables no superó la mitad de la población alcanzada en el medio complejo. La estirpe IS3 creció igual en todas las fuentes probadas, pero la población viable en ningún caso superó la mitad de la obtenida con extracto de levadura. Los valores de densidad óptica obtenidos con la estirpe 793 están en relación directa con el número de microorganismos viables.

Estos datos sugieren que el medio definido con nitrato y sacarosa sirve para la mayoría, pero no para todas las estirpes de R.meliloti. Por tanto, a la hora de introducir nuevas estirpes conviene realizar ensayos previos de crecimiento. Además, datos no incluidos en esta Memoria sugieren que algunas estirpes (pero no todas) mejoran su crecimiento en el medio con nitrato y sacarosa tras una serie de subcultivos (presuntamente por selección de mutantes mejor adaptados). El bajo coste del medio con nitrato y sacarosa hace deseable su utilización, siempre que sea posible, a escala industrial.

Tabla 9.

CRECIMIENTO DE ESTIRPES DE Rhizobium meliloti EN DISTINTAS FUENTES DE NITROGENO.

Estirpes	$\text{ClNH}_4$		Glutamato-Na		Extr. levadura	
	D.O.	R.V.x10 <sup>7</sup>	D.O.	R.V.x10 <sup>7</sup>	D.O.	R.V.x10 <sup>7</sup>
IS3	1,22	118	1,25	168	1,60	386
IS120	0,16	—*	0,12	—*	1,20	—*
793	1,22	151	1,36	334	1,70	380
795	1,27	103	1,52	267	1,70	445
797	0,20	—*	0,40	—*	1,40	—*

Las medidas de densidad óptica ( $\lambda = 540 \text{ nm}$ ) son media de tres repeticiones.

\*, Valores no determinados.

Aislamiento de mutantes alterados en la producción de polisacárido extracelular.

La detección de mutantes alterados en la producción de PSE se hizo por observación directa, buscando colonias con morfología alterada. Después de la mutagénesis con nitrosoguanidina y el recrecimiento para permitir la segregación (Véase Material y Métodos) se sembraron placas de medio M-79 con una dilución apropiada para la aparición de 300-500 colonias. Se detectaron tres tipos de colonias con morfología anómala:

1. Colonias muy mucosas, generalmente de color claro y aspecto acuoso.
2. Colonias compactas, de tamaño menor que la media (aunque las colonias silvestres de R.meliloti son de tamaño variable, las compactas siempre son pequeñas).
3. Colonias rugosas, de borde ligeramente irregular y tamaño variable.

Las colonias con morfología anómala se purificaron sobre medio M-79. Sólo se conservaron y propagaron como estirpes aquellas que conservaban de manera estable una morfología alterada (Fotografía 1-4). Ninguno de los mutantes revierte al tipo silvestre a una frecuencia apreciable, ni siquiera tras el pase por planta. Dichas estirpes son las siguientes:

1. Supermucosas ( $\text{Exo}^{\text{C}}$ ): JC4004, ISM101, ISM102, ISM103, ISM104.
2. Compactas: ISM105, ISM106.
3. Rugosas ( $\text{Exo}^{-}$ ): ISM107, ISM108, ISM109, ISM110.

La frecuencia de aparición de mutantes morfológicos es relativamente alta. En condiciones en que la mutagénesis con nitrosoguanidina produce una frecuencia de auxótrofos del 1 al 2%, entre un 0.1% y un 0.5% de las colonias tienen morfo-

Fotografía 1.- Morfología colonial de la estirpe silvestre GR4.

Fotografía 2.- Morfología colonial de la estirpe Exo<sup>C</sup>  
JC4004.

Fotografía 3.- Morfología colonial de la estirpe "compacta" ISM106.

Fotografía 4.- Morfología colonial de la estirpe Exo<sup>-</sup> ISM110.

logía rara. Obsérvese que la mayoría (9/11) de los mutantes morfológicos aislados están afectados en la producción de PSE, ya sea por exceso (5/11) o por defecto (4/11). Más adelante se comentará la posible naturaleza de los mutantes "compactos". La facilidad con que se obtienen mutantes de PSE puede indicar que el método de detección favorece la observación de este tipo de alteraciones. Pero además, dado que parece improbable que la síntesis de polisacáridos extracelulares esté gobernada por un gran número de genes, la facilidad para aislar mutantes de PSE puede tomarse como un indicio de que muchas mutaciones pueden tener efectos pleiotrópicos sobre la producción de exopolisacárido.

El perfil de plásmidos de los mutantes es normal, con una excepción: ISM110 lleva una gran delección en un megaplásmido (J.E. Ruiz-Sáinz y D.N. Rodríguez Navarro, no publicado). Como se trata de una estirpe Exo<sup>-</sup> cabe pensar en la posibilidad de que haya genes eps localizados en los megaplásmidos.

Análisis de la producción de polisacárido extracelular por mutantes de Rhizobium meliloti alterados en la morfología colonial.

La estirpe silvestre GR4 produce diferentes cantidades de PSE dependiendo de la composición del medio de cultivo y sobre todo de la fuente de carbono. Los niveles más altos se obtienen con manitol (90-100 mg/100ml). Otras fuentes aceptables son la sacarosa (50-60 mg/100ml), la maltosa (40-50 mg/100ml) y el glutamato (30-40 mg/100ml). La producción de PSE es escasa o indetectable con glucosa, glicerol, galactosa y lactosa. Estos datos se resumen en la Tabla 10.

Se comprobó que los mutantes Exo<sup>-</sup>, Exo<sup>C</sup> y "compactos" eran auténticos mutantes alterados en la capacidad de sintetizar PSE y no mutantes afectados en la utilización de azúcares: todos ellos conservaban sus características cualquiera que fuera la fuente de carbono empleada.

---

Tabla 10 .

PRODUCCION DE PSE POR LA ESTIRPE SILVESTRE GR4 DE R.meliloti  
CON DIVERSAS FUENTES DE CARBONO

---

Fuentes de Carbono	Peso seco PSE (mg/100 ml)
Manitol	92,3
Sacarosa	57,0
Maltosa	46,3
Glutamato	33,9
Glucosa	-- a
Glicerol	--
Galactosa	--
Lactosa	--

---

Los resultados son media de dos ensayos, con dos repeticiones.

a) Indetectable.

Para estudiar la producción de PSE se eligió el manitol como fuente de carbono. Las determinaciones cuantitativas de la producción de PSE se resumen en la Tabla 11. Puede observarse que todas las estirpes supermucosas producen más PSE que la silvestre; el caso más espectacular es la estirpe JC4004, que casi triplica a la silvestre. Las estirpes rugosas no producen PSE y las compactas producen cantidades intermedias.

En la estirpe silvestre GR4 la síntesis de polisacárido extracelular tiene lugar sobre todo durante la fase estacionaria: cuando se estudia la producción de PSE a lo largo del tiempo no se observa acumulación masiva hasta que el cultivo ha dejado de crecer exponencialmente (Figura 6). En cambio la estirpe JC4004 (y en general las estirpes supermucosas) comienzan a acumular polisacárido extracelular en la fase logarítmica de crecimiento. Aunque en la Figura 6 sólo se compara las curvas de producción de GR4 y JC4004, se obtienen resultados parecidos con ISM101, ISM102 e ISM103. Ello sugiere que las estirpes superproductoras sufren una desregulación (¿ desrepresión ?) de la síntesis de PSE y en principio justifica la denominación de Exo<sup>C</sup> (constitutivas).

Todos los PSE estudiados presentan más de cuatro monómeros diferentes en su estructura y la mayoría de ellos contienen: ácido urónico, galactosa, fructosa, glucosa y uno o dos azúcares más cuya identificación no fue posible. No obstante, la mayor parte de los picos denominados X<sub>1</sub> podrían asociarse con algunos de los siguientes azúcares: trehalosa, celobiosa o maltosa, cuyos tiempos de retención, cuando se inyectan individualmente como patrones puros, oscilan entre 20,5-24,5 minutos. En todos los casos se trata de dímeros de glucosa, consecuencia tal vez de una hidrólisis incompleta.

Los picos denominados X<sub>2</sub>, debido a su elevado tiempo de retención, son más difíciles de identificar. De los 21 patrones empleados, la ribosa presentó el tiempo de retención más alto (aproximadamente 40 minutos); sin embargo éste puede variar cuando dos o más azúcares se inyectan mezclados.

Tabla 11.

PRODUCCION DE POLISACARIDO EXTRACELULAR POR ESTIRPES DE R.meliloti.

Estirpe	Morfología de la colonia	Producción de PSE (mg/100 ml)*	% respecto
GR4	Silvestre	115	100
JC4004	Supermucosa	306	266
ISM101	Supermucosa	156.5	136
ISM102	Supermucosa	154	134
ISM103	Supermucosa	161.5	140
ISM104	Supermucosa	126	110
ISM105	Compacta	82.6	72
ISM106	Compacta	72.6	63
ISM107	Rugosa	indetectable	—
ISM108	Rugosa	indetectable	—
ISM109	Rugosa	indetectable	—
ISM110	Rugosa	indetectable	—

\* Media aritmética de 3 repeticiones.

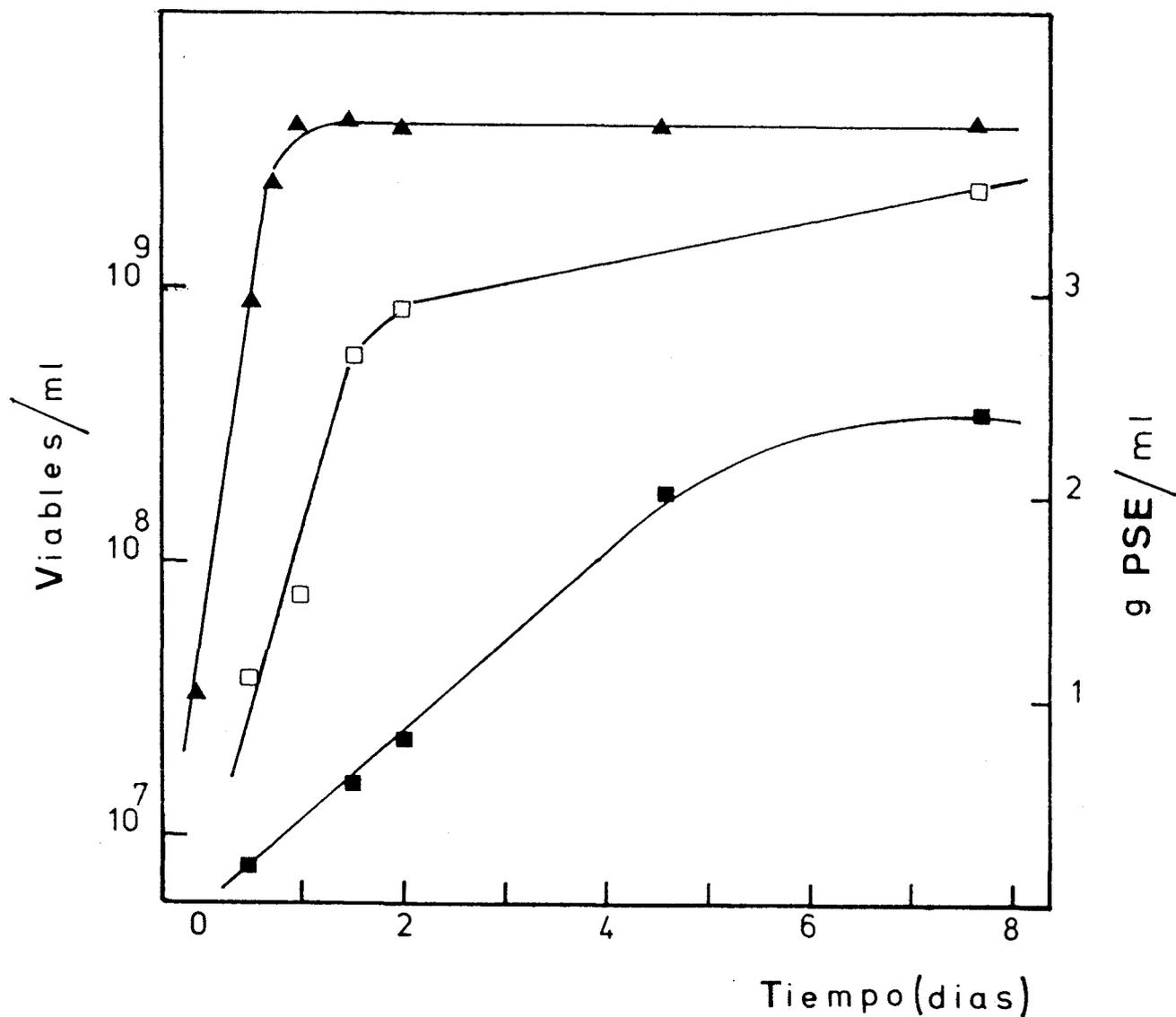


Figura 6.

Producción de PSE a lo largo del tiempo por la estirpe silvestre GR4 (■) y la superproductora JC4004 (□). Las curvas de crecimiento, prácticamente iguales, se han unificado (▲).

Cuando se menciona como ácido urónico a uno de los monómeros constituyentes, nos referimos indistintamente al ácido glucurónico y/o galacturónico, ya que los tiempos de retención de los correspondientes patrones fueron prácticamente indistinguibles (12-13 minutos).

Destaca el hecho de que sólo una estirpe (ISM101) presenta manitol en la composición de su PSE. Cabría pensar, como algunos autores han señalado, en una contaminación del medio de cultivo, pero la escasez de este azúcar y su mínima proporción (2,8 %) sugieren que esa posibilidad pueda descartarse.

El análisis de la composición de los PSE producidos por mutantes  $\text{Exo}^{\text{C}}$  reveló que dichos mutantes podían clasificarse en dos tipos: (a) mutantes superproductores cuyo PSE es idéntico o muy parecido al silvestre; (b) mutantes superproductores cuyo PSE difiere del tipo silvestre, por carecer de algún azúcar (fructosa) o presentar algún azúcar extra (manitol). En sentido estricto, sólo deberían considerarse constitutivos aquellos mutantes superproductores cuyo PSE es idéntico al silvestre, pero no puede descartarse la posibilidad de que alguna mutación de genes estructurales produzcan la síntesis constitutiva de PSE (o viceversa: que la expresión constitutiva cause alteraciones metabólicas que se traduzcan en la síntesis de polisacáridos ligeramente diferentes). En cambio, los mutantes "compactos" producen un PSE de composición idéntica al tipo silvestre. Estos resultados se resumen en la Tabla 12.

Los mutantes  $\text{Exo}^{-}$  producen poco PSE (o nada). En cualquier caso las cantidades producidas son siempre demasiado pequeñas para ser aislado y analizado. Es posible que estos mutantes estén afectados en genes estructurales de biosíntesis de PSE, pero tampoco puede descartarse la existencia de mutaciones regulatorias que originen un fenotipo "negativo no inducible". No se ha llevado a cabo un análisis genético detallado que permita aclarar estos extremos.

Tabla 12.

COMPOSICION DE LOS EXOPOLISACARIDOS DE LA ESTIRPE SILVESTRE GR4 Y DE LOS MUTANTES Exo<sup>C</sup> Y "COMPACTOS" DE Rhizobium meliloti.

Estirpe	Fenotipo	Acidos <sup>a</sup> urónicos	Fructosa	Galactosa	Glucosa	Manitol	Ara/Fuc	X <sub>1</sub> <sup>b</sup>	X <sub>2</sub> <sup>c</sup>
GR4	silvestre	+	+	+	+	-	-	+	+
JC4004	supermucosa	+	-	+	+	-	+	+	+
ISM101	supermucosa	+	+	+	+	+	-	+	-
ISM102	supermucosa	+	+	+	+	-	-	+	-
ISM103	supermucosa	+	-	+	+	-	-	+	-
ISM105	compacta	+	+	-	+	-	-	+	+
ISM106	compacta	+	+	+	+	-	-	+	-

a.- Acidos glucurónico y/o galacturónico, cuyos tiempos de retención son prácticamente idénticos

b.- Dímeros de Glucosa (Trehalosa, Celobiosa y/o Maltosa)

c.- Azúcares no identificados

Los mutantes "compactos" son difíciles de clasificar. Su PSE es parecido o idéntico al silvestre; por tanto la alteración de la morfología colonial podría deberse a la modificación de otras estructuras de la superficie bacteriana. Sin embargo, en la literatura existen precedentes que correlacionan el fenotipo "compacto" con la producción de exopolisacárido: la estirpe 4C de R.meliloti, derivada de la GR4 por curación de un plásmido de 119 Md, forma colonias compactas y produce menores cantidades de PSE que el tipo silvestre (Olivares et al., 1977; Palomares et al., 1978). Ninguno de los mutantes compactos descritos en esta memoria ha sufrido curación de plásmidos; probablemente lleven mutaciones puntuales, ya que han sido obtenidos con nitrosoguanidina. Dichas mutaciones podrían afectar a la estructura del exopolisacárido sin traducirse en un cambio grosero de la composición química. Téngase en cuenta que el análisis de PSE descrito en esta memoria se limita a la determinación cualitativa (o semicuantitativa) por HPLC. Esta técnica no sirve para analizar la presencia o ausencia de constituyentes minoritarios del PSE (por ejemplo O-acetil y O-piruvato), ni detecta por supuesto, alteraciones estructurales. Por tanto, los mutantes "compactos" pueden clasificarse bona fide como mutantes estructurales, pendientes de un análisis químico más completo.

Fagotipo de mutantes de Rhizobium meliloti alterados en la producción de polisacárido extracelular.

Se determinó el fagotipo de la estirpe silvestre GR4 y diversos mutantes  $\text{Exo}^-$ ,  $\text{Exo}^C$  y "compactos". Aunque en la literatura no existen precedentes que indiquen la presencia de receptores para fagos en el polisacárido extracelular de Rhizobium, parece lógico pensar que la alteración de la superficie bacteriana podría afectar a la interacción de los bacteriófagos con sus receptores. Además se sabe que el plásmido pEZ1 de R.meliloti, que rige la sensibilidad a determinados fagos (Corral et al., 1978), controla la producción de PSE (Palomares et al., 1978).

Se utilizó una colección de bacteriófagos específicos de R.meliloti, proporcionada por E. Corral (Fac. de Ciencias, Univ. de Granada) y se comparó el fagotipo de la estirpe silvestre GR4 con el de diversos mutantes  $\text{Exo}^-$ ,  $\text{Exo}^C$  y "compactos" derivados de ella. Además de determinar la sensibilidad o resistencia a cada uno de los bacteriófagos, se estudió la capacidad multiplicadora de las estirpes sensibles (Véase Corral, 1980 y la sección "Material y Métodos").

La estirpe control Rm2 es sensible a los cinco fagos en sayados y perfectamente capaz de multiplicarlos (Fenotipo  $\text{M}^+$ ). En cambio, la estirpe silvestre GR4, es sensible a (y multiplicadora de) los bacteriófagos DF2 y AL1, pero resistente a FAR, LO0 y f2D.

Con una sola excepción, todos los mutantes de exopolisacárido derivados de GR4 presentan el mismo fagotipo: siguen siendo resistentes a los fagos a los que lo era la estirpe parental y, además, son resistentes a AL1. Aunque son sensibles a DF2, son  $\text{M}^-$ . La excepción es la estirpe  $\text{Exo}^C$  JC4004 que presenta exactamente el fagotipo inverso: es resistente a DF2 pero sensible a AL1, FAR, LO0 y f2D; y no multiplica a ninguno de ellos (Tabla 13).

Estos resultados no permiten interpretaciones sencillas. ¿Cómo explicar que todos los mutantes menos uno tengan el mis

Tabla 13.

FAGOTIPADO DE ESTIRPES Exo<sup>C</sup>, Exo<sup>-</sup> y COMPACTAS DE Rhizobium meliloti

Estirpe	Características coloniales	Fagotipo				
		DF2	AL1	FAR	LOO	f2D
GR4	Silvestre	+	+	-	-	-
JC4004	Exo <sup>C</sup>	-	+	+	+	±
ISM101	Exo <sup>C</sup>	+	-	-	-	-
ISM102	Exo <sup>C</sup>	+	-	-	-	-
ISM103	Exo <sup>C</sup>	+	-	-	-	-
ISM104	Exo <sup>C</sup>	+	-	-	-	-
GRC60	Exo <sup>-</sup>	+	-	-	-	-
ISM107	Exo <sup>-</sup>	±	-	-	-	±
ISM108	Exo <sup>-</sup>	+	-	-	-	-
ISM109	Exo <sup>-</sup>	+	-	-	-	-
ISM110	Exo <sup>-</sup>	±	-	-	-	-
GR4C	Compacta	+	-	+	±	±
ISM105	Compacta	+	-	-	-	-
ISM106	Compacta	+	-	-	-	-
Rm2	Compacta	+	+	+	+	+

(+)sensible; (-) resistente; (±) variable según el ensayo.

mo fagotipo?. Téngase en cuenta que esos mutantes pertenecen a varias clases fenotípicas ( $\text{Exo}^-$ ,  $\text{Exo}^C$  y "compactos"). La única conclusión posible es que el fago AL1 no infecta estirpes que no produzcan un polisacárido silvestre y que cualquier alteración del PSE origina resistencia. En la bibliografía hay un precedente que concuerda con esta idea: la estirpe GR4C, que produce un exopolisacárido alterado, es resistente a AL1 (Corral et al., 1978). La pérdida de la capacidad multiplicadora del fago DF2 es más difícil de interpretar: como hipótesis de trabajo cabría pensar en la posibilidad de que la mutagénesis activara profagos defectivos existentes en el genomio de la estirpe GR4: la activación daría lugar a una "inmunidad parcial" que permitiría la lisis desde fuera pero impediría la multiplicación masiva. Esta hipótesis no está avalada por datos experimentales, pero concuerda con algunas observaciones de Corral (1980).

El fagotipo de la estirpe  $\text{Exo}^C$  JC4004 no es menos complicado. Es resistente a DF2, lo que podría interpretarse, en principio, de dos maneras. Una, que los receptores del fago DF2 están en la cápsula. Dos, que la superproducción de PSE constituye una barrera física para la interacción del bacteriófago con sus receptores de la superficie bacteriana. Disponemos de una serie de datos en contra de la primera hipótesis:

1. Mutantes carentes de PSE siguen siendo sensibles al fago DF2 (Véase la Tabla 13).

2. Entre los mutantes resistentes al fago DF2 (aislados como tales) no aparecen colonias con morfología alterada.

Contra la segunda hipótesis puede esgrimirse el hecho de que otros mutantes superproductores de exopolisacárido (ISM101, ISM102, ISM103 e ISM104) son sensibles a DF2. Sin embargo conviene señalar que JC4004 es la estirpe más superproductora de PSE de todas las descritas en esta Memoria (Véase la Tabla 11). La posibilidad de que el PSE constituya un obstáculo para el anclaje del fago en la superficie bacteriana parece, pues, una hipótesis razonable.

Otro hecho sorprendente es la adquisición simultánea de sensibilidad a los bacteriófagos FAR, L00 y f2D, a los que la estirpe parental es resistente y JC4004 sensible. La exclusión mútua DF2/f2D ya ha sido descrita por Corral (1980). La adquisición simultánea de sensibilidad a dos bacteriófagos no relacionados, FAR y L00, es aún más difícil de explicar. Además, la adquisición de sensibilidad a bacteriófagos a los que la estirpe silvestre es resistente entra en contradicción con la hipótesis, antes esbozada, de que la superproducción de PSE pueda entorpecer el contacto entre los receptores bacterianos y las partículas fágicas.

A efectos prácticos y en la línea argumental de esta Memoria, hay que concluir que no se pueden hacer correlaciones sencillas entre la modificación del PSE y el fagotipo. Ello impide diseñar métodos "dirigidos" de aislamiento de mutantes partiendo de estirpes resistente a determinados bacteriófagos o deducir si una estirpe tiene un PSE silvestre examinando su fagotipo.

#### Detección de actividad de despolimerasas de polisacárido inducidas por fagos.

Algunos bacteriófagos específicos de Rhizobium spp. inducen la síntesis de despolimerasas bacterianas que degradan el polisacárido extracelular (Barnet y Humphrey, 1975). Ello se traduce en la aparición de halos alrededor de las placas líticas (Barnet, 1972). Los ensayos de detección de halos en las placas líticas producidas por los fagos DF2, L00, FAR, f2D y AL1 se llevaron a cabo empleando la técnica de doble capa, con los medios de cultivo y condiciones descritas anteriormente. Los ensayos iniciales se realizaron con la estirpe Rm2: posteriormente se utilizó la estirpe silvestre GR4. En la estirpe Rm2 un 40-60% de las placas líticas producidas por los bacteriófagos DF2, AL1 y L00 muestran halos que podrían indicar la despolimerización del polisacárido capsular y/o extracelular (Fotografía 5). El porcentaje de placas líticas

Fotografía 5.- Halos de despolimerización inducidos  
por el fago DF2 sobre la estirpe Rm2.

con halo, no aumenta cuando se purifica un clon fágico a partir de una de ellas, lo que sugiere la existencia de una cierta variabilidad de origen fisiológico.

La estirpe GR4 sólo es sensible a los bacteriófagos DF2 y AL1 (Véase la sección "Fagotipado"). Igual que ocurre con la estirpe Rm2, un 40-60 % de las placas líticas producidas por los fagos DF2 y AL1 sobre GR4 muestran un halo. Dicho porcentaje no aumenta tras la purificación de los fagos.

Como ya hemos comentado el fenotipo M<sup>-</sup> de los mutantes alterados en la síntesis de PSE hizo imposible la observación de la inducción de despolimerasas bacterianas por el fago DF2.

La importancia de la despolimerización de cara a la infección es incierta, ya que hay fagos que no inducen halos de despolimerización (y aquellos que los inducen sólo lo hacen en un determinado porcentaje de placas líticas). En cualquier caso, la ausencia de correlaciones impide especular con la posibilidad de introducir en las estirpes de R.meliloti determinadas mutaciones que podrían facilitar su supervivencia en el suelo, haciéndolas total o parcialmente resistentes a los bacteriófagos.

Sensibilidad de mutantes Exo<sup>C</sup> a la radiación ultravioleta.

Se compararon las curvas de supervivencia a la radiación ultravioleta de la estirpe silvestre GR4 y diversos mutantes afectados en la producción de polisacárido extracelular. Aunque en los ensayos se emplearon tanto mutantes Exo<sup>C</sup> como Exo<sup>-</sup>, el objetivo de estos experimentos era la detección de posibles mutantes Lon<sup>-</sup> de R.meliloti entre las estirpes superproductoras de polisacárido extracelular (en Enterobacterias, las mutaciones lon causan superproducción de cápsula e incrementan unas diez veces la sensibilidad a la radiación ultravioleta (Chung y Goldberg, 1981). No se detectó ninguna estirpe con esas características entre los mutantes Exo<sup>C</sup> analizados (de hecho, tanto los mutantes Exo<sup>C</sup> como los Exo<sup>-</sup> mostraron una sensibilidad muy parecida a la de la estirpe silvestre GR4). En la Figura 7 se representan las curvas correspondientes a la estirpe GR4 y a los mutantes JC4004 e ISM109, elegidos como ejemplos representativos.

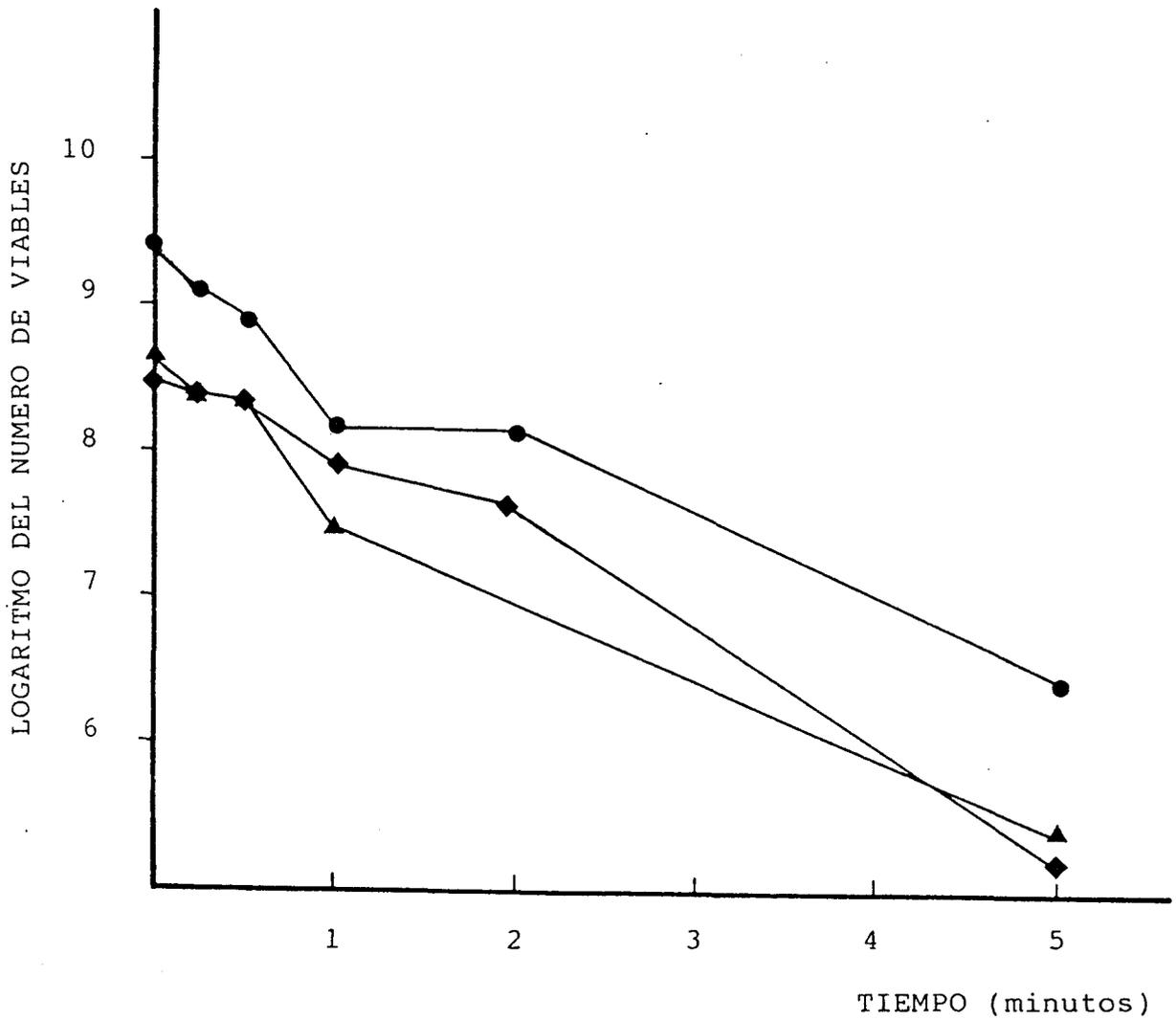


Figura 7.

Efecto de la radiación ultravioleta sobre la supervivencia de la estirpe silvestre GR4 (●), Exo<sup>C</sup> JC4004 (▲) y Exo<sup>-</sup> ISM109 (◆).

Características simbióticas de los mutantes de Rhizobium meliloti alterados en la producción de polisacárido extracelular.

Para determinar las características simbióticas (efectividad e infectividad) de los mutantes alterados en la producción de PSE, se llevó a cabo un ensayo bajo condiciones controladas de crecimiento en "jarros" de Leonard. Además de los mutantes y de la estirpe silvestre GR4, se incluyeron dos controles: plantas no inoculadas, adicionadas (TN) o no (T) de nitrógeno mineral. El control con nitrógeno permite estimar el crecimiento de las plantas en condiciones no limitantes de nitrógeno (fertilización química) frente a plantas inoculadas con estirpes de Rhizobium (aporte simbiótico de nitrógeno).

Se determinaron los siguientes parámetros simbióticos de la asociación Rhizobium-leguminosa:

- Actividad nitrogenasa (Reducción de acetileno).
- Número de nódulos.
- Peso fresco de nódulos.
- Peso seco de la parte aérea de las plantas (2 cortes).
- Contenido en N de la parte aérea (Método Kjeldahl).

Todos los mutantes ensayados (5 estirpes Exo<sup>C</sup>, 4 Exo<sup>-</sup> y 2 "compactas") fueron capaces de formar nódulos sobre plantas de alfalfa (Medicago sativa var. Aragón) en cultivo hidropónico. Los resultados resumidos en la Tabla 14, indican que dos estirpes, el mutante Exo<sup>C</sup> (ISM101) y el mutante Exo<sup>-</sup> (ISM107), son Fix<sup>-</sup>. ISM101 produce un PSE ligeramente distinto del silvestre (Tabla 12). En principio no hay razón para pensar que ambos fenotipos (alteración en la producción/composición de PSE y la capacidad fijadora de N<sub>2</sub>) estén relacionados. El criterio usual para determinar si una sola mutación es responsable de una o más características fenotípicas (estudio de la reversión) no ha podido emplearse hasta el mo

Tabla 14.

CARACTERISTICAS SIMBIOTICAS DE MUTANTES  $Exo^C$ ,  $Exo^-$  Y "COMPACTOS" DE Rhizobium meliloti

Estirpe	Red. acetileno <sup>a</sup>	Nº nódulos	Peso fresco de nódulos (mg)	Peso seco de parte aérea (mg)		Contenido en Nitrógeno (%)
				1	2	
TN	—	—	—	1.692	4.300	2,22
JC4004	31,59	111	228	488	1.950	3,05
GR4	26,25	196	430	509	1.850	2,97
ISM102	16,85	182	486	382	1.600	3,13
ISM106	19,86	185	385	380	1.725	3,24
ISM104	31,33	153	364	358	1.400	3,23
ISM103	19,88	206	452	350	2.150	3,33
ISM108	30,92	190	318	344	1.625	3,23
ISM105	23,11	238	464	332	1.775	3,16
ISM109	20,29	200	420	295	1.625	3,12

Tabla 14 (Continuación)

Estirpe	Red. acetileno <sup>a</sup>	Nº nódulos	Peso fresco de nódulos (mg)	Peso seco de parte aérea (mg)		Contenido en Nitrógeno <sup>b</sup> (%)
				1	2	
ISM110	21,44	154	543	189	1.450	3,18
ISM101	—	—	—	30	—	—
ISM107	—	—	—	14	—	—
T	—	—	—	15	—	—
M.D.S. (5%)	n.s.	n.s.	n.s.	103	452	0,62
C.V. %	41,4	40,4	43,6	18,3	22,5	10,8

Los datos son media de 4 repeticiones, 2 plantas/jarro.

<sup>a</sup> Moles de C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>/hora/mg nódulos.

<sup>b</sup> Determinación Kjeldahl.

TN. Testigo con nitrógeno, sin inocular.

T. Testigo sin inocular.

mento, debido a la dificultad para obtener revertientes. Por tanto, no sabemos si la alteración del PSE y el carácter Fix están relacionados. Es corriente que el tratamiento con nitrosoguanidina produzca múltiples mutaciones (Guerola et al., 1971); las estirpes ISM101 e ISM107 podrían ser dobles mutantes. Alternativamente, podrían tratarse de mutantes alterados en la capacidad de "invadir" el nódulo, como los descritos por Leigh et al. (1985).

Hay que señalar que la determinación de los parámetros simbióticos se llevó a cabo tras el segundo corte de la parte aérea de las plantas, de modo que en algunos tratamientos como el control sin nitrógeno y sin inocular (T), y para los mutantes inefectivos: ISM101 e ISM107 no fue posible obtener los datos correspondientes a peso seco (en la segunda cosecha), número y peso fresco de nódulos, debido a que las plantas no rebrotaron y los nódulos habían degenerado tras un período largo (45 días) sin aporte de fotosintato.

El análisis estadístico de los resultados, (Tabla 14) demostró que no existían diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para los siguientes parámetros: Número de nódulos, peso fresco de los mismos y actividad específica nitrogenasa. Por tanto, puede afirmarse que, con las excepciones de las estirpes ISM101 e ISM107, los mutantes aislados no han perdido las características de nodulación y eficiencia simbiótica exhibidas por la estirpe silvestre.

El contenido en nitrógeno del control fertilizado (TN), fue significativamente inferior al de las plantas inoculadas con Rhizobium; sin embargo, no existen diferencias en la acumulación de nitrógeno entre las plantas inoculadas con los diversos mutantes.

Por último, el peso seco de la parte aérea de las plantas se determinó en dos cosechas; en ambos cortes el control fertilizado rindió más materia seca que los demás tratamientos, y no se encontró una interacción significativa entre la eficiencia de las estirpes entre el primer y el segundo corte.

Determinación del coeficiente de competitividad de mutantes Exo<sup>C</sup>, Exo<sup>-</sup> y "compactos" de Rhizobium meliloti.

Para la determinación del coeficiente de competitividad de las estirpes de R. meliloti se eligió como estirpe control el mutante ISM107 (Exo<sup>-</sup>, Fix<sup>-</sup>), que se combinó con cada una de las estirpes a ensayar en proporción 4:1. Esto simplificó la determinación del número de nódulos formados por cada estirpe, estimándose de visu los nódulos efectivos (rosas) y los inefectivos (blancos) derivados de la estirpe control Fix<sup>-</sup>.

En la Tabla 15 se detalla el número de nódulos de cada tipo producidos por cada inóculo y el coeficiente de competitividad de cada estirpe, que se deduce al aplicar la siguiente fórmula:

$$\text{Coeficiente de competitividad} = \frac{\text{Nº de nódulos fijadores}}{\text{Nº total de nódulos}}$$

Cabe comentar que la aplicación del test  $\chi^2$  puso de manifiesto la no homogeneidad de los resultados, de manera que los distintos valores observados son consecuencia de la distinta capacidad competitiva de las estirpes y no se debe al azar.

En la Tabla 15, puede observarse que hay mutantes (6) altamente competitivos que forman la mayoría de los nódulos a pesar de la desventaja numérica en el inóculo. Por el contrario, cuatro de las estirpes ensayadas (GR4C, ISM108, ISM109, ISM104) fueron desplazadas por la estirpe de referencia en la formación de nódulos. Salvo excepciones, las estirpes con un nivel elevado o medio de producción de PSE (silvestre, compactas y Exo<sup>C</sup>) son más competitivas que las rugosas (GR4C, ISM108 e ISM109).

Estimando la eficiencia simbiótica de las estirpes por el peso seco de las plantas (Tabla 15), se observa que estirpes muy competitivas como GR4 e ISM110 difieren en su eficiencia fijadora, mientras que estirpes muy efectivas (GR4C) pueden ser poco competitivas. Estos resultados sugieren que la competitividad relativa de cada estirpe y la eficiencia en la fijación son características independientes.

Tabla 15.

DETERMINACION DEL COEFICIENTE DE COMPETITIVIDAD DE MUTANTES Exo<sup>C</sup>, Exo<sup>-</sup> Y "COMPACTOS" DE Rhizobium meliloti.

Estirpe	Característica colonial	Nº de nódulos Fix <sup>+</sup>	Nº de nódulos Fix <sup>-</sup>	Coef. compet.*	Peso seco (mg)
GR4	Silvestre	76	21	78,35	35,0
JC4004	Exo <sup>C</sup>	90	39	69,77	16,5
ISM102	Exo <sup>C</sup>	75	24	75,76	33,0
ISM103	Exo <sup>C</sup>	57	38	60,00	24,0
ISM104	Exo <sup>C</sup>	108	162	40,00	24,6
GRC-60	Exo <sup>-</sup>	39	12	76,47	22,0
ISM108	Exo <sup>-</sup>	42	281	13,00	20,0
ISM109	Exo <sup>-</sup>	37	91	28,91	20,6
ISM110	Exo <sup>-</sup>	136	37	78,61	17,1
GR4C	Compacta	40	103	27,97	37,8
ISM105	Compacta	82	27	75,23	30,0
ISM106	Compacta	118	16	88,06	31,8

Los datos son media de 7 repeticiones (2 plantas/tubo).

$$* \text{ Coef. competitividad} = \frac{\text{Nº de nódulos fijadores}}{\text{Nº total de nódulos}}$$

Determinación del grado de infectividad de mutantes Exo<sup>C</sup>, Exo<sup>-</sup> y "compactos" de Rhizobium meliloti.

De forma paralela a la determinación del coeficiente de competitividad, se estudió la velocidad de infección de los mutantes alterados en la producción de PSE, siguiendo la metodología de Olivares et al. (1980). Ambos ensayos proporcionaron resultados coincidentes: las estirpes Exo<sup>-</sup> ISM107, ISM108, ISM109 e ISM110 y las estirpes "compactas" ISM105, ISM106 y GR4C son menos infectivas y menos competitivas que la estirpe silvestre GR4. Estos datos, resumidos en la Tabla 16, confirman una vez más que el PSE facilita la infección (Olivares et al., 1980 y 1984). La disminución de la competitividad y de la capacidad infectiva es de algún modo "proporcional" al grado de alteración en la producción de PSE: en general los mutantes "compactos" son más infectivos y más competitivos que los mutantes rugosos (Exo<sup>-</sup>). Pero hay excepciones: la estirpe compacta ISM106, a pesar de producir un PSE de composición parecida o idéntica al tipo silvestre, es menos infectiva y menos competitiva que algunas estirpes rugosas (ISM109 e ISM110). Los mutantes Exo<sup>C</sup> tampoco tienen un comportamiento uniforme: ISM102 es prácticamente igual de infectivo y competitivo que la estirpe silvestre.

JC4004 e ISM103 son más infectivos, pero sorprendentemente menos competitivos que GR4. Estas discrepancias contrastan con el comportamiento más uniforme de los mutantes Exo<sup>-</sup> e impiden extraer conclusiones generales acerca del efecto de las mutaciones exo<sup>C</sup> y "compactas" sobre la capacidad infectiva. Tampoco parece existir correlación entre la composición del PSE y los fenómenos de competitividad y/o infectividad; cada mutante parece ser un caso particular.

Tabla 16.

DETERMINACION DEL GRADO DE INFECTIVIDAD DE MUTANTES Exo<sup>C</sup>, Exo<sup>-</sup> Y "COMPACTOS" DE Rhizobium meliloti.

Estirpe	Característica colonial	Nº de nódulos		Coeficiente infectividad*
		Con Tc	Sin Tc	
GR4	Silvestre	10,7	28,2	37,9
JC4004	Exo <sup>C</sup>	11,9	28,5	41,8
ISM101	Exo <sup>C</sup>	2,5	28,0	8,9
ISM102	Exo <sup>C</sup>	9,8	26,5	36,8
ISM103	Exo <sup>C</sup>	10,7	21,0	50,8
ISM107	Exo <sup>-</sup>	7,0	25,4	27,6
ISM108	Exo <sup>-</sup>	5,4	20,3	26,5
ISM109	Exo <sup>-</sup>	8,5	25,0	34,0
ISM110	Exo <sup>-</sup>	7,7	25,5	30,0
GR4C	Compacta	7,6	27,0	28,0
ISM105	Compacta	9,4	25,7	36,7
ISM106	Compacta	10,3	58,9	17,4

Los datos son media de 10 repeticiones, 4 plantas/tubo.

$$* \text{ Coef. infectividad} = \frac{\text{Nº de nódulos con Tc}}{\text{Nº de nódulos sin Tc}} \times 100$$

Estudios de adhesividad a las raíces de M.sativa y competitividad entre mutantes de R.meliloti alterados en la producción de polisacárido extracelular.

El objeto de este ensayo fue estudiar la influencia de la producción de PSE en la primeras etapas del proceso de infección de la leguminosa huésped: colonización de la rizosfera y adhesión de Rhizobium a las raíces. El uso de inóculos individuales (una sola estirpe) permite comparar las velocidades de colonización de la rizosfera. La inoculación conjunta, en proporción 1:1, de la estirpe silvestre y un mutante Exo<sup>C</sup> o Exo<sup>-</sup> (o de dos mutantes) permite determinar la competitividad relativa de cada mutante: una vez desarrollados los nódulos se identifican las estirpes en medios selectivos.

Aunque los mutantes Exo<sup>C</sup> y Exo<sup>-</sup> tienen una morfología colonial característica, fácilmente distinguible del tipo silvestre (y obviamente entre sí), para estos estudios se emplearon estirpes marcadas (Str<sup>R</sup> o Rif<sup>R</sup>). El marcaje facilita la identificación y no altera las características simbióticas (Tabla 17).

A las 24 horas de la inoculación puede observarse que las poblaciones de los mutantes Exo<sup>C</sup> JC4004 e ISM102 duplican o triplican las de la estirpe silvestre GR4 y de los mutantes Exo<sup>-</sup> ISM107 e ISM110. A su vez, la estirpe silvestre duplica el número de células de los mutantes Exo<sup>-</sup> (Tabla 18). Sin embargo, las diferencias se reducen con el tiempo y a las 96 horas el número de rizobios por unidad de raíz es prácticamente el mismo para todos los inóculos (Tabla 18).

Cuando las plantas se inocularon con inóculos dobles se observó que la estirpe silvestre GR4 desplazaba a cualquiera de los mutantes Exo<sup>C</sup> o Exo<sup>-</sup>, no sólo en la proporción relativa de células adheridas a la raíz, sino en la ocupación de los nódulos (la estirpe silvestre formó el 100 %).

Si la estirpe que compite con la silvestre es el mutante Exo<sup>-</sup> ISM110, a las 24 horas de la inoculación constituye el

Tabla 17.

CARACTERISTICAS SIMBIOTICAS DE ESTIRPES Str<sup>r</sup> Y Rif<sup>r</sup> DERIVADAS DE LA ESTIRPE SILVESTRE GR4 DE Rhizobium meliloti.

Estirpes	Peso seco parte aérea (mg)*	% respecto al control	Nº Nódulos*
Control	17	100	—
GR4	30	176	13.7
GR4 Str	28	165	13.0
GR4 Rif	33	194	12.5
GR4C	32	188	9.7
GR4C Str	31	182	12.0
GR4C Rif	32	188	9.5
JC4004	39	229	11.7
JC4004 Str	32	188	13.2
JC4004 Rif	33	194	14.2

Los datos son media de 4 repeticiones a razón de 4 plantas por tubo.

\* Diferencias no significativas ( $p < 0,05$ ).

Tabla 18.

ADHESIVIDAD DE LA ESTIRPE GR4 Y DIVERSOS MUTANTES Exo<sup>-</sup> Y Exo<sup>C</sup>  
A LAS RAICES DE Medicago sativa.

Inóculo	Caracte- rísticas	Tiempo	Nº rizobios	rizobios/mm	%
GR4	Silvestre	24 h	44.450	526	---
		48	157.500	1.300	
		96	38,25x10 <sup>5</sup>	26x10 <sup>3</sup>	
JC4004	Exo <sup>C</sup>	24 h	96.300	1.107	---
		48	106.650	944	
		96	42,30x10 <sup>5</sup>	24x10 <sup>3</sup>	
ISM110	Exo <sup>-</sup>	24 h	27.450	263	---
		48	121.500	1.168	
		96	41,00x10 <sup>5</sup>	27x10 <sup>3</sup>	
ISM107	Exo <sup>-</sup>	24 h	20.700	134	---
		48	153.900	941	
		96	37,80x10 <sup>5</sup>	16x10 <sup>3</sup>	
ISM102	Exo <sup>C</sup>	24 h	60.300	363	---
		48	841.500	5.667	
		96	40,95x10 <sup>5</sup>	16x10 <sup>3</sup>	

Tabla 18 (continuación)

Inóculo	Caracte- rísticas	Tiempo	Nº rizobios	rizobios/mm	%
GR4/ JC4004	Silvestre/ Exo <sup>C</sup>				
Total		48 h	206.650	2.431	100,0
GR4			110.700	1.302	53,6
JC4004			95.950	1.129	46,4
Total		96	40,70x10 <sup>5</sup>	27,8x10 <sup>3</sup>	100,0
GR4			27,70x10 <sup>5</sup>	18,9x10 <sup>3</sup>	68,0
JC4004			13,00x10 <sup>5</sup>	8,9x10 <sup>3</sup>	32,0
GR4/ ISM102	Silvestre/ Exo <sup>C</sup>				
Total		24 h	26.500	186,7	100,0
GR4			14.085	99,2	53,0
ISM102			12.465	87,8	47,0
Total		48	374.400	1.881,4	100,0
GR4			206.900	1.039,7	55,3
ISM102			167.500	841,7	44,7
Total		96	80,77x10 <sup>5</sup>	33,7x10 <sup>3</sup>	100,0
GR4			47,58x10 <sup>5</sup>	19,8x10 <sup>3</sup>	60,0
ISM102			33,19x10 <sup>5</sup>	13,9x10 <sup>3</sup>	40,0
JC4004/ ISM110	Exo <sup>C</sup> / Exo <sup>-</sup>				
Total		24 h	90.000	1.200	100,0
JC4004			83.250	1.110	92,5
ISM110			6.750	90	7,5
Total		48	171.900	1.829	100,0
JC4004			158.850	1.690	92,4
ISM110			13.050	139	7,6

Tabla 18 (continuación)

Inóculo	Caracte- rísticas	Tiempo	Nº rizobios	rizobios/mm	%
Total		96	29,07x10 <sup>5</sup>	19,1x10 <sup>3</sup>	100,0
JC4004			20,97x10 <sup>5</sup>	13,8x10 <sup>3</sup>	72,0
ISM110			8,10x10 <sup>5</sup>	5,3x10 <sup>3</sup>	28,0
GR4/ ISM110	Silvestre/ Exo <sup>-</sup>				
Total		24 h	17.100	213,7	100,0
GR4			13.500	168,7	79,0
ISM110			3.600	45,0	21,0
Total		48	153.450	2.102,0	100,0
GR4			144.900	1.985,0	94,4
ISM110			8.555	117,0	5,6
Total		96	26,50x10 <sup>5</sup>	17,4x10 <sup>3</sup>	100,0
GR4			25,10x10 <sup>5</sup>	16,5x10 <sup>3</sup>	94,7
ISM110			1,40x10 <sup>5</sup>	0,9x10 <sup>3</sup>	5,3
GR4/ ISM107	Silvestre/ Exo <sup>-</sup>				
Total		24 h	45.000	274,4	100,0
GR4			19.080	116,3	42,4
ISM107			25.920	158,0	57,6
Total		48	562.500	3.368,3	100,0
GR4			319.500	1.913,2	56,8
ISM107			243.000	1.455,1	43,2
Total		96	87,30x10 <sup>5</sup>	35,3x10 <sup>3</sup>	100,0
GR4			71,42x10 <sup>5</sup>	28,9x10 <sup>3</sup>	81,8
ISM107			15,88x10 <sup>5</sup>	6,4x10 <sup>3</sup>	18,2

21 % de la población rizosférica; este porcentaje disminuye en las siguientes horas hasta un 5 % y se mantiene constante hasta el final del ensayo. Con el otro mutante  $\text{Exo}^-$  (ISM107) la proporción inicial 1:1 se mantiene durante las primeras 48 horas, pero al final del ensayo la estirpe silvestre domina, alcanzando un tamaño de población que supera el 80 % (Tabla 18).

El predominio de la estirpe silvestre sobre los mutantes  $\text{Exo}^-$  podría deberse a una mayor adhesividad a las raíces a causa de la producción de PSE o a una tasa superior de multiplicación, como puede deducirse de los conteos realizados cuando las raíces se inoculan con inóculos simples.

En competición con los mutantes  $\text{Exo}^C$  (JC4004 e ISM102), la estirpe silvestre también predomina en la rizosfera, pero este efecto es menos marcado que con los mutantes  $\text{Exo}^-$ . Por ejemplo, al final del ensayo la estirpe superproductora JC4004 representa el 32 % de la población y la estirpe ISM102 el 40 % (Tabla 18). Cabe pensar que un nivel medio de produción de PSE sea idóneo para alcanzar una adhesividad óptima a las raíces, mientras que la superproducción, más que constituir una ventaja, podría originar una barrera física para el anclaje de las células.

La inoculación simultánea de mutantes  $\text{Exo}^C$  (ej. JC4004) y  $\text{Exo}^-$  (ej. ISM110) pone una vez más de manifiesto la importancia del PSE en las etapas previas a la formación de los nódulos. En las primeras 48 horas la estirpe rugosa es desplazada casi por completo por la estirpe superproductora JC4004 (Tabla 18). Al final del ensayo la proporción de la estirpe menos competitiva es del 28 %. Como en los casos anteriores, la estirpe que mejor coloniza la rizosfera (JC4004) desplaza a la otra en la ocupación de nódulos.

ESTUDIOS DE SUPERVIVENCIA DE ESTIRPES DE R.meliloti EN TURBA.

Mantenimiento de las características simbióticas de la estirpe JC4004 de R.meliloti en inoculantes a base de turba.

La calidad de los inoculantes debe medirse no sólo por el índice de supervivencia de las estirpes al cabo del tiempo de almacenamiento, sino además por el mantenimiento de las características simbióticas; es sabido que el almacenamiento de Rhizobium en el laboratorio puede conducir a la selección progresiva de estirpes simbióticamente deficientes en el momento de su empleo (Roughley, 1970; Vincent, 1970).

El mantenimiento de las características simbióticas de las estirpes de Rhizobium en inoculantes a base de turba se estudió con la estirpe Exo<sup>C</sup> JC4004 de R.meliloti. La conservación de la capacidad infectiva se estudió preparando suspensiones a partir de los inoculantes y determinando el número de nódulos formados en plantas de alfalfa. La efectividad se determinó a partir del peso seco de la parte aérea. Ambos tipos de ensayo se realizaron con una periodicidad mensual. Los resultados de estos seguimientos se resumen en la Tabla 19. Si bien el análisis de los resultados indica que existen diferencias significativas a lo largo del período de almacenamiento, no puede deducirse que haya tenido lugar una pérdida de efectividad de la estirpe, tanto en turba estéril como no estéril. Los datos de peso seco de las últimas estimaciones corresponden a valores elevados, por tanto las diferencias observadas podrían deberse a factores no controlados.

Por otro lado, al analizar el número de nódulos se pone de manifiesto una pérdida gradual en la capacidad de la estirpe para formar nódulos. En resumen, la disminución de infectividad de los inoculantes tras el almacenamiento prolongado a temperatura ambiente no se refleja en el peso seco de las plantas inoculadas con los mismos.

Tabla 19.

EVOLUCION DE LAS CARACTERISTICAS SIMBIOTICAS DE LA ESTIRPE JC4004 A LO LARGO DE 8 MESES DE ALMACENAMIENTO.

Tiempo (días)	Turba estéril		Turba no estéril	
	Infectividad (Nº nódulos)	Efectividad (p.seco,mg)	Infectividad (Nº nódulos)	Efectividad (p.seco,mg)
0	15,2	11,17	13,0	10,67
30	12,5	20,50	17,5	10,83
60	18,7	17,17	10,7	22,17
120	12,7	15,00	14,2	15,00
180	14,0	20,67	6,8	17,33
250	10,6	16,67	8,7	17,50
MDS <sub>0,05</sub>	3,65	3,47	3,17	3,04

Correlación entre el número de rizobios viables y los parámetros simbióticos (Nº de nódulos) y fisiológicos (peso seco de la parte aérea).

Cuando se estudia la relación entre el tiempo de almacenamiento y el número de rizobios viables presentes en inoculantes a base de turba, puede observarse una correlación significativa y negativa entre ambos (Tabla 20), siendo mayor la pendiente de la recta (coeficiente de regresión) en el caso de los inoculantes donde no se esteriliza el soporte. Por otro lado, al analizar los datos correspondientes pudo observarse una correlación positiva entre el logaritmo del número de rizobios viables y el número de nódulos formados, siendo significativa sólo cuando la turba no se esterilizó. Ello confirma que el efecto depresivo del tiempo sobre la población viable es más crítico cuando no se esteriliza el soporte y se traduce en una menor capacidad infectiva de dichos inoculantes

Al pretender establecer la relación existente entre el número de nódulos y el peso seco de las plantas, se observó una ausencia de correlación (turba estéril) o una correlación negativa (turba no estéril). En resumen, se observa una disminución de la infectividad, pero no de la efectividad, tras el almacenamiento prolongado a temperatura ambiente. Es discutible si ello constituye o no una pérdida de calidad del inoculante, ya que las estirpes altamente efectivas de Rhizobium suelen producir menor número de nódulos que las poco efectivas, probablemente porque las zonas de la raíz con cierto nivel de nitrógeno fijado (como ocurre con estirpes muy efectivas) no pueden ser noduladas (quizás por inactivación de lectinas ?) (Brill, 1980). Los datos presentados en esta Memoria podrían tomarse como un indicio de que el almacenamiento en turba ejerce una selección de las estirpes más efectivas, hipótesis arriesgada y sin precedentes en la literatura. Parece más probable que, en nuestras condiciones de trabajo, la determinación del peso seco de las plantas no sea un parámetro indicativo de las alteraciones en la efectividad

Tabla 20.

COEFICIENTES DE REGRESION LINEAL Y CORRELACION ENTRE EL NUMERO DE RIZOBIOS VIABLES Y LOS PARAMETROS SIMBIOTICOS ( N<sup>o</sup> de nódulos) Y FISIOLÓGICOS (Peso seco de la parte aérea), EN INOCULANTES A BASE DE TURBA.

TURBA NO ESTERIL

	<u>Coefc. correlación</u>	<u>Ecuación de regresión</u>
Tiempo vs. lg N <sup>o</sup> viables	r= -0.888 <sup>***</sup>	y= 8.884-0.004x
lg N <sup>o</sup> viables vs. N <sup>o</sup> nódulos	r= +0.471 <sup>**</sup>	y=-31.465+5.126x
N <sup>o</sup> nódulos vs. Peso seco	r= -0.501 <sup>**</sup>	y= 21.880-0.533x

TURBA ESTERIL

Tiempo vs. lg N <sup>o</sup> viables	r= -0.688 <sup>***</sup>	y= 9.426-0.002x
lg N <sup>o</sup> viables vs. N <sup>o</sup> nódulos	r= +0.262 n.s.	y=-22.929+3.972x
N <sup>o</sup> nódulos vs. Peso seco	r= +0.062 n.s.	y= 15.942+0.673x

Nivel de significación: \*\*\* p < 0.001

\*\* p < 0.01

n.s.= no significativo

de Rhizobium en los inoculantes a lo largo del tiempo de conservación de los mismos.

Supervivencia en turba de estirpes Exo<sup>-</sup> y Exo<sup>C</sup> de R.meliloti.

El objetivo de este ensayo fue comparar la viabilidad en turba de la estirpe silvestre GR4 y varios mutantes afectados en la producción de PSE. Las estirpes JC4004, ISM-102 y ISM103 superproductoras, y las denominadas ISM108, ISM109 y GRC60, rugosas, ya han sido descritas anteriormente. En las Tablas 21 y 22 se presentan los índices de supervivencia a lo largo de 8 meses en inoculantes con turba estéril y no estéril. Los resultados sugieren que en general las estirpes más mucosas (JC4004, ISM102 e ISM103) sobreviven mejor que la silvestre y que las rugosas, tanto en turba estéril como no estéril.

Hay que resaltar que en un soporte estéril todos los inoculantes mantenían al final del ensayo una población superior a  $10^8$  u.f.c./g de turba, destacando la estirpe JC4004 con una población superior a  $10^9$  u.f.c./g de turba. La mayor viabilidad de esta estirpe no parece debida al tamaño del inóculo, ya que al inicio del ensayo los inoculantes preparados con ella contenían igual o menor número de rizobios viables que el resto.

En turba no estéril las diferencias en la supervivencia de las distintas estirpes fueron más notorias, destacando GR4 y JC4004 con una población final superior a  $10^8$  u.f.c./g de turba; en contraste, la estirpe rugosa ISM 108 no alcanzó  $10^7$  u.f.c./g. De todos modos, en turba no estéril la ventaja de las estirpes superproductoras de PSE es menos evidente.

Estos resultados, especialmente los obtenidos usando turba estéril, sugieren que la capacidad para producir cantidades altas de PSE debería tenerse en cuenta a la hora de seleccionar estirpes de R.meliloti con vistas a la producción comercial de inoculantes.

Tabla 21.

SUPERVIVENCIA DE ESTIRPES DE R.meliloti EN TURBA ESTERIL.

Estirpes	Tiempo (días).					
	0	15	90	120	150	250
GR4	8,66	9,19	8,81	8,95	8,73	8,40
ISM108	9,04	9,11	8,94	9,15	8,61	8,56
ISM109	8,48	9,09	8,66	8,63	8,98	8,79
ISM103	9,04	8,83	8,75	8,62	8,72	8,63
ISM102	8,95	9,05	8,86	8,70	8,58	8,89
JC4004	8,82	9,62	9,45	9,60	9,60	9,48
GRC-60	8,35	9,15	9,13	8,95	8,89	8,47

Tiempo x Estirpe  $P < 0,01$   $MDS_{0,05} = 0,06$

Los datos son media de 6 repeticiones y se expresan como logaritmo del número de viables.

Tabla 22.

SUPERVIVENCIA DE ESTIRPES DE R.meliloti EN TURBA NO ESTERIL.

---

Estirpes	Tiempo (días).					
	0	15	90	120	150	250
GR4	8,20	8,48	8,28	8,26	7,96	8,16
ISM108	8,33	8,68	7,89	7,40	7,00	6,81
ISM103	8,11	8,64	7,20	7,17	7,84	7,16
ISM102	8,50	8,36	8,55	8,31	8,30	7,80
JC4004	8,54	9,40	9,06	8,72	8,48	8,19
GRC-60	8,45	9,03	7,64	7,60	7,69	7,45

---

Tiempo x Estirpe  $P < 0,01$        $MDS_{0,05} = 0,10$

---

Los datos son media de 6 repeticiones y se expresan como logaritmo del número de viables.

Inoculantes preparados con distinto contenido de polisacárido extracelular.

La mayor supervivencia de las estirpes superproductoras de exopolisacárido podría sugerir que el PSE sirve como fuente de carbono facilitando la multiplicación bacteriana durante el almacenamiento. Aunque en la literatura existen datos contradictorios (Patel y Gerson, 1974) se diseñó un experimento para comparar la viabilidad de una estirpe muy mucosa (JC4004) en presencia y ausencia de su propio PSE. Para ello se prepararon inoculantes que contenían diferentes concentraciones de PSE, además de dos controles: en un caso el PSE liberado al medio de cultivo se eliminó recogiendo las células por centrifugación y resuspendiéndolas en caldo M-79 sin fuente de carbono y nitrógeno. El segundo control consistió en un cultivo al que no se añadió polisacárido capsular.

El exopolisacárido aislado en la forma descrita anteriormente (véase Material y Métodos) se disolvió con agua y se añadió a los caldos de impregnación hasta alcanzar concentraciones finales de 1, 2 y 3 g/l. Los recuentos de rizobios viables se llevaron a cabo con periodicidad mensual.

Los resultados de estos experimentos están resumidos en las Tablas 23 y 24. La adición de PSE no se tradujo en un aumento de la supervivencia. Se detectó proliferación bacteriana incluso en el control preparado con un caldo de impregnación sin nitrógeno ni carbono. Ello sugiere que el soporte de turba contiene nutrientes (Ruiz Argüeso et al., 1979) que permiten el crecimiento de Rhizobium sin necesidad de recurrir a la utilización de su propio polisacárido.

Estos experimentos no aclaran si R.meliloti es capaz o no de utilizar su PSE como reserva, pero sugieren que, en el mejor de los casos, éste constituye una fuente de carbono secundaria o irrelevante.

Tabla 23.

SUPERVIVENCIA DE R.meliloti JC4004 A LO LARGO DEL TIEMPO EN DISTINTOS TIPOS DE INOCULANTES A BASE DE TURBA ESTERIL.

Tiempo (días)	I <sub>1</sub> *	I <sub>2</sub>	I <sub>3</sub>	I <sub>4</sub>	I <sub>5</sub>	Tiempo $\bar{x}$
0	9,15	9,28	9,25	9,44	9,45	9,31
15	9,21	9,40	9,30	9,29	9,25	9,29
30	9,16	9,34	9,42	9,15	9,41	9,30
60	9,26	9,41	9,36	9,48	9,34	9,37
120	9,14	9,45	9,31	9,03	9,16	9,22
180	9,28	8,91	8,99	9,12	9,04	9,07
250	8,98	8,84	8,98	8,95	8,86	8,92
360	8,65	8,50	8,58	8,51	8,68	8,58

Significación de los tratamientos:

Inoculantes n.s.

Tiempo P < 0,001

Inoc. x Tiempo P < 0,01 MDS<sub>0,05</sub> = 0,33

Resultados expresados como logaritmo del número de viables.

\*Inoculantes: I<sub>1</sub>, caldo centrifugado; I<sub>2</sub>, caldo normal; I<sub>3</sub>, I<sub>2</sub> + 25 % PSE; I<sub>4</sub>, I<sub>2</sub> + 50 % PSE; I<sub>5</sub>, I<sub>2</sub> + 100 % PSE.



Tabla 24.

SUPERVIVENCIA DE R.meliloti JC4004 A LO LARGO DEL TIEMPO EN DISTINTOS TIPOS DE INOCULANTES A BASE DE TURBA NO ESTERIL.

Tiempo (días)	I <sub>1</sub> *	I <sub>2</sub>	I <sub>3</sub>	I <sub>4</sub>	I <sub>5</sub>	Tiempo $\bar{x}$
0	8,84	8,98	9,23	8,87	8,92	8,97
15	8,41	8,60	8,56	8,41	8,49	8,49
30	7,99	8,55	8,44	8,42	8,51	8,38
60	8,05	8,60	8,34	8,43	8,20	8,32
120	8,16	8,61	8,15	8,01	7,63	8,11
180	7,68	8,11	8,08	8,09	8,14	8,02
250	7,18	7,77	7,46	7,58	7,64	7,53
360	7,32	7,53	7,55	7,55	7,35	7,46
Inocs. $\bar{x}$	7,95	8,34	8,23	8,17	8,11	

Significación de los tratamientos:

Inoculantes  $P < 0,001$

Tiempo  $P < 0,01$

Inoc. x Tiempo  $P < 0,01$   $MDS_{0,05} = 0,45$

Resultados expresados en logaritmo del número de viables.

\*Inoculantes: I<sub>1</sub>, caldo centrifugado; I<sub>2</sub>, caldo normal; I<sub>3</sub>, I<sub>2</sub> + 25 % PSE; I<sub>4</sub>, I<sub>2</sub> + 50 % PSE; I<sub>5</sub>, I<sub>2</sub> + 100 % PSE.

Efecto de la producción de PSE sobre la resistencia a la desecación

Como se ha descrito en el apartado correspondiente, los mutantes Exo<sup>C</sup> de R.meliloti sobreviven mejor que la estirpe silvestre GR4 en inoculantes a base de turba estéril y no estéril almacenados durante meses a temperatura ambiente. Una posible explicación a este hecho podría ser una diferente resistencia debida al papel protector del PSE, como se ha descrito en ambientes naturales para otras bacterias gramnegativas (Costerton et al., 1974 b).

Para ensayar esta hipótesis se comparó la supervivencia de la estirpe silvestre GR4 y la de diversos mutantes Exo<sup>C</sup> y Exo<sup>-</sup> en condiciones de desecación diseñadas a propósito (véase "Material y Métodos"). Los resultados se presentan en la Figura 8; puede observarse que, en las condiciones ensayadas los mutantes Exo<sup>C</sup> resisten mejor la desecación que la estirpe silvestre GR4. Ello sugiere, en efecto, que el PSE puede representar una cierta protección en condiciones de desecación. Sin embargo, hay algunos datos contradictorios: por ejemplo, algunos mutantes Exo<sup>-</sup> (ISM110 e ISM107) resisten mejor que la propia estirpe silvestre. Ahora bien, todos esos mutantes son más sensibles a la desecación que las estirpes Exo<sup>C</sup>; ello sugiere que la superproducción de PSE constituye una barrera higroscópica que facilita la supervivencia.

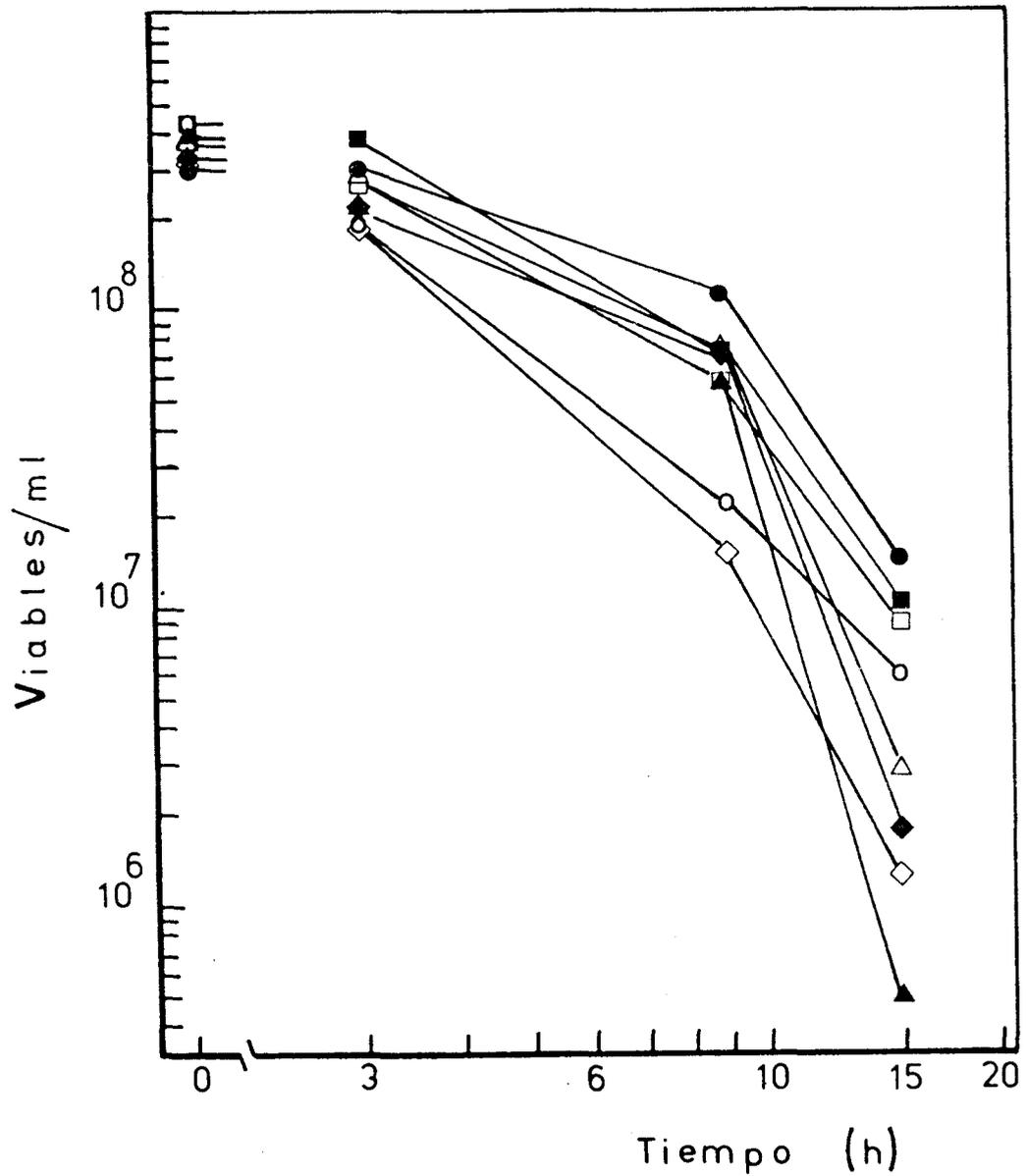


Figura 8.

Supervivencia de la estirpe silvestre GR4 y de mutantes Exo<sup>C</sup>, Exo<sup>-</sup> y "compactos" desecados en estufa a 28° C. GR4 (◇), JC4004 (■), ISM102 (●), ISM107 (◆), ISM109 (▲), ISM110 (○), ISM105 (△) e ISM106 (□).

Estudio de la eficiencia simbiótica de estirpes de *R.meliloti* con varias especies y ecotipos de *Medicago*.

El objetivo de esta serie de ensayos fue determinar, bajo condiciones controladas de crecimiento, la eficiencia simbiótica de las estirpes de *R.meliloti* existentes en nuestro laboratorio y de un mutante descrito en esta Memoria (JC4004) frente a algunas especies de *Medicago* de importancia agronómica. La elección de este mutante se basa en su posible interés para la fabricación de inoculantes, interés debido a su elevado índice de supervivencia en turba (rasgo característico de muchas estirpes superproductoras de polisacárido: Véase el apartado correspondiente).

Se eligieron dos ecotipos de *Medicago sativa*: Tierra de Campos, recomendado para zonas de secano (Tabla 25) y Aragón, más adaptado a zonas de regadío (Tabla 26). Además se estudiaron las relaciones simbióticas en dos especies anuales de *Medicago*: *M.polymorpha* (ecotipos Terebellum e Inermis, Tablas 27 y 28) y *M.scutellata* (ecotipo Sava, Tabla 29).

En los ensayos con *Medicago sativa* se realizaron dos cortes de la parte aérea (a los 45 y 90 días de la inoculación), mientras que con las especies anuales de *Medicago* sólo se realizó una cosecha a los 45 días de la inoculación de las plantas.

Se determinó el peso seco de la parte aérea como índice de la efectividad en la fijación simbiótica de nitrógeno. Este parámetro es el más apropiado bajo nuestras condiciones de trabajo y, además, es una estimación muy fiable (Bedmar et al. 1984).

Todas las variedades vegetales fueron noduladas, pero se observó una gran variabilidad en la eficiencia simbiótica de las estirpes: desde ser altamente efectivas hasta llegar incluso a ser parásitas de la planta huésped (Figura 9). Resultados similares se han publicado con diferentes especies y variedades de *Medicago* (Gibson, 1962; Brockwell y Hely, 1966; Jansen van Rensburg y Strijdom, 1982 a; Hale, 1983).

En simbiosis con plantas de alfalfa la mayoría de las es

Tabla 25.

EFFECTIVIDAD EN LA FIJACION SIMBIOTICA DE N<sub>2</sub> (MEDIDA COMO PESO SECO DE LA PARTE AEREA) DE ESTIRPES DE R.meliloti EN Medicago sativa (ecotipo Tierra de Campos).

Estirpes	1er. Corte	2do. Corte
GRO15	1.484	1.746
793	1.385	1.494
T N	1.350	527
797	1.350	1.490
GRO19	1.280	1.496
JC4004	1.231	1.615
GR4	1.171	1.715
GRO27	1.152	1.305
IS122	1.147	1.073
GR4C	1.111	1.178
GRO13	1.084	1.110
795	1.075	1.069
RS96	1.070	1.365
IS120	964	1.047
M-11	961	1.176
M-12	928	965
M-13	901	808
IS3	749	794
M-16	738	440
M-7	614	628
T	68	0
M-3	54	—
M.D.S. 0,05	353	472

Los datos (en mg) son media de 4 repeticiones.

T , testigo no inoculado; T N , testigo no inoculado con nitrógeno.

Tabla 26.

EFFECTIVIDAD EN LA FIJACION SIMBIOTICA DE N<sub>2</sub> (MEDIDA COMO PESO SECO DE LA PARTE AEREA) DE ESTIRPES DE R.meliloti EN Medicago sativa (ecotipo Aragón).

Estirpes	1er. Corte	2do. Corte
GRO27	2.061	1.157
T N	1.972	829
IS122	1.721	1.413
793	1.910	1.075
GRO19	1.883	1.107
GRO15	1.777	1.504
M-12	1.724	1.394
GRO13	1.697	1.082
797	1.502	1.088
795	1.482	926
M-16	1.450	988
M-11	1.437	852
IS3	1.403	1.216
M-13	1.369	974
IS120	1.263	904
M-17	897	675
M-7	731	438
M-4	186	85
T	88	4
M-3	79	4
M-2	78	6
M-8	72	5
M.D.S. <sub>0,05</sub>	447	530

Los datos (en mg) son media de 4 repeticiones.

T , testigo no inoculado; T N , testigo no inoculado con nitrógeno.

Tabla 27.

EFFECTIVIDAD EN LA FIJACION SIMBIOTICA DE N<sub>2</sub> (MEDIDA COMO PESO SECO DE LA PARTE AEREA) DE ESTIRPES DE R.meliloti EN Medicago polymorpha (ecotipo Terebellum).

Estirpe	Peso seco (mg)	Estirpe	Peso seco (mg)
M-30	1.370	GRB1	85
M-22	1.336	795	83
M-28	1.303	793	79
M-23	1.293	GR4C	78
M-26	1.279	GRO15	76
M-21	1.264	GRC60	71
IS3	1.254	M-32	71
M-7	1.245	M-33	70
M-24	1.138	ISM103	69
M-29	1.133	ISM110	68
M-20	1.081	IS122	67
M-12	1.073	GRO19	66
M-27	1.018	ISM106	66
M-3	988	ISM107	66
M-13	962	MM-M	65
M-18	844	T	64
IS120	842	797	61
M-25	800	GR4	61
RCR2012	789	M-31	61
M-17	779	GRO27	59
M-8	523	ISM105	59
T N	388	ISM101	56
JC4004	96	M-19	56
RS96	93	ISM102	54
GRO13	86	ISM104	53
Rm2	86		
		M.D.S. 0,05	136

Los datos son media de 4 repeticiones. T, testigo no inoculado; T.N., testigo no inoculado con nitrógeno.

Tabla 28.

EFFECTIVIDAD EN LA FIJACION SIMBIOTICA DE N<sub>2</sub> (MEDIDA COMO PESO SECO DE LA PARTE AEREA) DE ESTIRPES DE R.meliloti EN Medicago polymorpha (ecotipo Inermis).

Estirpe	Peso seco (mg)	Estirpe	Peso seco (mg)
M-3	1.299	M-22	263
M-30	1.039	M-18	223
M-28	1.021	IS120	216
M-26	880	IS122	68
M-39	704	ISM106	63
M-34	691	ISM102	63
M-35	664	ISM107	61
M-38	657	GRO13	61
M-23	599	A-1	59
M-7	516	ISM110	58
M-36	475	ISM103	58
M-40	418	JC4004	57
M-21	401	ISM101	53
M-25	391	ISM104	52
M-24	380	ISM105	52
M-17	372	GR4	48
IS3	369	T	48
M-12	363	GRO15	47
M-27	337	A-2	47
M-13	312	M-20	42
M-37	279	M-8	38
M.D.S. 0,05			165

Los datos son media de 4 repeticiones.

T., testigo sin inocular.

Tabla 29.

EFFECTIVIDAD EN LA FIJACION SIMBIOTICA DE N<sub>2</sub> (MEDIDA COMO PESO SECO DE LA PARTE AEREA) DE ESTIRPES DE R.meliloti EN Medicago scutellata (ecotipo Sava).

Estirpes	Peso seco (mg)
T N	1.412
IS120	1.285
GRO15	1.040
RS96	922
IS3	905
AN-3	832
M-12	775
793	725
JC4004	635
RCR2012	619
IS122	610
T	589
M.D.S. 0,05	459

Los datos son media de 3 repeticiones.

T , testigo no inoculado; T N , testigo no inoculado con nitrógeno.

Tabla 30.

ANALISIS FACTORIAL. EFICIENCIA SIMBIOTICA DE DIFERENTES ESTIRPES DE R.meliloti Y DOS ECOTIPOS DE Medicago polymorpha.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F <sub>C</sub>
Estirpes	32	42,0665	1,3146	65,40**
Ecotipos	1	8,3125	8,3125	413,56**
Interacción	32	7,9165	0,2474	12,31**
Error	191	3,8328	0,0201	
Total	256	62,1283		

M.D.S.<sub>0,05</sub> Interacción = 196

Tabla 31.

ANALISIS FACTORIAL. EFICIENCIA SIMBIOTICA DE DIFERENTES ESTIRPES DE R.meliloti Y DOS ECOTIPOS DE Medicago sativa.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F <sub>C</sub>
Estirpes	16	27,1725	1,6983	22,70**
Ecotipos	1	6,2145	6,2145	83,08**
Interacción	16	1,0332	0,0646	0,86ns
Error	72	5,3835	0,0748	
Total	105	39,8037		

M.D.S.<sub>0,05</sub> Cepas = 313

M.D.S.<sub>0,05</sub> Ecotipos = 107

Tabla 32.

CLASIFICACION DE LAS ESTIRPES DE R.meliloti SEGUN SU EFECTIVIDAD SIMBIOTICA EN RELACION CON LA ESPECIE VEGETAL ENSAYADA.

Espece	Número de estirpes	Efectivas <sup>(1)</sup> (%)	Poco efec <sup>(2)</sup> tivas (%)	Inefec <sup>(3)</sup> tivas(%)
<u>Medicago sativa</u>				
ecotipo Aragón	20	70	15	15
ecotipo T. de Campos	20	80	15	5
<u>Medicago polymorpha</u>				
ecotipo Inermis	41	14,6	75,6	9,7
ecotipo Terebellum	49	40,8	40,8	18,4
<u>Medicago scutellata</u>				
ecotipo Sava	10	20	80	—

- (1) Estirpes efectivas: son las que permiten un crecimiento mayor que el valor de la semisuma del crecimiento registrado con la estirpe más efectiva y el testigo sin inocular.
- (2) Estirpes poco efectivas: son las que registran valores de crecimiento comprendidos entre la semisuma anterior y el testigo sin inocular.
- (3) Estirpes inefectivas: son las que determinan valores de crecimiento inferiores al testigo sin inocular.

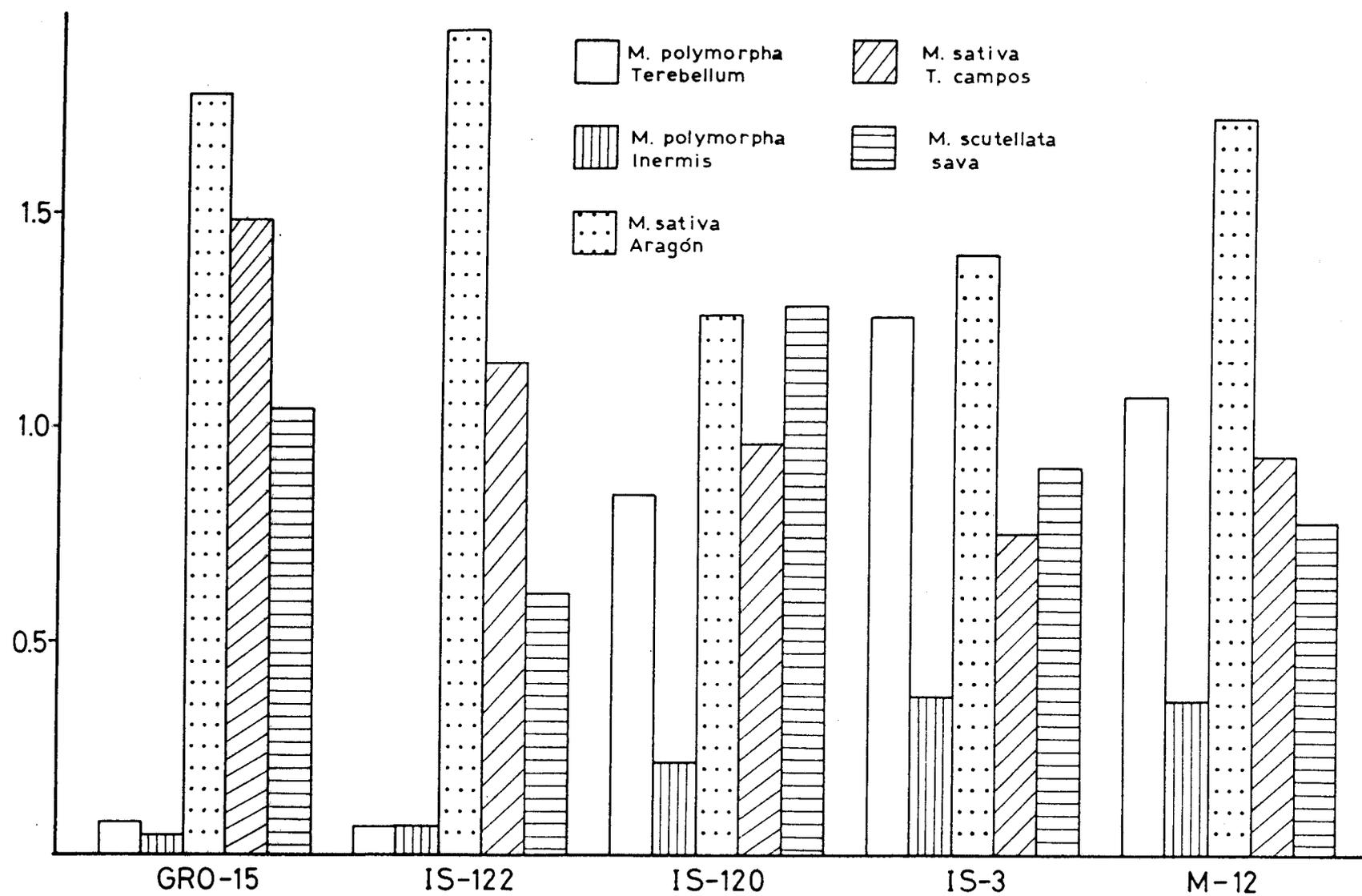


Figura 9.

Efectividad (peso seco de parte aérea) de algunas estirpes de R.meliloti frente a 3 especies de Medicago.

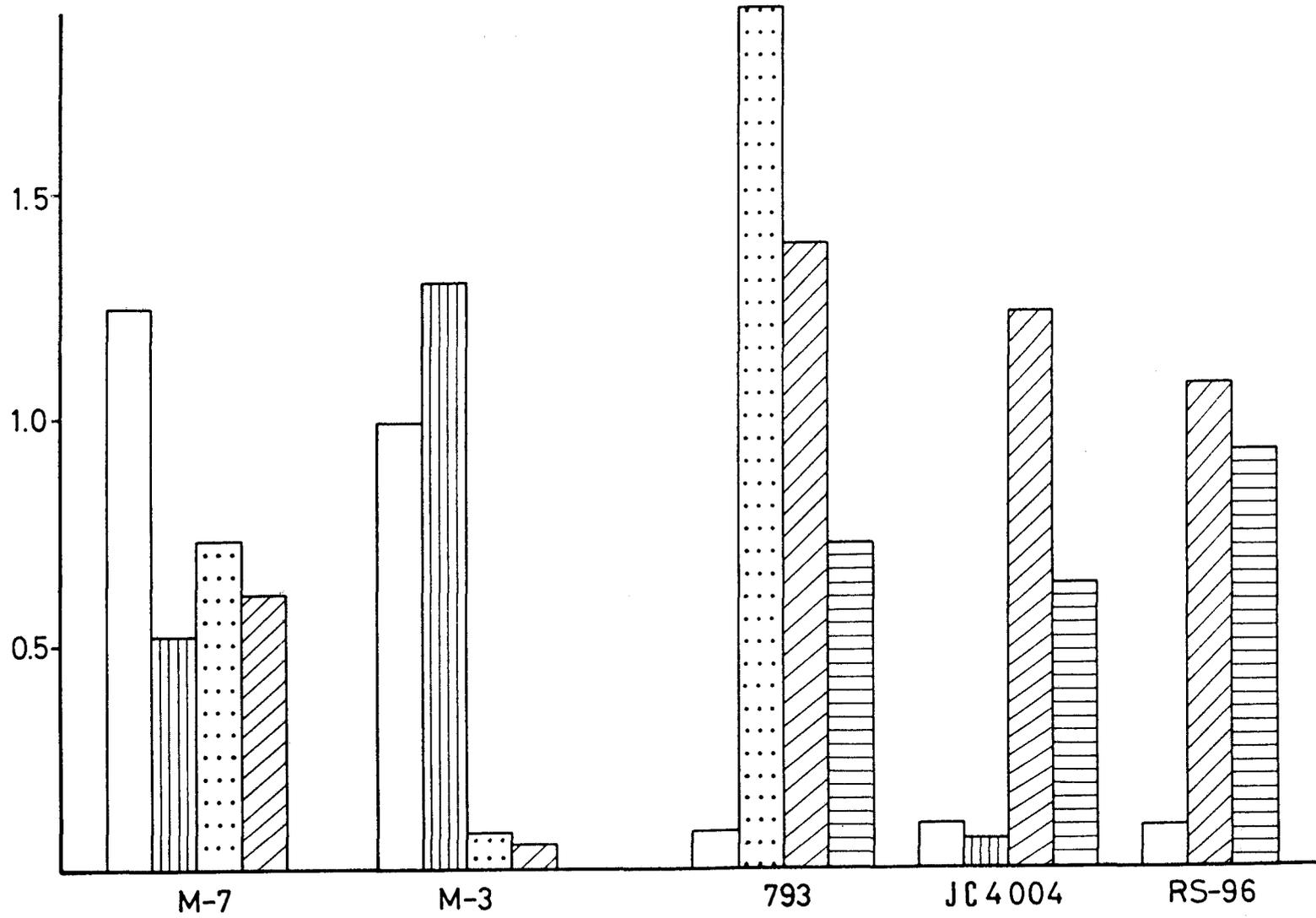


Figura 9. (continuación).

tirpes son efectivas (Tabla 32), un 70% en el ecotipo Aragón y un 80% en T. de Campos. La interacción entre la eficiencia de las estirpes y los dos cortes realizados no existió (T. de Campos) o fue muy pequeña (Aragón) (Tablas 25 y 26). Hay que señalar que las estirpes inefectivas en alfalfa proceden de aislamientos de plantas de M. polymorpha o Melilotus sp. y en consecuencia no están bien adaptadas a M. sativa.

En asociación con las especies anuales de Medicago, el porcentaje de estirpes efectivas fue menor que en el caso de M. sativa (Tabla 32). Las estirpes más eficientes en alfalfa, GRO15, GRO27, IS122 y 793, se comportaron como inefectivas con ambos ecotipos de M. polymorpha (Figura 9). En M. scutellata el número de estirpes ensayadas fue más reducido y no se incluyeron los aislamientos realizados a partir de plantas autóctonas, pero pudo confirmarse que estirpes efectivas en alfalfa eran competentes con esta especie anual de Medicago (IS120 y GRO15), no encontrándose asociaciones inefectivas (Tablas 29 y 32).

El análisis estadístico de los resultados demostró la existencia de diferencias significativas entre las diversas asociaciones Rhizobium-planta, no sólo a nivel de especie (Tablas 25-29) sino entre los cultivares de una misma especie (Tablas 30 y 31). Aunque se pueden encontrar estirpes de Rhizobium meliloti efectivas comunes a ambos ecotipos de M. sativa (GRO15, GRO27, 793 y 797), para la obtención de máximos rendimientos en la fijación de  $N_2$  se hace necesaria una selección exhaustiva de las estirpes mejor adaptadas a cada variedad vegetal y, en consecuencia, la preparación de inoculantes a base de estirpes altamente efectivas y competentes con cada una de ellas.

Estos datos están abundantemente apoyados por la bibliografía. Desde los trabajos de Vincent y Waters (1953), Russell y Jones (1975), Bromfield (1984), etc. se conoce la preferencia o selección que ejerce la planta huésped sobre una estirpe competente de Rhizobium de entre las existentes en la población rizosférica. La inoculación de una estirpe particular en varios huéspedes siempre determina respuestas diversas, que

dependen no sólo del fondo genético del microsimbionte sino también (y en gran medida) de la planta huésped con la que se establece la asociación simbiótica. Tal variación (especificidad de huésped) se manifiesta entre especies, entre ecotipos o variedades de una misma especie y entre plantas dentro de un cultivar. El empleo de isolíneas o plantas genéticamente homogéneas obtenidas por propagación vegetativa reduce la interacción entre los simbioses. En este caso (o trabajando en condiciones controladas) se pueden eliminar al menos en parte los efectos debidos a los factores ambientales, y separarlos de los genotípicos, quedando de manifiesto que la eficiencia simbiótica está controlada genéticamente por el hospedador (Jones y Hardarson, 1979).

CONCLUSIONES

1. Se ha diseñado un medio definido para el cultivo de Rhizobium meliloti tanto en el laboratorio como a escala industrial. La composición del medio es el resultado de un compromiso en el que se ha tenido en cuenta el coste de los productos utilizados. El medio contiene nitrato como fuente de nitrógeno y sacarosa como fuente de carbono.

2. Los mutantes "rugosos" de R.meliloti son menos infectivos y menos competitivos que la estirpe silvestre y que los mutantes superproductores de polisacárido extracelular. Ello sugiere que el PSE es necesario para que haya una infección óptima.

3. Se pueden producir alteraciones de la composición del PSE que no modifican significativamente el coeficiente de infectividad ni el grado de competitividad, lo que parece indicar que la estructura "global" del exopolisacárido no es un factor crítico para que haya infección óptima.

4. Los mutantes superproductores de exopolisacárido sobreviven mejor que la estirpe silvestre en los inoculantes de turba, presuntamente a causa de una mayor resistencia a la desecación.

5. No se han detectado correlaciones entre la alteración de la composición y/o el nivel de producción de exopolisacárido y el fagotipo, la producción de despolimerasas inducidas por fagos y la sensibilidad a la radiación ultravioleta. Ello impide diseñar métodos de selección positiva de mutantes.

6. No existen estirpes "universales" de R.meliloti, capaces de establecer una simbiosis óptima con las especies y ecotipos de Medicago empleadas. Por tanto, siempre que sea factible, conviene preparar los inoculantes utilizando estirpes adaptadas a cada especie, ecotipo o variedad.

BIBLIOGRAFIA

ABE, M., AMEMURA, A. y HIGASHI, T. 1982. Studies on cyclic  $\beta$ -1,2- glucan obtained from periplasmic space of Rhizobium trifolii cells. Plant Soil 64: 315-324.

ADAMS, M.H. 1966. Bacteriophages. John Wiley and Sons, Editors.

AGARWALL, A.K. y KEISTER, D.L. 1983. Physiology of ex-  
planta nitrogenase activity in Rhizobium japonicum. Appl.  
Environ. Microbiol. 45: 1592-1601.

ALBRECHT, S.L., MAIER, R.J., HANUS, F.J., RUSSELL, S.A.,  
EMERICH, D.W. y EVANS, H.J. 1979. Hydrogenase in Rhizobium  
japonicum increases nitrogen fixation by nodulated soybeans.  
Science 203: 1255-1257.

AMARGER, N. 1981. Selection of Rhizobium strains on  
their competitive ability for nodulation. Soil Biol. Biochem.  
13: 481-487.

AMARGER, N., OBATON, M. y BLANCHERE, H. 1967. Polysac-  
charides extracellulaires de Rhizobium meliloti. Can. J.  
Microbiol. 13: 99-105.

AMES, P. y BERGMAN, K. 1981. Competitive advantage pro-  
vided by bacterial motility in the formation of nodules by  
Rhizobium meliloti. J. Bacteriol. 48: 728-729.

BAE, H.C., COTA-ROBLES, E.H. y CASIDA Jr., L.E. 1972.  
Microflora of soil as viewed by transmission electron micro-  
scopy. Appl. Microbiol. 23: 637-648.

BAL, A.K., SHANTHARAM, S. y RATNAM, S. 1978. Ultrastruc-  
ture of Rhizobium japonicum in relation to its attachment to  
root hairs. J. Bacteriol. 133: 1393-1400.

BARNET, Y.M. 1972. Bacteriophages of Rhizobium trifolii.  
I. Morphology and host range. J. Gen. Virol. 15: 1-15.

BARNET, Y.M. y HUMPHREY, B. 1975. Exopolysaccharide  
depolymerases induced by Rhizobium bacteriophages. Can. J.  
Microbiol. 21: 1647-1650.

BARONDES, S.H. 1981. Lectins: their multiple endogenous  
cellular functions. Ann. Rev. Biochem. 50: 207-231.

BAROOAH, P.P. y SEN, A. 1964. Nitrogen fixation by Beijerinckia in relation to slime formation. Arch. Microbiol. 48: 381-385.

BAUER, W.D. 1981. Infection of legumes by rhizobia. Ann. Rev. Plant Physiol. 32: 407-449.

BEDMAR, E.J., MARTINEZ-MOLINA, E. y OLIVARES, J. 1984. Análisis de la medida de la actividad nitrogenasa (reducción de acetileno) para la selección de razas efectivas de Rhizobium. An. Edaf. Agrobiol. 43: 627-635.

BEDMAR, E.J. y OLIVARES, J. 1979. Nitrogen fixation (Acetylene reduction) by free-living Rhizobium meliloti. Current Microbiol. 2: 11-13.

BERGERSEN, F.J. 1961. The growth of Rhizobium in synthetic media. Aust. J. Biol. Sci. 14: 349-360.

BERGERSEN, F.J. 1980. Measurement of nitrogen fixation by direct means. In: Methods for evaluating Biological Nitrogen fixation (F.J. Bergersen, Ed.) pp. 65-110. John Wiley and Sons.

BERINGER, J.E. 1974. R-factor transfer in Rhizobium leguminosarum. J. gen. Microbiol. 84: 188-198.

BETHLENFALVAY, G.J. y PHILLIPS, D.A. 1977 a. Ontogenetic interaction between photosynthesis and symbiotic nitrogen fixation in legumes. Plant Physiol. 60: 419-421.

BETHLENFALVAY, G.J. y PHILLIPS, D.A. 1977 b. Effect of light intensity on carbon dioxide and nitrogen reduction in Pisum sativum L. Plant Physiol. 60: 868-871.

BEZDICEK, D.F., EVANS, D.W., ABEDE, B. y WITTERS, R.E. 1978. Evaluation of peat and granular inoculum for soybean yield and N fixation under irrigation. Agron. J. 70: 865-868.

BHAGWAT, A.A. y THOMAS, J. 1980. Dual binding sites for peanut lectin on rhizobia. J. gen. Microbiol. 117: 119-125.

BHUVANESWARI, T.V. y BAUER, W.D. 1978. The role of lectins in plant-microorganism interactions. III. Influence of rhizosphere/rhizoplane culture conditions on the soybean

lectin-binding properties of rhizobia. *Plant Physiol.* 62: 71-74.

BHUVANESWARI, T.V. PUEPPKE, S. y BAUER, W.D. 1977. Role of lectins in plant-microorganism interaction. I. Binding soybean lectin to rhizobia. *Plant Physiol.* 60: 486-491.

BJORND AHL, H. ERBING, C., LINDBERG, B., FAHREUS, G. y LJUNGGREN, H. 1971. Studies on an extracellular polysaccharide from Rhizobium meliloti. *Acta Chem. Scand.* 25: 1281-1286.

BOHLOOL, B.B., KOSSLAK, R.M. y WOOLFENDEN, R. 1984. The ecology of Rhizobium in the rhizosphere: Survival, growth and competition. *In: Advances in Nitrogen Fixation Research* (C. Veeger y W.E. Newton, Eds.) pp. 287-293. North-Holland Publishing Co., Amsterdam.

BOHLOOL, B.B. y SCHMIDT, E.L. 1973. Persistence and competition aspects of Rhizobium japonicum observed in soil by immunofluorescence microscopy. *Soil. Sci. Soc. Am. J.* 73: 561-564.

BOHLOOL, B.B. y SCHMIDT, E.L. 1974. Lectins: A possible basis for specificity in the Rhizobium-legume root nodule symbiosis. *Science*: 269-271.

BOON KERD, N., WEBER, D.F. y BEZDICEK, D.F. 1978. Influence of Rhizobium japonicum strains and inoculation methods on soybean grown in rhizobia-populated soils. *Agron. J.* 70: 547-549.

BRILL, W.J. 1980. Biochemical genetics of nitrogen fixation. *Microbiol. Rev.* 44: 449-467.

BROCKWELL, J. 1977. *In: A treatise on dinitrogen fixation*, Section II (R.W.F. Hardy y A.H. Gibson, Eds.) pp. 277-309. Wiley, New York.

BROCKWELL, J. 1981. Can inoculant strains ever compete successfully with established soil populations? *In: Current Perspectives in Nitrogen Fixation* (A.H. Gibson y W.E. Newton, Eds.) pp. 277. Aust. Acad. Sci., Canberra.

BROCKWELL, J., DUDMAN, W.F., GIBSON, A.H., HELY, F.W. y

ROBINSON, A.C. 1968. An integrated programme for the improvement of legume inoculant strains. Transactions of the 9th Int. Congress Soil Sci. Soc., vol. 2: 103-114.

BROCKWELL, J., GAULT, R.R., CHASE, D.L., HELY, F.W., ZORIN, M. y CORBIN, E.J. 1980. An appraisal of practical alternatives to legume seed inoculation: field experiments on seed bed inoculation with solid and liquid inoculants. Aust. J. Agr. Res. 31: 47-60.

BROCKWELL, J. y HELY, F.W. 1966. Symbiotic characteristics of Rhizobium meliloti: an appraisal of the systematic treatment of nodulation and nitrogen fixation interactions between hosts and Rhizobium of diverse origins. Aust. J. Agr. Res. 17: 885-899.

BROMFIELD, E.S.P. 1984. Variation in preference for Rhizobium meliloti within and between Medicago sativa cultivars grown in soil. Appl. Environ. Microbiol. 48: 1231-1236.

BROUGHTON, W.J. 1978. A review: Control of specificity in legume-Rhizobium associations. J. Appl. Bacteriol. 45: 165-194.

BROUGHTON, W.J. 1979. In: Photosynthesis and plant development (R. Marcelle, H. Clystess y M. van Poucke, Eds.) pp. 285-299. Junk, Den Haag, Netherlands.

BURNS, R.C. y HARDY, W.F. 1975. Nitrogen fixation in bacteria and higher plants. Springer-Verlag New York, New York.

BURTON, J.C. 1976. Methods of inoculating seeds and their effect on survival of rhizobia. In: Symbiotic nitrogen fixation in plants (P.S. Nutman, Ed.) pp. 175-189. Cambridge University Press, Cambridge.

BURTON, J.C. 1981 Rhizobium inoculants for developing countries. Trop. Agric. 58: 291-295.

BURRIS, R.H. 1977. Overview of nitrogen fixation. In: Genetic engineering for nitrogen fixation (A. Hollaender, Ed.) pp. 9-18. Plenum Press, New York.

BURRIS, R.M., PHELPS, A.S. y WILSON, J.B. 1942. Adapta-

tion of Rhizobium and Azotobacter. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 7: 272-275.

CADMUS, M.C., BURTON, K.A. y SLODKI, M.E. 1982. Growth-related substituent changes in exopolysaccharides of fast-growing rhizobia. Appl. Environ. Microbiol. 44: 242-245.

CALVERT, H.E., LALONDE, M., BHUVANESWARI, T.V. y BAUER, W.D. 1978. Role of lectins in plant-microorganism interactions IV. Ultrastructural localization of soybean lectin binding sites on Rhizobium japonicum. Can. J. Microbiol. 24: 785-793.

CARLSON, R.W., SANDERS, R.E., NAPOLI, C. y ALBERSHEIM, P. 1978. Host-symbiont interactions III. Purification and partial characterization of Rhizobium lipopolysaccharides. Plant Physiol. 62: 912-917.

CERDA-OLMEDO, E. y HANAWALT, P.C. 1967. Macromolecular action of nitrosoguanidine in Escherichia coli. Biochim. Biophys. Acta 142: 450-464.

CERVEÑANSKY, C. y ARIAS, A. 1984. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in pleiotropic carbohydrate-negative mutant strains of Rhizobium meliloti. J. Bacteriol. 160: 1027-1030.

CORPE, W.A. 1975. Metal-binding properties of surface materials from marine bacteria. Develop. Ind. Microbiol. 16: 249-255.

CORRAL, E. 1980. Estudios sobre bacteriófagos específicos de Rhizobium meliloti. Tesis Doctoral Universidad de Granada, Granada.

CORRAL, E., MONTOYA, E. y OLIVARES, J. 1978. Sensitivity to phages in Rhizobium meliloti as a plasmid consequence. Microbios Lett. 5: 77-80.

COSTERTON, J.W., DAMGAARD, H.N. y CHENG, K. -J. 1974 a. Cell envelope morphology of rumen bacteria. J. Bacteriol. 118: 1132-1143.

COSTERTON, J.W., INGRAM, J.M. y CHENG, K. -J. 1974 b.

Structure and function of the cell envelope of gram-negative bacteria. *Bacteriol. Rev.* 38: 87-110.

CRAWFORD, S.L. y BERRYHILL, D.L. 1983. Survival of Rhizobium phaseoli in coal-based legume inoculants applied to seeds. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 703-705.

CRIST, D.K., WYZA, R.E., MILLS, K.K., BAUER, W.D. y EVANS, W.R. 1984. Preservation of Rhizobium viability and symbiotic infectivity by suspension in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 895-900.

CHAKRABARTI, S., LEE, M.S. y GIBSON, A.H. 1981. Diversity in the nutritional requirements of strains of various Rhizobium species. *Soil Biol. Biochem.* 13: 349-354.

CHAO, W.L. y ALEXANDER, M. 1984. Mineral soils as carriers for Rhizobium inoculants. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 94-97.

CHEN, A.P.T. y PHILLIPS, D. 1976. Attachment of Rhizobium to legume roots as the basis for specific interactions. *Physiol. Plant.* 38: 83-88.

CHENG, K.-J. y COSTERTON, J.W. 1975. Ultrastructure of cell envelopes of bacteria of bovine rumen. *Appl. Microbiol.* 29: 841-849.

CHUNG, C.H. y GOLDBERG, A.L. 1981. The product of the lon (Cap R) gene in Escherichia coli is the ATP-dependent protease, protease La. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 4931-4936.

DA COSTA CASTRO, J.M., BRUNETEAU, M., MUTAFTSCHIEV, S., TRUCHET, G. y MICHEL, G. 1983. Isolation and identification of  $\beta$ -1,2-D-glucans in extracellular polysaccharides of Rhizobium meliloti L5-30. *FEMS Microbiol. Letters* 18: 269-274.

DATE, R.A. y ROUGHLEY, F.J. 1977. In: A treatise on Dinitrogen fixation, Section IV (R.W.F. Hardy y A.H. Gibson, Eds.) pp. 243-275. Wiley, New York.

DAZZO, F.B. y BRILL, W.J. 1979. Bacterial polysaccharide which binds Rhizobium trifolii to clover root hairs. *J.*

Bacteriol. 137: 1362-1373.

DAZZO, F.B. y HUBBELL, D.H. 1975 a. Concanavalin A: lack of correlation between binding to Rhizobium and specificity in Rhizobium-legume symbiosis. Plant Soil 43: 713-717.

DAZZO, F.B. y HUBBELL, D.H. 1975 b. Cross-reactive antigens and lectins as determinants of symbiotic specificity in Rhizobium trifolii-clover association. Appl. Microbiol. 30: 1017-1033.

DAZZO, F.B., URBANO, M.R. y BRILL, W.J. 1979. Transient appearance of lectin receptors of Rhizobium trifolii. Curr. Microbiol. 2: 15-20.

DEDONDER, R.A. y HASSID, W.Z. 1964. The enzymatic synthesis of a  $\beta$ -1,2-O-linked glucan by an extract of Rhizobium japonicum. Biochim. Biophys. Acta. 90: 239-248.

DEN DOOREN de JONG, L.E. 1971. Tolerance of Azotobacter for metallic and non-metallic ions. A. van Leeuwenhoek 37: 119-124.

DEINEMA, M.H. y ZEVENHUIZEN, L.P.T.M. 1971. Formation of cellulose fibrils by gram-negative bacteria and their role in bacterial flocculation. Arch. Microbiol. 78: 42-57.

DeJONG, T.M., BREWIN, N.J. y PHILLIPS, D.A. 1981. Effects of plasmid content in Rhizobium leguminosarum on pea nodule activity and plant growth. J. gen. Microbiol. 124: 1-7.

DESCHODT, C.C. y STRIJDOM, B.W. 1975. Effect of prior treatment of peat with ethylene oxide on methyl bromide on survival of rhizobia in inoculants. Phytophylactica 6: 229-234.

DILWORTH, M.J. 1966. Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations of Clostridium pasteurianum. Biochim. Biophys. Acta 127: 285-294.

DIXON, R.O.D. 1972. Hydrogenase in legume root nodule bacteroids: Occurrence and properties. Arch. Microbiol. 85: 193-201.

DIXON, R.O.D. 1978. Nitrogenase-hydrogenase interrela-

tionships in rhizobia. *Biochimie* 60: 233-236.

DIXON, R.O.D. y BLUNDER, E.A.G. 1983. The relative efficiency of nitrogen fixation in pea root nodules. *Plant Soil* 75: 131-138.

DOMBRINK-KURTZMAN, M.A., DICK Jr., W.E., BURTON, K.A., CADMUS, M.C. y SLODKI, M.E. 1983. Soybean lectin having 4-O-methyl-D-glucuronic acid specificity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 111: 798-803.

DOMMERGUES, Y.R., DIEM, H.G. y DIVIES, C. 1979. Polyacrylamide-entrapped Rhizobium as an inoculant for legumes. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 779-781.

DREYFUS, B.L., ELMERICH, C. y DOMMERGUES, Y.R. 1983. Free-living Rhizobium strain able to grow on N<sub>2</sub> as the sole nitrogen source. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 711-713.

DUDMAN, W.F. 1968. Capsulation in Rhizobium species. *J. Bacteriol.* 95: 1200-1201.

DUDMAN, W.F. 1976. The extracellular polysaccharide of Rhizobium japonicum: Compositional studies. *Carbohydr. Res.* 46: 97-110.

DUDMAN, W.F. 1978. Structural studies of extracellular polysaccharide of Rhizobium japonicum strains 71A, CC 708 and CB 1795. *Carbohydr. Res.* 66: 9-23.

DUNCAN, M.J. y FRAENKEL, D.G. 1979.  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase mutant of Rhizobium meliloti. *J. Bacteriol.* 137: 415-419.

DUNIGAN, E.P., SOBER, O.B., RABB, J.L. y BOQUET, D.J. 1980. Effects of various inoculants on nitrogen fixation yield of soybeans. *Bull. Louisiana State Univ. Agric. Exp. Station* 726: 3-16.

EDIE, S.A. 1983. Acetylene reduction and hydrogen evolution by nitrogenase in a Rhizobium-legume symbiosis. *Can. J. Bot.* 61: 780-785.

EISBRENNER, G. y EVANS, H.J. 1983. Aspects of hydrogen metabolism in nitrogen-fixing legumes and other plant microbe

interactions. *Ann. Rev Plant Physiol.* 34: 105-136.

ELKAN, G.H. y KWIK, I. 1968. Nitrogen, energy and vitamin nutrition by Rhizobium japonicum. *J. Appl. Microbiol.* 31: 399-404.

EVANS, H.J., EMERICH, D.W., RUIZ-ARGUESO, T., MAIER, R.J. y ALBRECHT, S.L. 1979. Hydrogen metabolism in the legume-Rhizobium symbiosis. *Proc. Steenbock-Kettering Int. Symp. on N<sub>2</sub> Fixation*, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin.

FINAN, T.M., WOOD, J.M. y JORDAN, C. 1983. Symbiotic properties of C<sub>4</sub>-dicarboxylic acid transport mutants of Rhizobium leguminosarum. *J. Bacteriol.* 154: 1403-1413.

FINNERAN, J.A. y CZUPPON, T.A. 1979. *In: A treatise on dinitrogen fixation* (F. Bottomley, Ed.) pp. 333-379. Wiley, New York.

FOTTRELL, P.F. y MOONEY, P. 1969. The regulation of some enzymes involved in ammonia assimilation by Rhizobium japonicum. *J. gen. Microbiol.* 59: 211-214.

FRANCO, A.A. y VINCENT, J.M. 1976. Competition among rhizobial strains for the colonization and nodulation of two tropical legumes. *Plant Soil* 45: 27-48.

FRED, E.B., BALDWIN, I.L. y MC COY, E. 1932. Root nodule bacteria and leguminous plants. *University of Wisconsin Studies in Science* 5. Univ. Wisconsin Press, Madison.

FRIEDMAN, B.A. y DUGAN, P.R. 1968. *Develop. Ind. Microbiol.* 9: 381-388.

GARDIOL, A., ARIAS, A. CERVENANSKY, C. y MARTINEZ-DRETS, G. 1982. Succinate dehydrogenase mutant of Rhizobium meliloti. *J. Bacteriol.* 151: 1621-1623.

GAULT, R.R., CHASE, D.L. y BROCKWELL, J. 1982. Effects of spray inoculation equipment on the viability of Rhizobium spp. in liquid inoculants for legume. *Aust. J. Exp. Anim. Husb.* 22: 299-309.

GAWORZEWSKA, E.T. y CARLILE, M.J. 1982. Positive chemotaxis of Rhizobium leguminosarum and other bacteria towards

root exudates from legumes and other plants. J. gen. Microbiol. 128: 1179-1188.

GIBSON, A.H. 1962. Genetic variation in the effectiveness of nodulation of lucerne varieties. Aust. J. Agric. Res. 13: 388-399.

GIBSON, A.H. 1966. The carbohydrate requirements for symbiotic nitrogen fixation: A "whole plant" growth analysis approach. Aust. J. Biol. Sci. 19: 499-515.

GIBSON, A.H. 1976. Recovery and compensation by nodulated legumes to environmental stress. In: Symbiotic nitrogen fixation in plants (P.S. Nutman, Ed.) pp. 385-403. Cambridge University Press, New York.

GIBSON, A.H., SCOWCROFT, W.R., CHILD, J.J. y PAGAN, J.D. 1976. Nitrogenase activity in cultured Rhizobium sp. strain 32 H 1. Arch. Microbiol. 108: 45-54.

GITTE, R.R., VITTAL RAI, P. y PATIL, R.B. 1978. Chemotaxis of Rhizobium sp. towards root exudate of Cicer arietinum L. Plant Soil 50: 553-566.

GLENN, A.R. y BREWIN, N.J. 1981. Succinate-resistant mutants of Rhizobium leguminosarum. J. gen. Microbiol. 126: 237-241.

GRAHAM, P.H. 1963. Vitamin requirements of root nodule bacteria. J. gen. Microbiol. 30: 245-248.

GRAHAM, P.H. 1964. Studies on the utilization of carbohydrates and Krebs cycle intermediates by rhizobia, using agar plate method. A. van Leeuwenhock 30: 68-72.

GRAHAM, P.H. y O'BRIEN, M.A. 1968. Composition of lipopolysaccharides from Rhizobium and Agrobacterium. A. van Leeuwenhock 34: 326-330.

GUEROLA, N., INGRAHAM, J.L. y CERDA-OLMEDO, E. 1971. Induction of closely linked multiple mutations by nitrosoguanidine. Nature 230: 123-125.

HALE, C.N. 1981. Methods of white clover inoculation. Their effect on competition for nodule formation between na-

turalized and inoculated strains of Rhizobium trifolii. New Zealand J. Exp. Agric. 9: 169-172.

HALE, C.N. 1983. Lucerne cultivars and their Rhizobium requirements. New Zealand J. Exp. Agric. 11: 161-163.

HALE, C.N. y MATHERS, D.J. 1977. Toxicity of white clover seed diffusate and its effect on the survival of Rhizobium trifolii. New Zealand Agric. Res. 20: 69-73.

HAM, G.E. 1980. Inoculation of legumes with Rhizobium in competition with neutralized strains. In: Nitrogen fixation, vol. 2 (W.E. Newton y W.H. Orme-Johnson, Eds.) pp. 131-138. University Park Press. Baltimore.

HAM, G.E., CARDWELL, V.B. y JOHNSON, H.W. 1971. Evaluation of Rhizobium japonicum inoculants in soils containing naturalized populations of rhizobia. Agron. J. 63: 301-303.

HAMBLIN, J. y KENT, S.P. 1973. Possible role of phytohaemagglutinin in Phaseolus vulgaris L.. Nature New Biol. 245: 28-30.

HANUS, F.J., ALBRECHT, S.L., ZABLOTOWICZ, R.M., EMERICH, D.W., RUSSELL, S.A. y EVANS, H.J. 1981. Yield and N content of soybean seed as influenced by Rhizobium japonicum inoculants possessing the hydrogenase characteristic. Agron. J. 73: 368-372.

HANUS, F.J., MAIER, R.J. y EVANS, H.J. 1979. Autotrophic growth of H<sub>2</sub>-uptake positive strains of Rhizobium japonicum in an atmosphere supplied with hydrogen gas. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 1788-1792.

HARDARSON, G., HEICHEL, G.H., VANCE, C.P. y BARNES, D.K. 1981. Evaluation of alfalfa and Rhizobium meliloti for compatibility in nodulation and nodule effectiveness. Crop Sci. 21: 562-567.

HARDARSON, G., HEICHEL, G.H., BARNES, D.K. y VANCE, C.P. 1982. Rhizobial strain preference of alfalfa populations selected for characteristics associated with N<sub>2</sub> fixation. Crop Sci. 22: 55-58.

HARDARSON, G. y JONES, G. 1979. Effect of temperature on competition amongst strains of Rhizobium trifolii for nodulation of two white clover varieties. *Ann. appl. Biol.* 92: 229-236.

HARDY, R.W.F. y HAVELKA, U.D. 1976. Photosynthate as a major factor limiting nitrogen fixation by field grown legumes with emphasis on soybeans. *In: Symbiotic nitrogen fixation in plants* (P.S. Nutman, Ed.) pp. 421-442. Cambridge University Press, Cambridge.

HARDY, R.W.F., HOLSTEN, R.D., JACKSON, E.K. y BURNS, R.C. 1968. The acetylene-ethylene assay for  $N_2$  fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.* 43: 1185-1207.

HARO, A. de. 1983. La calidad nutritiva de las leguminosas-grano y su control genético. *In: Leguminosas de grano.* pp. 211-247. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.

HELY, F.W., HUTCHINGS, R.J. y ZORIN, M. 1976. Legume inoculation by spraying suspensions of nodule bacteria in soil beneath seed. *J. Aust. Inst. Agric. Sci.* 42: 241-244.

HEPTINSTALL, S., ARCHIBALD, A.R. y BADDILEY, J. 1970. Teichoic acids and membrane functions in bacteria. *Nature* 225: 519-521.

HERRIDGE, D.F. 1982. Assesment of nitrogen fixation. *In: Nitrogen fixation in legumes* (J.M. Vincent, Ed.) pp. 123-136. Academic Press, Sydney, Australia.

HERRIDGE, D.F. y ROUGHLEY, R.J. 1975. Variation in colony characteristics and symbiotic efectiveness of Rhizobium. *J. Appl. Bacteriol.* 38: 19-29.

HEWITT, E.J. 1952. Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. *Tech. Commun.* 22. Commonwealth Agriculture Bureau.

HISAMATSU, M., AMEMURA, A., KOIZUMI, K., UTAMURA, T. y OKADA, Y. 1983. Stuctural studies on cyclic (1-2)- $\beta$ -D-glucans (cyclosophoraoses) produced by Agrobacterium and Rhizobium. *Carbohydr. Res.* 121: 31-40.

HICKEY, J.M., ROBERTSON, W.K., HUBBELL, D.H. y WHITTY, E.B. 1974. Inoculation, liming and fertilization of peanuts on Lakeland fine sand. Proc. Soil Crop Sci. Florida 33: 218-222.

HILL, S. 1975. Acetylene reduction by Klebsiella pneumoniae in air related to colony dimorphism on low fixed nitrogen. J. gen. Microbiol. 91: 207-209.

HILTBOLD, A.E., THURLOW, D.L. y SKIPPER, H.D. 1980. Evaluation of commercial soybean inoculants by various techniques. Agron. J. 72: 675-681.

HOGLUND, J.H. 1973. Bimodal response by nodulated legumes to combined nitrogen. Plant Soil 39: 533-545.

HOLL, F.B. 1975. Host plant control of the inheritance of dinitrogen fixation in the Pisum-Rhizobium symbiosis. Euphytica 24: 767-770.

HUBBELL, D.H. 1970. Studies on the root hair "curling factor" of Rhizobium. Bot. Gaz. 131: 337-342.

HUBBELL, D.H., MORALES, V.M. y UMALI-GARCIA, M. 1978. Pectolytic enzymes in Rhizobium. Appl. Environ. Microbiol. 35: 210-213.

HUGHES, A.H., HANCOCK, I.C. y BADDILEY, J. 1973. The function of teichoic acids in cation control in bacterial membranes. Biochem. J. 132: 83-93.

HUMPHREY, B.A. y VINCENT, J.M. 1969. The somatic antigens of two strains of Rhizobium trifolii. J. gen. Microbiol. 59: 411-425.

HUMPHREY, B.A. y VINCENT, J.M. 1975. Specific and shared antigens in strains of Rhizobium meliloti. Microbios 13: 71-76.

IRELAND, J.A. y VINCENT, J.M. 1968. A quantitative study of competition for nodule formation. Trans. 9th Int. Congress Soil Sci. 2: 85-93.

JACKSON, L.K., KEYSER, H.H., BURTON, K.A. y ENGLAND, R.E. 1983. Am. Chem. Soc. 17th Great Lakes Regional Meet. (St.Paul).

JACKSON, L.K., SLODKI, M.E., CADMUS, M.C., BURTON, K.A. y PLATTNER, R.D. 1980. 3-O-methyl-L-rhamnose from a Rhizobium capsular polysaccharide. Carbohydr. Res. 82: 154-157.

JANSEN VAN RENSBURG, H. y STRIJDOM, B.W. 1982 a. Root surface association in relation to nodulation of Medicago sativa. Appl. Environ. Microbiol. 44: 93-97.

JANSEN VAN RENSBURG, H. y STRIJDOM, B.W. 1982 b. Competitive abilities of Rhizobium meliloti strains considered to have potential as inoculants. Appl. Environ. Microbiol. 44: 98-106.

JANSSON, P.E., LINDBERG, B. y LJUNGGREN, H. 1979. Structural studies of the Rhizobium trifolii extracellular polysaccharide. Carbohydr. Res. 75: 207-220.

JENSEN, H.L., PETERSEN, E.J., DE, P.K. y BATTACHARYA, A. 1960. A new nitrogen-fixing bacterium: Derxia gummosa nov. gen. nov. spec.. Arch. Microbiol. 36: 182-195.

JONES, G. y HARDARSON, G. 1979. Variation within and between white clover varieties in their preference for strains of Rhizobium trifolii. Ann. appl. Biol. 92: 221-228.

KAMBERGER, W. 1979. An Ouchterlony double diffusion study on interaction between legume lectins and rhizobial cell surface antigens. Arch. Microbiol. 121: 83-90.

KAPUSTA, G. y ROUWENHORST, D.L. 1973. Influence of inoculum size on Rhizobium japonicum serogroup frequency in soybean nodules. Agron. J. 65: 916-919.

KATO, G., MARUYAMA, Y. y NAKAMURA, M. 1979. Role of lectins and lipopolysaccharides in the recognition process of specific Rhizobium-legumes symbiosis. Agric. Biol. Chem. 43: 1085-1092.

KATZNELSON, H. y ZAGALLO, A.C. 1957. Metabolism of rhizobia in relation to effectiveness. Can J. Microbiol. 3: 879-884.

KEEFER, R.F. y MORTENSEN, J.L. 1963. Biosynthesis of soil polysaccharides: I. Glucose and alfalfa tissue substrates. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 27: 156-160.

- KEELE, B.B., HAMILTON, P.B. y ELKAN, G.H. 1969. Glucose catabolism in Rhizobium japonicum. J. Bacteriol. 97: 1184-1191.
- KEISTER, K.L. 1975. Acetylene reduction by pure cultures of rhizobia. J. Bacteriol. 123: 1265-1268.
- KENNEDY, L.D. 1976. Isolation of 3-O-methyl-D-ribose from Rhizobium polysaccharide. Carbohydr. Res. 52: 259-263.
- KEYA, S.O. y ALEXANDER, M. 1975. Factors affecting growth of Bdellovibrio on Rhizobium. Arch. Microbiol. 103: 37-45.
- KEYSER, H.H. 1985. Agronomic implications of competition among rhizobia. 1st US-Spain Program Development Workshop on Nitrogen Fixation. Current Perspectives of Rhizobium-legume symbiosis. pp. 33-34. Granada.
- KOCH, B. y EVANS, H.J. 1966. Reduction of acetylene to ethylene by soybean root nodules. Plant Physiol. 41: 1748-1750.
- KONDOROSI, A., SVAB, Z. KISS, G.B. y DIXON, R.O.D. 1977. Ammonia assimilation and nitrogen fixation in Rhizobium meliloti. Molec. gen. Genet. 151: 221-226.
- KOSSLAK, R.M. y BOHLOOL, B.B. 1985. Influence of environmental factors on interstrain competition in Rhizobium japonicum. Appl. Environ. Microbiol. 49: 1128-1133.
- KRAUSE, R.M. 1972. Antigens of group D streptococci. In: Streptococci and streptococcal diseases (L.W. Wannamaker, Ed.) pp. 57-65. Academic Press, New York.
- KREMER, R.J. y PETERSON, H.L. 1982. Effect of inoculant carrier on survival of Rhizobium on inoculated seed. Soil Sci. 134: 117-125.
- KREMER, R.J. y PETERSON, H.L. 1983. Field evaluation of selected Rhizobium in an improved legume inoculant. Agron. J. 75: 139-143.
- KURZ, W.G.W. y LA RUE, T.A. 1975. Nitrogenase activity in rhizobia in absence of plant host. Nature 256: 407-408.

KUYKENDALL, L.D. y ELKAN, G.H. 1976. Rhizobium japonicum derivatives differing in nitrogen-fixing efficiency and carbohydrate utilization. Appl. Environ. Microbiol. 32: 511-519.

LABANDERA, C.A., ORIVE, R. y TEMPRANO, F. 1978. Producción de inoculantes para soja en España. Años 1977 y 1978. Anales IX Reunión Latinoamericana de Rhizobium pp. 326-339. México.

LA RUE, T.A. y KURZ, W.G.W. 1973. Estimation of nitrogenase using a colorimetric determination for ethylene. Plant Physiol. 51: 1074-1075.

LAW, I.J. y STRIJDOM, B.W. 1977. Some observations on plant lectins and Rhizobium specificity. Soil Biol. Biochem. 9: 79-84.

LAW, I.J., YAMAMOTO, Y., MORT, A.J. y BAUER, W.D. 1982. Nodulation of soybean by Rhizobium japonicum mutants with altered capsule synthesis. Planta 154: 100-109.

LEFFLER Jr., W.A. 1976. Leguminous plant inoculation process and apparatus. U.S. Patent 3,976,017.

LEIGH, J.A., SIGNER, E.R. y WALKER, G.C. 1985. Exopolysaccharide-deficient mutants of Rhizobium meliloti that form ineffective nodules. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 6231-6235.

LIEDERMAN, J. 1971. El bagazo como excipiente de inoculante para leguminosas. Rev. Ind. Agric. Tucumán 48: 51-58.

LOPEZ, R. y BACKING, J.H. 1968. Polysaccharide production by Beijerinckia and Azotobacter. Microbiol. Española 21:53-75.

LUDWIG, R.A. 1978. Control of ammonium assimilation in Rhizobium 32 H 1. J. Bacteriol. 135: 114-122.

LUDWIG, R.A. y SIGNER, E. 1977. Glutamine synthetase and control of nitrogen fixation in Rhizobium. Nature 267: 245.

MAHON, J.D. 1983. Energy relationships. In: Nitrogen Fixation, vol. 3, Legumes (W.J. Broughton, Ed.) pp. 299-325. Clarendon Press, Oxford.

MARTINEZ DE DRETS, G. y ARIAS, A. 1970. Metabolism of

some polyols by Rhizobium meliloti. J. Bacteriol. 103: 97-103.

MARTINEZ DE DRETS, G. y ARIAS, A. 1972. Enzymatic basis for differentiation of Rhizobium into fast- and slow-growing groups. J. Bacteriol. 109: 467-470.

MARTINEZ-MOLINA, E., MORALES, V.M. y HUBBELL, D.H. 1979. Hydrolytic enzyme production by Rhizobium. Appl. Environ. Microbiol. 38: 1186-1188.

MARSHALL, K.C. 1975. Ann. Rev. Phytopathol. 13: 357-373.

MAZZA, L.A., BALATTI, A.P. y LAGENS, R.P. 1979. Influencia de la fuente de carbono sobre el crecimiento y la citología de una cepa de Rhizobium. Rev. Fac. Agron. La Plata (3ª época) 55: 59-65.

MC COMB, J.A., ELLIOT, J. y DILWORTH, M.J. 1975. Acetylene reduction by Rhizobium in pure culture. Nature 256: 409-410.

MC GREGOR, C.A., MYTTON, L.R., BROCKWELL, J. y GIBSON, A.H. 1983. Nitrogen fixation by new and introduced lucerne cultivars. J. Aust. Inst. Agric. Sci. 49: 114-116.

MC INTIRE, F.C., PETERSEN, W.H. y RIKER, A.J. 1942. A polysaccharide produced by the crown-gall organism. J. Biol. Chem. 143: 491-496.

MC LOUGHLIN, T.J. y DUNICAN, L.K. 1985. Competitive studies with Rhizobium trifolii in laboratory experiments. Plant Soil 88: 139-143.

MEADE, J., HIGGINS, P. y O'GARA, F. 1985. Studies on the inoculation and competitiveness of a Rhizobium leguminosarum strain in soils containing indigenous rhizobia. Appl. Environ. Microbiol. 49: 899-903.

MINCHIN, F.R. y PATE, J.S. 1973. The carbon balance of a legume and the functional economy of its roots nodules. J. Exp. Bot. 24: 259-271.

MITCHELL, R. y NEVO, Z. 1965. Decomposition of structural polysaccharides of bacteria by marine micro-organism. Nature 205: 1007-1008.

MOAWAD, H. y BOHLOOL, B.B. 1984. Competition among Rhizobium spp. for nodulation of Leucaena leucocephala in two tropical soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 5-9.

MOAWAD, H.A., ELLIS, W.R. y SCHMIDT, E.L. 1984. Rhizosphere response as a factor in competition among three serogroups of indigenous Rhizobium japonicum for nodulation of field-grown soybeans. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 607-612.

MORENO, M.T. 1983. Las leguminosas de grano: una visión de conjunto. *In: Leguminosas de grano*, pp. 15-34. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.

MORRIS, E.R., REES, D.A., YOUNG, G., WALKINSHAW, M.D. y DARKE, A. 1977. Order-disorder transition for a bacterial polysaccharide in solution. A role for polysaccharide conformation in recognition between Xanthomonas pathogen and its plant host. *J. Mol. Biol.* 110: 1-16.

MORT, A.J. y BAUER, W.D. 1980. Composition of the capsular and extracellular polysaccharides of Rhizobium japonicum. Changes with culture age and correlations with binding of soybean seed lectin to the bacteria. *Plant Physiol.* 66: 158-163.

MORTENSON, L.E. 1978. The role of dihydrogen and hydrogenase in nitrogen fixation. *Biochimie* 60: 219-223.

MULONGOY, K. y ELKAN, G.H. 1977. Glucose catabolism in two derivatives of Rhizobium japonicum strain differing in nitrogen-fixing efficiency. *J. Bacteriol.* 131: 179-187.

NAPOLI, C.A. y ALBERSHEIM, P. 1980. Rhizobium leguminosarum mutants incapable of normal extracellular polysaccharide production. *J. Bacteriol.* 141: 1454-1456.

NELSON, D.W., SWEARINGIN, M.L. y BECKHAM, L.S. 1978. Response of soybeans to commercial soil-applied inoculants. *Agron. J.* 70: 517-518.

NICHOL, H. y THORNTON, H.G. 1942. Competition between related strains of nodule bacteria and its influence on infection of the legume host. *Proc. R. Soc. London Ser. B* 130: 32-59.



NUTMAN, P.S. (Ed.) 1976. In: Symbiotic nitrogen fixation in plants. Cambridge University Press, New York.

OADES, J.M. y WAGNER, G.H. 1971. Biosynthesis of sugars in soils incubated with  $^{14}\text{C}$  glucose and  $^{14}\text{C}$  dextran. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 35: 914-917.

OKON, Y., VOLFOVITCH, M., HENIS, Y. y PINTHUS, M.J. 1979. Inoculation of soybeans (Glycine max) in Israel with Rhizobium japonicum. Exp. Agric. 15: 267-272.

OLIVARES, J. 1964. Algunos aspectos de la simbiosis le guminosa-Rhizobium y aplicación al estudio de la misma de los anticuerpos fluorescentes. Ars Pharm. 5: 213-230.

OLIVARES, J., BEDMAR, E.J. y MARTINEZ-MOLINA, E. 1984. Infectivity of Rhizobium meliloti as affected by extracellular polysaccharides. J. Appl. Bacteriol. 56: 389-393.

OLIVARES, J., CASADESUS, J. y BEDMAR, E.J. 1980. Method for testing degree of infectivity of Rhizobium meliloti strains. Appl. Environ. Microbiol. 39: 967-970.

OLIVARES, J., MONTOYA, E. y PALOMARES, A.J. 1977. Some effects derived from the presence of extrachromosomal DNA in Rhizobium meliloti. In: Recent developments in Nitrogen Fixation , pp. 375-385 (W. Newton, R.J. Postgate y C. Rodriguez-Barrueco, Eds.) Academic Press, London.

ORME-JOHNSON, W.H., DAVIS, L.C., HENZL, M.T., AVERILL, B.A., ORME-JOHNSON, N.R., MUNCK, E. y ZIMMERMAN, R. 1977. Components and pathways in biological nitrogen fixation. In: Recent developments in Nitrogen Fixation (W. Newton, J.R. Postgate y C. Rodriguez-Barrueco, Eds.), pp. 131-178, Academic Press, London.

PAGAN, J.D., CHILD, J.J., SCOWCROFT, W.R. y GIBSON, A.M. 1975. Nitrogen fixation by Rhizobium cultured in a defined medium. Nature 256: 406-407.

PALOMARES, A.J., MONTOYA, E. y OLIVARES, J. 1978. Quality and rate of extracellular polysaccharides produced by Rhizobium meliloti and their inducing effect on polygalacturonase production in legume roots as derived from the presen

ce of extrachromosomal DNA. *Microbios*. 22: 7-13.

PARKER, C.A. y GROVE, P.L. 1970. Bdellovibrio bacteriovorus parasitizing Rhizobium in Western Australia. *J. Appl. Bacteriol.* 33: 253-255.

PARKER, C.A., TRINICK, M.J. y CHATEL, D.L. 1977. Rhizobia as soil rhizosphere inhabitants. In: A treatise on Dinitrogen Fixation, Section IV (R.W.F. Hardy y A.H. Gibson, Eds.) pp. 311-352. Wiley-Interscience, New York.

PATEL, J.J. y GERSON, T. 1974. Formation and utilization of carbon reserves by Rhizobium. *Arch. Microbiol.* 101: 211-220.

PHILLIPS, D.A. 1980. Efficiency of symbiotic nitrogen fixation in legumes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31: 29-49.

PLANQUE, K. y KIJNE, J.W. 1977 Binding of pea lectins to a glucan-type polysaccharide in the cell walls of Rhizobium leguminosarum. *FEBS-Letters* 73: 64-66.

PLANQUE, K., van NIEROP, J.J., BURGERS, A. y WILKINSON, S.G. 1979. Lipopolysaccharides of free-living and bacteroids forms of Rhizobium leguminosarum. *J. gen. Microbiol.* 110: 151-161.

PROCTOR, M.H. 1959. A function for the extracellular polysaccharide of Azotobacter vinelandii. *Nature* 184: 1934-1935.

PUEPPKE, S.G. 1981. The nodulation of soybeans apparently lacking lectins. 4<sup>th</sup> Int. Symp. Nitrogen Fixation, Canberra, Australia.

RAINBIRD, R.M., HITZ, W.D. y HARDY, R.W.F. 1984. Experimental determination of the respiration associated with soybean-Rhizobium nitrogenase function, nodule maintenance, and total nodule nitrogen fixation. *Plant Physiol.* 75: 49-53.

REDDY, V.M. y TANNER, J.W. 1980. The effects of irrigation, inoculants, and fertilizer nitrogen on peanuts (Arachis hypogaea L.) I. Nitrogen fixation. *Peanut Sci.* 7: 114-119.

REYES, V.G. y SCHMIDT, E.L. 1979. Population densities

of Rhizobium japonicum strain 123 estimated directly in soil and rhizospheres. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 854-858.

RIGAUD, J. y PUPPO, A. 1975. Indole-3-acetic acid catabolism by soybean bacteroids. *J. gen. Microbiol.* 88: 223-228.

ROBERT, F.M. y SCHMIDT, E.L. 1983. Population changes and persistence of Rhizobium phaseoli in soil and rhizospheres. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 550-556.

ROBERTSEN, B., AMAN, P., DARWILL, A.G., MC NEIL, M. y ALBERSHEIM, P. 1981. Host-symbiont interactions. V. The structure of the acidic extracellular polysaccharide secreted by Rhizobium leguminosarum and Rhizobium trifolii. *Plant Physiol.* 67: 389-400.

ROBERTSON, J.G., LYTTLETON, P. y PANKHURST, C.E. 1981. Preinfection and infection processes in the legume-Rhizobium symbiosis. In: *Current Perspectives in Nitrogen Fixation*, Proc. 4th Int. Symp. Nitrogen Fixation (A.H. Gibson y W.A. Newton, Eds.) pp.280-291. Australian Acad. Sci., Canberra.

ROBINSON, A.C. 1969. Host selection for effective Rhizobium trifolii by red clover and subterranean clover in the field. *Aust. J. Agric. Res.* 20: 1053-1060.

RONSON, C.W., LYTTLETON, P. y ROBERTSON, J.G. 1981. C<sub>4</sub>-dicarboxylate transport mutants of Rhizobium trifolii form ineffective nodules on Trifolium repens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 4284-4288.

RONSON, C.W. y PRIMROSE, S.B. 1979. Carbohydrate metabolism in Rhizobium trifolii: Identification and symbiotic properties of mutants. *J. gen. Microbiol.* 112: 77-88.

ROUGHLEY, R.J. 1968. Some factors influencing the growth and survival of root nodule bacteria in peat cultures. *J. Appl. Bacteriol.* 31: 259-265.

ROUGHLEY, R.J. 1970. The preparation and use of legume seed inoculants. *Plant Soil* 32: 675-701.

ROUGHLEY, R.J. 1976. The production of high quality inoculants and their contributions to legume yield. In: *Symbiotic*

Nitrogen Fixation in Plants (P.S. Nutman, Ed.) pp. 125-136. Cambridge University Press, Cambridge.

ROUGHLEY, R.J. y PULSFORD, D.J. 1982. Production and control of legume inoculants. In: Nitrogen Fixation in legumes (J.M. Vincent, Ed.) pp. 192-209. Academic Press, Australia.

ROVIRA, A.D. 1965. Plant root exudates and their influence upon soil microorganisms. In: Ecology of soil-borne plant pathogens (K.F. Baker y W.C. Snyder, Eds.) pp. 170-176. University of California Press, Berkeley.

RUIZ-ARGUESO, T., HANUS, J. Y EVANS, H.J. 1978. Hydrogen production and uptake by pea nodules as affected by strains of Rhizobium leguminosarum. Arch. Microbiol. 116: 113-118.

RUIZ-ARGUESO, T., SANTA MARIA, J., LABANDERA, C. y ORIVE, R. 1979. Crecimiento y sobrevivencia de Rhizobium japonicum (CB-1809) y Rhizobium trifolii (WU-290) en turbas españolas de diferentes orígenes. An. INIA/ Ser. Prod. Veg. 11: 127-137.

RUSSELL, P.E. y JONES, D.G. 1975. Variation in the selection of Rhizobium trifolii by varieties of red and white clover. Soil Biol. Biochem. 7: 15-18.

RYLE, G.J.A., POWELL, C.E. y GORDON, A.J. 1979. The respiratory cost of nitrogen fixation in soybean, cowpea and white clover. II Comparisons of the cost of nitrogen fixation and the utilization of combined nitrogen. J. Exp. Bot. 30: 145-153.

SADYKOV, B.F., KAPPUSHEV, A.V. y ZUYEVA, L.D. 1983. Estimation of the productivity of symbiotic nitrogen fixation by acetylene method. Mikrobiologiya 52: 519-524.

SCUDDER, W.T. 1975. Rhizobium inoculation of soybeans for sub-tropical and tropical soils. I. Initial field trial. Soil Crop. Sci. Soc. Florida Proc. 34: 79-82.

SCHACHTELE, C.F., LOKEN, A.H. y SCHMITT, M.K. Use of specifically labeled sucrose for composition of extracellular glucan and fructan metabolism by oral streptococci. Infect.

Inmun. 5: 263-276.

SCHMIDT, E.L. 1979. Initiation of plant root-microbe interactions. *Ann. Rev. Microbiol.* 33: 355-376.

SCHROEDER, V.N. y HINSON, K. 1975. *Soil Crop. Sci. Soc. Florida Proc.* 34: 101-103.

SCHUBERT, K.R. 1982. The energetics of biological nitrogen fixation. *Am. Soc. Plant Physiol.*, Rockville, Maryland.

SCHUBERT, K.R. y EVANS, H.J. 1976. Hydrogen evolution: A major factor affecting the efficiency of nitrogen fixation in nodulated symbionts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73: 1207-1211.

SCHUBERT, K.R., JENNINGS, N.T. y EVANS, H.J. 1978. Hydrogen reactions of nodulated leguminous plants. II. Effects on dry matter accumulation and nitrogen fixation. *Plant Physiol.* 61: 398-401.

SIDEBOTHAM, R.L. 1974. Dextrans. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 30: 371-444.

SKINNER, F.A., ROUGHLEY, R.J. y CHANDLER, M.R. 1977. Effect of yeast extract concentration on variability and cell distortion in Rhizobium spp. *J. Appl. Bacteriol.* 43: 287-297.

SKOTNICKI, M.L., ROLFE, B.G. y REPORTER, M. 1979. Nitrogenase activity in pure cultures of spectinomycin-resistant fast- and slow-growing Rhizobium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 86: 968-975.

SØMME, R. 1980. Pyruvic acid-containing mono- and oligosaccharides from Rhizobium trifolii Bart A. *Carbohydr. Res.* 80: 325-332.

SPARROW, Jr., S.D. y HAM, G.E. 1983. Survival of Rhizobium phaseoli in six carrier materials. *Agron. J.* 75: 181-184.

STARR, M.P. y HUANG, J.C. -C. 1972. Physiology of the Bdellovibrios. *Adv. Microb. Physiol.* 8: 215-261.

STEEL, R.G.D. y TORRIE, J.H. 1980. Principles and procedures of statistics. A biometrical approach. Int. Student Edition. Mc Grau-Hill Kogakusha, Ltd., London.

STRIJDOM, B.W. 1981. Some aspects of inoculant carriers of rhizobia. In: Current Perspectives in Nitrogen Fixation, 4th Int. Symp. Nitrogen Fixation (A.H. Gibson y W.E. Newton, Eds.) p. 339. Australian Acad. Sci., Canberra.

STRIJDOM, B.W. y DESCHODT, C.C. 1976. Carriers of rhizobia and the effects of prior treatment on the survival of rhizobia. In: Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants (P.S. Nutman, Ed.) pp. 151-168. Cambridge University Press, Cambridge.

STRIJDOM, B.W. y JANSEN VAN RENSBUR, H. 1981. Effect of steam sterilization and gamma irradiation of peat on quality of Rhizobium inoculants. Appl. Environ. Microbiol. 41: 1344-1347.

SUTHERLAND, I.W. 1977. Bacterial exopolysaccharides. Their nature and production. In: Surface carbohydrates of the prokaryotic cell (I.W. Sutherland, Ed.) pp. 27-96. Academic Press, London, New York.

TILAK, K.V.B.R. y SUBBA RAO, N.S. 1978. Carriers for legumes (Rhizobium) inoculants. Fert. News 23: 25-30.

TJEPKEMA, J.B. y EVANS, H.J. 1975. Nitrogen fixation by free-living Rhizobium in a defined liquid medium. Biochem. Biophys. Res. Commun. 65: 625-628.

TORRIANI, A. y PAPPENHEIMER, A.M. 1962. Inducible polysaccharide depolymerases of Bacillus palustris. J. Biol. Chem. 237: 3-13.

URBANO, M.R. y DAZZO, F.B. 1980. Age dependent determinants of bacterial adhesion in the Rhizobium-clover symbiosis. Abstr. Ann. Meet. Am. Soc. Microbiol. p. 163.

VANCE, C.P. y STADE, S. 1984. Alfalfa root nodule carbon dioxide fixation. II. Partial purification and characterization of root nodule phosphoenol pyruvate carboxylase. Plant Physiol. 75: 261-264.

VINCENT, J.M. 1962. Australian studies of the root-nodule bacteria. Proc. Linn. Soc. N.S.W. 79: 8-38.

VINCENT, J.M. 1970. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. IBP Handbook Nº 15. Blackwell Scientific Publications.

VINCENT, J.M. 1977. In: A treatise on dinitrogen fixation, Section III. Biology (R.W.F. Hardy y W.S. Silver, Eds.) pp. 277-366. John Wiley, New York.

VINCENT, J.M., NUTMAN, P.S. y SKINNER, F.A. 1979. In: Identification methods for microbiologists (F.A. Skinner, Ed.) pp. 49-69. Soc. Appl. Bact. Tech. Ser. 14. Academic Press, London.

VINCENT, J.E. y SMITH, M.S. 1981. Evaluation of inoculant viability on commercially inoculated legume seed. Agron. J. 74: 921-923.

VINCENT, J.M. y WATERS, L.M. 1953. The influence of the host on competition amongst clover root-nodule bacteria. J. gen. Microbiol. 9: 357-370.

WATANABE, T. KAMO, Y. MATSUDA, K. y DUDMAN, W.F. 1982. A new extracellular oligosaccharide, kojihexaose from Rhizobium japonicum strain 561. Carbohydr. Res. 110: 170-175.

WEAVER, R.W. y FREDERICK, L.R. 1974. Effect of inoculum rate on competitive nodulation of Glycine max L. Merrill. II. Field studies. Agron. J. 66: 233-236.

WEBER, D.F., CALDWELL, B.E., SLOGER, C. y VEST, H.G. 1971. Some USDA studies on the soybean-Rhizobium symbiosis. Plant Soil, Sp. vol., pp. 293-304.

WHATLEY, M.H., BODWIN, J.S., LIPPINCOTT, B.B. y LIPPINCOTT, J.A. 1976. Role for Agrobacterium cell envelope lipopolysaccharide in infection site attachment. Infect. Immun. 13: 1080-1083.

WINARNO, R. y LIE, T.A. 1979. Competition between Rhizobium strains in nodule formation: Interaction between nodulating and nonnodulating strains. Plant Soil 51: 135-142.

WOLD, F. 1971. Macromolecules: Structure and function. Prentice-Hall Englewood Cliffs, New Jersey.

WOLPERT, J.R. y ALBERSHEIM, P. 1976. Host-symbiont interactions. I. The lectins of legumes interact with O-antigen containing lipopolysaccharides of their symbiont rhizobia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 70: 729-737.

YORK, W., MC NEIL, M., DARWILL, A.G. y ALBERSHEIM, P. 1980.  $\beta$ -2-linked glucans secreted by fast-growing species of Rhizobium. *J. Bacteriol.* 142: 243-248.

YU, N., HISAMATSU, M., AMEMURA, A. y HARADA, T. 1983. Structural studies on an extracellular acidic polysaccharide (APS-I) of Rhizobium meliloti 201. *Agric. Biol. Chem.* 47: 491-498.

ZABLOTOWICZ, R.M., ESKEW, D.L. y FOCHT, D.D. 1978. Dinitrification in Rhizobium. *Can. J. Microbiol.* 24: 757-760.

ZABLOTOWICZ, R.M., RUSSELL, S.A., EVANS, H.J. 1980. Effect of the hydrogenase system in Rhizobium japonicum on the nitrogen fixation and growth of soybeans at different stages of development. *Agron. J.* 72: 555-559.

ZEVENHUIZEN, L.P.T.M. 1973. Methylation analysis of acidic exopolysaccharides of Rhizobium and Agrobacterium. *Carbohydr. Res.* 26: 409-419.

ZEVENHUIZEN, L.P.T.M. 1981. Cellular glycogen,  $\beta$ -1,2-glucan, poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid and extracellular polysaccharides in fast growing species of Rhizobium. *A. van Leeuwenhoek* 47: 481-497.

ZEVENHUIZEN, L.P.T.M. y SCHOLTEN-KOERSELMAN, H.J. 1979. Surface carbohydrates of Rhizobium. I.  $\beta$ -1,2-glucans. *A. van Leeuwenhoek* 45: 165-175.

ZEVENHUIZEN, L.P.T.M., SCHOLTEN-KOERSELMAN, H.J. y POSTHUMUS, M.A. 1980. Lipopolysaccharides of Rhizobium. *Arch. Microbiol.* 125: 1-8.

ZEVENHUIZEN, L.P.T.M. y VAN NEERVEN, A.R.W. 1984. Gel-forming capsular polysaccharide of Rhizobium leguminosarum and Rhizobium trifolii. In: *Advances in Nitrogen Fixation Research* (C. Veerger y W.E. Newton, Eds.) pp. 434.