

9/235

FACULTAD

TESIS DOCTORAL DE D^a

CONCEPCION AZCON GONZALEZ DE AGUILAR

Tesis Doctoral

**Fertilizantes microbianos:
Interacciones de Rhizobium y hongos de las
micorrizas V-A en la formación y eficacia
de sus respectivas simbiosis
con leguminosas**



Concepción Azcón González de Aguilar

UNIVERSIDAD DE GRANADA

1980



Biblioteca Universitaria de Granada



01151226

BIBLIOTECA
FACULTAD DE CIENCIAS
GRANADA

Estento 113
Tomo 1
Núm. 4

R= 23.242

T 9/125

FACULTAD DE CIENCIAS

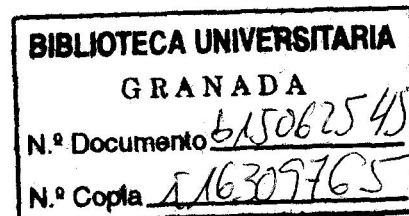
UNIVERSIDAD DE GRANADA

Facultad de Ciencias

Año 7-I-1980

ENTRADA N.º 15

FERTILIZANTES MICROBIANOS: INTERACCIONES DE *Rhizobium* Y HONGOS DE LAS MICORRIZAS V-A EN LA FORMACION Y EFICACIA DE SUS RESPECTIVAS SIMBIOSIS CON LEGUMINOSAS.



Concepción Azcón González de Aguilar

(Tesis Doctoral)

UNIVERSIDAD DE GRANADA

1980



FERTILIZANTES MICROBIANOS: INTERACCIONES DE *Rhizobium* Y HONGOS DE LAS MICORRIZAS V-A EN LA FORMACION Y EFICACIA DE SUS RESPECTIVAS SIMBIOSIS CON LEGUMINOSAS.

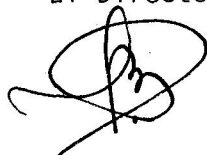
MEMORIA que presenta la Licenciada en Ciencias (Sección de Biológicas) Dña. Concepción Azcón González de Aguilar, para aspirar al Grado de Doctor.

Concepción Azcón

Fdo.- Concepción Azcón González de Aguilar

V° B°

El Director



Fdo.- Dr. José Miguel Barea
Investigador Científico del C.S.I.C.

V° B°

EL PONENTE



Granada, Enero de 1980

Este Trabajo ha sido realizado en el Departamento de Microbiología de la Estación Experimental del Zaidín (C.S.I.C), Granada, durante el tiempo comprendido entre Octubre de 1976 y Enero de 1980.

La realización de esta Tesis ha sido posible gracias a una Beca del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Parte de los resultados incluidos en esta MEMORIA, concretamente los correspondientes a las Tablas 3, 4, 5 y 40 y a las Figuras 6, 8 y 31, han sido publicados en las siguientes Revistas:

Canadian Journal of Microbiology: 24, 520-524 (1978)

Microbios Letters: 1979 (en prensa).

Nature: 279, 325-327 (1979)

A mis padres

Al finalizar este trabajo quiero expresar mi más sincero agradecimiento a las Personas e Instituciones que de alguna manera me ayudaron a lo largo de estos años y que, en suma, han permitido la realización de la presente Tesis Doctoral.

En primer lugar, al Dr. D. José Miguel Barea, Investigador Científico del C.S.I.C., Director de esta Tesis, por su constante y acertada labor de dirección. Su gran capacidad de trabajo e inquietud científica han constituido para mi un estímulo permanente y su enorme calidad humana ha contribuido a crear un ambiente de trabajo ideal para desarrollar con éxito una actividad científica.

Al Director de la Estación Experimental del Zaidín y al Jefe de la U. E. de I. de Microbiología de dicho Centro, por facilitarnos el material e instalaciones necesarios para llevar a cabo este estudio.

Al Padrino de la Tesis Dr. E. Montoya, mi Profesor de Microbiología, que por sus amplios conocimientos de esta Ciencia, es fuente constante de orientación y ayuda.

Una mención especial de mi gratitud la merecen mis compañeros de la U. E. de I. de Microbiología, concretamente, el Prof. J. Olivares, auténtico modelo de investigador científico, los Drs. R. Azcón y J. A. Ocampo, la Sra. I. López y demás miembros

de este departamento.

A la Sra. D. E. Rubí, que mecanografió la mayor parte de esta Memoria, quiero agradecerle no solo su valioso trabajo, sino también, y muy especialmente, la amabilidad con que lo realizó.

Varias personas me ayudaron, según su especialidad, en distintas facetas del Trabajo: Las Sras. Teresa, Pura y Pilar Medina y D. A. Coto, en análisis de plantas; las Sras. M. Thomas y R. Burgos, en análisis de suelos; D. J. Rodríguez Robledo, en fotografía; la Sra. M. Gomez-Moreno, en mecanografía; D. M. Martínez, en gráficas y D. J. Rosales, agricultor, por su colaboración en los ensayos de campo. A todos ellos quiero expresar mi gratitud, que hago extensiva a la U. E. de I. de Fisiología Vegetal por poner a mi disposición sus instalaciones para el cultivo de plantas.

Finalmente, mi reconocimiento al British Council por una Ayuda Económica que permitió mi desplazamiento a la Estación Experimental de Rothamsted (Inglaterra), para aprender técnicas necesarias para el desarrollo del presente estudio.

INDICE

INDICE

I. Objeto e interés del trabajo	1
II. Introducción	4
Micorrizas endotroficas vesiculo-arbusculares	6
Tipos de micorrizas	7
Presencia y distribución	7
Morfología y dinámica de la infección VA	9
Hongos formadores de micorrizas VA	12
Especificidad	13
Factores que controlan la infección	14
Efectos de las micorrizas VA sobre el crecimiento y nutrición de las plantas	20
Micotrofismo en plantas: Dependencia de las micorrizas	27
Micorrizas VA y enfermedades de las plantas	28
Implicaciones prácticas de las micorrizas VA	28
Papel de las micorrizas VA en la evolución de las plantas	30
Perspectivas de la investigación en micorrizas VA	31
Simbiosis mutualística <i>Rhizobium</i> -leguminosa	33
Presencia y distribución	34
Clasificación de los <i>Rhizobium</i>	34
Crecimiento de <i>Rhizobium</i> en la rizosfera	35
Propiedades características de la simbiosis <i>Rhizobium</i> -leguminosa.	36
Especificidad e infectividad	37
Efectividad o actividad	49

Consideraciones genéticas	54
Origen y evolución de la simbiosis	57
Implicaciones prácticas de la fijación de N_2 por la simbiosis <i>Rhizobium</i> -leguminosa	59
Perspectivas de investigación	62
Doble simbiosis en leguminosas: Coexistencia de micorrizas VA y nodulos fijadores de N_2	64
III. Plan de trabajo	68
IV. Material y métodos	71
Parte general	71
Microorganismos	71
Planta	71
Medios de cultivo	71
Suelos	74
Aislamiento, identificación y cuantificación de esporas VA	76
Obtención masiva de esporas	77
Cuantificación de la infección VA	77
Esterilización de semillas	78
Germinación de semillas	79
Esterilización de esporas en superficie	79
Esterilización de suelos	79
Parte especial	80
Ensayos de invernadero	80
Técnicas generales	80
Experiencia preliminar para poner de manifiesto la interacción <i>Rhizobium</i> x <i>Glomus</i>	83
Interacción de distintas fracciones de un cultivo de <i>Rhizobium</i> y <i>Glomus</i>	83
Efecto de algunos metabolitos de <i>Rhizobium</i> sobre la micorrización	85
Efecto de distintas concentraciones de polisacárido capsular de <i>Rhizobium</i> sobre la micorrización	87

Efecto de las fitohormonas	87
Ensayos "in vitro" sobre "cultivo" axénico de esporas de <i>Glomus</i>	92
Técnica de germinación en medio sólido	92
Técnica de "cultivo" axénico en medio líquido	93
Desarrollo del método	93
Efecto de la planta sobre la germinación de esporas y posterior desarrollo del hongo	95
Estudio de la producción de fitohormonas por esporas de <i>Glomus</i> germinadas axénicamente	96
Ensayos en suelos naturales para estudiar la aplicabilidad como "fertilizantes biológicos" de <i>Rhizobium</i> y <i>Glomus</i>	102
Ensayos para establecer la necesidad de inocular	102
Ensayos de "fertilización biológica" en campo	103
V. Resultados	106
Ensayos de invernadero	107
Aspectos generales	107
Interacción <i>Rhizobium</i> x <i>Glomus</i>	107
Interacción de distintas fracciones de un cultivo de <i>Rhizobium</i> x <i>Glomus</i>	107
Efecto de algunos metabolitos de <i>Rhizobium</i> sobre la micorrización	117
Efecto de distintas concentraciones de polisacárido de <i>Rhizobium</i> sobre la micorrización	120
Efecto de las fitohormonas	123
Ensayos "in vitro" sobre el cultivo axénico de esporas de <i>Glomus</i>	156
Efecto de las distintas fitohormonas sobre la germinación de esporas en medio sólido	156
Ensayos basados en el "cultivo" axénico de <i>Glomus</i> en medio líquido	166
Ensayos en suelos naturales para estudiar la aplicabilidad como fertilizantes biológicos de <i>Rhizobium</i> y <i>Glomus</i>	172

Ensayos para establecer la necesidad de inocular	172
Ensayos de fertilización biológica en campo	182
VI. Discusión	191
VII. Conclusiones	207
VIII. Resumen	209
IX. Bibliografía	210

OBJETO E INTERES DEL TRABAJO

I. OBJETO E INTERES DEL TRABAJO

Los microorganismos que viven en el suelo, desarrollan en su hábitat natural actividades de gran interés por su repercusión en el crecimiento y nutrición de las plantas, y como consecuencia de ello, en nutrición animal.

La necesidad de incrementar la calidad y cantidad de las cosechas agrícolas, ante la creciente demanda de alimentos, condiciona el progresivo agotamiento de los suelos, lo que a su vez, induce a aumentar el consumo de fertilizantes químicos, de elevado coste. Estos hechos han animado a investigar la posibilidad de manipular las poblaciones de microorganismos que habitan el suelo y que intervienen en los ciclos de los nutrientes, con el fin de mejorar el contenido en formas asimilables por las plantas cultivadas. La idea, lógicamente, es incrementar la producción vegetal y reducir el consumo de fertilizantes de elevado precio y contaminantes, a la larga, de los ecosistemas.

En este sentido, hacia la década de los años 50, se inició un capítulo de investigación sobre el posible empleo de bacterias solubilizadoras de fosfatos (fosfobacterias) y fijadoras de nitrógeno atmosférico (*Azotobacter*) como fertilizantes biológicos. Sin embargo, por diversas razones, unas de índole ecológica relacionadas con fenómenos de antagonismo entre microorganismos indígenas e introducidos, y otras derivadas de la falta de operatividad en la rizosfera de los mecanismos que tales bacterias demostraron "in vitro", dichos tratamientos no produjeron los efectos esperados. Fosfobacterias y *Azotobacter* fueron perdiendo credibilidad

como "fertilizantes" que podían ser aplicados en sustitución, al menos parcial, de los productos químicos clásicamente empleados con tal fin.

Actualmente, la atención se ha centrado en el estudio de microorganismos capaces de formar asociaciones simbióticas mutualísticas con las plantas. Así, estas se benefician directamente de la acción de los microorganismos, que a su vez encuentran en la planta un nicho ecológico protegido y fuentes de carbono asimilable. Tal es el caso de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa que, como se sabe, representa un importante aporte de nitrógeno a tales plantas y a través de ellas a la biosfera, y que es hoy día objeto de numerosos estudios debido a la gran variedad de facetas aún desconocidas de su biología. Igualmente, en los últimos años ha alcanzado un considerable interés el estudio de otra asociación mutualística entre hongos microscópicos y raíces de la mayoría de las plantas: Las micorrizas endotróficas vesículo-arbusculares (VA). Se sabe que las hifas del hongo que se desarrollan en la raíz y emergen de ella, juegan un importante papel en la translocación hacia la planta de iones fosfato, por lo que, en suelos con un contenido bajo en fosfato asimilable, caso generalizado a la mayoría de los suelos agrícolas, las micorrizas representan una contribución fundamental para la economía nutritiva de la planta. El interés por las micorrizas VA crece en la actualidad de forma considerable, no sólo por su potencialidad práctica, sino también porque diversos aspectos de su biología son, por ahora, desconocidos.

A pesar de la importancia que se reconoce a estas simbiosis microbio-planta, pocos trabajos se han dedicado a investigar efectos de la aplicación conjunta de *Rhizobium* y el hongo de la micorriza VA sobre el crecimiento y nutrición de las plantas (leguminosas). En tales trabajos se ha puesto de manifiesto una in-

teracción positiva, a nivel de efectos, entre ambos microorganismos. Como causas de ello se ha apuntado la interacción N x P que *Rhizobium* y hongos VA, respectivamente, aportan a la planta y a la simbiosis recíproca. No obstante, cabe esperar que ocurran interacciones entre ambos microorganismos, bien en el desarrollo de ellos en la rizosfera, bien en los procesos de infección de las raíces, en el establecimiento de las simbiosis, etc. El estudio de diversos aspectos de tales interacciones, así como los mecanismos por los cuales ocurren, es el OBJETO del presente TRABAJO.

Las leguminosas, plantas de gran interés agrícola, son las únicas susceptibles de mantener ambos tipos de simbiosis. Ellas pues serán el material vegetal utilizado para llevar a cabo esta investigación. Concretamente, la planta elegida ha sido la alfalfa, *Medicago sativa* L., dado, de un lado, su interés en nutrición animal en esta región agrícola, y de otro, debido a que sobre su *Rhizobium* específico, *R. meliloti*, se desarrollan en este Departamento investigaciones que han permitido conocer muchos aspectos de su Bioquímica y Genética, los cuales representan una base de conocimientos de gran utilidad para el presente estudio.

INTRODUCCION (REVISION BIBLIOGRAFICA)

II. INTRODUCCION (REVISION BIBLIOGRAFICA)

Hace unos 400 millones de años las plantas comenzaron a colonizar la superficie terrestre. Sin lugar a duda, el hambre y la sed, las dos grandes y eternas dificultades de la existencia sobre este Planeta, incidieron de forma decisiva en los primeros pasos de la evolución de los vegetales.

Como es mayoritariamente aceptado, las plantas se originaron a partir de las algas verdes. El tránsito de estas, desde su hábitat acuático a ambientes secos, y la evolución en ellos a "plantas" con "raíces", antecesoras de los actuales vegetales superiores, fue punto crucial en la historia de la vida sobre la tierra.

Hoy día se acepta que la colonización de aquel "suelo", seco y pobre, por las algas, fue posible gracias a que estas se asociaron con microorganismos, lo cual permitió que pudieran captar sus alimentos minerales. De un lado, hongos microscópicos formaron las primeras "micorrizas", simbiosis especializadas en la captación de fósforo (Nicolson, 1975; Pirozynski y Malloch, 1975) y de otro, las "plantas" se asociaron con microorganismos fijadores de N_2 atmosférico, asociaciones que posteriormente evolucionaron a simbiosis mutualísticas (Postgate, 1974).

Las micorrizas, se originaron prácticamente con las plantas, permitieron su evolución y a su vez, han evolucionado con ellas y con ellas se han perpetuado. Actualmente está fuera de duda que las simbiosis mutualísticas microbio-planta siguen desempeñando un papel idéntico al antes mencionado en la coloniza-

ción de nuevos hábitats (Harley, 1973) y, en general, se acepta que inciden decisivamente en el crecimiento y nutrición de los vegetales, hecho que cobra singular importancia en suelos de baja o moderada fertilidad.

La simbiosis *Rhizobium*-leguminosa y las micorrizas VA son quizás los dos ejemplos más representativos de los aspectos mencionados. Se trata de dos simbiosis mutualísticas (Lewis, 1973), en las que los microorganismos heterótrofos, hongo y *Rhizobium*, causan escaso daño a la planta huésped. Nutricionalmente, ambos microorganismos son biotrofos en condiciones ecológicas normales.

A continuación se estudian, por separado, las características y funcionalismo de ambas simbiosis y posteriormente, se considerará el significado de la coexistencia de ambas en plantas leguminosas.

MICORRIZAS ENDOTRÓFICAS VESÍCULO-ARBUSCULARES

"... under agricultural field conditions, crop do not, strictly speaking, have roots, they have mycorrhiza".

Wilhelm (1966)

Las micorrizas son simbiosis mutualísticas entre hongos y raíces de plantas superiores (Lewis, 1973 y Medve, 1978). Salvo en ciertas excepciones, limitadas cuantitativamente, la planta su ministra al hongo fuentes de carbono procedentes del fotosintato, además de un nicho ecológico protegido de los fenómenos de antagonismo microbiano en la rizosfera. Por su parte, el hongo ayuda a la planta a absorber sus nutrientes minerales del suelo (Nicolson, 1967 y Harley, 1972). Las condiciones de mutualismo llegan a esta tan acentuadas en las micorrizas, que se puede decir, de acuerdo con Gerdemann (1968), que "la mayoría de las plantas cuando crecen en condiciones naturales son organismos *dobles* en el sentido de que el órgano a través del cual absorben agua y nutrientes está constituido por la raíz propiamente dicha y un hongo".

En las excepciones referidas anteriormente, la relación hongo-planta, puede cambiar de biotrófica a necrotrófica, es decir, dejaría de ser una simbiosis mutualística para pasar a parasitismo (Smith, 1974; Crush, 1976).

Tipos de micorrizas

Históricamente, las micorrizas han venido siendo clasificadas, en base a su estructura y morfología, en dos grandes grupos: Ectotróficas y Endotróficas. En las primeras, se incluían micorrizas en las cuales el hongo, normalmente de micelio tabicado, forma un auténtico manto de hifas que rodea la raíz. El desarrollo del hongo en el interior de la corteza es intercelular, dando aspecto de red (red de Hartig). En las endotróficas, sin embargo, el hongo no forma manto sobre la raíz, y las hifas penetran en el interior de las células de la corteza. No obstante, hoy día se sabe que los hongos formadores de endomicorrizas están muy distanciados taxonómica y fisiológicamente, por lo que ha sido necesario modificar esta clasificación y subdividir a las antiguas Endotróficas en varios grupos.

En la Figura 1 se presentan los tipos de micorrizas actualmente aceptados de acuerdo con Smith (1974) y Lewis (1975).

Es evidente que las micorrizas más extendidas, son las de tipo vesículo-arbuscular (VA). Esta simbiosis, se encuentra en todos los climas y es formada por la mayoría de las plantas de interés agrícola e industrial (Sanders y Hayman, 1977).

Micorrizas Vesículo-Arbusculares (VA): Presencia y distribución

Las micorrizas vesículo-arbusculares se conocen desde el siglo pasado, pero a pesar del interés ecológico que se deriva de su casi omnipresencia, no se les prestó demasiada atención. En los últimos 15 a 20 años, y ante la evidencia de la repercusión de esta simbiosis en nutrición vegetal, es cuando se está realizando una investigación cada vez más intensa sobre el tema.

Las micorrizas VA han sido descritas en todos los conti-

FIGURA 1
TIPOS DE MICORRIZAS

DENOMINACION CLASICA	DENOMINACION ACTUAL	CARACTERISTICAS	PLANTA HUESPED	HONGOS QUE LA FORMAN	
Ectotróficas	Formadoras de "manto" (sheating)	<ul style="list-style-type: none"> * Forman "manto" que cubre la raíz * Hifas sólo intercelulares que forman la red de Hartig * Hongo de micelio septado 	<ul style="list-style-type: none"> Betulaceae Fagaceae Pinaceae Eucaliptus 	Agaricaceae Boletaceae y otros.	
	Vesículo-arbusculares (VA)	<ul style="list-style-type: none"> * Desarrollo mayoritario del hongo dentro de la raíz. * Hifas externas no formadoras de manto * Micelio no septado, salvo en hifas viejas * Hifas inter e intracelulares: las intercelulares no forman red de Hartig, las intracelulares forman arbuscúlos y vesículas. 	<ul style="list-style-type: none"> Se han encontrado en la mayoría de las plantas que viven sobre la corteza terrestre. 	Ficomicetos microscópicos pertenecientes a la Familia Endogonaceae.	
Endotróficas	Ericaceae	Ericoides	<ul style="list-style-type: none"> * Rudimento de manto * Hifas inter e intracelulares: las intracelulares forman masas compactas que pueden ser lisadas o digeridas. * No se forman vesículas ni arbuscúlos 	<ul style="list-style-type: none"> Ericaceae Epacridaceae Empetraceae 	Ascomicetos
		Arbutoides	<ul style="list-style-type: none"> * Forman manto * Hifas intra e intercelulares: las intercelulares no forman red de Hartig 	<ul style="list-style-type: none"> Ericaceae Pyrolaceae Monotropaceae 	<ul style="list-style-type: none"> Arbutus Arctostaphylos Boletus
(Ectendotróficas)	Orquidaceas	<ul style="list-style-type: none"> * La planta huésped tiene un periodo de su ciclo de vida heterótrofo durante el cual, para sobrevivir, necesita ser infectada por un hongo micorrízico. * La infección del huésped por el hongo puede evolucionar a micorriza o parasitismo 	Orchidaceae	Basidiomicetos	

nentes, excepto en la Antártida (Tinker, 1975). Se han encontrado en Briofitas, Pteridofitas, Gimnospermas y Angiospermas (Gerdemann, 1975) y mientras que solo un 3% aproximadamente de las fanerógamas tienen micorrizas "formadoras de manto" (Meyer, 1973), la gran mayoría de las especies restantes tienen micorrizas VA.

La opinión de Gerdemann (1975) es muy expresiva cuando dice que "es más fácil enumerar las familias de plantas en las cuales no se han encontrado (micorrizas VA) que recopilar una lista de aquellas en las que se sabe están presentes". Estas familias en las que no se han encontrado micorrizas VA son, de acuerdo con Gerdemann (1975), las siguientes: a) *Pinaceae*, *Betulaceae* y *Fagaceae* (forman micorrizas con manto); b) *Orchidaceae* y *Ericaceae* (forman sus tipos específicos de micorrizas); c) ciertas familias que han sido descritas como "no micorrizables" tales como *Chenopodiaceae*, *Cruciferae*, *Fumariaceae*, *Cyperaceae*, *Commelinaceae*, *Urticaceae* y *Poligonaceae* (Hirrel et al., 1978). No obstante, algunas especies de estas familias han sido descritas recientemente como micorrizables (Gerdemann, 1975; Kruckelmann, 1973). Es más, no sería ilógico pensar que plantas supuestamente "no micorrizables" en condiciones normales, puedan serlo en otras condiciones de cultivo.

Existen también ciertos grupos de plantas que tienen tanto micorrizas "formadoras de manto" como micorrizas VA, tal es el caso de *Salicaceae*, *Juglandaceae*, *Tiliaceae*, *Mirtaceae*, *Juniperus*, *Chamaecyparis* (Gerdemann, 1968) *Quercus* (Grand, 1969) y *Caesalpinaceae* (Redhead, 1968).

Morfología y dinámica de la infección VA

Aunque la ausencia de "manto" de micelio externo dificulta el reconocimiento de las micorrizas VA, utilizando una técnica sencilla de clarificación y tinción (Phillips y Hayman, 1970),

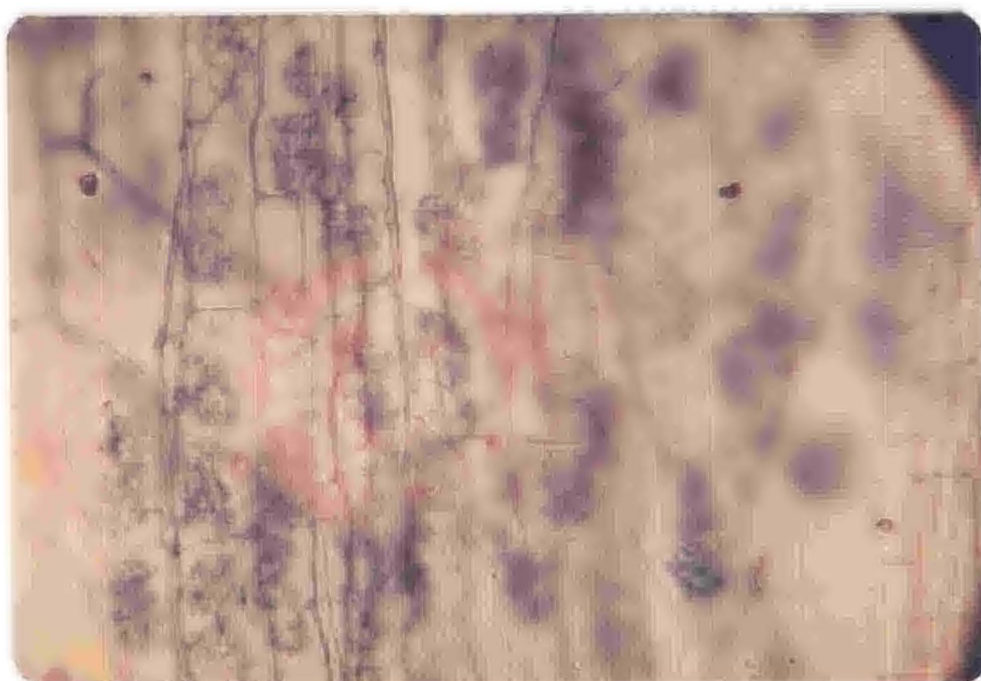
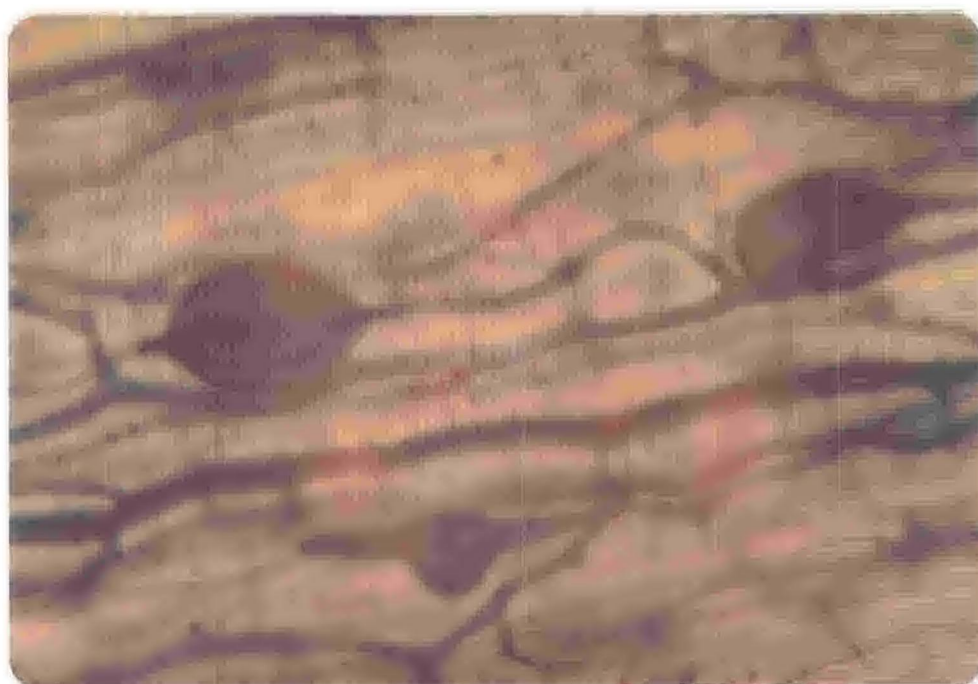
puede ser estudiada su morfología mediante el examen microscópico consiguiente. En contraste con lo que sucede en las micorrizas formadoras de manto, la infección VA origina pocos cambios morfológicos en la raíz.

La infección se desarrolla, bien a partir de clamidosporas, o bien a partir del micelio originado en una raíz previamente infectada (Tinker, 1975a y Powell, 1976). Las clamidosporas, que resisten condiciones adversas en el suelo, tales como el calor y la sequía, germinan cuando las circunstancias son favorables. Los "tubos de germinación" producidos, mueren a no ser que encuentren, y penetren con éxito, en una raíz huésped (Sanders y Hayman, 1977). El tubo de germinación, o la hifa infectiva, forman un apresorio sobre la superficie de la raíz, produciéndose así la penetración del hongo, que según Tinker (1975a) tiene lugar normalmente entre dos células epidérmicas. La hifa invasora se ramifica intercelularmente, de forma rápida, en la corteza de la raíz, sin invadir endodermis, eje ni meristemas.

Poco tiempo después de la infección se desarrollan los "arbusculos" mediante ramificación dicotómica repetida de hifas intracelulares, hasta la formación de hifas de menos de $0,2 \mu\text{m}$ de diámetro (Tinker, 1975a). Cuando se forma un arbusculo, el almidón de la célula invadida desaparece al mismo tiempo que el núcleo se alarga y se divide (Gerdemann, 1975). Los arbusculos son digeridos rápidamente y su contenido es absorbido por el huésped (Kaspari, 1973). Después de que los arbusculos son digeridos, los núcleos vuelven a su tamaño normal y el almidón puede reaparecer (Gerdemann, 1975).

Posteriormente a los arbusculos se forman las vesículas que son estructuras ovoides que contienen material lipídico. Estos son órganos de reserva, y en algunos casos, su pared gruesa las asemeja a clamidosporas. Se forman intra o intercelularmente





Elementos morfológicos típicos de las micorrizas V-A: Vesículas (arriba) y arbusculos (abajo).

y tanto fuera como dentro de la raíz (Gerdemann, 1968 y 1975 y Nicolson, 1967).

El desarrollo de la infección en el interior de la corteza está acompañado por un crecimiento exterior de las hifas, estableciéndose posteriores puntos de entrada. Las hifas que emergen de la raíz se extienden por el suelo varios centímetros (Rhodes y Gerdemann, 1975), dando lugar al micelio externo, que se desarrolla en la etapa de formación de vesículas, y que constituye el sistema de absorción de nutrientes. Está formado por una red tridimensional de hifas, unas de 8-30 μm de diámetro (Tinker 1975 y Nicolson, 1967) que son consideradas la base permanente de este micelio, y otras más delgadas (2-7 μm), de posible función rizoidal, más efímeras que las anteriores.

Sobre el micelio externo se forman grandes esporas vegetativas que van madurando hasta convertirse en clamidosporas. Algunas especies de hongos VA forman esporas dentro de la raíz, en tal abundancia, que llegan a romperla (Gerdemann, 1975) mientras que otros endofitos VA no forman esporas de resistencia (Mosse, 1978). Determinadas especies forman esporocarpos (Gerdemann y Trappe, 1974).

En cuanto a la dinámica del desarrollo de la infección VA en un huésped, aunque con peculiaridades y matices propios de las especies implicadas y factores ecológicos controlantes, se caracteriza por seguir un modelo en 3 fases: Fase lag, en la que tiene lugar la germinación de las esporas y comienza la colonización de las raíces por las hifas; a continuación, sigue una fase de desarrollo intensivo de la infección, y por último, se llega a la fase de constancia en la cual no varía la proporción entre raíces micorrizadas y no micorrizadas. Si se representa en una gráfica el porcentaje de infección con respecto al tiempo, se obtiene una

típica curva sigmoïdal (Sutton, 1973).

Tinker (1975a) propone un modelo teórico, basado en una fórmula matemática, que permite calcular el desarrollo de la infección en un momento dado. Este modelo, según su autor, es útil para precisar el concepto de especificidad, en el sentido de susceptibilidad de un huésped a la infección. El modelo acepta que el ritmo de la infección, es decir, el ritmo de formación de nuevas raíces infectadas por unidad de volumen de suelo, es proporcional a la constante S (susceptibilidad o especificidad), a la cantidad de raíces no infectadas, pero receptivas, y a la cantidad de raíces infectadas, todo por unidad de volumen de suelo. Partiendo de la base del crecimiento exponencial de la raíz, Tinker obtiene una fórmula, que aplicada y calculada para una secuencia de días, proporciona una curva teórica que coincide sensiblemente con la obtenida experimentalmente.

Hongos formadores de micorrizas VA

El parecido de las infecciones VA en su anatomía, hizo pensar que la mayoría de ellas estaban causadas por el mismo hongo. Hasta la revisión de Mosse (1973a) se aceptaba que los endofitos VA pertenecían en su mayoría al género *Endogone*, del cual se habían descrito diversidad de "tipos" o "razas". De acuerdo con la clasificación de Taxter (1922), todas las especies de *Endogone* forman esporocarpos. En vista del descubrimiento de esporas de resistencia ectocárpicas, unidas al micelio externo de raíces micorrizadas, Mosse sugirió la necesidad de revisar la taxonomía de estos hongos. En este sentido, Gerdeman y Trappe (1974) llevan a cabo estos estudios y encuadran a los hongos VA en la familia *Endogonaceae* de los *Mucorales* (ficomicetos), agrupados en 4 géneros: *Glomus*, *Sclerocystis*, *Gigaspora* y *Acaulospora*, ninguno de los cuales ha podido ser aislado en cultivo puro. Hoy día se acepta universalmen



Esporas (arriba) y esporocarpo (abajo) de *Glomus mosseae*

te esta clasificación y se le adicionan nuevas especies (Hall, 1977; Nicolson y Schenck, 1979 y Daniels y Trappe, 1979).

De gran interés es la "clave de identificación práctica" de Mosse y Bowen (1968), en la que se diferencian los hongos VA de acuerdo con la estructura de la pared y citoplasma, color, forma y tamaño de la espora, forma de la hifa de sustentación, modalidad de germinación, etc. Algunos de los tipos de espora de Mosse y Bowen (1968) difieren sólo en características poco importantes, y otros, en aspectos fundamentales. De esto se deduce que en unos casos se trata de esporas pertenecientes a géneros diferentes, en otros a especies, y finalmente, ciertos tipos no son más que variedades o estirpes de una misma especie. Hoy día, sigue siendo muy común la utilización en la bibliografía de la denominación del "tipo de espora" de Mosse y Bowen (1968), si bien, se indica, así mismo, la especie de Gerdemann y Trappe (1974) correspondiente.

Especificidad (Suceptibilidad)

Los hongos que forman micorrizas VA tienen un espectro de huéspedes extremadamente amplio, lo cual hace catalogarlas como inespecíficas. Sin embargo, sí que existen diferencias en el grado de susceptibilidad del huésped y en la adaptabilidad del hongo a determinadas condiciones. La existencia, por ejemplo, de hongos más adaptados a especies forestales y otras a cultivos agrícolas, es un hecho comprobado (Gerdemann, 1975); así mismo, se sabe que el pH de un suelo es un factor determinante de la presencia y efectividad de ciertos tipos de esporas (Mosse, 1972 y Graw, 1979). Esto parece indicar que sí hay marcadas diferencias en la facilidad e intensidad con que los endofitos infectan, se desarrollan y operan en distintos huéspedes y bajo diferentes condiciones ecológicas (Mosse, 1973a; Strzemska, 1974; Hayman, 1975b;

Kruckelmann, 1975). Estas consideraciones permiten concluir, de acuerdo con Mosse, que existe "cierta especificidad" en micorizas VA, en términos de efectividad de la simbiosis, pero que ésta parece depender más de la interacción con un tipo de suelo y condiciones de cultivo, que con un huésped particular.

Factores que controlan la infección

El potencial infectivo de un suelo viene determinado por la cantidad de esporas presentes y por la intensidad de la infección de las raíces que contiene. Estos parámetros se sabe que están influenciados por las condiciones ambientales.

Para extraer y cuantificar las esporas de hongos VA de un suelo se usa la técnica, relativamente sencilla, del "tamizado húmedo y decantación" ("wet sieving and decanting"), descrita en detalle por Gerdemann y Nicolson (1963). La cuantificación de la infección se lleva a cabo, normalmente, mediante el examen microscópico de muestras representativas de raíces (Phillips y Hayman, 1970). Recientemente, se han revisado y evaluado los métodos más comunmente usados para cuantificar la micorrización en raíces teñidas (Giovannetti y Mosse, 1980).

De otro lado, Hepper (1977) y Becker y Gerdemann (1977), han propuesto métodos colorimétricos para estimar la intensidad de la infección VA, pero la aplicabilidad de estos métodos es limitada y no han desplazado a la técnica anteriormente citada.

La mayoría de las esporas (Hayman, 1970) y de las raíces micorrizadas (Sparling y Tinker, 1975) se encuentran en la capa superficial del suelo (15-20 cm). Con respecto a ello, Mosse (1978) opina que este hecho puede ser simplemente el reflejo de una mayor densidad de raíces en la capa arable de los suelos, aunque no se debe olvidar que la escasez de O₂ en capas más profun-

das puede ser el factor condicionante. De acuerdo con Hayman et al. (1975), el número de esporas encontrado en la mayor parte de los recuentos descritos oscila entre 0.1 y 5 esporas por gramo de suelo.

Según Hayman (1970), Daft y Nicolson (1972) y Hayman et al. (1975) el número de esporas está estrechamente correlacionado con la intensidad de la infección en las raíces. Incluso Daft y Nicolson indican que el número de esporas en la rizosfera es la me di da de la infección más correlacionada con el peso de la planta. No obstante existen excepciones en las cuales no se manifiesta tal correlación (Redhead, 1975), y según Mosse (comunicación per so na l) el potencial infectivo de un suelo está más relacionado con la cantidad de raíces micorrizadas existentes en dicho suelo, que con el número de esporas presentes. De acuerdo con esta auto ra (Mosse, 1978), la infección estaría condicionada, de un lado, a la densidad de raíces e infectividad del suelo, y de otro, al déficit nutritivo de la planta, que a su vez depende de la espe cie ve ge ta l y de la disponibilidad de nutrientes en el suelo.

A parte de estas circunstancias condicionantes de la infección, otros factores ecológicos diversos pueden afectar el proce so.

Tales factores se pueden agrupar para su estudio en:

- Factores que afectan a la fotosíntesis del huésped directamente.
- Factores que afectan las condiciones del suelo.
- Factores que controlan el ritmo de crecimiento y desarrollo de las raíces.
- Presencia de otros microorganismos de la rizosfera.

Factores que afectan a la fotosíntesis del huésped directamente.-

La luz es factor fundamental en la infección VA (Hayman, 1974). En plantas colocadas en ligera penumbra, la infección no se afecta de forma considerable (Redhead, 1975); sin embargo, si son sometidas a grandes sombras, la infección se reduce drásticamente y la producción de esporas es afectada negativamente en un 80% (Redhead, 1975). Como era de esperar, si se elimina el aparato fotosintético de la planta, la infección y producción de esporas se reducen drásticamente. (Baylis, 1969).

Las bajas temperaturas reducen también la infección y la producción de esporas (Furlan y Fortin, 1973).

Factores que afectan las condiciones del suelo.-

Mosse (1972a) y Graw (1979) encontraron que el endofito de tipo de spora "yellow vacuolate" (*Glomus mosseae*), no se establecía en suelos de pH por debajo de 4,6, pero se logró introducir cuando se encalaron dichos suelos y se alcanzó un pH = 5,6. La humedad, lógicamente, influencia también el proceso de micorrización (Sieverding, 1979).

De otro lado, el porcentaje de infección y el número de esporas se reducen, por lo general, cuando se aplican fertilizantes fosforados y nitrogenados (Hayman, 1970, 1975a, 1975b). Se puede generalizar que las micorrizas VA son más persistentes en suelos de baja y moderada fertilidad (Gerdemann, 1975), aunque existan abundantes excepciones a tal generalización (Kruckelmann, 1975).

Interesante en este sentido, es profundizar algo más en el efecto del $PO_4^{=}$, en particular, sobre la micorrización. Adiciones crecientes de este nutriente, hacen disminuir la infección (Bay-

lis, 1967; Daft y Nicolson, 1969; Sanders y Tinker, 1973; Mosse, 1973b; Hayman, 1975b; Khan, 1975; Sanders, 1975 y Azcón et al. 1978). Así mismo, la adición de fosfato reduce también la formación de esporocarpos (Holevas, 1966 y Mosse 1967). El efecto de dosis supraóptimas de fosfato fué analizado por Mosse (1973b) en términos de "concentración crítica" de fósforo en los tejidos del vegetal huésped. Adiciones crecientes de PO_4^{3-} a plantas que ya han alcanzado tal "concentración crítica" provocan efecto negativo en el crecimiento de las mismas. Sanders (1975), mediante un ensayo en el que aplicaba foliarmente fosfato soluble, concluye que la concentración del ión dentro de la planta tiene más influencia en la reducción de la infección que el existente en el suelo. A similar conclusión llegan Menge et al. (1978a).

Factores que controlan el ritmo de crecimiento y desarrollo de la raíz.-

Es indudable que los factores antes considerados que afectan a la fotosíntesis o a las condiciones del suelo, repercuten ineludiblemente sobre la formación y crecimiento de las raíces. No obstante, otros factores pueden afectar el desarrollo radical de forma más directa. Estos son considerados a continuación.

Como resultado de diversos muestreos se ha deducido que el crecimiento intermitente de la raíz afecta a la producción de esporas (Mosse y Bowen, 1968). En las estaciones de lento crecimiento de la raíz (Mason, 1964) y en sitios donde mueren anualmente muchas raíces secundarias y pelos radicales, se ha puesto de manifiesto una reducción en el número de esporas. Las fluctuaciones en el número de esporas debidas a variaciones estacionales (Hayman, 1970; Ross y Ruttencutter 1977; Herskowitz y Estey, 1978) probablemente están relacionadas con el ritmo de crecimiento de la raíz, aunque también tales cambios pueden ser debidos a otras razones.

Las observaciones de Neill (1944) sugieren que las diferencias en el grado de infección asociadas con la fertilidad del suelo, estaban relacionadas con el ritmo de crecimiento de la raíz. Gerdemann (1968) opina que raíces vigorosas en crecimiento activo son difícilmente infectadas, y Harley (1972) concluye diciendo que cualquier factor que cause un crecimiento lento de la raíz o que reduzca la proporción de tejido radical en crecimiento activo, tiende a incrementar la infección. Puesto que se sabe que las auxinas y el etileno, fundamentalmente, y la acción combinada de estas con citoquininas y giberelinas, controlan la formación y desarrollo de las raíces (Thimann, 1972 y 1974 y Torrey, 1976), es lógico pensar que estas sustancias hormonales jueguen un importante papel en la formación de micorrizas VA.

Esto parece confirmarse en las micorrizas formadoras de manto (ectomicorrizas) ya que se ha demostrado que los hongos que las originan producen auxinas (Slankis, 1972 y 1974), y que éstas son rápidamente absorbidas por las raíces de las plantas huéspedes (Fortin, 1970) produciéndose cambios morfológicos que facilitan el establecimiento de la simbiosis (Slankis, 1974). De otro lado, también se ha puesto de manifiesto que los hongos formadores de micorrizas con manto producen citoquininas (Miller, 1971; Craft y Miller, 1974 y Kampert y Strzelczyk, 1978) y giberelinas (Strzelczyk et al., 1975), sin que se sepa exactamente la función de éstas en el proceso de infección.

La posibilidad de llevar a cabo estas investigaciones en hongos VA, entraña problemas basados en la dificultad para hacer crecer estos hongos en cultivo puro.

Influencia de otros microorganismos de la rizosfera en la formación de micorrizas VA.-

Varios trabajos experimentales han apuntado la existencia de

interacciones entre hongos de las micorrizas VA y otros microorganismos de la rizosfera. En primer lugar, hay que tener en cuenta, de acuerdo con Mosse (1973a), que los exudados radicales de las plantas micorrizadas difieren de los de las no micorrizadas, no sólo porque cambia el estado nutricional de la planta huésped, sino también debido a la gran cantidad de tejido del hongo presente en la raíz micorrizada, que puede afectar más directamente a los exudados. La repercusión de este cambio en los microorganismos rizosféricos comienza a ser investigada (Bagyaraj y Menge, 1978).

En el caso de las micorrizas formadoras de manto, se sabe que éstas inducen cambios cuali y cuantitativos en la microflora (Rambelli, 1972 y Slankis, 1974).

De otro lado, se ha descrito que *Azotobacter* y otros microorganismos afectan positivamente la formación de micorrizas formadoras de manto (Voznyakovskaya, 1954; Tribunskaya, 1955; Rambelli, 1972; Slankis, 1974). Tal efecto se debe (Slankis, 1974) a las sustancias extracelulares que los microorganismos liberan, entre las cuales pueden jugar un importante papel las fitohormonas, cuya producción es un fenómeno común de los microorganismos de la rizosfera (Brown, 1972 y 1974; Barea et al., 1976 y Barea y Montoya, 1975).

El efecto de las bacterias de la rizosfera sobre la formación de micorrizas VA, comienza a ser estudiado en el trabajo de Mosse (1962), en el cual se indica un efecto beneficioso de *Pseudomonas* sp. en el establecimiento de la micorriza. Posteriormente, los trabajos de Barea et al. (1975) y Azcón et al. (1976), apuntan una cooperación entre los hongos VA y bacterias solubilizadoras de fosfatos, en cuanto a sus efectos sobre el crecimiento y nutrición de las plantas. Tal interacción parece existir también en la formación de la simbiosis VA. De igual forma se han sugerido inter

acciones entre *Azotobacter* y hongos VA (Azcón y Barea, 1977; Barea et al., 1973 y Bagyaraj y Menge, 1978).

De gran interés desde el punto de vista de su repercusión en Agricultura se muestran las interacciones entre hongos VA y *Rhizobium* sp. y sus efectos sobre el crecimiento y nutrición de leguminosas. Las posibilidades de interacción de ambas simbiosis, indicadas por Assai (1944), y que hasta muy recientemente no empiezan a ser consideradas (Daft y El-Giahmi, 1974 y 1975; Crush, 1974), abren una importante línea de investigación. Los efectos de la doble simbiosis se asocian a la interacción N x P no habiéndose descrita cooperación en el establecimiento de la simbiosis.

Desde 1974 han sido publicados varios trabajos sobre la interacción entre micorrizas VA y *Rhizobium*. Dado el interés del tema, en el que se basa la presente investigación, se dedica más adelante un capítulo detallado al estudio de tales publicaciones.

Finalmente, cabría considerar la influencia que sobre la micorrización ejercen ciertos compuestos normalmente usados en agricultura como son los pesticidas (El-Giahmi et al., 1976; Steward y Pflieger, 1977; Boatman et al., 1978; Menge et al., 1978; Bailey y Safir, 1978; Burpee y Cole, 1978; Menge et al., 1979 y Ocampo y Hayman, 1980).

Efectos de las micorrizas VA sobre el crecimiento y nutrición de las plantas

Es un hecho universalmente aceptado que las micorrizas VA estimulan el crecimiento, desarrollo y nutrición de las plantas, especialmente en suelos de baja y moderada fertilidad (Mosse, 1973a). En los años que han transcurrido desde la citada revisión de Mosse se ha producido un acúmulo de datos sobre las respuestas de la planta a la inoculación con endofitos VA. Esta información es recogi-

da en diversas revisiones (Gerdemann, 1975; Tinker, 1975a; Gianinazzi-Pearson, 1976; Hayman, 1978; Mosse, 1978 y Ocampo, 1980). La mayoría de los trabajos experimentales han sido llevados a cabo fundamentalmente en invernadero, utilizando suelos tratados para ser desprovistos de sus endofitos naturales, y también suelos no estériles. Otros trabajos, sin embargo, han sido desarrollados en campo, tratando previamente el suelo con esterilizantes e incluso en algunos casos se han iniciado ensayos en suelos no tratados.

De los ensayos aludidos se deduce que los efectos se deben a que la micorriza mejora sustancialmente la absorción de nutrientes y agua por la planta y que el principal nutriente implicado es el fósforo.

Se sabe que la mayor parte de los suelos naturales tienen un bajo contenido en fosfato asimilable, e incluso la mayoría de los suelos arables productivos necesitan un aporte considerable de fertilizante fosforado para mantener su fertilidad (Sanders y Hayman, 1977). En efecto, el 95-99% del fósforo de un suelo está integrado en compuestos orgánicos o inorgánicos insolubles (Hayman, 1975a; Barea *et al.*, 1980). De otro lado, se conoce que el ritmo de absorción de los iones fosfato por la planta, es superior al de desplazamiento de dichos iones desde el suelo no rizosférico hacia la raíz. Ello condiciona que se forme una zona de agotamiento del elemento en la rizosfera. Esta zona de agotamiento, que ha podido ser puesta de manifiesto por autorradiografía (Owusu-Bennoah y Wild, 1979), es la base que justifica que el PO_4^{3-} sea factor limitante del crecimiento de las plantas en gran número de suelos (Hayman, 1975a y Barea *et al.*, 1980). Efectivamente, el desplazamiento del ión fosfato hacia la raíz, tiene lugar por difusión (Bielecki, 1973) y en su camino hacia la planta se fija fácilmente a arcillas y coloides del suelo por medio de combinaciones insolubles con Ca, Fe o Al.

Los mecanismos propuestos para explicar la mayor capacidad de absorción de fósforo por plantas micorrizadas están basados, de acuerdo con Tinker (1975a), en las siguientes causas:

- a) Que la micorrización induzca cambios morfológicos en la planta.
- b) Iden fisiológicos, lo que provocaría un incremento de la capacidad de la superficie de la raíz de la planta para absorber fósforo.
- c) Que la micorrización proporcione una superficie de absorción adicional (hifas del hongo), o más eficaz.
- d) Que las hifas o las raíces micorrizadas tengan capacidad para solubilizar fuentes de fósforo no disponibles a raíces no infectadas.
- e) Que la raíz micorrizada tenga más longevidad que la no infectada.

La posibilidad d) ha sido objeto de especial investigación y controversia. De un lado, muchos experimentos indican que las plantas micorrizadas crecen mejor que las no micorrizadas en suelos enriquecidos con formas difícilmente solubles de fósforo, tales como apatito, fitato y fosfatos de Ca, Al o Fe (Azcón et al., 1976 y Barrow et al., 1977). De otro lado, en micorrizas formadoras de manto, ha sido descrita la presencia de fosfatasas de superficie (Bartlett y Lewis, 1973). Todo esto hizo pensar en una posible solubilización de fosfatos por las hifas de las micorrizas VA. Sin embargo, ensayos con P^{32} (Sanders y Tinker, 1971; Hayman y Mosse, 1972 y Powell, 1975a) pusieron de manifiesto que, tanto las plantas micorrizadas como las no micorrizadas, toman el fósforo de la misma fuente: el "pool lábil" de fosfato soluble (Tinker, 1975b). La absorción más eficiente por las raíces micorrizadas, causa que se estimule la disociación química del fosfato insoluble para repo

ner el soluble, que está siendo captado por las hifas de la micorriza VA, y mantener así el equilibrio fosfato insoluble-fosfato soluble. Ello puede justificar la respuesta de las plantas micorrizadas a la adición de fosfato de roca (Azcón et al., 1976 y Powell y Daniel, 1978). No obstante, Smith (1974) aconseja continuar la investigación sobre la posible utilización de formas no asimilables de fosfato por las micorrizas VA, en ciertos suelos o condiciones no investigados aún a fondo.

La eficacia de las raíces en la absorción de fosfatos se ha valorado midiendo la cantidad de P^{32} captado por unidad de longitud de raíz (Sanders y Tinker, 1971 y 1973). Estos autores estiman que el parámetro mencionado ("inflow") es 4 veces mayor para las raíces micorrizadas, que para las no micorrizadas, lo que quiere decir que las raíces micorrizadas absorben los fosfatos mucho más eficazmente que las no micorrizadas. Tinker (1975a), al discutir los mecanismos antes mencionados, concluye que las explicaciones basadas solamente en cambios morfológicos de la raíz (hipótesis a) no justifican ese considerable incremento en la eficacia, máxime cuando se conoce que los cambios morfológicos que aparentemente originan las micorrizas son insignificantes. De otro lado, las razones basadas en suponer una mayor longevidad de las raíces micorrizadas no parecen aceptables, si se tiene en cuenta que las raíces no micorrizadas son capaces de absorber fósforo durante largos periodos de tiempo (Russell y Sanderson, 1967).

La hipótesis c) se considera hoy día la más acertada (Tinker, 1975a). En efecto, se acepta que el papel fundamental de las micorrizas estriba en que las hifas externas del hongo extienden el campo de absorción de la planta más lejos de la zona de agotamiento que rodea la raíz, de tal manera, que la red de hifas externas permite a la raíz incrementar su superficie de absorción y explorar un volumen de suelo superior al que pueden utilizar las plantas no micorrizadas. Esto parece estar confirmado por los traba-

jos de Hatting et al. (1973) y Pearson y Tinker (1975) en los cuales se detectó captación de P^{32} por raíces micorrizadas, cuando el isótopo fue colocado a una distancia no accesible a raíces no micorrizadas.

Concretamente, Rhodes y Gerdemann (1975) encuentran que las hifas de *Glomus* pueden extender la zona de captación de fosfato hasta, al menos, 7 cm de la superficie de la raíz.

Es indudable que la longitud, distribución y actividad de las hifas externas, son factores de la mayor importancia en la efectividad de las micorrizas VA. Los cálculos de Sanders y Tinker (1973) indican que 1 cm de raíz micorrizada de cebolla tiene 80 cm de hifas externas. De otro lado, Gray y Gerdemann (1969) sugirieron la posibilidad de que la superficie de la hifa fuera más activa en la captación de iones fosfato. Sin embargo, Bowen et al. (1975), utilizando P^{32} , ponen de manifiesto que el incremento en la captación de fosfatos debido a las hifas, depende más de su posición, longitud y número, que de alguna propiedad especial de la superficie que agilice la captación. Estas apreciaciones parecen descartar la hipótesis b).

Para explicar la translocación de fosfato en la hifa, Jennings et al. (1974) proponen 3 posibles mecanismos:

i) Simple difusión, ii) corrientes protoplasmáticas mono o bidireccionales y iii) flujo masivo originado por diferencias de presión dentro de la hifa. Cualquiera de estos mecanismos, para poder ser aceptado, debe ser capaz de justificar flujos del orden de 10^{-8} a 10^{-9} mol cm^{-2} seg^{-1} , que es el flujo calculado en el interior de la hifa.

Tinker no considera aceptable el mecanismo i), ya que para que por simple difusión se consiguieran esos flujos, debería haber unos gradientes muy elevados. Diversas observaciones han puesto de manifiesto que la ciclosis o corrientes protoplasmáticas bi

direccionales existen (Burnet, 1968) siendo ésta, por tanto, una explicación convincente. Sin embargo, este mecanismo por sí sólo no es suficiente para justificar el flujo (Tinker, 1975a), por lo que es posible que ambos mecanismos, flujo masivo y corrientes protoplasmáticas, operen, quizás simultáneamente.

Este modelo de translocación ha podido ser completado gracias a los trabajos histológicos de Cox et al. (1975) y Callow et al. (1978), en los cuales se ha puesto de manifiesto la existencia de gránulos de polifosfato en las vacuolas de hifas y arbusculos, particularmente cuando la infección está en sus estadios jóvenes y vigorosos. El modelo que sugiere Tinker, basado en estas observaciones, es que el ión fosfato se trasloca como gránulos de polifosfato, que en las vacuolas se van depositando, incrementando su tamaño o disminuyéndolo a medida que van siendo utilizados.

La operatividad de este mecanismo está asegurada con la existencia de polifosfatasas ácidas, y sobre todo alcalinas, localizadas en las vacuolas de arbusculos maduros e hifas intercelulares, descritas por varios autores (Gianinazzi-Pearson y Gianinazzi, 1976, 1978a y 1978b; Gianinazzi et al., 1979 y MacDonal y Lewis, 1978).

En cuanto a la transferencia de fosfatos del hongo al huésped, se acepta desde hace tiempo (Harley, 1972), que tiene lugar en los arbusculos, los cuales degeneran y son digeridos, liberándose el fósforo que contienen. Observaciones a nivel estructural (Cox y Sanders, 1974) confirman este hecho, habiéndose observado como los arbusculos se van formando y degenerando, calculándoseles una vida media de 7 a 11 días (Bevege et al., 1975). No hay que descartar, sin embargo, la posibilidad de que ocurra una transferencia de fosfato, y otros materiales, a través de los plasmasmas fúngico y del huésped. En este sentido, Woolhouse (1975)

propone un mecanismo de transporte pasivo para el plasmalema del hongo y activo para el de la célula huésped, mediante el cual el fosfato puede alcanzar las células del huésped sin necesidad de desintegración del arbusculo.

Hay que considerar también la posibilidad de que la transferencia tenga lugar en otras partes del micelio interno y no únicamente en los arbusculos (intracelulares). Hay varias razones para pensar esto; de hecho, en micorrizas formadoras de manto, hay intercambio de fosfato sin que ocurra la penetración intracelular del micelio. Así mismo, se han detectado respuestas a la infección VA antes de la formación de arbusculos (Tinker, 1975a). Se puede concluir, pues, que el sitio fundamental de transferencia es el arbusculo, pero puede que no lo sea exclusivamente.

De otro lado, está demostrado que el fotosintato de la planta es transferido al hongo, y que llega hasta su micelio externo (Cox et al., 1975 y Ho y Trappe, 1973). Aunque no se conoce el mecanismo de la transferencia, se acepta que ésta tiene lugar en los arbusculos (Tinker, 1975a).

Finalmente, cabe considerar que se han llevado a cabo muchos trabajos para determinar si las micorrizas VA favorecen la captación de otros nutrientes. En algunos de tales trabajos, parece indicarse la captación de Zn (Gilmore, 1971), S (Gray y Gerdemann, 1973 y Rhodes y Gerdemann, 1978a y b), K (Powell, 1975b) y Ca (Rhodes y Gerdemann, 1978a) por micorrizas VA. Sin embargo, existen contradicciones para estos y otros nutrientes (Mosse, 1973a), por lo que no se pueden generalizar estas apreciaciones. Probablemente, lo que ocurra sea que, por ser el fósforo factor limitante del crecimiento, las plantas micorrizadas están más equilibradas fisiológicamente, lo que puede condicionar una mayor absorción de otros nutrientes.

De igual modo, Safir et al. (1971) han sugerido que las mi-

corrizas VA estimulan la captación de agua. Esto puede ser de gran importancia ecológica en suelos áridos, pero el fenómeno ha sido discutido posteriormente (Safir et al., 1972) y necesita más estudio antes de elaborar conclusiones definitivas.

Micotrofismo en plantas: Dependencia de las micorrizas

Ciertas especies son más "micotróficas" que otras (Sanders y Hayman, 1977) en el sentido de que obtienen más beneficio de las micorrizas VA.

La dependencia de las micorrizas es definida por Gerdemann (1975) como "el grado en que una planta depende de la condición de estar micorrizada para producir su máximo crecimiento y rendimiento a un nivel dado de fertilidad del suelo". En un extremo de esta graduación están las plantas no micorrizables, absolutamente no-dependientes de las micorrizas, y en el otro se sitúan ciertas variedades de *Citrus* que son "altamente micorriza-dependientes" ya que incluso una fertilidad elevada no les proporciona los beneficios de la micorrización (Kleinschmidt y Gerdemann, 1972). La mayoría de las plantas se encuentran entre estos extremos, y para cada especie y situación se supone la existencia de un nivel de fertilidad (fundamentalmente de fósforo asimilable) al cual crecen igual las plantas micorrizadas que las que no lo están.

Generalmente, las plantas con alta demanda de fósforo (como las leguminosas) o pobre sistema radical (cebolla, patata) responden mejor a la micorrización. Baylis (1970, 1972 y 1975) indica que la capacidad de las plantas para crecer en suelos que tienen muy poco fósforo disponible puede depender del desarrollo de los pelos radicales, así, plantas con pocos o cortos pelos radicales dependerán más de la formación de micorrizas, que aquellas con pelos bien desarrollados. No obstante, parece ser que además de la

cantidad y tamaño de los pelos, otros factores deben estar implicados, pues plantas como *Paspalum notatum* y *Centrosema pubescens* con largos pelos radiculares, no toman eficientemente el fósforo del suelo, a no ser que estén micorrizadas (Mosse et al., 1973).

Micorrizas VA y enfermedades de las plantas

Recientemente, se están llevando a cabo investigaciones para determinar el papel que pueden desempeñar las micorrizas VA en la protección de las plantas frente a ciertos patógenos, ya que varios estudios han sugerido esta posibilidad (Schönbeck, 1978; Sikora, 1978; Veldeman, 1979 y Schönbeck y Dehne, 1979). Estos trabajos indican que las micorrizas pueden aumentar, y a veces disminuir, la resistencia de las plantas a las enfermedades. De acuerdo con Schönbeck y Dehne (1979), se puede concluir que las micorrizas VA aumentan la resistencia de las plantas, cuando se trata de patógenos que invaden las raíces, mientras que las enfermedades que afectan a la parte aérea de las plantas, pueden manifestar más virulencia en plantas micorrizadas.

No se conocen, por el momento, las causas que pueden explicar estos hechos, aunque numerosas investigaciones se están realizando en este sentido, por lo que son de esperar avances en los conocimientos de esta nueva faceta del papel ecológico de la simbiosis VA.

Implicaciones prácticas de las micorrizas VA: Sus posibilidades de utilización como "fertilizantes biológicos"

Actualmente están siendo consideradas las posibilidades de inoculación de micorrizas VA en campo, con objeto de mejorar el rendimiento de las cosechas agrícolas, con el consiguiente ahorro de fertilizantes químicos tradicionales (Sanders y Hayman, 1977).

Las respuestas positivas a la introducción de endofitos VA son de esperar, principalmente, en suelos en los que los hongos VA indígenas sean escasos o inefectivos (Mosse, 1977). Por esta razón, en la mayoría de los ensayos llevados a cabo en suelos naturales, se han usado "esterilizantes" para eliminar endofitos nativos (Menge et al., 1977). No obstante, se han iniciado ensayos en campo sobre suelo no tratado (Saif y Khan, 1977; Black y Tinker, 1977; Hayman, 1977; Abbot y Robson, 1978 y Powell, 1979), en los cuales se muestran incrementos, de hasta un 150% en el peso seco de la cosecha (parte aérea de las plantas), de los tratamientos con endofitos introducidos frente a los que sólo tenían los nativos del suelo en cuestión.

Según Mosse (comunicación personal), el inóculo más efectivo consiste en raíces de plantas infectadas. El problema, actualmente, se centra en conseguir suficiente inóculo para realizar aplicaciones masivas del hongo, ya que al no crecer éste en cultivo puro, tiene que ser reproducido sobre plantas en recipientes limitados. La producción de inóculo por este método, además de ser cara y lenta para poder ser usada con fines comerciales, tiene el peligro de contaminación por hongos patógenos que pueden desarrollarse a la vez que el hongo de la micorriza (Hayman, 1977 y Menge y Johnson, 1978). De ello se deduce que tienen que ser investigados nuevos métodos de producción de inóculo.

Con respecto a las técnicas para la aplicación en campo del inóculo, éstas varían según se trate de plantas anuales o perennes. En el caso de plantas anuales se recomienda que las semillas sean introducidas en el interior de pequeñas masas de inóculo ("pelleting") o depositadas sobre éste en el momento de la siembra. Si se trata de plantas perennes, las plántulas deben de ser preinoculadas y transplantadas cuando las raíces estén fuertemente micorrizadas (Hayman, 1977 y Hall, 1979).

Papel de las micorrizas VA en la evolución de las plantas

Se acepta que la colonización de la superficie terrestre por las plantas tuvo lugar hace unos 400 millones de años, entre los periodos Silúrico y Devónico (Chaloner, 1970).

La planta fósil más antigua que ha podido ser estudiada pertenece al género *Rhynia* y data de hace unos 370 millones de años. Se han obtenido microfotografías (Kidston y Lang, 1921) de las "raíces" de esta planta, en las cuales se aprecia claramente la presencia de una formación fúngica en su interior; algunas de tales microfotografías se reproducen en el trabajo de Nicolson (1975), y como dice este autor, "uno no tiene por más que sentirse impresionado por la similitud de algunos de tales hongos con las actuales especies de *Endogone (Glomus)*".

Kidston y Lang (1921) consideraron que, en ciertos casos, tales asociaciones hongo-"raíz" eran "micorrizas". Otros autores (Boullard y Lemoigne, 1971), al examinar materiales similares, concluyen también que una asociación tipo micorriza estaba presente en algunas "raíces". Parece ser, pues, que asociaciones que recuerdan a las modernas micorrizas VA existieron en los estadios más tempranos de la evolución de las plantas.

Es muy probable que las primeras plantas que evolucionaron y se establecieron en un ecosistema terrestre, encontraran un "suelo" ya colonizado por poblaciones microbianas, entre las cuales posiblemente hubiera cianobacterias (antes algas verde-azuladas) y bacterias fijadoras de N_2 (Fischer, 1965). Por esta razón, no sería el nitrógeno factor limitante, sino que posiblemente lo fuera el fósforo, tal como ocurre actualmente en la colonización de nuevos hábitats (Harley, 1973). En tales condiciones, cualquier asociación planta-microorganismo que mejorara la extracción de fósforo

ro del medio, sería seleccionada y perpetuada (Baylis, 1974). Nicolson (1975), concluye que éste podría ser el origen de las micorrizas VA. El micotrofismo, por tanto, no es un proceso nuevo, sino que se originó con la aparición de plantas con raíces (Kelley, 1950).

Generalmente, se reconoce que las plantas vasculares se han originado a partir de las algas verdes. En este sentido, Pirozynski y Malloch (1975) han propuesto una hipótesis según la cual para que el alga semiacuática pudiera superar los problemas de desecación y nutrición que suponía el paso a un hábitat terrestre, debieron asociarse simbióticamente con un hongo acuático (un oomiceto). Según esta hipótesis, las plantas serían el producto de tal simbiosis, la cual permitiría la colonización de la tierra durante los periodos Silúrico y Devónico. La conclusión de estos autores es taxativa: "Las plantas terrestres nunca tuvieron independencia, porque si la hubieran tenido nunca hubieran colonizado la tierra". La simbiosis fué posiblemente de tipo endotrófico, que es la forma de asociación mantenida hoy día por casi todas las plantas en forma de micorrizas VA.

Perspectivas de la investigación en micorrizas VA

El estudio de esta simbiosis es un actual y apasionante campo de investigación en sus diversas facetas, tales como los aspectos básicos de su biología, sus implicaciones en la ecología microbiana del suelo y la rizosfera, su repercusión en la ecología, fisiología y bioquímica de las plantas, taxonomía de los endofitos, y finalmente, las posibilidades de su aplicación práctica en agricultura.

Los temas actuales de investigación son diversos y abarcan todas y cada una de las facetas anteriormente descritas, pero a nuestro juicio dos grupos de líneas de investigación presentan un

interés extraordinario y constituyen sendos retos para los investigadores; estos temas son los siguientes:

- a) Estudios sobre la biología básica, derivados del cultivo axénico del hongo.
- b) Investigaciones sobre la posible aplicación práctica de las micorrizas VA como "fertilizantes microbianos".

SIMBIOSIS MUTUALISTICA RHIZOBIUM-LEGUMINOSA

Ciertos microorganismos del suelo forman con algunas plantas superiores asociaciones simbióticas mutualísticas capaces de fijar N_2 atmosférico. La existencia de tales simbiosis puede ser fácilmente visualizada por la presencia de nódulos en las raíces, que aparecen como respuesta de la planta a la invasión por el microorganismo.

Tales microorganismos son procariontes pertenecientes a las familias *Rizobiaceae*, *Frankiaceae* y a la división Cianobacteria (antes algas verde-azuladas).

Estos son:

- a) *Frankia*. La capacidad de estos actinomicetos para crecer y fijar N_2 , sólo ha sido observada en nódulos de las raíces de ciertas Angiospermas no-leguminosas (Rodríguez-Barrueco, 1969; Bond, 1976; Akkermans, 1978).
- b) *Rhizobium*. Las especies de este género son capaces de crecer en vida libre, pero su actividad fijadora de N_2 , al menos en condiciones naturales, sólo ocurre cuando se establece la simbiosis con plantas leguminosas. Recientemente, se ha descrito que un *Rhizobium* sp. forma nódulos con la no-leguminosa *Trema aspera* (Trinick, 1973).
- c) *Nostoc* (*Anabaena* ?). Esta cianobacteria es capaz de crecer y fijar N_2 tanto libre como simbióticamente. Forma nódulos en raíces de Gimnospermas (Stewart, 1976).

Por las razones expuestas en el OBJETO del presente

trabajo, nos vamos a centrar exclusivamente en el estudio de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa.

Presencia y distribución de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa

Prácticamente en la totalidad de las especies de leguminosas estudiadas (el 10% de las existentes sobre la tierra), se ha puesto de manifiesto la presencia de nódulos en sus raíces (Harley, 1971 y Nutman, 1975). Las especies de leguminosas que no forman nódulos, pertenecen en su mayoría a la familia *Cesalpinoideae* (Vincent, 1974).

Con respecto a su distribución, se puede decir que, en general, en donde una leguminosa susceptible está presente, se encuentra su *Rhizobium* específico. Lo contrario, sin embargo, es más difícil de asegurar, aunque normalmente no se encuentra *Rhizobium* en aquellos hábitats en los que sus huéspedes no están presentes.

Clasificación de los *Rhizobium*

Actualmente existe gran controversia en relación con la taxonomía de las especies de *Rhizobium* (Nutman, 1975 y Graham, 1976). Clásicamente, y así lo recoge la edición vigente del Manual de Bergey (Buchanan y Gibbons, 1974), se admite la existencia de seis especies de *Rhizobium*: *R. trifolii*, *R. leguminosarum*, *R. phaseoli*, *R. meliloti*, *R. lupini* y *R. japonicum*, de acuerdo con las plantas más significativas que estos pueden infectar. No obstante, algunos autores (Lange, 1961 y Norris, 1965) consideran que este criterio no es suficiente para diferenciar seis especies, por lo que proponen agruparlos en una sola, o a lo más dos de rápido y lento crecimiento, admitiendo la existencia de variedades adaptadas a los distintos grupos de leguminosas. La idea de estos autores viene apoyada por estudios de taxonomía numérica y de composición de bases de

ADN, además de por el hecho de que, *Rhizobium* específicos para varias plantas, pueden diferir en sus propiedades morfológicas, inmunológicas y bioquímicas (Date y Decker, 1965; Dudman, 1965; Johnson y Means, 1963; Manil, 1963) y por el contrario *Rhizobium* considerados de distintas especies, pueden tener características similares (Bonnier y Brakel, 1969).

Crecimiento de *Rhizobium* en la rizosfera

Rhizobium es predominantemente un microorganismo rizosférico, capaz de multiplicarse sobre la superficie de las raíces, tanto de no leguminosas como de leguminosas, pero especialmente de éstas (Rovira, 1965).

Se sabe, en efecto, que las plantas ejercen una acción selectiva sobre los microorganismos que crecen en su rizosfera. En el caso de *Rhizobium*, ocurre que incluso diferentes especies y razas de esta bacteria son estimuladas en distinto grado, pero no siempre más por sus huéspedes específicos que por plantas no susceptibles de su infección. Esto quiere decir que no se ha puesto de manifiesto una estimulación específica, aunque sí selectiva, por parte de la leguminosa huésped hacia su *Rhizobium* (Peter y Alexander, 1966 y Rovira, 1969). En general, la estimulación es más acusada en los sitios donde emergen raíces laterales (Nutman, 1975). Posiblemente, la planta ejerce su influencia selectiva sobre *Rhizobium* mediante el efecto nutricional de sus exudados radicales. No obstante, por la complejidad de éstos y por la variabilidad de las distintas especies de *Rhizobium* en cuanto a sus requerimientos nutritivos, se hace difícil obtener conclusiones definitivas de las causas concretas que determinan tal influencia selectiva. Es más, se han encontrado exudados radicales que no tienen efecto sobre *Rhizobium*, e incluso, algunos que inhiben su crecimiento (Mac Gregor y Alexander, 1972 y Currier y Strobel, 1976).

De otro lado, es lógico pensar que los diversos factores ecológicos que inciden en la rizosfera, afecten al desarrollo de *Rhizobium*. Entre otros, pH, salinidad, temperatura, desecación, fertilizantes químicos, etc..., se sabe que influyen la supervivencia y/o actividad de estas bacterias. No obstante, existe considerable variabilidad en el comportamiento de los distintos *Rhizobium* ante las diferentes circunstancias ambientales, por ello, prescindimos de elaborar conclusiones generales, haciendo sólo referencia a trabajos de revisión sobre este tema (Nutman, 1975 y Schmidt, 1978).

Así mismo se sabe que muchos microorganismos del suelo afectan el crecimiento de *Rhizobium*. Algunos de ellos son capaces de estimularlo (Krasilnikov, 1958 y Vincent, 1974), mientras que otros lo inhiben (Nutman, 1965 y Broughton, 1978). El mecanismo de antagonismo frente a *Rhizobium* más comúnmente descrito es el basado en la producción de antibióticos por otros microorganismos de la rizosfera (Pattison y Skinner, 1974), pero además, se sabe que *Rhizobium* puede ser parasitado por *Bdellovibrio* y bacteriófagos específicos, lisado por mixobacterias y sometido a predación por parte de ciertas amebas del suelo (Schmidt, 1978). Sin embargo, al igual que ocurre en otros casos de antagonismo microbiano, estos fenómenos han sido puestos de manifiesto mediante estudios "in vitro" y no se conoce su significado real en el suelo (Stotzky, 1972).

Propiedades características de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa.

La simbiosis *Rhizobium*-leguminosa se establece como resultado de la expresión de unas características propias de la bacteria (Thornton, 1952; Denarie y Truchet, 1974 y Schwinghamer, 1977), de la planta huésped (Nutman, 1952; Holl, 1975 y Holl y LaRue, 1976) o de la asociación de ambas (Dixon, 1969; Dart, 1974 y Vincent,

1974). Estas características, o propiedades simbióticas, reciben los nombres de especificidad, infectividad y efectividad o actividad.

Actualmente se admite que *Rhizobium* es capaz de fijar nitrógeno en ausencia de la planta huésped, es decir, que *Rhizobium* posee la información genética necesaria para llevar a cabo este proceso (ver Bedmar y Olivares, 1979, para referencias). No obstante, en condiciones naturales el N_2 sólo es fijado en el interior del nódulo, una vez establecida la asociación bacteria-raíz, y como consecuencia de la expresión de los dos genomas.

A continuación trataremos cada una de las tres propiedades de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. Las dos primeras, especificidad e infectividad, van a ser estudiadas conjuntamente, ya que ambas están tan íntimamente relacionadas que no parece lógico considerarlas por separado.

Especificidad e infectividad.-

Cualquiera que sea el mecanismo de la invasión de las raíces por *Rhizobium*, tal mecanismo se sabe que posee un grado de especificidad variable. En efecto, ciertas leguminosas tienen unos requerimientos muy concretos para "su" *Rhizobium*, mientras que otras aceptan un espectro extremadamente amplio (Broughton, 1978).

El esquema propuesto por Nutman (1965), en el que se recogen las interacciones bacteria-raíz que conducen a la infección de los pelos radicales, sigue aceptándose en sus líneas generales, pero evidentemente, el progreso de la investigación sobre el tema ha dado lugar a nuevas informaciones que hay que tratar de acoplar a los esquemas ya establecidos. Así tenemos el esquema propuesto por Nutman (1977) y el que se puede deducir de la revisión de Broughton (1978). A parte de diferencias en el tratamiento de alguno de los factores implicados, ambos esquemas difieren, fundamentalmen-

te, en la prioridad en el tiempo de ciertos pasos que conducen a la formación del cordón de infección.

En la Figura 2 se expone un resumen de ambos esquemas.

Hoy día se conocen y aceptan como ocurren la mayoría de dichos procesos, mientras que otros, o sus causas, son aún desconocidos o se conocen de modo fragmentario, por lo que para dar explicaciones a estos últimos se han expuesto y discutido varias hipótesis.

Seguidamente, se analizan, por separado, cada uno de estos procesos, tanto en sus facetas conocidas como en las hipotéticamente supuestas.

Vía de entrada: los pelos radicales.-

Se acepta universalmente que la infección ocurre a través de los pelos radicales de la planta (Ljunggren, 1969 y Dart, 1974 y 1977), aunque existan otras posibilidades de entrada, especialmente cuando intervienen *Rhizobium* de lento crecimiento o del grupo "cowpea".

El primer hecho visible que tiene lugar en el proceso de preinfección, es la elongación y ramificación de los pelos radicales.

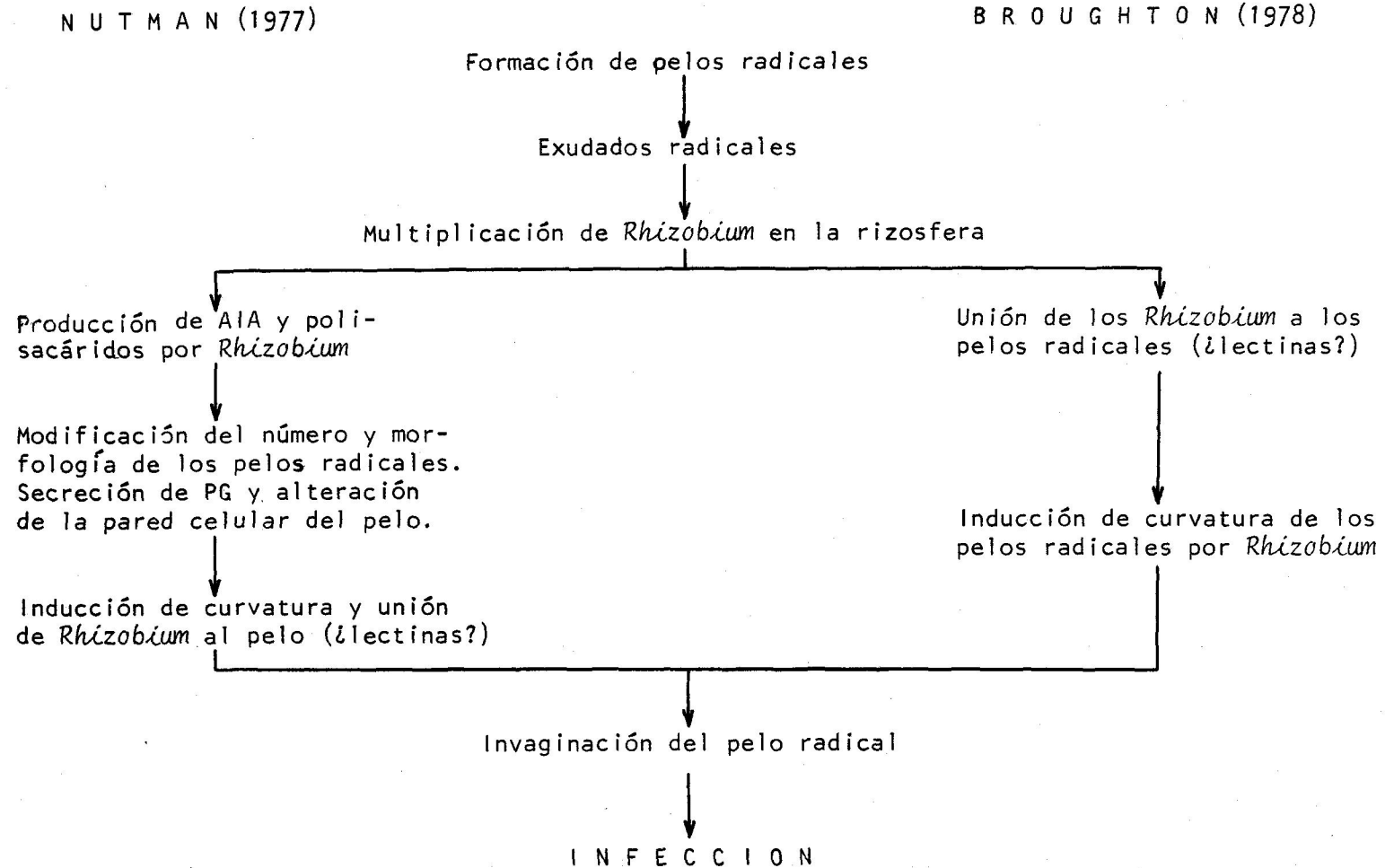
Se sabe que el periodo de susceptibilidad a la infección es corto y tiene lugar durante la elongación de los pelos. Así mismo, se conoce que las infecciones no ocurren al azar, sino en sitios determinados (Nutman, 1956; Lim, 1963). La formación de cordones de infección después del periodo de susceptibilidad, puede no dar lugar a la formación de nódulos, y en todo caso, éstos pueden ser no efectivos en la fijación de N_2 (Broughton, 1978).

Influencia de los exudados radicales.-

Anteriormente se comentó el efecto de los exudados radicales

Figura 2

Secuencia de eventos en el proceso de pre-infección de raíces de leguminosas por sus *Rhizobium* específicos.



sobre el crecimiento de *Rhizobium* en la rizosfera. De acuerdo con Nutman (1965), se trata de un efecto de estimulación selectiva, aunque no específica en el sentido estricto del término. No obstante, Olivares (1977) deduce de los resultados de Casadesús et al. (1976) que dicho efecto, no totalmente específico, que va a dar lugar al predominio en la rizosfera de un *Rhizobium* determinado, es consecuencia de una inducción específica de la bacteria sobre la raíz. Efectivamente, Casadesús et al. (1976) demostraron un incremento en la secreción de triptófano por la raíz de alfalfa cuando se encuentra en presencia de *R. meliloti*, o de sus polisacáridos extracelulares. Como es sabido, los polisacáridos extracelulares de *Rhizobium* inducen la producción de poligalacturonasa (PG), lo cual produce una relajación de la pared celular. Consecuentemente, la PG intervendría, no sólo en la penetración de los *Rhizobium* en el interior de los pelos radicales, como se verá posteriormente, sino también en la liberación de triptófano por la raíz. Ello significa un incremento del sustrato necesario a *Rhizobium*, y otros microorganismos de la rizosfera, para la producción de ácido indol acético (AIA). Esta fitohormona auxínica tiene posiblemente un papel múltiple en el proceso de infección, ya que se ha sugerido su participación en la formación, desarrollo y curvatura de los pelos radicales, así como en la formación del cordón de infección, aspectos estos que se discuten posteriormente.

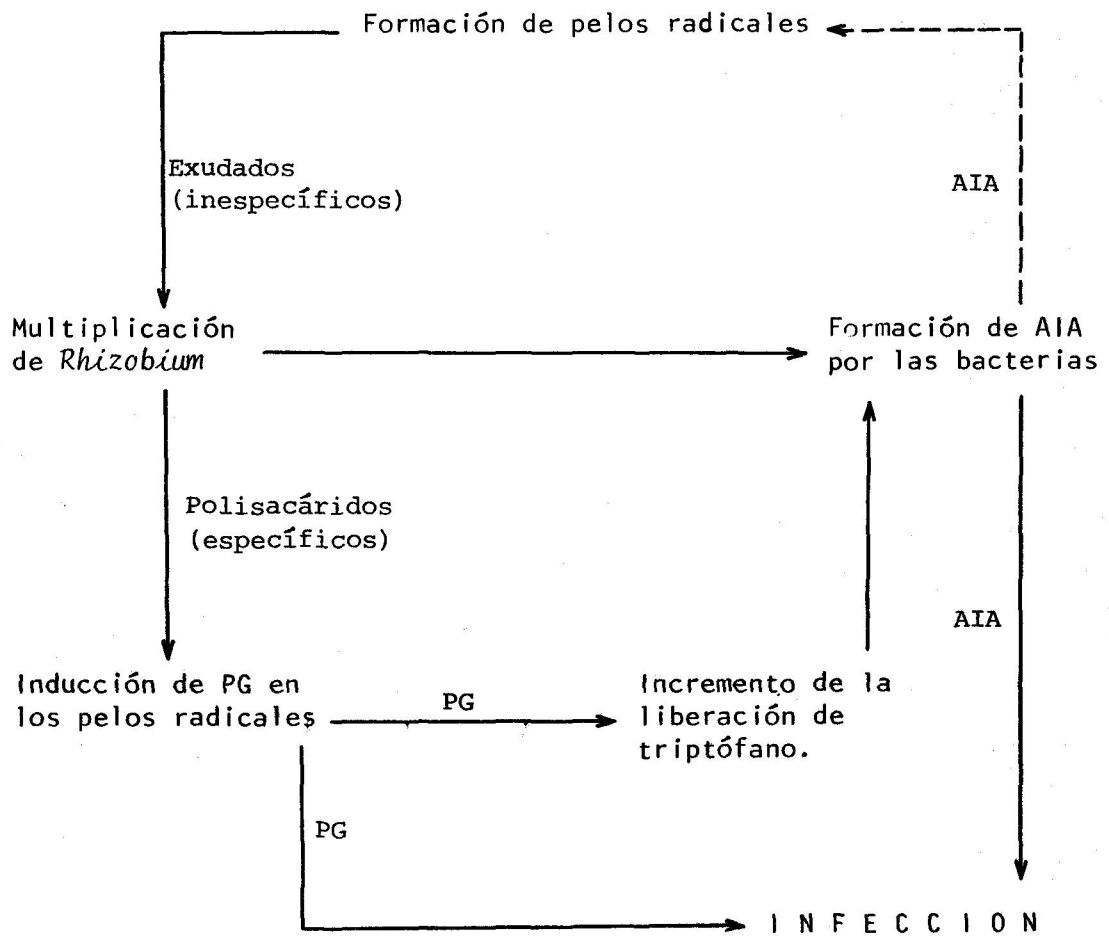
Después de las matizaciones de Olivares (1977) a los esquemas de Nutman (1965 y 1977), la situación podría quedar resumida como se indica en la Figura 3.

Unión de los *Rhizobium* a los pelos radicales: Papel de las lectinas

Una vez establecidos en la rizosfera de una leguminosa, cier

Figura 3

Papel de los exudados radicales, polisacáridos de *Rhizobium* y auxinas en el proceso de pre-infección.



PG = Poligalacturonasa

AIA = Acido indol acético

tos *Rhizobium* se unen a la superficie de la raíz, tanto a los pelos radicales como a las células epidérmicas (Dazzo et al., 1976). La unión siempre ocurre con el eje más largo de la bacteria perpendicular a la rizoplanea (Broughton, 1978). Esta unión sólo se manifiesta entre un *Rhizobium* y su leguminosa apropiada.

Bohlood y Schmidt (1974) y (1976) sugirieron que los *Rhizobium* podrían estar unidos a las raíces a través de las lectinas (fitohemaglutininas) situadas en el "sitio" de unión polar. En su trabajo original, Bohlood y Schmidt (1974) encontraron que las lectinas de la soja se combinaban específicamente con 22 de 25 *R. japonicum* y no se unieron con ninguno de 23 *Rhizobium* sp. representativos, incapaces de nodular con la soja.

Si efectivamente las lectinas son mediadoras en el proceso de unión de los *Rhizobium* a la raíz, ejerciendo una función de puente, es un tema que se está debatiendo actualmente. La hipótesis es bastante atractiva, por lo que examinaremos a continuación las posibilidades de que estas glucoproteínas sean responsables directas del control de la especificidad en la asociación *Rhizobium*-leguminosa. Dos recientes revisiones, la de Schmidt (1978) y especialmente la de Broughton (1978) estudian la naturaleza, características, propiedades y funcionalismo de las lectinas, y defienden la hipótesis de que las lectinas, situadas en determinados "sitios" del pelo radical, interaccionan específicamente con lipopolisacáridos concretos situados en la superficie de las células del *Rhizobium* apropiado. Estos receptores parecen estar presentes en la superficie de *Rhizobium*, sólo en determinados momentos del desarrollo del cultivo de la bacteria (Dazzo et al., 1979).

Las lectinas, que como ya se ha dicho, tienen naturaleza glucoproteica, son tetrámeros con subunidades que pueden ser idénticas (Lectina de Tipo I), iguales dos a dos (Tipo II) o incluso todas diferentes (Tipo III) (Broughton, 1978), y pueden poseer 0, 1,

2 ó 4 sitios de unión para los *Rhizobium* por tetrámero.

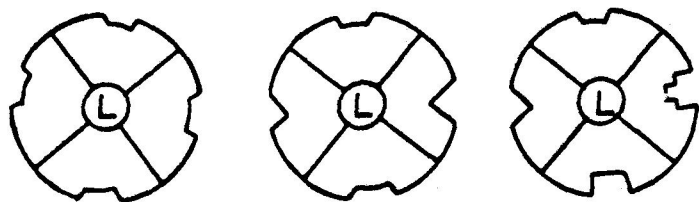
La hipótesis de Broughton (1978) es que la unión ocurriría a través de moléculas de lectina (ó similares a las lectinas) presentes en los pelos radicales, a las cuales se adhieren los *Rhizobium*. La situación, de acuerdo con Broughton (1978), puede esquematizarse como recoge la Figura 4. Como se dijo anteriormente, esta hipótesis sigue siendo actualmente objeto de estudio y controversia. De hecho, en el último Symposium sobre fijación de nitrógeno, celebrado en Brighton en Septiembre de 1979, se presentaron comunicaciones a favor (Kamberger y Nordhoff, 1979), y en contra (Hombrecher y Brewin, 1979) de tal teoría.

Reacción de curvatura de los pelos radicales y su inducción por *Rhizobium*. -

Este proceso posee una elevada especificidad (Yao y Vincent, 1969), no obstante, se ha observado la reacción de curvatura ("curling") de una leguminosa frente a *Rhizobium* sp. no específicos suyos (Li y Hubbell, 1969), aunque la reacción sí que parece restringida a las leguminosas (Nutman, 1958). Hay que distinguir, sin embargo, entre una "moderada curvatura" de los pelos radicales, y una "curvatura marcada", en la cual los pelos muestran un ángulo en su extremo de unos 360° (Broughton, 1978). Sólo en el caso de "curvatura marcada" se puede hablar de gran especificidad (Vincent, 1974 y Yao y Vincent, 1976) y sólo ocurre cuando existe un contacto físico íntimo con el *Rhizobium* específico invasivo.

Desde hace tiempo se sabe que estas bacterias son las inductoras de la "reacción de curvatura" (Mc Coy, 1932), habiendosele adjudicado al AIA un cierto papel en tal reacción (Kefford et al., 1960). Efectivamente, varios autores han encontrado influencia de filtrados libres de células de cultivos de *Rhizobium* en la

Figura 4

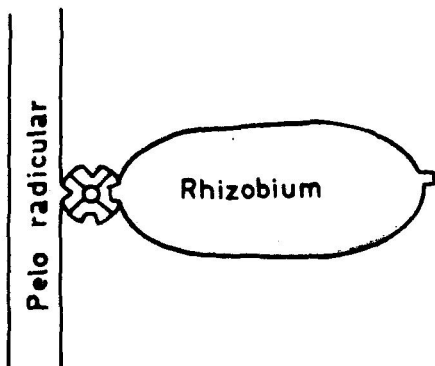


Tipo I

Tipo II

Tipo III

Tipos de lectinas



Modelo de unión

reacción de curvatura (Yao y Vincent, 1976 y Hubbell, 1977), pero el efecto, tanto medido como número de pelos deformados ó como intensidad de la reacción, nunca superó al producido por el *Rhizobium* homólogo en cultivo puro (Vincent, 1974).

La participación de las auxinas es, sin embargo, objeto de controversia, ya que si bien Key et al. (1967) afirman que son necesarias para la síntesis de nuevas proteínas que permiten la deformación del pelo, Bergersen (1978) mantiene que no intervienen específicamente, porque su adición no produce "curvatura marcada" del pelo radical.

Yao y Vincent (1976) revisan la información existente y concluyen que hay al menos dos factores implicados en la deformación del pelo, uno, presente en los filtrados de cultivos de *Rhizobium*, parcialmente dializable y termoestable; y otro, no dializable, que exige un contacto íntimo entre el *Rhizobium* invasivo y la leguminosa para que se exprese su actividad. Se sabe que el primero de ellos no es el AIA (Sahlman y Fahraeus, 1963 y Fahraeus y Ljunggren, 1968), y que es capaz, por sí sólo, o en conjunción con otros factores, de estimular actividades enzimáticas en las raíces de leguminosas homólogas (Hubbell, 1970).

Penetración de los *Rhizobium* en el pelo radical.-

Se sabe que sólo parte de los pelos radicales deformados conducen a la formación de nódulos y que la infección parece iniciarse en los puntos más agudos de los pliegues de los pelos. Es precisamente en esos puntos en donde la estructura normal del pelo se encuentra más forzada, llegándose incluso a la exposición de la pared primaria de los mismos (Bergersen, 1978).

La observación de que *Rhizobium* no disuelve ni penetra la pared celular del pelo en el sitio de contacto, condujo a la hi

hipótesis de que la infección empieza a través de un proceso de invaginación del pelo radical (Nutman, 1956). Tal invaginación va a dar lugar a la formación del cordón de infección, del que a continuación se hablará. Esta hipótesis ha recibido el apoyo de los estudios al microscopio electrónico de los sitios de infección de los pelos (Napolí y Hubbell, 1975). *Rhizobium* penetra en el pelo, vía cordón de infección, y a través de éste alcanza el citoplasma de la célula huésped. Una vez allí, tienen lugar una serie de reacciones enzimáticas que conducen a la disolución del cordón, quedando las bacterias libres en el citoplasma de la célula huésped.

Fahraeus y Ljunggren (1959) propusieron que *Rhizobium* produce polisacáridos específicos que inducen un incremento en la producción de enzimas pectinolíticos por la planta. Estos enzimas relajarían la pared celular del huésped, permitiendo la iniciación del cordón de infección y la entrada de la bacteria. De acuerdo con esta hipótesis, los enzimas serían inducidos solamente por las razas infectivas. En efecto, Ljunggren y Fahraeus (1959) apuntaron la existencia de correlación entre el nivel de inducción del enzima (poligalacturonasa) y la capacidad de la bacteria para nodular.

El papel de los enzimas pécticos en la invasión de los pelos radicales ha sido rebatido por diversos autores (Lillich y Elkan, 1968; MacMillan y Cooke, 1969 y Bonish, 1973); sin embargo, otros trabajos más recientes, que confirman la capacidad de *Rhizobium* para inducir en la planta la producción de enzimas pécticos, apoyan el papel de éstos en el proceso de invaginación (Palomares, 1975 y Verma et al., 1978). Se sabe que los polisacáridos extracelulares de *Rhizobium* son los responsables de la inducción, habiéndose demostrado que la síntesis de tales polisacáridos en *R. meliloti* deriva de la presencia de un ADN extracromosómico (Olivares et al., 1977; Palomares et al., 1978 a y b).

Lo que sí parece más cuestionable del trabajo inicial de Fahraeus y Ljunggren (1959) es que la inducción de enzimas pécticos sea la base para explicar la especificidad, tal como discuten Solheim y Raa (1971). Así mismo, es discutido si tales enzimas tienen, además, actividad en la disolución del cordón de infección una vez formado (Verma et al., 1978).

Recientemente, se ha apuntado que las lectinas son capaces de iniciar algunos cambios enzimáticos (Albersheim y Wolport, 1976) que afectan, por ejemplo, a la invaginación del pelo para formar el cordón de infección.

Desarrollo del cordón de infección.-

El cordón de infección es una estructura tubular, cuya superficie interna está formada por celulosa y que está rodeada por la membrana plasmática de la célula huésped (Dixon, 1969 y Verma et al., 1978). En el interior del cordón se encuentran las bacterias unidas extremo con extremo, usualmente inmersas en una matriz de polisacárido. El cordón crece hasta alcanzar el cortex de la raíz, donde se ramifica y divide. El crecimiento del cordón de infección ocurre probablemente por aflojamiento de la celulosa bajo la influencia de las auxinas producidas en el interior del tubo por *Rhizobium* (Bergersen, 1978), ya que estas hormonas pueden inducir la síntesis de celulasas. La producción de auxinas "in vitro" por *Rhizobium*, ha sido repetidamente puesta de manifiesto (Rigaud, 1969 y Sanchez-Calle et al., 1978).

Eventualmente, el cordón de infección se disuelve liberándose las bacterias al citoplasma de la célula huésped (Verma et al., 1978). Esto ha sido puesto en evidencia mediante estudios al microscopio electrónico que muestran la erosión o disolución de la pared celular, y restos de ésta rodeando a las bacterias (Chandler, 1978 y Dazzo et al., 1976). Es lógico pensar que enzimas capaces de hidrolizar la pared celular intervengan en este proceso. Aparte de

los trabajos ya reseñados sobre la producción de enzimas pécticos inducidos por *Rhizobium*, hay que hacer notar otras publicaciones recientes en las que se pone de manifiesto la producción de enzimas pécticos (Hubbell et al., 1978), celulasas y hemicelulasas (Martinez-Molina et al., 1980) por *Rhizobium* en cultivo puro. La actuación "in vivo" de estos enzimas ha sido discutida en el trabajo de Verma et al., (1978). Estos autores indican que la degradación de la pared celular sería llevada a cabo por pectinasas producidas por las bacterias y celulasas procedentes de la planta.

Desarrollo inicial del nódulo.-

Sólo un porcentaje relativamente bajo de infecciones da lugar a nódulos.

Cuando el cordón de infección alcanza el cortex de la raíz, las células de éste son estimuladas en su ritmo de división y a partir de ellas se desarrollará el nódulo. La mayoría de estas células iniciales del nódulo, contienen un número doble de cromosomas y han sido llamadas por eso disomáticas. También se dividen algunas células normales. Las células disomáticas van a dar lugar al tejido central del nódulo, en el cual se desarrollan las bacterias y tiene lugar la fijación de N_2 . Las otras células darán lugar a los tejidos no infectados del nódulo: La corteza y los cordones vasculares que conectan con el sistema vascular de la raíz (Bergersen, 1978). Con respecto al origen de las células disomáticas, existe discusión en la literatura científica, pero una hipótesis comunmente aceptada sostiene la participación de las citoquininas, junto con las auxinas, en la producción de estas células (Pankhurst y Schwinghamer, 1974). De hecho, Phillips y Torrey (1970) y Sanchez-Calle et al. (1978) han descrito la presencia de citoquininas en cultivos de *Rhizobium* sp.

Efectividad o actividad.-

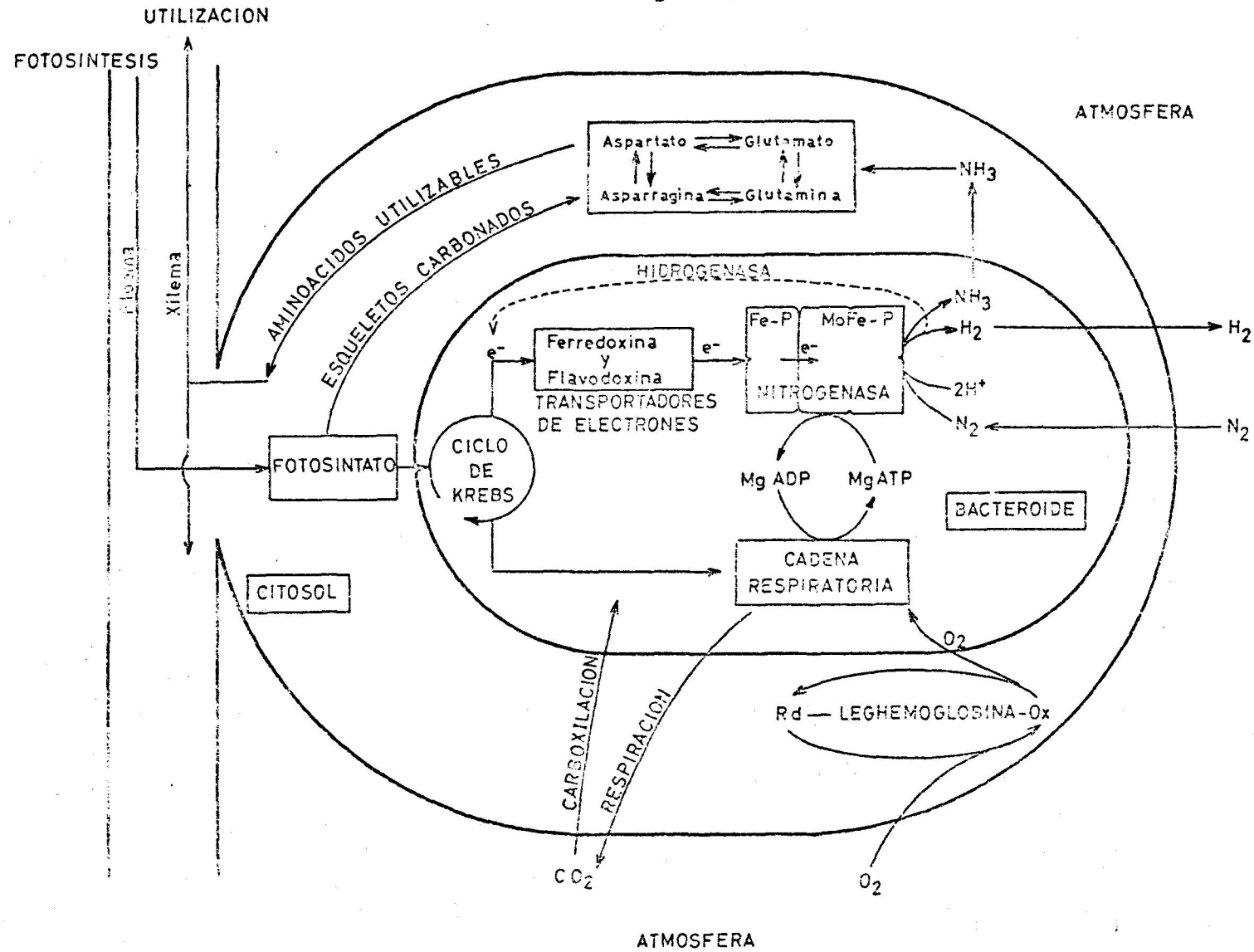
Es la tercera propiedad ó "característica simbiótica" de la asociación mutualística *Rhizobium*-leguminosa. Como consecuencia de su correcta expresión, tiene lugar en el nódulo una secuencia de procesos bioquímicos, que en esencia, conducen a la reducción del N_2 de la atmósfera hasta NH_4^+ , el cual se integra en cetoácidos sintetizados por la planta, dando lugar a aminoácidos que pasan del nódulo al xilema, siendo así transportados para su utilización por el vegetal. Las repercusiones prácticas de este proceso de fijación del N_2 atmosférico por leguminosas son totalmente reconocidas.

Las reacciones clave de la fijación de N_2 ocurren en las células infectadas por *Rhizobium* existentes en el tejido central del nódulo. Tal como se deduce de estudios al microscopio electrónico (Bergersen, 1974), cada célula huésped contiene miles de bacterias rodeadas individualmente, o en grupos, por membranas que se sabe son sintetizadas por el huésped. Estas bacterias que viven intracelularmente en los nódulos activos reciben el nombre de "bacteroides", para distinguirlos de las formas no fijadoras de N_2 que se encuentran en el suelo, cultivos, o primeros estadíos de la infección. Los bacteroides difieren de las células normales en su morfología, incapacidad para crecer en medios de cultivo ordinarios (Bergersen, 1968), poseer alteraciones en los citocromos y otros componentes de la cadena de transporte de electrones (Appleby, 1969 y Evans y Russell, 1971) y en que contienen nitrogenasa activa.

La fisiología y bioquímica del proceso de fijación han sido objeto de numerosos trabajos experimentales y de revisión. Entre estos cabe destacar, por recientes, los de Eady y Postgate (1974), Postgate (1975), Yates (1976), Evans y Barber (1977) y Bergersen (1978). La Figura 5 muestra un esquema de los procesos más importantes de la fijación de N_2 .



Figura 5



Nitrogenasa

Con este nombre se conoce el complejo enzimático que cataliza la reducción del N_2 a NH_3 . Su presencia ha sido demostrada en una gran variedad de microorganismos, entre los cuales se encuentran bacterias aerobias, facultativas, anaerobias y fotosintéticas, y también Cianobacterias. En líneas generales, se puede hablar de una similitud entre las nitrogenasas, cualquiera que sea el tipo de microorganismo del que proceden. Dentro del nódulo se sabe que la nitrogenasa está localizada en los bacteroides (Evans y Russell, 1971), sin embargo, hasta muy recientemente, no ha podido ser demostrado de manera directa que los *Rhizobium* "per se" poseen la información genética necesaria para sintetizar y regular el funcionamiento de este enzima. Esto se deduce de los ensayos de Pagan et al. (1975), McComb et al. (1975) y Bedmar y Olivares (1979), en los que se demuestra que los *Rhizobium* pueden fijar N_2 en cultivo puro, bajo determinadas condiciones, en ausencia de planta huésped.

El complejo enzimático está constituido por dos tipos de proteínas: La molibdo-ferro-proteína (Mo-Fe-Prot.) y la ferro-proteína (Fe-Prot). En general, se ha observado que las combinaciones de ambos componentes, procedentes de microorganismos aerobios diferentes o anaerobios diferentes, parecen ser más compatibles (operativas) que las combinaciones de las procedentes de aerobio con anaerobio.

Los requerimientos básicos para que opere la nitrogenasa son: condiciones anaerobias (el enzima es muy sensible al O_2), ATP, Mg^{++} y una fuente de poder reductor.

Durante la reacción, la energía del ATP y los electrones del reductor originan un cambio conformacional en la Fe-Prot. y la convierten en un reductor con un potencial redox de -400 mv (Orme-

-Jhonson, 1977). La Fe-Prot. reducida transfiere electrones a la Mo-Fe-Prot., la cual a su vez reduce al N_2 (Evans y Barber, 1977). La reducción de una molécula de N_2 a dos de NH_3 requiere de 12 a 15 moles de ATP (Orme-Jhonson, 1977).

Además del N_2 , otros sustratos, entre ellos el ion H^+ , pueden ser reducidos por acción de la nitrogenasa, e incluso cuando la reacción de la nitrogenasa es llevada a cabo en una atmósfera de N_2 puro, del 25 al 30 % del reductor proporcionado a la reacción es consumido en la reducción de H^+ a H_2 . Energéticamente, hay que tener en cuenta que el consumo de ATP en la reacción de la nitrogenasa es aproximadamente el mismo cuando actúa como aceptor el N_2 que cuando lo hace el H^+ . Esto indica que una gran cantidad de la energía aportada a la nitrogenasa, del 30 al 60 % según Schubert y Evans (1977), es gastada en la reducción del H^+ . Por esta razón, salvo que los organismos posean un mecanismo para utilizar el H_2 producido, puede perderse gran cantidad de energía.

Sustratos para la provisión de energía y poder reductor para que opere la nitrogenasa.

Es un hecho totalmente aceptado que la energía para que los bacteroides fijen nitrógeno en los nódulos es proporcionada por la planta. En efecto, los factores que afectan a la fotosíntesis, influyen de forma correlacionada el ritmo de fijación simbiótica de N_2 (Bergersen, 1974; Hardy y Havelka, 1976). El producto principal del fotosintato que llega desde las hojas al nódulo es la sacarosa (Bach *et al.*, 1958), no obstante, este azúcar no es utilizado directamente por bacteroides aislados, sino que es hidrolizado en el nódulo por una invertasa sintetizada por la propia planta (Bergersen, 1974). Las rutas del metabolismo glucídico en bacteroides no están completamente establecidas, aunque se sabe que estos contienen enzimas glucolíticas (Evans y Barber, 1977).

Los bacteroides llevan a cabo reacciones de carboxilación, utilizando para ello el CO_2 de la atmósfera (Lowe y Evans, 1962).

El poder reductor es generado en el bacteroide mediante fosforilación oxidativa de los sustratos carbonados (Yates, 1976). Los reductores más comunes de la nitrogenasa son una ferredoxina y una flavodoxina (Evans y Russell, 1971), pero también se han descrito actividades subsidiarias de las formas reducidas del FMN, FAD, NADP^+ y NAD^+ generados por la actividad de varios sistemas de deshidrogenasas acoplados a las cadenas de transporte de electrones (Bergersen, 1978).

Papel de la leghemoglobina en el aporte de O_2 al bacteroide.

Las preparaciones purificadas de nitrogenasa son extremadamente sensibles al oxígeno, por ello, los microorganismos aerobios han tenido que desarrollar mecanismos especializados para la protección de la nitrogenasa "in vivo". Mientras que *Azotobacter* lleva a cabo tal protección mediante su elevado ritmo de respiración (Postgate, 1975), los bacteroides de *Rhizobium* poseen un sistema de protección altamente especializado y efectivo. La clave de dicho sistema es la leghemoglobina. (Tjepkema y Yocum, 1974). El oxígeno se combina con la leghemoglobina, dando lugar a la oxileghemoglobina. Combinado de esta forma, el O_2 es transferido a la superficie del bacteroide, en donde la oxileghemoglobina se disocia muy lentamente, por lo que la concentración de O_2 libre en la superficie del bacteroide es siempre muy baja. Una vez allí, el O_2 es aceptado por un sistema de oxidasas muy especializado, que posee una afinidad poco común por él. Este sistema, que opera a bajas concentraciones de O_2 , es altamente eficiente en la síntesis de ATP (Evans y Barber, 1977; Bergersen, 1978). Se sabe que el bacteroide es responsable de la biosíntesis del grupo hemo, mientras que la apoproteína es de origen vegetal (Appleby, 1974).

Reciclaje de H_2 en el bacteroide.

Como se dijo anteriormente, la reducción de H^+ supone una pérdida de energía que sólo puede ser paliada con la utilización posterior del H_2 producido. Efectivamente, algunas leguminosas han desarrollado mecanismos por los cuales el H_2 producido es reciclado y utilizado en el sistema de transporte de electrones, con lo cual parte de la energía gastada es recuperada.

La utilización del H_2 tiene lugar a través de una secuencia de reacciones, en la primera de las cuales interviene la hidrogenasa. Parece ser que las células de *Rhizobium* contienen la información genética necesaria para la síntesis de la hidrogenasa, pero el efecto del huésped sobre la expresión de este enzima es decisivo, aunque su modo de acción es desconocido.

Desde el punto de vista práctico, sería de gran interés conseguir combinaciones de razas de *Rhizobium* y cultivares de leguminosas apropiadas para que se produzcan nódulos en los cuales se use eficientemente la energía, y no se malgaste en el desprendimiento de H_2 .

Consideraciones genéticas sobre la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa.

Es obvio que los sistemas simbióticos, por su complejidad, son poco asequibles para el análisis genético, por lo que las investigaciones en este campo se dificultan enormemente. La simbiosis *Rhizobium*-leguminosa no es una excepción, por ello, los datos que se tienen de la interacción de los genomas de la planta y de la bacteria son aún muy limitados.

Los conocimientos actuales acerca de la genética de *Rhizobium*, y de la simbiosis ya establecida, han sido analizados exhaustivamente en la revisión de Casadesús y Olivares (1978).

Tradicionalmente, las propiedades simbióticas de *Rhizobium* han sido clasificadas en 3 grandes fenotipos: especificidad del huésped (H_{sp}) o capacidad de nodular un huésped específico, infectividad (Inf) o capacidad de inducir la formación de nódulos y efectividad (Eff) o capacidad de fijar N₂ en el nódulo. Un subgrupo de los genes *eff* serían los genes *nif*, encargados de codificar la síntesis de la nitrogenasa.

Según esta clasificación es difícil distinguir claramente los caracteres Hps⁺ e Inf⁺. Para evitar esta confusión, se puede definir el fenotipo Hps⁺ como el conjunto de características que permiten a un *Rhizobium* dado asociarse simbióticamente con un número limitado de huéspedes.

Como ya se ha dicho, la especificidad se ha usado como criterio taxonómico, pero el rigor de este criterio es bastante discutible y solo aplicable de forma estricta a *R. meliloti* (Graham, 1976). Actualmente se ha sugerido que la base del "reconocimiento" específico puede residir en la interacción de las lectinas de la raíz y el antígeno O del lipopolisacárido de *Rhizobium* (Wolpert y Albersheim, 1976), como ya se ha indicado anteriormente. La lectina superficial de la raíz del trébol, la "trifolina" ha sido aislada y purificada (Dazzo y Hubbell, 1975 y Dazzo et al., 1978) y la capacidad de aglutinar con ella ha sido transferida de *R. trifolii* a *Azotobacter vinelandii* por transformación (Bishop et al., 1977). De acuerdo con Casadesús y Olivares (1978), estos hechos permiten distinguir el carácter Hsp⁺ (aglutinación específica) del Inf⁺ (capacidad de nodular). Por el momento, no hay datos sobre la localización, funcionamiento y expresión de los genes *hsp*.

En lo que respecta al carácter Inf⁺, es decir a la capacidad de *Rhizobium* sp. para invadir el cortex de la raíz del huésped apropiado e inducir la formación de nódulos, se sabe que,

salvo en *R. meliloti*, es muy frecuente la pérdida espontánea del mismo, aislandose de forma relativamente fácil los fenotipos Inf⁻. También se sabe que el tratamiento con agentes eliminadores de plásmidos, lleva consigo frecuentemente la pérdida de la capacidad infectiva. Todo esto ha hecho pensar en la posibilidad de que los genes *inf* se encuentren localizados en un plásmido (Dunican y Cannon, 1971; Higashi, 1967 y Prakash et al., 1980).

En cuanto al control genético de la efectividad, se tienen es casos datos de los mecanismos que determinan la aparición de los distintos enzimas implicados en la fijación de N₂. Hay razones su ficientes para pensar que el operón *nif* de *Rhizobium* sp. se encuentra en un plásmido (Dunican et al., 1976; Nuti et al., 1979), aunque existen genes *eff* en el cromosoma (Kondorosi et al., 1979).

Con respecto a la regulación de la fijación de N₂, la mayoría de los estudios han sido llevados a cabo en fijadores de vida libre por su menor complejidad, por lo que no se tienen muchos con cimientos de como se ejerce esta regulación en el interior del nó dulo. Las investigaciones se han centrado fundamentalmente en la regulación de la biosíntesis de la nitrogenasa. Se sabe que la ac tividad de los genes *nif*, además de estar controlada por los genes *eff*, posee un sistema propio de regulación.

En *klebsiella* la clave de la regulación parece estar en la glu tamina sintetasa, ya que en ausencia de amonio u otros compuestos nitrogenados que inhiben la actividad nitrogenasa, la glutamina sintetasa (GS) tiene una función reguladora, activando la trans cripción del operón *nif* y desencadenándose así la síntesis de ni trogenasa. Sin embargo, en presencia de amonio la GS sufre una mo dificación por la adición de radicales adenilo, lo cual determina su inactivación. (Streicher et al., 1974).

En los bacteroides de *Rhizobium* el glutamato parece ser el en

cargado de la regulación (Casadesús y Olivares, 1978). El glutamato inhibe la utilización del amonio, probablemente mediante una inhibición de los enzimas encargados de su asimilación, entre los que se encuentra la glutamina sintetasa. Si el glutamato inhibe la actividad catalítica de la GS, y no su síntesis, el modelo de Streicher et al., (1974) puede ser extrapolable a *Rhizobium*. Al inhibir el glutamato la asimilación de amonio, provocando su excreción, determina el carácter mutualístico y no parasítico de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa.

Finalmente, hay que hacer referencia a los estudios que sobre transformación, transducción y conjugación están siendo llevados a cabo en *Rhizobium* con vistas a la localización de los genes simbióticos, ya que son de gran importancia desde el punto de vista de investigación básica y aplicada.

Origen y evolución de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa.

En términos generales, se puede afirmar que el acontecimiento fundamental de la evolución de la vida en nuestro planeta en el período Paleozóico, fué la conquista de las zonas terrestres por representantes de casi todos los *phyla* de animales y vegetales. Los antecesores de las plantas superiores eran formas acuáticas, y para iniciar la colonización de hábitats secos y pobres nutritivamente, debieron sufrir una profunda transformación en su proceso evolutivo. Se sabe que esto ocurrió entre los periodos Silúrico y Devónico, hace, aproximadamente, unos 400×10^6 años.

Como ya se comentó anteriormente, las micorrizas tuvieron una influencia decisiva en la evolución de las plantas, facilitando la captación de fósforo y H_2O a partir de aquel "suelo". La obtención del nitrógeno, el otro macronutriente que tanto desde el punto de vista cuali como cuantitativo, es clave en nutrición vegetal, parece ser que fué posible porque el "suelo" estaba colonizado por bac-

terias y cianobacterias fijadoras de N_2 atmosférico (Fisher, 1965).

En efecto, la existencia de organismos fijadores podría remontarse a unos 2.000×10^6 años (Dilworth, 1974). El carácter reductor y el requerimiento de anaerobiosis propios de la nitrogenasa, son dos atributos que parecen completamente lógicos y adecuados para un enzima que debía funcionar en la primitiva atmósfera anaerobia (Postgate, 1974). De acuerdo con los razonamientos de Silver y Postgate (1973), Postgate (1974) y Casadesús y Olivares (1978), el sistema debió surgir bajo la atmósfera N_2/CO_2 y no durante la fase de evolución biótica cuando el NH_3 era abundante (atmósfera NH_3/CH_4).

El origen de la fijación simbiótica de N_2 por la asociación *Rhizobium*-leguminosa es bastante posterior. Según Hattori (1973), tuvo lugar entre los periodos Jurásico y Cretáceo del Mesozoico, es decir, hace unos 150×10^6 años, época en la que también debieron originarse los sistemas fijadores simbióticos en no-leguminosas (Bond, 1963).

Varias hipótesis han sido apuntadas para explicar el origen y evolución de esta simbiosis. Según Parker (1957), la asociación es consecuencia de una adaptación ecológica que debió ocurrir de acuerdo con las siguientes fases: a) asociación entre un fijador de vida libre y la planta sobre la superficie de la raíz (tal como la que hoy existe en *Azospirillum brasiliense* - sinónimo de *Spirillum lipoferum* - o *Azotobacter paspali* (Dobereiner et al., 1973) b) simbiosis "laxa" sobre la superficie de la raíz; c) establecimiento de la simbiosis dentro del tejido cortical de la raíz y d) formación de un tejido especializado en la fijación de N_2 , que es el nódulo. Según esta hipótesis, la selección natural fué dando lugar a asociaciones cada vez más dependientes de la planta. La hipótesis de Dilworth y Parker (1969) sugirió que *Rhizobium* podía haber depositado parte de la información genética, o de su expresión, en

