

Universidad de Granada

Facultad de Ciencias



Estudios sobre fijación de Nitrógeno en vida libre y transferencia genética en Rhizobium

Eulogio J. Bedmar Gómez



Biblioteca Universitaria de Granada



01533676

Tesis Doctoral

1978

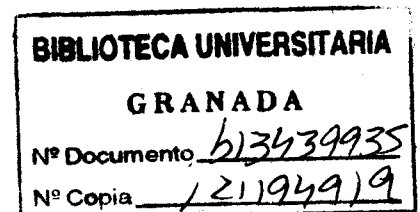
D.T. 2/113

~~D.T. 1-112~~

2-113

T
13
74

Tesis doctoral, dirigida por el Dr. D. José Olivares Pascual, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas de la Estación Experimental del Zaidín. Fue leída el día 30 de Marzo de 1978 ante el tribunal formado por los profesores: Recalde Martínez, Granada; Montoya Gómez, Granada; Ramos Cormenzana, Granada; Piédrola Angulo, Granada; Olivares Pascual, Granada. Obtuvo la calificación de Sobresaliente " cum laude".



C.

ESTUDIOS SOBRE FIJACION DE NITROGENO EN VIDA LIBRE
Y TRANSFERENCIA GENETICA EN *Rhizobium*.

Memoria que presenta el
Licenciado en Ciencias
(Sección Biológicas) D.
Eulogio José Bedmar Gó-
mez, para aspirar al gra-
do de Doctor.

613439935
15394657

Eulogio Bedmar

Fdo. Eulogio José Bedmar Gomez

V° B°
EL DIRECTOR

[Signature]

Fdo. Dr. José Olivares Pascual
Dr. en Farmacia
Prof. de Investigación del C.S.I.C.

V° B°
EL PONENTE

[Signature]

Fdo. Dr. Enrique Montoya Gómez
Catedrático de Microbiología.



P. 47. 988

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIOS SOBRE FIJACION DEL NITROGENO EN VIDA LIBRE
Y TRANSFERENCIA GENETICA EN RHIZOBIUM.

Eulogio José Bedmar Gómez
(Tesis Doctoral)

UNIVERSIDAD DE GRANADA

1978

La Memoria que presentamos ha sido realizada en los laboratorios de la Sección de Microbiología de la Estación Experimental del - Zaidín, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Su realización ha sido posible gracias a una beca del Plan de Formación del Personal Docente e Investigador.

Parte de los resultados de esta tesis, han sido presentados en el II International Symposium on Nitrogen Fixation, Salamanca, España, 1976.

Convencido de que este trabajo hubiera sido menos fructífero y agradable sin la ayuda de numerosas personas, deseo expresar mi agradecimiento a todas ellas, en especial al Dr. José Olivares Pascual, Director de esta tesis, Profesor de Investigación del CSIC y Jefe de la Sección de Microbiología de la Estación Experimental del Zaidín, de quién he recibido estímulo y orientaciones constantes; al Prof. Enrique Montoya Gómez, Catedrático de Microbiología de la Facultad de Ciencias y Director del Departamento de Microbiología y Bioquímica de la Estación Experimental del Zaidín del CSIC, cuyas valiosas enseñanzas y amplio sentido de la investigación han servido de base en mi formación científica.

A todos mis compañeros de la Sección y del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias, y al personal de la Estación, que en alguna forma han contribuido a llevar a cabo este trabajo.

A mis padres.

A María de los Angeles, mi mujer.

INDICE

	Página
<u>Introducción</u>	
Fijación biológica del nitrógeno	1.1
Aspectos bioquímicos de la fijación	1.7
Medida de la actividad de la nitrogenasa	1.10
Control de la nitrogenasa	1.12
Lugar de la fijación	1.14
Fijación del nitrógeno por <i>Rhizobium</i> en vida libre	1.15
Mutantes <i>nif</i>	1.20
Transferencia de genes en <i>Rhizobium</i>	1.21
Transformación	1.21
Transducción	1.22
Conjugación	1.23
Transferencia de genes <i>nif</i> en <i>Rhizobium</i>	1.27
Control genético en <i>Rhizobium</i> de las caracte- rísticas simbióticas	1.29
 <u>Objeto</u>	 1.32
 <u>Material y Métodos</u>	
Parte general	2.1
Microorganismos	2.1
Plantas	2.2
Fagos	2.2
Medios de cultivo	2.2
Esterilización de las semillas de alfalfa	2.7

	Página
Germinación de las semillas	2.7
Selección de razas de <i>R. meliloti</i> y <i>R. leguminosarum</i> resistentes a la estreptomicina	2.8
Obtención de mutantes auxotrofas de <i>R. meliloti</i> mediante tratamiento con luz ultravioleta	2.9
Aislamiento de fagos de <i>E. coli</i> K12-J53,RP4	2.9
Obtención de suspensiones de alto título de los fagos de <i>E. coli</i> y <i>R. meliloti</i> usados	2.10
Ensayos de infectividad y efectividad	2.11
Parte especial	
1.- Experiencias de fijación en vida libre	2.12
Microorganismos	2.12
Ensayos de infectividad y efectivi- dad de los clones aislados	2.13
Preparación de los inóculos	2.13
Inoculación de los frascos	2.13
Medida de la actividad nitrogenasa en <i>R. meliloti</i> por la reducción del acetileno a etileno	2.14
Preparación e inoculación del medio	2.15
Obtención e inyección del acetileno	2.16
Determinación del etileno	2.16
Controles	2.17
2.- Experiencias de conjugación	2.17
Microorganismos	2.17
Transferencia del factor RP4 de <i>E. coli</i> a <i>R. meliloti</i>	2.18

	Página
Transferencia del factor RP4 de <i>R. meliloti</i> a <i>E. coli</i>	2.19
Transferencia del factor RP4 entre razas de <i>R. meliloti</i>	2.20
Transferencia del plásmido PG entre razas de <i>R. meliloti</i>	2.21
Obtención de los polisacáridos extra- celulares de <i>R. meliloti</i>	2.24
Transferencia del plásmido PG de <i>R. meliloti</i> a <i>E. coli</i>	2.24
Adsorción del fago AL1 por <i>E. coli</i>	2.25
Transferencia del plásmido PG de <i>E. coli</i> a <i>R. meliloti</i>	2.25
Transferencia del plásmido PG a <i>R. leguminosarum</i>	2.26
Adsorción del fago AL1 por <i>R. legu- minosarum</i>	2.26

Experiencias y Resultados

1.- Fijación de nitrógeno en vida libre	3.1
Ensayos de infectividad y efectividad de los clones de <i>R. meliloti</i>	3.1
Determinación de la actividad nitro- genasa en <i>R. meliloti</i> por reducción del acetileno a etileno	3.4
Actividad nitrogenasa en presencia de diferentes concentraciones de nitrógeno fijado	3.7
Controles	3.9
2.- Experiencias de conjugación	3.10
Transferencia del factor RP4 de <i>E. coli</i> a <i>R. meliloti</i>	3.10

	Página
Transferencia del factor RP4 entre razas de <i>R. meliloti</i>	3.13
Transferencia del plásmido PG entre razas de <i>R. meliloti</i>	3.13
Obtención de los polisacáridos extracelulares de <i>R. meliloti</i>	3.20
Transferencia del plásmido PG de <i>R. meliloti</i> a <i>E. coli</i>	3.21
Transferencia del plásmido PG de <i>E. coli</i> a <i>R. meliloti</i>	3.23
Transferencia del plásmido PG a <i>R. leguminosarum</i>	3.24
Adsorción del fago AL1 por <i>R. le-</i> <i>guminosarum</i>	3.25
<u>Discusión</u>	4.1
<u>Conclusiones</u>	5.1
<u>Bibliografía</u>	6.1

INTRODUCCION

El nitrógeno es un elemento esencial para todas las formas de vida y, con la excepción del agua, es el nutriente limitante más común en la práctica de la agricultura. La mayor parte del nitrógeno para el crecimiento de las plantas proviene de la atmósfera mediante la fijación química y biológica, por la cual el gas nitrógeno es reducido a amoníaco o amonio, los cuales reaccionan con los cetoácidos para formar aminoácidos y amidas que constituyen el material básico para la síntesis de proteínas y otros compuestos biológicos nitrogenados. Teniendo en cuenta el crecimiento de la población mundial, el constante aumento de los costos de los fertilizantes obtenidos por la industria química y el progresivo incremento en el uso de los fertilizantes químicos nitrogenados, hay una obvia necesidad de encontrar caminos para suplementar o mejorar los métodos actuales del suministro de nitrógeno. Las recientes investigaciones acerca de la fijación biológica del nitrógeno han abierto nuevas y prometedoras posibilidades.

De acuerdo con las estimaciones de Burns y Hardy (1975), la fertilización mediante abonos nitrogenados aporta al suelo unas 44.10^6 toneladas de nitrógeno anuales. Esta cantidad representa sólo una parte del total del nitrógeno involucrado en su ciclo, que se considera en 175.10^6 toneladas por año; por consiguiente, desde el punto de vista cuantitativo, las bases esenciales del ciclo son los procesos de fijación química y biológica. La fijación química reside en reacciones espontáneas que forman óxidos de nitrógeno a partir del oxígeno y el nitrógeno atmosférico gracias a las descargas eléctricas de las tor

mentas, la radiación ultravioleta y los procesos de combustión que aportan unas 46.10^6 toneladas anuales. El resto de nitrógeno fijado, se debe a la actividad biológica de organismos procarióticos: bacterias y algas verdeazuladas.

Fijación biológica del nitrógeno.

Dentro de las bacterias fijadoras se establecen dos grandes grupos, el de fijadores en vida libre y el de fijadores -- simbióticos. Este último, genuinamente representado por la asociación *Rhizobium-Leguminosa*, es el más significativo desde el punto de vista cuantitativo.

En los últimos años se han descubierto algunas asociaciones entre plantas no leguminosas y bacterias fijadoras: *Paspalum notatum* / *Azotobacter paspalum* (Dobereiner et al. 1972) *Digitaria decumbens* / *Spirillum lipoferum* (Von Bulow y Dobereiner, 1975). La importancia de estas asociaciones desde el punto de vista agrícola, no ha sido aún estimada, pero los primeros datos son positivos.

Las algas verdeazuladas poseen también importancia agrícola. En los suelos abundantemente oxigenados de regiones templadas estas algas son numerosas, y además, algunas establecen -- simbiosis fijadoras con vegetales superiores: *Anabaena* / *Azolla* (Peters, 1975), *Nostoc* / *Gunnera* (Silvester y Smith, 1969), -- etc. Finalmente, un amplio grupo de líquenes fijadores de nitrógeno están constituidos por la asociación de algas verdes -- con hongos. Estos líquenes llevan a cabo prácticamente toda la actividad biológica fijadora de las regiones subárticas.

Debemos citar también, puesto que su importancia ecológica

ca es paralela a la importancia agrícola de las leguminosas, las asociaciones simbióticas entre endofitos de no leguminosas y algunos árboles o arbustos, tales como *Alnus*, *Casuarina*, *Mirya*. Los endofitos de dichas asociaciones no han sido aún aislados en cultivo puro, pero se trata muy probablemente de *Actinomicetos* (Becking, 1970), incluidos en la familia *Frankiaceae*.

La fijación libre, cuya menor relevancia desde el punto de vista agrícola ya ha sido señalada, es llevada a cabo por un extenso y heterogéneo grupo de microorganismos; entre ellos -- los hay aerobios, algas: *Nostoc*, *Plectomona*, etc.; bacterias; *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Derxia*, etc.; facultativos: *Klebsiella*, *Bacillus*, etc. y anaerobios: *Clostridium*, *Chromatium*, etc.

Los aspectos básicos de la fijación biológica del nitrógeno por las leguminosas no fueron establecidos hasta las típicas experiencias de Hellriegel y Wilfarth (1888), que cultivaron leguminosas y no leguminosas en suelo estéril con extractos de tierra de jardín. Se obtuvo así la primera evidencia -- acerca de la necesidad de usar extractos no estériles para la nodulación y que ésta era esencial para el normal desarrollo de las plantas. Estas experiencias fueron confirmadas y comprendidas cuando Beijerinck (1888) aisló en cultivo puro bacterias formadoras de nódulos que llamó *Bacillus radicicola*, el cual es ahora conocido como *Rhizobium*.

La importancia económica de la fijación simbiótica ha estimulado numerosas investigaciones en este campo, habiéndose -- descrito los progresos realizados en sus diferentes aspectos -- en las revisiones de Fred et al. (1932), Wilson (1940), Allen (1950, 1954, 1958), Nutman (1958, 1965, 1967), Vincent (1958, 1965), Raggio y Raggio (1962), Carnaham y Castle (1963), Vir-

tanen y Mittinen (1963), Burris (1965, 1966, 1974), Stewart (1966), Dixon (1969), Evans (1969), Ljungren (1969), Stewart y Lex (1970), Evans y Russell (1971), Beneman y Valentine -- (1972), Stanley et al. (1973), Vest et al. (1973), Brown et al. (1973), Dalton (1974), Dilworth (1974), Hardy y Hawelka (1975), Shanmugan y Valentine (1975), Yates (1976) y en algunos libros, entre ellos: Lutte biologique contre la faim, (Bonnier y Brakel, 1969), Biological fixation of atmospheric nitrogen, - (Mishustin y Shil'Nikova, 1971), The Chemistry and Biochemistry of nitrogen fixation (1971), Dinitrogen Fixation (Burns, 1974), Biological Nitrogen Fixation (Quispel, 1974), Los volumenes 6 y 7 correspondientes al IBP* (Stewart y Nutman, 1976), los Proceedings del I Symposium Internacional sobre fijación de Nitrogeno (Newton y Nyman, 1976) y los más recientes: A Treatise on Dinitrogen Fixation (Hardy y Silver, 1977); Hardy y Gibson -- (1977).

El proceso mediante el cual una bacteria que se encuentra en el suelo, en los alrededores de las raíces -rizosfera- penetra en las mismas y da lugar a la reducción de las moléculas de nitrógeno, es de una complejidad tal, que a pesar de los cientos de trabajos realizados, aún subsisten muchos puntos oscuros en el mismo, que han de ser esclarecidos si se quiere llegar a utilizar con fines prácticos la fijación simbiótica del nitrógeno con un cien por ciento de eficacia.

Para llegar a establecerse el estado simbiótico, los *Rhizobium* han de poseer tres características bien definidas: especificidad, infectividad y efectividad. La primera es res-

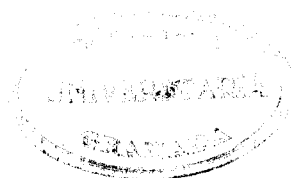
* International Biological Programme.

ponsable de la infección selectiva característica de estos microorganismos; la segunda, supuesta una especificidad adecuada, determina la capacidad mayor o menor de la bacteria para infectar los tejidos corticales de las raíces de las plantas; la tercera, condiciona la fijación de nitrógeno.

La incapacidad de las bacterias pertenecientes al género *Rhizobium* para fijar el nitrógeno en vida libre, dificulta considerablemente cualquier estudio fisiológico, bioquímico o genético que se pretenda llevar a cabo en estos microorganismos, ya que si bien crecen fácilmente sobre medios de cultivo en laboratorio, su comportamiento es distinto, al menos en parte, a cuando se desarrollan en el interior de los nódulos de las leguminosas. Esta diferencia, se hace ya patente en su morfología, convirtiéndose en el interior de las células radicales en los llamados bacteroides, de mayor tamaño, de forma irregular e inconstante, no reproductivos y dotados de la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico.

Aunque ninguna de las propiedades citadas puede ponerse de manifiesto en ausencia de la planta, la especificidad y la infectividad, dependen exclusivamente de la bacteria, mientras que, la efectividad, en cambio, solo tiene lugar si existe una integración perfecta entre la célula radical y el microorganismo.

Una típica característica de la asociación simbiótica entre *Rhizobium* y las diversas especies de leguminosas es la formación de leghemoglobina, que constituye la porción central de color rojo de los nódulos de las raíces de las leguminosas y que fué identificada como una hemoglobina por Kubo (1939) y --



posteriormente confirmada por Virtanem (1945) y Keilin y Wang (1945). Ellfok (1959, 1960 y 1961), cristalizó y caracterizó -- los dos componentes proteícos principales.

La leghemoglobina está localizada dentro de una membrana envolvente especializada en el interior de las células que constituyen el nódulo, (Bergensen 1966; Goodchild y Bergensen 1966). La leghemoglobina tiene una alta afinidad por el oxígeno y sufre una oxigenación reversible (Keilin y Wang, 1945), siendo su papel más probable facilitar la difusión del oxígeno a los bacteroides para su respiración, (Yocum, 1964; Tjepkema, 1971). Puesto que -- la nitrogenasa es extremadamente lábil al oxígeno, podría también controlar la presencia de oxígeno libre y prevenir la inactiva-- ción de la nitrogenasa por el oxígeno, (Bergensen et al. 1973). La leghemoglobina es un producto de la simbiosis; Cutting y ---- Schulman (1969) informan que la mitad hemo de la legghemoglobina es sintetizada por los bacteroides; esta parta hemo pasa al cito plasma de las células de la planta y es usada para la biosíntesis de la leghemoglobina.

La estructura primaria de la parte globina es determinada -- por el genomi^o de la planta (Cutting y Schulman, 1971), Dilworth (1969) encuentra una especificación genética similar en otras -- plantas leguminosas. Recientemente se ha conseguido el aislamiento y la traducción en vitro del ARN mensajero responsable de la -- leghemoglobina (Verma et al. 1974), confirmando los resultados de los autores antes citados. Más detalles pueden encontrarse en las revisiones de Wittemberg et al. (1975) y Appleby et al. (1976).

Aspectos bioquímicos de la fijación.

Desde el punto de vista bioquímico, los componentes esenciales para la fijación simbiótica son ATP (fuente de energía), poder reductor (fuente de electrones), el enzima nitrogenasa y el nitrógeno (aceptor de electrones) (Koch et al., 1967). Los bacteroides requieren grandes cantidades de energía en la forma de poder reductor y ATP para conducir la fijación del nitrógeno y otros procesos celulares; esta energía se obtiene de productos de la fotosíntesis de la planta. Sacarosa, glucosa y ácidos orgánicos son transportados a las raíces y los nódulos (Bach et al. 1958) y la oxidación de estos sustratos dentro de los bacteroides, genera la energía esencial. La ferredoxina es la encargada de transportar electrones a la nitrogenasa (Yoch et al. 1970), (Koch et al. 1970) confirmaron la presencia de ferredoxinas y estudiaron sus propiedades. Los nucleótidos de nicotinamida reducidos pueden funcionar como reductores de la nitrogenasa (Klucas y Evans, 1958; Bergersen, 1969; Wong et al. 1971).

El poli- β -hidroxiburato se creyó que era una fuente de poder reductor para la fijación del nitrógeno, ya que los bacteroides lo acumulan como un almacén de carbono y contienen enzimas para su hidrólisis (Klucas y Evans, 1968). Sin embargo, Wong y Evans, (1971) mostraron con el poli- β -hidroxibutirato no es capaz de mantener una alta actividad de nitrogenasa cuando el suministro de carbohidratos de la planta es limitado.

Nitrogenasa es el nombre que se da al sistema enzimático responsable de la fijación del N_2 a NH_3 (Posgate, 1970) y es -

sorprendentemente similar en todos los organismos de los que se ha aislado.

La investigación bioquímica sobre la nitrogenasa comenzó en 1960, más de setenta años después del aislamiento de las -- bacterias fijadoras de nitrógeno y gracias al desarrollo de ex tractos libres de células capaces de reducir nitrógeno in vi-- tro (Carnaham et al. 1960). Solo a modo de ejemplo y por la -- utilidad que presentan, se pueden indicar algunas de las revi-- siones más interesantes: Bergersen, (196), Mortenson, (1961, - 1964), Hardy y Burns, (1968), Hardy y Knight, (1968), Burris, (1969, 1973, 1974), Hardy et al. 1971), Beneman y Valentine -- (1972), Posgate, (1972, 1974), Dalton y Mortenson (1972), Strei-- cher et al. (1972), Dazzo y Hubbell (1974), Dalton (1974), -- Dilworth (1974), Eady y Posgate (1974), Hardy y Havelka (1975), Shanmugan y Valentine (1975), Yates, (1976).

El largo retraso entre los estudios biológicos y bioquí-- micos fue debido principalmente a la falta de información acer-- ca del substrato y los requerimientos energéticos de la fija-- ción. El uso del ácido pirúvico, que proporciona poder reductor vía reacción fosforoclástica y ATP a través del acetil fosfato (Mortenson, 1961, 1964) y de un reductor artificial como el di-- tionito, usado para donar electrones a la nitrogenasa (Koch et al. 1967; Klucas et al. 1968; y Bergersen y Turner, 1968), que reemplaza a los enzimas clásticos y a los reductores fisiológi-- cos por interacción directa con la nitrogenasa, ha permitido -- el examen bioquímico de muchas bacterias fijadoras (Bulen et al. 1965). El ATP fue suministrado en estas experiencias median-- te un generador de ATP (creatina-fosfato - creatina-cinasa).

La nitrogenasa es un complejo enzimático que contiene molibdeno, hierro y azufre inorgánico. Bulen y LeComte (1966) mediante cromatografía en DEAE-celulosa separaron la nitrogenasa de *Azotobacter vinelandii* en dos fracciones proteicas inacti--vas, que fueron llamadas Enzima I y II. El componente I, con--tiene molibdeno, hierro y azufre; el componente II contiene --hierro y azufre. La nitrogenasa activa se reconstituye cuando se recombinan los dos componentes activos.

Las nitrogenasas de *A. vinelandii* (Bulen y LeComte, 1966), *Bacillus polymixa* (Detroy et al. 1968), *Clostridium pasteuranum* (Mortenson et al. 1967), *Klebsiella pneumoniae* (Kelly, ---1969), bacteroides de *Rhizobium* (Bergersen y Turner, 1970), bac--terias fotosintéticas y algas verdeazuladas (Smith et al. 1971), han sido separadas en dos componentes inactivos mediante croma--tografía; en todos los casos los dos componentes presentan si--milares propiedades físicas y químicas. Algunas combinaciones de componentes heterólogos pueden presentar actividad cuando --se mezclan.

Dalton et al. (1971), informan sobre un nuevo método de --purificación usando un sistema de fraccionamiento con protami--na sulfato. Bergersen y Turner (1970) han separado la nitroge--nasa de los bacteroides de *Rhizobium* mediante filtración por --sephadex G-200 y dan valores de peso molecular de 182.000 y --51.000 para los componentes I y II respectivamente. Ambas pro--teínas son rápidamente inactivadas por el oxígeno (Klucas et -al. 1968). Se cree que el complejo enzimático está formado a --base de tres proteínas con Mo-Fe y varias subunidades de protei--nas con Fe. La estructura precisa de cada subunidad no es toda

via conocida aunque han sido examinadas por distintos autores, (Burris et al. 1970; Nakos y Mortenson, 1971).

Medida de la actividad de la nitrogenasa.

Históricamente, en el laboratorio, la fijación del nitrógeno ha sido determinada por el método de Kjeldahl, pero este método es poco sensible. Dos recientes innovaciones, el método del $^{15}\text{N}_2$ y el método de la reducción del acetileno, proporcionan una prueba directa de la actividad fijadora. El empleo del $^{15}\text{N}_2$ proporciona una evidencia positiva de la fijación (Burris y Wilson, 1957); y es alrededor de cien veces más sensible que el método de Kjeldahl, si bien tiene limitaciones debido al -- gran costo del isótopo $^{15}\text{N}_2$ y el uso del espectrómetro de masas. Este método se ha usado para confirmar la fijación del nitrógeno por los nódulos de las raíces (Aprison y Burris, 1952) y para estudiar la asimilación del nitrógeno fijado (Zelitch et al. 1952; Bergersen, 1965).

El método de la reducción del acetileno es rápido, simple, relativamente barato y más de mil veces más sensible que el método del $^{15}\text{N}_2$ (Stewart et al. 1967; Hardy et al. 1968). -- Schollhorn y Burris (1966) y Dilworth (1966), independientemente, observaron la inhibición de la fijación del nitrógeno en extractos de *C. pasteurianum* por el acetileno. Schollhorn y Burris (1967), establecieron la naturaleza competitiva de esta inhibición y Dilworth encontró que el acetileno era reducido a etileno en una reacción análoga a la reducción del N_2 a NH_3 . -- Hardy y Knight (1967) propusieron la aplicación de esta reacción como un procedimiento de ensayo muy sensible para la medi

da de la actividad fijadora del nitrógeno, utilizando cromatografía gaseosa.

La nitrogenasa presenta una amplia inespecificidad de -- substrato, catalizando la reducción de numerosos compuestos -- que contienen triples enlaces, además del N_2 a NH_3 (Hardy y -- Burns, 1968; Hardy y Knight, Jr. 1968; Hardy et al. 1971). Estos compuestos incluyen:

$N_2O \rightarrow N_2 + H_2O$. Hardy y Knight, Jr. (1966); Hoch et al. (1960).

$N_3 \rightarrow N_2 + NH_3$. Hardy y Knight, Jr. (1967); Schollhorn y Burris. (1966).

$C_2H_2 \rightarrow C_2H_4$. Dilworth (1966); Koch y Evans (1966); Schollhorn y Burris (1966); Hardy y Knight, Jr. (1967); Sloger y Silver (1967); Sprent (1969; Bergersen (1970) y Posgate (1967).

$RCCH \rightarrow RCHCH_2$. Hardy y Jackson (1967).

$HCN \rightarrow CH_4 + NH_3$. Hardy y Jackson (1967); Hardy y Knight (1967) y Kelly et al. (1967).

$RCN \rightarrow RCH_3 + NH_3$. Hardy y Jackson (1967).

$RNC \rightarrow CH_4 + C_2H_4 + C_2H_6 + C_3H_8 - \text{etc.}$ Hardy y Jackson (1967) y Kelly et al. (1967).

El H^+ es también reducido a H_2 en ausencia de otros aceptores de electrones. De estos substratos, el más utilizado, como ya se ha dicho, para medir la actividad de la nitrogenasa es el de la reducción del acetileno (C_2H_2) a etileno (C_2H_4) a etileno (C_2H_4), (Hardy et al. 1968). Puesto que el acetileno no es el substrato fisiológico específico de la nitrogenasa, -

el método proporciona una estimación indirecta de la cantidad de nitrógeno fijado. La reducción del N_2 a NH_3 requiere seis electrones, mientras que la reducción del acetileno a etileno requiere dos electrones; así, la reducción del acetileno ocurre tres veces más rápida que la reducción del nitrógeno, suponiendo que la tasa de energía y consumo de electrones son los mismos para ambos procesos.

La confianza en los ensayos de reducción del acetileno para medida de la actividad de la nitrogenasa descansa sobre las investigaciones biológicas y bioquímicas llevadas a cabo y que muestran que la presencia de una actividad siempre indica la presencia de otra (Hardy et al. 1968). Todas las evidencias bioquímicas indican idénticos requerimientos para la reducción de ambos compuestos.

El nitrógeno y el acetileno son inhibidores competitivos, lo que indica un sitio activo idéntico para su reducción (Hardy y Burns, 1968).

La reducción del acetileno ha sido usada por numerosos investigadores para investigar la distribución y contribución de los organismos fijadores en la naturaleza, ya que esta sensible técnica ha sustituido a la sencilla práctica de la observación del crecimiento microbiano en medios carentes de nitrógeno. Estos ensayos han demostrado la ausencia de fijación en organismos superiores y se cree que la fijación sólo ocurre en organismos procarióticos.

Control de la nitrogenasa.

Se ejerce a través de los genes nif (de nitrogen fixation)

que son los genes estructurales que determinan la habilidad de un microorganismo para fijar nitrógeno. Todas las bacterias fijadoras de nitrógeno sólo lo fijan cuando son incapaces de obtener suficiente nitrógeno de otra fuente (Brill, 1973). Fuentes de nitrógeno fácilmente aprovechables tales como urea o amoníaco reprimen completamente la formación de nitrogenasa, mientras que otras fuentes que no son tan efectivas, tales como nitrato, aspartato, glutamato, asparragina y glutamina sólo la reprimen parcialmente (Wilson et al. 1943; Parejko y Wilson, 1970). Esto sugiere que el agotamiento de los pools de NH_4^+ o compuestos nitrogenados relacionados con el metabolismo del NH_4^+ provocan que ambos componentes del enzima sean sintetizados (Brill, 1976).

Antes de iniciarse la síntesis de nitrogenasa, se presenta una fase de retraso, después de la eliminación del amonio en el medio donde crecen estos microorganismos, (Goerz y Pengra, 1961); Mahl y Wilson, 1968; Witz et al. (1967).

La síntesis de la nitrogenasa bajo un gas inerte, así como el descubrimiento de la síntesis del enzima en vacío después de la eliminación del amonio limitante, permitió a Parejko y Wilson (1970), concluir que la síntesis de nitrogenasa es un fenómeno de desrepresión y no de inducción. Shah et al. (1972) mostraron que los componentes I y II de la nitrogenasa de *A. vinelandii* eran coordinadamente sintetizados durante la desrepresión y coordinadamente perdidos durante la represión del enzima; así, los genes estructurales nif son aparentemente regulados de manera coordinada en este organismo.

Gordon y Brill (1972) aislaron mutantes revertientes de

A. vinelandii nif⁻ las cuales habian perdido la actividad de los componentes I y II. Algunos revertientes producían nitrogenasa constitutivamente y eran insensibles al amonio. Esta observación sugiere que los genes estructurales para la síntesis de la nitrogenasa son controlados por un gen regulador común.

El locus que lleva a cabo la represión por amonio ha sido mostrado por Tubb y Posgate (1973); se tomaron muestras de un cultivo continuo en condiciones reprimidas, las cuales se desreprimieron y se trataron con rifampicina (inhibidor de la iniciación de la síntesis de ARN) y cloranfenicol (inhibe la síntesis de proteínas). Así se puede separar la traducción de la transcripción durante la derrepresión. De esta manera se concluyó que la represión por amonio ocurre a nivel de la transcripción.

Lugar de la fijación.

Los nódulos han sido considerados historicamente el lugar donde se lleva a cabo la fijación porque sólo las plantas noduladas podían asimilar el nitrógeno atmosférico. Este hecho fué confirmado por Aprison et al. (1954), usando la técnica del $^{15}\text{N}_2$ para determinar la distribución del isótopo radiactivo en los componentes del nódulo después de la exposición al $^{15}\text{N}_2$. El lugar de la fijación dentro del nódulo permaneció indefinido hasta que Kennedy (1965) y Kennedy et al. (1966) encontraron que la mayor concentración del isótopo era retenida en los bacteroides y no en la membrana que los envuelve. Posteriormente Bergersen y Evans, independientemente, prepararon componentes activos de los nódulos. Originalmente, Bergersen -

(1966) informó que el homogeneizado de nódulos de soja preparados anaeróbicamente en una solución tamponada de sacarosa fijaba nitrógeno sólo si el oxígeno estaba presente durante la incubación. Después de estabilizar la actividad fijadora, Bergersen y Turner (1967) aislaron bacteroides del homogeneizado y encontraron que ellos podían fijar nitrógeno.

Evans y colaboradores (Koch et al. 1967) informaron sobre un método para la preparación del homogenizado nodular de alta actividad y extractos libres de células de los bacteroides, encontrando que estos extractos contienen nitrogenasa.

Fijación de nitrógeno por *Rhizobium* en vida libre.

La incapacidad de las bacterias pertenecientes al género *Rhizobium* para fijar el nitrógeno en vida libre, esto es, la necesidad de la íntima asociación bacteria-planta para que el proceso ocurra, ha inducido a distintos autores a sugerir que la leguminosa aporta importante información genética en la simbiosis *Rhizobium*-*Leguminosa*. Así, la planta podía contribuir genéticamente a la producción de nitrogenasa en los bacteroides (Evans y Russell, 1971), además de a la formación de la leghemoglobina (Cutting y Schulman, 1969; Dilworth, 1969; Cutting y Schulman 1971), siendo por tanto necesaria la complementación de los dos genomas implicados (Denarié y Truchet, 1974), o que los genes nif fueran activados de alguna manera por la planta (Dilworth y Parker, 1969), para la expresión fenotípica del carácter fijador del nitrógeno.

Recientemente, una serie de evidencias se han ido acumulando para sostener la teoría contraria, esto es, que los *Rhizobium* poseen los genes nif necesarios para la fijación, pero

que estarían reprimidos cuando las células se hallan en vida libre.

Los primeros intentos para obtener *Rhizobium* fijadores en vida libre en condiciones de cultivo controlados (Bergersen 1971) o por mutación (Phillips et al. 1973) no tuvieron éxito, aunque en condiciones anaerobias y con nitrato como receptor final de electrones, el *R. japonicum*, producía modelos citocrómicos similares a los de los bacteroides (Daniel y Aplebby, - 1972).

Las primeras evidencias arrancan de los trabajos del grupo de Evans, quienes mostraron que el *R. japonicum*, creciendo en cultivos normales de laboratorio y en ausencia de la planta, posee no sólo el factor transportador de electrones asociado con la nitrogenasa de los bacteroides (Phillips et al. 1973), sino también una proteína Fe-Mo inmunológicamente similar a la proteína Fe-Mo de la nitrogenasa (Bishop et al. 1975).

Phillips et al. (1973) emprendieron la ardua tarea de -- comparar la composición en aminoácidos de las proteínas Fe-Mo de diversas asociaciones *Rhizobium-Leguminosa* y han llegado a la conclusión de que la bacteria transporta la información necesaria para la síntesis de las proteínas Fe-Mo y es posible -- por tanto que transporte un completo sistema nif.

Por otra parte, Dunican y Tierney (1974) sugieren que la capacidad para fijar nitrógeno está presente en *R. trifolii* -- aunque no se manifiesta fenotípicamente a menos que sea transferida a un huésped adecuado. Estos autores, Dunican y Tierney, 1974; Dunican et al. 1974) realizan la transferencia de *R. trifolii* a *Klebsiella aerógenes*, no fijador natural del nitrógeno.

Esta transferencia fue mediatizada por un factor R adecuado (el factor desreprimido R1-19drd) y los híbridos de *K. aerogenes nif+* obtenidos fueron capaces de reducir el acetileno. El crecimiento de estos híbridos en un medio con nitrógeno combinado o bajo condiciones aeróbicas, reprimen la producción de nitrogenasa, indicando que los genes reguladores han sido también transferidos. Sin embargo, otra hipótesis posible, que el material transferido de *Rhizobium* active ciertos genes *nif* latentes en *Klebsiella* no ha sido todavía probada. El hecho de que los genes *nif* en los híbridos sean reprimidos por amonio, indicaría que en *Rhizobium* se encuentra presente la información para la síntesis de nitrogenasa, pero según especulaciones de Tubb (1974), estos microorganismos en vida libre no sintetizan este enzima porque la glutamina sintetasa en *Rhizobium* es incapaz de activar la transcripción del ADN correspondiente al operón *nif* por la ARN polimerasa. La nitrogenasa, por el contrario sería sintetizada en los nódulos de las raíces de las leguminosas, bien porque la planta suministra un adecuado sistema para la transcripción del operón *nif*, o bien porque ocurren cambios en la ARN polimerasa durante el establecimiento de la simbiosis de manera que los genes pueden ser transcritos sin necesidad de la activación por la glutamina sintetasa.

Los conocimientos sobre el tema, sin embargo, han experimentado un progreso evidente merced a las experiencias de fijación de nitrógeno en asociaciones de *Rhizobium* con cultivos de tejidos de leguminosas. Esto ha sido demostrado por Holsten et al. (1971) y Child et al. (1973) y posteriormente confirmado por Phillips, (1974) y Child y La Rue (1974), en asociaciones *in vitro* de *Rhizobium* en cultivos celulares de tejidos de soja.

La inducción de la nitrogenasa en *Rhizobium* no se restringe a exudados radicales de leguminosas, sino que puede extenderse a no leguminosas, tales como *Brassica napus*, *Bromus inermis*, *Triticum monococum* (Child, 1975) y *Nicotiana tabacum* ---- (Scowcroft y Gibson, 1975). En estos casos, la actividad de la nitrogenasa fue mostrada mediante la reducción del acetileno a etileno y confirmada por la incorporación del $^{15}\text{N}_2$ en la asociación *tabaco-Rhizobium sp.* (grupo "cowpea", raza 32H1). Una evidencia de que el factor o factores que inducen la síntesis de nitrogenasa son difusibles, fue obtenida también por Scowcroft y Gibson (1975) cuando el *Rhizobium sp.* 32H1 creció adyacente, pero separado de las células de tabaco cultivadas sobre una superficie de agar.

La mayoría de estos estudios se han realizado con *R. japonicum* y con una raza afín a esta especie perteneciente al grupo "cowpea", que pudieran presentar características especiales; de hecho, Bishop et al. (1975) han descrito que estos microorganismos pueden sintetizar la proteína Fe-Mo en presencia de NO_3 y NH_4^+ , propiedad que no parece haberse encontrado todavía en otras especies de *Rhizobium*, de las que no se tienen referencias de los intentos llevados a cabo, excepto en *R. leguminosarum* (Kurz y La Rue, 1975), no conociéndose por tanto, si es que no se ha hecho o no se han conseguido resultados positivos.

De cualquier manera, por las experiencias realizadas se puede pensar que estas bacterias no fijan el nitrógeno en vida libre por la existencia de un represor de la síntesis o inactivador del funcionamiento de la nitrogenasa, además del amonio o más generalmente del nitrógeno combinado como ya hemos dicho.

El exudado radical ha sido sustituido con éxito por un ácido dicarboxílico y una pentosa en las experiencias realizadas por Pagan et al. (1975), Kurz y La Rue (1975) y McComb et al. (1975), usando medios definidos, tanto líquidos como sólidos, sin el concurso de material procedente de la planta. En estos casos es además necesaria la presencia de cierta cantidad de amonio, sin que reprima la nitrogenasa, así como unas adecuadas presiones de oxígeno para una buena función reductora (Keister y Evans, 1976).

Tjepkema y Evans (1975) y Keister (1975), confirman la existencia de actividad nitrogenasa usando medios definidos, obteniéndose tasas de fijación comparables a las obtenidas en los nódulos que forman las bacterias cuando infectan su leguminosa específica, considerados hasta ahora los únicos lugares activos para la fijación. Concluyen estos autores que la fijación del nitrógeno por *Rhizobium* en vida libre parece no necesitar requerimientos especiales, excepto condiciones microaerófilas y quizás la presencia de un ácido dicarboxílico.

Por el interés que suponen, podemos citar los trabajos más recientes e interesantes relativos a este tema: Gibson et al. (1976); Evans y Keister, (1976), donde se examinan las condiciones nutritivas, fisiológicas y físicas que afectan a la actividad de la nitrogenasa de *Rhizobium sp.* "cowpea" y Finan y Dunican (1977) donde se propone una técnica de crecimiento en agar semisólido que ofrece un método reproducible para valorar in vitro la actividad nitrogenasa en *R. japonicum*.

Si los estudios bioquímicos sobre la fijación de nitrógeno no han llegado a estar bien establecidos en la pasada década y aunque se trabaja intensamente en los aspectos que hemos repa-

sado, sólo en los últimos años ha sido posible aplicar los métodos genéticos acerca de la fijación biológica. Aunque se ha estudiado mucho el microsimbionte-*Rhizobium*, debido a la complejidad del sistema, los estudios genéticos, hasta ahora, han quedado reducidos al nivel fenotípico. El reciente desarrollo de los métodos de transferencia de genes relacionados con la fijación en organismos libres (no simbioses) y de los mutantes nitrogenasa defectivos han facilitado esta aproximación genética. Para una mayor comprensión de los datos acerca de la genética de la fijación de nitrógeno es necesario conocer los trabajos de Brill, (1974) y Schwinghamer, (1974).

Mutantes Nif.

Estos son los mutantes deficientes en el enzima nitrogenasa, aunque indudablemente muchas otras mutaciones conducen a un fenotipo nif⁻.

Los primeros mutantes nif caracterizados a nivel bioquímico, lo fueron de *A. vinelandii* (Fisher y Brill, 1969; Sorger y Troffimekoff, 1970). Más tarde los fueron de *K. pneumoniae*, (Streicher et al. 1971; Dixon y Posgate, 1971) y *C. pasteurianum* (Simon y Brill, 1971). La técnica de aislamiento de estos mutantes implica mutagénesis seguida generalmente de enriquecimiento en presencia de penicilina. Los mutantes pueden ser seleccionados por su pequeño tamaño de colonia comparado con el tipo salvaje sobre un medio libre de amonio. Shah et al. (1973) han caracterizado bioquímicamente una serie de mutantes nif de *A. vinelandii* examinando reacciones cruzadas con nitrogenasa purificada del tipo salvaje y serológicamente usando antisuero de sus componentes. Se pueden detectar así la ausencia de los

componentes I y II o de ambos a la vez.

El estudio de los mutantes nif en el sistema *Rhizobium-Leguminosa*, implica el uso de tests de infección y efectividad de plantas y hasta la fecha no ha sido posible determinar si - las razas de *Rhizobium* con actividad simbiótica alterada tiene mutaciones específicas en los genes nif.

Transferencia de genes en *Rhizobium*.

La transferencia genética ha sido motivo de estudio desde los trabajos de Balassa (1956, 1960, 1963), aunque ya ---- Klezcloswka et al. (1944) habían observado que parecía darse en tre especies de *Rhizobium* intercambio de su especificidad, unos años antes del descubrimiento de la conjugación por Lederberg y Tatum en 1946.

Transformación

En *Rhizobium* han sido descritas transformaciones interes intraespecíficas. Citando a Denarié y Trüchet ; (1974) más de cincuenta publicaciones habían sido dedicadas hasta entonces, a transformación en *Rhizobium* bajo distintos aspectos: - Transferencia de marcadores genéticos, tales como resistencia a antibióticos o requerimientos nutritivos y a transferencia - de los caracteres simbióticos, tales como especificidad e infectividad. Cabe destacar entre las experiencias realizadas -- además de las ya citadas de Balassa, las de Lange y Alexandre (1961); Zelazna (1964); Klezcloswka (1965); Gadre et al. -- (1967); Mareckova (1969); Kern (1969); Raina y Modi (1969, -- 1971, 1972); Zelazna-Kowalka y Lorkiewicz (1971); Modi (1973);

Doctor y Modi (1976). Sin embargo, los resultados obtenidos son a menudo contradictorios. La baja reproducibilidad puede ser debida a la falta de conocimientos de los factores que controlan la competencia en *Rhizobium*.

En recientes trabajos se ha descrito la transformación en *R. trifolii* por ADN de *Pseudomonas aeruginosa* (Dunican y Tierney, 1973) y de *Escherichia coli* (O'Gara y Dunican, 1973) con una frecuencia relativamente alta. Sin embargo, muchos estudios sobre la transformación de los caracteres simbióticos no son convincentes sin el uso de marcadores apropiados (Schwinghamer, 1974).

Transducción

Aunque la lisogenia está bien extendida en *Rhizobium*, la transducción, hasta ahora sólo ha sido demostrada en *R. meliloti* (Kowalki, 1967; Kowalski y Denarié, 1973) y en *R. lupini* (Heuman et al. 1974).

Kowalski (1970) analizó 21 fagos moderados y encontró que doce eran capaces de transducir la resistencia a la estreptomina con una frecuencia de 10^{-5} - 10^{-7} . Igualmente, Kowalski (1970) encontró que algunas mutantes auxotrofas, pueden ser traducidas a prototrofas, aunque no se recupera la efectividad.

Kowalski y Denarié (1972), han demostrado que la efectividad está relacionada con la dependencia de la leucina, puesto que mutantes leu^{-} , cuando son transducidas a prototrofas recuperan la efectividad. La transducción restringida, (concretamente de la dependencia de la cisteína) también ha sido demostrada en *R. meliloti* (Sik y Orosz, 1971).

Conjugación

La conjugación ha sido descrita por numerosos autores. La primera información sobre la conjugación y más concretamente sobre transferencia de alguna característica simbiótica parece deberse a Higashi (1967), quién mostró la transferencia de infectividad entre *R. trifolii* y *R. phaseoli*.

Heuman (1968), Heuman et al. (1971) han estudiado extensivamente la conjugación en *R. lupini*. Lorkiewicz et al. (1971) cruzaron varias mutantes auxotrofas de *R. trifolii* y en algunos casos obtuvieron evidencia de conjugación en este organismo, así como Kaushik y Venkataramán, (1972).

Bose y Venkataramán (1969) informaron sobre la existencia de conjugación en *R. leguminosarum* usando marcadores de resistencia a las drogas; sin embargo, la frecuencia de conjugación obtenida fue muy baja y pudiera ser debida a una mutación espontánea o resultado de la complementación nutricional sobre las placas selectivas (Beringer, 1972).

Heuman et al. (1971 y 1973), trabajando con *R. lupini* en estudios de conjugación con más de seiscientas mutantes auxotrofas, caracterizadas por su pigmentación carotenoide, observaron que el cruce en estas bacterias es generalmente isosexual; cada célula puede actuar como donadora o receptora. Puhler (1971) demostró que el estado fisiológico de cada una de las células implicadas en el cruce, determina su comportamiento. La actividad receptora se desarrolla sólo durante la fase logarítmica de crecimiento, mientras que las células en fase estacionaria, actúan como donadoras. Esta característica no descrita todavía para otras especies del género *Rhizobium* di-

ficulta el correcto análisis genético en experiencias de transferencia. Para conseguir la conjugación en un sólo sentido ha sido necesario obtener células genéticamente femeninas. Los métodos utilizados son ampliamente expuestos por los autores antes citados en sus trabajos más recientes (Jessberger et al. -- 1974; Puhler et al. 1974 y Schofl et al. 1974).

Las experiencias de transferencia genética han permitido la formación de mapas genéticos los cuales han sido publicados para *R. lupini* (Heuman et al. 1973) *R. trifolii* (Al-Ani, 1972), *R. leguminosarum* (Beringer y Hopwood, 1976) y *R. melilotii* (Meade y Signer, 1976).

En la mayoría de los sistemas de conjugación la habilidad del donador es una propiedad de las razas que transportan factores sexuales como F en *E. coli* (Lederberg et al. 1952) FP2 en *P. aeruginosa* (Holloway, 1969) y SCP1 en *Streptomyces coelicolor* (Vivian; 1971). Por lo tanto en ausencia de una raza donadora conocida, la transferencia de genes puede ser detectada si sólo uno de los padres en el cruce transporta un factor sexual y si las condiciones de mezcla son adecuadas para ello.

La transferencia de plásmidos entre miembros de las Enterobacteriáceas y géneros de otras familias han sido descritos a menudo; Sykes y Richmond (1970), Fullbrook et al. (1970), Datta et al. (1971), Olsen y Shipley (1973) y hasta hoy se han hecho con factores R de la clase de compatibilidad P. Estos factores R fueron originalmente observados en razas de *P. aeruginosa* que mostraban alta resistencia a la carbenicilina y que se ha comprobado son transmisibles a *E. coli* (Sykes y Richmond, 1970) en cuyo cromosoma pueden integrarse así como en otros plásmidos de

otra clase de compatibilidad (Datta et al. 1971; Hedges y Jacob, 1974; Beringer, 1974), siendo su capacidad de ser transmitidos a un amplio rango de bacterias su mejor propiedad, ya que han proporcionado un excelente y simple método para demostrar la existencia de conjugación.

La propiedad de los plásmidos de la clase de compatibilidad P de integrarse en el cromosoma de diversas células receptoras se debe a una secuencia de ADN que se puede translocar y -- que ha sido llamada Transposón A (TnA) (Hedges y Jacob, 1974; Heffron et al. 1975) y semeja las secuencias de inserción de -- *E. coli*; las secuencias TnA podrían insertarse en el cromosoma -- como resultado de una activación de genes, dando lugar a fuertes mutaciones polares (Heffron et al. 1975).

Los factores R del grupo P mediatizan la transferencia -- del cromosoma en *P. aeruginosa* (Stanisich y Holloway, 1971; Haas y Holloway, 1976), en *E. coli* (Unger et al. 1975) y en *Acinetobacter* (Towner y Vivian, 1976), pero no había sido descrita hasta ahora la transferencia cromosómica por estos plásmidos en -- otros géneros bacterianos.

Muchos intentos se han realizado para introducir diversos factores sexuales en *Rhizobium* para promover la conjugación; -- factores I o FP2 o F no son transferibles por conjugación en la mayoría de los *Rhizobium*, aunque los factores R del grupo de -- compatibilidad P, tal como el factor RP4 pueden ser transferidos a esta bacteria desde *E. coli*, concretamente a *R. trifolii* y *R. meliloti* (Datta y Hedges, 1972) y *R. leguminosarum* (Beringer, -- 1974). El factor RP4 que confiere resistencia a la tetraciclina, kanamicina, neomicina y carbenicilina, es autotransmisible (Datta

et al. 1971) y ha sido transferido entre razas de *Rhizobium*: *R. leguminosarum* (Beringer, 1973, 1974 y 1976), *R. lupini* (Puhler et al. 1972) y *R. meliloti* (Meade y Signer, 1977).

El uso de los factores R ha permitido no sólo la demostración de la existencia de conjugación en *Rhizobium*, sino que Beringer y Hopwood (1976) en *R. leguminosarum* y Meade y Signer (1977) y Kondosori et al. (1977), en *R. meliloti*, han mostrado la transferencia de marcadores cromosómicos entre razas de *Rhizobium*, lo que ha servido además para demostrar que estos *Rhizobium* poseen un único cromosoma circular por mapeo de razas auxotrofas y mutantes resistentes a diversos antibióticos. Johnston y Beringer (1977) han encontrado que *R. leguminosarum* y *R. phaseoli* pueden intercambiar genes cromosómicos y que estas especies parecen estar estrechamente relacionadas.

Estos factores han permitido igualmente demostrar que en *Agrobacterium tumefaciens* la virulencia no sólo va asociada a un plásmido de elevado peso molecular (plásmido TI) (Zaenen et al. 1974) y que concretamente el factor RP4 incrementa dramáticamente su transferencia (Chilton et al. 1976), sino que Hooykaas et al. (1977) han conseguido la transferencia de TI a *Agrobacterium* no virulentos y a *Rhizobium*, sugiriéndose que todos los genes necesarios para la inducción de los tumores celulares, que estas agrobacterias provocan en numerosas monocotiledóneas, van localizados sobre TI, al que se le ha supuesto una estructura - TnA (Schell, 1977).

La demostración de que en *Rhizobium* se puede transferir factores R por conjugación, junto con la observación de Cole y Elkan (1972), de que algunos *Rhizobium* transportan factores R autotransmisibles, sugiere que esta bacteria, como otras

muchas Gram negativas, han desarrollado la habilidad de transferir información genética por conjugación.

Tranferencia de genes *nif* en *Rhizobium*.

Los métodos de transferencia de los genes *nif* han sido desarrollados recientemente en bacterias fijadoras de nitrógeno en vida libre.

En *K. pneumoniae* los genes *nif* parecen estar ligados al operón de la histidina (Streicher et al. 1971; Dixon y Posgate, 1971). La mayoría de las mutaciones *nif* son del 30-80% cotransducibles con *his* sobre el cromosoma de *Klebsiella* (Streicher et al. 1972).

Los genes *nif* han sido transferidos de *K. pneumoniae* a *E. coli C* (Dixon y Posgate, 1971 y 1972; Dunican et al. 1974; Dunican y Tierney, 1974). El *E. coli C* se ha elegido como recipiente porque es una raza naturalmente no restrictiva y no modificativa con respecto a los tipos de especificidad conocidos (Arber y Lynn, 1969). Los híbridos *nif*⁺ obtenidos fueron identificados bioquímica y serológicamente como *E. coli C*. Al permancer los genes *nif* suceptibles a la represión por el NH_4^+ en *E. coli*, indicaba que han sido transferidos tanto los genes estructurales como los reguladores y apoya la hipótesis de un operón *nif* (Dixon y Cannon, 1976). En los híbridos obtenidos, los genes *nif* o estaban integrados en el cromosoma (Cannon, et al. 1974a) o bien localizados sobre plásmidos, (Cannon et al. 1974b); pero estos plásmidos, -- aunque eran movilizados por factores R no eran autotransmisibles. Plásmidos que contuvieran genes *nif* y actuaran como factores sexuales, facilitarían la transferencia genética de *nif*. Un informe preliminar de la construcción de tal plásmido F' fue hecho por Dixon,

pero un plásmido de la clase de compatibilidad P que transporta rá los genes nif tiene muchas más ventajas que un factor F'-nif para los estudios genéticos de fijación, ya que se transfieren a alta frecuencia en mezclas sobre agar, aunque a baja frecuencia en medios líquidos (Cannon et al. 1976) y retienen la transferilidad.

Cannon et al. (1976) describen la construcción de un factor de este tipo a partir de la interacción del plásmido -- FN68 (factor F' aislado por estos autores, que transporta los genes nif y la región his del cromosoma de *K. pneumoniae* además de una secuencia TnA translocada desde el plásmido R68, aislado por Holloway y Richmond en 1973, que confiere resistencia a la tetraciclina, kanamicina y carbenicilina y que pertenece a la clase de compatibilidad P) y del plásmido RP4, que posee también una secuencia TnA. Esta interacción resulta en la formación de un recombinante que tiene las propiedades de la clase de compatibilidad P y transporta la región nif-his del cromosoma de *K. pneumoniae*. A este plásmido se la llamó RP41. Dixon et al. (1976) sugieren que este plásmido recombinante RP4-nif, ocurriría como consecuencia de la interacción entre los dos secuencias traslocadas que van en ambos plásmidos y que son las que determinan la resistencia a la carbenicilina. Estos autores y Cannon y Posgate (1976) describen la transferencia y funcionamiento de estos genes en diversas bacterias, tales como *K. pneumoniae*, -- *Agrobacterium tumefaciens*, *R. meliloti* y *A. vinelandii*. Cannon y Posgate (1976) probaron que el plásmido transferido a *A. vine*landii podía superar mutaciones ocurridas en los componentes I o II o ambos de la nitrogenasa, proporcionando así un modelo para el estudio de los genes que determinan la capacidad de fijar

nitrógeno. Los experimentos sobre la transferencia y expresión de los genes nif de *Klebsiella* en un amplio margen de organismos fijadores y no fijadores ayudarían a responder a algunas - de las más simples preguntas que podrían plantearse acerca de la posibilidad de realizar amplias transferencias intergénicas de los genes nif.

En este aspecto, la observación de que la transferencia de RP41 a *P. aeruginosa* no ocurre es ligeramente descorazonadora, puesto que el plásmido RP4 fue aislado en este organismo y un derivado de él, que transporta el operón his de *E. coli* producido por Olsen y Gonzalez (1974), es a la vez transmisible y estable en *P. aeruginosa*, pero indicaría que en RP41 - el rango de huésped ha sido modificado.

Por otra parte, Cannon (1977) ha informado que tanto FN68 como RP41, aunque son adecuadas herramientas genéticas, su gran tamaño y bajo número de copias por célula los hace inadecuados para los experimentos que requieren aislamiento a -- gran escala de ADN-nif purificado. Cannon et al. (1977) han -- construido in vitro tres pequeños plásmidos amplificables que - transpostan ADN de RP41, el cual incluye genes nif e his.

Control genético en *Rhizobium* de las características simbióticas.

No se ha desarrollado todavía ningún método para estudiar genéticamente cómo pasan estas bacterias por las distintas etapas que se requieren para llegar a formar los bacteroides.

Dunican y Cannon (1971) propusieron que el material genético en *Rhizobium* responsable de la expresión de ciertas propiedades relacionadas con la efectividad se encontraba en ADN -

extracromosómico. Cannon (1972) mostró que la exposición de razas de *R. trifolii* a agentes eliminadores de plásmidos, tales como el naranja de acridina, resultaba en una pérdida de efectividad en los cultivos, paralela a la adquisición de resistencia a la viómicina.

Ya unos años antes Higashi (1967) sugirió que la infectividad en *Rhizobium* parece estar ligada a un factor episómico por la pérdida de tal característica como consecuencia del tratamiento con naranja de acridina. Así mismo, Zurkowski et al. (1973) informan sobre la pérdida de infectividad en *R. trifolii*, por el tratamiento con acriflavina y sodio dodecil sulfato.

Hay que tener en cuenta que la interpretación de los datos obtenidos con agentes eliminadores de plásmidos son siempre difíciles, ya que el único plásmido que se cura eficientemente es el F'-lac.Fe I, como los factores R, no son curados por las acridinas (Salisbury et al. 1972).

Palomares et al. (1977) en un reciente estudio aportan con firme base datos suficientes, entre ellos la detección biofísica, para creer que la inducción por *Rhizobium* de la producción de poligalacturonasa por las células radicales de las leguminosas se deriva de la presencia de ADN extracromosómico. Esto podría confirmar los hallazgos de los autores citados anteriormente y la importancia de la inducción de la producción de poligalacturonasa en la infección de los pelos radicales por *Rhizobium* sugerida por Fahraeus y Ljunggren (1959).

El aislamiento de ADN cromosómico mediante centrifugación en gradiente de densidad de lisados aclarados de células (Tshitenge et al. 1975; Luyindula et al. 1975; Dunican et al. -

1975) ha sido posible recientemente, pero sólo Tshitenge et al. (1975), Nutti et al. (1977) y Palomares et al. (1977) han dado una estimación de su peso molecular, no coincidiendo en el valor encontrado por cada grupo que oscila entre los $5,9 \cdot 10^6$ daltons, dado por Palomares et al. a más de $2 \cdot 10^8$ del plásmido de gran tamaño encontrado por Nutti y colaboradores, y cuya presencia correlacionan con la infectividad mientras que los estudios previos realizados por Olivares et al. (1977) indican que la infectividad en *R. meliloti* no depende de la presencia del plásmido detectado, aunque recientemente se ha visto que puede modificar su virulencia (comunicación personal).

Las experiencias de transferencia de genes en *Rhizobium* ofrecen la posibilidad de determinar si el operón nif está localizado en el cromosoma o en un plásmido. De los resultados obtenidos por Dunican et al. (1976), se deduce que el operón nif está localizado en un plásmido y que los factores R podrían movilizar este plásmido de *R. trifolii* a *K. aerógenes*, suponiendo -- una asociación plásmido-plásmido en *R. trifolii*. Dos mecanismos, plásmidos agrupados y plásmidos cointegrados, se han sugerido -- para explicar la movilización de un plásmido por otro (Milliken y Clowes, 1973). El mecanismo de plásmidos agrupados parece ser aquí apropiado, ya que la evidencia sugiere que los dos plásmidos no constituirían una única estructura molecular, sino que -- ambos plásmidos pueden sufrir recombinación, pero permanecerían suavemente conectados.

La transferencia de RP41 a *R. meliloti* ocurre a baja frecuencia, lo cual no es sorprendente, ya que *R. meliloti* posee los genes nif, los cuales no se expresan en las condiciones usadas, pero sí lo hacen en los nódulos de las raíces de las le

guminosas. Sería interesante observar si el sistema nif de *K. pneumoniae* se puede expresar en *R. meliloti* en condiciones simbióticas o en las condiciones desarrolladas para la expresión de la nitrogenasa en ciertos *Rhizobium* en vida libre, ya que -- sin duda alguna, el objetivo de los estudios genéticos es la -- transferencia de los genes nif a plantas superiores; el ADN bacteriano puede ser mantenido y transferido en plantas superiores (Stronn y Anker, 1971) y algunos genes bacterianos pueden ser expresados en plantas durante varias generaciones (Ledoux et al. 1971; Ledoux et al. 1972).

A pesar de los frecuentes intentos realizados, hasta recientemente, no ha sido posible detectar la fijación de nitrógeno por *Rhizobium* cuando crece en vida libre. Toda la investigación desarrollada sobre esta característica simbiótica era llevada a cabo en la íntima asociación establecida entre la bacteria y la leguminosa en los nódulos de sus raíces. Como se indica en la Introducción, se suponía imprescindible la función conjunta de los dos genomas implicados. Los progresos conseguidos en el estudio de la fijación libre, en sus aspectos bioquímico y genético, comparados con los menos avanzados alcanzados en la investigación de la fijación por *Rhizobium*, se ha debido, sin duda, a la ausencia del "handicap" que supone en este caso la utilización del complejo sistema bacteria-planta.

Hoy día está bien establecido que ciertas razas de *Rhizobium* poseen la propiedad de fijar nitrógeno asimbióticamente, demostrándose que la nitrogenasa manifiesta su actividad enzimáti-

ca cuando las bacterias crecen en medios definidos. Las experiencias han sido realizadas, en la mayoría de los casos, sobre *Rhizobium* del grupo "cowpea", principalmente la raza 32H1, y *R. japonicum*, ambos de lento crecimiento. Pudiera ser que las condiciones ensayadas fueran esencialmente semejantes a las que se dan en el nódulo o bien que estas bacterias manifieste un comportamiento distinto a las otras especies del género.

El primer OBJETO de estudio de este trabajo ha sido conocer la posibilidad de que la fijación libre de nitrógeno pudiera darse también en otras especies de *Rhizobium*, distintas a las que han sido descritas y concretamente *R. meliloti*, especie con la que se ha venido, desde hace tiempo, trabajando en la Sección de Microbiología de la Estación Experimental del Zaidín, y que pertenece al grupo de las de rápido crecimiento. La idea primitiva era llegar a conocer qué factor podía existir en la planta que explicara el mecanismo por el que la fijación se da con mayor eficacia en la asociación simbiótica. Sin embargo, dificultades técnicas, surgidas de la actividad nitrogenasa por reducción del acetileno, ha impedido llegar al final de este primer objetivo propuesto.

Mientras que la producción media de grano se ha incrementado un 3 por ciento anual durante los últimos 25 años, la cantidad total de nitrógeno fijado biológicamente ha permanecido constante. Las leguminosas no son extensivamente cultivadas por ser económicamente menos rentables que los cereales y, a pesar de los avances que se han conseguido en el conocimiento de la fijación simbiótica de nitrógeno en sus distintos aspectos, parece haberse alcanzado ya el máximo grado de eficacia en las condiciones actuales. Es necesario continuar, por un lado, con la investigación a nivel bioquímico de plantas para superar la limitación de

la provisión de energía y por otro, a nivel genético microbiano para conseguir razas bacterianas óptimamente eficientes desde el punto de vista de su virulencia y de la capacidad de fijar nitrógeno.

En relación con la infectividad, se encontró en este laboratorio la existencia en razas silvestres de *R. meliloti*, de un elemento genético extracromosómico, al que estaba ligada la capacidad de inducir, en las células de las raíces de alfalfa, la producción de enzimas pécticos que parecen jugar un papel importante en la infección de los pelos radicales. Este plásmido, de un peso molecular de 5.9 megadaltons, parece determinar la calidad y cantidad de los polisacáridos extracelulares y como consecuencia el fagotipo de las bacterias correspondientes. La eliminación de este plásmido, por tratamiento con derivados de la --acridina, se manifiesta al mismo tiempo que en una depresión de la capacidad para inducir la producción de poligalacturonasa (por lo que a tal plásmido se le ha llamado "plásmido PG", en la resistencia a determinados fagos que lisan las células silvestres (Corral et al. 1978). Siendo de más simple y fácil detección, ha sido tenido en cuenta este último carácter, para la detección de la presencia de tal plásmido en las diferentes razas estudiadas.

Ahora, una nueva tecnología, la ingeniería genética, permite la acción directa sobre la evolución de las plantas y animales en unas direcciones definidas y a una velocidad nunca conseguidas por selección natural o las técnicas clásicas de cruzamiento. La moderna Agricultura se está viendo afectada por estos avances y cualquier aportación nueva en el campo de la fijación o de las características simbióticas, en el caso de *Rhizobium*, contri

buirá al progreso general para alcanzar, bien una simbiosis efectiva planta-bacteria en la que intervengan no leguminosas, cereales principalmente, bien plantas que por sí mismas lleven a cabo el proceso de fijación.

Aunque la transferencia genética en *Rhizobium* está siendo actualmente estudiada con amplitud merced al empleo de factores R de la clase de compatibilidad P, se tienen escasas referencias cuando intervienen plásmidos naturalmente residentes como el descrito PG. El estudio de la transferencia genética de este plásmido entre razas de *R. meliloti*, entre ésta y otras especies de *Rhizobium* e incluso otros géneros bacterianos, ha sido también OBJETO de este trabajo, para conocer sus propiedades y su posible utilidad en la investigación genética de las características simbióticas de *Rhizobium*.

MATERIAL Y METODOS

Parte General

Microorganismos

Rhizobium meliloti, razas silvestres Rm 2, Rm 11, Rm 203, aisladas de nódulos de raíces de alfalfa en los laboratorios de la Sección de Microbiología de la Estación Experimental del Zaidín y comprobadas su infectividad y efectividad sobre la misma leguminosa.

R. meliloti, razas Rm 4c y Rm 11c, "curadas", obtenidas por tratamiento con naranja de acridina de las silvestres Rm 4 y Rm 11 (Palomares et al. 1977) y que no son lisadas por el fago - AL1 (Corral et al. 1978).

R. meliloti, razas mutantes Rm 11c Str^I, Rm 4c Str^I y Rm 203 UVA-12. Las dos primeras resistentes a la estreptomicina (Str^I) y la tercera, auxotrofa, obtenida mediante tratamiento con luz ultravioleta, cuya frecuencia de reversión a prototrofa es mayor de $4,5 \times 10^{-8}$ y de la que no se han podido conocer los requerimientos nutritivos siguiendo el esquema de Holiday (1956).

E. coli, (Delbrück), proporcionado por el Centro de Distribución de Microorganismos de Lausana.

E. coli, raza K12-J53, RP4, resistente a la kanamicina, ampicilina y tetraciclina, procedente del John Innes Institute, Colney Lane, Norwich, Inglaterra.

R. leguminosarum, raza silvestre GR02, aislada de nódulos de *Vicia faba* L. en los laboratorios de la Sección de Microbiolo-

gía de la Estación Experimental del Zaidín y comprobadas sus propiedades simbióticas sobre *Vicia sativa* L.

R. leguminosarum, raza mutante GR02 Str^r, resistente a la estreptomycinina.

Planta

Medicago sativa L. (alfalfa).

Vicia sativa L. (veza).

Fagos

DF2 y AL1, ambos específicos de *R. meliloti* (razas silvestres). AL1 no es capaz de infectar a las razas curadas. Han sido proporcionados por la Sección de Microbiología de la Facultad de Ciencias de Granada.

Fagos Cl y CH, específicos de *E. coli* K12-J53, RP4, aislados de aguas residuales de Granada.

Medios de cultivo

El medio base utilizado tanto para el aislamiento como para la posterior conservación de las razas de *Rhizobium* en el laboratorio, ha sido el medio 79 de Allen (1951) cuya composición se expone a continuación:

PO ₄ HK ₂	0,6 g
SO ₄ Mg. 7H ₂ O	0,2 g
CO ₃ Ca	3,0 g
ClNa	0,2 g
Manita	7,6 g
Glucosa	2,4 g

Extracto de levadura (1)	260 ml
Agua de grifo	740 ml
Agar (cuando se quiera sólido)	17 g
pH.....	6,8-7,0
Esterilización a 115°C	20 minutos

(1) El extracto de levadura es el filtrado de la mezcla de 250 g de levadura de panadería con dos litros de agua después de ebullición durante 3 horas.

Este medio es usado normalmente adicionado de cristal violeta a la concentración 1:80.000, ya que además de inhibir el crecimiento de muchas bacterias Gramm positivas y hongos, facilita la identificación de *R. meliloti* en presencia de posibles contaminantes.

Para la selección de mutantes auxotrofas de *R. meliloti* - se han empleado, indistintamente, los medios mínimos de Ferry et al. (1959) y de Hooykaas et al. (1977) modificado por nosotros, no habiendo encontrado en su utilización ninguna diferencia.

Medio de Ferry et al.:

PO ₄ H ₂ K	2,268 g
PO ₄ HNa ₂ . 12H ₂ O	11,940 g
SO ₄ Fe. 7H ₂ O	0,078 g
SO ₄ Mg. 7H ₂ O	0,197 g
Cl ₂ Ca. 2H ₂ O	0,015 g
Biotina	12 microgramos
Glucosa	18 g
SO ₄ (NH ₄) ₂	6,6 g
Agua desionizada	1000 ml
Agar purificado(cuando se quiere sólido)	17 g

pH	6,5-7
Esterilización a 115°C	20 minutos. Conviene esterilizar la glucosa por separado.

Medio de Hooykaas et al:

Manita	10 g	Citrato férrico	10 ml
NO ₃ K	0,6 g	SO ₄ Mn.7H ₂ O	1 ml
SO ₄ (NH ₄) ₂ *	0,4 g	SO ₄ Cu.5H ₂ O	0,1 ml
Cl ₂ Ca.2H ₂ O	0,1 g	SO ₄ Zn	0,1 ml
SO ₄ Mg.7H ₂ O	0,25 g	BO ₃ H ₃	0,1 ml
PO ₄ H ₂ K	1,00 g	MoO ₄ Na ₂	0,1 ml
PO ₄ HK ₂	1,00 g	Agua desionizada	1000 ml
Cl ₃ Fe	0,01 g	Agar(cuando sólido)	17 g
		pH	6,5-7

* Incluido por nosotros.

Los ensayos de fijación en vida libre se han realizado - utilizando el medio descrito por Tjepkema y Evans (1975):

Acido málico	3,2 g
PO ₄ H ₂ K	3,0 g
Glutamato monosódico	100 mg
Cl ₂ Ca	5 mg
SO ₄ Mg.7H ₂ O	100 mg
BO ₃ H ₃	0,15 mg
SO ₄ Fe.7H ₂ O	0,13 mg
MoO ₄ Na ₂ .2H ₂ O	0,13 mg
SO ₄ Zn.7H ₂ O	0,11 mg

$\text{SO}_4\text{Co}.7\text{H}_2\text{O}$	0,07 mg
$\text{SO}_4\text{Cu}.7\text{H}_2\text{O}$	0,005 mg
$\text{Cl}_2\text{Mn}.4\text{H}_2\text{O}$	0,004 mg
Riboflavina	0,02 mg
Inositol	0,12 mg
Acido p-amino benzoico	0,02 mg
Acido nicotínico	0,02 mg
Biotina	0,02 mg
Tiamina	0,02 mg
Piridoxina	0,02 mg
Pantotenato cálcico	0,02 mg
Agua	1000 ml
Agar(cuando se quiere sólido)	15 g
pH	6,3
Esterilización a 115°C.....	20 minutos, ex- cepto la solución vitamínica que se esteriliza por filtra ción (tamaño de poro 0,45 μ).

Para las experiencias de infectividad y efectividad se ha empleado la solución nutritiva de Hewitt (1952), equilibrada después de la sustitución de los compuestos nitrogenados con los correspondientes aniones y cationes:

SO_4K_2	0,303 mg
Cl_2Ca	1,416 mg
$\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}.1\text{H}_2\text{O}$	0,208 mg
$\text{SO}_4\text{Mg}.7\text{H}_2\text{O}$	0,368 mg
Citrato de hierro	0,025 mg
$\text{SO}_4\text{Mn}.4\text{H}_2\text{O}$	0,022 mg
$\text{SO}_4\text{Cu}.5\text{H}_2\text{O}$	0,0024 mg
SO_4Zn	0,003 mg

BO_3H_3	0,0186 mg
MoO_4Na_2	0,00035 mg
Agua destilada	1000 ml

En las experiencias de conjugación se han empleado los siguientes medios:

Agar nutritivo y caldo nutritivo (Harrigan y McCance 1969):

Peptona	10 g
ClNa	5 g
Extracto de carne	3 g
Agua	1000 ml
Agar	15 g
pH	7,2
Esterilización a 115°C	20 minutos. Para medios semiblandos se adiciona el agar a la concentración de 0,7%.

Medio PCM (Plate-counting-medium):

Glucosa	1,5 g
Triptona	0,5 g
$\text{Cl}_2\text{Ca}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5 mM
Extracto de levadura	0,25 g
Agar (cuando sólido)	1,5 g
Agua	100 ml
pH	6,5-7
Esterilización a 115°C	20 minutos

Medio YSA (yeast-sucrose-agar) y YSB (yeast-sucrose-broth) (Vincent, 1970):

Sacarosa	2,5 g
----------------	-------

PO ₄ HK ₂	0,5 g
SO ₄ Mg.7H ₂ O	0,2 g
SO ₄ Ca	0,16 g
ClNa	0,1 g
Cl ₃ Fe	0,02 g
Extracto de levadura	0,5 g
Agua	1000 ml
Agar	15 g
pH	6,5-7
Esterilización a 115°C	20 minutos

Para medios semiblandos se adiciona el agar a la concentración de 0,7%.

Esterilización de las semillas de alfalfa

Se ha utilizado solución de cloruro mercúrico a la concentración de 2,5 %. Las semillas de alfalfa son sumergidas en esta solución durante quince minutos para asegurar una buena esterilización superficial. Pasado este tiempo, las semillas son lavadas con agua esteril de ocho a diez veces.

Germinación de las semillas

Se ha utilizado el procedimiento de germinación en tubo - descrito por Olivares (1963). Se utilizan tubos de 20 x 200 que contienen una tira de papel de filtro con un dobléz en la parte superior para soportar las semillas y unos 10 ml de agua; después de tapados con algodón se esterilizan en autoclave durante 20 minutos a 120°C. Se colocan semillas, previamente esterilizadas, en cada tubo y se llevan a 28°C en oscuridad, hasta que las plántulas alcanzan de 2 a 3 cm de longitud, (entre 48 y 72 horas). Paralelamente a la germinación en tubo, se puede realizar un test de

esterilidad (Solheim y Raa, 1971) haciendo germinar las semillas en una placa Petri con medio de agar común. Después de 2-3 días a 28°C se observa la posible aparición de crecimiento microbiano rodeando la plántula contaminada. En el caso de que ésto ocurra se deben eliminar las semillas colocadas en los tubos. Ultimamente se ha visto va mejor colocar en los tubos las semillas previamente germinadas en placas y libres de la correspondiente cubierta.

Preparación de los antibióticos

Todos los antibióticos fueron usados disueltos en agua -- destilada, esterilizados mediante filtración (poro de 0,45 μ) y -- adicionados al medio a las siguientes concentraciones finales --- (mg/l):

Sulfato de estreptomina	1000
Sulfato de kanamicina	25
Tetraciclina base	10
Ampicilina sódica	20

Selección de razas de *R. meliloti* Rm11, Rm4c y *R. leguminosarum* RmGRO2, resistentes a la estreptomina

Se ha utilizado medio sólido 79 de Allen adicionado de cristal violeta al 1:80.000 y del antibiótico en cantidad adecuada para conseguir una concentración final de 1000 μ g/ml.

Las placas Petri conteniendo este medio fueron sembradas con las suspensiones de los diferentes *Rhizobium* de una densidad óptima de 1,5 (aproximadamente $5 \cdot 10^9$ células/ml). 5-7 días es el tiempo normalmente requerido para la aparición de las colonias -- de las células que presentan resistencia natural al antibiótico.

La frecuencia calculada de aparición de mutantes resistentes ha sido del orden de $1,9 \times 10^{-9}$ y no ha sido detectada reversión a condiciones de sensibilidad.

Obtención de mutantes auxótrofas de *R. meliloti* 203 mediante tratamiento con luz ultravioleta

Un cultivo de Rm203 en fase logarítmica (12-14 horas en medio líquido de Allen a 28°C) se diluye con medio estéril a una D. O. de 0.05 y colocado en una placa Petri con la correspondiente barrita para la agitación magnética se dispone sobre un agitador de este tipo y bajo una lámpara de luz ultravioleta (15 W) a 20 cm de distancia durante 4 minutos con agitación suave. Este tiempo ha sido seleccionado por conseguirse con él una proporción de células muertas de más del 99,99%. Transcurrido el tiempo de irradiación la suspensión se recoge en un tubo estéril, se incuba durante 3 ó 4 generaciones (3-4 horas) y se preparan 2 ó 3 diluciones al décimo y se diseminan en placas con Allen cristal violeta. Después de 5-7 días de incubación a 28°C se pican las colonias y se llevan a medio mínimo y Allen para seleccionar las posibles auxótrofas. En la figura 1 se presenta la curva de supervivencia a UV para la raza Rm203, obtenida en las condiciones expuestas.

Aislamiento de fagos de *E. coli* K12-J53, RP4

Se ha seguido el procedimiento descrito por Billing (1969). El material de partida fue agua residuales, del que se eliminaron las partículas groseras y bacterias mediante filtración por papel y por membrana de 0,45 μ de tamaño de poro. La muestra obtenida se enriqueció mediante adición a la misma de un volumen igual de un cultivo de 18 horas de *E. coli*, K12-J53, RP4, e incubación a 37°C

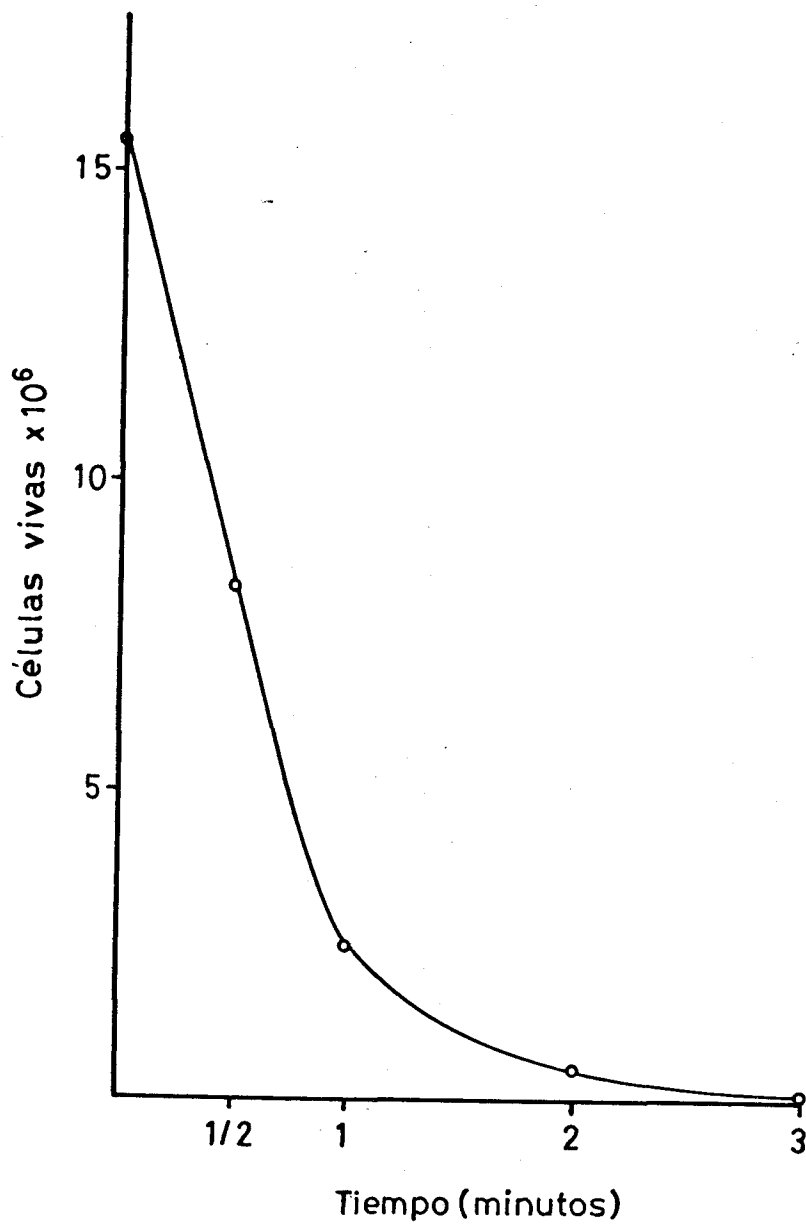


Fig. 1. Supervivencia de *R. meliloti* (raza Rm 203) al tratamiento con radiación ultravioleta en función del tiempo.

durante 18 horas. De esta mezcla se eliminaron las bacterias vivas por tratamiento con cloroformo (1%) y posterior centrifugación, a 5000 rpm durante 20 minutos.

Los distintos tipos de fagos aislados se han distinguido de acuerdo con la morfología de las placas líticas aparecidas en medio sólido, siguiendo la técnica de la doble capa. De ellos fueron seleccionados dos, llamados C1 y CH que mostraron una alta actividad lítica frente a la raza utilizada de *E. coli* en presencia de ampilicina, tetraciclina y kanamicina.

Obtención de suspensiones de alto título de los fagos de *R. meliloti* y *E. coli* usados

Se han utilizado matraces de 250 ml conteniendo 50 ml del medio adecuado en cada caso, (PCM para *Rhizobium* y caldo nutritivo para *E. coli* K12-J53, RP4), que fueron inoculados con una suspensión espesa de la bacteria específica y simultáneamente adicionados de 1 ml de la suspensión del correspondiente fago, manteniendo siempre un testigo, no inoculado con fago. Los matraces fueron cultivados en agitación a 28°C durante 24 horas para *Rhizobium* y a 37°C, en reposo, durante 18 horas para *E. coli*. Pasados estos tiempos los lisados obtenidos fueron sometidos a tratamiento con cloroformo (1%) y centrifugados de la manera ya descrita.

Los sobrenadantes fueron repartidos en tubos estériles y conservados en nevera, a 4°C hasta su uso. Puede comprobarse la existencia de contaminación de los sobrenadantes manteniendo los tubos a la temperatura adecuada durante 24 horas, eliminando aquellos en los que aparezca turbidez.

Titulación de las suspensiones de fagos

Se ha empleado la técnica de la doble capa. Para ello se preparó una serie de placas Petri conteniendo agar nutritivo, en el caso de *E. coli* o YSA, cuando se trataba de *Rhizobium*.

Tubos conteniendo 3 ml de agar nutritivo o YSA semiblandos, mantenidos en sobrefusión a 45°C en un baño termostatzado, son inoculados con una gota del cultivo bacteriano adecuado en fase logarítmica de crecimiento y 0,1 ml de las diferentes diluciones al décimo de las suspensiones del fago. El contenido de cada tubo fue posteriormente vertido en una placa con la capa base solidificada, extendiendolo por la superficie uniformemente.

Después de la incubación a 37°ó 28°C, durante 24-48 horas se cuenta el número de placas líticas aparecidas y se realizan - los cálculos correspondientes.

Los títulos calculados, en cada caso, fueron superiores a 10^9 partículas de fago/ml.

Ensayos de infectividad y efectividad

Se realizaron siguiendo las técnicas habituales en los laboratorios de la Sección de Microbiología de la Estación Experimental del Zaidín (Olivares, 1963; Palomares, 1975).

La técnica de germinación en tubo es adecuada para ver la infectividad, sustituyendo el agua por solución nutritiva de Hewitt modificada, cambiando los compuestos nitrogenados por otros carentes de este elemento, conservando al máximo el conveniente equilibrio iónico. Sin embargo, va mejor colocar sobre el papel de filtro de los tubos las semillas pregerminadas y libres de su cubierta, - evitándose así las pérdidas de plántulas por falta de germinación o por quedar mal orientadas.

Los tubos, preparados con 4-6 plantas cada uno, son inoculados con las diferentes suspensiones de las bacterias que se van a estudiar y colocados en invernadero, en condiciones óptimas de luz, humedad y temperatura. A los diez días, en el caso de ensayos de efectividad, se suele realizar una segunda inoculación, en idénticas condiciones que la primera.

La nodulación es visible macroscópicamente entre los 7-10 días, pero microscópicamente puede observarse colocando las plántulas entre porta y cubre a partir de las 72 horas. A los 30 días, independientemente del desarrollo alcanzado por las plantas, se cuenta el número de nódulos, que será el índice de infectividad.

Para conocer el grado de efectividad de una raza bacteriana, se prolonga el ensayo, pero dados los parámetros a considerar, es conveniente realizar siempre los experimentos a mayor escala para contar con material suficiente. Es preferible entonces el uso de un suelo adecuado y macetas de un tamaño tal que permita el desarrollo de un número de plantas suficiente y hasta un estado avanzado de desarrollo, generalmente floración.

Parte especial

1. Experiencias de fijación en vida libre.

Microorganismos

Para estos estudios se ha utilizado la raza Rm 11 de R. meliloti y los 50 clones (Rm 11 (100) a Rm 11 (150)), que fueron -- aislados a partir de ella por selección al azar de las colonias -- aparecidas sobre medio 79 de Allen, cristal violeta.

Ensayos de infectividad y efectividad de los clones aislados

Se han utilizado frascos de cristal de boca ancha de aproximadamente 300 ml de capacidad y arena de un tamaño de grano que oscilaba entre 1 y 1,5 mm de diámetro. Antes de llenar los frascos con arena se colocan en el fondo perlas de vidrio hasta 1 cm de altura y adicionada la arena, se esterilizaron en autoclave a 120°C durante 30 minutos.

El volumen de solución nutritiva de Hewitt, carente de compuestos nitrogenados, adicionados a cada frasco se calculó según la fórmula de Justice (1952):

$$\text{ml de solución/100 gr de arena} = \frac{118.29 \text{ ml de arena}}{\text{peso arena (Volumen)}} \times 12,2$$

Se prepararon lotes de 10 frascos para cada uno de los clones probados y un lote testigo.

Las semillas, previamente esterilizadas en su superficie, fueron colocadas en condiciones estériles, bajo una delgada capa de arena y un número dos o tres veces superior al deseado, para en tresacar después de la germinación las que no manifiesten un ritmo de crecimiento adecuado. Los frascos sembrados son llevados a invernadero en condiciones óptimas de luz, temperatura y humedad.

Preparación de los inóculos

Se obtienen por cultivo en agitación (Gallenkamp, 140 rpm) en matraces de 250 ml conteniendo 80 ml de medio líquido 79 de Allen sembrados con los distintos clones aislados e incubados a 28°C durante 48 horas, para conseguir un crecimiento óptimo. Transcurrido este tiempo se centrifugan los cultivos y el sedimento se suspende en agua estéril.

Inoculación de los fagos.

La inoculación se realizó con suspensiones de igual densidad óptica (correspondiente a 10^9 células/ml), inmediatamente después de la siembra a 3 ml por frasco. A los quince días se realizó una segunda inoculación en idénticas condiciones que la primera.

Durante el tiempo que duró la experiencia, el riego se efectuó con agua estéril, excepto dos veces que se utilizó solución nutritiva de Hewitt, libre de nitrógeno y estéril, para evitar deficiencias de cualquier nutriente.

Pasados sesenta días se interrumpió la experiencia, procediéndose a determinar los parámetros que van a indicar el grado de infectividad: número de nódulos por planta y el de actividad: peso fresco, peso seco, contenido en nitrógeno y nitrógeno total.

El secado se lleva a cabo a 80°C en estufa con corriente forzada de aire durante 24 horas.

Para determinar el nitrógeno se utilizó el proceso de mineralización propuesto por Paech y Tracey (1966) y descrito por La chica en C.I.A.F. (1969). Se usa como mezcla mineralizadora ácido sulfúrico concentrado y agua oxigenada diluida al 30 por ciento, y para la valoración, la técnica que utiliza el aparato descrito por Bouat y Groncet (1965).

Medida de la actividad nitrogenosa en *R. meliloti* por la reducción del acetileno a etileno

De acuerdo con los resultados obtenidos en las experiencias de infectividad y efectividad con los 50 clones aislados (Tabla I) se eligieron los siguientes: Rm 11 (110) y Rm11(112), como representantes de los índices de mayor infectividad y efectividad y los

clonos Rm 11 (126) y Rm 11 (144) en cuanto a índices de menor valor.

Para la medida de la actividad enzimática se ha seguido, -- salvo ligeras modificaciones para adoptar el método a nuestras posi bilidades, la técnica descrita por Koch y Evans (1966) y Hardy y -- Knigh (1967), usando cromatografía gaseosa (Burris, 1972).

Se han empleado tubos de 14 x 140 con tapón de goma perfora ble, que contenían el medio descrito por Tjepkema y Evans, 8 ml ó 4 ml según fuera líquido o sólido.

Preparación e inoculación del medio

Los tubos, provistos en principio de tapón de algodón, fue ron esterilizados en autoclave a 115°C durante 20 minutos, excepto la solución vitamínica que lo fue mediante filtración por membrana de 0,45 μ de tamaño de poro. A cada tubo se adicionó luego un volu men determinado de esta solución para conseguir la concentración - final adecuada. Los tubos con medio líquido fueron inoculados con 0,2 ml de las diferentes suspensiones de aproximadamente 10^9 cel/ ml de los clones seleccionados, preparadas en agua destilada esté ril a partir de cultivos en medio sólido 79 de Allen. El medio sóli do se sembró con un asa de platino a lo largo de la superficie de agar inclinado.

A los tubos así preparados se les sustituyó el tapón de - algodón por otro de goma perforable y se llevaron a incubar a 28°C durante 48 horas. Los de medio líquido se mantuvieron en agitación, con un ángulo de treinta grados, en un agitador Gallemkamp a 140 - rpm y una pulgada de excentricidad.

Paralelamente, a otra serie de tubos se les sustituyó la atmósfera interior por una mezcla conocida de gases, empleándose 1% de O_2 , 1% de CO_2 y 98% de N_2 (Tjepkema y Evans, 1975), unas veces y 80% de He y 20% de O_2 (Evans y Keister, 1976) otras, manteniéndose los cultivos a $28^\circ C$ durante 35 horas.

En otros casos, la incubación se realizó con el primitivo tapón de algodón, no sustituyéndolo por el de goma perforable hasta el momento de la inyección del acetileno.

Obtención e inyección del acetileno

El acetileno ha sido obtenido directamente a partir de carburo cálcico y agua. El gas producido fue recogido en un matraz de 300 ml de capacidad con tapón de rosca y herméticamente cerrado mediante una placa de silicona y provisto de una rama lateral unida por una rótula a un tubo en "U" que, lleno de agua, permite mantener siempre la misma presión interior mientras se extraen con una jeringuilla los volúmenes de acetileno correspondientes.

Pasado el tiempo correspondiente, 1 ml de la atmósfera del interior de los tubos se succionan con jeringa y 1 ml de acetileno se introduce de la misma forma. A tiempos determinados, son tomadas muestra para inyectar en el cromatógrafo de gases.

Determinación del etileno

La formación de etileno por reducción del acetileno fue medida usando un cromatógrafo Perkin-Elmer, modelo F-7 equipado con un detector de ionización de llama, con una columna de alúmina de 80 mesh, de 45 cm de longitud y 1,75 mm de diámetro interior, a la temperatura de $100^\circ C$. Como gas portador se ha utilizado nitrógeno a un flujo de 80 ml/minuto.

Los picos de acetileno y etileno obtenidos fueron previamente identificados por comparación de los tiempos de retención de los correspondientes patrones. La actividad del enzima se obtiene por referencia a la curva de patrón construida con los valores de los picos de los diferentes volúmenes de etileno inyectado.

El volumen inyectado de las muestras problema, ha sido en todos los casos de 200 μ l.

Controles

Una vez determinada la actividad nitrogenasa, la pureza de los cultivos y la ausencia de microorganismos fijadores en vida libre, aerobios y anaerobios, debe ser cuidadosamente probada para excluir la posibilidad de que la actividad observada sea debida a bacterias contaminantes. Para ello, una vez analizadas las muestras en el cromatógrafo de gases, se diseminaron las mismas, con un asa de platino, sobre medio 79 de Allen y agar nutritivo, incubándose a 28°C tanto en aerobiosis como en anaerobiosis hasta observar la aparición de crecimiento bacteriano. Las condiciones anaeróbicas fueron conseguidas utilizando el sistema GasPak.

Con las colonias crecidas en Allen se procedió a determinar su capacidad infectiva, sobre la planta huésped específica de *R. meliloti*, la alfalfa, de la manera ya descrita.

2. Experiencias de conjugación

Microorganismos

- R. meliloti*, razas Rm 11 y Rm 11 Str^r, Rm 4c y Rm 4c Str^r.
- R. meliloti*, raza Rm 203UVA-12.
- E. coli*, raza K12-J53, RP4.
- E. coli*, (Delbruck).
- R. leguminosarum*, raza GRO2.

Transferencia del factor RP4 de *E. coli* K12-J53, RP4 a *R. meliloti*

Fue seguida la técnica descrita por Datta et al. (1971) con modificaciones. La raza donadora *E. coli* K12-J53, RP4, se cultivó - en reposo en 5 ml de caldo nutritivo, hasta la fase final de crecimiento logarítmico (Clowes y Hayes, 1968).

Las distintas razas receptoras de *R. meliloti* Rm 11, Rm 11 Str^r, Rm 203UVA-12, Rm 4c y Rm 4c Str^r, lo fueron en 5 ml de medio líquido PCM, en agitación, hasta la fase final de crecimiento logarítmico.

El medio de mezcla en todos los casos fue agar nutritivo y la relación donador: receptor se hizo en proporción 1:1, mezclándose 0.1 ml de donador y 0.1 ml de receptor, que se diseminaron con una espátula sobre la superficie del medio, manteniéndose durante 3 horas a 28°C. Pasado este tiempo, la mezcla se recogió con 1,8 ml de agua estéril y se adicionó 0,5 ml de una suspensión de los fagos de *E. coli* C1 y CH. Previas diluciones al décimo de esta mezcla, -- 0,1 ml de cada dilución se diseminó sobre placas Petri conteniendo el medio selectivo, constituido por medio PCM adicionado de kanamicina, ampicilina y tetraciclina, a las concentraciones adecuadas. - Después se llevan a incubación a 28°C durante 48-60 horas.

La frecuencia de aparición de resistencia natural simultánea de *R. meliloti* a los antibióticos anteriormente mencionados, a las concentraciones ya indicadas, puede considerarse nula.

Las exconjugantes de *Rhizobium* obtenidos fueron identificados como tales, mediante la determinación de su sensibilidad a los fagos específicos de *R. meliloti*, concretamente el fago DF2.

Los ensayos con el fago DF2 de los diferentes exconjugantes se realizaron en medio líquido y sólido. Para ello se prepararon tu bos conteniendo 1 ml de agua estéril donde se hizo una suspensión -

de las bacterias que se deseaban probar. Con 0.1 ml de cada suspensión se inoculan dos tubos conteniendo 3 ml de medio líquido PCM a uno de los cuales se le adiciona 0.1 ml de suspensión de fago DF2, permaneciendo el otro como testigo. Los tubos así preparados se incuban en agitación a 28°C durante 24 horas, tiempo adecuado para -- comprobar la existencia de lisis, en el caso de que ésta ocurra. En medio sólido, de resultados a veces dudosos, pero de más fácil y rápida realización, que permite además el "screening" de un mayor número de colonias, se ha hecho el estudio de la siguiente forma: El medio sólido utilizado ha sido YSA, empleándose la técnica de la doble capa. A tubos conteniendo 3 ml de medio YSA blando, que se mantiene en sobrefusión a 45°C en un baño termostatzado, se adicionan 0.5 ml de la suspensión del fago AL1, se agitan y se vierten en las placas Petri, que contienen medio YSA ya solidificado, cuidando de que forme una capa homogénea. De la misma forma se preparan placas a las que no se adiciona el fago, que sirven como testigo.

En tubos conteniendo 1 ml de agua estéril se preparan suspensiones de los exconjugantes y una gota, de cada uno de ellos, tomada con asa de platino. se deposita sobre las placas preparadas, a razón de unas 25 gotas/placa uniformemente repartidas por la superficie y en correspondencia con las de las placas testigo. Las placas se incuban a 28°C durante 48 horas, tiempo necesario para comprobar si se ha producido la lisis de los exconjugantes probados, - creciendo sólo aquellos que son resistentes al fago utilizado.

Transferencia del factor RP4 de *R. meliloti* a *E. coli*

Los exconjugantes de las distintas razas de *R. meliloti* fueron capaces, a su vez, de transferir el factor RP4 a *E. coli*. En estas experiencias, la raza recipiente usada fue *E. coli* (Delbrück) y

se siguió la misma técnica de conjugación, sustituyendo los fagos C1 y CH de *E. coli* K12-J53, RP4 por el fago DF2, específico de *R. meliloti*, manteniendo la mezcla a 28°C durante 3 horas. El medio selectivo fue agar nutritivo adicionado de kanamicina, ampicilina y tetraciclina a las concentraciones ya indicadas, incubando las placas a 37°C durante 12 horas, tiempo suficiente para la aparición de los exconjugantes de *E. coli*, en los cuales los niveles de resistencia a las drogas usadas fueron comparables con los de los donadores.

Las experiencias de conjugación indicadas también se han -- realizado en medio líquido PCM, pero fueron menos eficientes para la transferencia del factor RP4, pudiéndose observar una disminución del pH en los tubos de mezcla, así como la presencia de factores anti-*Rhizobium* producidos por *E. coli*, además de que, como ya se ha indicado en la introducción, los factores RP4 se transfieren más fácilmente en mezclas sobre medios sólidos y por ello en todas las experiencias expuestas a continuación se ha seguido la misma técnica.

Transferencia del factor RP4 entre razas de *R. meliloti*

Se ha utilizado como raza donadora la Rm 203UVA-12, RP4 y como receptora las razas Rm 4c Str^r y Rm 11 Str^r.

Tanto donador como receptor se hicieron crecer en 5 ml de medio líquido PCM hasta la fase final de crecimiento logarítmico. La mezcla se hizo en proporción 1:1 de donador: receptor, mezclándose 0,1 ml de cada padre sobre agar nutritivo, manteniéndose la mezcla durante 3 horas a 28°C, tiempo óptimo en que la transferencia de RP4 se verifica a mayor frecuencia.

Las mezclas fueron recogidas con 1.8 ml de agua estéril y -- previas diluciones seriadas de diez en diez, 0,1 ml de estas suspensiones se sembraron sobre placas Petri conteniendo, para la contra-

selección, el medio mínimo descrito por Hooykass et al., que no permite el crecimiento de la raza donadora auxotrofa utilizada, adicionado de kanamicina, ampicilina, tetraciclina y estreptomycinina, a -- las concentraciones usuales. Los híbridos conseguidos suelen aparecer entre los 4-6 días de incubación a 28°C.

Transferencia del plásmido PG entre razas de *R. meliloti*.

La dificultad de eliminar en las experiencias de conjugación los padres de una mezcla cuyo objeto sea el conseguir una progenie de la raza curada a la que se haya transferido el plásmido PG desde un donador adecuado, así como el desconocimiento, hasta la fecha, de alguna característica de fácil identificación ligada a este plásmido, ha complicado considerablemente el estudio de su transferencia por conjugación entre razas de *R. meliloti*. Sin embargo, se ha utilizado también una técnica indirecta, en dos variantes, que pone en evidencia el hecho de la transferencia e incluso de la frecuencia a la que ocurre.

Se han usado como donadores las razas silvestres Rm 11, RP4,PG y Rm 203UVA-12, RP4,PG y como receptor la raza curada Rm 4c Str^r. La conjugación se ha realizado siguiendo el método descrito previamente.

El medio selectivo empleado fue PCM o el medio mínimo de Hooykaas et al., según el donador utilizado, adicionado de kanamicina, ampicilina, tetraciclina y estreptomycinina.

Los híbridos aparecidos, fueron recrecido sobre medio PCM en placas Petri para obtener masa suficiente con la que realizar las posteriores operaciones de control:

1. Comprobación de la resistencia a las drogas, efectuada de la manera ya descrita.

2. Sensibilidad al fago AL1, que se ha llevado a cabo tanto en medio líquido como sobre medio sólido. Los medios utilizados - han sido PCM y YSA, realizándose de la forma previamente comentada.

3. Diferencia cuantitativa de los polisacáridos extracelulares producidos.

Para la evidencia indirecta de la transferencia del plásmido PG se ha seguido, en principio, la técnica de conjugación descrita en experiencias anteriores. Las mezclas se mantuvieron tres horas y se recogieron posteriormente con agua estéril. Dos tubos, conteniendo 3 ml de medio líquido PCM, se inocularon con 0.1 ml de cada una de las mezclas recogidas; a uno de los tubos se adicionó 0.1 ml de fago AL1, quedando el otro como testigo. Los tubos se incubaron en agitación a 28°C durante 24 horas, tiempo suficiente para la actuación del fago, y después, previas diluciones seriadas al décimo, 0.1 ml de las diferentes suspensiones obtenidas se sembraron sobre placas Petri conteniendo medio PCM adicionado de 1000 µg/ml de estreptomycin, llevándose a 28°C hasta la aparición de las colonias, realizándose entonces los correspondientes recuentos.

Estas experiencias, de tipo indirecto, no permiten calcular la frecuencia de transmisión real del plásmido PG, por lo que fueron repetidas empleándose las mismas razas, donadoras y receptoras, aplicando la técnica de la doble capa. Para ello, una vez efectuada la conjugación en idénticas condiciones a las anteriormente citadas y recogidas las distintas mezclas con agua estéril, se prepararon diluciones seriadas al décimo y se inocularon con 0.1 ml de las diferentes suspensiones obtenidas dos series de tubos conteniendo 3 ml de medio YSA semiblando, mantenidos en sobrefusión en un baño termostático a 45°C. A una de las series se adiciona también 0.3 ml

de suspensión de fago AL1, mientras que la otra queda como tes
tigo. Los tubos así preparados se vertieron sobre placas Petri
conteniendo medio YSA adicionado de estreptomicina a la concen
tración de 1000 $\mu\text{g/ml}$, extendiéndose de manera uniforme hasta
conseguir una doble capa. Las placas se incubaron a 28°C hasta
la aparición de las colonias, realizándose entonces los corres
pondientes recuentos.

Los resultados obtenidos en la realización de estas ex
periencias mostraban en el primer caso, cuando la contraselec
ción por el fago AL1 se efectúa en medio líquido, que podría -
intervenir algún factor que fuera la causa de las diferencias
encontradas entre los valores correspondientes a las determina
ciones del número de células que aparecen en los recuentos de
los cultivos de la mezcla conjugante de uno y otro cruce, esto
es, cuando está o no presente el factor RP4. Este factor pudie
ra ser doble, por un lado la influencia del filtrado proceden
te de la lisis de células que contienen el plásmido PG por acción
del fago AL1, y por otro la distinta velocidad de crecimiento
de las razas usadas en estas experiencias. Para lo primero se -
empleó la raza Rm 11, PG que se inoculó con fago AL1 y se cul
tivó en agitación en medio PCM líquido durante 12-15 horas. El fil
trado, obtenido después de la centrifugación a 5000 rpm duran
te 30 minutos y filtración a través de una membrana de $0.45\ \mu$
de tamaño de poro, se dividió en dos partes, una de las cuales
se inoculó con la raza Rm 4c Str^r y la otra con la Rm 4c Str^r, RP4.
A tiempos cero, doce y veinticuatro horas se efectuaron recuen
tos sobre medio PCM sólido.

En el segundo caso, se hicieron recuentos de las suspen
siones de las razas Rm 4c Str^r y Rm 4c Str^r, RP4 sobre placas

Petri conteniendo medio PCM a tiempos cero doce y veinticuatro horas.

Obtención de los polisacáridos extracelulares de *R. meliloti*.

Para la obtención de estos polisacáridos se utilizaron cultivos en agitación, durante nueve días, en medio líquido 79 de Allen de las razas Rm 4c Str^R y de varios de los híbridos - PG obtenidos en el cruce Rm, RP4,PG X Rm 4c Str^R, siguiendo la técnica descrita por Amarger et al. (1967); a) centrifugación del cultivo bacteriano a 5000 rpm durante 30 minutos; b) adición al sobrenadante de dos volúmenes de acetona; c) lavado con acetona del precipitado y d) secado del mismo con aire caliente (40-50°C).

Transferencia del plásmido PG de *R. meliloti* a *E. coli*.

Se han empleado como razas donadoras Rm 11, RP4,PG y -- Rm 11,PG, y como receptora *E. coli* (Delbrück), siguiendo la técnica de conjugación descrita previamente.

El medio selectivo fue agar nutritivo adicionado de kanamicina, ampicilina, tetraciclina a las concentraciones usuales, en el caso de utilizarse como raza donadora Rm 11, RP4,PG y agar nutritivo solo en el caso de haber utilizado como donadora la raza Rm 11,PG.

Un determinado número de los exconjugantes obtenidos, una vez recrecidos sobre agar nutritivo, fueron puestos en presencia del fa

go AL1, de la manera ya descrita, con el objeto de comprobar si podrían ser infectados.

Adsorción del fago AL1 sobre *E. coli*, PG y *E. coli*, RP4, PG.

Para determinar la adsorción del fago AL1 sobre *E. coli* (Delbrück) que ha recibido el plásmido PG, sólo o junto con el RP4, se han estudiado diez posibles exconjugantes en cada caso, utilizando suspensiones en NB de igual volumen y número de células, de cada una de los variantes: *E. coli*, PG; *E. coli*, RP4, PG y *E. coli*, actuando este último como testigo.

A las suspensiones se les adicionó igual volumen de suspensión del fago AL1 y se mantuvieron en agitación suave durante tres horas a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se eliminaron las células mediante centrifugación a 5000 rpm durante 30 minutos y con los sobrenadantes que resultaron, se procedió a determinar el título de fagos. Para ello se empleó una suspensión de *R. meliloti* Rm 2, raza silvestre que es, de las ensayadas hasta ahora, la que presenta mayor sensibilidad al fago AL1, utilizándose para ello la técnica de la doble capa.

Transferencia del plásmido PG de *E. coli* a *R. meliloti*.

En estos cruces, se empleó como donador la raza *E. coli*, RP4, PG y *E. coli*, PG, y como receptora la Rm 4c Str^r, siguiéndose la técnica de conjugación usual.

Los recombinantes obtenidos, después de aislarse sobre medio PCM adicionado de kanamicina, ampicilina, tetraciclina y estreptomina a las concentraciones finales ya conocidas, fueron re-crecidos sobre medio PCM sólido. Con ellos, posteriormente, se procedió al

tratamiento con el fago AL1, tanto en medio líquido como sobre medio sólido, para determinar su sensibilidad a la infección.

Transferencia del plásmido PG a *R. leguminosarum*.

Se ha seguido la técnica de conjugación ya descrita previamente, ensayando dos tiempos, 3 y 20 horas. Como razas donadoras se han empleado Rm 203UVA-12, RP4, PG y *E. coli*, RP4, PG y como receptor, *R. leguminosarum*, raza GR02 Str^r.

El medio selectivo fue el medio mínimo de Hooykaas et al., en el primer caso y medio PCM en el segundo. Ambos medios se adicionaron de kanamicina, ampicilina, tetraciclina y estreptomicina a las concentraciones finales usadas.

Los exconjugantes obtenidos, después de ser recrecidos sobre medio PCM, fueron puestos en presencia del fago AL1 de la manera habitual, con el objeto de comprobar si eran lisados. También se realizaron pruebas de adsorción del fago por si el plásmido PG como en *E. coli* no se expresaba como en *R. meliloti*.

Adsorción del fago AL1 sobre *R. leguminosarum* GR02, RP4, PG Str^r y *R. leguminosarum* GR02 Str^r.

Se utilizaron suspensiones de diez posibles exconjugantes de igual volumen y número de células, de cada una de las razas GR02, RP4, PG Str^r y GR02 Str^r, que actuaba como testigo.

Las suspensiones realizadas en medio líquido PCM se adicionaron de igual volumen de suspensión de fago AL1, manteniéndose en -- agitación suave durante tres horas a temperatura ambiente. Pasado -- este tiempo se eliminaron las células mediante centrifugación a 5000 rpm, durante 30 minutos.



Con los sobrenadantes obtenidos se procedió a determinar el título de fagos; para ello se empleó una suspensión de *R. meliloti* Rm 2, siguiéndose la técnica de la doble capa.

EXPERIENCIAS Y RESULTADOS

1. Fijación de nitrógeno en vida libre.

Ensayos de infectividad y efectividad de los clones aislados de *R. meliloti* Rm 11 (100) a Rm 11 (150).

En la Tabla 1, se exponen los resultados correspondientes a los ensayos de infectividad y efectividad realizados con cincuenta clones aislados a partir de *R. meliloti* Rm 11. Son presentados los datos de peso seco y peso seco por número de nódulos, así como los valores obtenidos de los índices de infectividad y efectividad considerados, que han sido número de nódulos por planta para la infectividad y peso seco por número de nódulos y contenido en nitrógeno, correspondiente a la parte aérea de plantas de alfalfa (en frascos con arena) para la efectividad.

Con estas determinaciones se pretendía conocer la infectividad y efectividad de las bacterias aisladas, con el objeto de elegir las de características más adecuadas para los ensayos de fijación de nitrógeno en vida libre.

TABLA 1

Peso seco, número de nódulos por planta, peso seco por número de nódulos, y tanto por ciento de N₂ de plantas de alfalfa (en frascos con arena) correspondientes a los ensayos de infectividad y - efectividad de cincuenta clones aislados de *R. meliloti* Rm11.

Lote	Peso seco por planta (mg)	N° Nódulos por planta	Peso seco por nódulo	% N ₂
100	12,35	2,25	5,49	4,12
101	10,54	2,10	5,02	4,00
102	17,61	2,56	6,88	4,00
103	15,12	1,58	9,57	4,12
104	19,66	2,25	8,74	4,34
105	12,24	2,13	5,77	4,40
106	14,41	1,93	7,47	3,84
107	18,36	2,37	7,75	3,72
108	13,53	2,33	5,81	3,86
109	17,49	2,60	6,73	4,12
110	26,15	2,50	10,46	3,81
111	22,69	3,10	7,32	3,86
112	18,63	1,67	11,16	4,20
113	20,77	2,64	7,87	3,81
114	18,95	2,80	6,77	4,12
115	15,7	1,72	7,85	3,20
116	14,55	1,92	7,58	4,20
117	13,38	1,65	8,11	3,50

TABLA 1 (continuación)

Lote	Peso seco por planta (mg)	N° Nódulos por planta	Peso seco por nódulo	% N ₂
118	18,17	3,08	5,90	4,06
119	19,69	2,68	7,35	3,75
120	11,82	2,00	5,91	4,09
121	15,49	2,54	6,10	4,00
122	16,14	1,94	8,32	3,30
123	20,74	2,01	10,32	3,56
124	14,82	1,87	7,93	3,60
125	14,83	2,11	7,03	4,00
126	18,73	4,10	4,57	4,26
127	12,63	1,78	7,10	4,06
128	16,28	1,93	8,44	3,56
129	18,09	2,18	8,30	4,00
130	10,36	1,64	6,32	3,98
131	16,24	2,53	6,42	4,37
132	12,16	1,83	6,65	4,26
133	13,15	2,51	5,24	3,47
134	10,98	2,26	4,86	4,26
135	12,41	2,32	5,35	4,12
136	15,4	2,17	6,98	4,03
137	10,12	1,62	6,25	4,06
138	6,92	1,11	6,24	3,95
139	13,96	2,45	5,70	4,12
140	17,10	2,50	6,84	4,03
141	12,92	2,00	6,46	4,28

TABLA 1 (continuación)

Lote	Peso seco por planta (mg)	N° Nódulos por planta	Peso seco por nódulo	% N ₂
142	15,26	2,88	5,30	3,78
143	15,18	2,30	6,60	4,26
144	12,72	2,88	4,42	4,26
145	12,46	2,16	5,77	4,26
146	13,34	2,18	6,12	3,70
147	11,44	2,24	5,11	4,06
148	10,82	1,94	5,58	4,34
149	11,916	1,80	6,62	4,03
150	13,06	1,95	6,70	4,26

Determinación de la actividad nitrogenasa en *R. meliloti* por la reducción del acetileno a etileno.

A la vista de los resultados expuestos en la Tabla 1, se eligieron cuatro clones con los que se procedió a la medida de la actividad de la nitrogenasa, siguiendo la técnica de la reducción del acetileno a etileno.

Los clones Rm 11 (110) y Rm 11 (112), se eligieron como representantes de los que presentaban mayor índice de efectividad (peso seco / n° de nódulos), y los clones Rm 11 (126) y Rm 11 (144), por presentar índices de menor valor. Los clones seleccionados fueron ensayados tanto en medio líquido como en medio sólido; en un caso y en otro se estudiaron en idénticas condiciou

nes de cultivo, adicionando sulfato amónico a la concentración del 0,5 %, equivalente a 0,037 M.

Con la Tabla 2 comienza la exposición de los resultados referentes a las determinaciones de la actividad nitrogenasa. En esta primera tabla se presentan los resultados correspondientes a la actividad obtenida de los cuatro clones ensayados en medio líquido definido (Tjepkema y Evans, 1975) sin nitrógeno combinado y adicionado de sulfato amónico al 0,5%.

La falta de datos en esta especie de *Rhizobium*, referentes al tiempo óptimo para realizar las determinaciones, hizo necesario que esta experiencia preliminar se prolongase hasta 24 horas, con determinaciones cada dos, después de la inyección del acetileno.

El tiempo óptimo obtenido para la medida de la actividad enzimática ha sido de dos horas después de la inyección de acetileno.

TABLA 2

Actividad nitrogenasa de cuatro clones de *R. meliloti* detectada en medio definido líquido, con y sin adición de sulfato amónico al 0,5 por ciento.

Clonos	Actividad nitrogenasa *	
	Sin adición de amonio	Con adición de amonio
110	96,73	28,21
112	61,46	30,23
126	59,45	24,18
144	56,42	36,27

* Expresada en nanomoles de etileno por mg de proteína y por hora.

Puede observarse que la actividad enzimática desarrollada, disminuye cuando en el medio se encuentra presente nitrógeno combinado.

En la Tabla 3 se presentan los valores correspondientes a la actividad enzimática obtenida de los cuatro clones ensayados empleando medio definido sólido, sin nitrógeno combinado y adición de sulfato amónico al 0,5%.

TABLA 3

Actividad nitrogenasa de cuatro clones de *R. meliloti* detectada en medio definido sólido, con y sin adición de sulfato amónico al 0,5 por ciento.

Clonos	Actividad Nitrogenasa *	
	Sin adición de amonio	Con adición de amonio
110	18,13	16,22
112	24,18	20,15
126	16,12	8,06
144	14,10	10,17

* Expresada en nanomoles de etileno por miligramo de proteína y por hora.

De la observación de las Tablas 2 y 3, se deduce que el grado de actividad nitrogenasa desarrollado en medio sólido, des

ciende considerablemente comparado con el que ocurre en medio líquido, por lo que en las experiencias posteriores sólo ha sido empleado este último.

Actividad nitrogenasa en presencia de diferentes concentraciones de nitrógeno fijado.

De acuerdo con los resultados expuestos en la Tabla 2, se seleccionó el clon Rm 11 (110) para ensayar su actividad frente a diferentes concentraciones de nitrógeno combinado; se empleó sulfato amónico a las concentraciones de 0, 0.25, 0.5, 1 y 2 --gramos por ciento. En la Tabla 4 se exponen los resultados obtenidos.

TABLA 4

Actividad nitrogenasa de Rm 11 (110), frente a diferentes concentraciones de nitrógeno fijado.

$(\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2)$ (%)	Actividad Nitrogenasa *
0	91,9
0,25	27,6
0,5	24,8
1	14,1
2	12,0

* Expresada en nanomoles de etileno por miligramo de proteína y por hora.

La gráfica 2 representa la curva obtenida correspondiente a la disminución de la actividad fijadora del clon Rm 11 (110)

frente a diferentes concentraciones de nitrógeno fijado.

Estas experiencias se repitieron sustituyendo el tapón de algodón por otro de goma perforable inmediatamente antes de la inyección del acetileno, a diferencia de los casos anteriores en los que el tapón perforable fue colocado después de ser inoculados los tubos. En estos casos la actividad enzimática de la nitrogenasa de los clones ensayados disminuyó considerablemente.

En un tercer tipo de experiencias, la atmósfera interior de los tubos empleados fue sustituida por una mezcla gaseosa de composición conocida, que en unos casos fue He (80%) y O₂ (20%) y en otros N₂ (98%), O₂ (1%) y CO₂ (1%) de acuerdo con lo encontrado en la bibliografía, aunque aquí se ha sustituido el argon, por helio por no disponer de aquél. En la Tabla 5 se presentan los resultados obtenidos con el clon Rm 11 (110).

TABLA 5

Actividad nitrogenasa de Rm 11 (110) desarrollada en atmósfera controlada.

Atmósfera	Actividad Nitrogenasa *
Normal	91,9
He : O ₂	7,05
N ₂ : CO ₂ : O ₂	4,03
Vacío	0,00

* Expresada en nanomoles de etileno por miligramo de proteína y por hora.

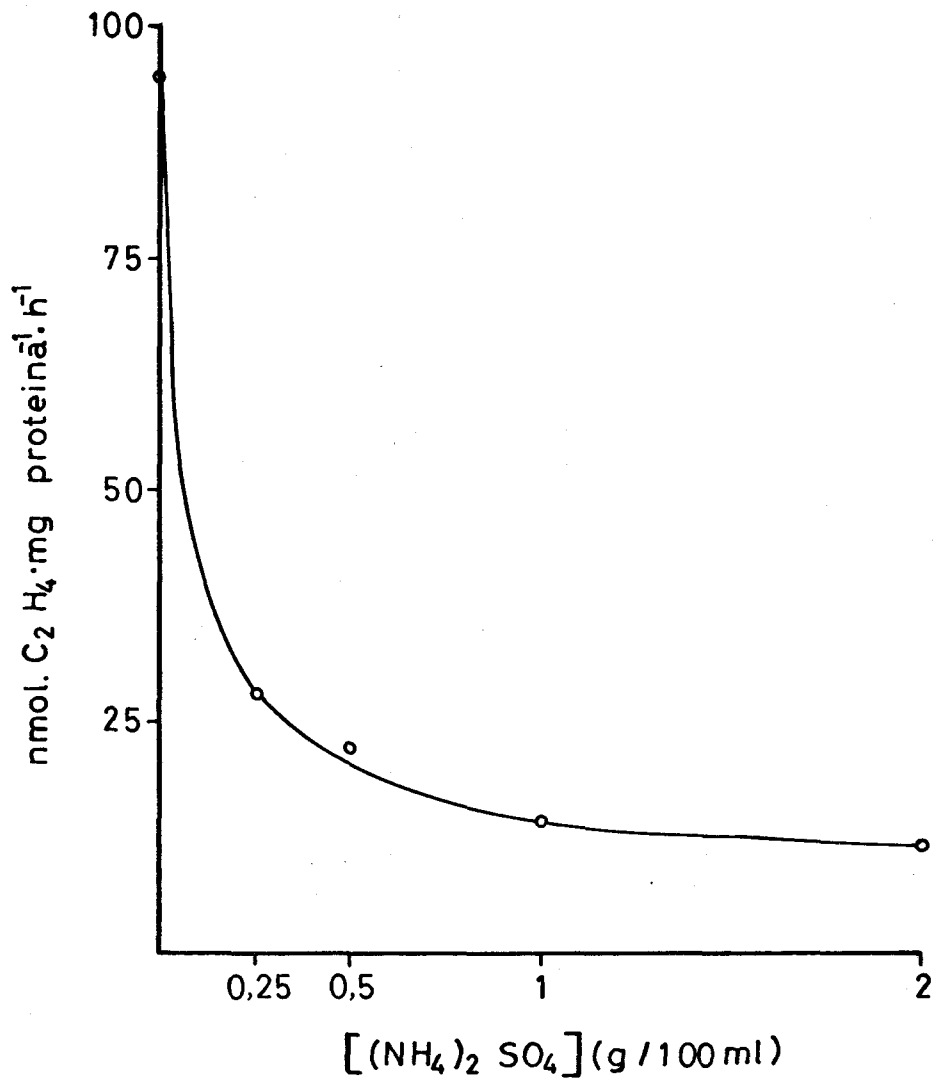


Fig. 2. Inhibición de la actividad nitrogenasa de *R. meliloti* creciendo en vida libre por distintas concentraciones de amonio.

En todas estas determinaciones el volumen de muestra inyectado para su análisis cromatográfico ha sido de 200 μ l, que constituyen una parte alícuota de los 9 ml de medio gaseoso - establecido en los tubos de ensayo donde se llevan a cabo las experiencias de fijación.

El cálculo de los miligramos de proteína se ha realizado a partir de una suspensión madre de *R. meliloti*, previo lavado y dilución de la misma (diluciones 10^{-1} , 20^{-1} , 50^{-1} y 10^{-2}) y posterior desecación a 105°C durante 24 horas. Conocida la densidad óptica de las diluciones se ha podido determinar los miligramos de proteína correspondientes a las células crecidas en 8 ml de medio líquido. La concentración en proteína se ha calculado por determinación del nitrógeno por Kjeldhal multiplicando por el factor 6.25.

La extrapolación de los valores de las alturas de los picos de etileno obtenidos por cromatografía gaseosa de las muestras problema, respecto a los valores dados de las muestras patrones de etileno, permiten calcular el número de nanomoles correspondientes a cada problema.

Controles

Posterior al análisis cromatográfico de cada una de las -- muestras ensayadas en el estudio de la determinación de la actividad fijadora de *R. meliloti* en vida libre, los controles efectuados para asegurar la pureza de los cultivos dieron los siguientes resultados: El crecimiento sobre medio 79 de Allen y agar nutritivo de las muestras ensayadas fue positivo cuando los cultivos se realizaron en aerobiosis y negativo, cuando lo fueron en anaerobiosis. Las células crecidas en aerobiosis, tanto en un -

medio como en otro, fueron capaces de infectar la alfalfa, lo que asegura de manera clara la naturaleza de los cultivos estudiados.

2. Experiencias de conjugación.

Transferencia del factor RP4 de *E. coli* K12-J53, RP4 a *R. meliloti*.

Se ha seguido con ligeras modificaciones la técnica descrita por Datta et al., (1971), ya que las mezclas se han efectuado sobre medio sólido y se ha disminuido el tiempo de contacto entre las mismas.

Como ya se ha indicado en Material y Métodos, el medio utilizado donde se han efectuado las distintas mezclas ha sido agar nutritivo, y el tiempo de contacto de 3 horas. La raza donadora empleada fue *E. coli* K12-J53, RP4 que se cultivó antes de la mezcla hasta la fase final de crecimiento logarítmico --- (Clowes y Hayes, 1968) y como receptoras las razas de *R. meliloti* siguientes: Rm 11, Rm 11 Str^R, Rm 4c, Rm 4c Str^R y Rm 203UVA-12, que fueron igualmente cultivadas hasta la fase final de crecimiento logarítmico, que se alcanzó entre las 12-15 horas de cultivo en agitación en medio líquido PCM.

Las frecuencias de conjugación obtenidas en los distintos cruces se exponen en la Tabla 6. Los exconjugantes de las distintas razas de *Rhizobium* obtenidos fueron previamente identificados como tales, mediante tratamiento con el fago DF2, antes de ser usados en posteriores experiencias.

TABLA 6

Frecuencia de transmisión del factor RP4 de *E. coli* K12-J53,RP4 a diversas razas de *R. meliloti*.

Cruces	Frecuencia de transmisión (por receptor)
<i>E. coli</i> K12-J53,RP4 X <i>R. meliloti</i> Rm 11	1.14×10^{-4}
<i>E. coli</i> K12-J53,RP4 X <i>R. meliloti</i> Rm 11 Str ^r	1.02×10^{-4}
<i>E. coli</i> K12-J53,RP4 X <i>R. meliloti</i> Rm 4c	2.62×10^{-3}
<i>E. coli</i> K12-J53,RP4 X <i>R. meliloti</i> Rm 4c Str ^r	2.59×10^{-3}
<i>E. coli</i> K12-J53,RP4 X <i>R. meliloti</i> Rm 203UVA-12	9.87×10^{-5}

Transferencia del factor RP4 de *R. meliloti* a *E. coli*.

Los exconjugantes de las distintas razas de *R. meliloti*, a los que fue transferido el factor RP4, fueron capaces a su vez de transmitir este factor a *E. coli*, alcanzándose en éste el

mismo nivel de resistencia a las drogas que en los donadores usados.

En estas experiencias la raza receptora empleada fue *E. coli* (Delbrück) y como razas donadoras se emplearon *R. meliloti* Rm 11,RP4; Rm 11 Str^r,RP4; Rm 4c,RP4; Rm 4c Str^r,RP4 y --- Rm 203UVA-12,RP4. El medio sobre el que se coloca la mezcla y el tiempo de contacto fueron idénticos a los de la experiencia anterior. En la Tabla 7 se exponen las frecuencias de transmisión correspondientes a estos cruces.

TABLA 7

Frecuencias de transmisión del factor RP4 de *R. meliloti* RP4 a *E. coli* (Delbrück).

Cruces	Frecuencia de transmisión (por receptor)
Rm 11,RP4 X <i>E. coli</i>	1.72 X 10 ⁻³
Rm 11 Str ^r ,RP4 X <i>E. coli</i>	4.5 X 10 ⁻⁴
Rm 4c,RP4 X <i>E. coli</i>	6.32 X 10 ⁻⁴
Rm 11 4c Str ^r ,RP4 X <i>E. coli</i>	5.28 X 10 ⁻⁴
Rm 203UVA-12,RP4 X <i>E. coli</i>	4.20 X 10 ⁻⁴

Transferencia del factor RP4 entre razas de *R. meliloti*.

Se ha seguido la técnica ya descrita. Como donadora se empleó la raza Rm 203UVA-12,RP4 y como receptoras, las razas Rm 4c Str^r y Rm 11 Str^r. En la Tabla 8 se expresan los resultados obtenidos. La utilización de una auxotrofa como donadora y medio mínimo más estreptomycinina en la selección, reduce al mínimo las posibilidades de confundir un híbrido con una donadora revertiente y resistente a este antibiótico.

TABLA 8

Frecuencia de transmisión del factor RP4 entre razas de *R. meliloti*.

Cruces	Frecuencia de transmisión (por receptor)
Rm 203UVA-12,RP4 X Rm 4c Str ^r	2.12 X 10 ⁻³
Rm 203UVA-12,RP4 X Rm 11 Str ^r	3.87 X 10 ⁻³

Transferencia del plásmido PG entre razas de *R. meliloti*.

En las experiencias del estudio de la transferencia del plásmido PG por métodos directos se ha utilizado el factor RP4 para facilitar la selección de los posibles híbridos y también pensando que, al igual que ocurre con la relación entre otros plásmidos y el factor RP4 (Chilton et al. 1976), éste podía facilitar la transmisión del plásmido PG. Como receptora se ha -

empleado la raza Rm 4c Str^r y como donadoras las razas Rm 11,RP4,PG y Rm 203UVA-12,RP4,PG.

TABLA 9

Frecuencia de transmisión del plásmido PG entre razas de *R. meliloti*, cuando la selección de híbridos se efectúa sobre medio que contiene los antibióticos para los que el factor RP4 determina resistencia.

Cruces	Frecuencia de transmisión (por receptor)
Rm 11,RP4,PG X Rm 4c Str ^r	3.53×10^{-3}
Rm 203UVA-12,RP4,PG X Rm 4c Str ^r	5.06×10^{-3}

De los cruces realizados, donde se han comprobado más de mil colonias en todos los casos, las células han resultado ser sensibles al fago AL1, esto es, habían recibido conjuntamente con el factor de resistencia múltiple, el llamado plásmido PG.

Como consecuencia de estos resultados se idearon unas experiencias para la detección indirecta de la transmisión del plásmido PG que permitieran conocer si tal elemento extracromosómico pasaba independientemente del RP4 o su transferencia es-

taba de alguna manera ligada a la del factor de resistencia.

En la Tabla 10, comienza la exposición de los resultados relativos a dichas experiencias. Se ha pretendido por tanto conocer no sólo la confirmación de la capacidad de transferencia del plásmido PG entre razas de *R. meliloti* sino la aparente relación a la hora de su transmisión, así como la auténtica frecuencia de transferencia del plásmido PG, ya que los datos indicados en la Tabla 9 vienen condicionados por la existencia de antibióticos en el medio.

En estos cruces, se han empleado como razas donadoras - las Rm 11,PG; Rm 11,RP4,PG y como receptoras en todos los casos, Rm 4c Str^r.

En la Tabla 10 son presentados los datos correspondientes al porcentaje de células que han recibido el plásmido PG, deducido de los recuentos realizados cuando, después de la conjugación, una muestra de la mezcla se cultiva en medio líquido durante 24 horas en presencia de fago AL1 y otra muestra en ausencia del mismo.

Hay que tener en cuenta que el donador es eliminado de las mezclas, ya que la selección final, después de la actuación del fago, durante 24 horas, se realiza sobre medio sólido adicionado de estreptomycin a la concentración de 1000 µg/ml.

TABLA 10

Número de células que aparecen después de haber sido cultivada la mezcla de conjugación por 24 horas en medio líquido en presencia y ausencia de fago AL1 y porcentaje de células que ha recibido el plásmido PG.

Cruces	células / ml		% de células con plásmido PG	
	con adición fago	sin adición fago	con adición fago	sin adición fago
Rm 11,PG X	2.6×10^8	7.3×10^8	64.39	100
Rm 4c Str ^r				
Rm 11,RP4,PG X	5.8×10^8	7.2×10^8	19,44	100
Rm 4c Str ^r				

Resultados medios de cuatro experiencias.

En la Tabla 11 y 12 se exponen los resultados correspondientes a la frecuencia de transmisión deducida también de forma indirecta, cuando la contraselección por el fago AL1 se efectuó sobre medio sólido, adicionado de estreptomycin para eliminar las razas donadoras. En este caso, en las placas que contienen fago, sólo crecen las células receptoras que no han recibido tal plásmido, y en las que se ha adicionado ampicilina, tetraciclina y kanamicina, las que han recibido el factor RP4. De esta

forma se puede conocer la posible relación entre ambos elementos genéticos.

TABLA 11

Número de células que crecen de la mezcla conjugante sobre medio sólido con estreptomycinina y con y sin adición de fago AL1

Cruces	Células / ml		Frecuencia de transmisión del plásmido PG
	con adición de fago	sin adición de fago	
Rm 11,PG X Rm 4c Str ^r	1.1 X 10 ⁷	2.7 X 10 ⁸	9.57 X 10 ⁻¹
Rm 11,RP4,PG X Rm 4c Str ^r	1.1 X 10 ⁷	2.5 X 10 ⁸	9.56 X 10 ⁻¹

Resultados medios de cuatro experiencias.

TABLA 12

Número de células que crecen de la mezcla conjugante sobre medio sólido con estreptomycin, con y sin adición en los antibióticos a los que determina resistencia el factor RP4.

Cruces	células / ml		Frecuencia de transmisión de RP4
	con anti-bióticos	sin anti-bióticos	
Rm 11,PG X	0	2.7×10^8	--
Rm 4c Str ^r			
Rm 11,RP4,PG X	1.8×10^5	2.5×10^8	7.2×10^{-4}
Rm 4c Str ^r			

Resultados medios de cuatro experiencias.

De los resultados presentados en estas dos tablas se deduce claramente que el plásmido PG se transfiere a alta frecuencia y el factor RP4 lo hace con independencia y los valores de su frecuencia de transmisión obtenidos por métodos directos o indirectos son coincidentes. Sin embargo en relación con el plásmido PG, los resultados obtenidos por métodos indirectos son diferentes según la contraselección se haga sobre medio líquido o sólido (Tablas 10 y 11 respectivamente), resultados que serán discutidos en su lugar correspondiente.

En la Tabla 13 se presentan los datos referentes al crecimiento de razas de *R. meliloti*, portadoras o no del factor RP4, en el filtrado de células que contienen el plásmido PG y que han sido lisadas por el fago AL1. Se han empleado las razas Rm 4c Str^r y Rm 4c, RP4 Str^r.

TABLA 13

Desarrollo de un cultivo de dos razas curadas de *Rhizobium meliloti*, una que contiene el factor RP4 y otra no, en un lisado de células por el fago AL1 y en medio PCM líquido.

Tiempo (horas)	Filtrado		Medio PCM	
	Rm 4c	Rm 4c,RP4	Rm 4c	Rm 4c,RP4
0	2.5×10^6	2.6×10^6	2.5×10^6	2.6×10^6
12	1.2×10^8	6.3×10^8	2.3×10^9	9.8×10^9
24	4.5×10^9	9.6×10^9	4.5×10^{10}	5.1×10^{10}

Resultados medios de cuatro determinaciones.

De los resultados expuestos en la Tabla 13, se deduce un ligero incremento en el número de células de los cultivos de la raza portadora del factor RP4. El lisado celular por el fago deprime el desarrollo de ambas razas aunque en mayor grado el de aquella que no posee el factor RP4.

En la Tabla 14 se exponen los resultados relativos al crecimiento de las razas de *R. meliloti* empleadas en la expe-

riencias de transferencia genética del plásmido PG, cuando se encuentra presente o ausente el factor RP4.

TABLA 14

Desarrollo de un cultivo de dos razas de *Rhizobium meliloti* portadoras del plásmido PG, una que contiene el factor RP4 y otra que no, en medio PCM líquido.

Tiempo (horas)	Razas	
	Rm 11,RP4,PG	Rm 11,PG
0	3.76×10^6	3.6×10^6
12	4.89×10^{10}	7.3×10^9
24	5.26×10^{10}	1.2×10^{10}

Resultados medios de cuatro determinaciones.

Estos resultados muestran un mayor desarrollo de los cultivos de la raza que posee el factor RP4 sobre el de aquellos de la raza que no lleva tal factor.

Obtención de polisacáridos extracelulares de *R. meliloti*.

De acuerdo con Palomares et al. (1975) la producción de polisacáridos extracelulares por las células silvestres de *R. meliloti* es del 30-40 por ciento mayor que la correspondiente a las curadas.

Se ha comprobado que cuando estas razas curadas adquieren de nuevo por conjugación el plásmido PG, alcanzan los niveles de

producción de polisacárido capsular comparables a los de las razas silvestres. En la Tabla 15 se exponen los resultados correspondientes a una de las experiencias realizadas.

TABLA 15

Polisacáridos extracelulares producidos por una raza silvestre, una curada y un híbrido que proviene de la conjugación entre - ambas.

Razas	Peso seco polisacárido * (gr)
Rm 11c Str ^F (curada)	0.87
Rm 11c Str ^F ,PG (híbrido)	1.24
Rm 11 (silvestre)	1.29

*Resultados medios de cuatro determinaciones.

Transferencia del plásmido PG de *R. meliloti* a *E. coli*.

En estos cruces, se ha empleado como raza receptora *E. coli* (Delbrück) y como donadoras, las razas Rm 11,RP4,PG y Rm 11,PG.

Tanto en un caso como en otro, los exconjugantes obtenidos, y como era de esperar, no fueron lisados por el fago AL1.

Cuando la selección se efectuó sobre medio adicionado de - kanamicina, ampicilina y tetraciclina, la frecuencia de aparición de exconjugantes que habían recibido el plásmido RP4 coincidió con la que se ha indicado en la Tabla 7.

En el caso de utilizarse Rm 11,PG como raza donadora, al no emplearse antibióticos en las placas selectivas, aparecen tanto las células que han recibido el plásmido como los restantes - receptores que permanecen inalterados. En ambos casos, al no ser asequibles los exconjugantes a la acción del fago AL1, resultó - imposible calcular, de esta manera, la frecuencia de transmisión de tal plásmido. Sin embargo, para tener una idea, y habida cuenta de los resultados obtenidos en las experiencias de transferencia del plásmido PG de exconjugantes de *E. coli* obtenidos del cruce entre Rm 11,RP4,PG X *E. coli* y Rm 4c (Tabla 17), se han realizado ensayos de adsorción del fago por los posibles exconjugantes. Se ha pensado que si el plásmido ha sido transferido, podría haber modificaciones en estas células similares a las que ocurren en *Rhizobium* que permitan la adsorción de los fagos.

En la Tabla 16 son presentados los datos correspondientes a estas pruebas.

TABLA 16

Adsorción del fago por *E. coli* que ha recibido el plásmido PG, sólo o junto con el RP4.

Bacterias	Número de partículas* no adsorbidas	% de fago adsorbido
<i>E. coli</i>	5.87×10^8 (a)	0
<i>E. coli</i> ,PG	1.8×10^6 (b)	99,69
<i>E. coli</i> ,RP4,PG	6.2×10^7 (b)	89.44

* Media de los resultados obtenidos con diez colonias aisladas en cada cruce. Diferencia entre a) y b) significativa -- ($P \leq 0.001$). Diferencia entre b) no significativa.

Transferencia del plásmido PG de *E. coli* a *R. meliloti*.

Como donadores se utilizaron las razas *E. coli*, RP4, PG y *E. coli*, PG y como receptor, la raza de *R. meliloti*, Rm 4c Str^r.

Los exconjugantes obtenidos siguiendo la técnica de conjugación usual, fueron lisados por el fago AL1.

Al efectuarse la selección sobre medio conteniendo los antibióticos a los que determina resistencia el factor RP4, la frecuencia de transmisión del plásmido PG coincidió, al igual -- que en los cruces entre razas de *R. meliloti* (Tabla 9), con la frecuencia de transmisión del factor RP4.

Cuando se utilizó como donador *E. coli*, PG crecen tanto las células receptoras que han recibido el plásmido PG como aquellas que no lo han recibido.

En la Tabla 17 se exponen los resultados relativos a la frecuencia de transmisión del plásmido PG, obtenidos de manera indirecta, de una forma similar a las transferencias realizadas del plásmido PG cuyos resultados se exponen en la Tabla 11, cuando la contraselección por el fago AL1 se efectúa, por tanto, sobre medio sólido.

TABLA 17

Número de células de la mezcla conjugante que crecen sobre medio sólido con estreptomycin, con y sin adición del fago AL1.

Cruces	células / ml		Frecuencia de transmisión del plásmido PG
	con adición de fago	sin adición de fago	
<i>E. coli</i> , PG X Rm 4c Str ^r	1.91 X 10 ⁷	2.6 X 10 ⁸	9.2 X 10 ⁻¹
<i>E. coli</i> , RP4, PG X Rm 4c Str ^r	2.08 X 10 ⁷	2.6 X 10 ⁸	9.2 X 10 ⁻¹

Resultados medios de cuatro experiencias.

Transferencia del plásmido PG a *R. leguminosarum*.

En estos cruces se ha utilizado como raza receptora *R. leguminosarum* GRO2 Str^r. Como donadoras, se han empleado Rm 203UVA-12, RP4, PG en un caso y en otro *E. coli*, RP4, PG, manteniendose las mezclas durante 3 y 20 horas.

En ambos casos, los exconjugantes obtenidos no fueron lisados por el fago AL1, por lo que, no es posible, de esta manera, conocer si ha habido transmisión del plásmido PG entre las razas utilizadas. Se realizó por ello, una prueba similar a la llevada a cabo cuando se estudió el paso de *R. meliloti* a *E. coli*, esto es, una

prueba de adsorción del fago por los posibles exconjugantes.

Adsorción del fago AL1 por *R. leguminosarum* GRO2,RP4 (PG?).

Se emplearon, en cada caso, diez suspensiones, a igualdad de volumen y número de células, de *R. leguminosarum* GRO2,RP4,PG, obtenidos tanto a partir de *E. coli*, RP4,PG como de Rm 203UVA-12,RP4 (PG?). Como testigo fue utilizado *R. leguminosarum* GRO2 Str^r, la cepa receptora.

En ningún caso hubo adsorción del fago AL1.

DISCUSION

La demostración reciente de que ciertos *Rhizobium* pueden reducir acetileno a etileno cuando crecen en medios definidos, sin el concurso por tanto de material procedente de la planta, ha derivado la investigación que se realizaba sobre la fijación de nitrógeno en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, hacia el estudio de este proceso bajo distintos puntos de vista en la bacteria donde se había inicialmente descubierto y, principalmente, en la raza 32H1 del *R. cowpea*.

Para abordar el objeto propuesto, una vez elegido *R. meliloti* como especie a ensayar en los estudios de fijación en vida libre, fue necesario antes que nada y debido a la carencia de datos, ya que sólo se tenían las referencias de los de las razas de lento crecimiento, determinar la infectividad y efectividad de clones aislados, de una determinada raza, para seleccionar -- aquellos que pudieran distinguirse y ofrecer mejores resultados.

Como se indicó en Material y Métodos y los resultados son expuestos en la Tabla 1, se determinó, utilizando las plantas de alfalfa, la infectividad y efectividad de cincuenta clones. Como se puede ver, además del peso seco se dan los valores correspondientes a la relación peso seco/número de nódulos y se ha hecho la correspondiente medida de contenido en nitrógeno, parámetro -- que junto con el anterior indican la actividad fijadora de una determinada raza.

En todos los casos se pudo observar que los nódulos se encontraban en las raíces principales y presentaban generalmente

un color rojizo, lo que es índice de una buena efectividad.

Conviene resaltar, sin embargo, que el número de clones probados ha sido pequeño y aunque en el estudio efectuado se ha tratado de minimizar las variaciones en las condiciones de experimentación, al tener que trabajar con un material heterogéneo, las semillas de alfalfa, se hace imposible obtener una adecuada homogeneidad. No hay que olvidar tampoco que las condiciones en las que se ha llevado a cabo la experiencia no han sido las ideales y por supuesto bastante diferentes a las que se dan naturalmente en el suelo, donde una serie de factores físicos, químicos y biológicos determinan condiciones particulares y en parte desconocidas que no se han tenido en cuenta en la experiencia reseñada.

De cualquier manera, puede afirmarse que los clones ensayados presentaban una adecuada capacidad de infección así como una alta efectividad, lo que los hacía aceptables para las posteriores experiencias.

La selección de los clones, que se hizo de acuerdo con un índice de efectividad que podría considerarse adecuado, resultó en la práctica poco idóneo. Como se deduce de la observación de la Tabla 2, no se presentan entre ellos las diferencias en la actividad nitrogenasa que se podían esperar de acuerdo con los valores encontrados de los índices de efectividad (peso seco/número de nódulos)*.

La disminución de actividad observada cuando las determinaciones se realizan en cultivos crecidos sobre medio definido sólido (Tabla 3) era de esperar, debido por un lado a la falta de difusión del acetileno en la masa microbiana, y por otro a los diferentes niveles de oxigenación. Las tasas de fijación obser-

* Ver nota al final de la Discusión.

vadas no deben atribuirse tanto a las bacterias que crecen sobre la superficie como a las que lo hacen en el interior, donde la tensión de oxígeno es inferior a la atmosférica por efecto de las células circundantes. Además la cantidad de moco producido, característico de estas bacterias, puede disminuir la transferencia de oxígeno en los cultivos bacterianos (Postgate, 1971) y es posible que el nivel de actividad nitrogenasa encontrado sea dependiente de la naturaleza del polisacárido producido.

Es interesante señalar a este respecto que el crecimiento a bajas tensiones de oxígeno parece ser esencial para el desarrollo de la actividad nitrogenasa cuando estas bacterias se encuentran en vida libre.

La exclusión del oxígeno (Tabla 5) inhibe tanto el crecimiento como la actividad enzimática, mientras que altos niveles de oxigenación estimulan el crecimiento, pero la bacteria no -- ejerce su actividad fijadora, como parece deducirse de las experiencias realizadas cuando se mantiene el tapón de algodón, sin sustituirlo por el de goma perforable, hasta inmediatamente antes de la inyección del acetileno.

Por otra parte, Postgate (1971) ha señalado que en las bacterias aerobias fijadoras de nitrógeno, la fijación ocurre de -- manera más efectiva a presiones de oxígeno inferiores a la at--mosférica; este parece ser también el caso de las especies de -- *Rhizobium* estudiadas. Igualmente Evans y Keister (1976) han descrito que la fijación de nitrógeno por esta bacteria creciendo en vida libre ocurre a presiones de oxígeno inferiores a 0.01 -- atmósferas, mientras que en *Azotobacter* sp y *Mycobacterium fla--vum* es más efectiva cuando la pO_2 es de 0.05 atmósferas .

La nitrogenasa de los bacteroides es rápidamente inactiva da por el oxígeno y una breve exposición de éstos al aire es - perjudicial (Bergersen y Turner, 1968). También Tjepkema y Evans (1975) y Keister (1975) han mostrado que cuando se cultiva el - *Rhizobium* sp. 32H1 y *R. japonicum* en medios líquidos, sólo se fi ja nitrógeno bajo condiciones de bajas tensiones de oxígeno. Sin embargo, Gibson et al. (1976) han descrito la existencia de una máxima actividad nitrogenasa con presiones de oxígeno entre 0.20 y 0.25 atmósferas.

Habiendose determinado la presión de oxígeno en los tubos de ensayo, al final de la experiencia, se ha visto que el cre- cimiento celular ha consumido parte del oxígeno presente en - el medio, hasta llegar a una presión adecuada para la que la - actividad fijadora pueda llevarse a cabo con cierta eficiencia; la presión de oxígeno encontrada ha sido de 0.12 atmósferas, va lor inferior al descrito como óptimo por Gibson et al. (1976) y superior a los valores dados por los autores antes citados, si bién no hay que olvidar que se trata de especies y razas distin tas. Igualmente, el glutamato es, probablemente, usado como -- fuente de nitrógeno hasta que el crecimiento celular es suficien te para el establecimiento de estas condiciones microaerófilas.

Aunque no se ha indicado en Material y Métodos, en todos - los casos se hicieron medidas de densidad óptica de los culti-- vos ensayados para ~~ten~~erlos en cuenta en los cálculos realizados pa ra conocer la actividad enzimática. Los clones indicados en la Tabla 2 presentaban crecimientos celulares muy similares, lo - que igualmente ocurrió en el caso de los cultivos que se expo- nen en la Tabla 4, pero sí es necesario, al parecer, que ocu-- rran varias divisiones celulares, (Keister, 1975) lo que se --

puede medir mediante el incremento de la D.O., habido entre el momento de la inoculación del medio y cuando se hace la medida de deducción de etileno.

Los iones amonio reprimen la nitrogenasa en la mayoría de los sistemas fijadores de nitrógeno (Tubb y Postgate, 1973; -- Brown et al., 1974; Kurz y La Rue, 1975; Gibson et al., 1976). En el caso de *R. meliloti* (Tabla 2), la adición al medio de -- NH_4^+ 0.037 M, inhibe la actividad nitrogenasa en un porcentaje importante. Al ir aumentando la concentración de amonio en el medio (Tabla 4), decrece considerablemente la actividad observada. Para mayor claridad, en la Gráfica 2 se han representado los valores indicados en la Tabla 4.

La actividad específica de la formación de etileno encontrada en este estudio es comparable en orden de magnitud a las dadas por Evans y Keister (1976), Keister (1975) y Tejepkema y Evans (1975) usando *Rhizobium* sp. "cowpea" 32H1 y *R. japonicum*.

Aunque se han dado actividades específicas de 600 nanomoles de etileno por miligramo de proteína y por hora, las tasas entre 50 y 100 son más típicas. Como comparación, se puede indicar que los bacteroides suelen presentar una actividad específica de 300 a 1500.

Hubiera sido más concluyente que de los clones estudiados se hubieran obtenido valores específicos de actividad nitroge-

nasa similares a los encontrados en el clon Rm 11 (110); sin embargo, se encuentra una gama de actividades que oscila de 0 a 100; este hecho, no sólo podría indicar errores en la técnica seguida, sino también la intervención de otras circunstancias en el proceso de desrepresión del enzima.

Cabe en este aspecto, señalar la atención sobre el hecho de que, a pesar de ser descritos frecuentemente en la literatura, el empleo de atmósferas controladas, con mezclas conocidas de gases, con *R. meliloti* no se han obtenido buenos valores de actividad nitrogenasa cuando se emplearon mezclas de helio y oxígeno o nitrógeno, carbónico y oxígeno, por lo que se podría sugerir que en esta bacteria, además de condiciones microaerófilas, una fuente de nitrógeno y un ácido dicarboxílico, intermediario del ciclo de Krebs, intervengan otros factores para que el proceso fijador pueda llevarse a cabo.

Aunque la pureza de los cultivos ha sido cuidadosamente controlada y se ha excluido toda posibilidad de bacterias contaminantes fijadoras de nitrógeno, tanto aerobias como anaerobias facultativas, hubiera sido necesario respaldar los test de reducción del acetileno a etileno mediante la utilización del $^{15}\text{N}_2$ cosa que no ha sido posible por carecer de la metodología adecuada, pero que sólo sirve de confirmación, ya que la técnica de la reducción del acetileno es recomendada por todos como fiel indicadora de la actividad nitrogenasa.

Hasta la fecha, las evidencias directas de fijación de nitrógeno en cultivos de *Rhizobium* en vida libre han estado restringidas a razas del grupo "cowpea" (Pagan et al., 1975; Kurz y La Rue, 1975; McComb et al., 1975), *R. japonicum* (Pagan et al., 1975; Kurz y La Rue, 1975) y una raza de *R. leguminosarum* (Kurz y La Rue, 1975).

Evidencias indirectas, debidas a las experiencias genéticas de transferencia de los genes nif (Dunican y Tierney, 1974); (Bishop, et al., 1977), indican que *R. trifolii*, posee la información genética necesaria para la fijación de nitrógeno. A la vista de los resultados expuestos, es posible, que todos los miembros del género *Rhizobium* posean información genética para la biosíntesis de la nitrogenasa. Elucidar la regulación fisiológica y genética de estos genes es, por tanto, de gran importancia.

El uso de factores R de la clase de compatibilidad P ha permitido no sólo la demostración de la existencia de conjugación entre miembros de las Enterobacteriáceas (Sykes y Richmond, 1970; Fullbrook et al. 1970; Datta et al. 1971; Obsen y Shipley, 1973); sino también, que este tipo de plásmidos son transmisibles de *E. coli* a *R. meliloti* y *R. trifolii* (Datta y Hedges, 1972) y *R. leguminosarum* (Beringer, 1974), así como entre razas de *Rhizobium*, *R. leguminosarum* (Beringer, 1973), *R. lupini* (Pühler et al. 1972) y *R. meliloti* (Meade y Signer, 1977).

En la mayoría de los casos, estos cruces se han realizado utilizando medios líquidos, manteniendo las mezclas una amplia gama de tiempos. Las frecuencias de transmisión dadas por los diversos autores oscilan entre 10^{-5} y 10^{-7} .

La demostración (Dixon y Cannon, 1976) de que los factores R se transfieren más fácilmente sobre medios sólidos, ha permitido incrementar la frecuencia de transmisión de estos factores que determinan resistencia múltiple, cuando se utilizan en expe

riencias de conjugación.

De acuerdo con la bibliografía citada, el factor RP4 fue capaz de transferirse desde el donador original, *E. coli* K12-J53, RP4 a diversas razas de *R. meliloti*, si bien, las frecuencias de transmisión obtenidas en estos cruces aumentaron considerablemente respecto a los valores antes citados. Como puede verse en la Tabla 6, estas frecuencias oscilan entre 10^{-3} y 10^{-4} . El medio de mezcla utilizado fue medio sólido, concretamente agar nutritivo.

La autenticidad de los híbridos obtenidos en estos cruces fue cuidadosamente probada ya que además de la selección que se efectúa por la acción de los antibióticos que permiten tan sólo el crecimiento de los auténticos exconjugantes, estos fueron probados con el fago DF2, específico de *R. meliloti*, tanto de las razas curadas como de las silvestres.

Conviene resaltar que en *R. meliloti* se retiene la transferibilidad del factor RP4, ya que es capaz, a su vez, de transmitirlo a *E. coli*. Como se deduce de la Tabla 7, donde se presentan los datos correspondientes a la frecuencia de transmisión del factor RP4 entre *E. coli* y *R. meliloti*, los exconjugantes adquieren el mismo nivel de resistencia a las drogas empleadas que en los primitivos donadores y aproximadamente a la misma frecuencia.

Los híbridos de *R. meliloti* que habían recibido el plásmido PG, fueron igualmente capaces de transmitirlo a otras razas de la misma especie. De acuerdo con los resultados expuestos en la Tabla 8, el factor RP4 puede transferirse fácilmente entre estas razas, cuando la mezcla de conjugación se mantiene sobre medio sólido.

La validez de los resultados obtenidos en estas experiencias quedan fuera de toda duda, merced a la naturaleza de las mismas por el empleo de razas auxotrofas que contienen el factor RP4 como donadoras y de razas curadas, resistentes a altas concentraciones de estreptomicina, como receptoras.

Estos hechos coinciden con los encontrados por (Beringer, 1974 y 1976) utilizando *R. leguminosarum* y diversos factores R de la clase de compatibilidad P.

Aunque no se ha indicado en Material y Métodos pues sólo se ensayó al principio del estudio, desechandose la técnica por su ineficacia, las experiencias de transferencia cuyos resultados han sido expuestas en las Tablas 6, 7 y 8, fueron llevadas a cabo también en medio líquido, utilizando una mezcla de YSB (60%) y caldo nutritivo (40%), (Beringer, 1976). Las frecuencias de transmisión, en este caso, coincidieron con las de los autores antes citados.

Meade y Signer (1977) dan valores de transferencia del factor RP4 en *R. meliloti*, en mezclas mantenidas "overnight" sobre medio sólido, de 10^{-1} .

En las experiencias de conjugación realizadas en el trabajo que aquí se expone, el tiempo de contacto entre donador y receptor fue en todos los casos de tres horas. Cuando se aumenta el tiempo de contacto, se observa un incremento de frecuencia de conjugación, haciendose equivalente a la del valor dado por Meade y Signer, pero los resultados obtenidos pueden ser dudosos ya que el crecimiento sobre el medio de mezcla, cuando se sobre-

pasa el tiempo adecuado, es demasiado abundante, lo que introduce errores en la estimación de las frecuencias calculadas al alterarse la proporcionalidad entre donador y receptor y no tener en cuenta el número de divisiones celulares que puedan ocurrir.

Se ha podido calcular que en tres horas sobre agar nutritivo, en *R. meliloti*, casi no llega a ocurrir un tiempo de generación completo. En estas condiciones, la frecuencia de transferencia del factor RP4 es del orden de 10^{-3} .

El uso de estos factores R y del fago AL1, que como ya se ha indicado no es capaz de lisar a las células que han sido curadas del plásmido PG, ha permitido poner de manifiesto la existencia de transferencia, por conjugación, de este elemento genético extracromosómico entre razas de *R. meliloti*, *R. meliloti* y *E. coli* y *E. coli* y *R. meliloti*.

En el primer caso, para el estudio de la transferencia del plásmido PG por métodos directos, entre razas curadas y no curadas, tanto silvestres como mutantes, de *R. meliloti*, la selección de los posibles híbridos se hizo en base a que recibieran también el factor RP4, ya que aquella se afectuó sobre medio adicionado de los antibióticos a los que determina resistencia dicho factor. Chilton et al. (1976) han demostrado que la introducción del factor RP4 en *Agrobacterium tumefaciens* promueve la transferencia, sobre medios sólidos, de los grandes plásmidos ----- (112-156 X 10^6 daltons) que confieren virulencia, desde razas virulentas a receptores carentes de este plásmido y por tanto avirulentas. Se planteó, entonces, la posibilidad de que el factor RP4 facilitara la transferencia del plásmido PG, aunque este es de bastante menor tamaño.

Los resultados obtenidos en estas experiencias (Tabla 9), muestran que la frecuencia de transmisión del plásmido PG coincide con la del RP4 al ser todos los híbridos lisados por el fago AL1, lo que indicaría la posibilidad de que el plásmido PG - se transfiera a mayor frecuencia que el RP4, o bien que ambos - plásmidos pudieran formar una asociación plásmido-plásmido, para constituir una unidad capaz de transmitirse conjuntamente.

Las experiencias de transferencia del plásmido PG, por métodos indirectos permiten confirmar la capacidad de transferencia del plásmido PG, además de conocer no sólo si el factor RP4 influye de alguna manera en su transferencia, sino también su auténtica frecuencia de transmisión.

En estos cruces, la contraselección por el fago AL1 se -- lleva a cabo en unos casos en medio líquido, cultivando una muestra de la mezcla conjugante con suspensión de fago durante el tiempo suficiente para la actuación del mismo. En otros, en medio sólido: a una parte alícuota de la mezcla conjugante se le adiciona un volumen de una suspensión de fago y después de ser agitados, se vierten sobre las placas que contienen la capa base.

Se observa, en el primer caso, que el factor RP4 parece disminuir el número de células que han recibido el plásmido PG (Tabla 10), mientras que en el segundo, no se manifiesta tal interferencia (Tabla 11). En ambos casos, se pone de manifiesto claramente que el plásmido PG se transmite a mayor frecuencia - que la indicada en la Tabla 9, si bien parece menor cuando la contraselección por el fago AL1 se realizó en medio líquido.



De la observación de la Tabla 11, en donde se presentan los resultados correspondientes a las experiencias de transferencia del plásmido PG por métodos indirectos, puede deducirse que este elemento genético extracromosómico se transmite a una alta frecuencia. Esta frecuencia indica que tal plásmido se transfiere con un 95% de eficiencia, esto es, casi todos los receptores reciben dicho plásmido.

Cuando en estas experiencias se adiciona al medio selectivo los antibióticos kanamicina, ampicilina y tetraciclina, además de estreptomycinina que fue empleada en todos los casos para eliminar el donador, la frecuencia de transmisión de ambos plásmidos coincide (Tabla 12), y es además similar a la ya indicada en la Tabla 9.

En estas experiencias, se pone también de manifiesto que los plásmidos PG y RP4 no constituyen una asociación que se transmita conjuntamente, como puede deducirse de sus diferentes frecuencias de transmisión, aunque no ha sido posible un estudio más exhaustivo sobre la segregación de tales caracteres.

La comprobación (Tabla 5) de que las razas curadas, utilizadas como receptores en estas experiencias y deficientes en cuanto a la producción de polisacárido capsular con respecto a las razas silvestres, alcanzan de nuevo los niveles normales de producción de polisacárido al readquirirse el plásmido PG, constituye una prueba inmejorable de la eficacia de la transmisión.

Si se admiten como ciertos los valores indicados en la Tabla 11 respecto a la frecuencia de transferencia del plásmido PG entre razas de *R. meliloti*, resulta extraña la diferencia que se observa en la frecuencia de transmisión del plásmido PG según

esté o no presente el factor RP4 y cuyos resultados se indican en la Tabla 10. Esta diferencia puede explicarse en orden a dos hechos, por una parte, la mayor velocidad de crecimiento de la raza que contiene el factor RP4 respecto a la de la que no lo contiene, como puede deducirse de los resultados expuestos en la Tabla 14, referente al desarrollo de dos razas de *R. meliloti*, una que lleva el factor RP4 y otra no, cuando se cultivan en medio PCM líquido, y por otro, la influencia que sobre estas razas ejerce el filtrado de células que contengan el plásmido PG y que hayan sido lisadas por el fago AL1. Este filtrado, aunque inhibe el crecimiento de ambas razas, desarrolla menor actividad sobre la portadora del factor RP4 (Tabla 13).

Hay que tener en cuenta, por otra parte, y de acuerdo con el número de células que aparecen en cada caso, como puede verse en las Tablas 10 y 11, que la actuación del fago AL1 ocurre mejor cuando su acción se efectúa sobre medio sólido, lo que -- probablemente se deba al acortamiento de sus fases de crecimiento, fundamentalmente de aquella durante la que el fago es capaz de infectar las células.

Hay que señalar, también que los medios empleados en ambos casos han sido distintos, siendo más favorable a la actuación -- del fago el medio YSB sólido, especialmente descrito por Vincent (1970) para el estudio fagotípico de *Rhizobium*.

Como puede observarse, en la Tabla 10 no se han dado valores de frecuencia de transmisión del plásmido PG, cuando se encuentra sólo o junto con el RP4 en las células donadoras, por no permitirlo el conjunto de alteraciones que se introducen por el hecho de cultivar la mezcla conjugante adicionada de fago AL1 durante 24 horas.

En aquellos casos en que los exconjugantes no fueron sensibles a la acción del fago AL1, lo que ocurrió cuando se emplearon como receptores en los cruces de transferencia genética, - razas de *E. coli* y *R. leguminosarum*, se realizaron pruebas de adsorción del fago. Los resultados muestran claramente la presencia del plásmido PG en los exconjugantes de *E. coli* (Tabla 16), cuando se las compara con un testigo que no ha recibido tal plásmido.

Puede observarse también en la Tabla 16 que la adsorción del fago es menor cuando en el donador se encuentran presentes - ambos plásmidos, PG y RP4, aunque el análisis estadístico de los resultados obtenidos mostró que las diferencias no son significativas.

Cuando se empleó como receptor *R. leguminosarum* en los cruces de transferencia del plásmido PG, actuando como razas donadoras tanto *R. meliloti* como *E. coli*, los exconjugantes obtenidos no sólo no fueron sensibles al fago AL1, sino que además, las pruebas de adsorción realizadas no mostraron diferencias significativas entre el tanto por ciento de fagos adsorbidos por estos exconjugantes y una raza silvestre de *R. leguminosarum*. Cabe suponer entonces que, o no ha habido transferencia del plásmido PG o que una vez en el interior de la bacteria no puede expresarse fenotípicamente. Dada la facilidad de transferencia intergenérica del plásmido PG, resultaría más lógica la segunda posibilidad, esto es, su falta de expresión fenotípica, probablemente por la acción inhibidora de un plásmido homólogo presente en *R. leguminosarum* al provocar la formación de un represor que inhiba su actuación o bien, no permitiendo su anclaje a la pared celular lo que impediría su replicación, siendo eliminado, en los

dos casos, en las multiplicaciones siguientes.

Los exconjugantes de *E. coli* fueron capaces a su vez de transferir el plásmido PG a *R. meliloti*. Estas pruebas, que se realizaron de manera similar a las ya descritas entre razas de *R. meliloti*, por métodos tanto directos como indirectos, muestran igualmente unos resultados semejantes. Como puede observarse en la Tabla 17, donde se indican los valores de paso del plásmido PG, obtenidos de manera indirecta, entre una raza de *E. coli* que posee este plásmido, sólo o junto con el RP4, y una raza curada de *R. meliloti*, la frecuencia de transmisión del plásmido PG es del orden de $9,2 \times 10^{-1}$, esto es, el 92 por ciento de los receptores han recibido dicho plásmido.

Igualmente, en estos cruces, el factor RP4 no interfiere en modo alguno en la transferencia del plásmido PG.

NOTA. La variabilidad en la actividad nitrogenasa entre cultivos procedentes de colonias aisladas de una determinada raza bacteriana ha sido descrita recientemente por Gibson et al. (1977)* y concretamente para *Rhizobium* del grupo "cowpea" de una de cuyas razas, la CB756, encuentran valores para 23 colonias de 50.4 nanomoles de C_2H_4 a 0,2; los factores responsables de este comporta

* Gibson, A.H., Scowcroft, W.R. and Pagan, J.D. 1977. Nitrogen fixation in plants: an expanding horizon? En Recent Development in Nitrogen fixation. pp 386-417. Eds. W. Newton, J.R. Postgate and C. Rodriguez-Barrueco. Academic Press. New York. London.

miento no han sido todavía aclarados. Estos resultados coinciden con los encontrados para *R. meliloti* en este trabajo.

CONCLUSIONES

1. Se ha demostrado la capacidad de *Rhizobium meliloti* para fijar nitrógeno atmosférico cuando se cultiva en ausencia de plantas en medio definido líquido y bajo presiones de oxígeno inferiores a la atmosférica. Esta es la primera vez que se describe la existencia de tal hecho en *R. meliloti* cuando crece en vida libre. La actividad fijadora es inhibida en presencia de amonio, a las concentraciones descritas en la bibliografía para los ensayos realizados con otras especies de *Rhizobium*.

2. Por razones todavía no conocidas, la actividad nitrogenasa no se manifiesta normalmente cuando estas bacterias crecen sobre medio definido sólido, al contrario que ocurre a las razas utilizadas del *Rhizobium* del grupo "cowpea".

3. El plásmido presente en células silvestres de *R. meliloti*, responsable de la capacidad de inducir la producción de poligalacturonasa por las células radicales de alfalfa y de determinar la sensibilidad de estas bacterias a ciertos fagos y que se ha llamado plásmido PG, es autotransmisible por conjugación entre razas de *R. meliloti* con un 95 por ciento de eficiencia. De la misma forma es capaz también de transmitirse de razas de *R. meliloti* a *E. coli*, prácticamente a igual frecuencia.

4. La expresión fenotípica del plásmido PG, puesta en evidencia en *R. meliloti* por la sensibilidad al fago AL1 y en *E. coli* por la capacidad de adsorción de este mismo fago, no se manifiesta de ningún modo en *R. leguminosarum*, probablemente por la

existencia en esta especie de un plásmido homólogo.

5. No existen interferencias de ningún tipo entre el plásmido PG y el factor RP4 a la hora de la transmisión del primero. Ambos plásmidos se transfieren a distinta frecuencia bajo idénticas condiciones de experimentación.

6. Como resumen, los resultados generales obtenidos en las experiencias de transferencia genética del plásmido PG, muestran que este elemento genético extracromosómico puede ser de un extraordinario valor en el desarrollo de la genética de *Rhizobium*. Este plásmido conjugativo, supuesto que sea capaz de transferir material cromosómico, hipótesis que está siendo examinada en nuestro Laboratorio, puede jugar un papel importante en la transferencia de las características simbióticas a otras bacterias y de la capacidad de fijar nitrógeno a otros organismos.

BIBLIOGRAFIA

- AL-ANI, F.Y. 1972. Genetic investigations on the root nodule - bacteria *Rhizobium*. PhD Thesis; University of Liverpool.
- ALLEN, O.N. 1951. Experiments in Soil Bacteriology. Burgess -- Publishing, Minneapolis, Minn.
- ALLEN, E.K. & ALLEN, O.N. 1950. Biochemical and Symbiotic ---- properties of the rhizobia. Bacteriol. Rev. 14, -- 273.
- ALLEN, O.N. & ALLEN, E.K. 1954. Morphogenesis of the leguminous root nodule. Abnormal and pathological plant growth. Brookhaven Symp. Biol. 6, 209.
- ALLEN, O.N. & ALLEN, E.K. 1958. Biological aspects of symbiotic nitrogen fixation. Lang (ed). Encyclopedia of plant physiology, Springer Verlag, Berlin. 8, 48.
- AMAGER, N., OBATON, M. & BLANCHERE, N. 1967. Polysaccharides -- extracellulaires of *Rhizobium meliloti*. Can. J. --- Microbiol. 13, 99.
- APPLEBY, C.A., BERGERSEN, I.J., MACNICOL, P.K., TURNER, G.L., - WITTENBERG, B.A. & WITTENBERG, J.B. 1976. Role of - leghemoglobin in symbiotic N₂ fixation. 1st Int. Sym. N₂ Fixation. Pullman, Wash. 1, 874.
- APRISON, M.H. & BURRIS, R.H. 1952. Time course of fixation of N₂ by excised soybean nodules. Science, 115, 264.

- APRISON, M.H., McGEE, W.C. & BURRIS, R.H. 1954. Nitrogen fixation by excised soybean root nodules. J. Biol. Chem. 208, 28.
- ARBER, W. & LYNN, S. 1969. DNA modification and restriction. Ann. Rev. Biochem. 38, 467.
- BALASA, R. 1956. Darch Desoxyribonucleinsäuren inducierte Veränderungen an *Rhizobium*. Naturwiss. 43, 133.
- BALASA, R. 1960. Transformation of a strain of *R. lupini*. Nature, 188, 246.
- BALASA, R. 1963. Genetic transformation of *Rhizobium*. Bacteriol. Rev. 27 (2), 228.
- BALASA, G. 1963. Genetic recombination in *Rhizobium*: a review of the work of R. Balasa. Bacteriol. Rev. 27, 228.
- BACH, M.K., McGEE, W.E. & BURRIS, R.H. 1958. Translocation of phosphosynthetic products to soybean nodules and -- their role in nitrogen fixation. Plant. Physiol. - 33, 118.
- BECKING, J.H. 1970. Plant-endophyte symbiosis in non-leguminous. Plant. Soil. 32, 611.
- BEIJERINCK, M.W. 1888. Die bakterien der papilionaceen knolchen. Botan. Ztg. 46, 725.
- BENEMAN, J.R. & VALENTINE, R.C. 1972. The pathways of nitrogen fixation. Adv. Microbiol. Physiol. 8, 59.
- BERGERSEN, F.J. 1960. Biochemical pathways in legume root nodule nitrogen fixation. Bacteriol. Rev. 24, 246.
- BERGERSEN, F.J. 1965. Ammonia, an early stable product of nitrogen fixation by soybean root nodule. Aust. J. Biol.

Sci. 18, 1.

- BERGERSEN, F.J. 1966. Nitrogen fixation in the legume root nodules. IX International Congress of Microbiology, --- Moscow. pg. 97.
- BERGERSEN, F.J. 1966. Some properties of nitrogen-fixing-breis prepared from soybean nodules. Biochim. Biophys. - Acta. 130, 304.
- BERGERSEN, F.J. 1966. Nitrogen fixation in breis of soybean root nodules. Biochim. Biophys. Acta. 115, 247.
- BERGERSEN, F.J. 1969. Nitrogen fixation in legume root nodules: biochemical studies with soybean. Roy. (London) Soc. Proc. B. 172, 401.
- BERGERSEN, F.J. 1970. The quantitative relationship between -- nitrogen fixation and the acetylene-reduction assay. Aust. J. Biol. Sci. 23, 1015.
- BERGERSEN, F.J. 1971. Biochemistry of symbiotic nitrogen fixation in legumes. Ann. Rev. Plant. Physiol. 22, 121.
- BERGERSEN, F.J. & TURNER, G.L. 1967. Nitrogen fixation by the - bacteroid fraction of breis of soybean root nodules. Biochim. Biophys. Acta. 141, 507.
- BERGERSEN, F.J. & TURNER, G.C. 1968. Comparativa studies of nitrogen fixation by soybean root nodules, bacteroid suspensions and cell free extracts. J. Gen. Microbiol. 53, 205.
- BERGERSEN, F.J. & TURNER, G.L. 1970. Gel filtration of nitrogenase from soybean root-nodule bacteroids. Biochim. Biophys. Acta. 214, 28

- BERGERSEN, F.J., TURNER, G.L. & APPLEBY, C.A. 1973. Studies of the physiological role of leghaemoglobin in soybean root nodules. Biochim. Biophys. Acta. 292, 271.
- BERINGER, J.E. 1972. R factor transfer experiments in *R. leguminosarum*. In John Innes Institute, Sixty third ---- Annual Report, III, Norwich.
- BERINGER, J.E. 1972. Genetic studies with *R. leguminosarum*. In Jonh Innes Institute, Sixty-third Annual Report, - III. Norwich.
- BERINGER, J.E. 1974. Transposition of carbenicillin resistance between plasmids in *E. coli*. Heredity. 33, 134
- BERINGER, J.E. 1974. Plasmid transfer in *Rhizobium*. Ist Int. - Symp. N₂ Fixation. Pullman.Wash, 2, 358.
- BERINGER, J.E. 1974. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. J. Gen. Microbiol. 84, 18.
- BERINGER, J.E. 1976. The demonstration of conjugation in *R. leguminosarum*. In Simbiotic Nitrogen Fixation in --- plants. (P.S. Nutman, ed). University Press. ---- Cambridge.
- BERINGER, J.E. & HOPWOOD, D.A. 1976. Chromosomal recombination and mapping in *R. leguminosarum*. Nature, 264.
- BERINGER, J.E. & JOHNSTON, A.W.B. 1977. Recent advances in --- *Rhizobium* genetics. Proc. Soc. Gen. Microbiol. 4, 145.
- BILLING, E. 1969. Isolation, growth and preservation of bacterio phages. Methods in Microbiology. Eds. J.R. Norris and D.W. Ribbons. 38, 315.

- BISHOP, P.E., EVANS, H.J., DANIEL, R.M. & HAMPTON, R.O. 1975. Immunological evidence for the capability of free living *R. japonicum* to synthesis a protion of a nitrogenase component. Biochim. Biophys. Acta. 181, 248.
- BISHOP, P.E., DAZZO, F.B., APPELBAUM, E.R., MAIER, R.J. and BRILL, W.J. 1977. Intergeneric transfer of genes involved in *Rhizobium*-legume symbiosis. Science. 198, 938-940.
- BONNIER, C. & BRAKEL, J. 1969. Lutte biologique contre la faim. Editions J. Duculot S.A. Gembloux.
- BOSE, P.D. & VENKATARAMAN, G.S. 1969. Recombination in *R. leguminosarum*. Experientia. 25, 772.
- BOUAT, A. & GRONCET, C. 1965. Notes techniques sur appareil semi-automatique de dosage de l'azote (et de certains composés volatils). Ann. Agron. 16 (1), 107.
- BRILL, W.J. 1973. Regulation of nitrogenase. In Dinitrogen Fixation. (ed. R.W.F. Hardy). Jonh Wiley and Sons. N.Y.
- BRILL, W.J. 1974. Genetics of nitrogen fixing organisms. In the Biology of Nitrogen fixation (ed. A. Quispel-North Holland. Amsterdam. 639.
- BRILL, W.J. 1976. Control of nitrogenase synthesis in *A. vine-landii*. In simbiotyc Nitrogen Fixation in plants. (P.S. Nutman, ed). University Press. Cambridge.
- BROWN, C.M., MACDONALD-BROWN, D.S. & MEERS, J.L. 1973. Physiological aspects of microbial inorganic nitrogen metabolism. Advan. Microbial. Physiol. 11, 1.
- BULEN, W.A. & LE COMTE, J.R. 1966. The nitrogenase system from *Azotobacter*: Ywo enzyme requirement for N₂ reduction ---

- ATP-dependent H₂ evolution, and ATP hydrolysis,
Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 56, 976.
- BULEN, W.A., BURNS, R.C. & LeCONTE, J.R. 1965. Nitrogen fixation hydrosulfite as electron donor with cell-free preparation of *A. vinelandii* and *Rhodospirillum rubrum*.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 53, 532.
- BURNS, R.C. 1974. Dinitrogen Fixation. Wiley. New York. Vol. I (II).
- BURNS, R.C. & HARDY, R.W.F. 1975. In Nitrogen Fixation in Bacteria and Higher Plants. Springer Verlag, New-York. pag. 47.
- BURNS, R.C., HOLSTEN, R.D. & HARDY, R.W.F. 1970. Isolation by crystallization of the Mo-Fe protein of *Azotobacter* nitrogenase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 39, 90.
- BURRIS, R.H. 1965. In Plant Biochemistry (J. Bonner and J.E. - Varner, eds) pag. 961, Academy Press. N.Y.
- BURRIS, R.H. 1966. Biological nitrogen fixation. Ann. Rev. Plant Physiol. 17, 155.
- BURRIS, R.H. 1969. Biochemistry of nitrogen fixation. Proc. Rev. Soc. London. ser B, 172, 339.
- BURRIS, R.H. 1972. Nitrogen fixation-assay methods and techniques. Methods in Enzymology. IV. S.P. Colowick and N.O. Kaplan eds. Academic press. N.Y. 415.
- BURRIS, R.H. 1974. Biological nitrogen fixation. Plant. Physiol. 54, 443.
- BURRIS, R.H. & WILSON, P.W. 1957. Methods for measurement of - nitrogen fixation. Methods in Enzymology. IV. S.P. Colowick and N.O. Kaplan eds. Academic Press, N.Y. 355.

- CANNON, F.C. 1972. A study of effectiveness and viomycin resistance in relation to the genome structure of *Rhizobium*.
PHD. Thesis. University College-Galway.
- CANNON, F.C. 1977. Cloning on nitrogen fixation (*nif*) and ---- hisgenes from *K. pneumoniae*. Soc. Gen. Microbiol. Proc. II.
- CANNON, F.C. & POSGATE, J.R. 1976. Expression of *Klebsiella* -- nitrogen fixation genes (*nif*) in *Azotobacter*. Nature, 260. 271.
- CANNON, F.C., DIXON, R.A. & POSTGATE, J.R. 1976. Derivation and properties of F-prime factors in *E. coli* carrying nitrogen fixation genes *K. pneumoniae*. J. Gen. Microbiol. 93, 11.
- CANNON, F.C., DIXON, R.A., POSTGATE, J.R. & PRIMROSE, S.B. 1974b. Chromosomal interaction of *Klebsiella* nitrogen fixation genes in *E. coli*. J. Gen. Microbiol. 80, 227.
- CANNON, F.C., DIXON, R.A., POSTGATE? J.R. & PRIMROSE, S.B. Plasmid formed in nitrogen-fixing *E. coli*-*K. pneumoniae* hybrids. I. Gen. Microbiol. 80, 241.
- CARNAHAM, I.E. & CASTLE, J.E. 1963. Nitrogen fixation. Ann. Rev. Plant. Physiol. 14, 125.
- CARNAHAM, J.E., MORTENSON, L.E., MOVER, H.F. & CASTLE, J.E. 1960. Nitrogen fixation in cell-free extracts of *Clostridium pasteurianum*. Biochim. Biophys Acta. 38, 188.
- C.I.A.F. Comité Inter-Institutos para el estudio de Técnicas Analíticas de Diagnostico Foliar. 1969.- Métodos de referencia para la determinación de los elementos minerales en vegetales. I.-Nitrógeno, P, K, Na, Ca y Hg. An. Edaf. Agrobiol. XXVIII (5-6) 409.

- CLOWES, R.C. & HAYES, W. 1968. Experiments in microbial genetics. Blackwell Scientific Publications Oxford and Edimburg.
- COLE, M.A. & ELKAN, G.H. 1972. Non-chromosomal determinants for penicillin and chloramphenicol resistance in *R. japonicum*. Paper presented to 72nd Ann. Meeting of the American Society for Microbiology.
- CORRAL, E., MONTOYA, E. & OLIVARES, J. Sensitivity to phages in *Rhizobium meliloti*. In press.
- CUTTING, J.A. & SCHULMAN, H.M. 1969. The site of heme synthesis in soybean root nodules. Biochim. Biophys. Acta. 192, 486.
- CUTTING, J.A. & SCHULMAN, H.M. 1971. Biogenesis of leghemoglobin. The determinant in the *Rhizobium*-legume symbiosis for leghemoglobin specificity. Biochim. Biophys. Acta. 229, 58.
- CHILD, J.J. 1975. Nitrogen fixation by a *Rhizobium* sp. in association with non-leguminous plant cell cultures. Nature. 253, 300.
- CHILD, J.J. & LA RUE, I.A. 1974. A simple technique for the ---- establishment of nitrogenase in soybean callus culture. Plant Physiol. 53, 38.
- CHILD, J.J., LA RUE, I.A. & HASKINS, P.M. 1973. Facile establishment of nitrogenase in time culture. Plant Physiol. 51, 349.
- CHILTON, M., FARRAND, S.T., LEVIN, R. & NESTER, E.W. 1976. RP4 - promotion of transfer of a large *Agrobacterium* plasmid which confers virulence. Genetics. 81, 609.
- DALTON, H. 1974. Fixation of dinitrogen by free-living microorganisms. C. Rev. Microbiol. 183.

- DALTON, H. & MORTENSON, L.E. 1972. Dinitrogen (N₂) fixation (with a biological chemical emphasis). Bacteriol. Rev. 36, 231.
- DALTON, H., MORRIS, J.A., WARD, M.A. & MORTENSON, L.E. 1971. --- Purification and some properties of molybdoferredoxin, a -- component of nitrogenase from *C. pasteurianum*. Biochemistry. 10, 2066.
- DANIEL, E.M. & APPLEBY, C.A. 1972. Anaerobic-nitrate, symbiotic and aerobic growth of *R. japonicum*, effects of cytochromes P-450, other haemoproteins, nitrate and nitrite reductase. Biochim. Biophys. Acta. 275, 347.
- DATTA, N. & HEDGES, R.W. 1972. Host ranges of R-factors. J. Gen. Microbiol. 70, 453.
- DATTA, N., HEDGES, R.W., SHAW, E.J., SYKES, R.B. & RICHMOD, M.H. 1971. Properties of an R-factor from *P. aeruginosa*. J. --- Bacteriol. 108, 1244.
- DAZZO, F.B. & HUBBELL, D.H. 1974. Biological nitrogen fixation. Soil Crop Sci. Soc. Florida. Proc. 34, 71.
- DENAIRE, J. & TRUCHET, G. 1974. Genetics of *Rhizobium*: A short survey. Wash. Ist Int Symp. N₂ Fixation. Pullman. 2, 343.
- DETROY, R.W., WITZ, D.E., PAREJKO, R.A. & WILSON, P.W. 1968. Reduction of N₂ by complementary functioning of two components from nitrogen fixing bacteria. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 61, 537.
- DILWORTH, M. 1966. Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. Biochim. Biophys. Acta. 127, 285.

- DILWORTH, M.J. 1969. The plant as the genetic determinant of -
leghemoglobin production in the legume-root nodule. ----
Biochim. Biophys. Acta. 184, 432.
- DILWORTH, M.J. 1974. Dinitrogen fixation. Ann. Rev. Plant. ---
Physiol. 25, 81.
- DILWORTH, M.J. & PARKER, C.A. 1969. Development of the nitrogen
fixing system in legumes. J. Theoret. Biol. 25, 208.
- DIXON, R.O.D. 1969. Rhizobia (with particular reference to rela-
tions with host plants). Ann. Rev. Microbiol. 23, 137.
- DIXON, R.A. 1974. Construction of an F-prime factor and deriva-
tion plasmids carryings the nitrogen fixation genes from
Klebsiella pneumoniae. Heredity. 33, 134.
- DIXON, R.A. & POSTGATE, J.R. 1971. Transfer of nitrogen fixation
genes by conjugation in *Klebsiella pneumoniae*. Nature, 234,
47.
- DIXON, R.A. & POSTGATE, J.R. 1972. Genetic transfer of nitrogen
fixation from *Klebsiella pneumoniae* to *E. coli*. Nature,
237, 102.
- DIXON, R.A. & CANNON, F.C. 1976. Recent advances in the genetics
of nitrogen fixation. In Symbiotic nitrogen fixation in
plants. (P.S. Nutman, ed). University Press. Cambridge.
- DIXON, R.A., CANNON, F.C. & KONDOROSI, A. 1976. Construction of
a P plasmid carryings nitrogen fixation genes from *Klebsie-*
lla pneumoniae. Nature. 260, 268.
- DOBEREINER, J., DAY, J.M. & DART, D.J. 1972. Nitrogenase activity
and oxygen sensitivity of the *Paspalum notatum*-*Azotobacter*
paspali association. J. Gen. Microbiol. 71, 103.

- DOCTOR, F. & MODI, V.V. 1976. Genetic transformation in *R. japonicum*. In Symbiotic Nitrogen fixation in Plants (P.S. Nutman, ed). University Press, Cambridge.
- DUNICAN, L.K. & CANNON, F.C. 1971. The genetic control of symbiotic properties in *Rhizobium*: evidence for plasmid control. Plant. Soil. 7, 79.
- DUNICAN, L.K. & TIERNEY, A.B. 1973. Transformation of an R-factor from *Pseudomonas aeruginosa* into *Rhizobium trifolii*. Molec. Gen. Genet. 126, 187.
- DUNICAN, L.K. & TIERNEY, A.B. 1974. Genetic transfer of nitrogen fixation from *R. trifolii* to *K. aerogenes*. Biochim. Biophys. Res. Comm. 57, 62.
- DUNICAN, L.K., TIERNEY, A.B. & O'GARA, F. 1974. Nif transfer from *R. trifolii* to *K. aerogenes*. Ist Symp. Nitrogen. Fixation Pullman. Wash. 1, 22.
- DUNICAN, L.K., O'GARA, F. & TIERNEY, A.B. 1976. Plasmid control of effectives in *Rhizobium*: transfer of nitrogen-fixing genes on a plasmid from *R. trifolii* to *K. aerogenes*. In Symbiotic nitrogen fixation in plants. (P.S. Nutman, ed). University Press. Cambridge.
- EADY, R.R. & POSTGATE, J.R. 1974. Nitrogenase. Nature. 249, 805.
- ELLFOLK, N. 1959. Crystalline leghemoglobin. Acta. Chem. Scand. 13, 596.
- ELLFOLK, N. 1950. Crystalline leghemoglobin. I. Purification procedure. Acta Chem. Scand. 14, 609.
- ELLFOLK, N. 1961. Crystalline leghemoglobin. III. Amino-acid -- composition of the two mains components. Acta Chem. Scand. 15, 545.

- GADRE, S.S., MAZUNDAR, L., MODI, W. & PAREKH, V. Interpecific transformation in *Rhizobium*. Archiv. Microbiol. 57, 388.
- GIBSON, A.H., SCOWCROFT, W.R. CHILD, I.J. & PAGAN, J.D. 1976. Nitrogenase activity in cultured *Rhizobium* sp. strain 32 H1. Nutritional and physical considerations. Arch. Microbiol. 108, 45.
- GOERZ, R.D. & PENGRA, R.M. 1961. Physiology of nitrogen fixation by a specie of *Achromobacter*. J. Bacteriol. 81, 568.
- GOODCHILD, D.J. 1966. Electron microscopy of the infection and subsequent development of the soybean nodule cells. J. Bact. 92, 204.
- GORDON, J.K. & BRILL, W.J. 1972. Mutants that produce nitrogenase in the presence of ammonia. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 69, 3501.
- HAAS, D. & HOLLOWAY, B.W. 1976. R-factor variants with enhanced sex factor activity in *P. aeruginosa*. Molec. Gen. Genet. 144, 243.
- HARDY, R.W.F. & KNIGHT, E. Jr. 1966. Reduction of N₂O by biological N₂-fixing systems. Biochim. Biophys. Res. Comm. 23, 409.
- HARDY, R.W.F. & KNIGHT, E., Jr. 1967. ATP-dependent reduction of acide and HCN by-fixing enzymes of *A. vinelandii* and *C. pastearanum*. Biochim. Biophys. Acta. 139, 69.
- HARDY, R.W.F. & JACKSON, E.K. 1967. Reduction of model substrates-nitrites and acetylenes-by nitrogenase. Federation Proc. 24, 725.

- EVANS, H.J. 1969. How legumes fix nitrogen. In J.G. Horsfall (ed): How crops grow. A century later. Centennial lecture Series. Conn. Agr. Exp. Station. 110.
- EVANS, H.J. & RUSSEL, S.A. 1971. Physiological chemistry of -- symbiotic nitrogen fixation by legumes. In Chemistry of Nitrogen Fixation (J.R. Postgate, ed.) Plenum Press. --- London. 191.
- EVANS, W.R. 1976. Reduction of acetylene by stationary cultures of free-living *Rhizobium* sp. under atmospheric oxygen -- levels. Can. J. Microbiol. 22, 949.
- FAHRAEUS, G. & LJUNGREN, H. 1959. The possible significance of pectic enzymes in root-hair infection by nodules bacteria. Physiol. Plant. 12, 145.
- FERRY, R., BLANCHERE, H. & OBATON, M. Un milieu de culture synthetique pour *R. meliloti*. Ann. Agron. 10, 219.
- FINAN, T. & DUNICAN, L.K. 1977. Factors influencing in vitro - nitrogen fixation (acetylene reduction) by *R. japonicum* 61A76 in semi-solid medium. Proc. Soc. Gen. Microbiol. 4(II).
- FISHER, R.J. & BRILL, W.J. 1969. Mutants of *A. vinelandii* unable to fix nitrogen. Biochim. Biophys. Acta. 184, 99.
- FRED, E.B., BALDWIN, I.B. & McCOY, E. 1932. Root nodule bacteria and leguminous plants. University of Wisconsin. Madison.
- FULLBROOK, P.D., ELSON, S.W. & SLOCOMBE, B. 1970. R-factor mediated betalactamase in *P. aeruginosa*. Nature. 226, 1054.

- HARDY, R.W.F. & BURNS, R.C. 1968. Biological nitrogen fixation. Ann. Rev. Biochem. 37, 331.
- HARDY, R.W.F. & KNIGHT, E. Jr. 1968. The biochemistry and postulated mechanisms of N₂ fixation. In Progress in Phytochemistry (L. Reinhold, ed.) John Wiley and Sons Ltd. Sussex. 387.
- HARDY, R.W.F. & HAVELKA, U.D. 1975. Nitrogen fixation: a key to world food. Science. 188, 633.
- HARDY, R.W.F., BURRIS, R.E. & PARSHALL, G.W. 1971. The biochemistry of nitrogen fixation. Advan. Chem. Series. 110, 219.
- HARDY, R.W.F., HOLSTEN, R.D., JACKSON, E.K. & BURNS, R.C. 1968. The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. Plant. Physiol. 43, 1185.
- HARRIGAN, W.G. & McCANCE. 1969. Laboratory methods in Microbiology. Academic Press Inc. London.
- HEDGES, R.W. & JACOB, A.E. 1974. Transposition of ampicillin resistance from RP4 to other replicons. Molec. Gen. Genet. 132, 31
- HEFFRON, F., RUBENS, C. & FALKOW, S. 1975. Translocation of a plasmid DNA sequence which mediate ampicillin resistance; molecular nature and specificity of insertion (R-factor/antibiotic resistance/ inverted repeat sequence/insertion segment). Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 72. 3623.
- HEFFRON, F., SUBLETT, R., HEDGES, R.W., JACOB, A. & FALKON, S. 1975. Origin of the TEM β-lactamase gene found on plasmids. J. Bact. 122, 250.

- HELLRRIEGEL, H. & WILFARTH, H. 1888. Untersuchungen über die - stickstoffnahrung der Gramineen und leguminosen. Beilage. Zu. der Ztschr. Ver. Rubenzucker. Ind. dtsh. Reichs.
- HEUMANN, W. 1968. Conjugation in starforming *R. lupini*. Molec. Gen. Genet. 102, 132.
- HEUMANN, W., PUHLER, A. & WAGNER, E. 1971. The two transfer -- regions of the *Rhizobium lupini* conjugation. I. Fertility factor elimination and one way transfer. Molec. Gen. Genet. 113, 308.
- HEUMANN, W., PUHLER, A. & WAGNER, E. 1973. The two transfer -- regions of the *R. lupini* conjugation. II. Genetic characterization of the transference chromosomae segments. Molec. Gen. Genet. 126, 267.
- HEUMANN, W., KAMBERGER, W., PUHLER, A., ROSCH, A., SPRINGER, R. & BURKARDT, H.J. 1974. Conjugation and transduction in *R. lupini*. IST Int. Symp. Nitrogen Fixation. Pullman. Wash. 2, 383.
- HEWITT, E.J. 1952. Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Tech. Comm. 22. Farnham Royal Brash: Commonwealth Agricultural Bureau.
- HIGASHI, S. 1967. Transfer of clover infectivity of *R. trifolii* to *R. phaseoli* as mediated by an episomic factor. J. Gen. Appl. Microbiol. 13, 391.
- HOCH, G.E., SCHNEIDER, K.C. & BURRIS, R.H. 1960. Hidrogen evolution and echange, and conversion of N₂O to N₂ by soybean root nodules. Biochim. Biophys. Acta. 37, 273.
- HOLLIDAY, R. 1956. A new Method for the identification of Biochemical mutants of microorganisms. Nature. 178, 987.

- HOLLOWAY, B.W. 1969. Genetics of *Pseudomonas*. Bact. Rev. 37, 371.
- HOLSTEN, R.D., BURNS, R.C., HARDY, R.W.F. & HERBERT, R.R. 1971. Establishment of symbiosis between *Rhizobium* and plant - cells in vitro. Nature, 232, 173.
- HOOPYKAASS, P.J.J., KLAPWIJK, P.M., NUTTI, M.P., SCHILPEROOT, R.A. & RORSCH, A. 1977. Transfer of the *A. tumefaciens*. TI -- plasmid to avirulent agrobacteria and to *Rhizobium* ex -- planta. J. Gen. Microbiol. 98, 477.
- JESSBERGER, B., PUHLER, A. & HEUMANN, W. 1975. Sequential mutagenesis in *Rhizobium lupini*. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A. 228, 162.
- JUSTICE, O.L. 1952. Agricultural Handbook (U.S. Department of Agriculture), 30, 89.
- KAUSHIK, B.D. & VENKATARAMAN, G.S. 1972. Induced variation in microorganisms. III. Genetic transfer between intact cells of the mutants of *R. trifolii*. Folia Microbiologica, 17, 393.
- KEILING, D. & WANG, Y.C. 1945. Hemoglobin in the root nodules of leguminous plants. Nature. 155, 227.
- KEISTER, D.L. 1975. Acetylene reduction by pure cultures of *Rhizobia*. J. Bacteriol. 123 (3), 1265.
- KEISTER, D.L. & EVANS, W.R. 1976. Oxygen requirement for acetylene reduction by pure cultures of *Rhizobia*. J. Bacteriol. 129 (1), 149.
- KELLY, M. 1969. Properties of purified nitrogenase of *Azotobacter chroococcum*. Biochim. Biophys. Acta. 171(I), 9.

- KELLY, M., POSTGATE, J.R. & RICHARDS, R.L. 1967. Reduction of cyanide and isocyanide by nitrogenase of *Azotobacter chroococcum*. Biochem. J. 102, 10.
- KENNEDY, I.R. 1965. Primary products of symbiotic nitrogen fixation. A study of the rate of N₂ distribution and of some transformation mechanism. PHD dissertation. University of Wuter Australia.
- KENNEDY, I.R., PARKER, C.A. & KIDBY, D.K. 1966. The probable site of nitrogen-fixation in root nodules of *Ornithopus sativus* (BBA 23304). Biochim. Biophys. Acta. 130, 517.
- KERN, H. 1969. Interspezifische transformationin zwischen *Agrobacterium tumefaciens* und *Rhizobium leguminosarum*. Arch. Microbiol. 66, 63.
- KLECKOWSKA, J. 1965. Mutations in symbiotic effectiveness in *R. trifolii*. caused by transfroming DNA and other agents. J. Gen. Microbiol. 40(3), 337.
- KLECZCOSWKA, J., NUTMAN, P.S. & BOND, G. 1944. Note on the ability of certain strains of *Rhizobium* from peas and clover to infect each others hort plants. J. Bacteriol. 48, 673.
- KLUCAS, R.V. & EVANS, H.J. 1968. An electron donor system for nitrogenase dependent acetylene reduction by extracts of soybean nodules. Plant. Physiol. 43, 1906.
- KLUCAS, R.V., KOCH, B., RUSSEL, S.A. & EVANS, H.J. 1968. Purification and some properties of the nitrogenase from soybean (*Glicine max*, Merr) nodules. Plant. Physiol. 43, 1906.
- KOCH, B. & EVANS, H.J. 1966. Reduction of acetylene to ethylene by soybean root nodules. Plant Physiol. 41, 1748.

- KOCH, B., EVANS, H.J. & RUSSELL, S. 1967. Properties of the nitrogenase system in cell-free extracts of bacteroids from soybean root nodules. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 58, 1343.
- KOCH, B.H., EVANS, H.J. & RUSSELL, S. 1967. Reduction of acetylene and nitrogen gas by breis and cell-free extracts of soybean root nodules. Plant Physiol. 42, 466.
- KOCH, B., WONG, P., RUSSELL, S.A., HOWARD, R. & EVANS, H.J. 1970. Purification and some properties of a non-heme iron protein from the bacteroids of soybean (*Glicina max*, Merr) nodules. Biochem. J. 118, 773.
- KONDOROSI, A., KISS, G.B., FORRAI, T., VINCZE, E. & BANFALVI, Z. 1977. Circular linkage map of *R. meliloti* chromosome. -- Nature. 268, 525.
- KOWALSKI, M. 1967. Transduction in *R. meliloti*. Acta Microbiol. Polon. 16, 7.
- KAWALSKI, M. 1970. Transducing phages of *R. meliloti*. Acta. Microbial. Polon. Ser. A, 2, 109.
- KOWALSKI, M. 1970. Genetic analisys by transduction of *R. meliloti* mutants with changed symbiotic activity. Acta Microbiol. Polon. Ser. A, 2, 115.
- KOWALSKI, M. & DENARIE, J. 1972. Transduction of a gene controlling the expression of nitrogen fixation in *Rhizobium meliloti*. C.R. Acad. Sci. Ser. D. 275, 141.
- KOWALSKI, M. & DENARIE, J. 1973. Transduction of effectiveness in *R. meliloti*. I.B.P. Meeting Nitrogen Fixation and the Biosphere. Edinburgh.

- KUBO, H. 1939. Uber das Hamoprotein ans den wurzelknolleehen von leguminose. Acta Phytochim. (Japan). 11, 195.
- KURZ, W.G.W. & LA RUE, T.A. 1975. Nitrogenase activity in rhizobia in absence of plant host. Nature, 256, 407.
- LANGE, R.T. & ALEXANDRE, M. 1961. Anomalous infections by *Rhizobium*. Can. J. Microbiol. 7, 959.
- LEDERBERG, J. & TATUM, E.C. 1946. Detection of biochemical mutants of microorganisms. Nature, 158, 558.
- LEDERBERG, J., CAVALLI, L.L. & LEDERBERG, E.M. 1952. Sex compatibility in *E. coli*. Genetics. 37, 720.
- LEDOUX, L., HUART, R. & JACOBS, M. 1971. Fate of exogenous DNA in *Arabidopsis thaliana*. In: Informative molecules in biological system (ed. L. Ledoux). North Holland. Amsterdam. 159.
- LEDOUX, L., BROWN, J., CHARLES, P., HUART, R., JACOBS, M., REMY, J. & WATTERS, C. 1972. Fate of exogenous DNA in mammals and plants. In: Workshop on mechanisms and propects of genetic exchange; Advances in the Bioscience S (ed. G. Raspé). Pergamon Press, Oxford. 347.
- LEWIN, B. 1977. Gene expression. (ed. John Wiley and sons). New York, London, Sidney, Toronto.
- LJUNGREN, M. 1969. Mechanism and pattern of *Rhizobium* invasion into leguminous root hairs. Physiol. Plant Supp. 5, 5.
- LORKIEWICZ, Z., ZURKOWSKI, W., KOWALCZUK, E., GORSKA-MELVE, A. 1971. Mutagenesis and conjugation in *R. trifolii*. Acta Microbiol. Polon. Ser A. III, 3-4, 101.
- LUYINDULA, N., TSHITENGE, G., LURQUIN, P. & LEDOUX, L. Etude

- des plasmides de *R. japonicum*. Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie. 83, 199.
- MAHL, M.C. & WILSON, P.W. 1968. Nitrogen fixation by cell-free extracts of *K. pneumoniae*. Can. J. Microbiol. 14, 33.
- MARECKOVA, H. 1969. Transformation in *R. japonicum*. Arch. Mikrobiol. 68, 113.
- MCCOMB, J.A., ELLIOT, J. DILWORTH, M.J. 1975. Acetylene reduction by *Rhizobium* in pure culture. Nature. 256, 409.
- MEADE, H., SIGNER, E. 1976. In: Abstr. A. Mtg. Ann. Soc. Microbiol. 106.
- MEADE, H.M. & SIGNER, E.R. 1977. Genetic-mapping of *R. meliloti*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 74 (5), 2076.
- MILLIKEN, C.E. & CLOWES, R.C. 1973. Molecular structure of an R-factor, its component drug resistance determinants and transfer factor. J. Bacteriol. 113, 1026.
- MISHUSTIN, E.N. & SHIL'NIKOVA, V.K. 1971. Biological fixation of atmospheric nitrogen. MacMillan Press. London.
- MODI, V.V. 1973. Genetic transformation of *Rhizobium*. In: I.B.P. Meeting nitrogen fixation and the biosphere. Edinburgh.
- MORTENSON, L.E. 1961. A simple method for measuring nitrogen fixation by cell-free enzyme preparations of *C. pasteurianum*. Anal. Biochem. 2, 216.
- MORTENSON, L.E. 1964. Ferredoxin and ATP, requirements for nitrogen fixation in cell-free extracts of *Clostridium pasteurianum*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 52, 272.

- MORTENSON, L., MORRIS, J.A. & JENG, D.V. 1967. Purification, metal composition and properties of molybdoferredoxin and azoferredoxin, two of the components of the nitrogen-fixing system of *C. pasteurianum*. Biochim. Biophys. Acta. 141, 516.
- NAKOS, G. & MORTENSON, L.E. 1971. Subunit structure of azoferredoxin from *C. pasteurianum*. Biochemistry. 10, 455.
- NAKOS, G. & MORTENSON, L.E. 1971. Molecular weight and subunit structure of molybdoferredoxin from *C. pasteurianum*. Biochim. Biophys. Acta. 229, 431.
- NUTMAN, P.S. 1958. The physiology of nodule formation. In: Nutrition of the legumes. (E.G. Hallsworth, eds). ----- Butterworth. London. 87.
- NUTMAN, P.S. 1965. Symbiotic nitrogen fixation. Soil Nitrogen-Agronomy. (W.V. Batholomew and F.E. Clark, eds.). 10, 363.
- NUTMAN, P.S. 1967. The relation between nodule bacteria and the legume host in the rhizosphere and in the process infection. Ecology of soil Borne Plant Pathogen. (Ed. K.F. Baker and W.C. Snyder). University of California-Verkeley. 231.
- NUTTI, M.P., LEDEBOER, A.M., LEPIDI, A.A. & SCHILPEROORT, R.A. 1977. Large plasmids in different *Rhizobium* species. J. Gen. Microbiol. 100, 241.
- O'GARA, F. & DUNICAN, C.K. 1973. Transformation and physical properties of R-factor RP4 tranfered from *E. coli* to *Rhizobium trifolii*. J. Bacteriol. 116 (3), 1177.
- OLIVARES, J. 1964. Algunos aspectos de la simbiosis leguminosa-*Rhizobium* y aplicación al estudio de la misma de los anti

cuerpos fluorescentes. Ars. Pharm. 5, 3.

- OLIVARES, J., MONTOYA, E. & PALOMARES, A.J. 1977. Some effects derived from the presence of extrachromosomal DNA in *R. meliloti*. Proc. II Int. Symp. Nitrogen Fixation. (Eds. W.E. Newton, J. R. Posgate & C. Rodriguez Barrueco). Academic Press. 375.
- OLSEN, R.H. & SHIPLEY, P. 1973. Host range and properties of the *P. aeruginosa* R-factor 1822. J. Bacteriol. 113, 772.
- OLSON, R.M. & GONZALEZ, C. 1974. *E. coli* gene transfer to unrelated bacteria by a histidine operon-RP1 drug resistance plasmid complex. Biochim. Biophys. Res. Commun. 59, 377.
- PAECH, K. & TRACEY, M.J. 1956. Modern methods of plant analysis. Springer Verlag Berlin. Gottingen-Heidelberg.
- PAGAN, J.D., CHILD, J.J., SCOWCROFT, W.R. & GIBSON, A.M. 1975. Nitrogen fixation by *Rhizobium* cultured on a defined medium. Nature. 256, 406.
- PALOMARES, A.J. 1975. Estudio sobre la producción de poligalacturonasa en la asociación *Rhizobium*-leguminosa. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- PALOMARES, A.J., MONTOYA, E. & OLIVARES, J. 1977. Induction of the production of polygalacturonase in legume roots as a consequence of extrachromosomal DNA carried by *R. meliloti*. Microbios (Cambridge) In press.
- PAREJKO, R.A. & WILSON, P.W. 1970. Regulation of nitrogenase synthesis by *K. pneumoniae*. Can. J. Microbiol. 16, 681.
- PETERS, G.A. 1975. *Azolla-Anabaena azollae* symbiosis. Plant. Physiol. 56, 34.

- PHILLIPS, D.A. 1974. Factors affecting the reduction of acetylene by *Rhizobium*-soybean cell associations in vitro. Plant. Physiol. 53, 67.
- PHILLIPS, D.A., DANIEL, R.M., APPLEBY, C.A. & EVANS, M.J. 1973. Isolation from *Rhizobium* of factors which transfer ----- electrons to soybean nitrogenase. Plant. Physiol. 51, 136.
- PHILLIPS, D.A., HOWARD, R.L. & EVANS, H.J. 1973. Studies on the -- genetic control of a nitrogenase component in leguminous root nodules. Physiol. Plant. 28, 248.
- POSTGATE, J.R. 1972. Biological nitrogen fixation. Watford. Merrow.
- POSTGATE, J.R. 1972. The chemistry and biochemistry of nitrogen fixation. London Plenum Press.
- POSTGATE, J.R. 1970. Biological nitrogen fixation. Nature. 226, 25.
- POSTGATE, J.R. 1974. New advances and future potential in biological nitrogen fixation. J. Appl. Bact. 37, 185.
- PÜHLER, A. 1971. Die Kompetenz von Donor un reciepiant in der *R. lupini*-Konjugation. Dissert. Univers. Erlangen-Nuremberg.
- PÜHLER, A., BURKARDT, M.J. & HEUMAN, W. 1972. Genetic experiments with the *P. aeruginosa* R-factor RP4 in *R. lupini*. J. Gen. Microbiol. 73, 26.
- PÜHLER, A., BURKARDT, H.J., MATTES, R.E. & HEUMAN, W. 1974. Genetic studies of class R-resistance factors in *R. lupini*. W. Zbl Bakt. Hyg. I Abt. Orig. A. 228, 168.
- QUISPTEL, A. 1974. Biological Nitrogen fixation. Amsterdam. North Holland.

- RAGGIO, M. & RAGGIO, N. 1962. Root nodules. A. Rev. Pl. Physiol. 13, 109.
- RAINA, J.L. & MODI, V.V. 1969. Genetic transformation in *Rhizobium*. J. Gen. Microbiol. 57, 125.
- RAINA, J.L. & MODI, V.V. 1971. Further studies on genetic transformation in *Rhizobium*. J. Gen. Microbiol. 65, 161.
- RAINA, J.L. & MODI, V.V. 1972. Deoxyribonucleate binding and transformation in *R. japonicum*. J. Bacteriol. 111, 356.
- SALISBURY, V., HEDGES, R.W. & DATTA, N. 1972. Two modes of "curing" transmissible bacterial plasmids. J. Gen. Microbiol. 70, 443.
- SCHELL, J. 1977. On the transfer, maintenance and expression on TI-plasmid DNA in plant cells transformed by *A. tumefaciens*. Proc. Soc. Gen. Microbiol. 4 (4), 146.
- SCHOFFL, F., WUNDER, M., TUCHTER, R., HEUMAN, W. & PUHLER, A. 1974. Regulation of chromosomal transfer in *R. lupini*. Zbl. Bakt. Hyg; I. Abt. Orig. A. 228, 155.
- SCHOLLHORN, R. & BURRIS, R.H. 1966. Study of intermediates in nitrogen fixation. Federation Proc. 24, 710.
- SCHOLLHORN, R. & BURRIS, R.H. 1967. Acetylene as a competitive inhibitor of N₂ fixation. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 58, 213.
- SCHWINGHAMER, E.A. 1974. Genetics aspects of nodulation and nitrogen fixation by legumes: the microsymbiont. In: Dinitrogen Fixation (ed. G.W. Hardy). Wiley and Co. N.Y.
- SCOWCROFT, W.R. & GIBSON, A.H. 1975. Nitrogen fixation by *Rhizobium* association with tobacco and cocopea cell cultures. Nature. 253, 351.

- SHAH, V.K., DAVIS, L.C. & BRILL, W.J. 1972. Nitrogenase. I. Repression and derepression of the iron-molybdenum and iron --- proteins in *A. vinelandii*. Biochim. Biophys. Acta. 256, 498.
- SHAH, V.K., DAVIS, L.C., GORDON, J.K., ORME-JOHNSON, W.H. & BRILL, W.J. 1973. Nitrogenaseless mutants of *A. vinelandii*. Activity, cross-reaction and EPR spectra. Biochim. Biophys. Acta. 292, 246.
- SHANMUGAN, K.T., & VALENTINE, R.C. 1975. Molecular biology of nitrogen fixation. Science, 187, 919.
- SIK, T. & OROSZ, L. 1971. Chemistry and genetics of *R. meliloti*, phage 16-3. In: Biological Nitrogen fixation in Natural and Agricultural habitats (ed. T.S. Liey E.G. Mulder). M. Nijhoff. The Hague. 57.
- SILVESTER, W.B. & SMITH, D.R. 1969. Nitrogen fixation by *Gunnera-Nostoc* symbiosis. Nature. 224, 1231.
- SIMON, M.A. & BRILL, W.J. 1971. Mutant of *Clostridium pasteurianum* that does not fix nitrogen. J. Bacteriol. 105, 65.
- SLOGER, C. & SILVER, W.S. 1967. Biological reductions catalysed by symbiotic nitrogen-fixing-tissues. Bact. Proc. 67, 112.
- SMITH, R.V., TELFER, A. & EVANS, MC. W. 1971. Complementary functioning of nitrogenase components from a blue-green alga and a photosynthetic bacterium. J. Bacteriol. 107, 574.
- SOLHEIM, B. & RAA, J. 1973. Characterization of the substances causing deformation of root hairs of *Trifolium repens*. when inoculated with *R. trifolii*. J. Gen. Microbiol. 77, 241.

- SORGER, G.J. & TROFIMENKOFF, D. 1970. Nitrogenaseless mutants of *A. vinelandii*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 65 (1), 74.
- SPRENT, J.I. 1969. Prolonged reduction of acetylene by detached soybean nodules. Planta. 88, 372.
- STANISHIH, V.A. & HOLLOWAY, B.W. 1971. Chromosome transfer in *P. aeruginosa* mediated by R-factors. Genet. Res. 17, 169.
- STEWART, W.D.P. 1966. Nitrogen fixation in plants. University of London. The Athlone Press.
- STEWART, W.D. & LEX, M. 1970. Nitrogenase activity in the blue-green algae *Plectonema boryanun* strain 594. Arch. Microbiol. 73, 250.
- STEWART, W.D.P., FITZGERALD, G.P. & BURRIS, R.H. 1967. In situ: studies in N₂ fixation using the acetylene reduction technique. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 58, 2071.
- STRANDBERG, G.W. & WILSON, P.W. 1968. Formation of the nitrogen fixing enzyme system in *A. vinelandii*. Can. J. Microbiol. 14, 25.
- STREICHER, S.L. & VALENTINE, R.C. 1973. Comparative biochemistry of nitrogen fixation. Ann. Rev. Biochem. 279.
- STREICHER, S.L., GURNEY, E.G. & VALENTINE, R.C. 1971. Transduction of the nitrogen fixing genes in *K. pneumoniae*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 68, 1174.
- STREICHER, S.L., GURNEY, E.G. & VALENTINE, R.C. 1972. The nitrogen fixation genes. Nature. 239, 495.

- STROUN, M., ANKER, P. 1971. Bacterial nucleic acid synthesis in plants following bacterial contact. Molec. Gen. Genet. 115, 92.
- SYKES, R.B. & RICHMOND, M.H. 1970. Intergenetic transfer of a beta-lactamase gene between *P. aeruginosa* and *E. coli*. Nature. 226, 952.
- TJEPKEMA, J.D. 1971. Oxygen transfer in the soybean nodule and the function of leghemoglobin. Ph. D. Dissertation: University of Michigan. Ann. Arbor.
- TJEPKEMA, J.B. & EVANS, H.J. 1975. Nitrogen fixation by free-living *Rhizobium* in a defined liquid medium. Biochem. Biophys. Res. Commun. 65, 625.
- TOWNER, K.J. & VIVIAN, A. 1976. RP4 mediated conjugation in *Acinetobacter calcoaceticus*. J. Gen Microbiol. 23, 355.
- TSHITENGE, G., LUYINDULA, N., LURQUIN, P.F. & LEDOUX, L. 1975. Plasmid DNA in *R. vigna* and *R. trifolii*. Biochim. Biophys. Acta. 414, 357.
- TUBB, R.S. 1974. Glutamine synthetase and ammonium regulation of nitrogenase synthesis in *Klebsiella*. Nature. 251, 481.
- TUBB, R.S. & POSTGATE, J.R. 1973. Control of nitrogenase synthesis in plants following bacterial contact. Molec. Gen. Genet. 113, 92.
- UNGER, L., SOKATCH, J.R. & MARTIN, R.R. 1975. I.C.N. Ucla Winter Conference on Molecular and cellular Biology. Abstract.
- VERMA. D.P.S., NASH, D.T. & SCHULMAN, H.M. 1974. Isolation and in vitro translation of soybean leghaemoglobin mRNA. Nature. 251, 74.

- VEST, G., WEBER, D.F. & SLOGER, R.C. 1973. Nodulation and nitrogen fixation. In "soybeans: improvement, production and --- uses". Amer. Soc. of Agron. (Cadvell, B.E., ed) American -- Society of Agronomy. Madison. 353.
- VINCENT, J.M. 1958. Survival of root nodule bacteria. (E.G. ----- Hallsworth, ed.), Nutrition of the legumes. Butterwoths Scientific Publications. London. 108.
- VINCENT, J.M. 1965. Environmental factors in the fixation of nitrogen by the legume. W. B. Bartholomew and F.E. Clark ed., Soil Nitrogen-Agronomy. 10, 384.
- VINCENT, J.M. 1970. A Manual for the practical of root-nodule - bacteria. I.B.P. Handbook n° 15; Blackwell Sci. Publications, Oxford and Edinburgh.
- VIRTANEN, A.I. 1945. Symbiotic nitrogen fixation. Nature. 155, - 747.
- VIRTANEN, A.J. & MIETTINE, J.K. 1963. Plant Physiology, (F.C. -- Steward, ed), III. Academic Press, New York.
- VIVIAN, A. 1971. Genetical control of fertility in *Streptomyces coelicolor* A³ (2), plasmid involvement in the interconversion of VF and IF strains. J. Gen. Microbiol. 69, 353.
- VON BULOW, J.F.W. & DOBEREINER, J. 1975. Potential for nitrogen fixation in maize genotypes in Brasil. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 72, 2389.
- WILSON, P.W. 1940. The biochemistry of symbiotic nitrogen fixation. University of Wisconsin, Madison.
- WILSON, P.W., HULL, J.F. & BURRIS, R.H. 1943. Competition between free and combined nitrogen in nutrition of *Azotobacter*. Proc.

- Nat. Acad. Sci. USA. 29, 289.
- WITTENBERG, J.B., APPLEBY, C.A., BERGERSEN, F.J. & TURNER, G.L.
1975. Leghemoglobin: the role of hemoglobin in the nitrogen
fixing legume root nodule. Annals. New York Academy of ----
Sciences. 244, 28.
- WITZ, D.F., DETRY, R.W., & WILSON, P.W. 1967. N₂ fixation by ---
growing cells and cell-free-extracts of *Bacillaceae*. Arch.
fur Microbiol. 55, 369.
- WONG, P.P. & EVANS, A.J. 1971. Poly-β-hydroxybutirate utilization
by soybean (*Glucina max*, Merr) nodules and assesment of its
role in maintenance of nitrogenase activity. Plant. Physiol.
47, 750.
- WONG, P.P., EVANS, H.J., KLUCAS, R. & RUSSELL, S.A. 1971. Investi-
gations on the pathway of electron transport to the nitroge-
nase from nodule bacteroids. Plant. Soil. Spec. Vol. 525.
- YATES, Nitrogen fixation. 1976. Trends Biochem. Sci. 17.
- YOCH, D.C. & ARNON, D.I. 1970. The nitrogen fixation system of -
photosynthetic bacteria. II. *Cromathium* nitrogenase activity
linked to photochemically generated assimilatory pover. ---
Biochim. Biophys. Acta. 197, 181.
- YOCH, D.C., BENEMAN, J.R., ARNON, D.I., VALENTINE, R.C. & RUSSELL,
S.A.. An endogenous electron carrier for the nitrogenase --
system of *Rhizobium* bacteroids. Biochem. Biophys. Res. Comm.
38, 838.
- YOCUM, C.S. 1964. Recent studies of symbiotic nitrogen fixation.
Science. 146, 432.

- ZAENEN, I., VAN LAREBEKE, N., TENCHY, H., VAN MONTAGU, M. & SCHELL, J. 1974. Supercoiled circular DNA in crown gall inducing *Agrobacterium* strains. J. Molec. Biol. 86, 109.
- ZELAZNA, I. 1964a. Transformation in *R. trifolii*. I. The influence of some factors on the transformation. Acta Microbiol. Polon. 13, 283.
- ZELAZNA, I. 1964b. Transformation in *R. trifolii*. I. Development of competence. Acta Microbiol. Polon. 13, 291.
- ZELAZNA-KOWALSKA, I. & LORKIEWICZ, Z. 1971. Conditions for genetical transformation in *R. meliloti*. Acta Microbiol. Polon. Ser. A. 3, 21.
- ZELITCH, I., WILSON, P.W. & BURRIS, R.H. 1952. The amino acid -- composition and distribution of N¹⁵ in soybean root nodules supplied N¹⁵ enriched N₂. Plant Physiol. 27, 1.
- ZURKOWSKI, W., HOFFMAN, M. & LORKIEWICZ, Z. 1973. Effect of acriflavine and sodium dodecyl sulphate on infectiveness of *R. trifolii*. Acta Microbiol. Polon. Ser. A. 5, 55.