

R-24.676

3/115

UNIVERSIDAD DE GRANADA

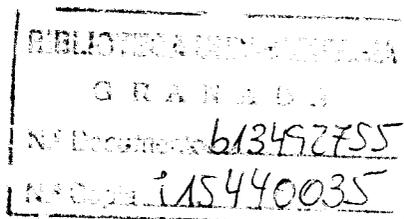
Facultad de Ciencias

Fecha 1 SET. 1975

ENTRADA NUM. 3730

ESTUDIO SOBRE LA PRODUCCION DE POLIGALACTURONASA
EN LA ASOCIACION RHI ZOBIIUM-LEGUMINOSA.

por
ANTONIO JOSE PALOMARES DIAZ



Visado con el V^oB^o:

LOS DIRECTORES

Fdo. Enrique Montoya Gomez
Catedratico de Microbiologia.
Facultad de Ciencias.

Fdo. José Olivares Pascual.
Profesor de Investigacion
del C.S.I.C.

MEMORIA presentada para
aspirar al grado de
DOCTOR EN CIENCIAS
Granada, Septiembre de 1975

Fdo. Antonio José Palomares
Diaz.
Ldo. en Ciencias Biologicas

La Memoria que presentamos ha sido realizada en la SECCION DE MICROBIOLOGIA DE LA ESTACION EXPERIMENTAL DEL ZAIDIN, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

La realización del trabajo expe
rimental ha sido sufragada por una -
Beca del Plan de Formación del Persoo
nal Docente e Investigador.

Mi sincero agradecimiento a los directores de esta tesis Dr. D. Enrique Montoya Gómez, Catedrático y Director del Departamento Interfacultativo de Microbiología de la Universidad de Granada. - Dr. D. José Olivares Pascual, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y Jefe de la Sección de Microbiología de la Estación Experimental del Zaidín. Su gran ayuda y constante orientación han hecho realidad este trabajo. Sus valiosas enseñanzas y amplio significado de la investigación han servido de base en mi formación científica, siendo para mí Profesores y Maestros al mismo tiempo.

Al Prof. Dr. D. Luís Recalde Martínez, Director de la Estación Experimental del Zaidín, C.S.I.C., por la favorable acogida dispensada.

A todos mis compañeros de la Sección y al personal de la Estación Experimental del Zaidín que en alguna forma han contribuido a llevar a cabo este trabajo.

A mi Padre († 1969).

INDICE

	<u>Pág.</u>
<u>Introducción</u>	15
Características simbióticas	22
Especificidad	22
Infectividad	31
Vía de entrada	31
Reacción de curvatura	33
Enzimas pécticos e infección	35
Polisacáridos extracelulares	38
Actividad o efectividad	41
Consideraciones genéticas sobre las características sim bióticas	42
 <u>Objeto</u>	 45
 <u>Plan de Trabajo</u>	 48
 <u>Material y Métodos</u>	 50
Microorganismos	51
Plantas	51
Suelo	51
Productos	51
Aislamiento de <i>Rhizobium</i>	52
Medios de cultivo	52
Esterilización de semillas	54

	<u>Pág.</u>
Germinación	54
Estudio del efecto de los exudados radicales sobre la - multiplicación de <i>Rhizobium</i>	55
Obtención de exudados	55
Efecto de los exudados sobre la multiplicación	56
Ensayos de infectividad	57
Ensayos de actividad	59
Preparación del inóculo	60
Inoculación de las semillas y plántulas	60
Determinación de la capacidad de inducir la producción de poligalacturonasa	61
Estudio genético	65
Tratamiento con naranja de acridina	65
Tratamiento con mitomicina C	66
Detección del ADN extracromosómico por centrifugación - diferencial en gradiente de densidad	67
Obtención, purificación y análisis de los polisacáridos extracelulares	69
Obtención	69
Purificación	70
<u>Resultados</u>	74
Estudio del efecto de los exudados radicales sobre el - crecimiento	75
Ensayo de infectividad	75
Ensayos de efectividad	79
Determinaciones de la actividad enzimática	81
Estudio genético sobre la existencia de un plasmido de- terminante de la capacidad de inducir la poligalacturo- nasa	92

	<u>Pág.</u>
Inestabilidad del carácter	92
Tratamiento con naranja de acridina	94
Tratamiento con mitomicina C	96
Separación de ADN en gradiente de densidad	98
Producción, obtención, purificación y análisis de los polisacáridos extracelulares	99
<u>Discusión</u>	109
<u>Conclusiones</u>	127
<u>Bibliografía</u>	129

INTRODUCTION

La fijación del nitrógeno es un tema que ha apasionado a los científicos durante muchos años, habiéndose investigado desde muy diferentes puntos de vista y con fines, unas veces, primariamente básicos y otras, eminentemente prácticos. La repercusión económica que supondría la sustitución de los costosos fertilizantes nitrogenados por microorganismos fijadores del nitrógeno atmosférico ha sido sin duda muchas veces el aliciente que ha permitido un desarrollo tan amplio.

Desde que Beijerinck (1888) descubriera el inicialmente llamado *Bacillus radicicola* y el mismo autor en 1901 encontrara el primer fijador libre, *Azotobacter*, la investigación subsiguiente ha seguido dos caminos, bien definidos a veces, y con un claro solapamiento otras: el estudio taxonómico y microbiológico de los organismos implicados y el estudio fisiológico, bioquímico y genético de la fijación del nitrógeno. Imposible es incluir aquí la relación interminable de autores que, de una u otra forma, han estado relacionados con algún aspecto de este tema. Sólo a modo de ejemplo y por la utilidad que presentan se pueden indicar algunas de las revisiones más recientes e interesantes: Maki y Wilson (1968), Reiderer y Wilson (1970), Mishustin y Shilnikova (1971), Becking (1971), Benemann y Valentine (1972), Dalton y Mortenson (1972), Streicher, et al. (1972),

Vest, et al. (1973), Streicher y Valentine (1973), Dalton (1974), Dilworth (1974), Postgate (1974), Burns (1974), Smanngam y Valentine (1975), Hardy y Havelka (1975).

Si bien en un principio la capacidad de fijar nitrógeno se circunscribía a un pequeño número de microorganismos, *Rhizobium*, *Azotobacter*, algas microscópicas, etc., en el transcurso de los años se ha ido ampliando esta reducida relación, de tal forma que hoy es posible decir que no hay grupo microbiano entendiendo por grupo a una familia o conjunto de familias relacionadas que no incluya algún miembro con esta característica biológica. Dalton (1974) da una lista de microorganismos fijadores bastante larga aunque incompleta, ya que a la sencilla práctica de la observación del crecimiento microbiano en medios carentes de nitrógeno, ha sustituido la sensible técnica de la reducción del acetileno (Koch y Evans, 1966; Koch, et al, 1967; Hardy y Knight, 1967), sustrato ideal para la inespecífica nitrógenasa presente en todos los organismos fijadores.

Es evidente que muchos de los microorganismos incluidos en este grupo juegan un papel nulo o poco importante en la incorporación del nitrógeno al suelo. Es más, incluso la acción de los tan traídos y llevados fijadores de vida libre, tales como los *Azotobacter* y especies afines y el *Clostridium pasteurianum* tampoco representa desde el punto de vista de la economía general de nitrógeno del suelo, un sumando de importancia. La fijación libre, aunque nada desdeñable globalmente, no evita la necesidad de la fertilización nitrogenada. La energía requerida para romper el triple enlace (Becking, 1971) que une en una molécula los dos átomos de nitrógeno es tan alta que su suministro se encuentra extremadamente limitado por el bajo contenido en materia orgánica existente en el medio natural, excepción he

cha de las algas verde azuladas que, por fotoautótrofas, son independientes de este factor. Por otra parte, el nitrógeno fijado en esta forma no es directamente asimilable por las plantas que deben crecer a sus expensas, sino que tiene antes que pasar por un complicado y largo ciclo biológico, para el que muchas veces no se dan las condiciones ambientales óptimas.

Estos inconvenientes y limitaciones no se dan, en cambio, en el caso de la fijación simbiótica, cuyo máximo exponente en cuanto a extensión y conocimiento lo constituye la asociación *Rhizobium*-leguminosa, conocida ya desde el último cuarto de siglo pasado.

Aunque taxonómicamente (Bergey, 1974) se incluyen dentro del género *Rhizobium* seis especies distintas, los criterios utilizados para su clasificación son tan débiles que se puede admitir con otros autores (Lange, 1961; Norris, 1965) que se trata de una sola especie, con una serie de variedades adaptadas cada una a determinados grupos de leguminosas. De hecho, lo que se puede decir de la fisiología y bioquímica de la fijación del nitrógeno por *Rhizobium* es perfectamente transportable de unas especies a otras, salvando solamente lo referente al grupo de plantas que cada una es capaz de infectar en condiciones naturales. Esto hace que muchos autores prefieran hablar de *Rhizobium* en general, especificando solamente cuando sea estrictamente necesario.

La importancia científica y económica de la fijación simbiótica del nitrógeno atmosférico por *Rhizobium* está fuera de toda duda. Al contrario de lo que ocurre, como se ha visto, en la fijación libre, el cultivo de leguminosas en general no requiere fertilización nitrogenada e incluso ésta puede ser perjudicial en determinados casos. El peso del nitrógeno fijado por unidad de superficie y año es

una cifra muy respetable (Bonnier y Brakel, 1969). La energía requerida para la reducción del nitrógeno es suministrada por la fotosíntesis de la planta implicada y el elemento fijado en los nódulos radicuales es inmediatamente utilizado.

Sin embargo, si globalmente el fenómeno expuesto es claro, el proceso mediante el cual una bacteria se encuentra en el suelo en los alrededores de las raíces 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 a lo largo de los años sobre este tema, 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 de N_2 con un 100 % de eficacia.

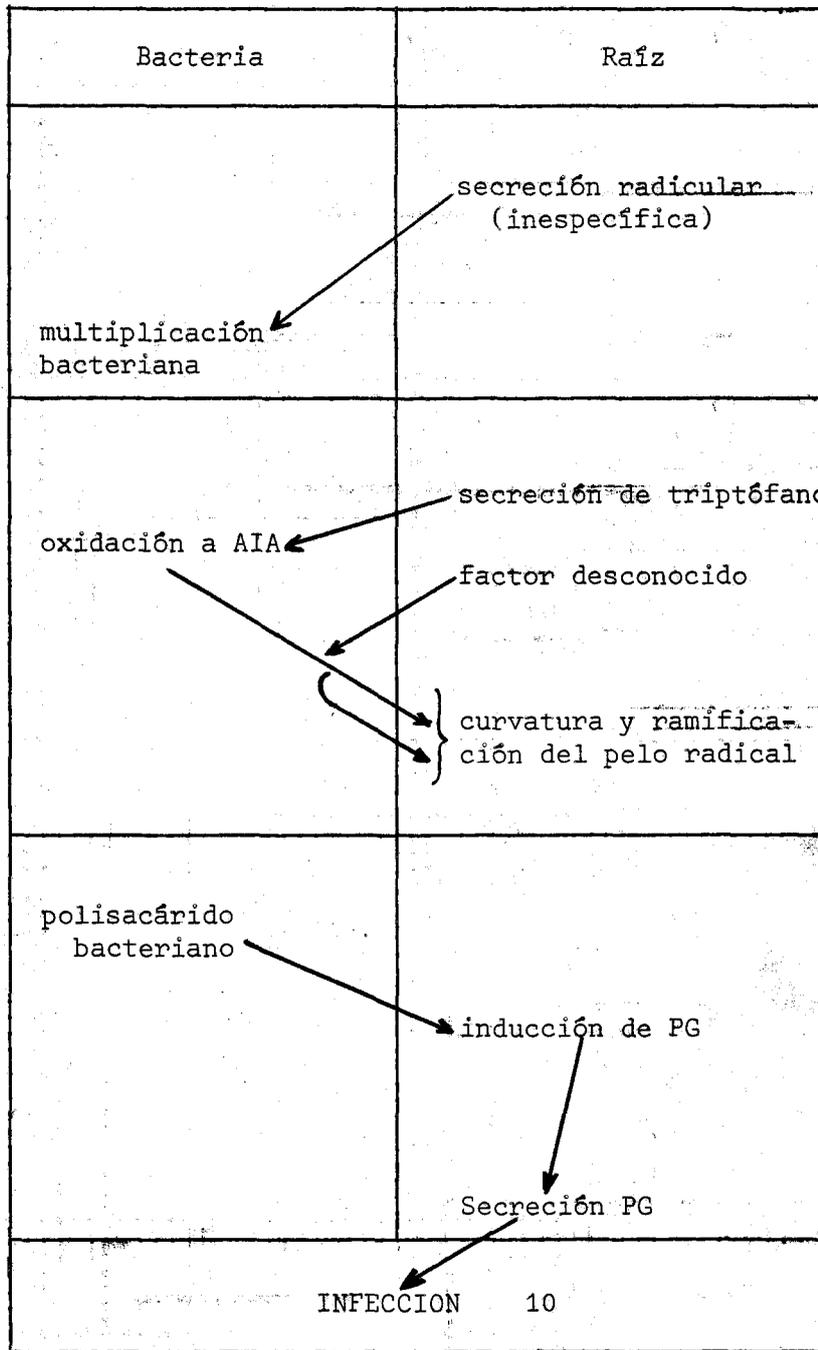
Prescindiendo de la planta, para no hacer demasiado largo este preámbulo, la fijación simbiótica de N_2 necesita que posea tres características: especificidad, infectividad y efectividad.

La primera es responsable 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 radicuales de la planta; y la tercera condiciona la fijación del nitrógeno. La fijación, sin embargo, exige al parecer la complementación de los dos genomas implicados; el de la planta y el de la bacteria. Por ello, aunque ninguna de las características citadas puede ponerse en evidencia en ausencia de la planta adecuada, la especificidad e infectividad, dependen exclusivamente de la bacteria, mientras que la efectividad, en cambio, sólo tiene lugar si existe una integración perfecta entre la célula radical y el microorganismo; ésto explica el que, hasta el momento, haya sido imposible detectar, ni aún con los métodos más sensibles, la fijación

de nitrógeno por estas bacterias en vida libre.

En el presente trabajo se ha abordado el estudio de una serie de problemas relacionados con la infección específica de las leguminosas por *Rhizobium*, dejando a un lado todos aquellos otros relacionados con la efectividad.

Si, aunque sea a título provisional, aceptamos el esquema propuesto por Nutman (1965), y mostrado en la figura 1, sobre las interacciones bacteria-raíz que conducen a la infección, la labor realizada ha versado fundamentalmente sobre aspectos relacionados con los puntos 7 y 8 del citado esquema: papel del polisacárido bacteriano en la inducción selectiva de la producción de poligalacturonasa por las raíces de las leguminosas, estudio químico del mismo y finalmente estudio de los factores genéticos que condicionan su síntesis; aspectos todos ellos sumamente conflictivos hasta el momento, como se expone en la introducción que sigue, en la que se ponen al día los conocimientos existentes sobre los citados aspectos del proceso de infección de las leguminosas por *Rhizobium*.



Características simbióticas.

Como ya se ha indicado, para que llegue a establecerse el estado simbiótico entre *Rhizobium* y leguminosa, la bacteria ha de poseer dos características bien definidas: infectividad y efectividad, o también llamada actividad y una tercera que puede ser tomada en -- consideración, aunque sus límites no son tan claros por encontrarse en cierto modo íntimamente ligada con la primera; a esta última propiedad se la conoce con el nombre de especificidad o infectividad -- dirigida a una o varias especies determinadas de leguminosas.

La especificidad e infectividad parecen independientes de la efectividad, pero ésta, al no poderse poner de manifiesto fuera de la raíz, es difícil saber si está ligada de alguna forma a aquéllas. Hay por tanto, razas infectivas efectivas y no efectivas, pero no es posible conocer en condiciones normales la existencia de razas no infectivas efectivas. Hasta ahora sólo mediante experiencias de transferencia genética y en determinados casos, puede vislumbrarse alguna evidencia al respecto.

Especificidad.

El concepto clásico por el cual el género *Rhizobium* incluye varias especies, está principalmente basado en la capacidad de infectar a un grupo determinado de leguminosas.

Pese a esto, se ha observado que *Rhizobium* específicos para un mismo grupo vegetal pueden presentar características morfológicas, biológicas y serológicas diferentes (Manil, 1963; Johnson y Means, 1963; Dudman, 1965; Date y Decker, 1965), mientras que por el contra

rio tales características pueden ser idénticas para *Rhizobium* pertenecientes a grupos de inoculación distintos. (Bonnier y Brakel, 1969).

Estos últimos autores, consideran el género *Rhizobium* como un vasto grupo de bacterias que poseen caracteres comunes y son idóneos para colonizar las especies de la familia leguminosas.

En el estudio de la especificidad, hay que tener en cuenta la adaptación de la bacteria a las condiciones físicas, químicas y biológicas ambientales, como un factor importante.

Cuando se hace una prueba de inoculación utilizando bacteria y planta apropiadas, los resultados que se obtienen no siempre son óptimos, debido a que la bacteria necesita un período de adaptación al suelo en el que vá a desarrollarse, dándose, por tanto, los mejores resultados después de la segunda o tercera siembra.

La adaptación es más rápida para las especies menos exigentes desde el punto de vista de la especificidad, especies que Bonnier y Brakel (1969) han calificado como de "especificidad laxa".

Un caso muy particular de especificidad se encuentra en plantas de leguminosas injertadas. Se ha visto que injertando sobre soja cultivada en suelo desprovisto de *R. japonicum*, diversas especies de leguminosas cuyas bacterias específicas están presentes en el suelo (Bonnier, et al., 1952; 1953a; 1953b), se logra la nodulación de las raíces de soja. De la misma forma se ha conseguido la nodulación de *Trifolium ambiguum* en un suelo donde esta planta no es nodulada, injertándola sobre la especie *Trifolium repens* cuyos *Rhizobium* específicos estaban presentes.

La especificidad bacteriana viene también determinada por -- las interrelaciones existentes en la rizosfera, entre la planta, el suelo y los microorganismos.

Los *Rhizobium* utilizan los materiales exudados al suelo por raíces de las plantas y también posiblemente por otra microflora asociada con la rizosfera.

El tiempo que estas bacterias pueden sobrevivir en el suelo en ausencia de su leguminosa huésped, depende de las condiciones del suelo, de la raza microbiana y del conjunto de plantas que crecen en ese habitat particular.

La complejidad del sistema, donde pueden interaccionar una serie de factores, ha hecho difícil decidir cual de ellos afecta a la supervivencia de esta bacteria. Tal dificultad se incrementa por el hecho de que bajo idénticas condiciones, distintas razas de *Rhizobium* pueden reaccionar de forma diferente.

La distribución geográfica de estas bacterias corresponde con la de su planta huésped y cuando una leguminosa es trasplantada a una nueva región libre de especies vegetales afines, la inoculación artificial es generalmente necesaria para asegurar el establecimiento próspero de un grupo microbiano determinado (Thornton, 1931; Fred, et al. 1932; Allen y Allen, 1958; Donald, 1960 ; Vicent, 1962).

Se han descrito muchas experiencias, especialmente con fines aplicados, que muestran el grado de supervivencia de *Rhizobium* en -- condiciones de laboratorio (Vicent, 1958). Posteriores trabajos indican que las células vegetativas de *Rhizobium* puede sobrevivir en suelo autoclavado durante 30 a 46 años cuando se les adiciona manitol (Jensen, 1961).

La temperatura y la desecación afectan a la supervivencia de *Rhizobium* en el suelo. En unos estudios de estos factores Marshall (1964), encontró que el *R. trifolii* y *R. meliloti* eran más sensibles a altas temperaturas que *R. lupini* y *R. japonicum*, comparativamente más resistentes.

Otros factores del suelo pueden afectar específicamente a estas bacterias. Ha sido observado que en suelos pobres hay un alto porcentaje de razas inefectivas de *R. trifolii* (Jones, 1963; Holding y King, 1963). Este hecho se atribuye a una mayor tolerancia de las razas inefectivas a los iones manganeso y aluminio que son encontrados en altos niveles en los suelos ácidos (Mulder y van Veen, 1960; Holding y King, 1963).

La habilidad de las especies del género *Rhizobium* para crecer en la rizosfera de no leguminosas puede ser, por supuesto, un factor determinante para sobrevivir en el suelo y en ausencia de estas plantas. Manil (1958) ha encontrado *Rhizobium* en raíces de plantas pertenecientes a las Polygonaceas, Malvaceas y Gramineas, aunque no dá información amplia.

No obstante, según otros autores, las bacterias del nódulo son poco afectadas por las raíces de las no leguminosas, la estimulación del *R. trifolii* por el algodón es una excepción (Krasil'nikov, 1958) y las razas de *Rhizobium* son más fuertemente estimuladas por sus huéspedes, a los que pueden infectar, que por otras no leguminosas.

En experiencias realizadas por Rovira (1961) sobre el efecto de exudados radicales de plantas de trebol (*Trifolium pratense*) y gramínea (*Paspalum digitatum*) sobre el crecimiento de bacterias y

hongos en general y *Rhizobium* en particular, pudo demostrar que el número de bacterias por gramo de suelo era bastante más elevado en la zona que está inmediatamente próxima a la raíz que en zonas más alejadas de ella. En el caso de la gramínea, la estimulación del crecimiento del *Rhizobium* era similar a la que ejercía esta misma planta sobre otros microorganismos. Con trebol rojo el *Rhizobium* era estimulado más fuertemente que otros microorganismos, estímulo que se manifestaba hasta una distancia de 10 a 20 mm de la raíz, aunque la superficie misma parece estar relativamente libre de bacterias nodulares (Rovira y Stern, 1961). Todo esto sugiere que nutrientes solubles son exudados por las raíces de trebol y que la difusión de estas sustancias hasta cierta distancia de la raíz estimula de forma específica el crecimiento de los *Rhizobium* del suelo. Estudios en trebol (Hely, et al., 1957; Radulovic y Nutman, 1963) y haba (Nutman, 1963), muestran que la estimulación es tan rápida y progresiva que continúa expresándose en sucesivas cosechas.

El por qué de la estimulación específica de *Rhizobium* por raíces de leguminosas no es conocido. Probablemente sea nutricional y depende de algún modo de los exudados radicales, los cuales son más numerosos y variados en las leguminosas que en otras plantas (Rovira, 1955; 1962).

Se conoce por estudios de laboratorio (Nutman, 1953; Tuzimura y Watanabe, 1966) que mientras que *R. trifolii* es estimulado por trebol (*Trifolium pratense* y *Trifolium subterraneum*) y por alfalfa (*Medicago sativa*) el *R. meliloti* sólo es estimulado por la alfalfa.

En ensayos en campo, Robinson (1967) observó que unas especies de *Rhizobium* eran estimuladas en la rizosfera de *Poa australis*.

Esta estimulación del crecimiento por una no leguminosa, como en el caso de la gramínea anteriormente citada, es más bajo que el estímulo manifestado por la leguminosa, pudiendo ésto ser un simple reflejo del hecho de que las leguminosas mantienen un número total de población rizosférica superior a las no leguminosas (Katznelson, 1965).

Hay evidencia de que los *Rhizobium* sobreviven y crecen en la rizosfera de no leguminosas. Esto puede ser esencial para el mantenimiento de algunos *Rhizobium* en el suelo en ausencia de su leguminosa huésped. No obstante, ha sido encontrado que después de 10 a 15 años de cultivo de cereales el *R. meliloti* no sobrevive en el suelo.

Es necesario hacer notar, igualmente, que hay ejemplos de efectos negativos. Así, la población próxima a las plántulas jóvenes de *T. subterraneum*, *Centrosema pubescens* y otras leguminosas pueden ser desfavorables para los *Rhizobium* porque difunden materias tóxicas desde el pericarpio de la semilla (Bonnier, 1954; Thompson, 1960; Bowen, 1961). Datos aportados por Nutman (1953) sugieren que el *R. meliloti* no crece en la proximidad del trebol porque estas plantas producen una sustancia que los inhibe.

Hay pocos estudios sobre la interacción entre *Rhizobium* y el conjunto de la microflora del suelo, aunque se sabe que algunas bacterias y hongos influyen en la nodulación de las leguminosas (Krasilnikov, 1949; Anderson, 1957).

Harris (1953) encontró que ciertos hongos y bacterias aumentaban de forma marcada la nodulación de trebol por una raza escasamente infectiva de *R. trifolii* pero tiene poco efecto sobre el comportamiento de una raza altamente infectiva. No se describe si estos microorganismos afectan la proliferación de *Rhizobium* en la rizosfe-

ra a los procesos de nodulación y fijación de nitrógeno.

En su habitat característico el *Rhizobium* tiene que competir con otros organismos rizosféricos por nutrientes y soportar antagonismos directos de algunos de ellos, aunque otros pueden estimular su crecimiento.

Los estudios de Krasilnikov y Korenyako (1944) muestran que de 18 razas de bacterias del suelo no esporuladas y Gram negativas, 13 estimulan y 2 inhiben la multiplicación de varias especies de *Rhizobium* en la rizosfera de trebol, las otras tres no actúan.

Aunque esto es índice de las interacciones que pueden ocurrir en el suelo, hay que hacer notar que el máximo número de *Rhizobium* encontrados en estas experiencias fué sólo de 2×10^3 /g., cifra baja comparada con la de 10^6 /g. encontrada por Vicent y Waters (1953; --- 1954) y de 10^7 por Purchase y Nutman (1957). Esto sugiere que uno de los medios en los cuales fueron realizados los test era impropio para *Rhizobium* o que fueron usadas razas escasamente infectivas (Harris, 1954).

El problema de tales interacciones entre *Rhizobium* y la microflora rizosférica fué indicado por Hely, et al. (1957) cuando explicaban la escasa nodulación encontrada en trebol crecido en suelos podzólicos amarillos, como debido a un antagonístico desarrollo en la rizosfera de la planta huésped.

Anderson (1957) muestra que la multiplicación de *R. trifolii* en la rizosfera podría ser reducida por la presencia de ciertos hongos, mientras Holland y Parker (1962), atribuyen el fracaso de establecimiento de leguminosas en suelos arenosos al antagonismo de los hon

gos abundantes en estos suelos y especialmente *Penicillium*, sobre el *Rhizobium*.

Hattingh y Louw (1964) muestran que el 24 % de los microorganismos aislados del suelo rizosférico inhiben hasta más de 5 razas de *R. trifolii*, con una considerable variación en la sensibilidad de las diferentes razas.

La habilidad de los *Rhizobium* para competir con la microflora nativa del suelo en la rizosfera del huésped, es de importancia práctica cuando se hace difícil el establecimiento y mantenimiento de leguminosas en el campo.

Dejando a un lado la adaptación, en relación directa con la especificidad se ha observado la estimulación del crecimiento de *Rhizobium* tanto "in vitro" como en el suelo. Estudios de Vicent y Waters (1953), Nutman (1957) y Lim (1968) dan índices de multiplicación de *Rhizobium* de 10^2 a 10^7 células/gramo en la rizosfera externa hasta 10^9 células/gramo en la rizosfera próxima.

La rápida proliferación de *Rhizobium* en agar libre de nitrógeno en el cual las plantas huésped fueron crecidas, ha sido demostrado por Vicent y Waters (1953) y Purchase y Nutman (1957). Las cifras microbianas encontradas a los 10 días fueron del orden de 10^7 cel./ml. de medio en ausencia de las raíces y 10^9 cél./ml. en presencia de ellas.

Bowen (1961) también observa una rápida proliferación de *Rhizobium* en raíces de *Centrosema pubescens* crecidas en arena; ya que después de un día el número de células encontradas fué de $5,9 \times 10^4$, y cuatro días después el nivel era de $1,9 \times 10^7$.

Todo lo expuesto sugiere que en su medio natural los nutrientes solubles son exudados por las raíces de leguminosas difundiéndose hasta una cierta distancia de la raíz ejercen su estímulo de forma más o menos intensa sobre los *Rhizobium* del suelo.

Rovira (1961), encuentra que la razón entre el número de *R. trifolii* en la rizosfera y en el suelo (R/S) oscila de 8 a 200 en el caso de trebol rojo (*Trifolium pratense*) y cuando se trataba de *Paspalum digitatum* de 6 a 13.

Tuzimura y Watanabe (1959, 1962) encuentran una razón R/S para *Rhizobium* con la leguminosa *Astragalus sinicus* que oscila entre 3.000 y 10.000 mientras que para la población bacteriana total es de 100 a 400. Se puede hablar por tanto, de una estimulación preferencial para *Rhizobium*.

Las leguminosas excretan un gran número de sustancias en la rizosfera principalmente azúcares, aminoácidos y también algunas vitaminas.

De seis leguminosas ensayadas Rovira (1961), se encontró que la biotina era excretada siempre y la niacina y el ácido pantoténico generalmente también; pero la tiamina que es un factor esencial para el crecimiento de esta bacteria, era excretada de forma esporádica.

En circunstancias naturales el *Rhizobium* depende bastante de la excreción de tiamina por otros microorganismos presentes en la rizosfera. Esto explica cómo, además de la planta huésped, otros microorganismos presentes pueden estimular el crecimiento de *Rhizobium*.

Como se ha podido observar, no se han llegado a conclusiones

definitivas sobre la naturaleza de la especificidad cuya existencia ponen algunos autores en duda precisamente por la falta de concordancia y normalización de los trabajos realizados.

Infectividad:

Esta característica simbiótica está muy relacionada con la especificidad. Para que en una leguminosa se dé el proceso de infección la bacteria responsable tiene que presentar unas características determinadas que van a hacer que la planta la reconozca como suya.

Una vez que se ha dado este reconocimiento, el grado de infectividad que posee la bacteria determina su posibilidad de entrada en la raíz.

Se puede generalizar diciendo que la infectividad es la capacidad que tiene un determinado *Rhizobium* para penetrar dentro de la raíz de su planta específica. Hay bacterias infectivas y no infectivas, que también son conocidas en la literatura como virulentas o no virulentas haciendo sinónimos los términos de infectividad y virulencia y dentro de las infectivas se distinguen distintos grados de virulencia.

Vía de entrada.- Generalmente, en todas las leguminosas, los puntos de entrada de la bacteria son los pelos radicales, particularmente en las familias *Trifoliae* y *Viciae* (Nutman, 1956); no obstante, hay una serie de plantas, entre las cuales se encuentran las legu

minosas acuáticas, que no tienen pelos radicales, en las que la entrada se produce a través de las células epidérmicas (Schaefer, 1940). - Allen y Allen (1940) citan el caso de la especie *Arachis hypogea*, en la cual el punto de entrada se encuentra junto a las raíces laterales, de manera que la localización de los nódulos es siempre adyacente a - dichas raíces.

Para explicar la entrada de *Rhizobium* en las raíces se han formulado dos hipótesis; una de ellas, debida a Dart y Mercer (1964), propugna que pequeñas formas cocoides de *Rhizobium* entran por boquetes hechos entre las microfibrillas de celulosa, mientras que otras, debida a Nutman (1956) y conocida como "teoría de la invaginación", defiende que la superficie del pelo radical se invagina dentro de la luz del mismo para formar el cordón de infección, después de una primera incorporación de las bacterias en el interior del material que - forma la pared primaria del huésped.

La pared primaria del pelo radical está constituida por sustancias pécticas que forman una fase continua y celulosa que forma una fase discontinua de fibrillas.

Durante el crecimiento del pelo radical, la red de celulosa se afloja y expande, mientras que nuevas fibrillas se forman para - mantener su estructura. Este proceso es conocido como "intususcepción" (Frey-Wyssling, 1952) al que contribuye el ácido indol acético en - virtud de su capacidad para aflojar las uniones de celulosa (Galston y Purves, 1960).

El mérito de la hipótesis de invaginación se basa en que explica la entrada de las bacterias en el interior del pelo radical sin romper la estructura primaria de la pared de la célula vegetal. No -

han sido encontrados poros en la extremidad del pelo por lo que es probable que las sustancias pécticas se endurezcan después de la invasión del *Rhizobium* (Subba-Rao, 1967).

La hipótesis de invaginación supone no sólo una afinidad química y física entre la superficie bacteriana y la pared primaria del pelo radical a nivel molecular, sino también, un mecanismo por el cual el crecimiento del pelo radical en el proceso de invasión bacteriana es dirigido hacia el interior del mismo por un proceso de invaginación.

No obstante estas teorías expuestas, el mecanismo exacto de entrada del *Rhizobium* no está todavía bien establecido.

Reacción de curvatura. - Muy pocas observaciones de la infección han sido realizadas en el suelo estando todos los estudios basados en plantas crecidas en cultivos en medio líquido o en agar.

La primera indicación visible de la interacción *Rhizobium*-leguminosa es la elongación y deformación de los pelos radicales (Thornston y Nicol, 1938; Haack, 1964).

Los pelos radicales son previamente deformados en su extremidad en forma de bucle o rizo en un característico "cayado de pastor" (curling). Sólo en una pequeña proporción de pelos aparece deformación y no todos los pelos deformados son infectados (Nutman, 1965).

Haack (1964) encontró que la estimulación del crecimiento del pelo radical, no era específica de la interacción leguminosa *Rhizobium* ya que en pruebas realizadas con raíces en tres especies de no leguminosas también fueron significativamente estimuladas por *Rhi*

zobium. Sin embargo, en ensayos realizados en otras leguminosas no se encontraron estimulaciones significativas.

La curvatura del pelo radical no se da en no leguminosas y en las leguminosas ha sido encontrado que la reacción de "curling" depende de la raza de *Rhizobium* añadido al huésped (Sahlman y Fahraeus, -- 1962; Haack, 1964). El "curling" puede también ser inducido por filtrados de extractos de nódulos libres de células (Kostermans, 1935; - Chen, 1938; Thimann, 1939).

Según Solheim y Raa (1973), el polisacárido puede ser uno, de por lo menos dos factores, que participan en la deformación del pelo radical que generalmente precede a la infección del huésped. El otro factor al cual se le atribuye la deformación es el ácido indol acético excretado por *Rhizobium* y formado por oxidación del triptófano exudado por la planta (Kefford, et al., 1960) .

El *Rhizobium* en medios de cultivo ordinarios puede oxidar el triptófano a ácido indol acético. Cuando éste aminoácido se adiciona en cantidades próximas a una parte por millón a un medio hidropónico en el que crecen leguminosas, la cantidad de ácido indol acético formado es tan grande que se llega a inhibir el crecimiento de las raíces (Nuttman, et al., 1945),

Ha sido demostrado que el ácido indol acético induce la deformación del pelo radical en *Trifolium pratense* (van der Starre, et al., 1967), mientras que similares efectos no fueron observados por otros investigadores cuando ensayaban iguales concentraciones de ácido indol acético frente a *Trifolium repens* (Sahlman y Fahraeus, 1962).

Los trabajos realizados con bacterias y extractos bacterianos

muestran que la reacción de curvatura y ramificación de los pelos radicales es más específica, que cuando se utiliza ácido indol acético solamente (Sahlman y Fahraeus, 1962; Haack, 1964).

Por otra parte, los filtrados obtenidos de bacterias crecidas en la rizosfera son más activos que los filtrados de células crecidas en medio de cultivo. Esto sugiere que algún cofactor es producido por la raíz, factor radicular que es estable al calor y contiene un componente de alto peso molecular (Fahraeus, 1963).

Enzimas pécticos e infección. - Es bastante difícil explicar la entrada de *Rhizobium* dentro de los pelos radicales sin romper la pared de las células próximas al lugar de infección. La invasión por *Rhizobium* es diferente a la de varios hongos, en los cuales se sabe que la entrada en los tejidos de las plantas superiores es por emisión de unos propagulos o fragmentos de micelio.

Desde principios de siglo muchas infecciones fúngicas de las plantas han sido relacionadas con la capacidad de los hongos para producir enzimas pectinolíticos. Sin embargo, la búsqueda de enzimas pécticos en cultivos puros de *Rhizobium* ha sido negativa (McCoy, 1932; Smith, 1958; Clarke y Tracey, 1956).

Como se ha indicado el paso de la bacteria al interior de la raíz implica el debilitamiento y ruptura de la pared celular. Se ha demostrado que el ácido indol acético es uno de los responsables de esta acción sobre la pared, pero de efecto indirecto. Nuevas proteínas son necesarias para que esta distensión tenga lugar cuya síntesis está relacionada con la presencia del ácido indol acético (Key, et al., 1967).

Por otra parte se sabe que los niveles de celulasas, β -1-3 glucanasa y pectinasa varían en los epicotilos de guisante como consecuencia de la adición de ácido indol acético (Datko y MacLachlan, 1968). Si todas estas observaciones se aplican a las raíces, estas enzimas podrían permitir el ablandamiento y distensión de las células de la pared, lo cual indicaría el comienzo de la infección.

No se prestó atención a la degradación enzimática de pectinas en la pared celular de los pelos radicales por *Rhizobium* hasta que Fahraeus y Ljunggren (1959, 1968) y Ljunggren y Fahraeus (1961), demostraron que se producía poligalacturonasa "in situ", en los alrededores de la raíz cuando un *Rhizobium* específico interaccionaba con la raíz de una leguminosa susceptible de ser infectada por esta bacteria.

Del mismo modo, Subba-Rao y Sarma (1968) demostraron que cuando las raíces estaban asociadas con *Rhizobium* se daba un aumento en la actividad de polimetilesterasa.

Sin embargo esta actividad enzimática se presenta también en medios donde crecen plantas de leguminosas que no han sido inoculadas mientras que la poligalacturonasa solamente se produce en aquellos casos en que las plantas han sido inoculadas con su bacteria específica.

Estos resultados anteriores no alteran necesariamente la teoría de invaginación de Nutman (1956), sino que ayudarían a explicar más claramente los procesos de invaginación como una consecuencia bioquímica específica de los momentos iniciales de la asociación bacteria-raíz.

Ljunggren y Fahraeus (1961) realizaron experimentos en los cuales utilizaron razas de *Rhizobium* infectivas, de virulencia media

y no infectivas, aisladas de un mismo grupo de inoculación, a las --
cuales se les permitió interaccionar con varias especies de plantas
de diversa susceptibilidad bajo condiciones asépticas para impedir --
la intervención de otros microorganismos. Los resultados indicaron, --
que la infección de las semillas estaba altamente correlacionada con
la producción de poligalacturonasa. El enzima producido "in situ" --
debilita la pared celular de los pelos radicales por una despolimeri-
zación parcial de la pectina, lo que facilitaría la invasión bacteria-
na como sucede en la teoría de invaginación de Nutman, anteriormente
citada.

Según Ljunggren y Fahraeus (1961), ciertas sustancias solu-
bles en agua y específicas de la bacteria, principalmente de natura-
leza polisacarídica y conteniendo ADN, pasan a través de la pared de
los pelos radicales y alcanzan el protoplasma, donde, después de reac-
cionar con algún componente del mismo, se convierten en un "organiza-
dor" que induce la producción de poligalacturonasa y su liberación a
los alrededores de la raíz.

Los filtrados libres de células de cultivos de *Rhizobium* in-
ducen la producción de poligalacturonasa en la proximidad de las raí-
ces en la misma forma que lo hacen las suspensiones microbianas, lo
que sugiere que el enzima es producido por la planta como respuesta
a la inducción provocada por alguna sustancia sintetizada por la bac-
teria.

La validez de la hipótesis de Fahraeus y Ljunggren ha sido --
discutida por Lillich y Elkan (1968), los cuales fueron incapaces de
encontrar diferencias en la actividad protopectinásica cuando la so-
ja era inoculada con razas infectivas y no infectivas de *R. japonicum*.
Para confirmar sus resultados, repitieron las experiencias de Fahraeus

y Ljunggren con trebol, utilizando idénticas razas de *Rhizobium* y no encontrando diferente producción de enzima por las raíces del huesped inoculado con una raza infectiva de *R. trifolii* y una raza no infectiva de *R. japonicum*, es más, el último ensayo dió una actividad enzimática mayor.

Estos mismos autores dicen que la disminución de viscosidad de una solución de pectina, base del método de medida de esta actividad enzimática, obtenida en todos estos experimentos estaba por debajo de los límites de resolución del método. Los valores obtenidos en estos ensayos están entre el 10 y el 20%, mientras que se estiman un mínimo del 30% de descenso de viscosidad para poder considerarlo un resultado significativo.

Polisacáridos extracelulares. - Ya se ha indicado como Fahraeus y Ljunggren (1959) relacionan la infectividad de los *Rhizobium* con la presencia en la cápsula de polisacáridos que inducen la producción de poligalacturonasa por las raíces de las leguminosas. Asimismo, estos autores sugirieron años después que la especificidad está generalmente determinada por el polisacárido capsular (Fahraeus y Ljunggren, 1968; Ljunggren, 1969).

El estudio de los polisacáridos extracelulares producidos en gran cantidad por las especies del género *Rhizobium*, especialmente en medios adecuados (Ferry, et al., 1959; Bergersen, 1961; Vicent, 1962; Dudman, 1964a), ha ocupado la atención de numerosos investigadores (Grenland, et al., 1962; Clapp y Emerson, 1965; Barker, et al., 1967; Swincer, et al., 1968; Finch, et al., 1968; Swincer, et al., 1969), aunque los resultados no han sido todavía definitivos, por la falta de métodos apropiados para la obtención de un producto purificado en cantidad suficientemente grande para su caracterización.

Las revisiones realizadas sobre este tema muestran que en la mayoría de los trabajos se han utilizado para el crecimiento bacteriano medios sólidos (Anderson, 1933; Cooper, et al., 1938; Bray, et al., 1944) que entre otros inconvenientes presenta la contaminación significativa por agar (Bray, et al., 1944; Yaphe, 1957; Yaphe, 1958).

A partir de Davis y Clap (1961) todos los autores utilizan generalmente el medio líquido para el cultivo del microorganismo productor, que presenta indudables ventajas: utilización de grandes volúmenes, difusión del polisacárido al medio, posibilidad de aireación, ausencia de polisacáridos extraños, etc.

Schluchterer y Stacey (1945) señalan tres posibles funciones a los polisacáridos producidos por *Rhizobium*: intervención en la formación del cordón de infección en los pelos radicales, acumulación de material de reserva para la planta y por último como un mecanismo de defensa de la bacteria. Esta hipótesis carece hoy día de sentido una vez que se ha profundizado más en esta materia.

Los métodos químicos (Schluchterer y Stacey, 1945; Hepper, 1972) e inmunológicos usuales (Dudman, 1964b; Dudman y Heidelberg, 1969; Heidelberg, et al., 1970), no han sido muy afortunados en el establecimiento de diferencias entre los polisacáridos de las distintas especies.

La cromatografía en papel y electroforesis (Amarger, et al., 1967), la utilización de geles de DEAE-dextranos (Dudman, 1972) e incluso la cromatografía de gases (Bjorndal, et al., 1971), han sido las técnicas más generalmente usadas en el estudio de estas sustancias. En su composición no hay mucho acuerdo entre los diversos auto

res, ya que mientras Hopkins, et al. (1930) encuentran glucosa y ácido gluconónico como componentes de los polisacáridos de *R. trifolii*, *R. leguminosarum* y *R. meliloti*, Cooper, et al. (1938) en una raza de *R. trifolii* y otra de *R. meliloti*, Humphrey y Vicent (1959) y Graham (1965) han puesto de manifiesto además de estos componentes, el ácido 4-O metilglucurónico en polisacáridos de *R. trifolii*, *R. leguminosarum* y *R. phaseoli*, pero no han encontrado glucosa en los de *R. meliloti*. Kleczkowski y Kleczkowski (1952) señalan la presencia de fructosa en polisacáridos producidos por una raza de *R. leguminosarum* y Dudman (1964b) ha encontrado galactosa en razas de *R. meliloti*.

Confirmando trabajos anteriores, diversos autores (Dudman y Heidelberger, 1969; Bjorndal, et al., 1971; Zevenhuisen, 1971; Hepper, 1972) han señalado la única presencia de glucosa, galactosa y ácido gluconónico como constituyentes de los polisacáridos en las especies estudiadas por ellos.

Finalmente, mientras Bailey, et al. (1971) señala la presencia de manosa en especies de *Rhizobium*, Humphrey, et al. (1974) indican la ausencia de la misma en polisacáridos extracelulares de las especies de crecimiento rápido: *R. trifolii* y *R. meliloti*.

De esta breve reseña bibliográfica sobre los polisacáridos capsulares de *Rhizobium* se deduce que es imposible poner de acuerdo a los distintos autores y en orden toda la información existente. Es difícil, por tanto, extraer conclusiones concordantes y sobre todo, a pesar del amplio estudio realizado por todos estos autores, establecer una relación clara y precisa entre cantidad y calidad de polisacárido extracelular de *Rhizobium* y dos de sus características simbióticas, especificidad e infectividad, ya que la mayor parte del trabajo realizado ha sido dirigido al estudio químico de tal tipo de sustancias.

Actividad o efectividad:

No todas las razas infectivas son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico sino solamente aquéllas que poseen condiciones para ello y que son las conocidas como activas o efectivas.

Hay varios grados de efectividad, desde la ineficacia total - característica de razas desprovistas del poder fijador hasta la actividad muy elevada de aquéllas que son particularmente seleccionadas - para la inoculación artificial por bacterización de semillas.

Por otra parte, el grado de efectividad de una raza constituye una propiedad que se creía relativamente estable pero que al depender en parte de factores ligados a la presencia de ADN extracromosómico puede manifestar alteraciones en uno u otro sentido.

Como criterio de actividad, además del aspecto morfológico y lugar de asentamiento de los nódulos producidos, se toma universalmente el efecto que la infección produce sobre distintos parámetros de las plantas desarrolladas en presencia de estas bacterias: peso fresco, seco, contenido en nitrógeno y nitrógeno total, tanto en la parte aérea como en la raíz.

Muchos han sido los trabajos realizados para conseguir encontrar una característica principalmente bioquímica, en la bacteria o nódulo, que está claramente relacionada con la actividad para facilitar su ensayo. Hasta ahora sólo se tienen indicios o suposiciones más o menos bien fundamentadas que no sustituyen las clásicas determinaciones (Hunt, 1951; Yakovleva, 1959; Okuda y Yamaguchi, 1960; Yakovleva, 1961; Holding y King, 1963; Gelim y Blixt, 1964; Hoffmann, 1964; Schwinghamer, 1964; Dimchev, 1965; Gupta y Sem, 1965a; 1965b; Sen, --

1965; Dobereiner, 1966).

Como se dijo al principio esta característica se pone de manifiesto sólo cuando se encuentran en íntima asociación bacteria y planta. La incapacidad de las bacterias pertenecientes al género *Rhizobium* para fijar nitrógeno en vida libre, dificulta considerablemente cualquier estudio fisiológico, bioquímico o genético que se pretenda llevar a cabo con estos microorganismos, que aunque crecen bien sobre los medios de cultivo en el laboratorio, su comportamiento es distinto al menos en parte, a cuando se desarrollan en el interior de los nódulos de las raíces de las leguminosas.

El estudio de la efectividad está íntimamente ligado al de la fijación del nitrógeno tanto desde el punto de vista bioquímico como genético y en numerosos aspectos, especialmente genéticos, con la especificidad e infectividad, por lo que vá a ser concluída esta introducción haciendo unas consideraciones genéticas sobre estas características simbióticas, una de las cuales, la infectividad ha sido objeto de estudio bajo este punto de vista en este trabajo que aquí se presenta,

Consideraciones genéticas sobre las características simbióticas.

Estas tres características que determinan la fijación del nitrógeno han sido motivo desde los trabajos de Balasa (1956; 1960; 1963) de estudios de transferencia genética, aunque ya Kleczkowska, et al. (1944) habían observado, que parecía darse entre especies de *Rhizobium* intercambio de su especificidad, unos años antes del descubrimiento de la conjugación en *Escherichia coli* por Lederberg y Tatum (1946).

Las experiencias de transformación realizadas han sido numerosas entre las que cabe destacar además de las descritas por Balasa (1965) incluidas en los trabajos de Lange y Alexander (1961), Kleczkowski (1965), Gradre, et al. (1967), Mareckowa (1969), Kern (1969), Rai y Modi (1969), Raina y Modi (1972), Modi (1973), etc.

Citar a Denaire y Truchet (1974), más de 50 publicaciones han sido dedicadas 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 fisiológicos tales como especificidad o infectividad. La baja reproducibilidad puede ser explicada por la falta de conocimiento 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, 1974) y de *E. coli* (O'Gara y Dunican, 1973) con una frecuencia relativamente alta. Experiencias de transducción han sido realizadas entre otros por Kowalski (1967) -transferencia de la resistencia a la streptomicina- y Kowalski y Denaire (1972 y 1973) -auxotrofia y efectividad.

También han sido descritos por varios autores, plásmidos que controlan la resistencia a los antibióticos en distintas especies de *Rhizobium*, así como su transferencia de unas razas a otras (Datta, et al., 1971; Datta y Hedges, 1972). Pero unos años antes, Higashi (1967) sugiere que la infectividad en estas bacterias parece estar ligada a un factor episómico, ya que la pérdida de tal característica, consecuencia al tratamiento de las células con naranja de acridina, un conocido agente eliminador de plásmidos (Hirota, 1960), así lo hacía suponer. Posteriormente, Dunican y Cannon (1971), incrementan la evidencia tratando células activas e infectivas con naranja de acridina y bromuro de etidio, ampliando su idea sobre el origen plasmidial a

la capacidad de fijar nitrógeno, efectividad. Para estos autores, la evidencia favorece la teoría de que los caracteres efectividad (EFE⁺) e infectividad (INF⁺) son dependientes de plásmidos separados en las razas de *Rhizobium* infectivas y efectivas.

Más recientemente Zurkowski, et al. (1973) estudian el efecto de la acriflavina y el laurilsulfato sódico sobre la capacidad infectiva de *R. trifolii*. Pero a pesar de los numerosos trabajos realizados Dénaire y Truchet (1974) afirman que no hay un conjunto de datos genéticos y biofísicos suficientes para establecer firmemente si los genes que controlan las propiedades simbióticas en *Rhizobium* están situados sobre el cromosoma, sobre plásmidos o episomas.

La necesidad de la presencia de la planta para que la fijación tenga lugar ha inducido a distintos autores a sugerir que la leguminosa contribuye genéticamente a la fijación del nitrógeno, siendo, por tanto, esta característica la expresión fenotípica de dos genomas asociados. Evans y Russel (1971), sugieren que la leguminosa participa en la producción de nitrógeno en los bacteroides y Dunican y Tierney (1974) concluyen que la capacidad de fijar nitrógeno está presente en *R. trifolii* aunque no se manifiesta a menos que sea transferida a un huésped adecuado,

Numerosos intentos de transferencia de la capacidad de fijar nitrógeno han sido realizados por numerosos autores utilizando los más variados mecanismos y microorganismos receptores (Dixon y Posgate, 1971; Streicher, et al., 1971; Cannon, et al., 1974a; Dunican y Tierney, 1974; Cannon, et al., 1974b; Dunican, et al., 1974). El objetivo en muchos de ellos ha sido encontrar la posibilidad de que el último receptor eficaz sea la planta que por sí misma, portando la información necesaria, sea capaz de fijar el nitrógeno en ausencia de bacterias.

OBJETO

El problema de la infección de las raíces de leguminosas por *Rhizobium* sigue estando todavía confuso a pesar de la intensidad con que se ha trabajado en sus numerosos aspectos y facetas, que van, desde que *Rhizobium* y planta coinciden en el mismo hábitat, hasta que la bacteria se encuentra ya dentro de la raíz lista para interactuar con las células vegetales y comenzar el proceso de la fijación del nitrógeno.

Es evidente que dicho proceso biológico no es, la mayoría de las veces, cien por cien eficiente. Al hecho bioquímico de la fijación se une el complicado proceso de la infección, poniéndose en juego la especificidad de la bacteria implicada.

Junto a la adaptación de una determinada especie de *Rhizobium* a un ambiente dado, con sus características físicas, químicas y biológicas propias, la presión selectiva del sistema radical de la planta condiciona el primer paso de la infección. Cuando se consigue una suficiente proliferación microbiana en la rizosfera de la leguminosa, la preparación de la pared del pelo radical con vistas a la penetración de la bacteria correspondiente, viene determinada, entre otras cosas todavía no bien conocidas, por su capacidad para inducir la producción de enzimas pécticos, por la célula radical.

Aunque se ha indicado que la producción de poligalacturonasa por las raíces de las plantas es de importancia capital en el proceso de infección, el papel de este enzima en la infección no ha sido aún aclarado y mucho menos las condiciones o factores que determinan la producción de la misma. De otra parte, varios autores han relacionado recientemente la infectividad de una determinada raza de *Rhizobium* -- con la presencia de un plásmido en la célula bacteriana. Se han basado para ello tanto en los resultados obtenidos en tratamientos con -- sustancias químicas, que a concentraciones subbacteriostáticas actúan de un modo selectivo sobre estos elementos genéticos extracromosómicos, y que muestran una clara disminución de la capacidad para formar nódulos en las raíces de las leguminosas, como en experimentos realizados sobre la transferencia genética de tal carácter.

Si esto último se admite como cierto y se demuestra que la poligalacturonasa juega un papel decisivo, o al menos importante, en la infectividad de los *Rhizobium*, es evidente que la capacidad de inducir su producción tendrá que estar condicionada a la presencia de determinantes genéticos extracromosómicos,

El objeto, pues, de este estudio consiste en determinar si existe relación entre la infectividad específica de un *Rhizobium* para una determinada leguminosa y su capacidad de inducir la producción de poligalacturonasa por las raíces de ésta; el posible papel de los polisacáridos capsulares como efectores de la citada inducción y, finalmente, comprobar si la capacidad de inducción de poligalacturonasa y la calidad y cantidad de polisacáridos capsulares dependen o no de la presencia de determinantes genéticos extracromosómicos en las bacterias estudiadas.

Para desarrollar dicho estudio se propone el siguiente plan de trabajo:

PLAN DE TRABAJO

Estudios sobre especificidad,

- Comprobación del efecto de exudados radicales de leguminosas sobre la multiplicación de diferentes especies de *Rhizobium*,

Estudios sobre infectividad,

- Inducción de la producción de poligalacturonasa (PG),
- Puesta a punto de la técnica de detección de la inducción de la producción de PG,
- Selección de una asociación *Rhizobium*-leguminosa adecuada al objeto del trabajo,
- Comprobación de la especificidad de la inducción enzimática,
- Selección de razas de *Rhizobium meliloti* con diferentes grados de capacidad inductora de PG,
- Determinación de la infectividad y efectividad de las razas elegidas,
- Estudio genético de la capacidad de inducir la producción de PG,
 - Ensayos de eliminación de plásmidos,
 - Ensayos de inducción,
 - Comprobación biofísica de la existencia de ADN extracromosómico,
- Estudio comparado sobre los polisacáridos capsulares de razas bacterianas inductoras y no inductoras,
- Obtención de los polisacáridos capsulares,
- Purificación de los mismos,
- Composición química de las fracciones activas,

MATERIAL Y METODOS

Microorganismos:

Rhizobium meliloti (Rm1 - Rm9, y otras varias obtenidas por -
tratamientos con agentes químicos de las anteriores),

R. trifolii (Rt)

R. leguminosarum (R1)

R. phaseoli (Rp)

Plantas:

Medicago sativa (alfalfa)

Trifolium pratense (trebol)

Phaseolus vulgaris (judía)

Pisum sativum (guisante)

Raphanus sativa (rábano)

Triticum sativum (trigo).

Suelo:

Se ha utilizado el Pardo rojo mediterráneo,

Productos:

Los utilizados en los distintos tipos de experiencias se indican y describen en los apartados correspondientes.

Aislamiento de *Rhizobium*:

Todos los microorganismos utilizados han sido aislados para este trabajo en los laboratorios de la Sección de Microbiología de la Estación Experimental del Zaidín,

Para su aislamiento se ha partido de los nódulos separados de la raíz de la planta leguminosa correspondiente, previamente lavada con agua del grifo para eliminar todos los restos de tierra que pueden quedar adheridos a la misma. Los nódulos se colocan en vaso de precipitado donde se vuelven a lavar con agua abundante hasta conseguir que queden lo más limpios posible,

La esterilización de su superficie se realiza con cloruro mercúrico. Los nódulos son sumergidos durante cinco minutos en una solución de Cl_2Hg al dos por mil y pasado este tiempo lavados cuidadosamente con agua esteril. El número de lavados óptimo para la eliminación del cloruro mercúrico es generalmente de 8 a 10. Después, se pasan a una caja de Petri esteril y se machacan con una varilla de vidrio previamente flameada. Del líquido resultante, que debe ser de color rojizo en los nódulos activos, se toma con un asa de platino y se disemina en cajas de Petri sobre medio de Allen 79 (1951) -- adicionado de cristal violeta al 1:80 ,000. De las colonias crecidas y una vez reconocidas se hacen nuevos aislamientos para asegurar su pureza.

Medios de cultivo:

El medio de cultivo base utilizado, tanto para el aislamiento

to como para la posterior conservación de *Rhizobium* en el laboratorio, ha sido el 79 de Allen (Allen, 1951) que a continuación se indica, con las adiciones o modificaciones requeridas para cada caso particular.

PO_4HK_2	0,6 g
$SO_4Mg.7H_2O$	0,2 g
CO_3Ca	3,0 g
$ClNa$	0,2 g
Manita	7,6 g
Glucosa	2,4 g
Extracto de levadura al 1%(1)	260 ml
Agua de grifo	740 ml

pH 7 - 7,5

(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 la ebullición durante 3 horas,

Otro medio utilizado en la realización de este trabajo ha sido el mínimo especial para *Rhizobium meliloti* (Ferry, et al., 1959). Su composición es como sigue:

PO_4HK	2,268 g
$PO_4HNa_2.12H_2O$	11,940 g
$SO_4Fe.7H_2O$	0,078 g
$SO_4Mg.7H_2O$	0,197 g
$Cl_2Ca.2H_2O$	0,015 g
Biotina	12 microgramos
Glucosa	18,0 g
$SO_4(NH_4)_2$	6,6 g
Agua desionizada	1000 cc.

Esterilización de semillas:

Se han seguido dos métodos de esterilización según el tipo de semilla. Uno utiliza el cloruro mercurio a la concentración de 2,5% (Barea, et al., 1972) y se ha empleado para todas las semillas citadas anteriormente a excepción de la judía, para la que la sal de mercurio se ha sustituido por una solución de Ortodipholatan al 0,5%. El tiempo de contacto de las semillas con estas soluciones es de 15 y 30 minutos, respectivamente, pasado el cual se lavan de 8 a 10 veces con agua esteril.

Germinación:

Para hacer germinar las semillas se han seguido dos procedimientos dependiendo del número y destino de las mismas.

a) Germinación en tubo: (Olivares, 1963). En este método se utilizan tubos de 14 x 140 mm, que contienen una tira de papel de filtro con un doblez en la parte superior para soportar la semilla y unos 5 ml de agua de grifo. Después de tapados con algodón se esterilizan en autoclave durante 20 minutos a 120°. Se coloca una semilla, previamente esterilizada, en cada tubo y se lleva a una estufa a la temperatura adecuada, hasta que la plántula alcanza de 2 a 3 cm de longitud; 28° ha sido la temperatura usual y 48-72 horas el tiempo normalmente requerido.

b) Germinación en placa: Este método se utiliza preferentemente, a pesar de sus inconvenientes, cuando se requiere un número de semillas alto que puede oscilar entre 60 y 250, dependiendo de su tamaño. Las semillas esterilizadas, se colocan en una caja de Petri

de tamaño adecuado, homogéneamente repartidas por la superficie de un círculo de papel de filtro de diámetro igual al interior de la caja. Después de añadir la cantidad suficiente de agua esteril para mojar el papel y mantener una atmosfera de humedad apropiada dentro de la caja se llevan a 28° de 2 a 3 días.

Respecto a estos procedimientos de germinación se ha de decir que tienen sus ventajas e inconvenientes cada uno. Así, en el primero si una semilla está contaminada no afecta a las demás, y sólo esa se elimina. Tiene, por el contrario, el inconveniente de que es más laboriosa su preparación y requiere mayor cantidad de material para llevarla a cabo. El segundo método, más facil y rápido, presenta el inconveniente de que en el caso de no haber conseguido el cien por cien de esterilidad en las semillas empleadas, la contaminación de una se extiende facilmente a toda la caja.

Tanto en uno como en otro método, una vez finalizada la germinación, se puede realizar un test de contaminación (Solheim y Raa, 1971), consistente en colocar 5-10 semillas en una caja de Petri con medio de agar común. Después de 2 a 3 días en incubación a 28° se observa la posible aparición de crecimiento microbiano rodeando la plántula contaminada. En el caso de que esto ocurra, todas las semillas pertenecientes a ese lote deben ser eliminadas.

Estudio del efecto de los exudados radicales sobre la multiplicación de *Rhizobium*.

Obtención de exudados: Plántulas con una longitud de raíz de 2 a 3 cm, procedentes de semillas esterilizadas y germinadas como se ha indicado, fueron colocadas en una caja Petri provista de una malla de plástico a través de cuyos orificios pasan las correspondien

tes raíces. Esta malla se sostiene por una varilla de vidrio para que solamente la raíz esté en contacto con el agua destilada esteril (líquido al cual iban a exudar sus productos). El número de semillas utilizado dependía del tamaño de las mismas y estaba entre las 60 en el caso del guisante hasta las 250 para alfalfa y trebol.

Una vez colocadas las semillas en la placa, se adicionan 40 ml de agua destilada esteril y se llevan a una cámara a 25° bajo luz fluorescente. Después de 6 días se toma el líquido que ha estado en contacto con las raíces y se esteriliza por filtración (Millipore de 0,45 micras de diámetro de poro).

Efecto de los exudados sobre la multiplicación: En tubos del espectrofotómetro utilizado (Spectronic-20), previamente esterilizados, se colocan 2 ml de medio 79 de Allen líquido esterilizado por filtración y se adicionan 4 ml del exudado correspondiente. Después de sembrados con un volumen igual de una suspensión bacteriana de densidad conocida, se incuban a 28°, realizando medidas de D.O. a 650 nm a intervalos de tiempo determinados.

Se ensayaron las siguientes combinaciones entre bacterias y exudado de raíces de leguminosas y no leguminosas:

R. meliloti, *R. trifolii* y *R. leguminosarum* frente a:

Exudado de <i>Medicago sativa</i> (alfalfa)
" " <i>Trifolium pratense</i> (trebol)
" " <i>Pisum sativum</i> (guisante)
" " <i>Raphanus sativa</i> (rábano)
" " <i>Triticum sativum</i> (trigo)

Como testigo se ha empleado agua destilada esteril.

Del mismo modo se han realizado otros ensayos utilizando: exudados de alfalfa, trebol y guisante frente a:

R. trifolii

R. meliloti

R. leguminosarum

R. phaseoli

Ensayos de infectividad:

Se han seguido dos variantes para realizar los ensayos de infectividad: en medio líquido y en arena.

1) Técnica de Fahraeus (1957) modificada sustituyendo el portaobjetos y cubre entre los que se sujeta la planta, por un alambre forrado de plástico que cuelga del tapón del tubo y está doblado en forma de anillo en su extremo inferior para soportar la plántula. Como solución nutritiva se ha utilizado la de Fahraeus, cuya composición es como sigue:

Cl_2Ca	0,1 g
PO_4HK_2	0,1 g
$\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0,15 g
$\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,74 g
Citrato de hierro	5 mg
$\text{SO}_4\text{Mn} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	7 mg
SO_4Zn	2,5 mg
BO_3H_3	1,5 mg
IK	0,7 mg
$\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,4 mg
$\text{MoO}_4\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,02 mg
Agua destilada	1000 cc

pH - 6,5

La nodulación es visible macroscópicamente entre los 20 y 30 días, pero microscópicamente puede observarse colocando la planta entre porta y cubre a partir de 72 a 96 horas. El tamaño de la semilla limita el uso de este dispositivo. Se considera ideal para las de tamaño medio. En este trabajo se ha utilizado para guisantes y *R. leguminosarum*.

2) La segunda variante emplea tubos de 40 x 200 mm con arena lavada, esterilizados en autoclave a 120° durante 30 minutos. Cada tubo contiene 100 gramos de arena que suponen una altura de 8 cm aproximadamente.

A cada uno de estos tubos se le añadió solución nutritiva de Hewitt (1952) modificada, sustituyendo los compuestos nitrogenados -- por otros carentes de este elemento, pero conservando al máximo el -- conveniente equilibrio iónico.

La composición de la solución de Hewitt es como sigue:

SO ₄ K ₂	0,0303 %
Cl ₂ Ca	0,1416 %
PO ₄ H ₂ Na.1H ₂ O	0,0208 %
SO ₄ Mg.7H ₂ O	0,0368 %
Citrato de hierro	0,0025 %
SO ₄ Mn.4H ₂ O	0,0022 %
SO ₄ Cu.5H ₂ O	0,00024%
SO ₄ Zn	0,0003 %
BO ₃ H ₃	0,00186 %
MoO ₄ Na ₂	0,000035 %
Agua destilada	1.000 cc

Se sembraron tres plántulas con una longitud de raíz de apro

ximadamente 2 cm, de alfalfa procedentes de semillas esterilizadas superficialmente y germinadas en condiciones estériles.

Una serie de tubos se dejaron como testigo, mientras que los otros fueron inoculados con 2 ml/tubo de una suspensión de bacterias con una D.O. de 1,25 (aproximadamente 10^9 cel./ml). Se investigaron varias razas de *R. meliloti* aislados de diferentes lugares. Todos estos tubos, una vez preparados, se llevaron a invernadero bajo condiciones óptimas de luz y temperatura y con un fotoperíodo adecuado.

A los 30 días, independientemente del crecimiento alcanzado por las plantas, se cuenta el número de nódulos, índice de infectividad.

Ensayos de actividad:

La mayoría de las veces la misma prueba de infectividad cuando se prolonga, sirve para conocer la actividad de una raza bacteriana, pero dados los parámetros a considerar es conveniente realizar siempre los ensayos a mayor escala para contar con material suficiente. Aunque estos ensayos se han realizado alguna vez en tubos, es preferible la utilización de macetas con un suelo adecuado y de un tamaño tal que permita el desarrollo de un número de plantas suficientes y hasta un estado de desarrollo avanzado, generalmente floración.

Se han utilizado macetas con capacidad para 1 Kg de suelo - que una vez llenas son esterilizadas por calentamiento en autoclave a 120° durante 30 minutos y tres días consecutivos.

En todos los experimentos se han preparado lotes de cinco macetas, uno testigo, y los otros para la prueba de actividad de las razas disponibles.

Las semillas han sido sembradas como tal o previa germinación en condiciones estériles, colocando por maceta dos o tres veces el número deseado para entresacar después de unos días las que no manifiesten un ritmo de crecimiento adecuado y homogéneo. La inoculación se realiza antes de la siembra o inmediatamente después de realizada según se hayan utilizado semillas o plántulas.

Preparación del inóculo: Se obtiene simplemente por cultivo en agitación en matraces de 250 ml con 80 ml de medio líquido 79 de Allen sembrados con la bacteria apropiada e incubados a 28° durante el tiempo necesario para conseguir un crecimiento óptimo. La agitación se ha realizado en un agitador Gallenkamp a 180 rpm y una pulgada de excentricidad.

Inoculación de las semillas y plántulas: Preparado el inóculo de una densidad fuerte y esterilizadas las semillas, se ponen los dos en contacto, en una placa esteril, durante 2-3 horas antes de realizar la siembra. Las semillas para las macetas testigo se dejan embeber también el mismo tiempo en agua esteril o mejor en el mismo cultivo de prueba calentado previamente a 120° durante 30 minutos.

Cuando se inoculan plántulas la operación se realiza bien sumergiéndolas unos minutos en la suspensión bacteriana o bien regándolas después de sembradas. Las testigo sufren el mismo tratamiento con suspensión calentada a 120°, 30 minutos.

Las macetas sembradas fueron llevadas a invernadero en condiciones óptimas de luz, humedad y temperatura.

Durante el tiempo que duró la experiencia, el riego se realizó con agua esteril unas veces y con solución nutritiva de Hewitt

libre de nitrógeno y esteril otras, para evitar deficiencias de cualquier nutriente.

Pasados de 60 a 90 días, se interrumpe la experiencia procediendo a determinar los parámetros que van a indicar el grado de actividad de la bacteria ensayada y que han sido: peso fresco, peso seco, contenido en nitrógeno y nitrógeno total.

El peso seco se obtiene después de ser colocadas las plantas en una estufa de desecación con corriente forzada de aire a 80° durante 24 horas.

Para la determinación del nitrógeno se utilizó la mineralización propuesta por Paech y Tracey (1966) y descrita por Lachica en C.I.A.F. (1969). En ella se usa como mezcla mineralizadora ácido sulfúrico concentrado y agua oxigenada diluida al 30% y como método el de Kjeldahl, utilizando el aparato descrito por Bouat y Groncet (1965).

Determinación de la capacidad de inducir la producción de poligalacturonasa.

La determinación de la capacidad de inducir la producción de poligalacturonasa en distintas razas de *Rhizobium* se ha realizado siguiendo la técnica de Fahraeus y Ljunggren (1961) aunque modificada para obtener mejores resultados. Está fundada en la observación de la disminución de viscosidad de una solución de pectina, en unas condiciones determinadas, causada por los exudados radiculares de plantas de leguminosas crecidas por un cierto tiempo en presencia de las razas microbianas objeto del ensayo. En esencia, los pasos que

hay que dar se indican a continuación:

Las semillas estériles se hacen germinar, como antes se indicó, hasta que tienen una longitud de 2 a 3 cm, colocándose después en una caja Petri esteril de 10 cm de diámetro. El número de plántulas por placa varía según el tamaño de la semilla; para guisante, el número óptimo es de unas 60, mientras que en el caso del trebol y al falfa se aumenta hasta 250. Los ensayos con judía, haba, etc. se ven seriamente dificultados por el excesivo tamaño de la semilla.

Posteriormente, en cada placa se vierte esterilmente 40 ml de la suspensión bacteriana en agua destilada de una D.O. de 0,5 (aproximadamente 10^8 cel/ml) preparada con un cultivo de tres días sobre medio sólido.

El contacto entre plántula y microorganismo se ha realizado de dos formas; una en que sólo la raíz estaba sumergida en la suspensión, para lo cual en la placa se coloca una malla de plástico esterilizada por alcohol, sostenida por una varilla de vidrio, a través de cuyos agujeros pasan las raicillas, como en el caso de la obtención de exudados, y en otra en que las plántulas se encuentran totalmente inmersas en la suspensión microbiana.

Después de haber comprobado que no había diferencia entre las dos variantes en cuanto a inducción enzimática se refiere, se utilizó siempre la segunda forma por su facilidad y rapidez.

Cuando las plántulas y la suspensión bacteriana están ya juntas, se llevan las placas a una cámara estufa a 25° bajo luz fluorescente por un tiempo determinado. Los ensayos se han hecho a la luz siguiendo la recomendación de los autores citados, pero se ha

comprobado que en oscuridad, aunque manteniendo la temperatura, se obtienen los mismos resultados.

El tiempo de contacto elegido de las plántulas con la bacteria en la cámara es de 6 días, después de haber realizado pruebas con diferentes tiempos entre 2 y 15 días.

Una vez pasado este tiempo se procede a la determinación de la actividad enzimática utilizando viscosímetros Oswald de grado 150, y aplicando la fórmula dada por Fahraeus y Ljunggren (1961) para expresar los resultados:

$$P = \frac{t_0 - t_{60}}{t_0 - t_w}$$

Donde P = tanto por ciento de disminución de viscosidad.

t_0 = tiempo que tarda en pasar el líquido entre las dos señales del viscosímetro a tiempo cero.

t_{60} = tiempo que tarda en pasar el líquido entre las dos señales a tiempo 60 minutos.

t_w = tiempo que tarda en pasar el agua destilada.

También se han realizado lecturas a las 24 horas y a tiempos intermedios, siendo sustituido en la fórmula t_{60} por el correspondiente tiempo a que ha sido realizada.

Para efectuar la medida en el viscosímetro se prepara en un vaso de precipitados una mezcla con 5 ml de una solución de pectina Sigma (grado I) al 1 %, 1 ml de ClNa al 5 % y 2 ml de tampón de fosfatos 0,2 M y pH 7 y unas gotas de tolueno para evitar el desarrollo de posibles contaminantes durante la determinación. Después de la mezcla se lleva a un baño a 30°.

En otro vaso se ponen 3 ml del líquido que contiene el enzima que también se lleva a la misma temperatura. Este líquido se obtiene por filtración de la suspensión bacteriana que ha estado en contacto con las raíces el tiempo óptimo requerido para la inducción y producción del enzima.

Cuando el contenido de los dos vasos ha alcanzado los 30° se mezclan y se lleva a un viscosímetro que está también dentro del baño realizándose inmediatamente la primera lectura que es la correspondiente al tiempo cero. Las sucesivas lecturas se hacen a una hora o más hasta llegar a un máximo de 24 horas.

Paralelamente se realiza otra determinación en el ensayo correspondiente a las plantas que han sido colocadas frente a agua destilada (40 ml), en vez de suspensión bacteriana. Este segundo ensayo se considera como testigo, aunque también pueden actuar como tales, las pruebas en las que las suspensiones bacterianas han estado en contacto con una leguminosa no específica.

Las modificaciones introducidas en la técnica de Fahraeus y Ljunggren han sido principalmente dos. Una se refiere a la naturaleza y pH del tampón utilizado y la segunda al tiempo de contacto entre raíces y la suspensión bacteriana. El tampón acético acetato 0,1 M y pH 5 original, ha sido sustituido por otro de fosfatos 0,2 M, pH 7 y el tiempo de contacto ha sido aumentado a seis días, en lugar de los dos indicados por los autores citados. Estos cambios han sido introducidos a la vista de los resultados inicialmente obtenidos.

Se han ensayado las siguientes asociaciones bacteria-leguminosa:

<i>R. meliloti</i>	<i>Medicago sativa</i>
<i>R. leguminosarum</i>	<i>Pisum sativum</i>
<i>R. trifolii</i>	<i>Trifolium pratense</i>
<i>R. meliloti</i>	<i>Pisum sativum</i>
<i>R. meliloti</i>	<i>Trifolium pratense</i>
<i>R. trifolii</i>	<i>Medicago sativa</i>
<i>R. leguminosarum</i>	<i>Medicago sativa</i>

Se han realizado también experimentos sobre la inducción de la producción de poligalacturonasa con algunas variantes en relación con lo arriba expuesto: exudados y extractos radicales frente a la bacteria apropiada y cultivos libres de células o preparaciones de polisacáridos capsulares más o menos purificados frente a las raíces correspondientes. Los exudados fueron obtenidos por cultivo de las plantas en la solución de Hewitt y los extractos por homogeneización de las raíces en agua destilada.

Estudio genético:

Tratamiento con naranja de acridina:

Antes de realizar el tratamiento de las distintas razas se determinó la máxima concentración subbacteriostática de colorante: la determinación de la concentración de naranja de acridina (Fluka - AG, Buchs SG) a usar en los tratamientos se realizó inoculando una serie de tubos que contenían medio de Allen líquido y colorante a distintas concentraciones con las razas de *R. meliloti* que se querían ensayar. Las concentraciones usadas fueron 0, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 50 y 100 µg/ml. A tiempos 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48, 60 y 72 horas se midió la densidad óptica de los cultivos a 650 nm.

(a esta longitud de onda no interfiere el color naranja) eligiéndose una concentración óptima de 20 µg/ml.

El tratamiento para la eliminación del posible plásmido se llevó a cabo inoculando matraces de 250 ml que contenían 80 ml de medio líquido de Allen con naranja de acridina a 20 µg/ml con las razas de *R. meliloti* silvestres que mostraron una mayor capacidad de inducción de la producción de poligalacturonasa. De los cultivos en agitación se realizaron aislamientos a las 24, 48 y 72 horas sobre placas de medio sólido de Allen, y en cada caso se picaron y llevaron a tubos de medio sólido inclinado para obtener masa y poder realizar las pruebas de inducción del enzima.

Paralelamente se realizó también un aislamiento de un cultivo efectuado en las mismas condiciones pero en ausencia del colorante, que fué utilizado como testigo.

Tratamiento con Mitomicina C:

Las razas de *R. meliloti* silvestres que presentaban una baja actividad de inducción enzimática se trataron con mitomicina C (Sigma).

Como en el caso del tratamiento con naranja de acridina, no se tenían datos para realizar esta operación en *Rhizobium*, por lo que fueron necesarias unas pruebas previas para determinar aproximadamente la concentración y el tiempo óptimos de tratamiento.

Los tratamientos se realizaron adicionando la mitomicina a una suspensión bacteriana en medio líquido de Allen de una D.O. de 0,5 a 650 nm (1×10^8 cel/ml) y diseminando en placas o sembrando di

rectamente en tubos a intervalos determinados de tiempo.

En las pruebas previas, transcurrido el tiempo de contacto entre la mitomicina y la suspensión bacteriana, se sembraron tubos de medio sólido inclinado para obtener masa microbiana suficiente para la determinación de la capacidad inductora de poligalacturonasa sin riesgo de que hubiera una represión grande del plásmido por una multiplicación celular excesiva. En las pruebas definitivas, con una concentración y tiempo ya seleccionados, se realizaron aislamiento en placa y en cada ensayo se picaron unas 50 colonias para obtener la correspondiente masa celular.

Las concentraciones ensayadas fueron: 0,1; 0,25; 0,50 y 1 $\mu\text{g/ml}$ durante 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 90, 120 min.

De acuerdo con los resultados que se exponen en la gráfica de la figura 4 se escogieron 0,25 $\mu\text{g/ml}$ y 30 minutos para las pruebas definitivas.

Los tratamientos de razas previamente curadas con naranja de acridina, se realizaron también por la técnica descrita.

Detección del ADN extracromosómico por centrifugación diferencial en gradiente de densidad:

Se han seguido con pequeñas modificaciones la técnica descrita por Bazaral y Helniski (1968) y Oliver, et al. (1974) y Clewell (1972).

Marcado del ADN: Las razas Rm4 (de alta capacidad de inducción de poligalacturonasa) y Rm4c (de capacidad nula) fueron cultiva

das a 28° y en agitación en tubos de 200 x 20 mm con 10 ml de medio mínimo conteniendo $3,3 \times 10^{-3}$ mCi/ml de 6-³H timidina (Amersham 5 Ci/mmol) hasta el final de la fase logarítmica (10^9 cel/ml).

Preparación de los lisados de células: 5-10 ml de los cultivos obtenidos fueron centrifugados y las células sedimentadas lavadas dos veces con tampón TES (ClNa 0,05 M; Tris 0,05 M; EDTA 0,005 M; pH = 8) a 0°. El sedimento resultante fué resuspendido en 1 ml de tampón TES, conteniendo 1,0 mg de lisozima (Sigma), 500 µg de RNasa (Sigma) y 100 mg de sacarosa, e incubado a 37° durante 10 minutos. Los esferoplastos obtenidos se lisaron colocando la suspensión en baño de hielo 5 minutos y adicionando 0,5 ml de una solución de lauril sulfato sódico al 2 %, que se mezcla con ayuda de una pipeta; finalmente y a temperatura ambiente se añade 1 ml de TES, agitando de nuevo con pipeta. El lisado es entonces centrifugado a 35.000 g durante 10 minutos para separar los restos celulares.

Obtención del gradiente: La centrifugación fué realizada en una centrifuga preparativa MSE, con rotor basculante, a 130.000 g durante 44 horas a 24°. Los tubos de polialomero se llenaron con 4,5 ml de una mezcla realizada en un vial con 0,75 ml de lisado, 4,5 g de cloruro de cesio (Merck), 0,85 ml de solución de bromuro de etidio (1mg/ml) (Sigma) y 3 ml de TES. Transcurrido el tiempo de centrifugación los tubos fueron perforados en el fondo y las gotas recogidas de 2 en 2 sobre trocitos de papel de filtro Watman n° 1, que se secaba en corriente de aire caliente. El goteo se graduó a voluntad por cierre hermético de la parte superior del tubo con un tapón de goma perforable, por el que se introdujo una aguja hueca unida por un tubo de teflón a una jeringuilla de tornillo.

Medida de la radiactividad: Los trozos de papel de filtro -

secados se lavaron dos veces con ácido tricloroacético al 5 %, etanol y eter y, una vez secos, se introdujeron, cortados en trozos, en los correspondientes viales para realizar la medida en contador de centelleo líquido (PW 4500).

Obtención, purificación y análisis de los polisacáridos extracelulares.

Obtención: Para la obtención de los polisacáridos capsulares se utilizaron cultivos en agitación de 7 días en medio líquido de Allen de las razas de *R. meliloti* escogidas por su alta o nula capacidad de inducir la producción de poligalacturonasa siguiendo la técnica descrita por Amarger, et al. (1967) que en esquema consta de los siguientes pasos:

Centrifugación del cultivo bacteriano a 5000 rpm durante 30 minutos.

Adición al sobrenadante de dos volúmenes de acetona.

Lavado con acetona del precipitado formado y secado del mismo.

Disolución en agua y eliminación de los restos insolubles por centrifugación.

Diálisis frente a agua destilada a 4° durante 24 horas.

Precipitación con acetona.

Repetición del proceso tres veces.

Una vez separado el polisacárido se investigó su efecto inductor de la producción de poligalacturonasa, como anteriormente se

indicó, con la variante de sustituir el cultivo bacteriano por diferentes concentraciones de la preparación obtenida. También se han -- realizado estudios comparativos de producción de poligalacturonasa - con polisacáridos obtenidos a partir de bacterias tratadas con naranja de acridina.

Purificación:

- 1.- Estudio analítico.
- 2.- Estudio preparativo.

Tanto en uno como en otro se ha realizado la purificación - por filtración en geles utilizando Sephadex G-25 (Pharmacia Fine Chemical).

En los dos casos se ha partido de una solución del precipitado obtenido con acetona, seco, a la concentración de 2 mg/ml.

Las concentraciones más altas eran demasiado viscosas para pasar fácilmente a través del gel.

Para el estudio analítico se han utilizado 2 ml de solución y columnas de 30 x 2 cm y para el preparativo 30 ml en columnas de 30 x 3,5 cm. El flujo ha sido de 0,5 ml/min, habiéndose operado siempre a temperatura ambiente y con recogida de fracciones de 5 ml en - un colector de fracciones automático (LKB; Ultrorac).

Los polisacáridos se han determinado en cada una de las fracciones por la reacción de la antrona (Fairbairn, 1953).

Reacción de la antrona:

Preparación del reactivo: A 100 ml de agua destilada se añaden, poco a poco, 500 ml de ácido sulfúrico concentrado. En 100 ml de esta mezcla se disuelven por agitación, en el momento de usarlo 0,2 g de antrona (Merck).

Metódica: En tubos de ensayo perfectamente limpios (tantos como fracciones se hayan recogido, más un par de ellos que los utilizamos como testigo) se colocan 5 ml de reactivo de la antrona recién preparado. Se llevan a un baño de hielo y allí se le va añadiendo a cada uno 1 ml de cada fracción, de tal modo que forme una segunda capa sobre el reactivo. En los tubos testigo, en lugar del ml de problema se utiliza 1 ml de agua destilada.

Cuando todos los tubos han sido preparados, se agitan si es posible mecánicamente, llevándolos de nuevo al baño de hielo. Cuando todos los tubos están agitados, se pasan a un baño de agua hirviendo donde se mantienen 10 minutos enfriándolos después rápidamente en agua corriente hasta temperatura ambiente. A partir de este momento se puede realizar la lectura a la correspondiente D.O. al color verde desarrollado, a una longitud de onda de 620 nm, usándose como blanco los testigos preparados.

Medida de actividad de las fracciones obtenidas: Las fracciones recogidas de la columna preparativa fueron reunidas por picos, de acuerdo con los valores obtenidos en la determinación de polisacáridos, y llevados al volumen adecuado, por concentración en vacío, para realizar los correspondientes ensayos de inducción de la producción de poligalacturonasa, en los cuales esta solución purificada sustituye a la suspensión bacteriana que se coloca en contacto con las plántulas de alfalfa.

Análisis del polisacárido purificado: Una vez localizado el pico activo, se procedió al análisis del mismo. Para ello se concentra a vacío en rotavapor y se vuelve a pasar por columna de Sephadex G-25 para eliminar restos de otros polisacáridos. Recogidas de nuevo fracciones en el colector y realizada la reacción de la antrona para localizar el polisacárido buscado, se concentra hasta 10 ó 12 ml a los que se les añade ClH concentrado en la cantidad necesaria para que quede al final 1,0 N. La hidrólisis se realiza por calentamiento a reflujo durante 5 horas, concentrando después a sequedad. Se vuelve a disolver en unos ml de agua destilada, repitiendo la operación dos o tres veces para que el hidrolizado pierda todo el ClH que le quedaba.

El último residuo seco se disuelve en 2 ó 3 ml de agua destilada para realizar el análisis de los azúcares por cromatografía en papel.

Cromatografía en papel: Se utiliza cromatografía descendente en papel Schleicher-Schull 2043b como fase estacionaria y la mezcla Butanol-Piridina-Agua (6:4:3) como fase móvil.

Puestos los correspondientes puntos y una vez secos se introduce el papel en la cubeta el tiempo necesario para que se produzca un perfecto desarrollo, aproximadamente 36 horas, secando después el cromatograma a temperatura ambiente. El revelado se realiza por cualquiera de los procedimientos que a continuación se indica dependiendo de los azúcares que se quiera investigar.

Revelado con Ftalato de anilina: El cromatograma seco se pulveriza con ftalato de anilina, revelador específico de aldosas. Se prepara disolviendo 1,66 g de ácido ftálico y 1 ml de anilina en 100

ml de n-butanol saturado de agua. Después de la pulverización se lleva a una estufa de 100° durante cinco minutos.

Revelado con urea clorhídrica: Este revelado es específico de cetosas. La marcha a seguir es idéntica al caso anterior, con la sola variante del revelador que se prepara utilizando urea al 3% en ClH al 5% en etanol.

Revelado con cloruro de trifenil tetrazolio: El cromatograma seco es introducido en una solución de cloruro de trifenol tetrazolio al 0,5% en metanol adicionado de NaOH hasta una concentración final de 0,25 M. El color se desarrolla por mantenimiento del papel durante dos minutos a vapor de agua con una velocidad de condensación de 120 ml/min. Después de lavado con agua de grifo es secado al aire. Los ácidos urónicos, azúcares neutros y exosaminas se detectan con una gran sensibilidad.

Para determinaciones cuantitativas, con una proximación del 10%, las zonas coloreadas del papel son recortadas y extraídas con metanol-acético (8:1 v:v) y medidas a una D.O. de 482 nm, estableciendo la comparación con los correspondientes patrones.

RESULTADOS

Estudio del efecto de los exudados radicales sobre el crecimiento microbiano.

En las tablas 1 y 2 se exponen los resultados obtenidos para el crecimiento de distintas especies de *Rhizobium* en presencia de exudados radicales de diversas leguminosas y no leguminosas. En la primera se enfrentan las bacterias a los distintos exudados, mientras que en la segunda se expone el efecto de los exudados radicales frente a la bacteria ensayada. El crecimiento celular se expresa en D.O. a 650 nm a 24 y 48 horas.

Se puede apreciar claramente el efecto positivo sobre el crecimiento de los exudados correspondientes a las plantas específicas, más marcado a las 24 que a las 48 horas, tiempo en que todos los cultivos tienden a igualarse. Los resultados extraños aparecidos cuando se utiliza guisante pueden derivarse de un tamaño de semilla y plántula, que no permiten la normalización de la técnica utilizada.

Ensayo de infectividad.

En las tablas 3 y 4 son presentados los resultados correspondientes a uno de los ensayos de infectividad realizados con cuatro es

TABLA 1.

Crecimiento de tres especies de *Rhizobium* en presencia de exudados radicales de leguminosas y no leguminosas, expresado en D.O. a 650 nm.

Bacteria	Exudado radical	D.O. 650 nm	
		24 horas	48 horas
<i>R. meliloti</i>	Alfalfa	0,90	0,96
"	Trebol	0,70	0,80
"	Guisante	0,66	0,72
"	Trigo	0,50	0,80
"	Rabano	0,47	0,71
"	H ₂ O destilada	0,19	0,46
<i>R. trifolii</i>	Trebol	0,24	0,58
"	Alfalfa	0,17	0,50
"	Guisante	0,14	0,60
"	Trigo	0,13	0,58
"	Rabano	0,11	0,55
"	Agua destilada	0,10	0,19
<i>R. leguminosarum</i>	Guisante	0,39	0,64
"	Alfalfa	0,20	0,54
"	Trebol	0,19	0,56
"	Trigo	0,13	0,55
"	Rabano	0,10	0,47
"	Agua destilada	0,06	0,20

Valores medios de tres determinaciones.

TABLA 2.

Efecto del exudado radical de tres leguminosas sobre el crecimiento de cuatro especies de *Rhizobium*.

Exudado radical	Bacteria	D.O., 650 nm	
		24 horas	48 horas
Alfalfa	<i>R. meliloti</i>	0,22	0,57
"	<i>R. trifolii</i>	0,19	0,54
"	<i>R. leguminosarum</i>	0,21	0,55
"	<i>R. phaseoli</i>	0,19	0,44
Trebol	<i>R. trifolii</i>	0,06	0,16
"	<i>R. meliloti</i>	0,05	0,14
"	<i>R. leguminosarum</i>	0,04	0,13
"	<i>R. phaseoli</i>	0,04	0,14
Guisante	<i>R. leguminosarum</i>	0,07	0,18
"	<i>R. meliloti</i>	0,11	0,26
"	<i>R. trifolii</i>	0,07	0,19
"	<i>R. phaseoli</i>	0,10	0,22
Agua destilada	<i>R. meliloti</i>	0,07	0,14
" "	<i>R. trifolii</i>	0,07	0,14
" "	<i>R. leguminosarum</i>	0,06	0,13
" "	<i>R. phaseoli</i>	0,07	0,17

Valores medios de tres repeticiones.

pecies de *Rhizobium*, la tabla 3, y con varias razas de *R. meliloti*, la 4. Con estas determinaciones se pretendía conocer la infectividad de las bacterias utilizadas en este trabajo; y concretamente, en la segunda tabla, aquellas razas de la misma especie que habían sido aisladas en distintos suelos y que como se tendrá ocasión de ver en la tabla 10, manifiestan una alta capacidad de inducir la producción de poligalacturonasa.

TABLA 3.

Número de nódulos aparecidos en las raíces de plantas de alfalfa, guisante, trebol y judía (crecidas en arena) inoculadas con la especie de *Rhizobium* correspondiente.

Tratamiento	Nº de nódulos/planta
Plantas no inoculadas	0
Plantas inoculadas con <i>R. meliloti</i>	59
" " " <i>R. leguminosarum</i>	34
" " " <i>R. trifolii</i>	48
" " " <i>R. phaseoli</i>	26

Valores medios de tres determinaciones.

El número de nódulos aparecido es claro índice de infectividad aunque al presentar esta característica valores graduales sólo se puede hablar de índice alto o bajo cuando se comparan varias razas de -- una misma especie, hecho que se manifiesta en los resultados expuestos en la Tabla 4.

TABLA 4.

Número de nódulos aparecidos en las raíces de plantas de alfalfa (crecidas en arena) inoculadas con cuatro razas de *R. meliloti*.

Tratamiento	Nº de nódulos/planta
Plantas no inoculadas	0
Plantas inoculadas con Rm2	57
" " " Rm3	5
" " " Rm4	60
" " " Rm8	55

Valores medios de tres repeticiones.

Ensayos de efectividad:

Las experiencias realizadas para el ensayo de infectividad pueden, si las condiciones de las mismas lo permiten, llevarse hasta el punto de ser posible la determinación de algunos de los parámetros que son índice de efectividad. Este ha sido el caso de los resultados expuestos en la tabla 5 que corresponden a los pesos fresco y seco de la parte aérea de las plantas cuyo número de nódulos figura en la tabla 4. La pequeña cantidad de materia seca obtenida no permite la correcta determinación de nitrógeno por lo que para el análisis de este elemento se ha utilizado la parte aérea de las plantas crecidas en macetas y cuyos resultados junto a los de peso fresco, nitrógeno y nitrógeno total figuran en la tabla 6.

TABLA 5.

Peso fresco y seco, correspondiente a la parte aérea de las plantas de alfalfa (crecidas en tubos con arena) testigo e inoculadas con cuatro razas de *Rhizobium meliloti*.

Tratamiento	Peso fresco (g)	Peso seco (g)
Plantas no inoculadas	0,42	0,085
" inoculadas con Rm2	1,73	0,160
" " " Rm3	0,50	0,080
" " " Rm4	1,65	0,165
" " " Rm8	1,47	0,150

Valores medios de tres repeticiones.

TABLA 6.

Peso fresco, seco, contenido en nitrógeno y nitrógeno total absorbido, correspondientes a la parte aérea de plantas de alfalfa (en maceta) testigo e inoculadas con *R. meliloti*.

Tratamiento	P, fresco (g)	P, seco (g)	% de N	N total (mg)
No inoculada	12,75	1,59	1,91	30,30
Inoculada con Rm2	24,61*	3,08*	2,07*	63,97*
Inoculada con Rm4	23,96*	2,93*	2,10*	61,60*

Valores medios de cinco repeticiones.

* Diferencia con el testigo significativa ($P \leq 0,01$).

Se deduce de la observación de estas últimas tablas el grado de efectividad manifestado por alguna de las razas de *R. meliloti* -- utilizadas en este trabajo.

Las fotos que se incluyen en las páginas siguientes corresponden a ensayos realizados de infectividad en tubos y actividad en macetas. Se puede apreciar claramente el efecto positivo de la inoculación de semillas de alfalfa con las razas adecuadas de *Rhizobium meliloti*.

Medida de actividad enzimática

Con la tabla 7 comienza la exposición de los resultados referentes a las determinaciones de la actividad de poligalacturonasa (PG) en los distintos ensayos. En esta primera tabla se presentan los resultados correspondientes a tres especies de *Rhizobium* frente a su leguminosa específica, elegida de entre las posibles por su tamaño adecuado de semilla.

TABLA 7.

Actividad de poligalacturonasa en la asociación de tres *Rhizobium* con su planta específica.

Bacteria	Leguminosa	Actividad PG*	
		t _{1 hr}	t _{24 hr.}
<i>R. meliloti</i>	<i>Medicago sativa</i>	5,6	21,0
<i>R. trifolii</i>	<i>Trifolium pratense</i>	5,0	11,3
<i>R. leguminosarum</i>	<i>Pisum sativum</i>	5,3	12,0

Valores medios de cinco determinaciones.

* Expresado en % de disminución de la viscosidad de una solución de pectina al 1%.

Estas experiencias se realizaron con vista a la selección de la especie de *Rhizobium*, y por tanto de leguminosa, que más interesaba para continuar el estudio. Como se observa en las condiciones de experimentación utilizadas, se dió la mayor actividad para la asociación *R. meliloti* - *Medicago sativa* por lo que fué en principio elegida. No obstante, antes de la elección definitiva se quiso demostrar su especificidad por lo que se realizaron los experimentos cuyos resultados son presentados en la tabla 8.

TABLA 8.

Inducción de poligalacturonasa en la asociación de distintas especies de *Rhizobium* con diferentes leguminosas, a tiempo 1 hora y 24 horas.

Bacteria	Leguminosa	Actividad PG	
		t _{1 hr.}	t _{24 hr.}
<i>R. meliloti</i>	<i>Pisum</i>	-1,2	0,0
<i>R. meliloti</i>	<i>Trifolium</i>	0,0	0,0
<i>R. meliloti</i>	<i>Medicago</i>	4,7	25,0
<i>R. trifolii</i>	<i>Medicago</i>	1,4	1,7
<i>R. leguminosarum</i>	<i>Medicago</i>	0,0	0,0
---	Agua dest. <i>Pisum</i>	0,0	0,0
---	" " <i>Trifolium</i>	0,0	0,0
---	" " <i>Medicago</i>	0,0	0,0

Valores medios de cinco determinaciones.

Expresado en % de disminución de la viscosidad de una sol. de pectina al 1%.

Es clara la evidencia de que existe una especificidad alta en la capacidad de inducción del enzima, que sólo se da cuando están en presencia de una raza infectiva de *Rhizobium* y su correspondiente leguminosa.

A la vista de estos resultados se eligió definitivamente la mencionada asociación aunque los valores de actividad de poligalacturonasa eran relativamente bajos y por tanto carentes la mayoría de las veces de significación. Después de comprobar que el tiempo óptimo de medida de actividad era de 24 horas (figura 1) (los valores expresados en el gráfico corresponden a ensayos realizados introducidas las dos variantes que más abajo se indican). Se alteraron las condiciones de experimentación en dos puntos: pH en la medida de actividad enzimática y tiempo de contacto entre bacteria y plántula. Los resultados, introducidas las dos variantes, se exponen en la tabla 9, determinaciones realizadas a pH 5,0 y 7,0 (de acuerdo con lo presentado en el capítulo de Material y Métodos) y en la figura 2 donde se ha presentado la actividad de poligalacturonasa encontrada en función del tiempo de contacto entre la bacteria y las raíces.

La actividad encontrada cuando la medida se realiza a pH 7,0 es considerablemente más alta y permite eliminar errores a la hora de realizar estudios comparativos. La figura 2 muestra claramente la máxima inducción enzimática a los seis días de establecida la asociación. Estas condiciones se mantuvieron en todos los experimentos y una vez establecidos, lo primero que se hizo fue una medida de actividad de una serie de estirpes o razas de *R. meliloti* aisladas de diversos suelos y en distintas épocas, cuyos resultados, correspondientes a 9 diferentes cultivos, se expresan en la tabla 10. Se aprecia una evidente variabilidad.

TABLA 9.

Resultados de la medida de la actividad de poligalacturonasa en tres asociaciones *Rhizobium*-planta específica, realizadas a pH 5,0 (tampón acético acetato) y pH 7,0 (tampón de fosfatos).

Bacteria	Planta	Actividad PG*			
		pH-5,0		pH-7,0	
		1 hr.	24 hr.	1 hr.	24 hr.
<i>R. leguminosarum</i>	<i>Pisum</i>	5,7	13,7	7,4	48,3
<i>R. trifolii</i>	<i>Trifolium</i>	6,0	14,2	15,2	55,8
<i>R. meliloti</i>	<i>Medicago</i>	5,6	21,0	15,1	79,7

Valores medios de cinco determinaciones.

* Expresado en % de disminución de la viscosidad de una solución de pectina al 1%.

TABLA 10.

Valores de inducción de poligalacturonasa obtenidos para diferentes razas de *R. meliloti*, a tiempo 1 hora y 24 horas, en ensayos realizados a pH 7,0.

Raza bacteriana	Actividad de PG*	
	1 hora	24 horas
Rm1	3,8	29,1
Rm2	22,1	64,7
Rm3	2,1	12,8
Rm4	12,6	75,3
Rm5	0,8	16,3

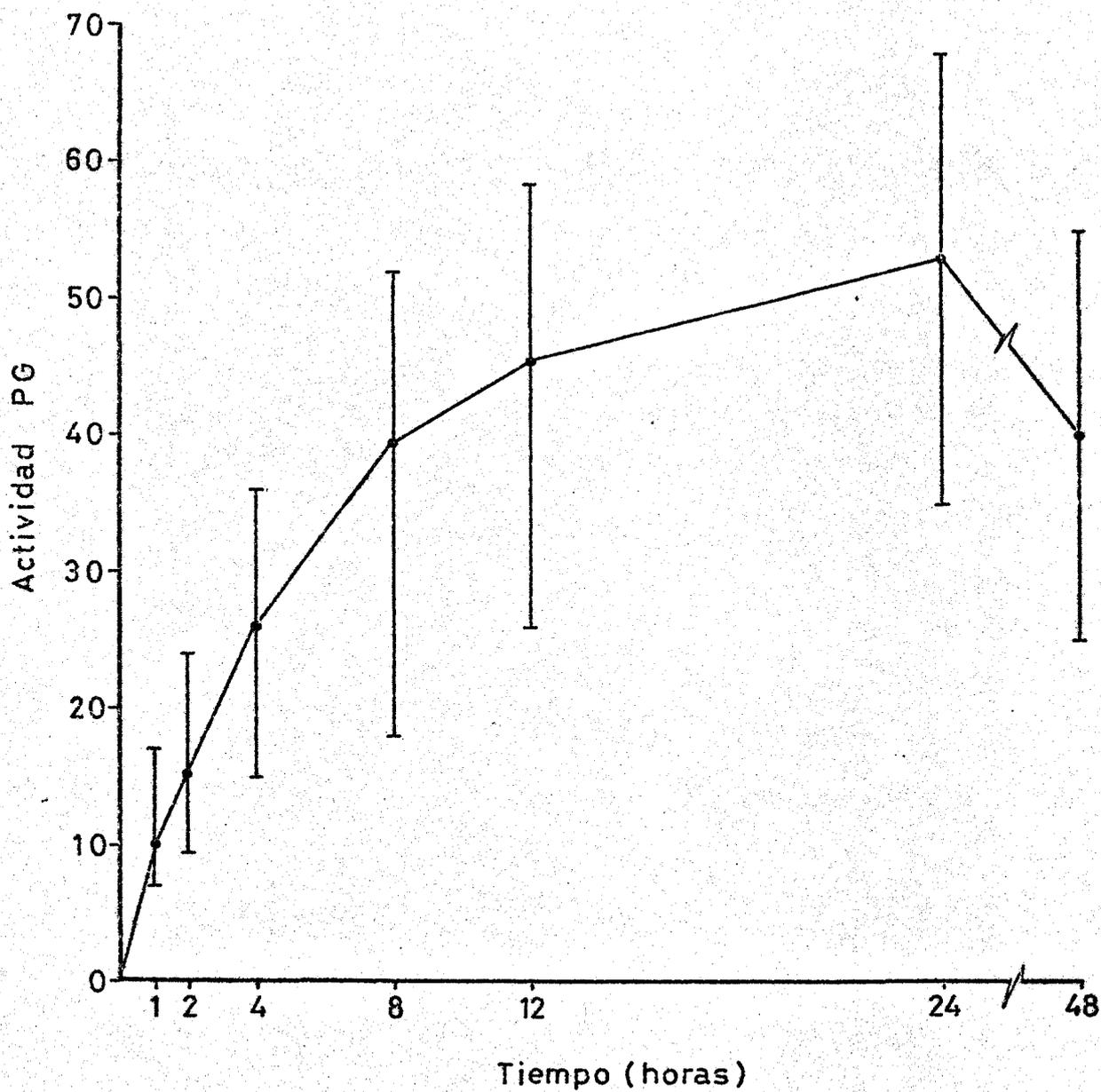


Fig. 1.- Valores de actividad enzimática obtenidos a distintos tiempos de medida de viscosidad.

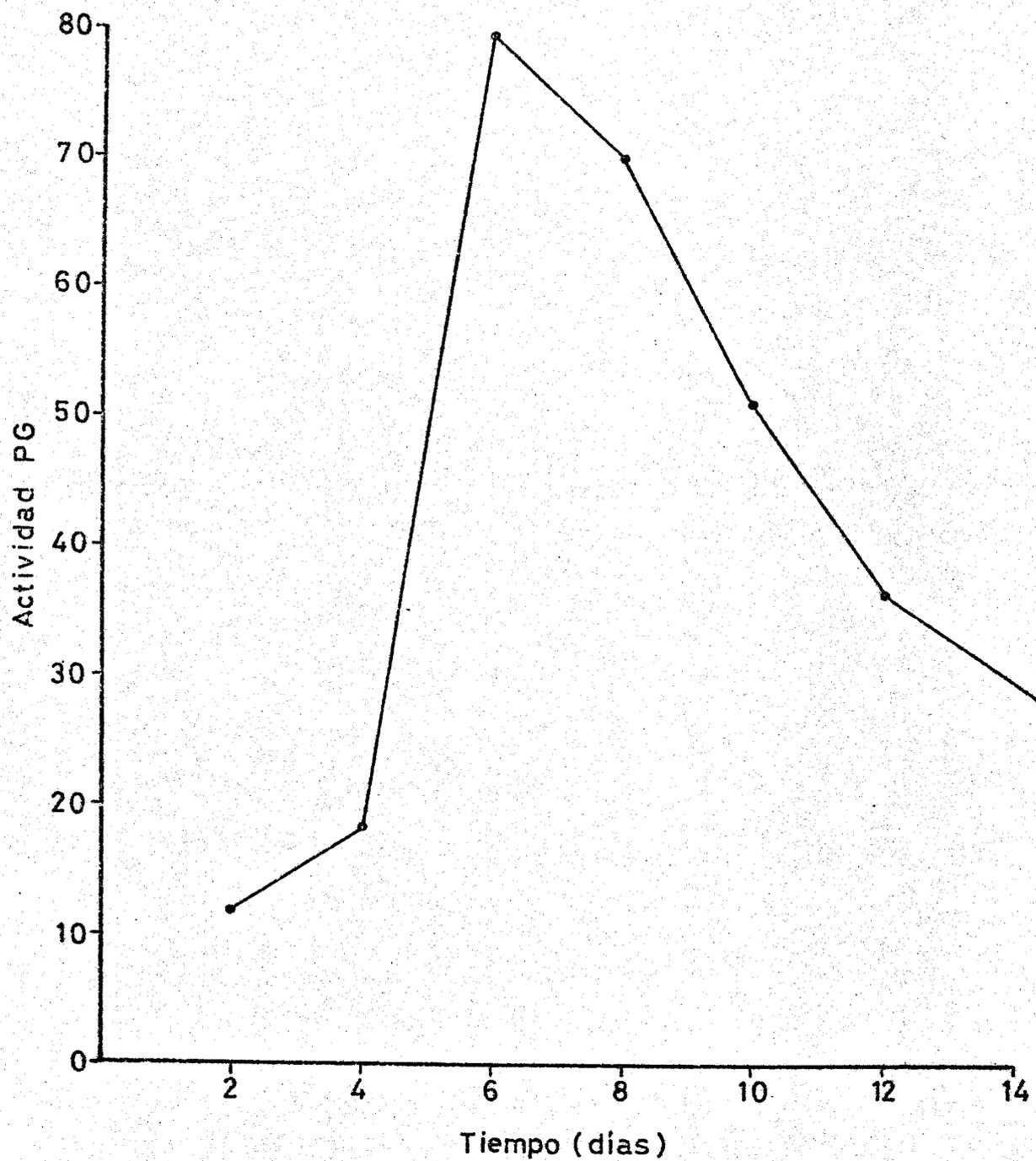


Fig. 2.- Actividad de poligalacturonasa en función del tiempo de contacto entre *R. meliloti* y *Medicago sativa*, Actividad expresada en % de disminución de la viscosidad de una solución de pectina al 1%.

TABLA 10 (continuación).

Raza bacteriana	Actividad de PG*	
	1 hora	24 horas
Rm6	3,6	14,7
Rm7	5,6	24,4
Rm8	7,7	61,9
Rm9	2,7	14,4

Valores medios de cinco determinaciones.

* Expresado en % de disminución de la viscosidad de una solución de pectina al 1%.

Experimentos realizados sustituyendo la planta por extractos y exudados radiculares.

Aunque sometido a cierta problemática, se ha descrito que la poligalacturonasa era producida por la planta en presencia de la bacteria, para comprobar este extremo y descartar que la PG pueda ser producida por la bacteria en presencia de la planta se montaron los experimentos cuyos resultados son expuestos en las tablas 11 y 12. La primera corresponde a los ensayos realizados con bacterias frente a exudados radiculares de *Medicago sativa* y la segunda frente a extractos de las raíces de la misma planta, ya que siempre han sido utilizadas razas de *R. meliloti*.

TABLA 11.

Actividad de poligalacturonasa cuando se ponen en contacto *R. meliloti* (Rm4) y exudados de raíz de *Medicago sativa*.

Exudado	Actividad de PG*/24 horas
1	- 8,4
2	- 5,5
3	1,7
4	- 8,0
5	5,4

* Actividad expresada en % de disminución de la viscosidad de una solución de pectina al 1%.

TABLA 12.

Actividad de poligalacturonasa cuando se ponen en contacto *R. meliloti* (Rm4) y extractos radicales de *Medicago sativa*.

Extracto	Actividad de PG*/24 horas
Completo	0,0
Sobrenadante	- 2,9
Filtrado Millipore	- 5,8

Valores medios de cinco determinaciones.

* Actividad expresada en % de disminución de la viscosidad de una solución de pectina al 1%.

Estudios sobre la existencia de un plásmido determinante de la capacidad de inducir la poligalacturonasa.

Inestabilidad del carácter.

En la tabla 13 y figura 3 se expone una muestra de la inestabilidad del carácter de inducir la producción de poligalacturonasa en una de las razas de *R. meliloti* (Rm4), donde fácilmente se aprecia la disminución de la capacidad inductora que ocurre conforme es mayor el número de resiembras efectuadas a partir del cultivo original. En la tabla se muestran actividad de poligalacturonasa y porcentaje de disminución de actividad a lo largo del tiempo, mientras que en la figura se ha representado el tanto por ciento de actividad determinado en cada uno de los ensayos, considerando 100 a la actividad de poligalacturonasa correspondiente a la capacidad inductora de las células recién aisladas del nódulo.

TABLA 13.

Evolución de la capacidad de inducir la producción de poligalacturonasa de *R. meliloti* (Rm4) en función del tiempo de conservación por pases sucesivos en medio de cultivo.

Pases	Actividad de PG*	% disminución actividad
0	86,6	0
1	57,1	34,1
2	24,2	72,1
3	13,1	84,9
4	11,1	87,2

Valores medios de cinco repeticiones.

* Actividad de PG expresada en % de disminución de viscosidad de una solución de pectina al 1% a las 24 horas.

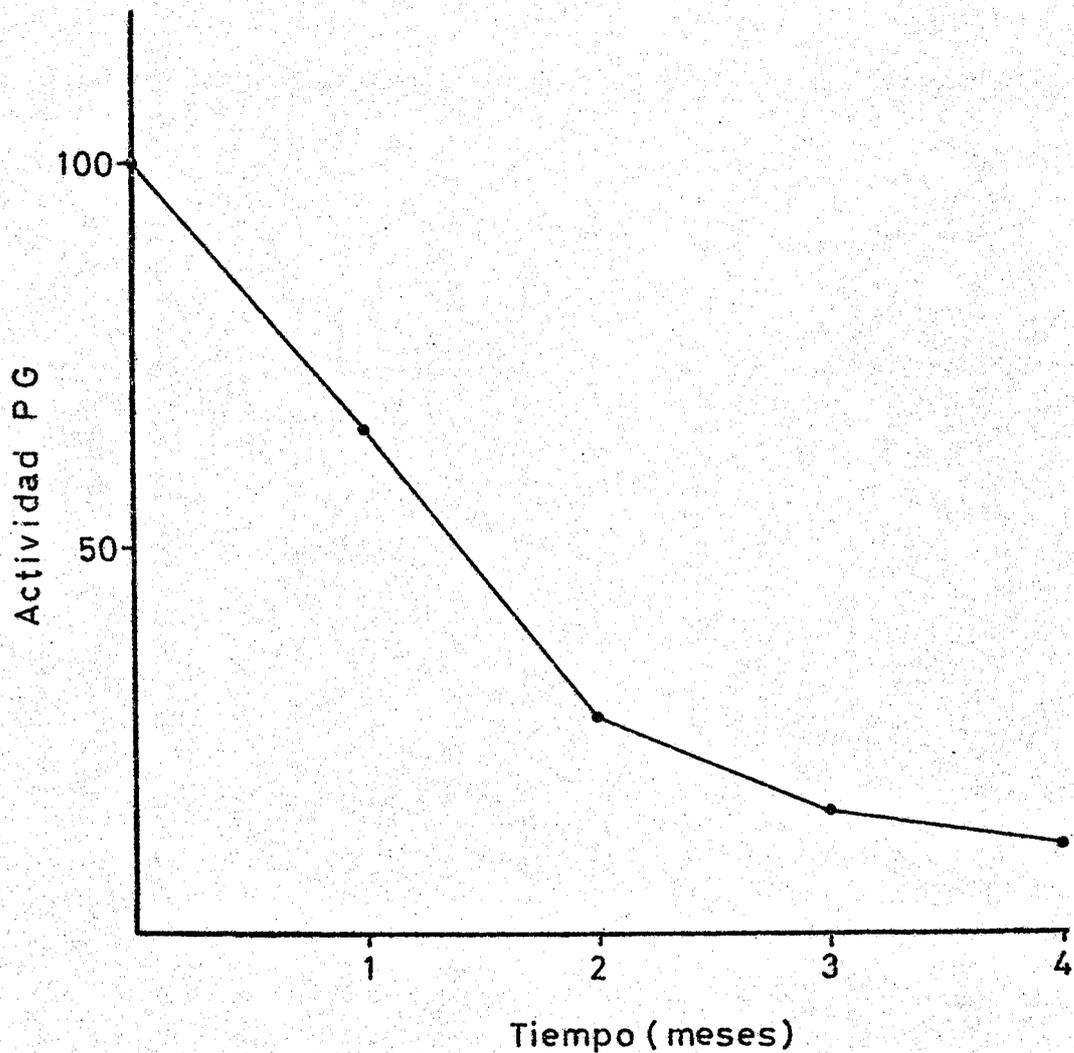


Fig. 3.- Actividad de poligalacturonasa correspondiente a la capacidad inductora manifestada por *R. meliloti* (Rm4) desde su aislamiento hasta cuatro meses de conservación por pases en el laboratorio. Se ha representado el tanto por ciento de actividad considerando 100 el valor obtenido originalmente.

Tratamiento con naranja de acridina

Antes de llevar a cabo el tratamiento con naranja de acridina se realizaron pruebas previas para la determinación de la máxima concentración subbacteriostática. En la tabla 14 se exponen en D.O. a 650, los resultados correspondientes obtenidos en la lectura realizada a las 12, 24, 48 y 72 horas.

TABLA 14.

Efecto de la concentración de naranja de acridina sobre el crecimiento de *R. meliloti* (Rm4).

Concentración µg/ml	Tiempo (horas)			
	12	24	48	72
0	1,56	2,88	3,80	2,60
1	1,50	2,88	3,80	2,60
2	1,41	2,94	3,60	2,50
5	1,56	2,88	3,30	2,40
10	1,50	2,88	3,60	2,40
15	1,50	2,88	3,40	2,40
20	1,50	2,88	3,60	2,60
25	1,50	2,82	3,50	2,40
30	1,50	2,80	3,40	2,40
50	1,41	2,78	3,10	2,40
100	1,32	2,76	3,10	2,10

Se aprecia claramente que la concentración más idónea de las ensayadas es la de 20 µg/ml, que será la usada para los ensayos definitivos.

En la tabla 15 se exponen los resultados obtenidos cuando razas de *R. meliloti* que muestran alta capacidad de inducir la producción de poligalacturonasa reciben tratamiento con naranja de acridina.

TABLA 15.

Porcentaje de cultivos de *R. meliloti* obtenidos después del tratamiento con naranja de acridina durante 24 horas que muestra una actividad inductora de Poligalacturonasa mayor que el valor indicado (número de clones estudiado: 50).

Bacteria	Tratamiento con NA	% cultivos PG 20 ^{a)}
<i>R. meliloti</i> (Rm4)	-	94,6
<i>R. meliloti</i> (Rm8)	-	93,8
<i>R. meliloti</i> (Rm4)	+	16,2 ^{b)}
<i>R. meliloti</i> (Rm8)	+	14,7 ^{b)}

* PG expresado en % de disminución de la viscosidad de una solución de pectina al 1%.

a) PG = 20, ha sido considerado como valor mínimo significativo.

b) La mayor parte de los subcultivos mostraron un valor de PG inferior a 4.

Se observa claramente que el tanto por ciento de subcultivos procedentes de colonias aisladas después del tratamiento, que muestran alta capacidad inductora, ~~decrece considerable~~ y significativamente.

Tratamiento con mitomicina C.

En la figura 4 se exponen gráficamente los resultados obtenidos de los ensayos previos realizados para determinar los óptimos de concentración de antibiótico y tiempo de tratamiento para las experiencias definitivas.

En la Tabla 16 se recogen los resultados correspondientes a los tratamientos realizados con mitomicina C a la concentración y tiempo previamente determinados sobre dos razas de *R. meliloti* que originalmente manifiestan una baja capacidad inductora de poligalacturonasa.

TABLA 16.

Porcentaje de clones de *R. meliloti* obtenidos después del tratamiento con mitomicina C a 0,25 µg/ml durante 30 minutos que muestra una actividad inductora de poligalacturonasa más alta que el valor indicado (número de clones estudiado: 50).

Bacteria	Tratamiento con Mitomicina C	% clones PG: 20 ^a)
<i>R. meliloti</i> (Rm3)	-	1,0
<i>R. meliloti</i> (Rm9)	-	0,0
<i>R. meliloti</i> (Rm3)	+	95,0
<i>R. meliloti</i> (Rm9)	+	96,0

* PG expresada en % de disminución de la viscosidad de una solución de pectina al 1%.

a) PG = 20 ha sido considerado como valor mínimo significativo.

Los resultados muestran una patente inducción de la capacidad de inducir la producción del enzima.

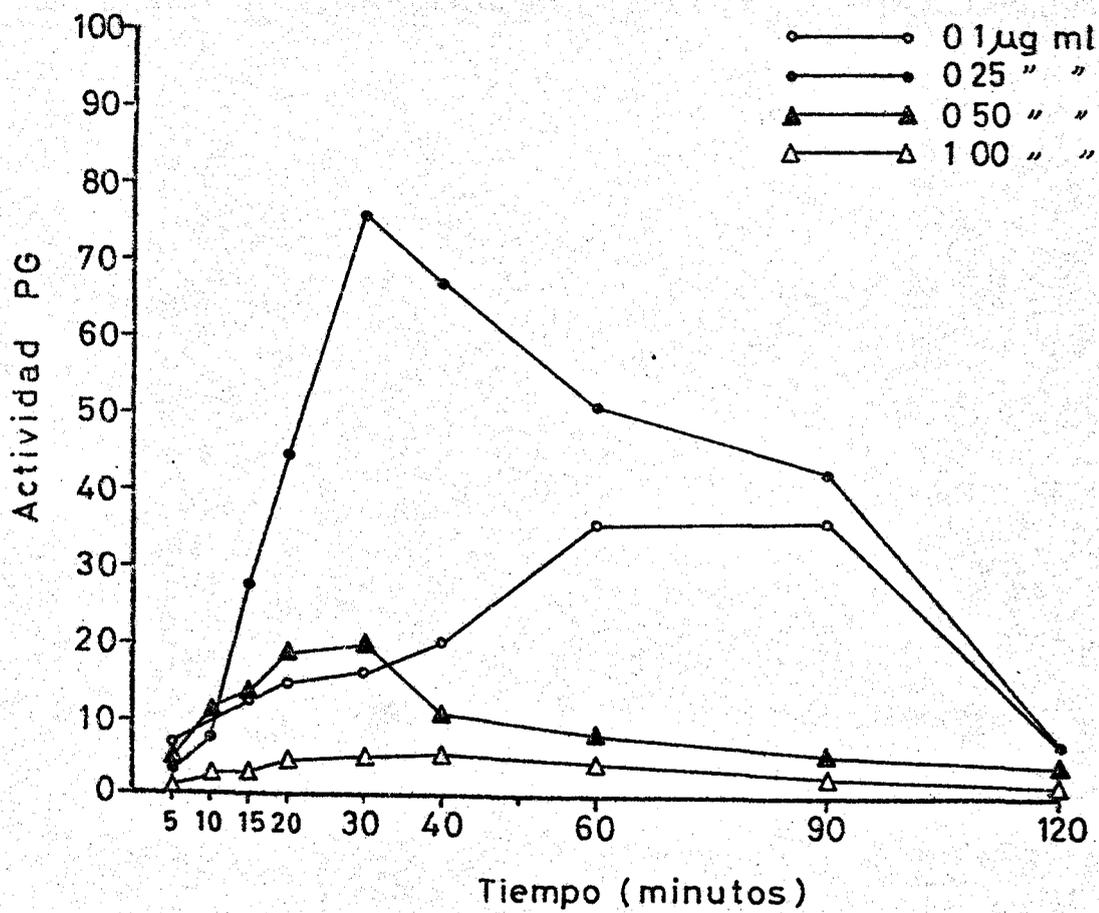


Fig. 4.- Actividad de PG de los cultivos tratados con Mitomicina C a diferentes concentraciones y tiempos. Actividad de PG expresada en % de disminución de viscosidad de una solución de pectina al 1% a las 24 horas.

Cuando el tratamiento con mitomicina se realiza sobre razas - previamente tratadas con naranja de acridina y que manifiestan una capacidad inductora nula, ésto es, razas curadas, se obtienen unos datos que son mostrados en la tabla 17.

TABLA 17.

Porcentaje de subcultivos obtenidos de razas de *R. meliloti* - curadas con naranja de acridina después del tratamiento con mitomicina que muestra una actividad inductora de PG mayor que el valor indicado (número de clones estudiados: 50).

Bacteria	Tratamiento con Mitomicina	% clones PG* (20a)
<i>R. meliloti</i> (Rm4c)	-	0,0
<i>R. meliloti</i> (Rm8c)	-	0,0
<i>R. meliloti</i> (Rm4c)	+	0,0 (b)
<i>R. meliloti</i> (Rm8c)	+	0,0 (b)

* PG expresada en % de disminución de la viscosidad de una solución de pectina al 1%.

- a) PG = 20, ha sido considerado como valor mínimo significativo.
 b) La mayor parte de los subcultivos mostraron un valor de PG inferior a 4.

Se observa que el efecto de la mitomicina en este caso particular no se manifiesta al haber sido los plásmidos previamente eliminados por el tratamiento con naranja de acridina.

Separación de ADN en gradiente de densidad.

En la figura 5 se han representado los valores de CPM obtenidos en cada fracción recogida de los tubos donde se realizó la centrifugación en gradiente de densidad de los lisados capsulares de *R. meliloti* correspondientes a una raza silvestre de alta capacidad inductora (Rm4) y otra curada (Rm4c) y, por tanto, sin tal actividad.

Se aprecia claramente la falta del pico presumiblemente debido a ADN extracromosómico, en la curva de separación correspondiente al ADN de células curadas.

Producción, obtención, purificación y análisis de los polisacáridos capsulares.

Antes de comenzar el estudio de la producción de los polisacáridos se ensayó la actividad inductora del precipitado acetónico obtenido de cultivos de *R. meliloti* de alta capacidad de inducción de la producción de poligalacturonasa, obteniéndose valores de actividad considerablemente altos.

En la tabla 18 se exponen los valores obtenidos, expresados en peso seco, por 100 ml de medio, de polisacárido precipitado en cultivos de dos razas de *R. meliloti*, una activa (Rm4) y otra curada (Rm4c) a lo largo de un determinado período de crecimiento.

Para mejor apreciar la marcha de la producción de estos polisacáridos se ha realizado la representación gráfica (figura 6) de los datos arriba expuestos, observándose que la cantidad de polisacárido producido por las células silvestres es de un 30-40 % mayor que la correspondiente a las curadas, manifestándose, sin embargo, en ambas una forma semejante.

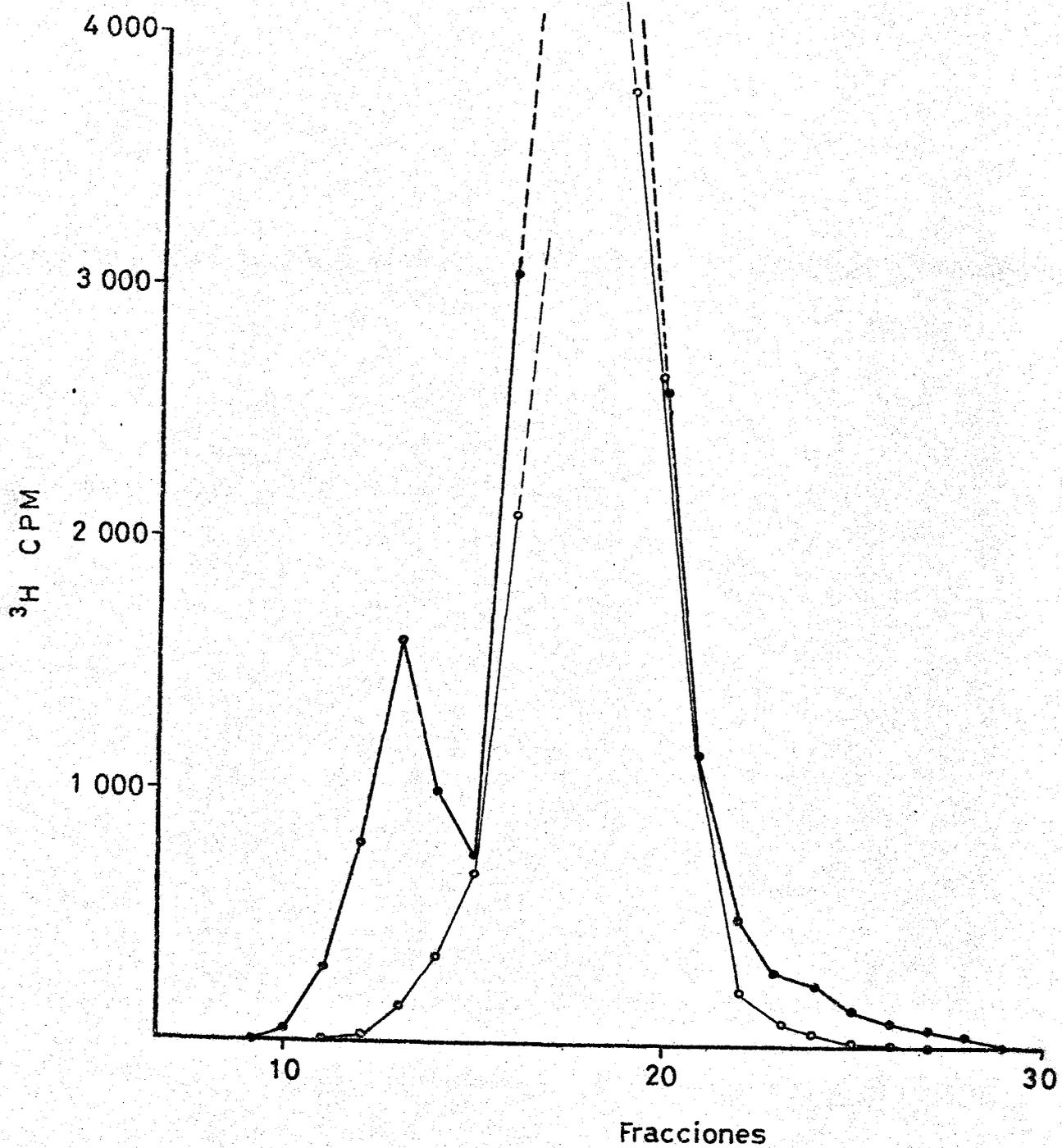


Fig. 5.- Centrifugación en gradiente de densidad de ADN marcado con ^3H procedente de una raza de *R. meliloti* de alta capacidad inductora (Rm4) (•) y de otra curada con naranja de acridina (o) (Rm4c).

TABLA 18.

Producción de polisacárido a lo largo de 19 días de cultivo de dos razas de *R. meliloti*, una salvaje con alta capacidad inductora de poligalacturonasa (Rm⁴) y otra (Rm^{4c}) curada con naranja de acridina.

Tiempo de cultivo (días)	Peso seco de polisacárido (mg/100 ml)	
	Raza salvaje (Rm ⁴)	Raza curada (Rm ^{4c})
3	317,4	168,7
4	344,8	211,2
5	400,7	253,4
6	455,5	285,7
7	472,6	332,4
9	497,2	351,2
12	311,3	341,5
16	373,2	253,7
19	386,7	337,2

La actividad de poligalacturonasa medida cuando se ponen en -- contacto las plántulas de *Medicago sativa* con distintas concentraciones de los polisacáridos aislados de las dos razas antes mencionadas, es expuesta en la tabla 19. Así mismo, para mayor claridad se han -- realizado las representaciones gráficas que aparecen en la figura 7.

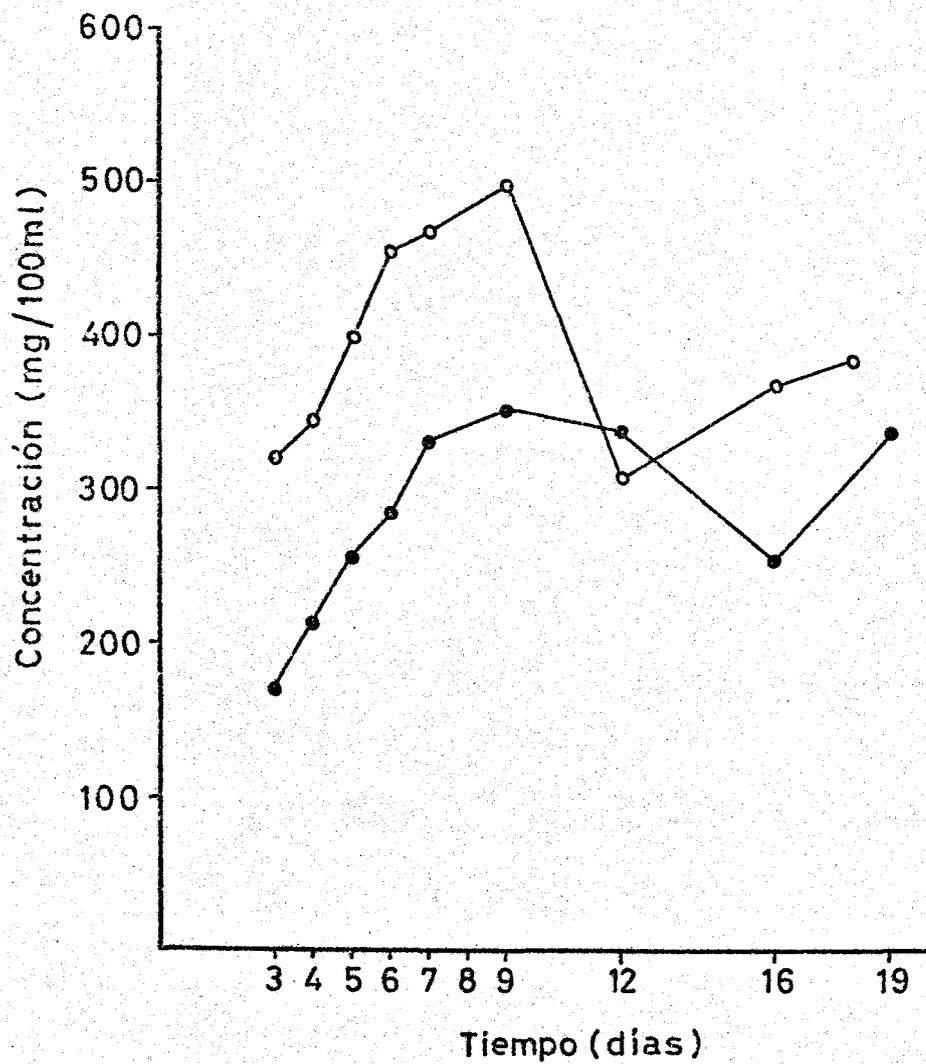


Fig. 6.- Producción de polisacárido en función del tiempo de cultivo de dos razas de *R. meliloti*. Una salvaje (Rm4) de alta capacidad inductora (o) y otra curada (Rm4c) de capacidad nula (•).

TABLA 19.

Actividad de poligalacturonasa inducida por diversas concentraciones de polisacárido, de dos razas de *R. meliloti* (una curada con naranja de acridina y otra salvaje) sobre raíces de plántulas de *Medicago sativa*.

Concentración (mg/ml)	Actividad PG*	
	Raza salvaje (Rm4)	Raza curada (Rm4c)
0	0,0	0,0
0,10	12,7	1,5
0,15	15,3	2,5
0,25	33,3	5,0
0,50	84,7	5,1
0,75	85,2	7,0
1,00	86,0	74,0
2,00	92,5	76,6
5,00	71,5	60,0

* PG expresada en % de disminución de la viscosidad de una solución de pectina al 1%.

Purificación: Los resultados obtenidos en la filtración realizada por Sephadex G-25 de soluciones de polisacáridos capsulares de una raza de *R. meliloti* silvestre (Rm4) de alta capacidad inductora de poligalacturonasa y de otra (Rm4c) curada con naranja de acridina, son expuestos en la figura 8. En ella se puede observar una separación semejante, apareciendo tres picos muy claros y en los mismos lugares, aunque en distinta altura de acuerdo con los valores obtenidos utilizando la técnica de la antrona.

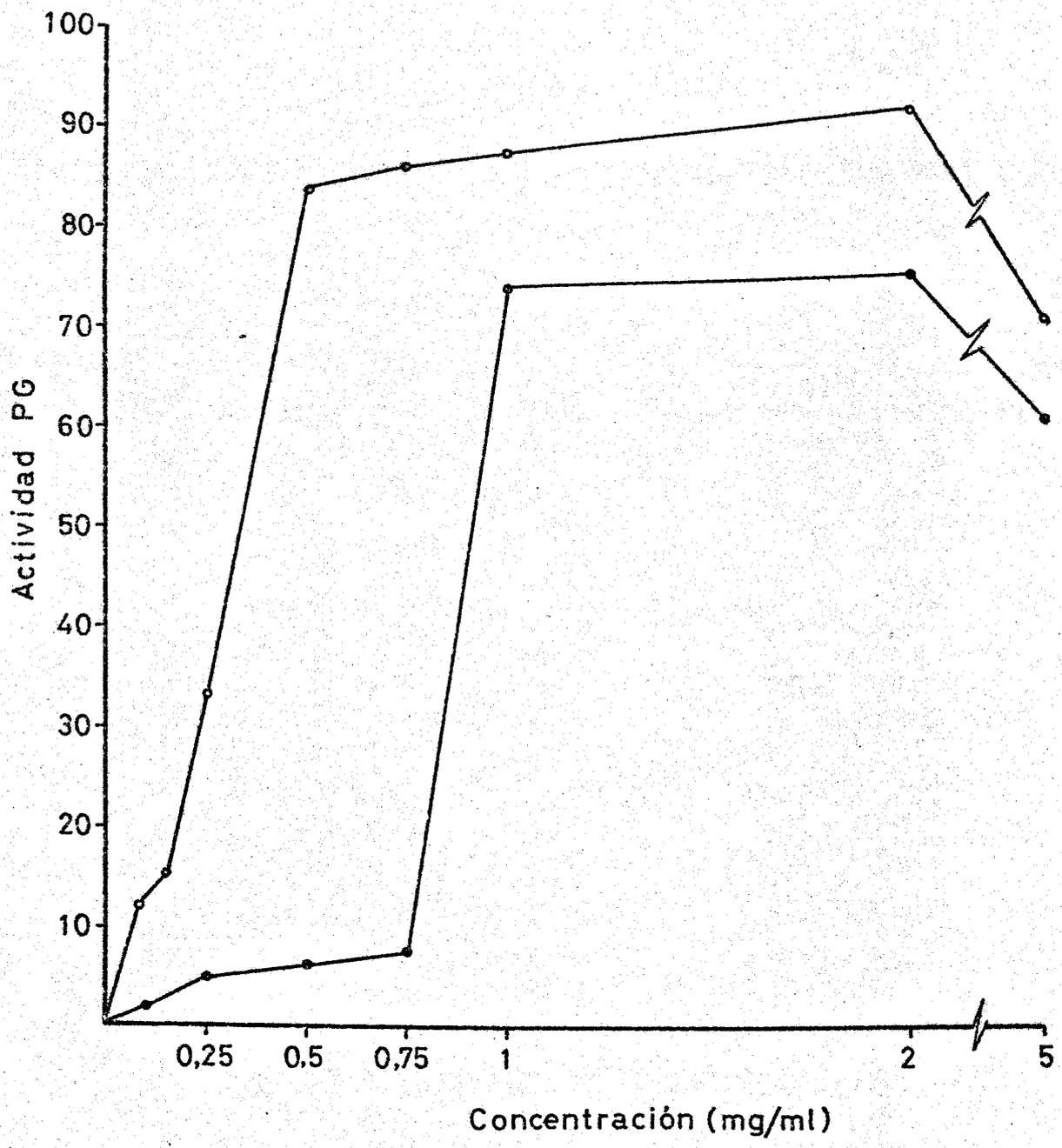


Fig. 7.- Actividad de poligalacturonasa inducida por diversas concentraciones de polisacárido, de dos razas de *R. meliloti* (una curada con naranja de acridina (o) y otra salvaje (.)) sobre raíces de plántulas de *Medicago sativa*.

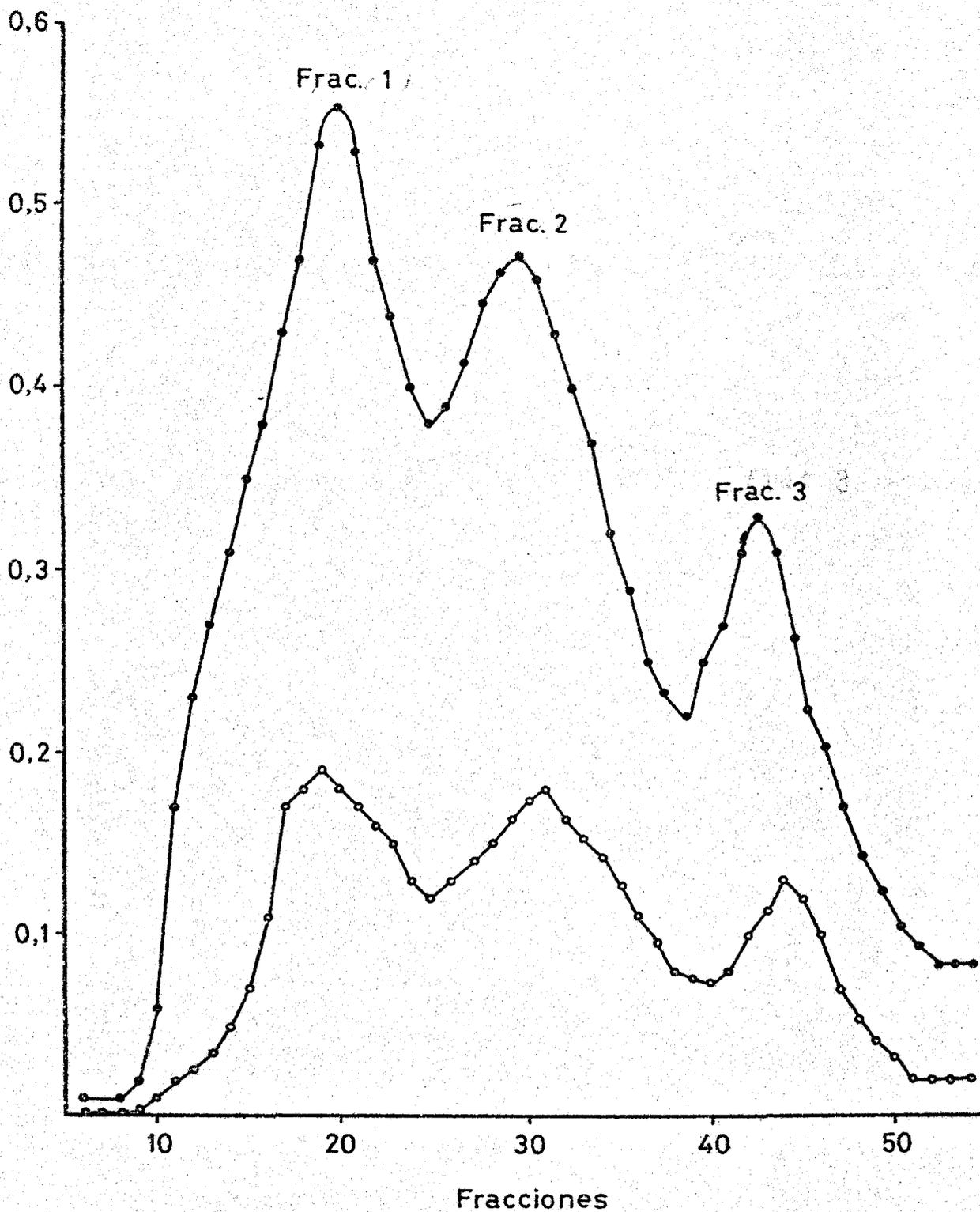


Fig. 8.- Filtración por Sephadex G-25 de los polisacáridos obtenidos de una raza silvestre (Rm4) (o) y otra curada (Rm4c) (•) de *R. meliloti*.

Reunidas las fracciones correspondientes a cada pico y realizada la valoración de capacidad inductora del enzima péctico, se encontró que en ambos fraccionados, tabla 20, la actividad residía en el primer pico, aunque era de un 40% menor en el procedente de la raza curada a pesar de encontrarse aparentemente en mayor cantidad, de acuerdo con la valoración por la técnica de la antrona, aunque en cuanto al peso seco obtenido no hay diferencia apreciable.

TABLA 20.

Actividad enzimática inducida por las fracciones obtenidas de la filtración por Sephadex G-25 de los polisacáridos capsulares de una raza silvestre y otra curada de *R. meliloti*.

Fracción	Actividad de PG*	
	Raza silvestre (Rm4)	Raza curada (Rm4c)
Primera	76,0	43,3
Segunda	0,5	0,0
Tercera	0,0	1,5

Valores medios de tres determinaciones.

* PG expresada en % de la disminución de la viscosidad de una solución de pectina al 1%.

Análisis del polisacárido.

La cromatografía en papel del hidrolizado del primer pico de cada fraccionada, vuelto a pasar por Sephadex para mayor purificación separó los azúcares y derivados de la forma que esquemáticamente se representa en la figura 9; una vez fueron adecuadamente revelados.

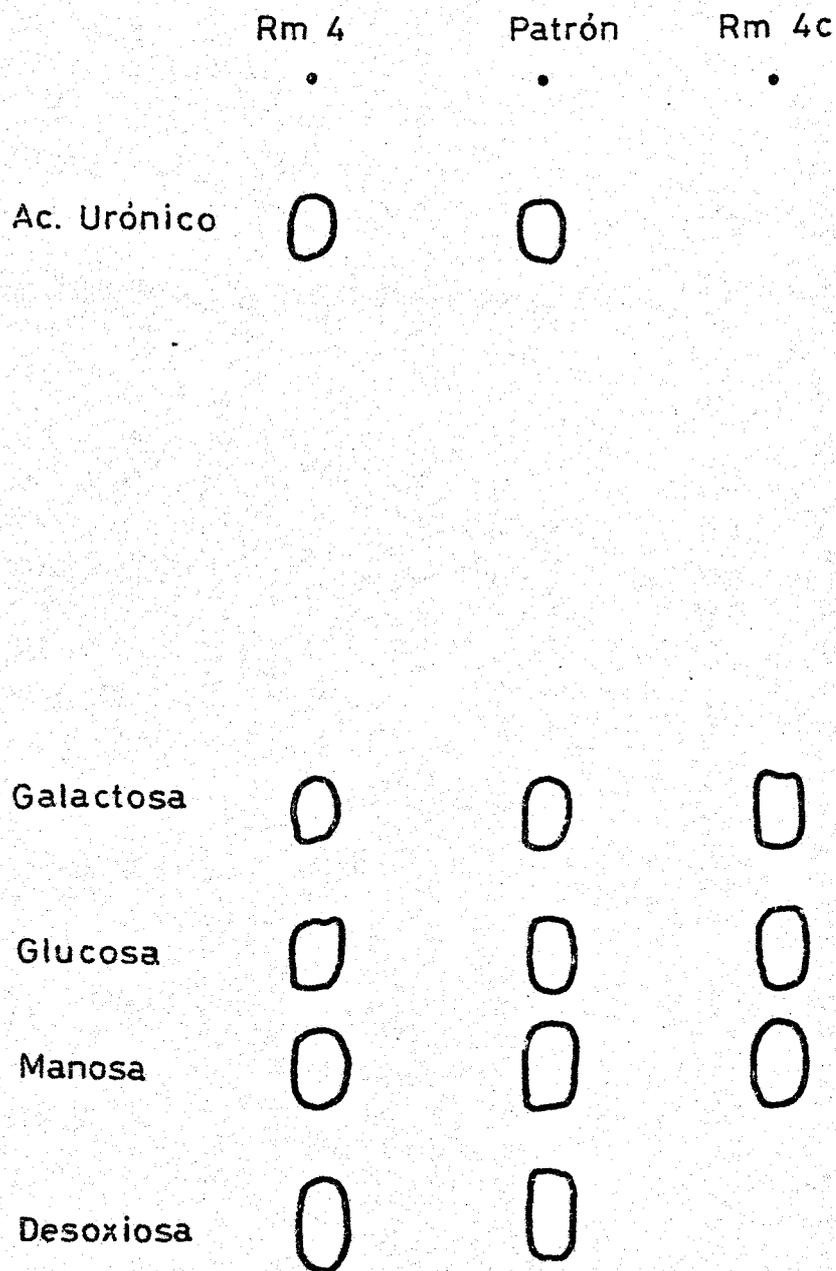


Fig. 9.- Esquema de la separación cromatográfica de los hidrolizados de la primera fracción resultante de la filtración por Sephadex de los polisacáridos capsulares de las dos razas de *R. meliloti* estudiadas.

Cuando tales manchas son recortadas y valoradas de acuerdo con la técnica descrita en Material y Métodos, se encuentran los resultados que se muestran en la tabla 21, donde se expone el valor porcentual de cada monómero.

TABLA 21.

Composición porcentual de azúcares en el hidrolizado de los polisacáridos purificados de las dos razas microbianas ensayadas.

Azúcares o derivados	Composición porcentual	
	Raza salvaje (Rm4.)	Raza curada (Rm4c)
Ac. Urónico	15,10	-
Galactosa	23,85	14,65
Glucosa	30,43	55,87
Manosa	16,78	27,34
Desoxiosa	11,17	-

La composición de ambos polisacáridos es cualitativa y cuantitativamente bastante distinta.

DISCUSION

De acuerdo con la concepción de Nutaman sobre el proceso de infección de las raíces de las leguminosas por *Rhizobium*, que aparece - en el esquema 1, el primer paso, la mayor proliferación de estas bacterias en la rizosfera de las leguminosas ha sido considerado la mayoría de las veces que ha sido tratado como inespecífico; no establecieron los distintos autores una separación clara entre especificidad e infectividad a este nivel, ya que en los trabajos sobre especificidad se determina esta característica por la capacidad para producir nódulos en las raíces de una determinada especie de leguminosa, sin tener en cuenta para nada cualquier hecho previo a la infección propiamente dicha que pudiera afectar a la misma.

De los resultados expuestos en la tabla 1 parece deducirse que la estimulación del crecimiento por exudados de raíces que experimenta una determinada especie de *Rhizobium* es mayor cuando estos exudados proceden de las raíces de su leguminosa específica. La tabla 2 que - muestra los resultados obtenidos al poner en contacto los exudados de las leguminosas estudiadas frente a las distintas especies de *Rhizo--bium*; confirma lo anteriormente dicho, porque, con la sola excepción de lo que ocurre cuando se utiliza guisante puede observarse un mayor crecimiento bacteriano cuando el exudado utilizado es el específico - de la bacteria.

Con todo, los resultados obtenidos en este tipo de experiencias, a pesar de ser bastante coincidentes, no permiten llegar a ninguna con

clusión válida sobre si una determinada leguminosa favorece el crecimiento de su *Rhizobium* específico, aumentando así la probabilidad de que pueda ser infectada por el mismo.

De una parte el número de experiencias realizadas ha sido pequeño y, de otra, aunque en el estudio efectuado se ha tratado de eliminar cualquier variación en las condiciones experimentales, el hecho de tener que trabajar con un material heterogéneo -las semillas de las distintas plantas empleadas- hace imposible obtener una homogeneidad adecuada, tal como se han planteado las experiencias.

Lo anteriormente dicho se pone de manifiesto al máximo en el caso del guisante, con el que, al tener semillas mucho mayores y dar, por tanto, plántulas más desarrolladas, se obtienen unos valores totalmente distintos a los esperados, ya que éstas al excretar, por una parte, mayor cantidad de sustancias al medio y, por otra, al absorber más agua, dan lugar a que en el líquido final se encuentre con una concentración de sustancias exudadas considerablemente más alta.

No hay que olvidar tampoco, que las condiciones en que se ha estudiado el fenómeno no han sido las ideales y por supuesto bien diferentes a las que ocurren naturalmente en el suelo donde la acción conjunta de factores físicos, químicos y biológicos determinan condiciones particulares y en parte desconocidas, que no se han tenido en cuenta en las experiencias reseñadas.

De cualquier manera y aunque no pueda afirmarse de manera definitiva que una determinada leguminosa produzca un factor de crecimiento específico para la especie de *Rhizobium* que le es propia, lo que si aparece claro es que los exudados de las raíces de las plantas ensayadas favorecen el crecimiento de los *Rhizobium*.

Los resultados obtenidos concuerdan con los de Robinson (1967), Rovira (1962), Katnelson (1965), etc., quienes consideran que el estímulo ejercido por las leguminosas frente a distintos *Rhizobium* es mayor que el que producen las raíces de otras plantas. Sin embargo, como se aprecia claramente en la tabla 1 los exudados de no leguminosas, trigo y rábano, también favorecen la proliferación microbiana cuando se comparan con los testigos de agua. Confirman, pues, estos resultados las apreciaciones de Manil (1958) sobre la capacidad de los *Rhizobium* para crecer en la rizosfera de plantas no leguminosas, lo que permite su supervivencia en ausencia de sus plantas específicas.

Otro punto que conviene hacer resaltar como fruto de estas experiencias, es que no se ha podido comprobar el efecto inhibitor específico de la semilla de trebol sobre *R. meliloti* descrito por Nutman en 1953, ya que la inhibición del crecimiento que originan los exudados de *Trifolium* sobre esta bacteria es similar al que originan sobre las restantes bacterias ensayadas.

A pesar del indudable interés de esta faceta del proceso de infectividad y de lo prometedor de los resultados obtenidos, no fué posible profundizar más en el tema, ya que, siendo el objeto principal de este trabajo el estudio del papel que juega la producción de poligalacturonasa en la infectividad de los *Rhizobium*, hubo que concentrar todos los esfuerzos sobre este problema. Las interacciones previas al proceso de infección que se llevan a cabo en la rizosfera de leguminosas y otras plantas, quedan, pues, como un prometedor y abierto campo de investigación de indudable interés en la ecología de los *Rhizobium*.

Para abordar el estudio propuesto fue necesario realizar una serie de experimentos preliminares al objeto de seleccionar la asociación

ción *Rhizobium* - leguminosa más adecuada para su realización.

En primer lugar fué necesario determinar si las especies y razas microbianas que se iban a utilizar presentaban una infectividad y efectividad aceptables.

Como muestra la tabla 3, se determinó la infectividad de cuatro especies de *Rhizobium* frente a su planta correspondiente. Los datos obtenidos en las plantas inoculadas comparadas con las de las testigo, no inoculadas, son bastante elocuentes ya que, mientras en estas últimas no aparecían nódulos, las inoculadas presentan un número mayor o menor según especie o raza.

En todos los casos se pudo observar que los nódulos se encontraban en las raíces principales y además presentaban generalmente un color rojizo, lo que es índice de una buena efectividad.

Con posterioridad a la selección de la asociación *R.melitoti* - *Medicago sativa* para la realización del trabajo, por los motivos que se expondrán más adelante, los resultados previos antes seleccionados sobre infectividad, se comprobaron cuidadosamente con cuatro razas de la citada especie de *Rhizobium*. Los resultados expuestos en la tabla 4 confirmaron la infectividad de las cuatro razas de *R.melitoti* seleccionadas, muy similar excepto en un caso.

Aprovechando el anterior ensayo de infectividad, se pudo realizar una prueba de actividad aunque un poco limitada, ya que sólo se determinó peso fresco y seco de las plantas de *Medicago sativa* que previamente habían sido inoculadas por las cuatro razas de *R.melitoti* (tabla 5) pero que dió diferencias respecto al testigo altamente significativas. El hecho de no haber realizado la prueba de actividad -

completa no fue otro que la falta de cantidad mínima necesaria de material para poder realizar la correspondiente determinación de Nitrógeno por las técnicas rutinarias que estaban a mano. Por eso se realizó una prueba de actividad en macetas en invernadero con dos de las tres razas utilizadas anteriormente, la Rm2 y Rm4. En estas dos experiencias se realizaron todas las determinaciones necesarias para poder estimar su grado de actividad.

Estas determinaciones cuyos resultados son mostrados en la tabla 6, han indicado la alta diferencia significativa entre las plantas que han sido inoculadas y las testigo sin inocular. Como se puede ver, además del peso fresco y seco, se ha hecho la correspondiente determinación de contenido en nitrógeno y cantidad total absorbida del mismo, parámetros que con los dos anteriores indican la actividad de una raza cuando se comparan con un testigo.

En relación con la capacidad de los *Rhizobium* ensayados para inducir la producción de poligalacturonasa por las raíces de las leguminosas, los resultados presentados en la tabla 7 son claramente positivos a pesar de que las condiciones de determinación no fueron las óptimas que después se han empleado.

El hecho de que la especie *R.melitoti* presentase una actividad enzimática relativamente grande, unido al tamaño ideal de la semilla de la leguminosa para la técnica utilizada, hizo que se eligiera dicha especie microbiana y la planta *Medicago sativa* para los posteriores experimentos. Hay que indicar aquí que ya fueron desechadas previamente a la realización de las pruebas de capacidad de inducción, otras plantas como haba, judía, etc., por el tamaño exagerado de su semilla que planteaba serias dificultades para poder realizar las pruebas enzimáticas por la técnica disponible.

La tabla 8, muestra claramente la especificidad de la inducción del enzima poligalacturonasa, que se produce sólo cuando se forma una asociación determinada, en este caso *R.melitoti* - *Medicago sativa*, y no cuando esta bacteria se pone en contacto con otra planta como guisante o trebol.

Del mismo modo los *R. trifolii* y *R. leguminosarum* no fueron capaces de inducir la producción del enzima puestos en contacto con la alfalfa.

Estos resultados son prueba evidente de que se puede conocer la especificidad de una manera rápida con el sólo estudio de la inducción del enzima.

En todos los ensayos de medida de producción de poligalacturonasa realizados al comienzo, fue seguida estrictamente la técnica descrita por Ljunggren y Fahraeus (1961); la mayoría de las veces, sin embargo, los valores de actividad enzimática encontrados apenas si sobrepasan ligeramente, el nivel de error que por término medio había sido establecido por Lillich y Elkan (1968) en un 20 - 30% de actividad de PG, calculada de acuerdo con la fórmula dada por los autores de la técnica original. Según Lillich y Elkan, los resultados obtenidos carecían siempre de significación por lo que su trabajo se convirtió en una dura crítica de la hipótesis de Fahraeus y Ljunggren.

Para obviar esta dificultad fueron estudiadas nuevas condiciones de experimentación que hicieron la técnica más sensible. El pH original de 5.0 conseguido con tampón acético acetato 0,1M, fué elevado a 7.0, utilizando tampón de fosfatos 0,2M. Los resultados obtenidos, tabla 9, con esta modificación fueron totalmente distintos, ya que los valores de actividad de PG demostrables se incrementaron en más de un

cien por ciento, lo que permite negar la afirmación de Lillich y Elkan ya citada.

Por otra parte, el tiempo de contacto entre bacterias y raíces fue modificado en distintos ensayos, habiéndose encontrado como óptimo los 6 días en lugar de los dos o cuatro estimados como buenos por Fahraeus y Ljunggren. La gráfica representada en la figura 2 es bien elocuente a este respecto.

Una vez puesta a punto la técnica y elegida la asociación bacteria - leguminosa, el nuevo paso a dar era la selección de las razas que mejores resultados podían ofrecer.

Como consta en la introducción, existen razas que son infectivas y otras que no lo son, por ello todas las razas pertenecientes a una misma especie no tienen necesariamente la misma capacidad para infectar y, por otro lado, para inducir la producción de poligalacturona sa.

En la tabla 10 se exponen los resultados de la inducción enzimática provocada por nueve razas de *R. meliloti*, mostrándose la variedad de datos que van desde una actividad en PG de 70 correspondiente a la raza Rm4 hasta a otros cercana a 0 de la raza Rm3.

En este momento de la investigación, aunque por los antecedentes se estimaba que la planta era el simbiote que producía el enzima, se creyó oportuno realizar la comprobación pertinente, por lo que tanto exudados como extractos radicales, se pusieron en contacto por un tiempo adecuado con el correspondiente *Rhizobium*. Los resultados ex-puestos en la tabla 11 y 12, respectivamente, son claramente indicati-vos de que la producción del enzima es de origen vegetal aunque, por -

mecanismos todavía desconocidos, requiere la inducción de una sustancia liberada por la bacteria al medio, sustancia descrita en la bibliografía, aunque no sin cierta duda, como los polisacáridos extracelulares de los *Rhizobium* o algún componente de los mismos (Fahraeus y Ljunggren, 1959a); incluso hay autores que estiman que el agente inductor puede ser ADN extracelular ligado a los polisacáridos (Ljunggren, 1961).

De acuerdo con el objeto de este trabajo se ha intentado la separación, purificación y análisis de tales polisacáridos, liberados al medio en su mayor parte. Pero antes de discutir los resultados obtenidos y siguiendo el orden cronológico que se ha seguido en la investigación, va a ser comentado un hecho que al ser encontrado, se estimó interesante estudiar a fondo para completar el trabajo.

A lo largo de los experimentos realizados se pudo comprobar que la capacidad de inducir la producción del enzima iba disminuyendo conforme transcurría el tiempo desde el aislamiento del *Rhizobium* de los nódulos de las raíces de la alfalfa. En la tabla 13 se exponen los resultados correspondientes a una de las razas aisladas que son completados con la representación gráfica en la figura 3 del tanto por ciento de actividad residual en función del tiempo de conservación tanto en la tabla como en la figura, se puede apreciar el descenso gradual de la actividad desde las primeras semanas hasta el cuarto mes de mantenimiento en el laboratorio por pases sucesivos.

Una alternativa para explicar esta pérdida progresiva de actividad es suponer que la capacidad de inducción de PG está ligada a la presencia de un ADN extracromosómico o plásmido, la expresión de cuyos genes va siendo reprimida progresivamente en el transcurso de la conservación de la bacteria en el laboratorio, o bien, mediante una "cura"

espontánea, va desapareciendo de la población en las citadas condiciones.

En la bibliografía sobre el tema se encuentran sugerencias sobre el posible papel de plásmidos en el establecimiento y efectividad de las asociaciones *Rhizobium* - leguminosa. Higashi (1967) ha realizado estudios en este sentido sobre especificidad, mientras que Dunican y Cannon (1971), Zurkowski et al. (1973) sobre infectividad. A parte de estos, los diferentes trabajos existentes sobre fijación del nitrógeno, especialmente desde el punto de vista genético, con transferencia del carácter fijador a otros microorganismos induce a pensar también en una dependencia plásmica de la efectividad (Cannon et al. 1971; O'Gara et al. 1973; Dunican y Tierney, 1974; Beringer, 1974). - En ninguno de los estudios realizados, sin embargo, ha relacionado la capacidad de inducción de la poligalacturonasa de los *Rhizobium* con la presencia de un plásmido. Por esta razón, se estimó importante la comprobación de la hipótesis antes planteada.

En primer lugar se hicieron tratamientos encaminados a la eliminación de plásmidos sobre razas activas y se observó la repercusión de los mismos en la capacidad de inducción de PG. De acuerdo con Hirota (1960) se utilizó naranja de acridina en dichos tratamientos.

Los primeros ensayos se realizaron con naranja de acridina tuvieron por objeto conocer la concentración máxima de colorante que no tiene acción inhibitoria sobre el crecimiento de los *Rhizobium*, ya que sólo se tenía los datos de Hirota (20 µg/ml) referidos a *Escherichia coli*. La medida de crecimiento se realizó según se expresa en Material y Métodos por lectura de la D.O. a 650 nm, longitud de onda que no presenta interferencia con la distinta intensidad amarillo-naranja de los cultivos de acuerdo con su contenido en colorante. Los -

resultados que se exponen en la tabla 14 indican que el *R. melitoti* se comporta de igual manera que el *E. coli* frente al naranja de acridina, por lo que fue elegida para la realización de los tratamientos la concentración utilizada por Hirota.

Las experiencias de eliminación de plasmidos se llevaron a cabo con las razas salvajes que presentaban mayor capacidad de inducción de PG. De cada tratamiento se realizó un aislamiento y se picó un número significativo de colonias para hacer subcultivos y obtener masa microbiana suficiente para realizar la determinación de la capacidad de inducción de PG de cada clono.

Un resumen de los resultados se expone en la tabla 15 donde se puede observar el tanto por ciento de clones que muestran una capacidad inductora más baja que el valor que se ha tomado como índice (PG=20), de acuerdo con la afirmación de Lillich y Elkan y nuestra experiencia personal.

Aunque en la mencionada tabla sólo figuran los resultados obtenidos para tratamientos con naranja de acridina de 24 horas, se han realizado ensayos a 48 y 72 horas con resultados similares.

Esta demostración hubiera sido aparentemente más concluyente si hubiera habido una división tajante entre los que manifiestan una alta capacidad enzimática y los que la presentan baja, sin embargo, se encuentra una gama de valores de actividades que gradualmente va de cerca de 100 a próximos a 0. Este hecho, no solamente indica la falta de una técnica más sensible, sino también la intervención de otra circunstancia además de la existencia de un plasmido que controla la producción del inductor de la que después tendrá ocasión de tratarse cuando se discutan los resultados referentes a la purificación

de polisacáridos capsulares.

Los resultados obtenidos en los tratamientos con naranja de acridina concuerdan, pues, con la hipótesis antes propuesta de dependencia de la capacidad de inducción de PG a la presencia en *Rhizobium* de un plasmido. Faltaba por comprobar si la pérdida paulatina de la actividad inductora es debida a la cura espontánea del plasmido o a la represión del mismo. Para determinar este extremo, se ensayó si las razas que espontáneamente habían perdido actividad eran capaces de recuperarla en un proceso de inducción mediante un tratamiento adecuado. Como agente inductor se empleó la mitomicina C (Nakazawa y Tamada, 1972).

Los ensayos con esta sustancia química se han realizado como es lógico de forma contraria a los anteriores, escogiéndose las razas de *R.melitoti* que naturalmente mostraban una baja capacidad inductora de poligalacturonasa.

Antes que nada, por la carencia de datos sobre el particular referentes a *R.melitoti* ya que sólo se tenían las referencias de Otsuji et al. (1959) con *E.coli* y algún dato aportado por Parijskaja (1973), se realizaron los ensayos para conocer el tiempo y la concentración óptima para realizar los tratamientos. Como se indicó en el capítulo de Material y Métodos, aquí no se hizo aislamiento como en el caso del naranja de acridina, caso más sencillo pues sólo jugaba el factor concentración, sino unos ensayos previos de actividad inductora con las mismas bacterias que prácticamente habían estado en contacto por corto tiempo con una determinada concentración de mitomicina C, eliminando la interferencia del antibiótico con un inóculo fuerte llevado sobre medio sólido, para conseguir masa sin necesidad de muchas divisiones celulares.

De esta forma se tuvieron unos datos de actividad de poligalacturonasa que representados gráficamente, figura 4, dan una idea clara de concentración y tiempo óptimos (0,25 µg/ml, 30 minutos), para llevar a cabo las pruebas definitivas. Pruebas que, como en el caso de los tratamientos con naranja de acridina, suponían el aislamiento sobre el medio sólido y el posterior estudio de un número significativo de los subcultivos procedentes de las colonias aparecidas.

Los resultados de la tabla 16 son bien demostrativos, pero a pesar de ello era necesario realizar un tercer tipo de prueba antes de llegar a conclusiones definitivas: comprobar que las razas curadas con naranja de acridina no recuperan la actividad inductora después del tratamiento con mitomicina. Realizados los ensayos correspondientes, los resultados fueron coincidentes, como puede deducirse fácilmente de la observación de la tabla 17.

Así pues puede concluirse que la capacidad del *R.melitoti* de inducir la producción de PG por las raíces de la leguminosa específica, depende de la presencia de un plasmido que, bajo las condiciones normales de conservación de la bacteria en el laboratorio, va siendo reprimido paulatinamente hasta el punto de que la bacteria llega a perder casi totalmente su capacidad inductora. Esta capacidad inductora residual obedece probablemente a la inducción espontánea y al azar de algunas células dentro del conjunto que componen la población. Naturalmente, aunque hasta el momento se ha hablado en singular, los resultados obtenidos no permiten afirmar que en la inducción de la PG intervenga un sólo plasmido.

Además de estos ensayos y de sus resultados tan positivos, se creyó interesante realizar un ensayo biofísico, consistente en la separación por centrifugación en gradiente de densidad del ADN de célu-

las que mostraban una alta capacidad inductora y de las curadas. La - figura 5 presenta la separación obtenida después de la medida de radio actividad presente en cada fracción correspondiente a la timidina tri- tiada que se usó para el marcado de los ácidos nucleicos. La falta de pico correspondiente a la presencia de ADN extracromosómico en la raza curada, confirma de forma rotunda la existencia de un plasmido que por mecanismo todavía desconocido puede controlar la producción del - inductor de la poligalacturonasa.

En la exposición que antecede ha quedado demostrado que la inducción de la producción de la PG se lleva a cabo por una o más sus- tancias producidas por la bacteria. Se había sugerido que tales sus- tancias podrían ser los polisacáridos extracelulares (Fahraeus y Ljun- ggren, 1959a), pero tal sugerencia no había sido confirmada hasta el momento ya que la mayoría de los estudios sobre los polisacáridos de *Rhizobium* se han enfocado desde un punto de vista químico y antigéni- co (Schluchterer y Stacey, 1945; Dudman, 1964a; Heidelberger et al. - 1970; Hepper, 1972).

Las experiencias realizadas en este trabajo, cuyos resultados se exponen en la tabla 19 y la figura 7, demuestran sin lugar a dudas que, efectivamente, los polisacáridos extracelulares son los inducto- res de la producción de PG por las raíces de las leguminosas. No pue- de descartarse, sin embargo, la idea de que tales macromoléculas no - actuen directamente, sino que los inductores reales sean fragmentos - de menor tamaño molecular procedentes de su degradación. Esta idea - viene apoyada por la evolución de la cantidad de polisacáridos que se aislan de un cultivo según el tiempo de incubación (Tabla 18, figura 6) que parece indicar que los polisacáridos sintetizados en los prime- ros días de cultivo se degradan fácilmente, el incremento posterior - que experimentan puede interpretarse como debido a un nuevo crecimien-

to de la bacteria a expensas de los productos liberados en las autolisis de células viejas. De todas formas en tanto no se compruebe lo dicho de manera directa, hay que seguir considerando a los polisacáridos extracelulares como los inductores de la PG.

Era de esperar que las razas curadas no produjesen polisacáridos o que estos fuesen inactivos; sin embargo, se encontró que, a diferencia de lo que ocurren cuando se emplean bacterias, a concentraciones mayores de 2 mg/ml, la capacidad inductora de preparaciones obtenidas de una raza con alta capacidad de inducción y de otra curada, era la misma o parecida.

Este hecho llamó poderosamente la atención y exigió un estudio más profundo del problema. Como primer paso se determinaron las actividades correspondientes a diferentes concentraciones de los polisacáridos obtenidos, encontrándose una respuesta que representada gráficamente explica el porqué de los primeros resultados hallados (Figura 7). Como se ve hay un umbral bastante mayor para los polisacáridos procedentes de las células curadas. Esto unido a una menor producción de los mismos, Tabla 18, aclaran la baja actividad manifestada por los cultivos de bacterias curadas.

De este estudio se dedujo que tanto las células normales activas como las tratadas con naranja de acridina producen polisacáridos activos, aunque éstas últimas, en menor cantidad y, es de suponer, de naturaleza química distinta ya que para ejercer su efecto como inductores necesitan estar presentes a una mayor concentración, lo que indica una menor especificidad.

El esclarecimiento de esta cuestión exigía la purificación y análisis de los dos tipos de sustancias. Para ello se utilizó la fil-

tración por Sephadex y se intentó el estudio de la composición química de los polisacáridos por análisis cromatográfico de los hidrolizados correspondientes.

El paso por Sephadex G-25 está limitado por la alta viscosidad que representan las soluciones de polisacárido cuando sobrepasan una cierta concentración. Utilizando concentraciones bajas, en columnas - comparativamente grandes, se consiguieron separaciones de los productos originales con suficiente resolución para un estudio analítico.

La presencia de polisacárido en cada fracción recogida fue detectada con el método de la antrona y de acuerdo con los valores obtenidos se reunieron las que formaban los picos para valorar la capacidad de inducir la producción de poligalacturonasa. Las dificultades - que presenta esta técnica de medida impide realizar la determinación fracción por fracción. De todos modos, se llega bien sin lugar a dudas a detectar la presencia de actividad inductora en el primer pico de los tres que aparecen.

Se da el hecho curioso de que el fraccionamiento de polisacáridos extracelulares de células curadas también da lugar a tres picos, aunque la valoración con antrona proporciona cifras tres veces mayores para todas las fracciones aunque se haya partido de igual cantidad de muestra que en la separación del material capsular de las bacterias normales. El análisis de los monómeros explica este particular comportamiento de los polisacáridos de las razas curadas como se verá más adelante.

Realizados los ensayos de actividad inductora de los tres picos aparecidos, los resultados mostraron que la actividad residía también en el primero de ellos. Manifestando los otros dos una actividad

nula. No obstante a pesar de partir para la purificación de igual cantidad de material capsular de uno y otro tipo de células, la actividad mostrada por la fracción activa del procedente de las razas curadas es menor que la misma del otro tipo de células. Llevadas a sequedad ambos picos dieron pesos muy similares.

El análisis cromatográfico de los hidrolizados de la fracción activa de uno u otro origen se esquematizan en la figura 9, mientras que los resultados cuantitativos se muestran en la tabla 21. Como se aprecia, los dos polisacáridos son cualitativamente diferentes y al mismo tiempo presentan una proporción distinta de los azúcares comunes: glucosa, galactosa, manosa, ácidos urónico y desoxiosas como 2 : 2 : 1 : 1 : 1 para el polisacárido de células normales y para la glucosa, galactosa y manosa de las curadas, como 4 : 1 : 2. Esta distinta composición explica el comportamiento particular cuando se valora con el método de la antrona que da valores tres veces superiores en las razas curadas donde hay más glucosa y manosa; ya que entre las dos suman el triple que en el polisacárido de las células normales.

En relación con estos resultados no es posible establecer comparaciones con los datos aportados por otros autores con una metodología bastante diferente, no habiéndose realizado en ningún caso fraccionamiento por Sephadex G-25. Keele et al. (1974), consigue con Sephadex G-150 una separación bien distinta. Estos mismos autores encuentran en el material capsular una cierta proporción de ácidos nucleicos a los que Ljunggren (1961) achacaba la inducción de la PG. Por otra parte, la presencia de ácidos urónicos detectados en la fracción activa e indicada ya por Amarger et al. (1967) fue negada recientemente por Somme (1974). Humphrey et al. describen la ausencia de manosa en los polisacáridos extracelulares de los *Rhizobium* de crecimiento rápido, uno de los cuales es el *R. meliloti*, afirmación no concordante -

con los resultados aquí presentados. Se puede concluir que además de la variabilidad de razas, se aprecia la carencia de una normalización de los métodos de estudio seguidos por los diferentes autores.

Aunque no se haya hecho análisis alguno de las fracciones no activas de los dos purificados, el comportamiento mostrado cuando se realiza la valoración con antrona indica una similitud cualitativa - grande con el primer pico de cada una de ellas, aunque de composición estructural distinta que supone la pérdida de la actividad inductora del enzima.

A la vista de los resultados expuestos, el papel del plasmido o plasmidos en relación con la síntesis de los polisacáridos activos podría consistir en la producción de una serie de enzimas capaces de adicionar restos de ácidos urónicos, desoxiosas y probablemente galactosa a un esqueleto polisacarídico, cuya síntesis está regulada por genes nucleares, formado exclusivamente por glucosa, galactosa y manosa. La introducción de los sustituyentes citados conferiría una mayor especificidad como inductor al polisacárido y al aumentar el tamaño molecular incrementaría la cantidad del mismo producida. La conjunción de estos dos hechos explicaría la no ineffectividad de las razas de *Rhizobium* carentes del o los plásmidos responsables de la misma.

No obstante, en tanto no se disponga de más datos sobre la estructura química y la homogeneidad de la fracción polisacarídica activa, cualquier interpretación, ya sea la expuesta u otras, que se den para explicar el efecto del o los plásmidos estudiados sobre el tipo de polisacáridos sintetizados, debe considerarse por el momento como puramente especulativa.

CONCLUSIONES

- 1) Ha sido comprobada, en contra de la opinión de algunos autores, la relación existente entre la infectividad de los *Rhizobium* y su capacidad para inducir la producción de poligalacturonasa por las raíces de la leguminosa infectada.
- 2) Esta inducción, para la que se han determinado las condiciones óptimas, es totalmente específica, ya que sólo tiene lugar en las asociaciones de una determinada raza de *Rhizobium* con su leguminosa correspondiente.
- 3) Los efectores primarios de la inducción de la poligalacturonasa son los polisacáridos extracelulares producidos por los *Rhizobium*, tal como había sido ya sugerido.
- 4) La calidad y cantidad de tales polisacáridos, y por ende su mayor o menor poder inductor, están controladas por uno o varios determinantes genéticos extracromosómicos, cuya presencia y estado de represión condicionan, en definitiva, la capacidad de una raza de *Rhizobium* para infectar las raíces de una determinada leguminosa.

BIBLIOGRAFIA

ALLEN, O.N. 1951.- Experiments in soil bacteriology, Burgess Publishing Minneapolis, Minnesota.

ALLEN, O.N. y ALLEN, E.K. 1940.- Response of the peanut plant to inoculation with rhizobia with special reference to morphological development of the nodules. Bot. Gaz. 102, 121-142.

ALLEN, E.K. y ALLEN, O.N. 1958.- Biological aspect symbiotic nitrogen fixation. A. Lang (ed.) Encyclopedia of plant physiology. Springer Verlag Berlin, 8, 48-105.

ANDERSON, D.A. 1933.- The production of gum by certain species of *Rhizobium*. Iowa Agric. Expt. Sta. Research Bull. n° 158, 27-56.

ANDERSON, K.J. 1957.- The effect of soil microorganisms on the plant rhizobia association. Phytion. (Buenos Aires), 8, 59-73.

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

BAILEY, R.W., GREENWOOD, F.M. y CRAIG, A. 1971.- Extracellular polysaccharides of *Rhizobium* strains associated with *Lotus* species. J. of General Microbiology, 65, 315-325.

BALASA, R. 1956.- Durch Desoxyribonucleinsäuren induzierte Veränderungen an Rhizobien. Naturwiss., 43, 133.

BALASA, R. 1960.- Transformation of a strain of *Rhizobium lupini*. Nature London, 188, 246.

BALASA, R. 1963.- Genetic transformation of ~~Rhizobium~~, Bacteriol. Rev. 27(2), 228-241.

BAREA, J.M., ESCORIHUELA, M. y CALLAO, V. 1971.- Técnica de desinfección de semillas para su cultivo aséptico con vistas a la inoculación bacteriana específica, Ars Pharmaceutica XII, 11-12, 459-69.

BARKER, S.A., HAYES, M.H.B., SIMMONDS, R.G. y STACEY, M. 1967.- Studies on soil polysaccharides, Carbohyd. Res. 5, 13-14.

BAZARAL, M. and HELINSKI, D.R. 1968.- Circular DNA forms of colicinogenic factors E₁, E₂ and E₃ from *Escherichia coli*, J. Mol. Biol. 36, 185-194.

BECKING, J.H. 1971.- Biological nitrogen fixation and its economic significance. In "Nitrogen-15 in soil. Plant studies", International Atomic Energy Agency, Vienna, 189-221.

BEIJERINCK, M.W. 1888.- Die Bakterien der Papilionaceen Knöllchen. Botan. Ztg. 46, 726.

BEIJERINCK, M.W. 1901.- Über oligonitrophile Microben. Zbl. Bakteriol. Parasitenk Abt. II 7, 561.

BENEMAN, J.R. and VALENTINE, R.C. 1972.- The pathways of nitrogen fixation.

Adv. Microbiol., Physiol., 8, 59.

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

BERINGER, J. E. 1974.- R-Factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. J. Gen. Microbiol., 84, 118.

BJORNDAL, H., ERBING, C., LINDBERG, B., FAHRAEUS, G. y LJUNGGREN, H., 1971.- Studies of an extracellular polysaccharide from *Rhizobium meliloti*. Acta Crem. Scandinavica 25, 1281-1286.

BONNIER, C. 1954.- Anatomie comparée des nodosités à *Rhizobium* et des tumeurs d'aspects nodulaire bacteriologiquement steriles des racines de *Medicago sativa*. Bull. Inst. Agron. Stat., Gembloux, 22, 167.

BONNIER, C., HELY, F. W. y MANIL, P. 1952.- Essai d'adaptation a soja hispidá de souches de *Rhizobium* non spécifiques, Influence de greffes sur la specificité d'hôte du genre *Rhizobium*, Bull. Inst. Agron. Stat. Rech. Gembloux, 20, 137.

BONNIER, C., HELY, F. W. y MANIL, P., 1953a.- Symbiose planta + bacterie chez les legumineuses, Influence de la greffe, Rep. Proc. VIth Int. Congr. Microb., 3, 11.

BONNIER, C., HELY, F. W. y MANIL, P., 1953b.- Effect of grafting on nodulation of *Trifolium*, Nature 171, 884.

BONNIER, C. et BRAKEL, J. 1969.- Lutte biologique contre la faim. Editions J. Duculot S.A. Gembloux.

BOUAT, A. y CROUZET, C. 1965. - Notes techniques sur un appareil semi-automatique de dosage de l'azote (et de certains composés volatils). Ann. Agron. 16(1), 107-118.

BOWEN, G. D. 1961. - The toxicity of legume seed diffusates towards rhizobia and other bacteria. Plant Soil, 15, 155-165.

BRAY, H. G., SCHLUCHTERER, E. y STACEY, M. 1944. - Enzyme formation and polysaccharide synthesis by bacteria. 2. Polysaccharide formation by *Rhizobium radicicola* species. Biochem. J. 38, 154-156.

BUCHANAN, R. E. y GIBBONS, N. E. 1974. - Bergey's Manual of determinative Bacteriology 8th. Williams & Wilkins Com. Baltimore.

BURRIS, R. H. 1974. - Biological nitrogen fixation. Plant Physiol. 54, 443-449.

CANNON, F. C., DIXON, R. A. y POSTGATE, J. R. 1974a. - Plasmid formed in nitrogen-fixing *Escherichia coli* - *Klebsiella pneumoniae*. Hybrids. J. of Gen. Microbiol. 80, 241-251.

CANNON, F. C., DIXON, R. A. y POSTGATE, J. R. 1974b. - Chromosomal integration of *Klebsiella* fixation genes in *Escherichia coli*. J. of Gen. Microbiol. 80, 227-239.

CANNON, F. C., DUNICAN, L. K. y O'GARA, F. 1971. - Dye-Buoyant-Density-Gradient-Analysis of *Rhizobium* Deoxyribonucleic Acid. Biochem. J. 125, 103.

CHEN, H. K. 1938. - The production of growth substances by clover nodule bacteria. Nature (London) 142, 753-754.

C.I.A.F. Comité Inter-Institutos para el Estudio de Técnicas Analíticas de Diagnóstico Foliar, 1969.- Métodos de referencia para la determinación de los elementos minerales en vegetales, I.- Nitrógeno, Fósforo, Potasio, Sodio, Calcio y Magnesio, An. de Edaf. y Agrobiol. XXVIII (5-6), 409-430.

CLAPP, C.E. y EMERSON, W.W. 1965.- The effect of periodate oxidation on strength of soil crumbs: I Qualitative studies, II Quantitative studies, Proc. Soil Sci. Soc. Amer. 29, 127-134.

CLARKE, P.H. y TRACEY, M.V. 1956.- The occurrence of chitinase in some bacteria, J. Gen. Microbiol. 14, 188-196.

CLEWEL, D.B. 1972.- Nature of col E₁, plasmid replication in *Escherichia coli* in the presence of chloramphenicol, Journal of Bacteriology 110, 667-676.

COOPER, E.A., DAKER, W.D. y STACEY, M. 1938.- Enzyme formation and polysaccharides synthesis by bacteria. 3. Polysaccharides produced by "nitrogen-fixing" organism, Biochem. J. 32, 1752-1758.

COOPER, E.A., DAKER, W.D. y STACEY, M. 1938.- Enzyme formation and polysaccharide synthesis by bacteria. III, Polysaccharide complexes, Nature 169, 783-785.

DALTON, H. and MORTENSON, L.E. 1972.- Dinitrogen (N₂) fixation (with a biological chemical emphasis), Bacteriol. Rev. 36, 231.

DALTON, H. 1974.- Fixation of dinitrogen by free-living microorganisms, CRC Critical Reviews in Microbiology, 183-220.

DART, P.J. y MERCER, F.V. 1964.- Fine structure changes in the development of the nodules of *Trifolium subterraneum* L and *Medicago tribuloides*, Arch Mikrobiol. 49(3), 209-235.

DATE, R.A. y DECKER, A.M. 1965.- Minimal antigenic constitution of 28 strains of *Rhizobium japonicum*, Can. J. Microbiol. 11(1), 1-8.

DATKO, A.H. y MacLACHLAN, G.A. 1968.- Indoleacetic acid and the synthesis of glucanases and pectic enzymes, Plant Physiology 43(5), 735-742.

DATTA, M., HEDGES, E.J., SHAW, R.B., SYKES, H. y RICHMOND, M.N. 1971.- Properties of an R-factor from *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 108, 1244-1249.

DATTA, N. y HEDGES, R.W. 1972.- Host ranges of R-factors, J. Gen. Microbiol. 70, 453.

DAVIS, R.J. y CLAPP, C.E. 1961. Preparation of purified polysaccharides from *Rhizobium*, Appl. Microbiol. 9, 519-524.

DENARIE, J. y TRUCHET, G. 1974.- Genetic of symbiotic properties in *Rhizobium*, Int. Symp. N₂ Fixation Wash.

DILWORTH, M.J. 1974.- Dinitrogen fixation, Ann. Rev. Plant Physiol. 25, 81-114.

DINCHEV, D. 1965.- Influence of nodule bacteria on the nitrogen nutrition of plants. In Plant-Microbe relationships, Prague, Czechosl. Acad. Sci. 251-255.

DIXON, R.A. y POSTGATE, J.R. 1971.- Transfer of nitrogen fixation genes by conjugation in *Klebsiella pneumoniae*, Nature 234, 47-48.

DOBEREINER, J. 1966.- Evaluation of nitrogen fixation in legumes by the regression of total plant nitrogen with nodule weight. Nature 210 (5038), 850-851.

DONALD, C.M. 1960.- The impact of cheap nitrogen, J. Australian Inst. Agric. Sci. 26, 319-338.

DUDMAN, W.F. 1964a.- Growth and extracellular polysaccharide production by *Rhizobium meliloti* in defined medium, J. Bacteriol. 88, 640-645.

DUDMAN, W.F. 1964b.- Immune diffusion analysis of the extracellular soluble antigens of two strains of *Rhizobium meliloti*, J. Bacteriol. 88, 782-794.

DUDMAN, W.F. 1965.- Comparative immune diffusion at gelatin-agar interfaces; a presumptive test for protein and acidic polysaccharide antigens, J. Immunol. 95(4), 704-717.

DUDMAN, W.F. 1972.- Detection of acidic polysaccharides in gels by DEAE-dextran, Anal. Biochem. 46, 668-690.

DUDMAN, W.F. y HEIDELBERGER, M. 1969.- Immunochemistry of newly found substituents of polysaccharides of *Rhizobium* species, Science 164, 954-955.

DUNICAN, L.K. y CANNON, F.C. 1971.- The genetic control of symbiotic properties in *Rhizobium* evidence for plasmid control, Plant and

Soil Sp. Vol. 73-79.

DUNICAN, L.K. y TIERNEY, A.B. 1974.- Genetic transfer of nitrogen fixation from *Rhizobium trifolii* to *Klebsiella aerogenes*, Biochem. Biophys. Res. Comm. 57, 62-72.

DUNICAN, L.K., TIERNEY, A.B. y O'GARA, F. 1974.- Nif transfer from *Rhizobium trifolii* to *Klebsiella aerogenes*, Int. Symp. Nitrogen Fixation, Wash.

EVANS, H.S. y RUSSEL, S.A. 1971.- In "The chemistry and Biochemistry of nitrogen fixation". Ed. J.R. Postgate, Plenum Press, London.

FAHRAEUS, G. 1963.- The deformation of clover root hairs by nodule bacteria and by their culture filtrates, Rothamsted Exptl. Sta. Rept. 1962, 72-78.

FAHRAEUS, G. y LJUNGGREN, H. 1959a.- Effect of *Rhizobium* polysaccharide on the formation of polygalacturonase in Lucerne and Clover. Nature 184, 1578-1579.

FAHRAEUS, G. y LJUNGGREN, H. 1959b.- The possible significance of pectic enzymes in root-hair infection by nodule bacteria, Physiol. Plantarum 12, 145-154.

FAHRAEUS, G. y LJUNGGREN, H. 1968.- Preinfection phases of the legume symbiosis. In the Ecology of soil bacteria. (Gray, T.R.G., Parkinson, D., Eds., Liverpool Univ. Press Liverpool 681 pp 396-421.

FAIRBAIRN, N.J. 1953.- Modified anthrone reagent. Chem. Ind. (London),

FERRY, P., BLANCHERE, H. y OBATON, M. 1959.- Un milieu de culture synthétique pour *Rhizobium meliloti*, Ann. Agron. 10, 219-233.

FINCH, P., HAYE, S.M.H.B. y STACEY, M. 1968.- Studies on the polysaccharide constituents of an acid extract of a Fenland Muck soil. -- Transactions of the Ninth International Congress of Soil Science, Adélaine 3, 193-201.

FRED, E.B., BALDWIN, J.L. y McCOY, E. 1932.- Root nodule bacteria and leguminous. Univ. Wisconsin, Madison, Wisconsin, 345.

FREY-WYSSLING, A. 1952.- Growth of plant cell walls, Symp. Soc. Exptl. Biol. 4, 320-328.

GADRE, S.V., MAZUNDAR, L., MODI, V.V. y PAREKH, V. 1967.- Interspecific transformation in *Rhizobium*, Arch. Mikrobiol. 57, 388.

GALSTON, A.W. y PURVES, W.K. 1960.- Mechanism of action of auxin, A. Rev. Pl. Physiol. 11, 239-276.

GELING, O. y BLIXT, S. 1964.- Root nodulation in peas, Agri. Hort. Genet 22, 149-159.

GRAHAM, P.H. 1965.- Extracellular polysaccharides of the genus *Rhizobium*, Antonie van Leeuwenhoek 31, 346-354.

GREENLAND, D.J., LINDSTROM, G.R. y QUIRK, J.P. 1962.- Organic materials which stabilize natural soil aggregates, Proc. Soil Sci. Soc. Amer. 26, 366-371.

GUPTA, K.G. y SEN, A. 1965a.- Relationship between nitrogen-fixing

efficiency of *Rhizobium* spp. and their capacity to consume glucose and utilize phosphate. Indian J. Agric. Sci. 35(1), 39-42.

GUPTA, K.G. y SEN, A. 1965b. - The relationship between glucose consumption and efficiency of *Rhizobium* spp. from some common cultivated legumes. Plant and Soil 22(2), 229-238.

HAACK, A. - 1964. - Über den Einfluss der Knöllchenbakterien auf die Wurzelhaare von Leguminosen und Nichtleguminosen. Zentr. Bakteriolog. Parasitenk., Abt. II, 117, 343-366.

HARRIS, J.R. 1954. - Rhizosphere relationships of subterranean clover. I. Interactions between strains of *Rhizobium trifolii*. Australian J. Agric. Res. 5, 247-270.

HARDY, R.W.F. y KNIGHT, E. 1967. - ATP-dependent reduction of acide and HCN by N_2 -fixing enzymes of *Azotobacter vinelandii* and *Clostridium pasteurianum*. Biochem. Biophys. Acta 139, 69-90.

HARDY, R.W.F. and NAVELKA, V.D. 1975. - Nitrogen fixation research a key to world food. Science 188, 633.

HARRIS, J.R. 1953. - Influence of rhizosphere microorganisms on the virulence of *Rhizobium trifolii*. Nature 172, 507.

HATTINGH, M.J. y LOUW, H.A. 1964. - The antagonistic and stimulatory effects of soil microorganisms on rhizobia of clover. South Afric. J. Lab. and Clin. Med. 10(1), 32.

HEIDELBERGER, N., DUDMAN, W.F. y NIMMICH, W. 1970. - Immunochemical relations of certain capsular polysaccharides of *Klebsiella pneu-*

cocci and rhizobia, J. Immunol. 104, 1321.

HELY, F.W., BERGERSEN, F.J. y BROCKWELL, J., 1957.- Microbial antagonism in the rhizosphere as a factor in the failure of inoculation of subterranean clover, Australian J. Agri. Res. 8, 24-44.

HEPPER, C.M., 1972.- Composition of extracellular polysaccharides of *Rhizobium trifolii*. Antonie van Leeuwenhoek 38, 437-445.

HEWLITT, E.J., 1952.- Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Tech. Comm. 22, Farnham Royal Brahs: Commonwealth Agricultural Bureau.

HIGASHI, S., 1967.- Transfer of clover infectivity of *Rhizobium trifolii* to *Rhizobium phaseoli* as mediated by an episomic factor, J. Gen. Microbiol. 13, 391-403.

HIROTA, Y., 1960.- The effect of acridine dyes on mating type factors in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. Wash. 46, 57.

HOFFMANN, G., 1964.- Effektivitat und wirtsspezifitat der knollchenbakterien von *Robinia pseudoacacia*, L. Arch. Forstwesen 13(6), 563-576.

HOLDING, A.J. y KING, J., 1963.- The effectiveness of indigenous populations of *Rhizobium trifolii* in relation to soil factors, Plant and Soil 18(2), 191-198.

HOLLAND, A.A. y PARKER, C.A., 1962.- Inter. Congr. Microbiol. 8th Montreal, 1962, Abstr. B 14, 8, 57.

HOPKINS, E.W., PETERSON, W.H. y FRED, E.B. 1930.- Composition of the gum produced by root nodule bacteria, J. Am. Chem. Soc. 52, 3659-3668.

HUMPHREY, B.A. y VINCENT, J.M. 1959.- Extracellular polysaccharides of *Rhizobium*. J. Gen. Microbiol. 21, 477-484.

HUMPHREY, B., EDGLEY, M. y VINCENT, J.M. 1974.- Absence of mannose in the extracellular polysaccharide of fast-growing rhizobia. Journal of General Microbiology 81, 267-270.

HUNT, G.E. 1951.- A comparative chromatographic survey of the amino acids in five species of legume root and nodules, Amer. J. Bot. 38, 452-457.

JENSEN, M.L. 1961.- Survival of *Rhizobium meliloti* in soil culture. Nature (London) 192, 682-683.

JOHNSON, H.W. y MEANS, V.M. 1963.- Serological groups of *Rhizobium japonicum* recovered from nodules of soybeans (*Glycine max*) in field soils. Agron. J. 55(3), 269-271.

JONES, D.G. 1963.- Symbiotic variation of *Rhizobium trifolii* with S. 100 Nomark white clover (*Trifolium repens* L). J. Sci. Food Agric. 14(10), 740-743.

KATZNELSON, H. 1965.- Nature and importance of the rhizosphere. In "Ecology of soil-borne plant pathogens". Baker, K.F., Snyder, W.C. Eds., John Murray, London 571 pp, 187-207.

KEELE, B.B., WHEAT, M.R.W. and ELKAN, G.H. 1974.- Carbohydrate, nucleic

acid and protein composition of extracellular material from
Rhizobium japonicum. J. Gen. Appl. Microbiol. 20, 187-196.

KEFFORD, N.P., BROCKWELL, J., y ZWAR, J.A. 1960. - The symbiotic synthe-
sis of auxin by legumes and nodule bacteria and its role in no-
dule development. Biol. Sci. 13, 456-467.

KERN, H. 1969. - Interspezifische transformationen zwischen *Agrobacte-*
rium tumefaciens und *Rhizobium leguminosarum*. Arch. Mikrobiol.
66, 63.

KEY, J.D., BARNETT, N.M. y LIN, C.Y. 1957. - Ann. N.Y. Acad. Sci. 144,
49-62.

KLECKOWSKA, J. 1965. - Mutations in symbiotic effectiveness in *Rhizo-*
bium trifolii caused by transforming DNA and other agents. J.
Gen. Microbiol. 40(3), 377-384.

KLECKOWSKI, J. y KLECKOWSKI, A. 1952. - Effect of specific polysaccha-
rides from the host bacteria and of ribonuclease on the multi-
plication of *Rhizobium* phases. J. Gen. Microbiol. 7, 340-349.

KOCH, B. and EVANS, J. 1966. - Reduction of acetylene to ethylene by
soybean root nodules. Plant Physiol. 41, 1748-1750.

KOSTERMANS, D. 1935. - Over hetero-auxine. Dissertation University of
Utrecht.

KOWALSKI, M. 1967. - Transduction in *Rhizobium meliloti*. Acta Microbiol.
Polon. 16, 7.

KOWALSKI, M. y DENARIE, J., 1972, - Transduction d'un gene controlant l'expression de la fixation de l'azote chez *Rhizobium meliloti*, C.R. Acad. Sci. Ser. D 275, 141.

KOWALSKI, M. y DENARIE, J., 1973, - Transduction of effectiveness in *Rhizobium meliloti*, IBP Meeting Nitrogen fixation and the Biosphere, Edinburg.

KRASIL'NIKOV, N.A., 1949, - Varieties of actinomycetes producing Streptomycin, Mikrobiologiya 18, 397-401.

KRASIL'NIKOV, N.A., 1958, - Soil microorganisms and higher, Acad. Sci. Foundation Washington, 474.

KRASIL'NIKOV, N.A. y KORENYAKO, A.I., 1944, - Influence of soil bacteria on the virulence and activity of *Rhizobium*, Microbiology, Moscow 13, 39-44.

LANGE, R.T., 1961, - Nodule bacteria associated with the indigenous leguminosae of South Western Australia, 1961, J. Gen. Microbiol. 26(2), 351-359.

LANGE, R.T. y ALEXANDRE, M., 1961, - Anomalous infections by *Rhizobium*, Can. J. Microbiol. 7, 959.

LEDERBERG, J. y TATUM, E.L., 1946, - Detection of biochemical mutants of microorganisms, Nature 158, 558.

LILLICH, T.T. y ELKAN, G.H., 1968, - Role of polygalacturonase in invasion of root hairs of leguminous plant by *Rhizobium* spp., Can. J. Microbiol. 14, 617-625.

- LIM,G. 1963,- ~~Studies on the physiology of nodule formation, VIII.~~
The influence of the size of the rhizosphere population of nodule bacteria on root-hair in clover. Ann. Botany (London) 27, 55-67.
- LJUNGGREN,H. 1961.- Transfer of virulence in *Rhizobium trifolii*. Nature 191, 623.
- LJUNGGREN,H. y FAHRAEUS,G. 1961,- The role of polygalacturonase in root-hair invasion by nodule bacteria. J. Gen. Microbiol. 26, 521-528.
- LJUNGGREN,H. 1969.- Mechanism and pattern of *Rhizobium* invasion into leguminous root hairs. Physiol. Plantarum Suppl. V.
- MAHL,M.C. and WILSON,P.W. 1968.- Nitrogen fixation by cell-free extracts of *Klebsiella pneumoniae*. Can. J. Microbiol. 14, 33.
- MANIL,P. 1958.- The legume rhizobia symbiosis. In "Nutrition of the legumes". Hallsworth E.G. (ed.), Butterwoths London 357 pp.124-133.
- MANIL,P. 1963.- Le *Rhizobium* et la fixation symbiotique de l'azote. A propos de la taxonomie et de la classification des *Rhizobium*. Quelques donnees recentes sur le determinisme biochimique de la fixation. Ann. Inst. Pasteur 105 (1), 19-45.
- MARECKOVA,E. 1969.- Transformation in *Rhizobium japonicum*. Arch. Mikrobiol. 68, 113-115.
- MARSHALL,K.C. 1964.- Survival of root nodule bacteria in dry soil ex

posed to high temperatures, Australian J. Agri. Res. 15(2),
273-281.

McCOY, E. 1932.- Infection by *radicicola* in relation to the microchem-
istry of host's cell walls, Proc. Roy. Soc. (London) Ser. B
110, 514-533.

MISHUSTIN, E.N. and SHIL'NIKOVA, V.K. 1971.- Biological fixation of at-
mospheric nitrogen. MacMillan Press, London.

MODI, V.V. 1973.- IBP Meeting Nitrogen Fixation and the Biophere. Edin-
burg.

MULDER, E.G. y van VEEN, W.L. 1960.- Effect of pH and organic compounds
on nitrogen fixation by red clover, Plant Soil 13(2), 91-113.

NAKAZAWA, A. and TAMADA, T. 1972.- Stimulation of colicin E₁ synthesis
by cyclic 3' 5'-adenosine monophosphate in mitomycin C induced
Escherichia coli. Biochem. and Biophys. Res. Comm. 46(2), 1004-
1010.

NORRIS, D.O. 1965.- Acid production by *Rhizobium*. A unifying concept.
Plant and Soil 22(2), 143-166.

NUTMAN, P.S. 1953.- Studies on the physiology of nodule formation. 4.
The mutual inhibitory effects on nodule production of plants
grown in association, Ann. Botany (London) 17, 95-126.

NUTMAN, P.S. 1956.- The influence of the legume in root nodule symbio-
sis. A comparative study of host determinants and functions.
Biol. Rev. 31, 109-151.

NUTMAN, P.S. 1957.- Studies on the physiology of nodule formation. 5. Further experiments on the stimulating and inhibitory effects of root secretions. Ann. Botany (London) 21(83), 321-337.

NUTMAN, P.S. 1963.- Factors influencing the balance of mutual advantage in legume symbiosis. Symp. Soc. Gen. Microbiol. 13, 51-71.

NUTMAN, P.S. 1965.- 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, Berkeley.

NUTMAN, P.S., THORNTON, H.G. y QUASTEL, J.M. 1945.- Inhibition of plant growth by 2,4-dichlorophenoxy-acetic acid and other plant growth substances. Nature (London) 155, 497.

O'GARA, F. y DUNICAN, L.K. 1973.- Transformation and physical properties of R-factor RP-4 transferred from *Escherichia coli* to *Rhizobium trifolii*. J. Bacteriol. 116(3), 1177-1180.

OKUDA, A. y YAMAGUCHI, M. 1960.- Nitrogen-fixing microorganisms in paddy soils. Soil and Plant Food 6(2), 76-85.

OLIVER, R.D., MANIS, J.J., and WHITFIELD, H.J. 1974.- Evidence for a composite state of an *F^{hvs}*, *gnd*, element and a cryptic plasmid in a derivative of *Salmonella Typhimurium* LT-2. Journal of Bacteriology 119(1), 192-201.

OTSUJI, M., SEKIGUCHI, M., IJIMA, T. and TAKAGI, Y. 1959.- Induction of phage formation in the lysogenic *Escherichia coli* K-12 by Mitomycin C. Nature 184, 1079-1080.

PAECH, K. and TRACEY, M. J. 1956.- Modern methods of plant analysis. - Springer Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg.

PARIJSKAYA, A. M. 1973.- Effect of acridine orange and mitomycin-C on symbiotic properties of *Rhizobium meliloti*. Mikrobiologiya 42 (1), 119-121.

POSTGATE, J. R. 1974.- New advances and future potential in Biological Nitrogen Fixation. J. Appl. Bact., 37, 185-202.

PURCHASE, H. F. y NUTMAN, P. S. 1957.- Studies on the physiology of nodule formation. VII, The influence of bacterial numbers in the rhizosphere on nodule initiation, Ann. Botany (London) 21, 439-454.

RADULOVIC, V. y NUTMAN, P. S. 1963.- Field experiment on legume inoculation. Rothamsted Exptl. Sta. Rept., 79-81.

RAINA, J. L. y MODI, V. V. 1969.- Genetic transformation in *Rhizobium*. J. Gen. Microbiol., 57, 125-130.

RAINA, J. L. y MODI, V. V. 1972.- Deoxyribonucleate Binding and transformation in *Rhizobium japonicum*. J. Bacteriol., 111, 356.

REIDERER-HENDERSON, M. and WILSON, P. W. 1970.- Nitrogen fixation by sulphate bacteria. J. Gen. Microbiol., 61, 27.

ROBINSON, A. C. 1967.- The influence of host on soil and rhizosphere populations of clover and lucerne root nodule bacteria in the field. J. Australian Inst. Agri. Sci. 33, 207-209.

ROVIRA, A.D. 1955.- Plant root excretions in relation to the rhizosphere effect. I. The nature of the root exudates from oats and peas. *Plant Soil* 7, 178-194.

ROVIRA, A.D. 1961.- *Rhizobium* numbers in the rhizospheres of red clover and paspalum in relation to soil treatment and the numbers of bacteria and fungi. *Australian J. Agri. Res.* 12, 77-83.

ROVIRA, A.D. 1962.- Plant root exudates in relation to the rhizosphere microflora. *Soils Fertilizers* 25, 167-172.

ROVIRA, A.D. y STERN, W.R. 1961.- The rhizosphere bacteria in grass-clover associations. *Australian J. Agri. Res.* 12, 1108-1118.

SAHLMAN, K. y FAHRAEUS, G. 1962.- Microscopic observations on the effect of indole-3-acetic acid upon root hairs of *Trifolium repens*. *Kuigl. Lantbruks-Hogskol. Ann.* 28, 261-268.

SCHAEDE, R. 1940.- Die Knöllchen der adventiven Wasserwurzeln von *Nepenthes oleracea* und cytologischen Untersuchungen. *Zentr. Bacteriol. Parasitank. Abt. II*, 85, 416-425.

SCHLUCHTERER, E. y STACEY, M. 1945.- The capsular polysaccharide of *Rhizobium radicicolum*. *J. Chem. Soc.* 776 p.

SCHWINGHAMER, E.A. 1964.- Association between antibiotic resistance and ineffectiveness in mutant strains of *Rhizobium* spp. *Can. J. Microbiol.* 10(2), 221-233.

SEN, A.N. 1965.- Relationships between the efficiency of different strains of soybean nodule organisms (*R. japonicum*) with their

ability to consume glucose in pure culture, *Sci. and Culture* 31(8), 429-430.

SHANMUGAN, K.T. and VALENTINE, R.C., 1975, - Molecular biology of nitrogen fixation, *Science* 187, 919-924.

SMITH, W.K., 1958, - A survey of the production of pectic enzymes by plant pathogenic and other bacteria, *J. Gen. Microbiol.* 18, 33-41.

SOLHEIM, B. and RAA, J., 1971, - Evidence countering the theory of specific induction of pectin-degrading enzymes as basis for specificity in *Rhizobium*-Leguminosae associations, *Plant and Soil* 35, 275-280.

SOLHEIM, B. and RAA, J., 1973, - Characterization of the substances causing deformation of root hairs of *Trifolium repens* when inoculated with *Rhizobium trifolii*, *J. Gen. Microbiol.* 77, 241.

SOMME, R., 1974, - Chemical analysis of exocellular, acid polysaccharides from seven *Rhizobium* strains, *Carbohydrate Research* 33, 89-96.

STREICHER, S., GURNEY, E. and VALENTINE, R.C., 1971, - Transduction of the nitrogen fixation genes in *Klebsiella pneumoniae*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 68(5), 1174-1177.

STREICHER, S., GURNEY, A. and VALENTINE, R.C., 1972, - The nitrogen fixation genes. *Nature* 239, 495.

STREICHER, S.L. and VALENTINE, R.C., 1973, - Comparative biochemistry of

nitrogen fixation, Ann. Rev. Biochem. 279-302.

SUBBA-RAO, N. S., 1967. - Mechanism of infection of legume roots by *Rhizobium*, J. Scient. Ind. Res. 26, 34-37.

SUBBA-RAO, N. S., y SARMA, K. S. B., 1968. - Pectin methyl esterase activity of root exudates of legumes in relation to Rhizobia, Plant Soil 28, 407-413.

SWINCE, R. G. D., OADES, J. M. y GREENLAND, D. J., 1968. - Studies on soil polisaccharides from soil, II. The composition and properties of polysaccharides in soils under pasture and under fallow-wheat rotation, Austr. J. Soil Res. 6, 211-235.

SWINCE, R. G. D., OATES, J. M. y GREENLAND, D. J., 1969. - The extraction characterization and significance of soil polysaccharides, Adv. Agron. 21, 195-235.

THIMANN, K. V., 1939. - The physiology of nodule formation, Trans. third Comm. Intern. Soc. Soil Sci. (New Brunswick N.J.) Vol. A, 24-28.

THOMPSON, J. A., 1960. - Inhibition of nodule bacteria by an antibiotic from legume seed coats, Nature (London) 187, 619-620.

THORNTON, H., 1931. - Lucerne "inoculation" and the factors affecting its success, Imp. Bur. Soil Sci. Tech. Commun. H.H. Stationery Office, London 20, 39.

THORNTON, H. G. y NICOL, H., 1938. - Reduction of nodule numbers and growth produced by addition of sodium nitrate to lucerne in sauce cul-

- ture. J. Agri. Sci. 26, 173-188.
- TUZIMURA, K. y WATANABE, I. 1959.- Stimulation of number of root-nodule bacteria by a nodulation-dilution frequency-mithoa-Ecological Studies of *Rhizobium* in Soils, J. Sci. Soil Tokyo 30, 292-296.
- TUZIMURA, K. y WATANABE, I. 1962.- The growth of *Rhizobium* in the rhizosphere of the host plant. Soil Sci. Plant Nutri, 8, 19-24.
- TUZIMURA, K., WATANABE, J. y SHI, J. 1966.- Differential growth and survival of *Rhizobium* species in the rhizosphere of various plants in different sorts of soil. Ecological studies on root nodule bacteria in soil. Soil Sci. Plant Nutri. (Tokyo) 12(3), 15-22.
- VAN der STARRE-VAN der MOLEN, L., BOSSINK, G. y QUISPTEL, A. 1967.- The influence of colchicine on root nodule formation in *Trifolium pratense*. Plant Soil 26, 397-412.
- VEST, G., WEBER, D.F. y SLOGER, R.C. 1973.- Nodulation and nitrogen fixation. In "Soybeans: Improvement, production and uses", Amer. Soc. of Agron. Cadwell, B.E. Ed., Madison, 353-389.
- VINCENT, J.M. 1958.- Survival of root nodule bacteria. E.G. Hallsworth (ed.) Nutrition of the legumes, Butterwoths Scientific Publications London, 108-123.
- VINCENT, J.M. 1962.- Influence of calcium and magnesium on the growth of *Rhizobium*. J. Gen. Microbiol, 28, 653-663.
- VINCENT, J.M. 1962.- Presidential address. Australian Studies of root

nodules bacteria. A review, Proc. Linn. Soc. N.S. Wales 87, 8-38.

VINCENT, J.M. 1970.- A Manual for the Practical of Root-Nodule bacteria. IBP Handbook n° 15, 163 pp, Blackwell Sci. Publications. Oxford and Edinburgh.

VINCENT, J.M. y WATERS, L.M. 1953.- The influence of host on competition among dover root-nodule bacteria, J. Gen. Microbiol. 9, 357-370.

VINCENT, J.M. y WATERS, L.M. 1954.- The root nodule bacteria as factors in clover establishment in the basaltic soils of the lismore dishid, New south wales, II survival and succes of inocula in laboratory trials, Australian J. Agri. Res. 5, 61-76.

YAKOVLEVA, Z.M. 1959.- Isoelectric point of nodule bacteria, Izv. Akad. Nauk, SSSR, Ser. Biol. 4, 595-598.

YAKOVLEVA, Z.M. 1961.- Properties of symbiotic nodule bacteria, Trudy Inst. Mikrobiologi Akad. Nauk SSSR 11, 198-201.

YAPHE, W. 1957.- The use of agarase from *Pseudomonas atlantica* in the identification of agar in marine algae, Can. J. Microbiol. 3, 987-993.

YAPHE, W. 1958.- Standards for bacteriological agar, Bacteriol. Proc. p. 26.

ZEVENHUISEN, I.P.T.M. 1971.- Chemical composition of exopolysaccharides of *Rhizobium* and *Agrobacterium*, Journal of General Micro-

biology 68, 239-243.

ZURKOWSKI, W., HOFFMAN, M. y LORKIEWICZ, Z. 1973. - Effect of acriflavine and sodium dodecyl sulphate on infectiveness of *Rhizobium trifolii*. Acta Microbiol. Polon. Ser. A 5(22), 55-60.