

Universidad de Granada

Facultad de Ciencias



DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

Estudios sobre los bacteriófagos específicos
de
Rhizobium meliloti

Eduardo Corral Román

Tesis Doctoral

1980

Estudios sobre los bacteriófagos específicos de Rhizobium meliloti

Eduardo Corral Ro

ts
138

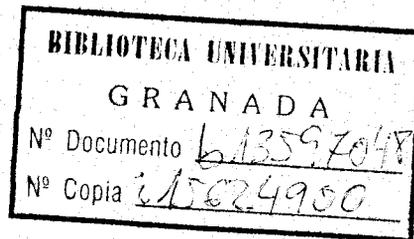
~~Page 19~~

7 6/138

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
- GRANADA -
Sala B
Estante 137
Número 276

R. 49.404

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA



"ESTUDIOS SOBRE LOS BACTERIOFAGOS ESPECIFICOS
DE RHIZOBIUM MELILOTI"

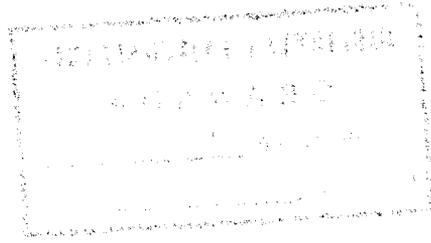
Eduardo Corral Román

UNIVERSIDAD DE GRANADA

1980



Dep.leg.Gr.285.1980.Granada.



"ESTUDIOS SOBRE LOS BACTERIOFAGOS ESPECIFICOS
DE RHIZOBIUM MELILOTI"

MEMORIA presentada para aspirar al grado
de Doctor en Ciencias por el Licenciado D.
Eduardo Corral Román.

Prof. Dr. D. ENRIQUE MONTOYA GOMEZ
Director de la Tesis

Prof. Dr. D. JOSE OLIVARES PASCUAL
Co-director de la Tesis

EDUARDO CORRAL ROMAN
Aspirante al grado de Doctor en Ciencias

Granada, Junio de 1980.

Tesis Doctoral dirigida por el Prof. Dr.
D. Enrique Montoya Gómez, Catedrático de
Microbiología de la Universidad de Granada.
Fue leída el 12 de Julio de 1980, obteniendo
la calificación de Sobresaliente "cum laude",
ante el Tribunal formado por los pro-
fesores Recalde Martínez, Montoya Gómez,
Ramos Cormenzana, Olivares Pascual y Pretel
Martínez.

El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada durante los años 1975 a 1980.

Parte de los resultados de esta Tesis fueron presentados en el IInd Int. Symp. Nitrogen Fixation (Salamanca, 1976), en el VII Congreso Nacional de Microbiología (Cádiz, 1979) y publicados en "Microbios Letters", 1978.



Mi agradecimiento

Al Director de esta Tesis Doctoral, Prof. Dr. D. Enrique Montoya Gómez, Catedrático de Microbiología de la Facultad de Ciencias y al Co-Director de la misma, Prof. Dr. D. José Olivares Pascual, Prof. de Investigación del C.S.I.C., por su constante ayuda y orientación en la realización de este trabajo.

Igualmente, quiero dar las gracias a mis compañeros , personal técnico y auxiliar del Dpto. de Microbiología de la Facultad de Ciencias y del Dpto. de Microbiología de la Estación Experimental del Zaidín.

INDICE

	<u>Pag.</u>
INTRODUCCION	19
GENERALIDADES	21
TAXONOMIA DEL GENERO	
<u>RHIZOBIUM</u>	24
ECOLOGIA, CARACTERES ESENCIALES DE LA SIMBIOSIS	30
Multiplicación en la rizosfera y colonización de la raíz (etapa Roc)	33
Unión de <u>Rhizobium</u> a la raíz (etapa Roa).	
Las lectinas como base de la Especificidad	34
La incurvación de los pelos radicales (etapas Hab y Hac)	38
Entrada en el pelo radical y formación del canal de infección (etapa Inf).....	40
Efectos sobre los tejidos vegetales. Libera- ción de los bacilos del canal de infección e iniciación del nódulo. (Etapas Noi y Bar).....	44
Desarrollo de los bacteroides (etapa Bad).	
Aspectos funcionales del nódulo.....	45
Fijación del nitrógeno atmosférico en el nó- dulo (etapas Fix, Cof y Npf)	50
Asimilación del amonio y regulación del pro- ceso de la fijación	53
Las propiedades simbióticas de <u>Rhizobium</u> y los plásmidos.....	60

	<u>Pag.</u>
<u>RHIZOBIUM EN EL SUELO</u>	63
Antagonismos	64
BACTERIOFAGOS.....	65
Bacteriófagos moderados. Lisogenia y <u>Seudo</u> lisogenia.....	67
Restricción y modificación	70
BACTERIOFAGOS DE <u>RHIZOBIUM</u>	73
Propiedades generales. Interacción <u>Rhizobium-</u> fagos.....	74
Lisogenia, transducción y transfección.....	76
Fenómenos de Restricción y modificación	78
Bacteriocinogenia.....	78
 OBJETO DEL TRABAJO.....	 81
 MATERIAL Y METODOS.....	 87
 1. MICROORGANISMOS.....	 89
1.1. Bacterias.....	89
1.2. Bacteriófagos.....	91
2. MEDIOS DE CULTIVO.....	91
2.1. Medio de Thornton, modificado (Th).....	91
2.2. Medio 79 de Allen con cristal violeta.....	92
2.3. Caldo 79 de Allen, modificado (79M).....	93
2.4. Medio de Vincent, complejo (V).....	94
2.5. Caldo de dilución (B).....	95

	<u>Pag.</u>
2.6. Solución de Hewit (H).....	95
3. AISLAMIENTO DE BACTERIOFAGOS.....	96
3.1. Método general	96
3.2. Método cuantitativo.....	97
3.3. Aislamiento de bacteriófagos asociados a las estirpes de <u>R.meliloti</u>	98
3.4. Purificación.....	99
3.5. Conservación y almacenamiento	99
3.6. Caracterización.....	100
3.7. Especificidad de los distintos bacteriófagos.....	100
4. AISLAMIENTO DE ESTIRPES DE <u>R.MELILOTI</u>	101
4.1. Aislamiento a partir de muestras de suelo rizosférico.....	101
4.2. Aislamiento a partir de los nódulos.....	102
4.3. Identificación de las nuevas estirpes.....	103
4.4. Ensayos de Infectividad.....	103
4.5. Curva de crecimiento de una estirpe de <u>R. meliloti</u>	104
5. INTERACCION FAGO-BACTERIA.	
TECNICAS GENERALES.....	105
5.1. Fagotipado de estirpes de <u>R.meliloti</u>	106
5.2. Selección de estirpes resistentes mediante bacteriófagos.....	108
5.2.1. Selección en medio sólido.....	108
5.2.2. Selección en medio líquido.....	109

	<u>Pag.</u>
5.3. Ensayos de adsorción.....	110
5.4. Restricción y modificación	112
6. TRATAMIENTO CON NITROSOGUANIDINA (NTG).....	113
7. INDUCCIÓN CON MITOMICINA C (mit.C).....	114
8. IRRADIACIÓN CON LUZ ULTRAVIOLETA(UV).....	115
9. CULTIVOS EN PRESENCIA DE TWEEN-80.....	116
10. TRATAMIENTOS CON NARANJA DE ACRI- DINA (NA).....	117
11. MICROSCOPIA ELECTRONICA.....	118
11.1. Preparación del soporte:	
Rejillas con Formvar-Carbón.....	118
11.2. Preparación de las muestras.....	120
11.3. Tinciones.....	122
11.4. Montaje de las muestras en las rejillas y tinción.....	124
RESULTADOS.....	127
1. BACTERIOFAGOS.....	129
1.1. Aislamiento. Estudio cuali y cuantitativo de los bacteriófagos activos frente a - <u>R.meliloti</u> , presentes en el suelo.....	129
1.2. Purificación y caracterización.....	133
1.3. Clasificación.....	133

	<u>Pag.</u>
1.4. Bacteriófagos termosensibles.....	141
1.5. Selección de bacteriófagos para las ex- periencias de fagotipado.....	146
2. FAGOTIPADO DE ESTIRPES DE <u>R.MELILOTI</u>	150
2.1. Aislamiento y fagotipado de estirpes sil- vestres presentes en suelos rizosféricos.....	150
2.2. Aislamiento a partir de los nódulos	152
2.3. Fagotipado.....	153
2.4. Clasificación de las estirpes de <u>R.meliloti</u> según su fagotipo.....	159
2.5. Fagotipado de las estirpes de la colección del laboratorio. El fenotipo M ⁻ (Multiplica- ción menos).....	162
3. ESTUDIOS EN EL LABORATORIO SOBRE EL ORIGEN DE LOS DISTINTOS FAGOTIPOS.....	166
3.1. Mutagénesis con nitrosoguanidina (NTG).....	163
3.2. Obtención de estirpes resistentes mediante selección con bacteriófagos.....	168
3.2.1. Selección en medios sólidos.....	169
3.2.2. Selección en medio líquido. Condi- ones generales y curva de crecimiento de la estirpe Rm2.....	172
3.2.2.1. Selección mediante el empleo de los bacteriófagos virulentos.....	176



	<u>Pag.</u>
3.2.2.2. Selección de estirpes resistentes mediante el fago DF2.....	178
3.3. Propiedades de las estirpes resistentes obtenidas en el laboratorio.....	186
3.3.1. Ensayos de adsorción.....	187
3.3.2. Relación entre el fagotipo y la mor- fología colonial.....	192
3.3.3. Reversión del carácter resistente a los fagos.....	199
3.4. Fenómenos de lisogenia yseudolisogenia y su relación con la resistencia a los fagos.....	202
3.4.1. Interacción entre los fagos moderados yla estirpe sensible Rm2.....	203
3.4.2. Estudios sobre la asociación fago-bac- teria en estirpes silvestres y de labora- torio.....	205
3.5. Relación entre el fagotipo y la presencia de plásmidos.....	210
4. FENOMENOS DE RESTRICCIÓN Y MODIFICA- CIÓN EN ESTIRPES DE <u>R.MELILOTI</u>	212
4.1. Restricción y modificación del fago DF2 (Rm2) por las estirpes hv21 y 402.....	213
4.2. Comportamiento de las estirpes 2D2 y 2D5, frente al bacteriófago DF2.....	216

	<u>Pag.</u>
4.3. Modificación del fago AL1 por la estirpe 2DA.....	219
DISCUSION.....	223
CONCLUSIONES.....	243
BIBLIOGRAFIA.....	247

INTRODUCCION

GENERALIDADES

La historia del género Rhizobium se remonta a fechas tan tempranas como 1888, en que Beijerinck consiguió aislar una estirpe a partir de los nódulos de una leguminosa. El la llamó en un principio Bacterium radicola, nombre que ha persistido durante cierto tiempo hasta ser sustituido definitivamente por el de Rhizobium.

Dos años antes, Hellriegel y Wilfarth habían demostrado de forma concluyente la necesidad de la presencia de unas tumoraciones especiales en las raíces de las leguminosas para que éstas pudiesen sobrevivir en suelos deficientes en nitrógeno. Esta experiencia permaneció como la única evidencia de la fijación del nitrógeno atmosférico por las leguminosas hasta que las modernas técnicas de marcado con elementos radiactivos han permitido establecer definitivamente que el sitio de la fijación son efectivamente las tumoraciones de la raíz ó nódulos.

Ya en el siglo actual, Fred Baldwin y McCoy —

(1932) establecieron la existencia de ocho grupos principales, dentro de los cuales encajaban la mayoría de las estirpes aisladas, de acuerdo con las especies vegetales sobre las que fuesen capaces de originar la formación de nódulos.

A partir de este momento el número de científicos dedicados a investigar sobre las especies del género así como sobre el proceso de la fijación del nitrógeno en los nódulos no ha hecho sino crecer constantemente, lo que debe imputarse sin duda a la importancia cada vez mayor que tiene el citado proceso de la fijación biológica del nitrógeno atmosférico, elemento escaso en forma aprovechable por los vegetales y, obviamente, esencial para su subsistencia.

Una estimación aproximada del total del nitrógeno fijado mediante procesos biológicos es del orden del millón de toneladas métricas por año, cifra de la que el mayor porcentaje corresponde a la simbiosis Rhizobium-leguminosa. Este hecho, unido a la circunstancia de que la práctica totalidad del nitrógeno fijado resulta inmediatamente aprovechable por el hombre a través de la leguminosa hospedadora, ha convertido al Rhizobium en objeto de atención primordial para un gran número de investigadores.

Sin embargo, el estudio de la asociación Rhizobium-leguminosa plantea muchos problemas, derivados de que en el establecimiento de la simbiosis intervienen los genomas del microorganismo y del hospedador vegetal; esto ha llevado a muchos investigadores al estudio de otros microorganismos capaces de fijar el nitrógeno atmosférico en vida libre, como Azotobacter sp., Kleb-

siella sp. y algas verdeazuladas. Un resultado importante de estos trabajos ha sido el descubrimiento de que el sistema enzimático implorado en la reducción del N_2 a NH_3 posee características físico-químicas y de funcionamiento prácticamente iguales en todos ellos y similares también a las que posee el que se ha aislado y purificado a partir de los nódulos, lo cual ha permitido suponer que los mecanismos básicos de regulación del proceso de la fijación encontrados en los fijadores en vida libre serían también aplicables a la asociación Rhizobium-leguminosa.

En el estudio de la simbiosis cabe distinguir dos aspectos fundamentales, según que se considere como objeto de estudio el microorganismo o el hospedador vegetal; pero aunque el estudio de este último presenta un enorme interés a la hora de comprender el establecimiento y funcionamiento de la asociación, constituyen mayoría las investigaciones realizadas sobre el simbiote. Los apartados siguientes de este capítulo tratan precisamente de revisar la información más relevante que sobre las características y actuación de los Rhizobium ha aparecido en los últimos años.

TAXONOMIA DEL GENERO RHIZOBIUM

La 8ª edición del Manual de Bergey incluye al género Rhizobium junto con el Agrobacterium, dentro de la familia Rhizobiaceae. La diferenciación entre estos dos géneros se basa fundamentalmente en la capacidad que muestran las especies de Rhizobium de formar nódulos fijadores de nitrógeno en las raíces de leguminosas y no utilizar los citratos y la de dar lugar a lesiones hipertróficas en muy diversos tipos de plantas y utilizar los citratos en el caso de las especies del género Agrobacterium. Aún aceptando esta separación, cuestionable como se expondrá más adelante, la agrupación en especies de las estirpes pertenecientes al género Rhizobium no ha sido resuelta hasta el momento satisfactoriamente.

La clasificación tradicional del género tiene su origen en los trabajos de Fred, Baldwin y McCoy en 1932, los cuales establecieron como carácter sistemático principal, la capacidad de infectar y formar nódulos en un número restringido de especies vegetales, las cuales componían el "grupo de inoculación" de una estirpe determinada. De esta forma se llegó al establecimiento de seis especies: R.leguminosarum, especie tipo que forma nódulos sobre las especies de Vicia, Lens y Pisum; R.trifolii, sobre especies del género Trifolium; R.phaseoli, sobre algunas especies de Phaseolus; R.meliloti, sobre especies de Melilotus, Medicago y Trigonella; R.japonicum, sobre especies del género Glycina; y R.lupini, sobre especies de los géneros Lupinus y

Ornithopus. Las restantes estirpes de Rhizobium no encuadrables en ninguna de las seis especies citadas se vienen incluyendo en una especie de cajón de sastre que se conoce con el nombre de grupo "cowpea".

Ahora bien, lo que confiere un alto grado de aleatoriedad a esta clasificación es que las estirpes incluidas en cada una de las especies citadas podrían haberse clasificado como pertenecientes a otras especies, ya que muchas de ellas son capaces de infectar y formar nódulos sobre leguminosas distintas de las que componen su grupo de inoculación. El caso extremo en este sentido lo constituye un aislamiento de 85 estirpes a partir de distintas leguminosas en Australia, de los que sólo 3 podían incluirse en las especies tradicionales, siendo las otras capaces de infectar a hospedadores de hasta 4 grupos de inoculación distintos (Dixon, 1968).

La alarmante frecuencia con que los investigadores encontraban incongruencias de este tipo obligó muy pronto a un replanteamiento de las bases taxonómicas y así Norris (1965), inició una serie de estudios que le llevaron a diferenciar dos grupos dentro del género:

- a) Estirpes de crecimiento rápido, con tiempos de generación de 2 a 4 horas en medios con manitol y extracto de levadura y con 2 - 6 flagelos peritricos.
- b) Estirpes que crecen lentamente en dichos medios, con tiempos de generación de 6 a 8 horas y con un flagelo de inserción polar o subpolar.



La 8ª edición del Manual de Bergey ha recogido esta agrupación de los Rhizobium incluyendo en el primero los — R.leguminosarum, R.phaseoli, R.trifolii y R.meliloti y en el segundo los R.japonicum y R.lupini. Dado que al grupo "cowpea" no se le concede categoría de especie, no está recogido en la citada edición aún cuando puede encuadrarse con el segundo grupo. Dentro de cada grupo, no obstante, la diferenciación entre especies sigue efectuándose atendiendo a los grupos de inoculación clásicos ya citados.

Graham (1964 y 1976) aplicó los principios de la taxonomía numérica a un elevado número de estirpes pertenecientes a los géneros Rhizobium y Agrobacterium, comprobando un total de 100 caracteres distintos. Las conclusiones a las que llegó este autor fueron sorprendentes:

- 1) Las estirpes incluidas en las especies clásicas, R.leguminosarum, R.trifolii y R.phaseoli, deberían ser integradas en una sola, R.leguminosarum.
- 2) Las estirpes de crecimiento rápido, especialmente R.meliloti, se encuentran muy próximas a Agrobacterium sp.
- 3) Las estirpes de crecimiento lento se apartan mucho, tanto de las de crecimiento rápido como de Agrobacterium sp., por lo que deberían formar un género aparte, para el que propuso el nombre de Phytomyxa que es, por otra parte, el nombre más antiguo del actual género Rhizobium (Schroeter-1886).

't Mannetje (1967), aplicando nuevas técnicas de procesamiento a los datos que obtuviera Graham concluyó que si —

bien Agrobacterium sp. se encontraba muy próximo a las estirpes de Rhizobium de rápido crecimiento, no existían aún evidencias suficientes para agrupar a ambas en un mismo género. Finalmente, Moffet y Colwell (1968), siguiendo también el método adansoniano - afirmaron que R.meliloti debería continuar como una especie única y que Agrobacterium sp. debería incluirse en el género Rhizobium, mientras que R.leguminosarum incluiría, tal como propuso Graham, todo el conjunto de estirpes designadas como R.trifolii, R.phaseoli y R.leguminosarum. Del mismo modo, las estirpes de crecimiento lento debían incluirse según estos autores en un género aparte.

Otros autores que han investigado el contenido - en Citosina más Guanina y el grado de homología de los ADNs de estirpes de Rhizobium y Agrobacterium, han llegado a las mismas conclusiones antes citadas (Lange, 1961 y 1966; De Ley y Rassel, 1965; De Ley et al., 1966 y Heberlein et al., 1967).

Así pues, todos los datos obtenidos indican la necesidad de una reorganización dentro, no sólo ya del género Rhizobium, sino también a nivel de la familia Rhizobiaceae.

Sin embargo, existen todavía una serie de datos que difícilmente encajan tanto en la clasificación tradicional, como en la nueva. Así, R.phaseoli es un buen exponente de lo que Norris llamó especies "puente", en base a que algunas de las estirpes son capaces de infectar a Macroptillium lathyroides y Macroptillium atropurpureum, que deberían ser susceptibles únicamente a la infección por estirpes incluidas en el grupo "cowpea". Simultáneamente, algunas estirpes de este último grupo son capaces de infectar a -

Phaseolus vulgaris. Desde el punto de vista del hospedador vegetal también existen especies puente, ya que las estirpes que nodulan a Lotus corniculatus son de crecimiento rápido, mientras que las que se aíslan de Lotus uliginosus y Lotus pedunculatus pertenecen sin duda al grupo "cowpea" (Vincent, 1977). Curiosamente, algunas de las estirpes aisladas de Lupinus densiflorus, son de crecimiento rápido y, al mismo tiempo, poseen flagelos subpolares, lo cual podría interpretarse en el sentido evolucionista, considerando a las citadas estirpes como eslabones entre las de crecimiento rápido y lento, o meramente como una complicación más en el ya intrincado asunto de la taxonomía de Rhizobium. Finalmente, hay que mencionar la estirpe aislada de la leguminosa tropical Lotonis bainesii, verdadera "rara avis" dentro del género Rhizobium, ya que se encuentra muy lejos del resto de las estirpes en lo que se refiere al contenido en G+C de su ADN y en su constitución antigénica (Vincent, 1977).

En cuanto a las investigaciones que podrían aportar nuevos puntos de vista, cabe mencionar el estudio de los antígenos intracelulares. Los estudios realizados hasta el momento llevan a las mismas conclusiones generales que se han expuesto más atrás, con la nota adicional de que las estirpes aisladas de Lotus corniculatus, Leucaena leucocephala, Cicer sp. y Lupinus densiflorus, aún siendo de crecimiento rápido, ocupan una posición intermedia entre el grupo formado por R. trifolii-R. leguminosarum-R. phaseoli y las estirpes de crecimiento lento.

Otra técnica que se ha empleado con algún éxi

to, se basa en comprobar la capacidad de las estirpes de Rhizobium para provocar la incurvación ("curling") de los pelos radicales de un grupo suficientemente alto de leguminosas, tomando los resultados que se obtengan como indicación segura de las afinidades de las estirpes consideradas por un grupo de inoculación determinado

Por último, aunque se conocen desde muy antiguo su existencia y propiedades generales, los fagos específicos no son por el momento de utilidad en la caracterización de especies, dado que algunos de ellos son capaces de atacar a estirpes incluidas en especies diferentes, tanto de crecimiento lento como rápido, lo que no es obstáculo para que sean, al igual que los antígenos de superficie, muy importantes en la caracterización de razas determinadas (Staniewski et al., 1962 y Staniewski, 1970).

Como resumen de todo lo que se ha expuesto hay que concluir que la situación actual en cuanto a designación de las estirpes de Rhizobium no puede ser más confusa, pues si bien algunos autores han adoptado los criterios de la nueva ordenación taxonómica, otros, bastante numerosos, siguiendo la fuerza de la costumbre, se atienen a la clasificación tradicional y, finalmente, un tercer grupo de autores han decidido hacer abstracción de cualquier ordenación taxonómica, denominando las estirpes manipuladas por ellos como Rhizobium sp. aislado de tal o cual hospedador; uso éste que es particularmente frecuente en el caso de las estirpes del grupo "cowpea".

ECOLOGIA. CARACTERES ESENCIALES DE LA SIMBIOSIS

La propiedad que ha convertido a los Rhizobium en el objeto de estudio de muchos microbiólogos, es su capacidad para establecer una asociación simbiótica con las leguminosas, durante la cual es capaz de fijar el nitrógeno atmosférico y reducirlo a ión amonio, que es utilizado por la planta hospedadora.

Se han propuesto varios esquemas que tratan de integrar o resumir los eventos fundamentales que conducen al establecimiento de una simbiosis Rhizobium-leguminosa efectiva a la hora de fijar nitrógeno (Nutman, 1965; Broughton, 1978), con variantes o matizaciones según la experiencia propia de cada autor (Olivares, 1977 ; Nutman, 1977). Las diferencias entre los distintos esquemas atañen a la cronología de ciertos acontecimientos así como a las consecuencias derivadas de ellos. Ultimamente, Nuti et al. (1980) basándose en los datos aportado por los distintos autores resume el proceso en las doce etapas siguientes:

ETAPA	ABREVIATURA	SIGNIFICADO
I.-Multiplicación de <u>Rhizobium</u> en la rizosfera.....	Roc.....	Colonización de la raíz ("Root colonization")
II.-Unión de las bacterias a las células corticales.....	Roa.....	Adherencia a la raíz ("Root adhesion")

III.-Presencia del ácido nucleico bacteriano en las células del córtex de la leguminosa.....	Nap.....	Presencia del ácido nucleico ("Nucleic acid - presence")
IV.-Ramificación de los pelos radicales.....	Hab.....	Ramificación del pelo - ("Hair branching")
V.-Incurvación de los pelos radicales.....	Hac.....	Incurvación del pelo - ("Hair curling")
VI.-Formación del canal de infección.....	Inf.....	Infección ("Infection")
VII.-Desarrollo del meristemo de la planta.....	Noi.....	Iniciación del nódulo ("Nodule initiation")
VIII.-Liberación intracelular de las bacterias del canal de infección	Bar.....	Liberación de las bacterias ("Bacterial release")
IX.-Desarrollo de los bacteroides.....	Bad.....	Desarrollo del bacteroides ("Bacteroid developpment")
X.-Reducción del Nitrógeno atmosférico...	Fix.....	Fijación ("Fixation")
XI.-Funciones bioquímicas y fisiológicas complementarias.....	Cof.....	Funciones complementarias ("Complementary functions")
XII.-Permanencia de las funciones nodulares..	Npf ¹	Permanencia del nódulo ("Permanence of nodule functions")

1: Antes se la conocía como etapa Nop, pero se prefiere utilizar Npf para evitar confusiones con Nopalina, sustancia a la que son resistentes las estirpes de Agrobacterium tumefaciens, que poseen el plásmido Ti (Nuti, et al,1980).

En el conjunto de las etapas citadas se reconocen las tres características que tradicionalmente se han atribuido a las estirpes de Rhizobium capaces de establecer la asociación simbiótica: Especificidad (Esp) o capacidad de una estirpe para reconocer a un limitado número de hospedadores; Infectividad (Inf) o capacidad de la estirpe en cuestión para penetrar en la raíz y formar el nódulo; y Efectividad (Eff) o capacidad de la estirpe para diferenciarse hasta la forma bacteroide y fijar el nitrógeno atmosférico dentro del nódulo. Sin embargo, no puede establecerse una correspondencia concreta entre cada una de estas propiedades clásicas y las etapas que propone Nuti, debido a que es difícil precisar si, por ejemplo, las etapas Noi y Bar son consecuencia de la Infectividad o por el contrario de la Efectividad de una estirpe, o si la etapa Roc está relacionada o no con la Especificidad.

Por lo demás, habría que indicar que alguna de las etapas propuestas por Nuti, son bastante discutibles, como es el caso de la etapa Nap, ya que de momento no se ha conseguido evidencia segura sobre su existencia.

En los apartados siguientes, que tratan de revisar la información concerniente al proceso completo que conduce al establecimiento de la simbiosis, se ha procurado seguir el esquema citado anteriormente, aunque en algunos casos se han estudiado —

juntas varias etapas con objeto de no alargar excesivamente este - capítulo de Introducción.

Multiplicación en la rizosfera y colonización de la raíz (etapa Roc).

El hábitat natural de los Rhizobium es el suelo, y más concretamente la rizosfera de plantas leguminosas y no leguminosas. El término rizosfera no ha sido definido con precisión, ya que suele considerarse como tal, bien el cilindro de suelo que rodea a la raíz hasta una distancia de 15-20mms. (Dommerges, 1970), o bien solo la capa de material mucilaginoso, colonizada por microorganismos que rodea a las raíces y los pelos radicales (Dart, 1977).

Sea cualquiera la definición que se tome, el hecho cierto, conocido desde hace tiempo, es que los exudados radicales de las leguminosas ejercen un efecto estimulante sobre las poblaciones de Rhizobium del suelo de manera que en la rizosfera de estas plantas se encuentra una alta proporción de Rhizobium. Este efecto puede considerarse que es selectivo, puesto que las poblaciones de Rhizobium resultan seleccionadas con respecto a las de otras especies, e incluso se ha comprobado que pueden resultar particularmente favorecidas las estirpes homólogas, esto es específicas e infectivas para una leguminosa determinada (Tuzimura - et al., 1966). Hay que hacer notar, sin embargo, que al lado de especies de leguminosas cuya rizosfera es altamente beneficiosa para Rhizobium sp., existen otras que no lo son en absoluto, quizá como consecuencia de la excreción de alguna sustancia inhibidora -

(Currier y Strobel, 1976; Macgregor y Alexander, 1972).

No ha podido establecerse hasta el momento qué sustancia o sustancias son las responsables de la estimulación antes citada. Las necesidades de carbohidratos de las especies del género, varían ampliamente incluso a nivel de estirpe (Vincent 1977) y de otro lado, la composición de los exudados es sumamente variable cuali y cuantitativamente, en función de una serie de factores, como el tipo de suelo o la población microbiana de éste, alterándose asimismo en los ensayos de laboratorio, tras la inoculación y aparición del primer nódulo (Rao e Iswaran, 1976). De cualquier forma, y teniendo en cuenta las necesidades de biotina y tiamina de muchas estirpes de Rhizobium, es posible atribuir a estas vitaminas, que están presentes en los exudados radicales, parte del efecto estimulante de estos últimos (Vincent, 1977).

Unión de Rhizobium a la raíz (etapa Roa). Las lectinas como base de la Especificidad

La Especificidad no ha sido considerada por todos los autores como una característica simbiótica distinta, sino que en muchos casos se ha preferido incluirla dentro de la Infectividad. Este punto de vista puede considerarse como superado actualmente, gracias a que, aparte de los trabajos de Higashi (1967), se ha conseguido recientemente la transferencia del carácter Especificidad mediante experiencias de transformación, desde R. trifolii a Azotobacter vinelandii (Bishop et al. 1977), así como poner de manifiesto por Prakash et al. (1979) la localización de los ge-

nes Especificidad en un ADN extracromosómico de R.leguminosarum.

Si bien las evidencias genéticas no ofrecen ninguna duda, las sustancias implicadas en el reconocimiento, por parte de Rhizobium y la leguminosa específica, son objeto desde hace ya algunos años de controversia. Por lo que se refiere a la planta, las evidencias parecen indicar que son las lectinas las responsables de la unión de la estirpe homóloga a las células epidérmicas de la raíz.

Las lectinas constituyen un grupo de gluco proteínas muy amplio y mal conocido que ya hace mucho tiempo fueron propuestas como base de la especificidad en la interacción Rhizobium-leguminosa (Simon, 1914, citado por Broughton, 1978). Su peso molecular varía desde 60.000 a 140.000 daltons y pueden llegar a contener hasta un 22% de polisacáridos en su molécula. Invariablemente se trata de tetrámeros con subunidades iguales entre sí o agrupadas de dos en dos, aunque otras evidencias apuntan hacia la existencia de lectinas con todas las subunidades diferentes entre sí. Hasta hace pocos años la única técnica aprovechable para su detección consistía en comprobar su capacidad hemo o leucoaglutinante, lo cual presuponía de hecho la existencia de al menos dos sitios activos de unión/tetrámero. El empleo de las técnicas de marcado con fluoresceína ha puesto de manifiesto la existencia de lectinas que son capaces de unirse a las células de Rhizobium, pero no de aglutinarlas, es decir, tales moléculas poseerían un solo sitio activo o bien dos sitios, pero no funcionales en la aglutinación a causa de impedimentos estéricos intramoleculares.



Se ha especulado bastante acerca de la misión de las lectinas en la fisiología de las leguminosas, desde atribuirles un papel semejante al de los anticuerpos, frente a bacterias y enzimas fúngicos, hasta la que nos ocupa de ser la base de la Especificidad. En cualquier forma, es seguro que las distintas especies de leguminosas producen lectinas también diferentes y que una misma planta posee en la mayoría de los casos, un conjunto de isolectinas, que se producen en sitios y tiempos diferentes durante su desarrollo, lo cual constituye una evidencia indirecta de su importancia en la fisiología del vegetal (Broughton, 1978).

Las primeras evidencias seguras de la interacción lectinas-Rhizobium fueron obtenidas por Sahlman y Fahraeus (1963) y posteriormente, por Hamblin y Kent (1973), quienes demostraron que en una mezcla de hematíes y R.phaseoli se producía la aglutinación al añadir lectinas obtenidas de semillas de Phaseolus vulgaris. Seguidamente Boochloul y Schmidt (1974) pusieron de manifiesto que hasta el 90% de las estirpes de R.japonicum reaccionaban específicamente con lectinas obtenidas de Glycina maxima, marcadas previamente con fluoresceína, observándose que las lectinas se unían sobre todo a los polos de los bacilos.

Por otra parte, Boochloul y Schmidt (1976), y Dazzo et al (1976), entre otros, mostraron que los bacilos de varias especies de Rhizobium se unían polarmente a las raíces de sus hospedadores específicos, al tiempo que los anticuerpos anti Rhizobium marcados con fluoresceína se unían también a los polos de los bacilos; finalmente, Reporter et al., (1975) y Kauss y Bowles

(1976) demostraron que los Rhizobium se unen precisamente a -- aquellas zonas de la raíz de su hospedador en las que las lectinas son más abundantes.

Todas estas evidencias parecen poner de manifiesto que las lectinas son las responsables de la unión de Rhizobium a la raíz, ahora bien, no siempre ha sido posible demostrar que la unión Rhizobium-lectina sea específica (Chen y Phillips, 1976; Law y Strijdom, 1977) lo que ha sido explicado -- por Broughton (1978) como debido a fallos técnicos, o bien a que las lectinas utilizadas en estos ensayos, obtenidas normalmente de las semillas de la leguminosa, no son las mismas que se encuentran en la raíz, que serían, verdaderamente, las efectoras de la de interacción con las estructuras superficiales de las células de Rhizobium sp..

En cuanto a la naturaleza de estas estructuras superficiales de Rhizobium, no se sabe prácticamente nada, si bien Broughton (1978) propone que se trata del lipolisacárido (antígeno O). En este sentido, la evidencia más segura la aportaron Wolpert y Albersheim (1976), demostrando que el antígeno O de R.trifolii reaccionaba específicamente con las lectinas obtenidas de Trifolium sp..

Pese a todo lo que se ha expuesto, la falta de resultados positivos obtenida por Chen y Phillips (1976) y Law y Strijdom (1977) y más recientemente por Hombrecher y Brewin (1979) acerca de la especificidad de la unión Rhizobium-lectinas, -- así como el desconocimiento casi absoluto del sitio de unión en la

superficie de la bacteria, impiden de momento el asegurar definitivamente que las lectinas sean la base estructural de la especificidad. Es, pues, necesario, de acuerdo con Broughton (1978), profundizar en el estudio de las lectinas, particularmente de las que se encuentran en las raíces, y simultáneamente, en el de los receptores de la superficie de Rhizobium, los cuales, como ha mostrado recientemente el trabajo de Dazzo et al., (1979), podrían estar presentes sólo durante ciertas fases del crecimiento bacteriano.

La incurvación de los pelos radicales (etapas Hab y Hac).

Los pelos radicales son células epidérmicas -- transformadas que constituyen la vía de entrada más general para los Rhizobium; como excepciones pueden citarse los casos de las leguminosas Neptunia oleracea, que por desarrollarse en un hábitat acuático no posee pelos radicales, y Arachis hypogaea, en la que la infección tiene lugar en células epidérmicas no transformadas, cercanas al punto de unión de una raíz secundaria (Dart, 1977).

En plántulas cultivadas en condiciones axénicas, los pelos radicales crecen rectos, presentando al microscopio un aspecto mucoso, evidenciándose bajo este material una cobertura a base de fibrillas de celulosa que forman una red bastante regular excepto en el ápice, donde se observa una disposición irregular -- que deja entre sí espacios no cubiertos. La inoculación de las plántulas con un cultivo de una estirpe de Rhizobium homóloga --

provoca la aparición de una serie de efectos sobre el crecimiento de los pelos que traen como consecuencia la incurvación sobre un punto, a cierta distancia del ápice del eje mayor del pelo ("curling").

Según Broughton (1978), dentro del fenómeno general se distinguen efectos moderados, como la incurvación de los pelos en un ángulo menor de 360° y en otros casos, ramificación de dichos pelos, y acentuados, consistentes en el giro o incurvación en ángulo igual o superior a 360° . De acuerdo con este autor, la inoculación de plántulas de una leguminosa determinada con estirpes no homólogas o bien con filtrados libres de células o con preparaciones de exopolisacáridos de estirpes homólogas provocaría la aparición de los efectos moderados, mientras que los efectos acentuados solo se darían al inocular el cultivo completo de la estirpe homóloga.

No se conocen realmente la o las sustancias efectoras de los fenómenos moderados y acentuados, ya que todos los resultados obtenidos hasta el momento son bastante confusos. Ljunggren (1969) encontró una sustancia termosensible en los filtrados libres de células de estirpes de R.trifolii que se convertía en termoestable al añadir estos filtrados a plántulas de Trifolium repens y que además se unía a la raíz, de la que podía eluirse mediante soluciones de ácido acético 0.2 N o urea 6 M (Solheim y Raa, 1973). Por otra parte, Hubbell (1970) encontró en preparaciones crudas de exopolisacáridos de estirpes de R.trifolii una sustancia termosensible y no dializable. Finalmente, Yao y Vincent (citados por Dart, 1977), atribuyen los efectos moderados a una sustancia termoestable y dializable, presente en los filtrados libres

de células que se afecta por los tratamientos con nucleasas, periodo y, sobre todo, tripsina, mientras que los efectos acentuados se producirían por la acción de una sustancia presente en la superficie de las células de Rhizobium, o, alternativamente, por una sustancia que necesitaría de algún cofactor presente en dicha superficie.

De acuerdo con estos hechos, las sustancias responsables de los efectos moderados serían varias y de naturaleza química distinta; proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos; pero no es posible decidir de momento nada acerca de los efectores de la incurvación acentuada.

Entrada en el pelo radical y formación del canal de infección (etapa Inf)

La entrada en el pelo radical de las células de Rhizobium puede revestir dos formas. En una de ellas, todo parece indicar que se trata de un accidente y consiste en la invasión del pelo por unas formas pequeñas, cocobacilos, normalmente flagelados, invasión que se produce probablemente a través de los espacios que dejan entre sí las fibrillas de celulosa en el ápice del citado pelo radical. La segunda forma de invasión comprende de formación de una estructura especializada, el canal o cordón de infección, que contiene a los bacilos que son de esta forma "guiados" al interior de la raíz.

En la infección cabe distinguir dos aspectos dis

tintos del mismo problema: 1) la entrada propiamente dicha, y 2) la aparición en el medio de una serie de sustancias de carácter enzimático y hormonal que serían las responsables de las alteraciones que, como consecuencia de la iniciación y progresión del canal de infección, sufre la pared del pelo radical.

El mecanismo de entrada se ha discutido con gran calor en los últimos años sin que se haya llegado a ninguna conclusión definitiva. Es un hecho comprobado mediante técnicas serológicas que las poblaciones bacterianas aisladas de un solo nódulo son en la mayoría de los casos muy homogéneas, es decir, se trata de estirpes puras y, en consecuencia, es lógico pensar que procedan de una sola célula, pero también se dan casos de poblaciones mezcladas en un solo nódulo, lo cual induciría a pensar que penetraron más de un bacilo (Labendra y Vincent, 1975).

La explicación de ambos hechos debe residir forzosamente en el mecanismo de entrada, por lo que Dart (1977) ha propuesto la formación de un poro de corta duración que permitiría la penetración de un solo bacilo, mientras que Nutman (1965) mantiene que la pared del pelo se invaginaría en el punto de entrada, al tiempo que se produce la incurvación alrededor de este punto, por lo que no sería improbable el que quedasen englobados más de un bacilo, que de llegar a formarse el nódulo, originarían una población mezclada.

Cualquiera que sea el mecanismo concreto por el que se produce la entrada, lo cierto es que el bacilo llega a encontrarse en el interior del pelo, lo cual lleva implícito el con-

curso de sustancias de carácter enzimático y hormonal que permitan la relajación de la estructura de la pared del pelo y el cambio en la dirección del crecimiento de dicha pared (Napoli y Hubbell, 1975).

En cuanto a las enzimas implicadas en el proceso, serían de carácter pectinolítico y han sido detectadas en los últimos años en la mayoría de los ensayos de interacción Rhizobium-leguminosa por numerosos autores; uno de ellos, (Darbyshire, 1966) encontró que el pretratamiento de las raíces de Trifolium glomeratum con enzimas pectinolíticos aumentaba el número de puntos de infección aunque no el número de nódulos formados.

De otra parte, ya en 1959 Ljunggren y Fahraeus habían propuesto que Rhizobium sp., y más concretamente, los exopolisacáridos de las estirpes infectivas inducirían la producción por parte de la raíz de la leguminosa homóloga de enzimas del tipo de la poligalacturonasa, que sería la responsable de la relajación de la pared del pelo, de forma que el bacilo pudiese penetrar en él.

Posteriormente, Palomares (1975) demostró que los exopolisacáridos de estirpes infectivas de R. meliloti eran capaces de inducir la producción de la citada poligalacturonasa, cuando se los añadía a plántulas de Medicago sativa y que la producción de un polisacárido especialmente activo en la inducción era debida a la presencia de un plásmido (Olivares et al., 1977; Palomares et al., 1978a y b). No obstante, la pérdida del plásmido no ocasionaba la pérdida de la infectividad, si bien ésta resultaba afectada cuantitativamente (Olivares et al., 1980) .

Otros autores, sin embargo, no han podido encontrar diferencias significativas en la producción de enzimas pectinolíticas por las leguminosas inoculadas con estirpes de Rhizobium específicas o no e infectivas o no, para dichas leguminosas (Lillich y Elkan, 1968; Solheim y Raa, 1971; Bonish, 1973), lo que ha llevado a considerar actualmente el que la producción de enzimas puede explicarse, a pesar de los resultados de Palomares, como debida a la actividad de la leguminosa en distintas etapas de su desarrollo y no a una acción específica de las estirpes de Rhizobium (Dart, 1977).

En lo que se refiere a las sustancias de carácter hormonal está perfectamente demostrado que las distintas estirpes de Rhizobium sp. producen cantidades notables de distintas auxinas vegetales, como los ácidos indol acético e indol carboxílico (AIA y AIC, respectivamente), citoquininas y giberelinas (Sánchez Calle et al., 1978). Los ensayos efectuados con estas sustancias por un buen número de autores (ver referencias en Dart, 1977) ponen de manifiesto que su actividad, en el sentido de favorecer o perjudicar la infección y el número de nódulos formados, depende de la concentración a la que actúen, no obstante lo cual, se admite que deben jugar un papel importante, tanto en la iniciación y progresión del canal de infección como en los efectos sobre los tejidos vegetales que dicho canal atraviesa (Hubbell et al., 1978).

Así pues, y al igual que ocurría con el mecanismo de la entrada de Rhizobium en el pelo radical, no puede concretarse acerca de los efectores de carácter enzimático y hormonal

que posibilitan la formación del canal de infección, el cual en los primeros momentos de su desarrollo sólo es aparente como un punto hialino y brillante cerca del que se sitúa el núcleo de la célula vegetal, al tiempo que la zona que lo rodea se caracteriza por una mayor opacidad y la aparición de depósitos de callosa. (Dart, 1977).

Conforme progresa, el canal de infección aparece como una estructura groseramente cilíndrica, con una pared de composición idéntica a la del pelo, en cuyo interior se dividen activamente los bacilos que se hallan dispuestos longitudinalmente y en una sola fila, inmersos en una matriz mucilaginosa o "zooglea". El extremo del canal es, al igual que el extremo del pelo radical, una zona más plástica que debe permitir el crecimiento, como se ha dicho antes, gracias a la acción de las auxinas producidas por el Rhizobium y a enzimas producidas por el hospedador vegetal. En su recorrido atraviesa, o puede atravesar, varias células, llegando al córtex interno, en donde se ramifica, siendo característico el que se encuentre acompañado o guiado por el núcleo de las células invadidas y rodeado por la membrana citoplasmática de éstas (Dart, 1977).

Efectos sobre los tejidos vegetales. Liberación de los bacilos del canal de infección, e iniciación del nódulo. (Etapas Noi y Bar).

El canal de infección sigue una línea de crecimiento básicamente recta, por lo que se ha sugerido que la progre

sión se haría en función del gradiente de concentración de una - sustancia hormonal liberada desde el centro de la raíz hacia las zonas externas. No se ha podido demostrar esta hipótesis pero si resulta obvio el que los efectos observados sobre la ploidía de las células de los tejidos nodulares y de aquellos que atraviesa el canal, deben ser el resultado de la actividad de sustancias de carácter hormonal.

Estos efectos se traducen concretamente en el aumento de tamaño de las células por las que atraviesa el canal, y en la división de las células adyacentes, detectándose actividad meristemática incipiente, con síntesis de material citoplasmático - y división celular, en la zona del córtex por la que entró el canal de infección . Precisamente esta zona es la que dará origen al nódulo, al menos en la generalidad de los casos, ya que en las leguminosas Arachis hypogaea y Aeschynomene indica, el desarrollo nodular se realiza a partir de las células del periciclo, siendo así equivalentes a una raíz secundaria (Dart, 1977).

En lo que se refiere a las células en las que se va a liberar el contenido del canal de infección, el punto de - vista más antiguo mantiene que este evento tendría lugar en las - células del córtex con niveles cromosómicos $4c$ (disomáticas); - actualmente, en cambio, se admite con igual probabilidad que las auxinas producidas por Rhizobium en el canal de infección inducirían la reduplicación del material cromosómico, no seguida de citoqui - nesis, de algunas de las células próximas y que tales células $4c$ serían las recipiendarias de los bacilos contenidos en el citado ca



nal (Libbenga y Torrey, 1973). De cualquier modo, la rotura del canal debe ocurrir gracias a la actuación de enzimas que serían producidas tanto por Rhizobium como por la célula vegetal (Hubbell et al., 1978; Verma et al., 1978), tras lo que serían liberados en el citoplasma de la célula vegetal "paquetes" de bacilos envueltos en la matriz, y rodeados finalmente por la membrana de la célula hospedadora, individual o colectivamente, dependiendo de que se trate de estirpes de crecimiento rápido o lento.

La liberación de los bacilos en la célula vegetal coincide con el aumento de la actividad meristemática de las células circundantes, evento que supone el inicio del desarrollo del nódulo. Dependiendo de la forma final de éste, el tejido meristemático se dispone principalmente en posición apical (nódulos alargados o cilíndricos) originando nuevas capas de células hacia la zona central del nódulo, o bien rodea a esta zona a modo de "cambium" para dar lugar a nódulos de aspecto redondeado; (Dart, 1977).

Desarrollo de los bacterioides (etapa Bad). Aspectos funcionales del nódulo

Los bacilos liberados del canal de infección invaden rápidamente el citoplasma de la célula hospedadora, iniciando simultáneamente la diferenciación a la forma bacteroide. Este proceso supone alteraciones que afectan a la forma y tamaño celulares, de un lado, y a la composición bioquímica, de otro; en lo que se refiere a la forma y el tamaño los cambios más notables

tienen lugar en las estirpes de crecimiento rápido, en las que se observa una fuerte reducción en el espesor de la pared celular, lo que posibilita la adopción de formas extrañas, en T, Y, maza, etc., al tiempo que el tamaño aumenta, alcanzándose a veces un volumen 20 veces mayor que el de los bacilos vegetativos. En el caso de las estirpes de crecimiento lento, las alteraciones no son tan evidentes, ya que se conserva en general la forma bacilar, al tiempo que el tamaño no suele superar cuatro o cinco veces el de las células vegetativas (Dart, 1977).

Los cambios a nivel bioquímico son, en principio más interesantes desde el punto de vista funcional. Los bacilos normales en el canal de infección muestran gránulos de poli- β -hidroxi-butírico (PHBA), que pueden perderse durante la diferenciación a bacteroide y ser sustituidos por acúmulos de polifosfatos, aunque en otros casos, los bacteroides muestran gránulos de PHBA más abundantes si cabe que en los bacilos vegetativos, lo que sugiere una posible función de reservorio energético (Wong y Evans, 1971).

El nucleoide aparece disperso en el bacteroide, habiéndose descrito pérdidas en el material genético que podrían explicar la falta de viabilidad de los bacteroides en los medios de cultivo ordinarios (Bergersen, 1977); no obstante, otros autores ~~mantiene~~ que los bacteroides de diversas estirpes de Rhizobium, de crecimiento lento y rápido, tendrían una viabilidad de hasta - el 90% (Tsien et al., 1977).

Otros cambios bioquímicos, destacables por su probable repercusión en el proceso de la fijación, se han detectado

en las cadenas transportadoras de electrones, habiéndose descrito la pérdida en los bacteroides, de los citocromos a, a3, o y la hemoglobina de Rhizobium, y la aparición de los citocromos c552, p450 y p420 (Appleby, 1969).

Del mismo modo, parece seguro que se altera la composición en coenzimas del tipo de las flavinas, según el resultado de los trabajos de Pankhurst et al. (1972), habiéndose demostrado posteriormente que el contenido en Riboflavina, FMN (flavín-mononucleótido) y FAD (flavín-adenín-dinucleótido) de los bacteroides es mucho mayor que el de los bacilos vegetativos (Pankhurst et al., 1974).

Pero los cambios más interesantes son, sin duda, la aparición del complejo enzimático nitrogenasa (NAS), cuya presencia se detecta bastante tempranamente en el proceso de diferenciación a la forma bacteroide, y la de la leghemoglobina, no relacionada en absoluto con la hemoglobina presente en el bacilo vegetativo (Dixon, 1968); por el contrario, la leghemoglobina tiene un origen mixto, ya que el grupo hemo es sintetizado por Rhizobium mientras que la proteína es de origen vegetal (Appleby, 1974). Por lo demás y a diferencia de la NAS y los demás componentes que se han citado, la leghemoglobina no se encuentra en el interior de los bacteroides sino que ocupa el citosol de la célula hospedadora.

Los bacteroides ocupan la zona central de nódulo maduro, fácilmente distinguible cuando se observan cortes de este material, por su color rosado más o menos intenso, debido a la leg

hemoglobina. Rodeando a esta zona central se disponen hacia afuera, una capa de endodermis procedente del córtex de la raíz, que envuelve a su vez al tejido vascular que tiene su origen en la estela. Sigue a continuación una capa de tejido meristemático que, como se dijo en el apartado anterior, se dispone apicalmente en los nódulos de forma alargada, o bien rodeando a la zona central en los de forma redondeada; este tejido meristemático es el encargado de renovar la zona central conforme las células invadidas por los bacteroides degeneran en la base del nódulo. La capa más externa de éste, está formada por tejido epidérmico procedente de la raíz, habiéndose observado en algún caso, una capa de poco espesor de tejido esclerenquimatoso, subyacente a la epidermis (Dart, 1977).

Desde el punto de vista funcional, hay que destacar, de un lado, los espacios intercelulares de la zona central, que se intercomunican para formar conductos que llegan al exterior, y de otro, la presencia en dicha zona central de las "células intersticiales" o células no invadidas por los bacteroides, relativamente abundantes y dispuestas a veces a modo de radios que cruzan la citada zona central (Dart, 1977). Basándose en los requerimientos de oxígeno del nódulo, Bergersen (1977) propone que los conductos desempeñan un papel fundamental ya que permiten la rápida difusión de aquél hasta la zona central, mientras que las células intersticiales, muy activas metabólicamente, con gran abundancia de mitocondrias, serían "sumideros" de oxígeno, impidiendo así el libre acceso de éste a los bacteroides, en los que se -

encuentra la nitrogenasa que, como se verá, resulta rápidamente inactivada por el oxígeno. Una evidencia adicional, según el mismo autor, de que la estructura de la zona central del nódulo tiene la misión de regular la cantidad de oxígeno que llega a los bacteroides, la constituye la presencia de abundantes mitocondrias y amiloplastos en la zona del citoplasma de la célula vegetal adyacente a los espacios intercelulares.

Así, la estructura del nódulo, se presenta como la más adecuada para resolver dos problemas antagónicos: de un lado, es necesario el aporte constante y rápido de oxígeno, de manera que pueda obtenerse el ATP necesario para el funcionamiento de la NAS, y de otro, debe impedirse que la cantidad de oxígeno que llega a los bacteroides sea tan alta como para provocar la inactivación del citado complejo enzimático. Existe un tercer mecanismo regulador de la presión parcial de oxígeno en la zona de los bacteroides, constituido por la leghemoglobina, cuya misión se expone en el apartado siguiente.

Fijación del nitrógeno atmosférico en el nódulo (etapas Fix, Cof y Npf)

La fijación del nitrógeno atmosférico supone la reducción de esta molécula, con una ganancia total de 6 electrones, para formar dos moléculas de amoníaco. Este proceso es catalizado por la NAS sintetizada en los bacteroides.

La NAS es un complejo formado por dos enzimas, una ferroproteína (Fe-Prot) y una molibdo ferroproteína (MoFe-Prot)

dependiente de la presencia de ATP, Mg^{2+} y poder reductor, para su actividad. Una característica interesante de la NAS es su baja especificidad de sustrato, siendo capaz de catalizar la reducción de una serie de moléculas que tienen un triple enlace, como acetileno ($CH \equiv CH$) y cianuro ($C \equiv N$); esta propiedad ha permitido la puesta a punto de una técnica relativamente sencilla para detectar su presencia, consistente en la incubación del material de que se trate, como cultivos de microorganismos, o cortes de nódulos, en atmósfera de acetileno, seguido de la inyección de una muestra de dicha atmósfera en un cromatógrafo de gases para examinar la presencia de etileno, que se habrá formado a partir de acetileno por reducción, catalizada por la NAS. (Dilworth, 1966; Koch y Evans, 1966).

De otro lado, los requerimientos de ATP y poder reductor de la NAS son muy altos, habiéndose estimado que la reducción de una molécula de nitrógeno supone como mínimo la hidrólisis de 12 a 15 moléculas de ATP (Orme-Johnson, 1977). Un hecho que acentúa aun más el gasto energético es que durante la catálisis, parte del poder reductor se invierte en la reducción de protones (H^+) a hidrógeno molecular (H_2), aún en atmósfera de nitrógeno puro (Hoch *et al.*, 1960).

Una última propiedad de la NAS es su extrema sensibilidad al oxígeno, por lo que es vital que se encuentra protegida en los bacteroides. Ya se ha expuesto en el apartado anterior la estructura histológica del nódulo que permite un aporte constante de oxígeno e impide al mismo tiempo que la concentración de es-

te pueda llegar a ser lesiva para la actividad de la NAS. El oxígeno que haya de ser utilizado en los bacteroides es captado por la leghemoglobina presente en el citosol de la célula vegetal y transportado, a la forma de oxileghemoglobina, hasta la membrana que rodea al bacteroide, donde lo cede a oxidasas muy específicas que se encuentran acopladas en la cadena transportadora de electrones - (fosforilación oxidativa) de gran rendimiento en la producción de ATP (Bergersen, 1978). Este sistema de control de aporte de oxígeno permite al bacteroide obtener el ATP necesario para el funcionamiento de la NAS y al mismo tiempo, la protección eficaz de ésta.

Por otra parte, cabe preguntarse sobre la naturaleza y procedencia de los sustratos necesarios para la obtención de energía y poder reductor; en este sentido, no existen dudas actualmente de que los productos resultantes de la actividad - fotosintética de la leguminosas (fotosintato) constituyen la fuente - principal de estos sustratos necesarios para la fijación. La evidencia más fuerte fue obtenida por Minchin y Pate (1973), quienes, mediante experiencias de marcado con C^{14} demostraron que hasta - el 32% del fotosintato es transportado a los nódulos, porcentaje - del que aproximadamente la mitad, es devuelto a la planta huésped en forma de compuestos aminados, mientras que la otra mitad se - gasta en los procesos de respiración y crecimiento del nódulo y - en la fijación del nitrógeno.

En cuanto a la naturaleza de los sustratos, se acepta generalmente que serían hexosas, para las que se han detectado los enzimas oxidativos correspondientes en los bacteroides -

(Wong et al., 1971), si bien los ácidos orgánicos sencillos, como el succínico, provocan un aumento mayor en la actividad fijadora - cuando se los añade a suspensiones de bacteroides, quizá como - consecuencia de tener menos problemas que las hexosas, para atravesar la membrana citoplasmática de los bacteroides (Bergersen, 1977).

Finalmente, en lo que se refiere a la obtención del poder reductor, varios autores han estudiado la posible implicación de coenzimas como FMN, FAD y NAD (nicotín adenínucleóotido), que se encontrarían acoplados a la vía oxidativa de las hexosas, al ciclo de los ácidos tricarbóxicos e incluso a la oxidación del ácido β -hidroxi-butírico, sin que de momento se haya llegado a ninguna conclusión definitiva. Según Bergersen, (1978) la abundancia relativa de FMN y FAD, junto con el descubrimiento de - Koch et al. (1970) de una ferredoxina y una flavodoxina en los - bacteroides, indicarían que estos coenzimas son los principales cofactores implicados en el flujo de electrones hacia la NAS.

Asimilación del amonio y regulación del proceso de la fijación

El empleo de las técnicas de marcado radiactivo de corta duración (pulsos radiactivos) con N^{15} demostró que el primer producto estable de la fijación es el ión NH_4^+ (Bergersen, 1965). Según es aceptado por la mayoría de los autores, el NH_4^+ se incorporará al ácido α -cetoglutarico para formar glutámico, mediante la catálisis de la enzima GDH (Glutámico deshidrogenasa), -

ligada al NADP, y dicho glutámico es convertido a continuación en glutamina, por la enzima GS (Glutamino sintetasa), en presencia de más amonio procedente de la fijación. Ambas sustancias son exportadas seguidamente al citoplasma de la célula hospedadora, en donde intervienen una serie de enzimas, que en presencia de cetoácidos, catalizan las correspondientes reacciones de transaminación mediante las que se forman las diversas sustancias aminadas que serán finalmente exportadas fuera del nódulo a través del xilema (Pate, 1977).

Este sencillo esquema de funcionamiento se ha visto complicado por una serie de descubrimientos en relación con otras posibles vías de asimilación del amonio resultante de la fijación, y así, se ha propuesto que la principal actividad del bacteroide sería la formación de L-aspártico, por aminación del ácido oxalacético (OAA), el cual procedería tanto de los excedentes del ciclo de Krebs, como de reacciones de carboxilación a partir del ácido fosfoenolpirúvico (PEP); posteriormente el aspártico sufriría una reacción de transaminación, catalizada por una enzima, L-aspartato-alfa-glutarato transaminasa, que conduciría a la formación de glutámico, el cual seguiría el proceso que se ha descrito en el párrafo anterior.

Esta variación en las primeras etapas de la asimilación del amonio viene apoyada por el descubrimiento de que la aspartato transaminasa del bacteroide tiene una Km más baja para el aspártico, que para el glutámico mientras que la que se aísla de la célula vegetal se comporta exactamente al revés, siendo en

en cambio, iguales las Km de ambas para los cetoácidos (Ryan et al., 1971). Otras dos evidencias adicionales a favor de esta vía metabólica son, el efecto estimulante del CO₂ sobre la fijación del nitrógeno en los nódulos, y el que la mayoría de los autores han detectado niveles muy bajos de GDH (NADP) en los bacteroides (Dunn y Klucas, 1973; Kurz et al., 1975) por lo que no parece probable que esta enzima pueda desempeñar un papel relevante en la asimilación del amonio.

Pese a todo, las experiencias de marcado radiactivo de larga duración ("long term") con ¹⁵N, demuestran que el grupo amino se incorpora mayoritariamente en los aminoácidos - glutámico y glutamina, por lo que Bergersen (1977) y Pate (1977) mantienen que tanto el glutámico como el aspártico constituyen las vías principales de asimilación del amonio en el bacteroide.

Un problema muy distinto al que se ha expuesto, y que de momento no se ha resuelto en absoluto, lo constituye el mecanismo de regulación de la fijación del nitrógeno en el nódulo.

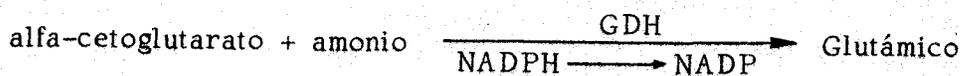
La primera propuesta en este sentido se debe a Wong y Evans (1971) quienes postularon, quizá por analogía con la información obtenida en los fijadores en vida libre, que en condiciones en las que el aporte de fotosintato al nódulo fuese escaso, el amonio resultante de la fijación se acumularía en el medio, inhibiendo la actividad de la NAS; ya un año antes, sin embargo, Kennedy (1970), había demostrado que la adición de amonio y/o aminoácidos a una concentración final de 1 mM, no tenía ningún efecto inhibitor sobre la actividad de la NAS aislada de nódulos de Lupinus sp..



Posteriormente, y en vista de las dificultades que planteaba el estudio de la regulación de la fijación en los nódulos, muchos autores dedicaron sus esfuerzos al esclarecimiento del citado proceso en los microorganismos que poseían la capacidad de fijar el N_2 atmosférico en vida libre, particularmente Klebsiella pneumoniae, puesto que, a partir del descubrimiento de la fijación del N_2 por Rhizobium sp. en ausencia de la leguminosa hospedadora (Pagan et al., 1975; MacComb et al., 1975; Keister, 1976; Bedmar y Olivares, 1979), lo que demostraba que este microorganismo posee los genes necesarios para la síntesis de la NAS, parecía posible que los mecanismos de regulación del proceso de la fijación descubiertos en Klebsiella sp., fuesen aplicables también en Rhizobium sp.

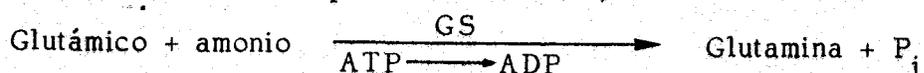
El conocimiento obtenido acerca de la regulación del proceso de la fijación y del metabolismo del nitrógeno en Klebsiella sp., puede resumirse como sigue:

La asimilación del amonio tiene lugar a través de dos vías enzimáticas alternativas en función de la concentración de esta sustancia en el medio. Uno de estos enzimas, la glutámico deshidrogenasa ligada al NADP (GDH-NADP), es activa solo en presencia de altas concentraciones de amonio (aporte exógeno), debido a que posee una K_m muy alta para éste, catalizando la siguiente reacción;

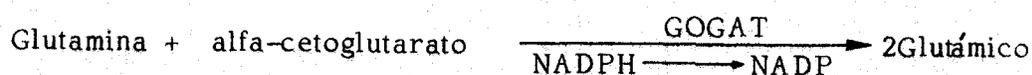


Cuando las concentraciones de amonio son bajas, como ocurre precisamente durante la fijación biológica, las enzimas que intervienen

sucesivamente son, la glutamino sintetasa (GS), que cataliza la siguiente reacción, en presencia de ATP,



y a continuación, la glutámico sintasa, también conocida como glutamino-2-oxoglutarato aminotransferasa (GOGAT), ligada al NADP, que cataliza una reacción clásica de transaminación,



(Shanmugan et al., 1974).

La GS tiene un papel fundamental, por su actuación en la asimilación del amonio y porque es al mismo tiempo, el elemento clave en la regulación de todo el metabolismo del nitrógeno en las bacterias entéricas examinadas hasta ahora (Bender et al., 1977). Esta enzima es un dodecámero de 600.000 daltons - con subunidades de 50.000 daltons cada una, que resulta reprimida rápidamente e inactivada de forma reversible por la unión covalente de restos de AMP a su molécula, cuando existen altas concentraciones de amonio en el medio (Kingdom et al., 1967), aunque más recientemente se han obtenido evidencias de que el verdadero efector de la inhibición de la GS es el glutámico. (Bender y Magasanik, 1977).

El descubrimiento de que la GS controla la síntesis de un gran número de enzimas implicadas en el metabolismo de varias sustancias nitrogenadas, como histidina, prolina, triptófano, urea, etc, así como de la síntesis de la NAS en K. pneumoniae

(Streicher et al., 1974) llevó rápidamente al estudio de los mecanismos reguladores del metabolismo del nitrógeno en Rhizobium sp., a través de la investigación de las enzimas correspondientes, tanto en los bacteroides como en células en vida libre.

Los resultados obtenidos en los bacteroides, aunque no muy uniformes, según la estirpe y condiciones experimentales utilizadas, indican que, tanto la GS como la GOGAT se encuentran presentes en baja concentración, mientras que no se detecta en absoluto la GDH-NADP (Brown y Dilworth, 1975; Robertson et al., 1975; Kurz et al., 1975) y sí, en algunos casos, la GDH ligada al NAD, implicada solo en el catabolismo del glutámico - (O'Gara y Shanmugan, 1976).

Estos hechos llevaron a proponer un modelo de funcionamiento del bacteroide según el cual se produciría la inducción de la síntesis de la NAS y simultáneamente, la represión o inactivación de las enzimas de la asimilación del amonio, lo cual aseguraría la exportación fuera del bacteroide de la práctica totalidad del amonio resultante de la fijación (O'Gara y Shanmugan, 1976). Hay que hacer notar que este modelo supone el que las reacciones de aminación para formar glutámico, glutamina y aspártico se darían fuera del bacteroide, mientras que, como se expuso anteriormente, Bergersen (1977) y Pate (1977), mantienen que dichas reacciones - tienen lugar todavía dentro del bacteroide.

De otra parte, las investigaciones realizadas - sobre las estirpes de Rhizobium en vida libre han dado hasta el momento resultados contradictorios, en cuanto a la presencia y posible importancia de las distintas enzimas. Brown y Dilworth (1975),

han detectado la presencia de las tres enzimas, GS, GOGAT y GDH-NADP, mientras que Kondorosi et al., (1977), no han podido encontrar actividad debida a esta última en una estirpe de R.meliloti ni tampoco de la GDH-NAD. Curiosamente, la actividad de la GS de esta estirpe, no parece estar regulada por el estado de adenilación, así como tampoco resulta notablemente inhibida por altas concentraciones de amonio en el medio, a diferencia de lo que se ha encontrado en las estirpes de Klebsiella sp. Por el contrario, la GS presente en una estirpe de Rhizobium del grupo "cowpea", parece tener propiedades muy semejantes a la de K.pneumoniae, puesto que resulta inhibida por el amonio y su actividad depende del estado de adenilación (Ludwig, 1978), y, al mismo tiempo, podría estar implicada en la regulación de la síntesis de la NAS, ya que se han aislado mutantes GS⁻ que son, al mismo tiempo NAS⁻ (Ludwig y Signer, 1977).

Por si estos datos fuesen poco confusos, los resultados obtenidos por O'Gara y Shanmugan (1976), con estirpes de R.trifolii, R.leguminosarum, R.japonicum y Rhizobium del grupo "cowpea", indican, de un lado, que las estirpes citadas no son capaces de utilizar el amonio como única fuente de nitrógeno, a menos que el medio de cultivo se suplemente con otras sustancias nitrogenadas como aspártico, y que la adición de glutámico al medio bloquea en todos los casos la utilización del amonio, y de otro, que la enzima GOGAT tiene un importante papel regulador, puesto que su actividad varía notablemente en función de la fuente de nitrógeno que se añada al medio de cultivo, así como de la etapa de

crecimiento en que se encuentran los cultivos de las citadas estirpes.

En suma, no es posible, por el momento, decidir acerca de los procesos de regulación de la fijación del nitrógeno y de su utilización en las distintas estirpes de Rhizobium sp., probablemente porque no se han utilizado en todos los casos ni la estirpe ni la metodología adecuadas. Estos problemas podrán, quizá, resolverse con relativa facilidad gracias a los importantes descubrimientos realizados en los dos últimos años en relación con la genética de las propiedades simbióticas de Rhizobium sp., tema del que se ocupa el apartado siguiente.

Las propiedades simbióticas de Rhizobium y los plásmidos

Las primeras evidencias obtenidas acerca de la existencia de plásmidos en estirpes de Rhizobium, se remontan a los trabajos de Higashi (1967) y Dunican et al., (1974). Posteriormente, y utilizando el método del "lisado claro", se demostró la presencia de plásmidos pequeños, de hasta 90 Mdal. (Sutton, 1974; Palomares et al., 1978a y b, entre otros); seguidamente, Ledebøer et al., (1976), demostraron que el método del lisado claro no era el más adecuado para la separación y detección de plásmidos de alto peso molecular, probablemente porque éstos quedan unidos a restos de membrana durante la extracción. Más recientemente, el tratamiento de los lisados celulares con detergentes de alta polaridad, ha permitido la detección de plásmidos de hasta 300 Mdal., en dis-

tintas estirpes de Rhizobium, utilizando para la separación la — técnica de la electroforesis en geles de agarosa (Spitzbarth et al., 1979; Casse et al., 1979; Prakash et al., 1979; Nuti et al., 1979).

Los hechos que ponen de manifiesto que la información necesaria para el establecimiento de la simbiosis va en elementos de ADN extracromosómicos, puede resumirse, según Nuti et al. (1980), como sigue:

- a) El aislamiento de mutantes defectivos en la simbiosis se correlaciona normalmente con la pérdida de plásmidos de alto peso molecular o con deleciones importantes en alguno de dichos plásmidos.
- b) La transferencia de fenotipos simbióticos a frecuencias superiores a las que se transmiten los marcadores cromosómicos.
- c) La inestabilidad "per se" de los caracteres simbióticos en distintas especies de Rhizobium.
- d) la hibridación de plásmidos indígenas de R.trifolii y R.leguminosarum con otros plásmidos, parcialmente digeridos con la endonucleasa Eco RI y que contienen algunos de los genes del operón nif de Klebsiella sp.

En relación al punto a), se ha encontrado que el tratamiento de "shock" térmico sobre estirpes nod⁺ fix⁺ (es decir, infectivas y efectivas, según la notación clásica) resulta en la obtención de estirpes nod⁻ que además han perdido uno de los plásmidos de los tres que contenía la estirpe original (Prakash et

al.,1979). De otro lado, Johnston et al. (1979), han obtenido estirpes nod⁻ utilizando el mismo procedimiento, con la diferencia de que en lugar de perderse uno de los plásmidos, se detectó una delección muy grande en uno de ellos. Finalmente, Zurkowski y Lorkiewicz (1976) obtuvieron igualmente estirpes nod⁻, en las que se comprobó la pérdida de un plásmido de 190 Mdal.

En lo que se refiere a la transferencia de fenotipos simbióticos, la evidencia más fuerte la han obtenido Johnston et al. en 1979. Estos autores introdujeron el marcador Km^r en el plásmido pJB5JI de R.leguminosarum, el cual fue transferido a estirpes nod⁻ de la misma especie y a otras nod⁻ de R.phaseoli y R.trifolii, comprobándose que todas las estirpes obtenidas que habían recibido el plásmido eran nod⁺ sobre el guisante (Pisum sativum), lo cual demuestra que los genes implicados en la Especificidad e Infectividad van en el plásmido o se contranficien con él.

En resumen, existen evidencias suficientes como para admitir que la información necesaria para la expresión de los caracteres simbióticos va codificada en elementos ADN extracromosómicos de alto peso molecular. Se desconoce por el momento la importancia de los plásmidos pequeños que han sido detectados hasta el momento, si bien Nuti et al.(1980) proponen que éstos podrían jugar un papel relevante en experimentos de ingeniería genética. En este sentido, el plásmido pEZ1 de R.meliloti, descrito por Palomares et al. (1978a y b), tiene un peso molecular de 59 Mdal. y es autotransmisible (Bedmar y Olivares,1979), lo

que permite augurar buenas perspectivas si se consiguen datos -- acerca de la información que va codificada en él, aunque ya se de mostró el que la presencia del plásmido se correlaciona con la sen sibilidad a varios bacteriófagos específicos (Corral et al., 1978).

RHIZOBIUM EN EL SUELO

Ya se ha mencionado anteriormente que el hábitat natural de Rhizobium es el suelo, y más concretamente, la rizosfera de las leguminosas. Por razones obvias siempre ha resultado más atrayente el estudio de la simbiosis que el de las con condiciones en que se desarrolla fuera del hospedador vegetal y los factores a su desarrollo y supervivencia en el suelo. Resulta im prescindible, sin embargo, el conocer lo más exactamente posible dichas condiciones, pues difícilmente podrá establecer asociación alguna si las condiciones edáficas no permiten su supervivencia.

Se dispone de buen número de datos acerca de la influencia de factores como la temperatura, humedad pH, iones metálicos pesados, etc., sobre la viabilidad de los Rhizobium en el suelo, si bien no es posible llegar a conclusiones generales debido a que, en muchos casos, la información es contradictoria o se refiere a estirpes muy particulares, lo cual disminuye el valor de los datos aportados.

La rizosfera, definida en otro apartado de este capítulo, puede considerarse en sentido amplio, como la zona

de dimensiones variables inmediatamente adyacente a las raíces. En esta zona, y merced al efecto de los exudados radicales se desarrollan distintas especies de microorganismos que pueden alcanzar números tan elevados como 10^{10} /ml., de los que, en el caso de la rizosfera de las leguminosas, Rhizobium sp. puede suponer hasta un 10% del total (Nutman, 1975).

Antagonismos

Como se desprende de lo que se ha dicho más arriba, los Rhizobium coexisten en la rizosfera con otros microorganismos que en muchos casos ejercen un efecto antagónico sobre ellos (Vincent, 1977).

El estudio de estos antagonismos se lleva a cabo normalmente en el laboratorio, ya que el estudio "in situ" es, con frecuencia, muy complicado. No obstante, se han desarrollado diversas técnicas, como la que emplea anticuerpos anti Rhizobium marcados con fluoresceína, o la utilización de estirpes resistentes a antibióticos, que permiten realizar estudios sobre competencia y antagonismos en el suelo (Alexander, 1977).

A priori, pueden clasificarse los antagonismos en dos grupos, uno de ellos inespecífico, derivado de la presencia en la rizosfera de microorganismos predadores como Paramecium y Mixobacterias, o de productores de sustancias antibióticas, como Pseudomonas, Streptomyces, Nocardia, etc., y el otro específico, constituido por Bdellovibrio y los bacteriófagos espe-

cíficos. En cuanto a Bdellovibrio, es dudoso que pueda ejercer un efecto importante sobre las poblaciones de Rhizobium en el suelo, ya que su acción predatora está determinada, al menos en el laboratorio, por una serie de condiciones que, en principio, no parece probable que se desarrollen en el suelo (Alexander, 1977). Por el contrario, los bacteriófagos han constituido desde hace muchos años objeto de atención por parte de numerosos investigadores (ver referencias en Pochon, 1958), como presuntos responsables de la desaparición o modificación sustancial de las poblaciones rizobianas susceptibles a su ataque.

BACTERIOFAGOS

El descubrimiento de los bacteriófagos se remonta a los primeros años de este siglo, con los trabajos de Twort y D'Herelle, independientemente.

La falta de los medios técnicos adecuados para su observación directa y la vigencia en aquellos momentos de otros organismos como objeto de estudios genéticos, hizo que el interés por los bacteriófagos no fuese demasiado grande hasta unos años más tarde, cuando la puesta a punto del microscopio electrónico y el esfuerzo de investigadores como Ellis y colaboradores (1939), puso de manifiesto que, junto con las bacterias, constituían el material biológico ideal para los estudios genéticos y bioquímicos a nivel molecular.



A este respecto baste mencionar que el descubrimiento de los ARNm y la elucidación de los factores que controlan los procesos de la transcripción y traslación de la información genética contenida en los ácidos nucleicos, no hubiera sido posible, o lo hubiera sido mucho más tarde, de no ser por el estudio de los bacteriófagos. A otro nivel, los bacteriófagos han demostrado su importancia como claves para la identificación de estirpes y como instrumentos en la transferencia de material genético y, en consecuencia, en las experiencias de mapado cromosómico.

Las características esenciales de los bacteriófagos se derivan de su composición exclusiva a base de proteína y ácido nucleico. Esto hace que se comporten como partículas inertes fuera del ambiente celular adecuado para su multiplicación; se trata de parásitos a nivel genético puesto que establecen competencia con el ácido nucleico del hospedador (Watson, 1977). Una diferencia adicional y básica con cualquier otro organismo, es que no crecen por aumento de tamaño hasta dividirse binariamente, lo que permite distinguirlos claramente de los organismos celulares más pequeños como las Rickettsias.

El ciclo vegetativo normal de un bacteriófago comprende una serie de etapas bien conocidas y que pueden aplicarse a la generalidad de los casos:

a) Adsorción del fago a receptores superficiales de la bacteria hospedadora.

- b) Inyección del ácido nucleico al citoplasma bacteriano o a zonas adyacentes a la membrana, acompañado de una serie de proteínas que estabilizan a dicho ácido nucleico o le sirven para iniciar la replicación.
- c) Multiplicación intracelular y maduración y ensamblaje de las nuevas partículas.
- d) Lisis celular y liberación al medio externo de los viriones.

Es prácticamente imposible la enumeración, ni siquiera resumida de los autores que han contribuido al esclarecimiento de cada una de las etapas antes citadas, además de que tal cosa rebasaría los límites de este capítulo. En consecuencia, sólo se revisarán superficialmente aquellos aspectos de la interacción fago-bacteria que tienen relación con los resultados que sobre R. meliloti y sus bacteriófagos, se exponen en el capítulo siguiente.

Bacteriófagos moderados. Lisogenia yseudolisogenia

Uno de los aspectos más sorprendentes de la interacción fago-bacteria lo constituye la lisogenia. En este tipo de asociación, caracterizado por la integración del ADN del fago en el cromosoma del hospedador o en otro sitio de su maquinaria replicativa, normalmente la membrana celular, se consigue la supervivencia de la bacteria y al mismo tiempo la perpetuación del fago, en el estado de profago, entendiéndose por tal, el ADN del -

bacteriófago, sometido a la acción de su propio represor (Barksdale y Arden, 1974).

Las consecuencias que se derivan del estado lisogénico para la bacteria hospedadora son, por un lado, la inmunidad ante el eventual ataque por el mismo bacteriófago y aún de otros fagos relacionados con el primero y la aparición de nuevos caracteres fenotípicos, como consecuencia de la expresión de algunos genes del fago o bien de genes bacterianos cuya expresión es ahora posible merced a la presencia del profago. Estos fenómenos, llamados genéricamente de conversión lisogénica, pueden tener una gran trascendencia como en la asociación entre Corynebacterium diphtheriae-fago β , en el que un gen del fago dirige la síntesis de la toxina diftérica; en otros casos, la alteración fenotípica es más sutil, pero no menos provechosa para la bacteria, como ocurre en el sistema E.coli-fago P1, en el que el profago establece un nuevo sistema de restricción, cuyo efecto se suma al que ya posee la estirpe no lisogenizada (Arber, 1965).

La estabilidad de la asociación lisogénica no es absoluta, sino que con una frecuencia más o menos alta, el profago se desliga del control bacteriano e inicia un ciclo replicativo que conduce a la lisis del hospedador. Este hecho, conocido como inducción del profago, puede producirse espontáneamente, lo que hace que en los cultivos de estirpes lisogenizadas siempre aparezca un cierto número de partículas de fago, o bien mediante la actuación de una serie de agentes, como la irradiación con luz ultravioleta, adición a los cultivos de mitomicina C, carencia de timina,

saltos de temperatura, etc. (Lwoff, 1953).

Un tipo de asociación fago-bacteria que imita perfectamente las propiedades de la lisogenia, por lo que se le llamóseudolisogenia, infecciones persistentes o estado portador, - se caracteriza porque no existe el profago como tal, sino que se dan una serie de circunstancias a nivel de la población bacteriana que conducen a un estado de resistencia al fago, lo que imita la - inmunidad, presencia del bacteriófago en los cultivos y aparición - de nuevos caracteres fenotípicos, lo cual simula la conversión lisogénica.

El establecimiento de las asociaciones seudolisogénicas es posible merced a los siguientes factores: 1) escasez de receptores específicos para el bacteriófago en la superficie celular, con lo que se disminuye la probabilidad de la adsorción, 2) liberación, por las bacterias infectadas y lisadas, de una serie de sustancias, virolisinas, que, actuando sobre la superficie de las células, contribuyen aún más a la escasez de receptores y 3) desarrollo del "estado portador" (Fraser, 1957), en el que las células infectadas por el fago no resultan dañadas hasta el extremo de paralizar su crecimiento, sino que se dividen varias veces antes de lisarse y liberar fagos. De esta forma se llega a un estado de -- equilibrio entre las células infectadas que, como se ha dicho, no se lisan inmediatamente y las células que no pueden adsorber fago, es decir, son sensibles aunque fenotípicamente resistentes.

Las asociaciones seudolisogénicas son fácilmente detectables, debido a que no pueden mantenerse en presen-

cia de suero antifago, al impedirse el proceso de infección de las células sensibles. Además, existen otros agentes que rompen la asociación pseudolisogénica, tales como el Tween, medios con alta o baja tonicidad, etc.; el efecto de todos ellos parece ser el de impedir la adsorción del bacteriófago, con lo que, al prolongar la incubación, acaban predominando las células sensibles sobre las infectadas (Barksdale y Arden, 1974).

Restricción y Modificación

El estudio de la capacidad de los fagos para multiplicarse en estirpes distintas de la misma especie, condujo al descubrimiento de la restricción, concretamente en las estirpes K12, B y C de E.coli y los fagos T2 y lambda. Posteriormente se han descrito fenómenos de la misma naturaleza en otros sistemas fago-bacteria, de donde se deduce que la restricción y la modificación son dos caracteres ampliamente extendidos entre las bacterias.

En la década de los sesenta se estudiaron con mayor atención el comportamiento de los fagos y las estirpes de E.coli mencionadas más arriba y así, los experimentos de Arber y Dussoix en 1962, llevaron a la demostración de dos tipos enzimáticos, una metilasa y una endonucleasa, encargadas respectivamente, de la metilación de ciertas bases ubicadas en secuencias específicas de la cadena de ADN (modificación, carácter m^+) y de cortar la doble cadena, caso de que no se hubiese producido la -

metilación (restricción, carácter r^+).

Actualmente se conocen dos tipos de endonucleasas. El tipo I, caracterizado por un peso molecular alto, lo constituyen proteínas poliméricas con subunidades distintas entre sí, que requieren ATP y S-adenosil-metionina (SAM) para su actividad (Boyer,1971). Cortan el ADN, no por la secuencia específica que reconocen en su sitio activo, sino a una cierta distancia de él. El tipo II son proteínas de peso molecular relativamente bajo, están formadas por subunidades iguales entre sí y no requieren ATP ni SAM para actuar; por lo demás, cortan la doble cadena por la misma secuencia de bases que reconocen en su sitio activo (Collins,1977).

Los genes que llevan la información para la síntesis de los dos tipos enzimáticos pueden ser cromosómicos, plasmídicos (plásmidos R) y fágicos. La importancia de la presencia de estos genes en los microorganismos se descubrió casi inmediatamente en experiencias de transferencia genética, pues la mayor barrera para la entrada de un ADN extraño en una célula receptora reside precisamente en que si este ADN no está modificado adecuadamente, las endonucleasas de restricción lo cortarán y a continuación otras nucleasas lo reducirán rápidamente a nucleótidos (Boyer,1971).

No obstante, la eficacia de las endonucleasas de restricción no es absoluta, ya que sólo son activas frente a moléculas de ADN de doble cadena no modificadas y, además, dependiendo del estado fisiológico de la célula, puede darse el ca

so de que, en la competencia que se establece entre la endonucleasa y la metilasa, sea ésta la que consiga llegar antes al ADN, - modificándolo y haciendo así imposible el ataque de la primera; de hecho, es suficiente con que una sola de las dos cadenas de la molécula del ADN se encuentre modificada para que la endonucleasa no pueda actuar.

Por otra parte, puede darse el caso de que las endonucleasas no puedan actuar debido a la saturación de todos sus sitios activos; tal es, al menos, la explicación que se ha dado para el fenómeno de la infección cooperativa, en el que la infección con un bacteriófago no modificado, a alta multiplicidad, de una estirpe restrictora, da como resultado la lisis celular y la liberación al medio de nuevos fagos no modificados. Se interpreta, en consecuencia, que las primeras moléculas del ADN del fago sirven como "cebo" para saturar los sitios activos de todas las moléculas de endonucleasa presentes en la célula, permitiendo así el que otras moléculas de ADN del fago inicien el ciclo replicativo. No está claro, sin embargo, el por qué en algunas situaciones la actividad de las endonucleasas se ve disminuída o eliminada por completo, como en estirpes r^+ irradiadas con luz ultravioleta, o calentadas durante cierto tiempo a 45° (Boyer, 1971).

Aparte de su importancia en los procesos de transferencia genética entre microorganismos, las endonucleasas de restricción han encontrado un campo de aplicación particularmente interesante en el reconocimiento de secuencias de ADN, como lo demuestran los trabajos realizados sobre el ADN del fago -

lambda, concretamente del sitio att y de los operadores-promotores a los que se une el represor (Pirrotta, 1976), pero sobre todo en la construcción de plásmidos artificiales en los que se "clonan" - secuencias génicas de especial interés para ser estudiadas en microorganismos adecuados (Collins, 1977).

BACTERIOFAGOS DE RHIZOBIUM

El descubrimiento de bacteriófagos activos frente a estirpes de Rhizobium se debe a Gerretsen en 1923, si bien ya en 1908, Loew y Aso sospecharon la existencia de "agentes líticos" capaces de destruir los cultivos de Rhizobium sp.

El aislamiento se efectuó precisamente a partir de nódulos y raíces de leguminosas y en 1927, Grijns demostró inequívocamente su existencia por la formación de placas de lisis en cultivos en medios sólidos.

A partir de la década de los años treinta, la investigación sobre los rizobiofagos corre pareja con la que se realizaba sobre los fagos de otras especies bacterianas, aunque en el caso de los primeros, las citadas investigaciones tuvieron un carácter marcadamente ecológico y tendían a poner de manifiesto la actuación de los rizobiofagos sobre sus hospedadores en el suelo. En este sentido, autores como Demolon y Dunez (citados por Allen y Allen, 1950) les atribuyeron un papel exagerado al hacerles responsables de la llamada "fatigue des lucernes" por des-

trucción de las poblaciones de R.meliloti en la rizosfera de Medicago sativa.

Ya en los años cincuenta se habían encontrado fagos activos frente a la mayoría de las especies del género, particularmente de las de crecimiento rápido (Vincent, 1977), admitiéndose actualmente que la práctica totalidad de los suelos en los que se hayan cultivado leguminosas de cualquier especie contienen fagos activos frente a las estirpes de Rhizobium capaces de nodular a dichas leguminosas, siendo posible su detección tanto en las muestras de suelo rizosférico como en los nódulos y raíces (Pochon, 1958).

Propiedades generales. Interacción Rhizobium-fagos

Los rizobiofagos no muestran tener propiedades que los diferencien de los que se han aislado y caracterizado para otras especies bacterianas. Antes al contrario, las diferencias que pudieran aparecer serían imputables más a las estirpes de Rhizobium que a sus fagos específicos, y así, es necesario tomar algunas precauciones especiales, en los ensayos en medio sólido, para evitar la variabilidad en la morfología de las placas líticas que pudiera derivarse de una excesiva producción de polisacárido por parte de la estirpe concreta que se esté ensayando.

Los datos obtenidos por los diversos autores acerca del proceso de adsorción son bastante contradictorios,

variando desde el 20% en 10 minutos de contacto, hasta el 80% en sólo 1 minuto. El caso extremo lo constituiría el fago DF2 de -- R.meliloti, que se adsorbe muy lentamente, alcanzando porcentajes relativamente bajos aún después de una hora de contacto (Casadesús y Olivares, 1978 y 1979).

Tampoco es posible generalizar en otros aspectos, como la duración de la fase de latencia o el rendimiento en partículas infectivas por célula infectada ("burst size"), que varían desde 70 a 295 minutos y desde 11 a 490 partículas infectivas por célula, respectivamente (Staniewski et al., 1962; Kowalski et al., 1963).

A partir de los años cuarenta se estudiaron otros aspectos de la interacción Rhizobium-fagos, que incluyen -- desde la inactivación de los fagos específicos de R.trifolii y R.leguminosarum por los polisacáridos externos de estirpes de las -- dos especies citadas, hasta el efecto que tiene la infección sobre la movilidad electroforética de las células infectadas, pasando por el efecto de la adición de quimotripsina o ribonucleasa sobre la -- adsorción e infección, respectivamente (Kleczkowska, 1945; Kleczkowski y Kleczkowski, 1952, 1953, 1954a y b y 1959).

La naturaleza de los receptores específicos se ha estudiado en muy pocos casos, pero en todos ellos se han identificado con la fracción lipopolisacáridica de la superficie celular de estirpes de R.trifolii y R.leguminosarum (Barnet y Vincent, 1970; Atkins y Hayes, 1972; Zajac et al., 1975).

En relación con otros aspectos de la inter-



acción Rhizobium-fagos, se conoce desde hace muchos años la propiedad de algunos rizobiofagos de seleccionar estirpes resistentes tras el ataque y destrucción de las correspondientes estirpes sensibles (ver referencias en Pochon,1958). Este problema fue investigado exhaustivamente por Kleczkowska (1950 y 1971), quien estudió la génesis de las citadas estirpes resistentes en distintas condiciones de ensayo, así como otros caracteres fenotípicos que, en principio, parecían ir ligados a la resistencia a los bacteriófagos utilizados en la selección, tales como la morfología de las colonias o la incapacidad para establecer una simbiosis efectiva en la fijación del nitrógeno atmosférico.

Finalmente, en lo que se refiere a la morfología de la nucleocápsida, los rizobiofagos tampoco difieren esencialmente de los que se han aislado para otras especies, según se desprende de los resultados obtenidos por autores como Krsmanovic-Simic y Werquin (1973) y Ackermann (1978), entre otros.

Lisogenia, transducción y transfección

La lisogenia fue descrita por primera vez en 1956, por Marshall, en las estirpes SU297 y SU298 de R. trifolii. Dichas estirpes constituyen un caso bastante especial, por cuanto la estirpe SU297 libera un fago moderado, el i, que a su vez es capaz de infectar y provocar la inducción del fago 7 en la estirpe SU298 (Vincent,1977). A partir de este momento, se -

describieron casos de lisogenia en la mayoría de las especies del género (Takahashi y Quadling,1961; Kowalski,1966, entre otros), habiéndose citado también un caso muy raro, consistente en la lisogenización de una estirpe por un fago moderado obtenido por reversión del carácter "vir" (virulento o lítico) que dicho fago había ganado previamente (Kleczkowska, 1971).

En relación todavía con la lisogenia, se han citado casos de conversión, precisamente en la estirpe SU297 lisogenizada por el fago 7, que, como se ha dicho, es liberado por la estirpe SU298 (Barnet y Vincent,1970).

Por último, cabe mencionar los estudios sobre las variaciones en el fagotipo de estirpes lisogenizadas (Staniewski y Kowalski,1965), sobre el fenómeno de la inducción por la mitomicina C de dichas estirpes lisogénicas de R.meliloti (Zelazna-Kowalska,1972) y, sobre todo, los estudios que Sik y Orosz (1973) han llevado a cabo con el fago moderado 16-3, también de R.meliloti, con vistas a su utilización como transductor especializado.

La transducción se ha conseguido con relativa facilidad en estirpes de R.meliloti, para caracteres de auxotrofia (Kowalski,1967 y 1970; Svab et al.,1978; Casadesús y Olivares,1978) y para caracteres simbióticos (Kowalski y Denarié,-1972).

De otra parte, la transfección se ha llevado a cabo también en estirpes de R.meliloti, habiéndose estudiado las condiciones óptimas para que se llevara a cabo el proceso —

(Staniewski et al., 1971; Sik y Orosz, 1973; Staniewski et al., 1975).

Fenómenos de restricción y modificación

Se ha investigado bastante poco acerca de estos dos fenómenos en las distintas estirpes de Rhizobium. Las únicas citas disponibles al respecto datan de los años 1965 y 1966, sobre estirpes restrictoras de R.trifolii y R.leguminosarum para algunos fagos moderados. El autor de estos trabajos, Schwinghamer, advierte, no obstante, de la muy probable importancia que la restricción pueda tener en los procesos de transferencia genética entre las distintas estirpes y especies del género (Schwinghamer, 1977).

Bacteriocinogenia

La producción de sustancias de tipo bacteriocina parece ser un fenómeno muy común en las distintas estirpes de Rhizobium sp., examinadas hasta el momento (Roslycky, 1967). No se conocen, sin embargo, los determinantes genéticos implicados en el proceso, al menos en la generalidad de los casos; en otras especies bacterianas se sabe con certeza que se debe a la presencia de plásmidos, por lo que Schwinghamer (1977), propone que éste sería también el caso de Rhizobium sp.. En este sentido, Hirsch (1979) ha descubierto recientemente que la capacidad para producir bacteriocinas se transfiere con una frecuencia mayor que

cualquier carácter cromosómico, lo cual apoya evidentemente la su posición de Schwinghamer.

En otros casos, se ha determinado que las supuestas bacteriocinas son restos de partículas de fagos (Lotz y Mayer, 1972; Schwinghamer et al., 1973; Schwinghamer, 1975; Fernández Vivas, 1979) más o menos incompletas, por lo que el fenómeno debe atribuirse casi con toda seguridad a estados lisogénicos defectivos.

Finalmente, y en relación con la producción de bacteriocinas o liberación de partículas "phage-like", Schwinghamer y Brockwell (1978) han llevado a cabo un estudio comparativo sobre las posibles ventajas que tales capacidades confieren a las estirpes productoras frente a otras no productoras.

OBJETO DEL TRABAJO

La información que se ha revisado en el capítulo anterior, aunque muy extensa, resulta útil para poner de manifiesto el número de cuestiones que quedan por resolver en la simbiosis Rhizobium-leguminosa. Dejando a un lado al macrosimbionte, cuyo estudio correspondería a otras disciplinas, los mayores esfuerzos se están dedicando a esclarecer la genética del microorganismo, como lo demuestran los trabajos aparecidos en los dos últimos años sobre la ubicación de los genes implicados en la simbiosis en elementos de ADN extracromosómicos.

También se ha puesto de manifiesto que los fagos específicos han sido objeto en muy pocas ocasiones de estudios de importancia en relación con la genética de Rhizobium sp.. Esta circunstancia no deja de ser extraña teniendo en cuenta el que se ha demostrado hasta la saciedad la importancia de los bacteriófagos en el estudio de otras especies bacterianas y que la tendencia actual es considerar a éstos como elementos muy activos en la transferencia de información genética y, por tanto, en la evolución de sus hospedadores y no como agentes de destrucción, como podría desprenderse de los ensayos de laboratorio.

En el caso de Rhizobium sp., debido a la particular ecología de éste, los fagos específicos deben haber jugado, si cabe, un papel más importante. No en vano se ha demostrado que los fagos son capaces de "seguir" a Rhizobium sp. aún en

el interior de los nódulos, de lo que se sigue que, fenómenos de transducción, lisogenia yseudolisogenia y consecuentemente, el aumento constante del acervo genético del hospedador bacteriano, por aparición de asociaciones defectivas, han debido ser eventos muy comunes y quizá fundamentales en la evolución de estos microorganismos hasta su estado actual.

Se admitirá de buen grado que todo lo dicho es pura especulación, pero sólo es necesario el considerarlo como posible para sentirse atraído por el estudio de los fagos y sus hospedadores. Basta pensar en los ejemplos conocidos en otras especies bacterianas sobre las capacidades que confieren algunos fagos durante la asociación seudo o lisogénica, para vislumbrar toda una serie de posibilidades análogas en las estirpes de Rhizobium sp., del mismo modo que debe ser suficiente el considerar a los fagos como instrumentos útiles y poco complicados en estudios genéticos e identificación de estirpes como pertenecientes a un taxón determinado.

Bajo estas premisas se planteó el siguiente trabajo, cuyos objetivos pueden enunciarse como sigue:

- 1) Aislamiento, purificación y caracterización parcial de bacteriófagos activos frente a estirpes de R. meliloti.
- 2) Fagotipado de estirpes de R. meliloti y estudio del origen de los distintos fagotipos encontrados, tanto en estirpes aisladas "de novo", como de otras obtenidas durante la realización del presente trabajo.

El primer objetivo responde claramente a la necesidad de disponer de un instrumento para la identificación de estirpes de Rhizobium, como pertenecientes a R.meliloti, sin necesidad de recurrir al ensayo de infectividad. Esto es posible, concretamente para esta especie, debido a que pueden considerarse — como excepcionales los casos de bacteriófagos activos simultáneamente frente a estirpes de R.meliloti y de otras especies.

El segundo objetivo tiene una relación directa con el anterior y se basa en el hecho, conocido desde antiguo, de la existencia de estirpes silvestres resistentes a la totalidad — de los fagos frente a las que se las ha ensayado, lo cual no permite, obviamente, el identificarlas por este medio.

La aparición de dichas estirpes resistentes se ha atribuído clásicamente a fenómenos de mutación y/o de lisogenia y sin embargo, los ensayos preliminares realizados al inicio de este trabajo, así como los datos aportados por la bibliografía, indicaban que los fenómenos mencionados no podían explicar todos los hechos observados.

En consecuencia, pareció conveniente profundizar en el estudio del fenotipo resistente, estudio que se abordó, por un lado, investigando la génesis de las estirpes resistentes en los cultivos de las correspondientes sensibles inoculados — con fago y por otro, examinando las propiedades y características de las estirpes resistentes aisladas de nódulos radicales u obtenidas en el laboratorio.

De acuerdo con los resultados obtenidos en



estas experiencias, que permitían descartar tanto la mutación como la asociación fago-bacteria, se inició la investigación de otras posibilidades, tales como la relación entre la sensibilidad a los fagos y la presencia de plásmidos, cuya pérdida o alteración conllevaría lógicamente la resistencia a dichos fagos y la ganancia, durante la interacción de los fagos con estirpes sensibles, de sistemas de restricción, cuya actuación conduciría también a la aparición del fenotipo resistente.

Así pues, y a modo de resumen, los trabajos que se exponen en esta Memoria comprenden, desde el punto de vista aplicado, el aislamiento y caracterización de bacteriófagos específicos de R.meliloti, con vistas a su utilización en la identificación de estirpes aisladas "de novo" y en experiencias de tipo genético (Casadesús y Olivares, 1978 y 1979; Bedmar y Olivares, 1979) y, desde el punto de vista ecológico, el estudio de su abundancia en los suelos y, sobre todo, la investigación de los mecanismos que, desarrollados por las estirpes de R.meliloti a lo largo, sin duda, de millones de años, han permitido a dichas estirpes su supervivencia y la coexistencia en equilibrio con los citados fagos específicos, en la rizosfera de sus hospedadores vegetales.

MATERIAL Y METODOS

1. MICROORGANISMOS

1.1. Bacterias

Al inicio de los trabajos que se incluyen en esta memoria, se dispuso de una colección de estirpes de R. meliloti, cedida por el Dpto. de Microbiología de la Estación Experimental del Zaidín. Posteriormente, se aislaron casi 300 nuevas estirpes, a partir de nódulos radicales de leguminosas incluidas en el grupo de inoculación de R. meliloti.

A continuación se relacionan las estirpes procedentes de la Estación Experimental del Zaidín, que se referirán - de ahora en adelante como colección de laboratorio, junto con sus características mas notables en relación a la simbiosis y el fago tipo. En este grupo se han incluido además, algunas estirpes obtenidas a partir de las anteriores mediante diversos procedimientos.

Rm2: Silvestre, infectiva y efectiva. Se comporta como sensible a todos los bacteriófagos, por lo que se la ha utilizado precisamente para el aislamiento, purificación y enriquecimiento -- de dichos bacteriófagos.

Rm203: Es el aislamiento original del que procede la estirpe Rm2. Tiene las mismas propiedades que ésta, en relación al fagotipo y a los caracteres simbióticos.

Rm11: Tiene las mismas propiedades que la estirpe Rm2, de la que se diferencia únicamente en la morfología de las colonias.

Rm11c: Obtenida a partir de la anterior, por tratamientos con naranja de acridina (NA) (Palomares, 1975). Es también infectiva y efectiva, pero ha perdido la sensibilidad a algunos bacteriófagos.

sp57: Obtenida también a partir de la Rm11, por subcultivo, tras la selección con un fago virulento. Es infectiva y efectiva pero se comporta como resistente a un bacteriófago.

402: Silvestre, infectiva y efectiva. Es un subcultivo del aislamiento original, Rm4, de la que difiere ligeramente en la morfología de las colonias. Es sensible a todos los bacteriófagos.

4c: Se obtuvo a partir de la estirpe 402, por tratamiento con NA, al igual que la estirpe Rm11c, siendo idéntica a ésta con respecto a su comportamiento frente a los fagos.

Rm7 y Rm8: Silvestres, infectivas y efectivas. Forman colonias -- de aspecto no mucoso y son resistentes a un bacteriófago.

Rm2(AL1) y Rm2(SF2): Se obtuvieron a partir de la estirpe Rm2 -- por lisogenización con los fagos AL1 y SF2, respectivamente.

Con excepción del fagotipo, se comportan igual que la estirpe original.

1.2. Bacteriófagos

El aislamiento, purificación y caracterización parcial de fagos específicos de R. meliloti ha constituido una parte esencial de este trabajo, por lo que la descripción de los distintos bacteriófagos se detallará en el capítulo de Resultados.

2. MEDIOS DE CULTIVO

2.1. Medio de Thornton, modificado (Th)

Composición:

Manitol	10.0 g.
Sulfato amónico	1.0 g.
Extracto de levadura	1.0 g.
Fosfato bipotásico	1.0 g.
Carbonato cálcico	2.5 g
Cloruro cálcico	0.02 g.
Cloruro sódico	0.1 g.
Sulfato magnésico	0.2 g.
Sulfato férrico	0.02 g.
Agar	18 g.

Agua del grifo	1000 ml.
pH	7

Este medio se ha utilizado para el mantenimiento de las estirpes de R. meliloti.

2.2. Medio 79 de Allen con cristal violeta (CV)

Composición:

Manitol	7.6 g.
Glucosa	2.4 g.
Extracto de levadura	2.0 g.
Sulfato magnésico	0.2 g.
Cloruro sódico	0.2 g.
Fosfato bipotásico	0.6 g.
Agar	20.0 g.
Agua destilada	1000 ml.
Cristal violeta	1/80.000
pH	7

Con la composición que se ha descrito, se utilizó para el aislamiento de nuevas estirpes de R. meliloti a partir de los nódulos radicales y de muestras de suelo.

La solución de cristal violeta debe esterilizarse - separadamente y añadir al medio la cantidad necesaria una vez que éste también ha sido esterilizado a 117°C durante 20 mins.

2.3. Caldo 79 de Allen, modificado (79M)

Composición:

Manitol	7.6 g.
Glucosa	2.4 g.
Extracto de levadura	1.0 g.
Sulfato amónico	1.0 g.
Sulfato magnésico	0.2 g.
Cloruro sódico	0.2 g.
Fosfato bipotásico	0.6 g.
Cloruro cálcico	0.05 g.
Agua destilada	1000 ml.
pH	7

Una vez que se ha preparado se ajusta el pH y se calienta en el autoclave a 115°C. Se forma un precipitado que se elimina por filtración por membrana Milipore de 0.45 micras. Finalmente, se reparte y esteriliza a 117°C durante 20 minutos.

Este medio se ha utilizado para el crecimiento rutinario de las estirpes, así como para los ensayos y enriquecimientos de los bacteriófagos en medio líquido.

2.4. Medio de Vincent, complejo. (V)

Composición:

Sacarosa	2.5 g.
Fosfato bipotásico	0.5 g.
Cloruro sódico	0.1 g.
Cloruro cálcico	0.05 g.
Cloruro férrico	0.02 g.
Sulfato magnésico	0.2 g.
Extracto de levadura	0.5 g.
Agar	18/7 g.
Agua destilada	1000 ml.
pH	7

El medio original lleva en su composición 0.16 g. de Sulfato cálcico, que se han sustituido por 0.05 g. de Cloruro cálcico para evitar el enturbiamiento que produce el primero. Esta modificación resultó imprescindible puesto que el medio se ha utilizado en todos los ensayos rutinarios que incluyen bacteriófagos, en los que es necesario conseguir la máxima nitidez de las placas líticas originadas por dichos bacteriófagos. Por lo demás, el medio se esteriliza a 117°C durante 30 minutos.

2.5. Caldo de dilución. (B)

Composición:

Sacarosa	2.5 g.
Extracto de levadura	0.5 g.
Agua destilada	1000 ml.

Este medio es una modificación, sin sales, del medio de Vincent. Se ha utilizado como caldo de dilución y en las experiencias de adsorción de fagos, puesto que según los autores (Barnet y Vincent, 1970), la falta de sales impide una excesiva producción de exopolisacáridos, que podrían interferir en el proceso de adsorción. El pH se ajusta a 6.5 y la esterilización se lleva a cabo a 117°C durante 30 minutos.

2.6. Solución de Hewit. (H)

Composición:

Sulfato potásico	0.303 g.
Cloruro cálcico	1.416 g.
Fosfato monosódico, monohidrato	0.208 g.
Sulfato magnésico, heptahidrato	0.368 g.
Citrato férrico	0.025 g.
Sulfato de manganeso, tetrahidrato	0.022 g.
Sulfato de cobre, pentahidrato	0.0024 g.
Sulfato de cinc	0.003 g.



Acido bórico	0.0186 g.
Molibdato sódico	0.00035 g.
Agua destilada	1000 ml.

El medio se utilizó como solución nutritiva para las plántulas de alfalfa sobre las que se fue a realizar el ensayo de infectividad.

3. AISLAMIENTO DE BACTERIOFAGOS

El aislamiento se llevó a cabo siguiendo la técnica general utilizada por los distintos autores, desde fechas tan tempranas como 1940. Sin embargo, se han introducido algunas modificaciones, de manera que pudiese cuantificarse el resultado obtenido, en aquellos casos en que se consideró conveniente.

3.1. Método general

Se tomaron muestras de suelo rizosférico, conteniendo nódulos o raíces noduladas. Estas muestras se homogenizaron en un mortero y se dejaron macerar en agua destilada, en proporción 1:1 (peso/vol), durante varias horas.

Se recogió la suspensión, una vez que las partículas más pesadas habían sedimentado, centrifugando a 16.000 rpm. durante 30 minutos para eliminar microorganismos y partículas de suelo. El sobrenadante se mezcló en la proporción 1:1 con los -

cultivos de la estirpe sensible Rm2 recién inoculados, incubando durante 48 horas a 28°C en agitación y durante 4 días a 20° en reposo, respectivamente.

Al cabo de este tiempo, se añadió un 10% de cloroformo (vol/vol) a los cultivos, agitando vigorosamente para matar las células, centrifugando a continuación durante 30 minutos a -- 6.000 rpm.

Los sobrenadantes obtenidos se diluyeron convenientemente, ensayando frente a la estirpe sensible en placa, según la técnica de la doble capa de agar que se describe más adelante. Además, el sobrenadante se ensayó también frente a la misma estirpe en caldo 79M.

El objeto de incubar a 20° durante la fase de enriquecimiento fue detectar aquellos bacteriófagos que no pudiesen multiplicarse a 28°, es decir, que fuesen termosensibles.

Finalmente, es obvio que se consideró como resultado positivo, el que tanto el ensayo en placa como el que se realizó en caldo, dieran por resultado la aparición de placas líticas y el aclaramiento del cultivo de Rm2, respectivamente.

3.2. Método cuantitativo

En aquellos casos en que se consideró conveniente la estimación de la cantidad de bacteriófagos presentes en un suelo determinado, se modificó el proceso general descrito, como sigue:

Se prepararon cinco muestras de suelo, libre de raíces y nódulos, de 1 g. de peso aproximadamente. Una de las muestras se desecó a 105°C durante 48 horas y las otras cuatro se suspendieron en un volumen de agua destilada (peso/vol) de manera que pudiese considerarse tal suspensión como la dilución 1/10. Se añadió cloroformo al 10% y se agitó, centrifugando seguidamente para sedimentar el cloroformo y las partículas de suelo. El sobrenadante se diluyó decimalmente y se ensayaron las distintas diluciones en placa frente a la estirpe sensible. Los resultados se leyeron a los 2 días, anotando tanto el número como la variedad de placas líticas que aparecían. Finalmente se realizaron los cálculos necesarios, de acuerdo con la pérdida de peso experimentada por la muestra a 105°C, para referir los datos a peso seco de suelo.

3.3. Aislamiento de bacteriófagos asociados a estirpes de *R. meliloti*

Con alguna frecuencia, las estirpes de *R. meliloti* que se aíslan de los nódulos radicales se encuentran asociadas o contaminadas con bacteriófagos. En algún caso, se ha considerado conveniente el aislamiento de estos bacteriófagos.

Dicho aislamiento no reviste dificultad alguna, puesto que es suficiente cultivar la estirpe contaminada o asociada en caldo 79M, centrifugando a continuación para obtener el sobrenadante, en el que se encontrarán los fagos. Posteriormente, se sigue el método de purificación que se describe a continuación.

3.4. Purificación

El proceso de purificación consistió en enriquecimientos y reislamientos sucesivos a partir de placas líticas suficientemente separadas. El enriquecimiento se llevó a cabo de forma rutinaria en caldo 79M, a 28° y en agitación, frente a la estirpe Rm2, y los ensayos en medio sólido, para la obtención de placas líticas separadas, se realizaron en placas de medio Vincent, según la técnica de la doble capa de agar, que se describe más adelante.

3.5. Conservación y almacenamiento

La mayoría de los bacteriófagos aislados durante el presente trabajo, se conservan bien, durante varios meses, en el mismo medio de cultivo utilizado para el enriquecimiento y a 4°. En estas condiciones, se ha preferido utilizar tubos de cierre hermético, añadiendo unas gotas de cloroformo para evitar la evaporación excesiva y la contaminación, respectivamente.

Se ha observado, sin embargo, que algunos bacteriófagos experimentan pérdidas de actividad de hasta el 90% en pocas semanas en las condiciones que se han expuesto. Esta circunstancia ha obligado a enriquecimientos muy frecuentes, normalmente cada mes, para evitar su pérdida.

3.6. Caracterización

La identificación de los bacteriófagos únicamente por la caracterización de las placas líticas que originan sobre una estirpe determinada, aún en condiciones estandarizadas, resulta obviamente insuficiente y aún arriesgada, puesto que tales caracteres están sujetos a variaciones importantes en función de pequeñas variaciones en las condiciones de ensayo.

Por tanto, y aunque reconociendo el valor indudable del parámetro citado más arriba, la caracterización de los distintos bacteriófagos se completó estudiando el espectro de actividad, ésto es, su capacidad para atacar a un grupo de estirpes de R. meliloti, y la morfología de la nucleocápsida al microscopio electrónico.

En lo que se refiere al espectro de actividad, se averiguó ensayando frente a las distintas estirpes, según el procedimiento que se describe en el apartado 5.1. de este capítulo, y la obtención y preparación de las muestras para el microscopio electrónico se describen igualmente en el apartado 11.

3.7. Especificidad de los distintos bacteriófagos

Algunos de los bacteriófagos aislados, se utilizaron posteriormente para el fagotipado de estirpes de R. meliloti, por lo que previamente, se comprobó que no eran activos frente a estirpes de otras especies del género.

Dicha comprobación consistió en el ensayo de los citados bacteriófagos, en placa, frente a 10 estirpes de R. trifolii y R. leguminosarum, aisladas respectivamente, de Trifolium repens y Vicia faba.

4. AISLAMIENTO DE ESTIRPES DE R.MELILOTI

4.1. Aislamiento a partir de muestras de suelo rizosférico

Las muestras de suelo se obtuvieron agitando las raíces de la leguminosa, cuidando especialmente de que tales muestras no tuvieran nódulos o trozos de raíz, con objeto de asegurar la procedencia de las estirpes que eventualmente pudieran aislarse.

Seguidamente, se suspendieron las muestras en agua destilada, en proporción 1:1 (peso /vol.), agitando durante unos diez minutos. A partir de la suspensión obtenida se diluyó decimalmente, inoculando 0,1 ml. de cada dilución en placas de medio 79CV

Las placas se incubaron durante 3 ó 4 días, seleccionando a continuación aquellas colonias que, por su aspecto, fuesen semejantes a las que originaban las estirpes de R.meliloti de la colección del laboratorio.

Las colonias seleccionadas se diseminaron una vez más en el medio 79CV, pasando después a preparar suspensiones que se observaron al microscopio óptico de contraste de fases, - bajo el objetivo de 40x. Como control de estas observaciones, se

prepararon suspensiones de las estirpes Rm2 y 4c.

Se desecharon aquellas estirpes que se diferenciaban claramente de los controles y las restantes se recrecieron en medio Th, ensayando a continuación frente a una serie de bacteriófagos activos frente a la estirpe Rm2.

Finalmente, las estirpes que no se dejaron atacar por los fagos específicos, se ensayaron frente a plántulas de alfalfa para comprobar si se trataba efectivamente de estirpes de R. meliloti.

4.2. Aislamiento a partir de los nódulos

Se siguió el procedimiento clásico, que comprende una esterilización superficial de los nódulos, por inmersión en una solución de cloruro mercuríco al 0.1% en agua destilada, durante 5 minutos y el triturado de los nódulos en una gota de agua destilada estéril. Seguidamente, se disemina a partir del jugo nodular en placas de medio 79CV, incubando a 28°C durante 5 a 7 días.

Una vez que aparecieron las colonias, se diseminó en el mismo medio, para asegurar la pureza de las nuevas estirpes, o, alternativamente, las colonias se suspendieron en caldo B, centrifugando y lavando varias veces, para diseminar finalmente en placas de medio Th. Este último método se empleó con más frecuencia, para asegurar la no contaminación por bacteriófagos de las estirpes aisladas.

4.3. Identificación de las nuevas estirpes

Aunque el método de la esterilización superficial con la solución de cloruro mercúrico es bastante eficaz, era obvia la necesidad de asegurar que las nuevas estirpes pertenecían efectivamente a la especie R. meliloti.

Con este objeto, las estirpes recientemente aisladas se ensayaron frente a una serie de bacteriófagos específicos de R. meliloti, aceptándose que una estirpe determinada pertenecía efectivamente a la citada especie, si mostraba ser sensible - al menos a un bacteriófago .

Cuando las estirpes ensayadas resultaron ser resistentes a todos los bacteriófagos, se procedió al ensayo de infectividad sobre plántulas de alfalfa.

4.4. Ensayos de infectividad

Se ha utilizado la técnica descrita por Olivares (1964).

Las semillas de Medicago sativa se esterilizaron mediante una solución de cloruro mercúrico al 2.5% en agua destilada, en la que se mantuvieron durante 10 minutos. Seguidamente se lavaron repetidas veces en agua destilada estéril, depositán_{do}las finalmente en placas de Petri sobre un papel de filtro húm_{ed}o, en número no superior a 100 semillas por placa.

La germinación se llevó a cabo incubando las - placas a 28°, hasta que las raíces alcanzaron una longitud de -

unos 2 cm. En este momento se pasaron a tubos que contenían - 10 ml. de la solución de Hewit y una tira de papel de filtro, dispuesta de forma que mojara en la solución. Las semillas se depositaron en la parte superior de la tira de papel de filtro, con ayuda del asa de siembra flameada y fría, en número de 4 ó 5 por cada tubo.

A continuación, los tubos se situaron en iluminación, conseguida mediante paneles de tubos fluorescentes de una potencia total de 160w, durante dos semanas, pasadas las cuales, se inocularon con 1 ml de suspensiones espesas de las estirpes - que fueran a ensayarse. Por término medio, los nódulos aparecieron a los 12 ó 15 días. Como control, en cada experiencia se dispusieron tubos inoculados con estirpes de la colección del laboratorio y tubos no inoculados con ninguna estirpe.

4.5. Curva de crecimiento de una estirpe de *R.meliloti*

En la mayoría de los ensayos de interacción entre las estirpes de *R.meliloti* y sus bacteriófagos específicos, es necesario conocer la m.d.i. (multiplicidad de infección fago/bacteria). Esto supone el tener que conocer en cada caso, el título de la suspensión de fagos y el número de células presentes en el inóculo bacteriano, aunque sea de forma aproximada.

Una solución cómoda del problema, consiste en estimar el número de células a partir de la D.O. del cultivo, sin tener que recurrir a sembrar en placa, para conocer dicho número.

Por esta razón, se procedió a obtener la curva patrón de crecimiento de la estirpe Rm2, en caldo 79M, en condiciones de cultivo análogas a las que se iban a dar en los ensayos con bacteriófagos.

La estirpe Rm2 se inoculó en un matraz, con un tubo lateral para permitir la medida de la D.O., que contenía - 25 ml. de caldo 79M, incubando a 28° en agitación. La medida de la D.O. se realizó periódicamente en un espectrofotómetro "Spectronic 20" (Bausch and Lomb), a 650 nm. Con la misma periodicidad, se tomaron muestras de 0.1 ml que se diluyeron decimalmente en caldo B, inoculando finalmente en placas de medio Th, alícuotas - de 0.1 ml de cada dilución para estimar el número de células viables en el cultivo en cada uno de los muestreos.

Por último, los datos obtenidos se representaron como logaritmos, en escala decimal, ajustando una recta de regresión que relacionase las dos series de datos.

5. INTERACCION FAGO-BACTERIA. TECNICAS GENERALES

Los ensayos en medio sólido, se han realizado - siempre según la técnica de la doble capa, descrita por Adams en 1966, utilizando el medio de Vincent, tanto para la capa base como para la capa superior de medio semiblando.

Esta técnica consiste en mezclar una dilución -- apropiada de la suspensión del fago con 0.2 ml. de una suspensión espesa de la estirpe sensible en 4 ml. de medio semiblando, fun-



dido y mantenido a 45° en el baño. La mezcla se vierte a continuación sobre la capa base y una vez que ha solidificado, se incuban las placas a 28° o 20° según los casos; si el inóculo bacteriano ha sido suficiente, las placas líticas serán visibles a las 24 ó 36 horas de incubación a 28°C y a los 4 ó 5 días si la incubación se lleva a cabo a 20°C.

Los ensayos en medio líquido se han realizado normalmente en caldo 79M, con excepción de los ensayos de adsorción, en los que la estirpe se cultivó en caldo B. No obstante, en los casos más frecuentes, en los que se pretendía el enriquecimiento de un fago o el probar la sensibilidad de una estirpe, se inocularon conjuntamente fago y bacteria en caldo 79M, incubando seguidamente a 28° en agitación durante 24 horas, si el objeto era el enriquecimiento, y de 8 a 12 horas si el objeto era averiguar la sensibilidad de la estirpe.

5.1. Fagotipado de estirpes de *R. meliloti*

Se ha llevado a cabo según una técnica derivada de la de la doble capa de agar, que se ha expuesto en el apartado anterior.

Las estirpes que fueran a ensayarse frente a los bacteriófagos, se cultivaron en placas de medio Th en masa. A partir de estos cultivos se tomó una porción con el asa y se homogenizó, agitando fuertemente, en 5 ml. de medio semiblando, fundido y mantenido a 45° en el baño.

La mezcla se vertió directamente sobre placas de Petri estériles, sin la capa de medio base, dejando transcurrir - unos minutos hasta que solidificara. A continuación, se marcaron las placas convenientemente y se depositaron gotas de las suspensiones de los distintos bacteriófagos, incubando a 28°, sobre una superficie lo más horizontal posible, para evitar que las gotas se mezclaran entre sí.

Este método tiene la gran ventaja de su rapidez, pues los resultados pueden leerse incluso antes de 24 horas. Por otra parte, tiene la ventaja adicional de que es posible ensayar un buen número de suspensiones de fagos sobre una estirpe, con un gasto de material y tiempo relativamente escaso.

La única precaución a tener en cuenta es que el título de la suspensión de fago sea, como mínimo, de 10^7 ppi/ml. (partículas infectantes/ml). Esto debe ser así pues se encontró que algunas estirpes son sensibles a determinados fagos, pero éstos - no se multiplican en dichas estirpes, es decir, se produce la lisis bacteriana, sin que se liberen nuevas partículas. Resulta - obvio, por tanto, que si el título de la suspensión es excesivamente bajo, no se observará la formación de halo de lisis, aun cuando una proporción de células haya resultado lisada.

Finalmente, y como precaución adicional, en todos los ensayos de fagotipado, se prepararon placas inoculadas - con la estirpe Rm2, que actuó como control de la pureza y título suficiente de las suspensiones de los distintos fagos.

5.2. Selección de estirpes resistentes mediante bacteriófagos

Este método, empleado con mucha frecuencia desde el descubrimiento de los bacteriófagos, aprovecha precisamente la propiedad de éstos, de eliminar todas o casi todas las células susceptibles a su ataque, permitiendo el desarrollo de aquellos mutantes preexistentes en la población que hubieran perdido, por -- ejemplo la propiedad de adsorber a dicho fagos.

La técnica es especialmente adecuada para los bacteriófagos líticos o virulentos, puesto que los moderados dejan tras su ataque una población bacteriana heterogénea, mezcla de estirpes lisogenizadas oseudolisogenizadas, entre las que es difícil detectar las verdaderas estirpes resistentes.

Por lo demás, la técnica es aplicable en medios sólidos y líquidos, aunque, como se expone seguidamente, el primer procedimiento tiene algunos inconvenientes.

5.2.1. Selección en medio sólido

Se llevó a cabo en placas de medio Vicent, según la técnica de la doble capa de agar.

Para ello, se mezclaron fago y bacteria en el medio semiblando, como ya es habitual, pero utilizando una concentración de fago tal que, tras la incubación de las placas, se obtuviese lisis confluyente, es decir, que no apareciesen placas líticas separadas.

La incubación se realizó a 28°, durante 4 ó 5 días, para permitir el desarrollo de las colonias, a partir de las cuales se diseminó en placas de medio Th, varias veces, para eliminar la contaminación con el bacteriófago utilizado en la selección.

Este método ha sido poco utilizado, debido a que los bacteriófagos virulentos dejan tras su ataque un gran número de estirpes supervivientes, sean resistentes o no, lo que dificulta mucho el aislamiento a partir de colonias separadas.

Por otra parte, el método tiene el inconveniente adicional de la lentitud, a lo que hay que añadir el tiempo invertido en los subcultivos y reaislamientos necesarios para obtener estirpes puras y no contaminadas con el fago.

Por todo ello, se ha preferido siempre la selección en medio líquido, que se describe seguidamente.

5.2.2. Selección en medio líquido

Se llevó a cabo inoculando conjuntamente el fago y la bacteria en tubos con 4'5 ml. de caldo 79M, incubando seguidamente a 28° y en agitación durante 48 a 72 horas. En este tiempo tienen lugar, sucesivamente, la fase de aclaramiento debida a la lisis de las células sensibles y el nuevo enturbiamiento del medio de cultivo por la proliferación de las estirpes resistentes.

A continuación se centrifugaron y lavaron las células 2 ó 3 veces en caldo B, para eliminar los bacteriófagos, diluyendo en el mismo caldo B, a partir de la última suspensión obtenida.

Por último, se inocularon 0'1 ml. de las diluciones adecuadas en placas de medio Th, para permitir el desarrollo de colonias separadas. Si bien la fase de lavado es suficiente normalmente para eliminar la contaminación con los fagos, se realizó un último control sobre las colonias seleccionadas, consistente en recrecerlas en caldo 79M, ensayando los sobrenadantes de estos -- cultivos, sobre la estirpe RM2 y, en su caso, desechando aquellas que aún fueran contaminadas.

Resulta evidente que el método es relativamente sencillo y considerablemente rápido, por lo que ha sido utilizado -- corrientemente.

Por último, solo hay que hacer notar, que aún a m.d.i. relativamente altas, es frecuente que junto con la población de estirpes resistentes aparezca otra de estirpes sensibles que no resultaron lisadas debido, probablemente, a la aparición en el medio de cultivo de sustancias, endolisinas (Barksdale y Arden, 1974) que alteran las estructuras superficiales de las células, impidiendo la adsorción del fago.

5.3. Ensayos de adsorción

El objetivo principal de los ensayos de adsorción ha sido demostrar que las estirpes resistentes a los fagos eran -- aún capaces de adsorberlos.

Como se expuso en el capítulo de Introducción, la adsorción puede ser un proceso muy lento y de resultados variau

bles en las estirpes de Rhizobium, debido a la interferencia del exopolisacárido y otros restos de material celular. Para reducir en lo posible las citadas interferencias, se utilizó siempre el caldo B que, según Barnet y Vincent (1970), da los mejores resultados gracias a su bajo contenido en sales.

El procedimiento seguido consistió en cultivar la estirpe que se fuera a ensayar durante una noche en caldo B, a 28° y en agitación, tras lo que se añadió la suspensión del fago, previamente titulada.

El tiempo de contacto fue variable según los casos, manteniendo la mezcla a 28° en reposo y centrifugando seguidamente a 5000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se diluyó decimalmente en tubos de caldo B, ensayando finalmente frente a la estirpe sensible, según la técnica de la doble capa, para contar el número de fagos no adsorbidos.

Una vez conocido dicho número, se obtiene el de fagos adsorbidos y finalmente, la adsorción se expresa como el porcentaje de fagos adsorbidos con respecto al número inicial de fagos presente en la suspensión original.

Una variante de este método, empleada con la misma frecuencia y que tienen la ventaja de poder controlar más exactamente el tiempo de contacto entre el fago y la bacteria, consistió en diluir 1/100, directamente a partir de la mezcla, en tubos con caldo B con el 10% de cloroformo (vol/vol), para matar las células. Este método, que tiene la ventaja adicional de eliminar la centrifugación, podría, sin embargo, tener el inconveniente de

que si el tiempo de contacto es excesivamente largo, algunas de -- las células infectadas, conteniendo partículas completas, resultarían lisadas por el cloroformo, liberando las citadas partículas al medio y falseando por tanto el número de partículas no adsorbidas. De otra parte, tampoco es improbable que el cloroformo sea capaz de inactivar algunas partículas, en cuyo caso, se obtendrían porcentajes de adsorción falsos, por exceso.

5.4. Restricción y modificación

La evidencia de que existen estirpes bacterianas capaces de restringir a determinados fagos, obtenidos por enriquecimiento frente a otras estirpes de la misma especie, se obtuvo en los primeros años de la década de los 50 en estirpes y fagos de E. coli.

En el orden práctico, todo consiste en controlar el número de placas líticas que una suspensión de un fago es capaz de producir, al ensayar según la técnica de la doble capa de agar, sobre otras estirpes de la misma especie.

Por lo demás, éste ha sido el método que se ha utilizado durante la realización de este trabajo, para comprobar si la resistencia a los fagos de determinadas estirpes de R. meliloti tenía su base en un fenómeno de restricción prácticamente total.

Cuantitativamente, la restricción se expresa como la e.o.p. ("efficiency of plating", eficacia en la formación de

placas líticas), que no es más que el resultado de dividir el número de placas líticas obtenidas sobre una estirpe cualquiera, por el que se obtiene al ensayar el bacteriófago sobre la misma estirpe - frente a la que se enriqueció últimamente:

En suma, si $F(X)$ es un fago obtenido por multiplicación en la estirpe X e Y es una estirpe restrictora, la e.o.p. de $F(X)$ sobre X, será, obviamente, 1, mientras que será tanto - menor que 1, sobre Y, en función de la capacidad de esta estirpe para restringir al citado $F(X)$.

6. TRATAMIENTO CON NITROSOGUANIDINA (NTG)

La mutagénesis con este agente se utilizó para intentar obtener estirpes resistentes a uno o varios fagos, sobre la base de que tales resistentes eran efectivamente debidas a un fenómeno de mutación. El método que se ha seguido es una variante - del que utilizara Casadesus (1978) para la obtención de marcadores de auxotrofia en estirpes de R. meliloti.

Se cultivó la estirpe durante la noche, en caldo - 79M a 28° y en agitación. A la mañana siguiente se diluyó el cultivo 1/10 en caldo B y se añadió NTG hasta alcanzar una concentración final de 180 µg/ml, dejando que actuase, a 28° y en reposo, durante 30 minutos, pasados los cuales se centrifugó durante 15 min a 5000 rpm. con lo que el tiempo total de tratamiento fue de 45 mi-

nutos. Las células se lavaron y centrifugaron varias veces más en caldo B, diluyendo finalmente la suspensión bacteriana y sembrando en placas de medio Th para obtener colonias separadas.

Una vez que aparecieron las colonias, se ensayaron frente a un fago o una mezcla de fagos, según la técnica de la doble capa de agar, modificada, puesto que el procedimiento seguido fue inocular el medio sembrando con una suspensión de fago de alto título, y una vez solidificada, se tocó en las colonias con pabillos de dientes estériles, inoculando en la capa de medio semiblando preparada como se ha dicho. Además, se prepararon placas control, no inoculadas con fagos, para comprobar si las colonias se lisaban o no. Esta técnica tiene la ventaja de poder ensayar gran número de colonias, con un gasto de material y tiempo relativamente escaso, y el inconveniente de que en algunos casos es difícil interpretar los resultados debido a la aparición tras el tratamiento con NTG de una mezcla de estirpes que producen colonias que se desarrollan muy lentamente, o con una producción de polisacárido aún mayor que la estirpe original.

7. INDUCCION CON MITOMICINA C (MIT.C)

La mitomicina C, fue uno de los primeros agentes que se descubrió eran capaces de provocar la inducción del estado lisogénico. Posteriormente, se comprobó la existencia de estirpes -

lisogenizadas en las que el profago no era inducible en absoluto, o lo hacía muy escasamente.

El objeto de la utilización de la mitomicina C sobre estirpes resistentes de R.melloti era, obviamente, intentar la inducción de profagos que, eventualmente, podrían ser la causa de la resistencia.

Como primer paso para averiguar las condiciones más adecuadas de inducción, se obtuvo la estirpe lisogénica Rm2 (AL1), a partir de la sensible Rm2 y el fago moderado AL1, con la que se realizaron los ensayos, en caldo 79M, frente a varias concentraciones de mitomicina C.

Para esta estirpe, la inducción tiene lugar ya a concentraciones de $0.25\mu\text{g/ml.}$; sin embargo, y ante la evidencia aportada por la bibliografía, de la existencia de estirpes de R.melloti, lisogénicas e inducibles por la mitomicina C a concentraciones de $10\mu\text{g/ml.}$ (Kowalska, 1972), los ensayos se llevaron a cabo rutinariamente a las siguientes concentraciones: 0.3, 0.5, 1.0, 2.5, 5 y $10\mu\text{g/ml.}$

8. IRRADIACION CON LUZ ULTRAVIOLETA (UV)

Al igual que la mitomicina C, se ha utilizado para intentar la inducción de las estirpes resistentes.

Las condiciones más adecuadas se averiguaron también, comprobando el efecto de diversas dosis de irradiación , -



en medio sólido y líquido, sobre la estirpe lisogénica Rm2(AL1).

En medio sólido, la dosis más adecuada fue la obtenida al irradiar durante 4 seg. a 13 cm. de distancia con una lampara "Sylvania" de 16w de potencia. En estas condiciones, la estirpe Rm2(AL1) se lisó completamente, mientras que la estirpe - Rm2, que actuó como control, no se vió afectada.

Para los ensayos en medio líquido, se prepararon varios cultivos en caldo 79M de las dos estirpes, en fase exponencial, con 10^8 células/ml., aproximadamente.

Seguidamente, se prepararon placas de Petri con 15 ml. de los cultivos, irradiando en las mismas condiciones que en el caso del medio sólido, durante 10, 20, 30, 40 y 50 segundos. A continuación, los cultivos se pasaron a tubos estériles, incubándolos a 28°C, en agitación y en oscuridad, durante 12 horas. Pasado este tiempo, se midió la D.O. de los cultivos irradiados y de otros no irradiados que habían actuado como controles. De acuerdo con los resultados obtenidos, el tiempo más adecuado fue de 20 a 30 segundos.

9. CULTIVOS EN PRESENCIA DE TWEEN-80

Algunos autores han recomendado los cultivos en caldo, en presencia de Tween-40 o Tween-80 a concentraciones desde 0.01% con objeto de evitar la formación de grumos, facilitando

así la obtención de colonias que procedan de una sola célula, una vez que se pasa a diseminar en medios sólidos. El Tween se ha empleado también a diversas concentraciones para curar laseudoliso-genia o el estado portador de cultivos contaminados con fagos. Este último ha sido el objeto que se ha perseguido, particularmente con estirpes que fueron capaces de liberar fagos y en las que no fue posible eliminar esta propiedad mediante el subcultivo o lavado. Las condiciones más adecuadas se averiguaron con la estirpe v47, y resultaron ser del 1% en caldo 79M y manteniendo el cultivo durante 48 horas a 28° en agitación.

10. TRATAMIENTOS CON NARANJA DE ACRIDINA (NA)

El NA es uno de los agentes que clásicamente se han utilizado para eliminar plásmidos de peso molecular relativamente bajo, habiéndose descrito en algunos casos, su capacidad para interferir con la replicación del ADN de algunos bacteriófagos.

En lo que se refiere a las estirpes de R.meliloti, se le ha utilizado para intentar la eliminación del plásmido pEZ1, descrito en la estirpe 402, por Palomares et al. (1978a y b), así como en la estirpe Rm2, en la que siendo silvestre al igual que la 402, se suponía debería estar presente.

El procedimiento seguido fue el mismo que utilizara Palomares (1975), consistente en incubar las estirpes en cal-

do 79M, en presencia de 20 μ g/ml de NA, durante 48 horas, a 28° y en agitación. Posteriormente, las células se lavaron y centrifugaron repetidas veces antes de diseminar en placas de medio Th para la obtención de colonias.

11. MICROSCOPIA ELECTRONICA

La preparación del material necesario así como la obtención de las muestras y su procesamiento para ser examinadas al microscopio electrónico, se llevaron a cabo siguiendo técnicas generales, modificadas en algunos casos, según se estimó conveniente.

11.1. Preparación del soporte: Rejillas con Formvar -Carbón

Se han utilizado rejillas de cobre de 300 ó 400 - mallas, que antes de ser cubiertas con el polímero plástico, se lavaron mediante pases sucesivos en los siguientes disolventes:

- 2 pases en cloroformo
- 2 pases en alcohol absoluto
- 2 pases en agua destilada
- 2 pases en alcohol absoluto
- 2 pases en cloroformo

Tras el último pase las rejillas se depositaron en una caja de Petri, sobre una pila de papel de filtro, dejándo-

las secar al aire y protegidas del polvo. Finalmente, se guardaron en una campana de desecación.

Para la película plástica, se ha utilizado siempre el Formvar (polivinil-formol), disuelto al 0.25 ó al 0.30% en cloroformo para espectroscopía (Merck). La solución se guardó también en una campana de desecación hasta el momento de ser utilizada.

El procedimiento seguido para colocar la película plástica sobre las rejillas, fue el siguiente:

Se toma un portaobjetos perfectamente limpio y seco y se sumerge en la solución de Formvar, retirándolo inmediatamente y dejándolo escurrir y secar sobre la solución, en posición vertical; de esta forma se evita el que durante el secado absorba humedad y se formen agujeros en la película.

Seguidamente se cortan los bordes de la película, raspando los bordes del portaobjetos con una cuchilla. Esta operación debe realizarse lo más cuidadosamente posible para evitar el que la película se ensucie con partículas de vidrio.

A continuación se pasa a desprender la película del portaobjetos, haciéndola flotar sobre agua destilada. Para ello, se introduce el portaobjetos por su borde de menor longitud, muy lentamente en el agua, vigilando si la película se desprende uniformemente.

Una vez que se tiene la película flotando sobre el agua, se disponen las rejillas sobre ella, más o menos ordenadamente y con la superficie mate en contacto con la película. Final

mente, para extraer la película con las rejillas adheridas, se deposita un trozo de papel de filtro sobre la citada película, dejándolo estar hasta que el agua lo empapa totalmente, y en este momento se saca, depositándolo en una caja de Petri que se lleva a secar a la estufa a 37°C.

Una vez que el conjunto formado por el papel, las rejillas y la película se han secado totalmente, se procede a cubrir la película con una capa de carbón, lo que se llevó a cabo en un evaporador Hitachi mod. HUS-4B, haciendo pasar una intensidad de corriente de 40 amperios por los electrodos de carbón durante 1 a 1.5 minutos.

Por desgracia, y por razones de orden técnico no siempre ha sido posible evaporar carbón sobre las rejillas, por lo que se recurrió a irradiar con luz UV durante 5 minutos, en las mismas condiciones que se expusieron en el apartado 8 de este capítulo. El efecto de la irradiación consiste fundamentalmente en hacer más hidrófila la superficie del Formvar y, según autores, contribuye a aumentar su estabilidad; sin embargo, tal efecto no es comparable, en modo alguno, a la que se obtiene con la película de carbón.

11.2. Preparación de las muestras

La mayor parte de las muestras examinadas han sido, naturalmente, suspensiones de bacteriófagos; sólo en algunos casos se han preparado suspensiones de fagos y bacterias para com

probar el sitio (superficie o flagelos) de adsorción.

A) Bacteriófagos.

En la mayoría de los casos se ha partido de los enriquecidos en caldo 79M, lo que ha sido posible gracias a que el título medio alcanzado en dichos enriquecimientos es del orden de 10^9 fagos/ml, que permite la observación al ME con relativa comodidad. El principal inconveniente de este método consiste en que si se utilizan tinciones a pH ácido se obtienen preparaciones bastante "sucias", al precipitar algunas de las sales que entran en la composición del medio de cultivo, a lo que contribuyen, evidentemente, los restos no centrifugables a baja velocidad de material celular.

El método clásico, consistente en ciclos de centrifugación a alta-baja-alta velocidad, se utilizó con aquellos bacteriófagos que se enriquecen pobremente frente a la estirpe sensible. Para ello, se prepararon de 15 a 20 placas, según la técnica de la doble capa de agar, de manera que se obtuviese lisis confluyente.

Se recogieron las capas de medio semiblando en 50 ml. de una solución de acetato amónico 0.1 M, homogeneizando en una "turmix" y filtrando la pasta obtenida a través de papel de filtro normal. La suspensión resultante se centrifugó a 6000 rpm durante 30 minutos para sedimentar las células y los restos de agar y el sobrenadante se filtró por membrana Milipore de 0.45 micras.

En este punto se realizó un ensayo sobre la estirpe Rm2, en placa, según la técnica de la doble capa de agar, -

para controlar el título de la suspensión obtenida y seguidamente, se pasó a centrifugar a 60.000xg durante 2 horas. El sedimento se resuspendió en el mismo volumen inicial de acetato amónico, centrifugando a continuación a 10.000 rpm durante 30 minutos, a lo que siguió una última centrifugación a 60.000 rpm. El sedimento se resuspendió finalmente en 2 ó 3 ml. de acetato amónico, 0.1 M, quedando así preparado para su montaje en las rejillas.

B) Muestras de bacterias y bacteriófagos.

El método utilizado más frecuentemente consistió en mezclar fago y bacteria en caldo B, a una D.O. final de 0.5, incubando a 28° en reposo para permitir la adsorción. Seguidamente se lavaron las células, centrifugando y resuspendiendo en la solución de acetato amónico varias veces y, como antes, se pasó directamente a montar muestras sobre las rejillas.

11.3. Tinciones

Se han utilizado las tinciones clásicas a base de sales pesadas, como el fosfotungstato sódico o pótasico, el acetato de uranilo, etc., a diversos valores de pH.

Acido fosfotúngstico. (PTA)

Se prepara en agua destilada al 1-2%, ajustando el pH con una solución de KOH o NaOH, entre 6.5 y 8. En la mayoría de los casos se utilizó el KOH, ajustando el pH a 7 (PTK).

Las soluciones de PTK pueden enturbiarse, bien durante su preparación bien con el transcurso del tiempo, por lo que es conveniente utilizarlas inmediatamente después de ser preparadas o bien, filtrarlas a través de una membrana Milipore de 0.2 micras, lo que permite su conservación durante bastante tiempo a temperatura ambiente.

Acetato de Uranilo. (AU)

Se prepara en agua destilada o en alcohol-agua al 50%, a concentraciones desde 0.5 al 1%. En teoría, el AU es mucho más adecuado que el PTK para su utilización como tinción negativa, pero también presenta el inconveniente de que si la muestra no está adecuadamente purificada, todos los contaminantes resultan teñidos, obteniéndose de hecho, preparaciones poco contrastadas, es decir, preparaciones en las que los especímenes destacan pobremente sobre el "background".

Por otra parte, el AU se utiliza a pH 4.5-5, lo que, en algunos casos, podría alterar la morfología de las estructuras que se vayan a visualizar, o crear artefactos que dificultan la observación de las primeras.

Oxalato de uranilo. (OxU)

Se obtiene mezclando AU y ácido oxálico en agua destilada en la siguiente proporción:

Acido oxálico	0.15 g.
Acetato de Uranilo	0.50 g.
Agua destilada	100 ml

(Mercer y Birbeck, 1974).

Es ligeramente más activo y estable que el AU, conservándose durante bastante tiempo a temperatura ambiente. Por lo demás se utiliza como el AU, a pH entre 4.5 y 5, que se ajusta con amoníaco.

11.4. Montaje de las muestras en las rejillas y tinción

El procedimiento más comúnmente utilizado consistió en depositar gotas de las suspensiones sobre las rejillas, dejándolas estar durante 1 ó 2 minutos y retirando a continuación el exceso de líquido con un papel de filtro. De esta forma, queda sobre la rejilla una fina película de la suspensión, que se deja secar al aire y protegida del polvo. Si la suspensión utilizada no contiene la concentración adecuada de la muestra que se vaya a observar, una vez secas las rejillas, se procede igual que al principio, depositando una gota, etc.

La tinción se realizó de la misma forma que el montaje de la muestra, es decir, se coloca una gota de la solución empleada, que se retira totalmente con ayuda de un papel de filtro, colocando a continuación una nueva gota que se retira del mismo modo y, por último, se coloca una tercera gota de la que sólo se retira el exceso, dejando una capa fina de líquido que se deja secar al aire.

En algunos casos, se utilizó un método simplificado, consistente en mezclar 1 : 1 (Vol/vol) la suspensión de la

muestra y la solución empleada en la tinción, procediendo como en los casos anteriores, depositando gotas y retirándolas, etc. Este método sólo es aplicable cuando la suspensión de la muestra tiene una concentración adecuada, ya que, de lo contrario, la dilución - de la muestra en la solución dificulta después la localización de los objetos que se vayan a observar.

Todas las observaciones se realizaron en un microscopio electrónico "Phillips", mod. EM-300. Conviene hacer no tar que es imprescindible el que las rejillas estén perfectamente - secas antes de ser introducidas en la columna del microscopio, pues de no ser así, dicha columna resulta rápidamente contaminada, al tiempo que la preparación sobre la rejilla "evapora" y se estropea irremediablemente.





RESULTADOS



1. BACTERIOFAGOS

1.1. Aislamiento. Estudio cuali y cuantitativo de los bacteriófagos activos frente a *R. meliloti*, presentes en el suelo.

Como se indicó en Objeto del Trabajo, el aislamiento y caracterización parcial de bacteriófagos específicos de *R. meliloti*, constituyó el primer objetivo de este trabajo. Como parte previa al aislamiento propiamente dicho, se creyó conveniente el investigar la presencia y abundancia relativa de dichos fagos en muestras de suelos rizosféricos de distinta procedencia.

El método utilizado para la cuantificación de los resultados se expuso en el capítulo de Material y Métodos, y en cuanto a la estimación del número de fagos distintos, presentes en cada muestra, se utilizó como criterio único, la morfología de las placas líticas.

Se han estudiado muestras de nueve suelos de distinta procedencia geográfica, aunque por razones obvias, la mayo-

ría de ellos pertenecen a la provincia de Granada; se ha tenido en cuenta, además, el tipo de cultivo y la antigüedad del mismo, en cada caso. En relación con el cultivo, se eligió preferentemente la alfalfa, y cuando ello no fue posible, se muestrearon suelos de prados o jardines en los que crecían especies de leguminosas pertenecientes al grupo de inoculación de R.meliloti.

Todos los ensayos se realizaron frente a la estirpe Rm2, que en experiencias preliminares demostró ser la más adecuada por sus características de cultivo, así como por su sensibilidad a los bacteriófagos. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 1.

De estos resultados se desprende la existencia de una relación entre la implantación de cultivos de alfalfa y la existencia en los suelos correspondientes, de bacteriófagos activos frente a la estirpe Rm2. La excepción la constituyen los suelos de Loja (Granada), en el que es posible atribuir el resultado negativo a la reciente implantación del cultivo, y el de Requejada (Santander), en el que, probablemente, el tiempo transcurrido entre la extracción de la muestra y su procesamiento, debió provocar la inactivación de la mayoría de los bacteriófagos.

De otra parte, tanto el número total como la variedad de fagos, se hacen mayores, en general, al aumentar la antigüedad del cultivo, aunque hay que destacar también, la presencia de fagos activos en número muy alto, en muestras de suelos en los que no se cultivaba alfalfa; ahora bien, como se dijo más arriba, en estos suelos se detectó la presencia de otras especies de

Tabla 1. Bacteriófagos activos frente a R. meliloti, estirpe Rm2, presentes en muestras de 9 - suelos rizosféricos de las provincias de Granada, Córdoba y Santander.

Muestra	Cultivo	Antigüedad	Nº total fagos/gr	Nº placas líticas distintas
Loja	Alfalfa	1 año	0	-
Riofrio	Prado	-	0	-
Albaicín	Alfalfa	4 años	$5'0 \times 10^3$	2
La Zubia	Alfalfa	4 años	$3'2 \times 10^2$	3
Deifontes	Alfalfa	12 años o más	$1'6 \times 10^3$	3
Granada	Alfalfa	10 años o más	$6'3 \times 10^4$	4
Iznalloz	Prado	-	$0'5 \times 10^2$	1
Cabra	Jardín	-	$1'0 \times 10^3$	1
Requejada	Alfalfa	-	0	-

leguminosas incluidas en el grupo de inoculación de R.meliloti, - como Medicago sp. en el caso de Iznalloz (Granada) y Melilotus sp., en el caso de Cabra (Córdoba).

Por último, hay que hacer notar que la estimación del número de fagos distintos presentes en un suelo, basada - en la morfología de las placas líticas que éstos originan debe dar lugar a valores inferiores a los verdaderos, ya que muchos bacteriófagos virulentos distintos dan lugar a placas líticas claras, de aspecto muy similar y, por tanto, difícilmente distinguibles entre sí.

Aparte de los ensayos cuantitativos, cuyo resultado se ha expuesto más arriba, se realizaron otros muestreos, a partir de suelo rizosférico y de nódulos radicales, mayoritariamente de Medicago sativa, con la finalidad exclusiva del aislamiento; en dichos ensayos y de acuerdo con lo que se dijo en el capítulo de Material y Métodos, se llevó a cabo un enriquecimiento previo de las suspensiones de suelo o de los extractos nodulares, frente a la estirpe sensible Rm2.

Finalmente, otros bacteriófagos se aislaron, no a partir de muestras de suelo rizosférico, sino como contaminantes o asociados a estirpes silvestres de R.meliloti, aisladas de nódulos radicales de las leguminosas hospedadoras.

1.2. Purificación y caracterización.

La purificación se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito en el capítulo de Material y Métodos . Tan solo cabe añadir que tras el enriquecimiento y tratamiento de los cultivos con cloroformo, la suspensión puede centrifugarse o bien filtrarse a través de una membrana Milipore de 0'45 micras, para eliminar las células y restos celulares más groseros. La filtración tiene un rendimiento ligeramente inferior a la centrifugación, quizá debido a la adsorción de algunos fagos al filtro.

En lo que se refiere a la caracterización de los distintos bacteriófagos, se ha recurrido fundamentalmente a tres parámetros: a) caracteres de las placas líticas que originan sobre la estirpe Rm2 en condiciones estándar; b) ensayo frente a una variedad de estirpes para obtener su espectro de actividad y c) examen al microscopio electrónico, con objeto de obtener datos acerca de su morfología.

1.3. Clasificación.

De acuerdo con los parámetros utilizados para la caracterización, los fagos aislados pueden clasificarse en varios grupos, según se atienda a uno u otro criterio. La clasificación basada en los caracteres de las placas líticas presenta el inconveniente doble de la subjetividad a la hora de describirlos y de la circunstancia de que pequeñas variaciones en las condiciones de ensayo pue

den alterar sustancialmente los mismos. De otro lado, el espectro de actividad es un dato seguro, a condición de que las estirpes en cuestión no varíen su sensibilidad para los fagos, y, finalmente, - la visualización al microscopio electrónico no siempre es posible llevarla a cabo en condiciones lo suficientemente óptimas para apreciar pequeñas diferencias morfológicas entre los viriones examinados.

A pesar de ello, se han establecido varios grupos, atendiendo a su carácter moderado o virulento, entendiendo - por tal, el que originen placas líticas turbias y claras, respectivamente, sobre la estirpe Rm2, atendiendo al tipo de nucleocápsida y a que sean capaces o no de lisar a ciertas estirpes bien caracterizadas. En la tabla 2 se exponen los distintos bacteriófagos y sus características más notables.

A partir de los datos que se han expuesto en la tabla anterior y teniendo en cuenta los parámetros utilizados para la caracterización, se han establecido los siguientes seis grupos - de bacteriófagos:

Grupo 1.

Bacteriófagos de carácter moderado, con nucleocápsida de simetría compleja, no activos frente a la estirpe v47.

VBP, f47, san y cab.

Al microscopio electrónico, estos bacteriófagos son muy semejantes entre sí, como se muestra en las figuras 1b y 1d. Se distinguen y muy escasamente, en la morfología de las placas líticas que originan sobre la estirpe Rm2 y en el espectro de activi-

dad. Una característica notable de todos ellos es que, pese a ser moderados, ya que producen placas líticas turbias, no establecen asociación lisogénica con las estirpes sensibles a su ataque.

Grupo 2.

Bacteriófagos moderados, con nucleocápsida de simetría compleja, no activos frente a la estirpe lisogénica Rm2-(AL1).

AL1, SF2, f2D y AT1.

Al microscopio electrónico son indistinguibles entre sí (figuras 1a, f, g y 2e), pero se diferencian bien de los que integran el grupo 1, tanto por la morfología de la nucleocápsida, como por su capacidad para establecer asociación lisogénica con la estirpe Rm2.

Por otra parte, es posible distinguir entre estos 4 fagos por la morfología de las placas líticas y por el espectro de actividad. En relación con este carácter, es interesante hacer notar que tanto AL1 como f2D son capaces de atacar a la estirpe Rm2(SF2), mientras que AT1 y el propio SF2 no pueden hacer lo mismo con la estirpe Rm2(AL1) ni con la citada Rm2(SF2). Esta circunstancia podría indicar que AT1 y SF2 son efectivamente, dos bacteriófagos muy relacionados, mientras que AL1 sería un mutante "vir" de uno de ellos, menos eficaz en el establecimiento de la asociación lisogénica y capaz, por tanto, de lisar a la estirpe Rm2(SF2).



- Figura 1. a. Bacteriófago f2D, del grupo 2, teñido con AU. Aproximadamente x220.000.
- b. Bacteriófago f47, del grupo 1, teñido con PTK. Aumentos aproximados, 200.000.
- c. Bacteriófago LOO, del grupo 3, teñido negativamente con PTK. Aproximadamente x225.000.
- d. Bacteriófago VBP, del grupo 1, teñido con PTK. Aumentos aproximados, 95.000.
- e. Bacteriófago FAR, del grupo 5. Tinción negativa con PTK. Aproximadamente x230.000.
- f. Bacteriófago AL1, del grupo 2. Tinción negativa con PTK. Aproximadamente x220.000.
- g. Bacteriófago SF2, del grupo 2. Tinción negativa con PTK. Aproximadamente x106.000.
- h. Bacteriófago FAR, del grupo 5. Tinción negativa con PTK. Aumentos aproximados, 154.000.

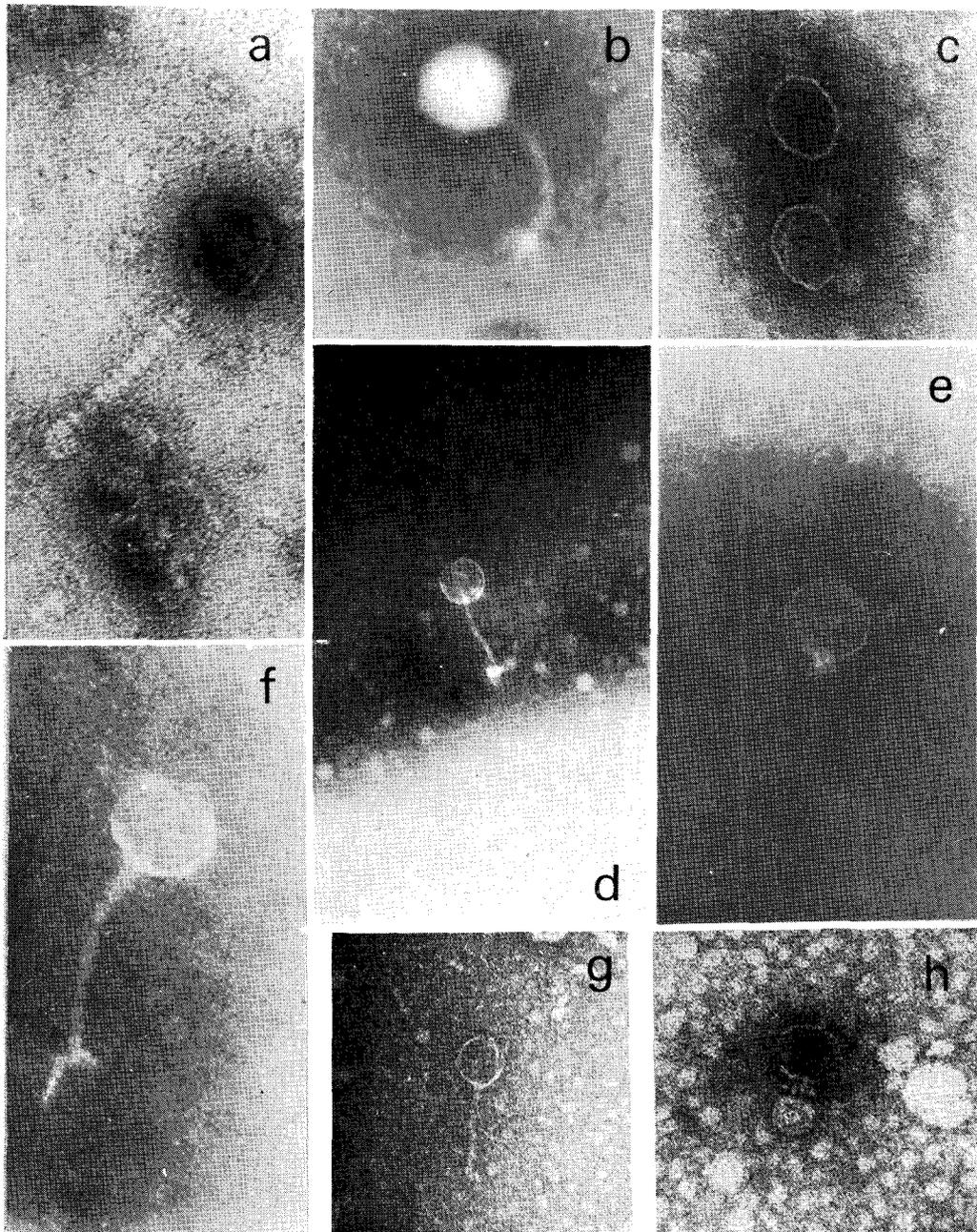


Figura 1.



Tabla 2. Nomenclatura, procedencia y características de los fagos de R. meliloti, aislados en el transcurso del presente trabajo

Nombre	Origen	Carácter	Simetría	Espectro de actividad											
				Rm2	Rm2(ALI)	Rm2(SF2)	2D5	2DA	402	4c	sp5	v5	v26	v47	hv213
VBP	Vega (Granada)	M	Compleja	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	
LOO	Loja (Granada)	V	Isométrica	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	
DF2	Deifontes (Granada)	V	Compleja	+	+	+	±	-	+	+	-	-	-	+	
AL1	Albaicín (Granada)	M	Compleja	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	±	
SF2	Santafé (Granada)	M	Compleja	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	
FAR	Domingo Pérez (Granada)	V	Compleja	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	
f2D	AL1, activo frente a la estirpe 2DA.	M	Compleja	+	-	+	+	-	+	-	+	±	±	±	
f47	Asociado a la estirpe v47.	M	Compleja	+	+	+	-	-	±	-	+	-	-	-	
fhv	Asociado a la estirpe hv213.	M	Compleja	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	
fc1	Asociado a la estirpe cl.	V	Isométrica	+	+	+	+	-	+	-	+	-	±	+	
ATI	Atarfe (Granada)	M	Compleja	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	±	
san	Requejada (Santander)	M	Compleja	+	+	+	±	-	±	-	+	-	-	-	
cab	Cabra (Córdoba)	M	Compleja	+	+	+	+	-	±	-	+	-	-	-	

M= Moderado; placas líticas turbias sobre la estirpe Rm2 // += lisis // - = resistencia // ± = El ensayo dió resultados variables, según los casos.

V= Virulento; placas líticas claras sobre la estirpe Rm2.

Grupo 3.

Bacteriófagos virulentos, de nucleocápsida isométrica, activos frente a la estirpe v26.

L00 y fc1.

La única diferencia entre ambos es que L00 ataca normalmente a la estirpe v26, mientras que fc1, que se aisló como contaminante de la estirpe c1, muestra un comportamiento variable frente a la citada v26. Por lo demás, al microscopio electrónico son indistinguibles (ver figuras 1c y 2b).

Grupo 4.

Bacteriófagos virulentos, con nucleocápsida de simetría compleja, capaces de lisar a las estirpes 4c y hv21 .

DF2.

Este bacteriófago, de morfología poco frecuente (figuras 2a, 2c y 2d), posee un espectro de actividad muy notable, ya que, como se verá en los apartados siguientes, son muchas -- las estirpes sensibles exclusivamente a su ataque. Recientemente, se ha encontrado que es también activo frente a una estirpe de R. meliloti (UR1, no incluida en esta memoria) procedente de Uruguay.

Grupo 5.

Bacteriófagos virulentos, con cápsida isométrica y cola rudimentaria, probablemente contráctil.

FAR.

Este bacteriófago es destacable, al igual que DF2 por la morfología de su nucleocápsida (figuras 1e y 1h). No se distingue particularmente por su espectro de actividad, si bien, en lo que se refiere a las placas líticas que origina sobre Rm2, es típico que deje tras su ataque un gran número de estirpes resistentes (figura 9a), lo cual lo distingue de los otros fagos virulentos.

Grupo 6.

Bacteriófagos moderados, con nucleocápsida de simetría compleja y espectro de actividad muy restringido.

fhv.

Al microscopio electrónico, éste bacteriófago - presenta una morfología muy similar a la de los componentes del grupo 1. Tanto su detección como su mantenimiento en el laboratorio, constituyen un verdadero problema, debido a que origina - placas líticas apenas aparentes y a que se multiplica muy escasamente sobre la misma estirpe a la que se le encontró asociado, - hv21 , y sólo en algunos casos sobre Rm2.

1.4. Bacteriófagos termosensibles.

Como se indicó en el capítulo de Material y Métodos, en los distintos ensayos de aislamiento de bacteriófagos se inocularon dos series de placas, una de las cuales se incubó a - 28°C y la otra a 20°C, para permitir el desarrollo de los posibles viriones incapaces de multiplicarse a 28°C.

- Figura 2. a. Bacteriófago DF2, adsorbido sobre la superficie de una célula bacteriana. Tinción negativa con PTK. Aumentos aproximados, 50.000.
- b. Bacteriófago fc1, del grupo 3, adsorbido sobre la superficie de una célula. Tinción negativa con PTK. Aproximadamente x160.000.
- c. Bacteriófago DF2, del grupo 4, teñido negativamente con PTK y aumentado 200.000 veces, aproximadamente.
- d. Bacteriófago DF2, teñido negativamente con OxU y aumentado 215.000 veces, aproximadamente.
- e. Bacteriófago AL1, del grupo 2, teñido negativamente con OxU. Aproximadamente x215.000.

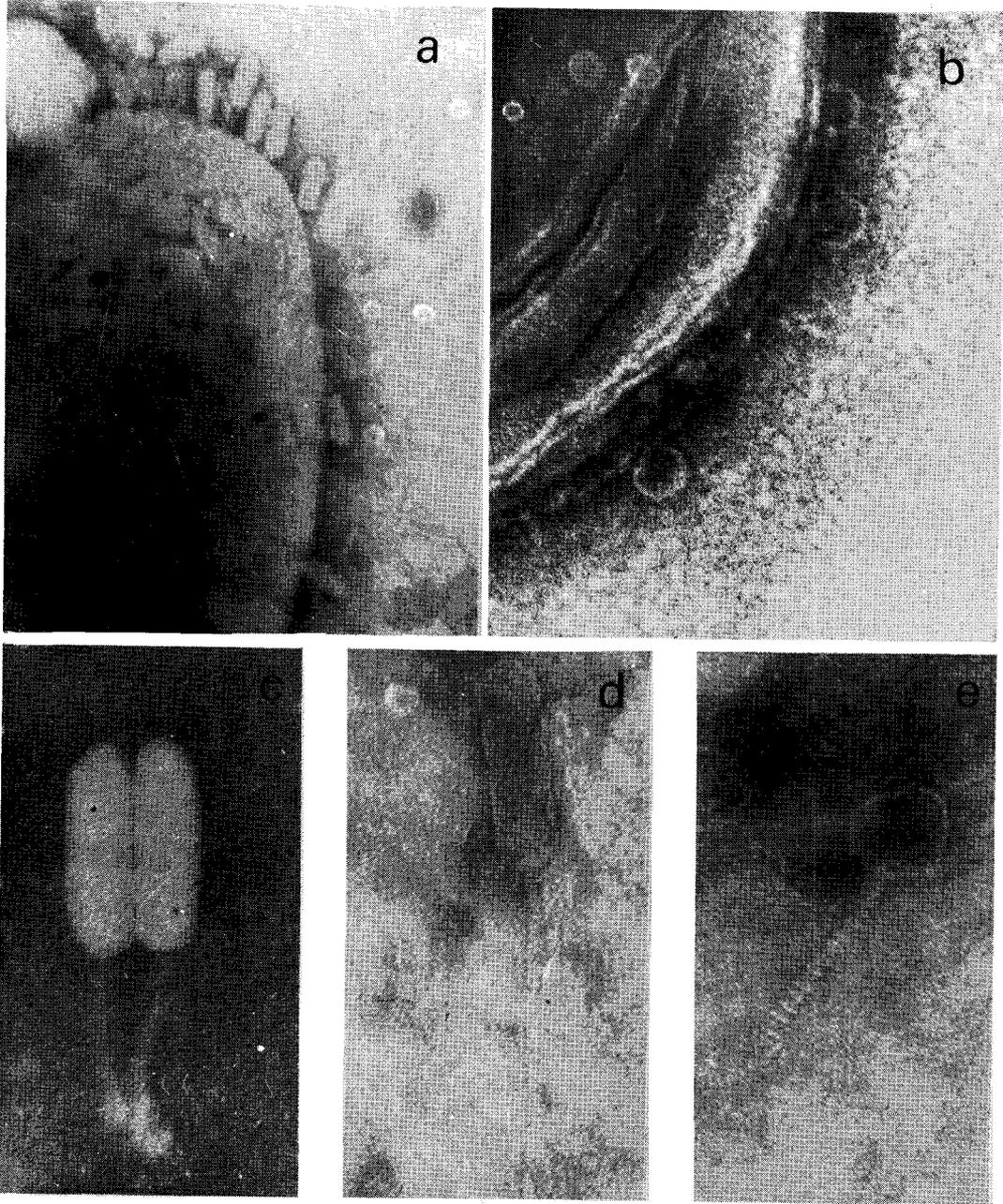


Figura 2.

Tabla 3.- Número de placas líticas formadas por la muestra de -
suelo de Iznalloz, sobre la estirpe Rm2, tras incubar
a 28 y 20°C.

Diluciones Temperatura	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
28°C	12	102	728
20°C	35	368	-

Este ensayo se realizó tras enriquecer la sus-
pensión de suelo frente a un cultivo de Rm2, incubando natural-
mente, a 28 y 20°C.

Tabla 4. Número de placas líticas formadas por la muestra de -
suelo de Domingo Pérez, sobre la estirpe Rm2, tras in-
cubar a 28 y 20°C.

Diluciones Temperatura	10^0	10^{-1}
28°C	16	1
20°C	37	2

Al contrario que en el caso anterior, se utilizó
directamente la suspensión del suelo, una vez centrifugada.

Los resultados obtenidos con las muestras de Domingo Pérez e Iznalloz, parecían indicar la existencia de fagos termosensibles en número bastante alto (tablas 3 y 4); sin embargo, se comprobó posteriormente que la mayoría de los fagos que sólo habían originado placas líticas a 20°C eran también capaces de multiplicarse a 28°C, aunque más lentamente, es decir, sólo formaban placas líticas a partir de las 72 horas de incubación, mientras que el tiempo normal para los demás bacteriófagos era de 24 a 36 horas.

Sólo se aisló un bacteriófago que con seguridad era incapaz de multiplicarse a 28°C, a partir de las muestras de suelo de Iznalloz, al que se llamó Iz1. Este fago originó placas líticas turbias sobre la estirpe Rm2 y mostró poseer un espectro de actividad semejante al de los fagos del grupo 2, descritos en el apartado anterior.

Este único resultado positivo, que ponía en evidencia la escasez relativa de fagos termosensibles en el suelo, unido a que los procesos de purificación y mantenimiento de estos bacteriófagos son considerablemente lentos, hizo que no se insistiera más en su aislamiento, así como tampoco se prosiguió con la caracterización del fago Iz1.

1.5. Selección de bacteriófagos para las experiencias de fagotipado.

La manipulación de los bacteriófagos supone una

serie de problemas difíciles de soslayar en el orden práctico, debido a la aparente facilidad con que se contaminan las suspensiones, bien con bacterias, bien con otros bacteriófagos. La primera cuestión se soluciona bastante bien añadiendo unas gotas de cloroformo a las suspensiones. La segunda forma de contaminación es más difícil de evitar sobre todo si, como en este caso, se han manipulado varios fagos distintos al mismo tiempo. Es muy probable que la contaminación de unos fagos con otros se produzca a favor de superficies húmedas, cuya creación es inevitable ya que la mayoría de los ensayos se realizan con el material sumergido en el baño a 45°C.

Por otra parte, algunos bacteriófagos son muy sensibles a la acción de ciertos agentes, como el cloroformo, o al desarrollo de ciertas condiciones, como la espuma que se forma en los cultivos en agitación, etc.

En consecuencia, se procedió a seleccionar entre los que se han expuesto anteriormente, una serie de bacteriófagos que presentaran el mínimo de inconvenientes a la hora de ser utilizados en el fagotipado de las estirpes de Rhizobium aisladas de nódulos radicales o de muestras de suelo rizosférico.

El criterio fundamental que se siguió fue el que en todo momento se pudiese controlar la pureza de las distintas suspensiones, es decir, que las características morfológicas y de comportamiento de los bacteriófagos seleccionados fuesen lo más distintas posible. Por lo demás, se eligió un número que no planteara excesivos problemas para su manipulación.

El resultado fué la elección de los seis fagos siguientes: VBP, LOO, DF2, AL1, SF2 y FAR, cuyas características se han expuesto en apartados anteriores.

Estos bacteriófagos se distinguen bastante bien por sus placas líticas, como se muestra en la figura 9a, con excepción de los virulentos LOO, DF2 y FAR. No obstante, ya se apuntó que FAR produce una placa lítica ligeramente turbia debido al crecimiento de células que no ha sido lisadas, y que, por otra parte, DF2 origina placas líticas de borde nítido pero ligeramente excéntricas, lo cual hace que se le distinga fácilmente de los otros dos. Además de éstas diferencias en los caracteres de las placas líticas y de las que se expusieron en el apartado 1.3., se han obtenido evidencias de que éstos tres fagos se adsorben sobre distintos receptores de la superficie celular, hecho que viene apoyado por la circunstancia de que el suero anti DF2 no es capaz de neutralizar a LOO y FAR.

En lo que se refiere a los fagos moderados, -- VBP, AL1, y SF2, no existe dificultad alguna en distinguirlos entre sí, ni tampoco, naturalmente, de los virulentos. No obstante, ya se indicó anteriormente que AL1 y SF2 son dos bacteriófagos estrechamente emparentados en cuanto a morfología y espectro de actividad y que, probablemente, AL1 es un mutante "vir" de SF2 o de AT1.

Finalmente, quedaba por dilucidar, en relación con estos seis bacteriófagos, la cuestión de la especificidad, es decir, había que comprobar si alguno de ellos era capaz de lisar

a otras estirpes de Rhizobium. Según la bibliografía consultada, -
son excepcionales los casos de fagos de R. meliloti activos fren-
te a otras especies del género, no obstante lo cual, se realizaron
los ensayos oportunos frente a una colección de 10 estirpes de -
R. trifolii y R. leguminosarum, aisladas de nódulos radicales de -
Trifolium repens y Vicia faba, respectivamente, con el resultado
de que ninguno de los seis bacteriófagos que se habían selecciona-
do tuvo actividad frente a las citadas estirpes, por lo que debe -
descartarse, en principio, el que en las experiencias de fagotipa-
do que se exponen más adelante, se hayan clasificado como R. meli-
loti estirpes que pertenecen a alguna de las otras dos especies.

2. FAGOTIPADO DE ESTIRPES DE R.meliloti.

El objeto de estas experiencias fue investigar - el fagotipo frente a los seis bacteriófagos seleccionados de estirpes silvestres de R.meliloti aisladas de suelos y nódulos radicales a fin de determinar de una parte, si el fagotipado puede sustituir a la técnica de inoculación a la hora de identificar una estirpe como R.meliloti y, de otra, determinar si las estirpes aisladas de diferentes hospedadores vegetales del grupo de inoculación de R.meliloti presentan patrones distintos de resistencia y sensibilidad a los citados fagos.

Como paso previo fue necesario el aislamiento - de estirpes silvestres de R. meliloti, que se llevó a cabo en principio a partir de suelos y posterior y mayoritariamente a partir - de nódulos radicales.

2.1. Aislamiento y fagotipado de estirpes silvestres presentes en suelos rizosféricos.

La falta de un medio totalmente selectivo para las especies del género Rhizobium dificulta su aislamiento a partir del suelo, en el que coexisten numerosas bacterias que compiten ventajosamente con Rhizobium sp. en los medios de cultivo apropiados para éste.

El método que se ha seguido y que se describió en el capítulo de Material y Métodos, ofrece la ventaja de una pre-

selección basada en caracteres morfológicos y al mismo tiempo, el inconveniente de la subjetividad en la apreciación de dichos caracteres.

Se ha efectuado un sólo aislamiento en el que se seleccionaron en primera instancia 126 colonias que presentaban aspecto mucoso y color similares a los de las estirpes de R. meliloti de la colección de laboratorio.

Las colonias aisladas se volvieron a diseminar en placas de medio 79CV, pasando a continuación a preparar extensiones que se observaron al microscopio, bajo el objetivo de 40x, utilizando como control, extensiones de las estirpes Rm2 y 4c.

Se desecharon 90 clones y los 36 restantes se ensayaron frente a los seis bacteriófagos seleccionados según la técnica habitual, con resultado negativo, es decir, ninguna de las estirpes mostró ser sensible a alguno de los bacteriófagos. En consecuencia, se realizó un ensayo de infectividad frente a plántulas de alfalfa, en el que se obtuvo, que sólo 5 estirpes fueron capaces de formar nódulos.

Los resultados obtenidos son, sin duda alguna, muy pobres. La preselección basada en la morfología colonial o de las suspensiones bacterianas al microscopio, no es, obviamente, muy exacta, debido a la existencia de otras especies bacterianas, como Pseudomonas sp. o Agrobacterium sp., y sobre todo Rhizobium sp. que presentan caracteres semejantes a R. meliloti. Por otra parte, existen otros dos factores más a considerar: la proba

ble existencia de estirpes no infectivas, y, como se verá a continuación, la abundancia relativa de estirpes resistentes al ataque de la mayoría de los bacteriaófagos específicos.

Bajo estos condicionamientos, difíciles de superar en la práctica, se decidió no proseguir con el aislamiento de estirpes de R. meliloti a partir de muestras de suelo rizosférico.

2.2. Aislamiento a partir de los nódulos.

El aislamiento a partir de nódulos radicales de Medicago sativa, no ofrece ninguna dificultad, ya que esta especie se cultiva ampliamente como forraje para ganados. En cambio, el aislamiento a partir de nódulos de Melilotus sp. y Trigonella sp., ha supuesto, en primer lugar, el tener que localizar las zonas en las que se dan ambos géneros y, en segundo lugar, su identificación positiva. Ambos problemas se han resuelto a satisfacción, gracias a la ayuda del Dpto. de Botánica de esta Facultad.

Se han aislado un total de 271 estirpes, a partir de nódulos radicales de varias especies de los tres géneros mencionados más arriba, que se relacionan, junto con su fagotipo en las tablas 5 a 9; como puede apreciarse, el número de estirpes obtenidas de nódulos de Medicago sp., es mayor que el de las estirpes de Melilotus sp. o Trigonella sp., debido a la circunstancia antes aludida, de la mayor disponibilidad de los cultivos de alfalfa, frente a la escasez relativa de especímenes de los otros

dos.

Por último, el nombre con que se ha designado a las estirpes de cada aislamiento, hace referencia a la procedencia geográfica, -Rmc, es R.meliloti de Cabra (Córdoba), - o al hospedador, -Rmg, es R.meliloti de Trigonella glauca, - de donde se aislaron las estirpes en cuestión.

2.3. Fagotipado.

Se ha utilizado la técnica de la capa de agar - sobre la que se depositan gotas de las suspensiones de los distintos bacteriófagos, tal como se describió en el capítulo de Material y Métodos.

En cuanto a la lectura de los resultados, se ha considerado como carácter sensible de una estirpe para un fago - determinado, la aparición de una zona o halo de lisis en el lugar en el que se depositó la gota, independientemente de que tal zona de lisis apareciese más o menos clara o turbia. El carácter resistente se ha considerado como la ausencia total de síntomas de lisis. Ambos caracteres se notan con los signos + y -, respectivamente.

Por último, en todos los ensayos de actividad - de los fagos frente a las distintas estirpes se prepararon placas de la estirpe Rm2, como control de la pureza y título suficiente - de las suspensiones de los seis bacteriófagos.

Tabla 5. Fagotipo de estirpes de R.meliloti aisladas de nódulos radicales de Medicago sativa, procedentes de un cultivo de alfalfa en La Zubia (Granada).

Estirpe	Fagotipo					
	VBP	LOO	DF2	AL1	SF2	FAR
Rmv1-v3	+	+	+	+	+	+
Rmv4	-	+	+	+	+	+
Rmv5-v8	-	-	-	-	-	-
Rmv9-v16	+	+	+	+	+	+
Rmv17	-	+	-	+	-	+
Rmv18	+	+	+	+	+	+
Rmv19	-	+	-	-	-	-
Rmv20	+	+	+	+	+	+
Rmv21 y v22	No crecen					
Rmv23	-	-	-	-	-	-
Rmv24	+	+	+	+	+	+
Rmv25	-	+	+	+	+	+
Rmv26	-	+	-	-	-	-
Rmv27 y v28	-	-	-	-	-	-
Rmv29-v36	+	+	+	+	+	+
Rmv37	No crecen					
Rmv38 y v39	-	-	-	-	-	-
Rmv40 y v41	+	+	+	-	-	-
Rmv42	-	+	+	+	+	+
Rmv43	+	+	+	+	+	+
Rmv44	-	+	+	+	+	+

+ : Sensible, halo de lisis normal.

- : Resistencia.

± : Se comporta de forma variable, según los ensayos.

p : Aparecen unas cuantas placas de lisis sueltas.

Continúa tabla 5.

Estirpe	Fagotipo					
	VBP	LOO	DF2	AL1	SF2	FAR
Rmv45 y v46	No crecen					
Rmv47	-	+	+	±	-	+
Rmv48-v53	+	+	+	+	+	+
Rmv54	-	-	-	-	-	-
Rmv55	+	+	+	+	+	+
Rmv56	+	+	+	-	-	-
Rmv57 y v58	+	+	+	+	+	+
Rmv59	-	+	+	+	+	+
Rmv60	-	-	-	-	-	-
Rmv61-v63	+	+	+	+	+	+
Rmv64	-	-	-	-	-	-
Rmv65	+	+	+	+	+	+
Rmv66 y v67	-	-	-	-	-	-
Rmv68	-	+	-	-	-	p
Rmv69	-	+	-	-	-	-
Rmv70 y v71	+	+	+	+	+	+
Rmv72	-	-	-	-	-	-
Rmv73	+	+	+	+	+	+
Rmv74	-	+	+	+	+	+
Rmv75	-	+	+	+	-	-

+ : Sensible, halo de lisis normal.

- : Resistencia.

± : Se comporta de forma variable, según los ensayos.

p: Aparecen unas cuantas placas de lisis sueltas.



Tabla 6. Fagotipo de estirpes de R. meliloti, aisladas de nódulos -
radicales de Medicago sativa, procedentes de un cultivo -
de alfalfa en la Huerta de San Vicente (Granada).

Estirpe	Fagotipo					
	VBP	LOO	DF2	AL1	SF2	FAR
Rmhv1-hv8	+	+	+	+	+	+
Rmhv9-hv16	-	-	+	-	-	-
Rmhv17-hv20	+	+	+	+	+	+
Rmhv21	-	-	+	-	-	-
Rmhv22-hv32	+	+	+	+	+	+

+ : Sensible, halo de lisis normal.

- : Resistencia.

Tabla 7. Fagotipo de estirpes de R. meliloti, aisladas de nódulos -
radicales de Medicago lupulina, procedente de Atarfe -
(Granada).

Estirpe	Fagotipo					
	VBP	LOO	DF2	AL1	SF2	FAR
Rml1 y 12	-	-	+	-	-	-
Rml3-16	+	+	+	+	+	+
Rml7-19	-	-	+	-	-	-
Rml10	-	+	-	-	-	-
Rml11	-	-	+	-	-	-
Rml12	-	+	-	-	-	-
Rml13	+	+	+	-	-	-
Rml14	-	-	+	-	-	-
Rml15	+	+	+	+	+	+
Rml16-118	-	-	+	-	-	-

+ : Sensible, halo de lisis normal

- : Resistencia.

Tabla 8. Fagotipo de estirpes de R.meliloti, aisladas de nódulos -
radicales de Trigonella glauca, recolectada en la zona -
del Puerto de la Mora (Granada).

Estirpe	Fagotipo					
	VBP	LOO	DF2	AL1	SF2	FAR
Rmg1	-	-	-	-	-	-
Rmg2	-	-	+	-	-	-
Rmg3-g13	-	-	-	-	-	-
Rmg14-g17	-	-	+	-	-	-
Rmg18-g20	-	-	-	-	-	-
Rmg21-g23	-	-	+	-	-	-
Rmg24	-	-	-	-	-	-
Rmg25-g27	-	-	+	-	-	-
Rmg29 y g29	-	-	-	-	-	-
Rmg30-g32	-	-	+	-	-	-
Rmg33 y g34	-	-	-	-	-	-
Rmg35-g40	-	-	+	-	-	-
Rmg41-g52	-	-	-	-	-	-

+ : Sensible , halo de lisis normal.

- : Resistencia.

Tabla 9. Fagotipo de estirpes de R. meliloti aisladas de nódulos radicales de Melilotus parviflorus, recolectado en la zona de Cabra (Córdoba).

Estirpes	Fagotipo					
	VBP	LO0	DF2	AL1	SF2	FAR
Rmc1-c16	-	-	-	-	-	-
Rmc17	-	+	+	+	+	+
Rmc18-c20	+	+	+	-	-	-
Rmc21 y c22	-	+	-	-	-	-
Rmc23 y c24	-	-	+	-	-	-
Rmc25	+	+	-	+	-	-
Rmc26-c29	+	+	+	+	+	+
Rmc30 y c31	-	-	+	-	-	-
Rmc32	+	+	+	+	+	+
Rmc33-c64	-	-	+	-	-	-
Rmc65-c77	-	-	-	-	-	-
Rmc78 y c79	-	-	+	-	-	-
Rmc80	-	-	-	-	-	-
Rmc81-c83	-	-	+	-	-	-
Rmc84 y c85	-	-	-	-	-	-
Rmc86	-	-	+	-	-	-
Rmc87	-	-	-	-	-	-
Rmc88-c92	+	+	+	+	+	+
Rmc93 y c94	-	-	+	-	-	-

+ : Sensible, halo de lisis normal

- : Resistencia.

2.4. Clasificación de las estirpes de R. meliloti, según su fagotipo.

Resulta evidente que una primera clasificación puede establecerse en base al carácter sensible o resistente a la totalidad de los fagos utilizados:

- 1) Sensibles a todos los fagos Fs.
- 2) Resistentes a todos los fagos Fr.
- 3) Parcialmente sensibles ó resistentes..... Fa (Fagotipo alterado).

El tercer grupo es bastante heterogéneo, si bien se encuentra que son muy abundantes las estirpes que se comportan como sensibles exclusivamente al fago DF2. En base a este hecho, se ha establecido una subdivisión dentro del grupo Fa, separando los subgrupos DF2s y Fa "sensu stricto".

Si se considera la frecuencia absoluta de cualquiera de los grupos anteriores, no se encuentran diferencias notables entre ellos, a excepción del subgrupo Fa, que queda en franca minoría, como se desprende los datos expuestos en la tabla 10.

Por el contrario, la distribución de los distintos fagotipos atendiendo a los hospedadores de procedencia, que se expone en la tabla 11, indica que las estirpes Fs son más propias de Medicago sp., mientras que los fagotipos Fr y DF2s, caracterizan a las estirpes aisladas de nódulos de Trigonella glauca y Melilotus parviflorus.

Tabla 10. Frecuencias absolutas de los distintos grupos y subgrupos de estirpes, establecidos según el fagotipo.

Grupo	Frecuencia (%)
Fs	28'78
Fr	29'52
Fa	9'22
DF2s	30'62
No crecen	1'84

Tabla 11. Distribución de los distintos fagotipos, según el hospedador vegetal del que se hayan efectuado los aislamientos.

Hospedador	Aislamiento	%Fs	%Fr	%Fa	%DF2s	%No crecen
<u>Medicago</u> sp.	Rmv					
	+ Rmhv	53'6	12'0	15'2	15'2	4'0
	+ Rml					
<u>Melilotus</u> sp.	Rmc	11'7	35'1	6'3	46'8	0'0
<u>Trigonella</u> sp.	Rmg	0'0	61'5	0'0	38'4	0'0

En relación con las estirpes procedentes de nódulos de *Medicago* sp., merecen una explicación aparte aquellas que aparecen en las tablas bajo el encabezamiento "No crecen". Se observó que estas estirpes, que mostraban un crecimiento aparentemente normal en las placas de medio 79CV y en las de medio Th, se lisaban al ser inoculadas en medio Vincent para el ensayo frente a los bacteriófagos. Se sospechó que éste comportamiento podría deberse a un fenómeno de inducción por choque térmico, caso que las estirpes en cuestión fuesen lisogénicas, o bien, a una contaminación con fagos durante la fase de aislamiento, por lo que se procedió a recoger la capa de medio semiblando en unos ml. de caldo B y, tras centrifugar y diluir el sobrenadante obtenido, ensayar sobre la estirpe Rm2, en placa, según la técnica habitual.

En todos los casos aparecieron placas líticas, lo que demostraba la existencia de fagos asociados a las estirpes que se habían lisado. Teniendo en cuenta que tales placas líticas eran claras, se estimó como más probable el que la lisis fue debida a una contaminación y no a la inducción del estado lisogénico.

Por último, para resumir los resultados que se han expuesto en este apartado, hay que destacar la abundancia de estirpes Fr en los nódulos, que llegan a constituir casi 1/3 del total de la muestra examinada. Esta circunstancia limita grandemente el uso del fagotipado para la identificación de estirpes de R. meliloti.

De otra parte, tampoco es posible decidir mediante esta técnica si una determinada estirpe procede de uno u otro hospedador vegetal, puesto que los resultados obtenidos muestran únicamente diferencias de tipo cuantitativo en relación con el fagotipado.

2.5. Fagotipado de las estirpes de la colección del laboratorio. El fenotipo M⁻ (Multiplicación menos).

Como se indicó en el capítulo de Material y Métodos, al inicio de este trabajo se dispuso de una colección de estirpes de R. meliloti, cedida por el Dpto. de Microbiología de la Estación Experimental del Zaidín.

Dichas estirpes proceden de nódulos radicales de Medicago sativa, pero teniendo en cuenta que su aislamiento se remonta ya a varios años y que algunas de ellas se obtuvieron mediante diversos tratamientos, a partir de las primitivas estirpes silvestres, se ha preferido exponer su fagotipo en una tabla aparte (tabla 12), en la que se han incluido además las estirpes Rm2 (AL1) y Rm2(SF2), obtenidas a partir de la estirpe Rm2 por lisogenización con los fagos AL1 y SF2, respectivamente.

En relación con las estirpes 4c y 11c, obtenidas a partir de las silvestres 402 y Rm11 por tratamientos con Naranja de Acridina (NA), se observó que el fago DF2 podía provocar, según los ensayos, la aparición de halos de lisis muy claros o muy turbios, hecho que se observó también para la estir---

Tabla 12. Fagotipo de las estirpes de R. meliloti de la colección de laboratorio.

Estirpe	Fagotipo					
	VBP	LOO	DF2	AL1	SF2	FAR
Rm2	+	+	+	+	+	+
203	+	+	+	+	+	+
Rm2(AL1)	+	+	+	-	-	+
Rm2(SF2)	+	+	+	+	-	+
402	+	+	+	+	+	+
4c	-	-	+	-	-	-
Rm11	+	+	+	+	+	+
11c	-	-	+	-	-	-
Rm7	-	+	+	+	+	+
Rm8	-	+	+	+	+	+
sp57	+	+	-	+	+	+

+ :Lisis

- : Resistencia

pe 402 y los fagos VBP, LOO, AL1, SF2 y FAR (o sea todos menos DF2). Esta particularidad se estudió con la estirpe 4c y el fago DF2, siendo aplicables los resultados obtenidos a los demás ejemplos de estirpes y fagos.

En los ensayos en placa de medio Vincent, las suspensiones de DF2 con un título igual o superior a 10^8 fagos/ml. originan halos de lisis de una nitidez comparable a la que aparece sobre Rm2, si bien al prolongar la incubación, aparece una turbidez mucho más densa, debida al crecimiento masivo de células que no han resultado lisadas.

Cuando se diluye progresivamente la suspensión del fago y se ensayan sobre 4c las distintas diluciones, se observa una pérdida progresiva de la nitidez del halo, que desaparece finalmente sin resolverse en placas líticas separadas.

En los ensayos en caldo, la inoculación del fago a una multiplicidad de infección (m.d.i.) fago/bacteria, aproximada de 10, provoca el aclaramiento casi completo del cultivo, pero si a continuación se obtiene el sobrenadante de éstos cultivos y se diluye, ensayando sobre Rm2 para contar el número de fagos activos, se obtiene que éste es, en promedio, un orden de magnitud inferior al que se inoculó. La repetición del proceso con éste sobrenadante resulta en un aclaramiento menor del cultivo inoculado con él, y, como antes, el nuevo sobrenadante contiene un número de partículas inferior en un orden de magnitud, al precedente.

De acuerdo con éstos resultados, la estirpe 4c, es efectivamente sensible al fago DF2, pero no es capaz de multi-

plicarlo, pues como se ha visto, lo que se obtiene es una pérdida gradual del bacteriófago en los cultivos de la citada estirpe 4c. A este comportamiento se le ha llamado M⁻, habiéndose comprobado que es propio también de las estirpes 402 y 11c, así como de otras que se describirán en los apartados siguientes.



3. ESTUDIOS EN EL LABORATORIO SOBRE EL ORIGEN DE LOS DISTINTOS FAGOTIPOS.

Los resultados obtenidos en el fagotipado de las nuevas estirpes ponen de manifiesto la gran variabilidad en la respuesta a los seis fagos y la abundancia relativa de estirpes total y parcialmente resistentes. Este hecho, que se conoce desde antiguo, se ha explicado fundamentalmente en base a la aparición de mutaciones al azar que serían rápidamente seleccionadas en presencia de los fagos apropiados. Posteriormente, algunos autores han afirmado que hasta un 70% de las estirpes de R. meliloti procedentes de los nódulos o del suelo rizosférico se encuentran lisogenizadas, por lo que la tendencia actual es admitir que la variabilidad en el fagotipo antes citada es consecuencia de la mutación y/o lisogenización de una alta proporción de las poblaciones de esta especie en su hábitat natural.

El objetivo de las experiencias que se exponen en los apartados siguientes ha sido investigar la posibilidad de la mutación y la asociación de tipo lisogénico oseudolisogénico como base para explicar la diversidad de fagotipos encontrados entre las poblaciones silvestres de R. meliloti.

En lo que se refiere a la mutación se ha estudiado la aparición de fagotipos resistentes mediante mutagénesis - con nitrosoguanidina (NTG) y mediante selección de mutantes espontáneas en presencia de bacteriófagos virulentos.

Por otro lado, la existencia de asociaciones fa-

go-bacteria se ha investigado estudiando la aparición de estirpes lisogenizadas o pseudolisogenizadas, tras el ataque de los bacteriófagos moderados a estirpes sensibles, así como investigando el comportamiento de un grupo de estirpes procedentes de los aislamientos que se han descrito en los apartados anteriores o de la colección de laboratorio, en condiciones que favorecen la inducción en bacterias lisogénicas.

3.1. Mutagénesis con nitrosoguanidina (NTG).

Una de las causas que se acepta como explicación de la variedad de fagotipos en las estirpes de R.meliloti es la aparición de mutaciones de resistencia a uno o varios fagos, que, por supuesto, no llevarían consigo la pérdida de las propiedades simbióticas de las estirpes afectadas.

El ensayo con NTG se llevó a cabo partiendo del hecho de que en los aislamientos a partir de los nódulos se había obtenido un número muy alto de estirpes resistentes y de la observación de que los fagos virulentos dejaban un número también muy alto de estirpes resistentes tras su ataque a otras inicialmente sensibles. Ambas cosas hacían pensar en una frecuencia de mutación espontánea muy alta, por lo que el tratamiento con NTG podría aumentar esta frecuencia hasta el extremo de detectar estirpes resistentes sin necesidad de recurrir a un proceso de selección con fagos.

El procedimiento que se describió en el capítulo de Material y Métodos se aplicó a la estirpe Rm2, tras lo cual,

se ensayaron 312 clones frente al fago DF2, con el resultado de - que ninguno de ellos se comportó como resistente al citado DF2. Posteriormente, se ensayaron 50 clones más, frente a los seis fa- gos, según la técnica habitual, sin que pudiera detectarse ningún tipo de alteración en la respuesta a los distintos fagos.

Sin embargo, teniendo en cuenta que el número de clones ensayados fue muy bajo y que no se realizaron ensayos preliminares para optimizar las condiciones del tratamiento mutagénico, el resultado obtenido no permite descartar la mutación como causa de la resistencia.

De cualquier forma, no se realizaron más experiencias de mutagénesis con NTG, ya que el método más adecuado - para la obtención de estirpes resistentes a los fagos parecía ser, como se ha aludido más arriba, la selección de mutantes espontá- neos con los propios fagos.

3.2. Obtención de estirpes resistentes mediante selección con bac- teriófagos.

Ya se expuso en el capítulo de Material y Méto- dos el procedimiento clásico para la obtención de estirpes resisten- tes mediante selección con fagos, así como las ventajas e inconvenientes derivados de la utilización de medios sólidos y líquidos.

Sólo resta añadir, que si se opera en medio - líquido, es necesario inocular el fago a alta multiplicidad, del or- den de 5 a 10 fagos por bacteria, de manera que ya en los prime-

ros momentos la totalidad o la inmensa mayoría de las células resulten infectadas, evitándose el desarrollo de poblaciones que siendo sensibles, se comportan en estos cultivos como resistentes al fago, y que podrían interferir con el aislamiento de las verdaderas estirpes resistentes.

3.2.1 Selección en medios sólidos.

No se ha utilizado normalmente este método para la obtención de resistentes, debido a que el proceso es más lento que en medio líquido. No obstante, los ensayos efectuados tanto en medio de Vincent, según la técnica de la doble capa de agar, y en medio Th en superficie, como los llevados a cabo en caldo 79M, dieron esencialmente los mismos resultados.

Los ensayos en medio Vincent consistieron en preparar placas inoculadas con fago y bacteria según la técnica de la doble capa de agar, de manera que se obtuviese lisis confluyente. A continuación se incubaron las placas a 28°C durante 4 a 6 días que era el tiempo necesario para que apareciesen las colonias originadas por aquellas células que hubiesen resistido el ataque del fago.

En estas experiencias sólo se utilizaron los fagos virulentos, LOO, DF2 y FAR y la estirpe Rm2, obteniéndose en los tres casos un crecimiento masivo debido a las células que no habían sido lisadas, por lo que no pudo averiguarse la frecuencia con que aparecían las supuestas estirpes resistentes.

En ensayos posteriores se aumentó la m.d.i. y se controló el inóculo bacteriano, en lo que se refiere al número de células viables presentes en él. Bajo estas condiciones se pudo estimar, en algunos casos, el número de células que no resultaban lisadas por los fagos, esto es, el número de colonias que crecían en las placas tras el periodo de incubación. Este resultó ser, como mínimo, el 0'1% del total de la población bacteriana presente en el inóculo, porcentaje que resulta a todas luces excesivo para ser atribuido a un fenómeno de mutación espontánea.

A continuación se llevaron a cabo otras experiencias en medio Th, en superficie, con las estirpes sensibles - Rm11 y Rm2 y los bacteriófagos LOO, DF2, AL1 y FAR, consistentes en sembrar, en tubos que contenían este medio solidificado en pico de flauta, suspensiones de la estirpe Rm11 y el fago LOO a una m.d.i. aproximada de 0'001, y de la estirpe Rm2 y los fagos DF2, AL1 y FAR, a la misma m.d.i. final, incubando a continuación a 28°C durante 48 horas.

Pasado este tiempo se guardaron los tubos a 4°C durante 30 días, al cabo de los cuales se resembró en el mismo medio y se incubó nuevamente a 28°C durante 48 horas pero sin añadir nuevos fagos. Además, se tomó una muestra del cultivo de la estirpe Rm2, que se ensayó en placa frente a los seis bacteriófagos para comprobar el fagotipo.

Este proceso de resiembra mensual y muestreo del cultivo de Rm2, se prolongó durante seis meses consecutivos, sin que en ningún momento se observaran síntomas de lisis en el -

Tabla 13. Fagotipo de una población de Rm2 inoculada con los fagos DF2, AL1 y FAR, a lo largo de seis meses de contacto.

Muestreo	VBP	LOO	DF2	AL1	SF2	FAR
1	t	+	+	+	+	+
2	-	+	t	+	t	t
3	-	+	-	t	t	t
4	-	+	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-

t = Halo de lisis muy turbio y difuso.

+ = Sensibilidad, halo de lisis normal.

- = Resistencia.

cultivo. En la tabla 13 se muestra el fagotipo del cultivo de Rm2 en cada uno de los muestreos mensuales, en la que puede observarse que la población bacteriana es completamente resistente a los seis fagos ya en el 5º mes.

Por último, el cultivo de la estirpe Rm11, inoculado con el fago LO0, sólo se muestreó en el 6º mes, resultando ser igualmente resistente a los seis fagos.

Estos resultados ponen de manifiesto la capacidad de los bacteriófagos para seleccionar poblaciones resistentes, destacando sobre todo, el que no hubiera efecto visible sobre el crecimiento de las estirpes y que tanto el fago LO0 como la mezcla de DF2, AL1 y FAR seleccionen poblaciones no sólo resistentes a ellas sino también a los restantes fagos.

3.2.2. Selección en medio líquido. Condiciones generales y curva de crecimiento de la estirpe Rm2.

La interacción en medio líquido ha sido el método que se ha empleado corrientemente, debido a la rapidez con que pueden obtenerse los resultados. El único factor a tener en cuenta en estos ensayos es la m.d.i., como se desprende de una serie de experiencias preliminares, cuyos resultados se exponen seguidamente.

1) Si se inoculan al mismo tiempo fago y bacteria, en caldo 79M, siempre se obtiene lisis exponencial del cultivo, independientemente de la m.d.i., cuando esta varía entre $1/10^4$ y 1.

2) Por el contrario, la inoculación del fago cierto tiempo después del momento de la siembra del inóculo bacteriano, provoca o no la caída de la D.O., en función de la m.d.i. que se alcance.

3) La duración de un ciclo lítico. entendiéndose por tal, el tiempo que transcurre desde el momento de la inoculación del fago hasta que se alcanza el máximo grado de aclaramiento en el cultivo, es función del inóculo bacteriano. Si éste procede de cultivos mantenidos a 4°C, el ciclo se completa en 8 horas, mientras que si procede de cultivos a 28°C, en fase exponencial o estacionaria, el tiempo invertido es de 12 a 14 horas.

A la vista de estos resultados, que ponen de manifiesto la necesidad de controlar, aunque sea aproximadamente, la m.d.i. en los ensayos, se obtuvo la curva de crecimiento de la estirpe Rm2 en las condiciones que se expusieron en el capítulo de Material y Métodos, análogas a las que se iban a dar en los ensayos posteriores.

Así pues, conociendo el título de la suspensión del fago y la D.O. del cultivo bacteriano, pudo estimarse la m.d.i. sin necesidad de tener que tomar muestra para conocer el número de células viables, presentes en el inóculo.

En la tabla 14 se exponen la D.O. y el número de células viables por ml., de un cultivo de la estirpe Rm2 a distintos tiempos de incubación. Basándose en estos datos, en la figura 3 se muestra la correlación existente entre los citados parámetros del cultivo, determinados experimentalmente, así como la recta de regresión teórica calculada en el intervalo 3-12 horas de incubación.

El coeficiente de regresión de la citada recta -
es $r = 0'992$ y su ecuación, $y = 1'687X + 9'330$.

Tabla 14. Relación entre la D.O. y el número de células viables
por ml., en un cultivo de Rm2 en caldo 79M,

Tiempo (horas)	D.O.	Nº células viables/ml.
3	0'01	$1'4 \times 10^6$
4	0'02	$3'2 \times 10^6$
5	0'03	$5'9 \times 10^6$
6	0'09	$2'1 \times 10^7$
7	0'19	$9'0 \times 10^7$
8	0'32	$3'0 \times 10^8$
10	0'58	$1'2 \times 10^9$
11	0'69	$1'5 \times 10^9$
12	0'75	$1'6 \times 10^9$

No se incluye el resultado de las 9 horas debido a
que se realizó una medida poco fiable.

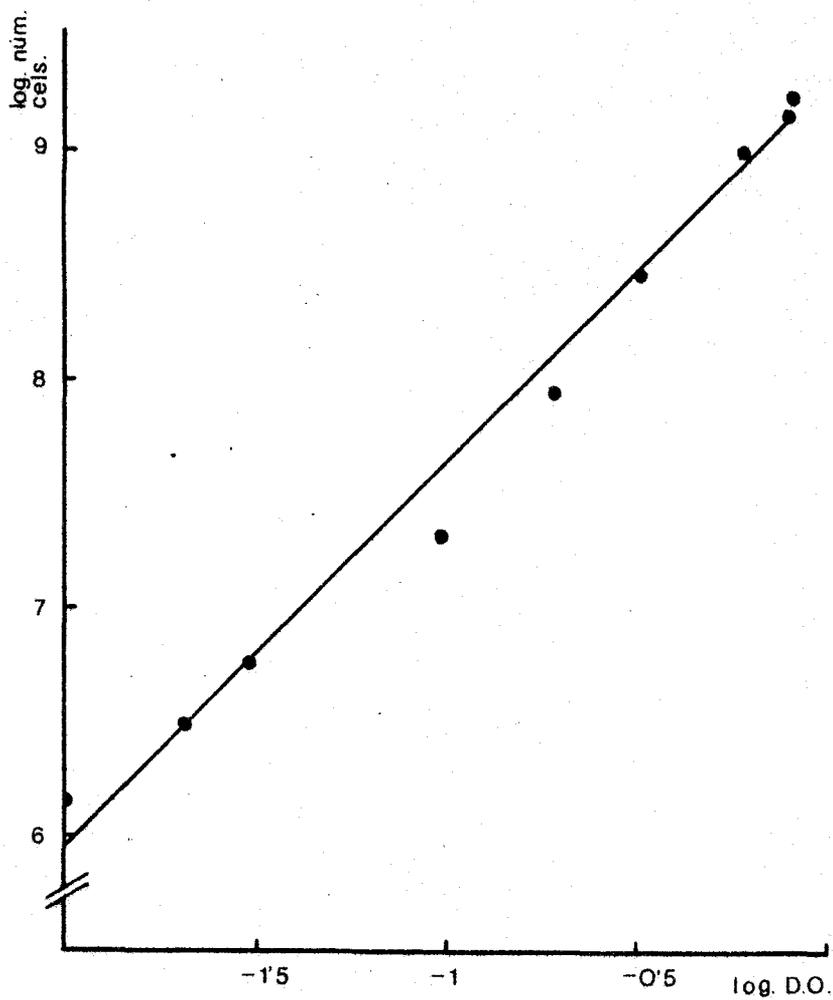


Figura 3. Relación entre D.O. y número de células viables de un cultivo de Rm2, en el intervalo comprendido entre 3 y 12 horas de incubación.

—: Recta de regresión teórica. ●: Puntos experimentales.



3.2.2.1. Selección mediante el empleo de los bacteriófagos virulentos.

La razón por la que sólo se han empleado los bacteriófagos virulentos para la selección de estirpes resistentes es triba en que, como se dijo en el capítulo de Material y Métodos, los fagos moderados pueden establecer asociaciones lisogénicas o pseudolisogénicas con las estirpes sensibles, originando así poblaciones en las que es muy difícil detectar aquellas estirpes que, - por mutación, hayan ganado un fenotipo resistente.

El procedimiento seguido, como se describió en el capítulo de Material y Métodos, consistió en inocular conjuntamente, en caldo 79M, la estirpe Rm2 y cada uno de los fagos virulentos, LOO, DF2 y FAR, incubando a 28°C y en agitación durante 72 horas. Al cabo de este tiempo, se lavaron las células centrifugando y resuspendiendo en caldo B, pasando finalmente a diseminar en placas de medio Th.

Una vez que aparecieron las colonias, se observó que algunas de ellas presentaban una morfología claramente distinta de la usual. Estas colonias, cuyas características se describirán en el apartado 3.3.2., no se tuvieron en cuenta en esta experiencia y solo se aislaron y recrecieron, para ser fagotipadas, - aquellas que mostraron una morfología similar a la de la estirpe original, Rm2.

El resultado obtenido se muestra en la tabla 15, en la que puede apreciarse que todas las estirpes seleccionadas -

fueron del tipo Fr, independientemente del bacteriófago que se hubiera utilizado en la selección. Este hecho pone de manifiesto que, al igual que LOO en el caso de las experiencias en medio sólido, DF2 y FAR originan poblaciones resistentes no sólo a ellos mismos, sino también a los otros bacteriófagos.

Tabla 15. Fagotipo de las estirpes resistentes obtenidas a partir de Rm2, mediante selección con los fagos virulentos - LOO, DF2 y FAR.

Cultivo	Nº de clones ¹	Fagotipo
Rm2/LOO	23	Fr
Rm2/DF2	19	Fr
Rm2/FAR	21	Fr

1 = Se incluye la suma de los resultados obtenidos en 2 ensayos independientes.

3.2.2.2. Selección de estirpes resistentes mediante el fago DF2.

De acuerdo con los resultados que se han expuesto en los apartados anteriores, el comportamiento de las estirpes seleccionadas con fagos virulentos es un tanto extraño y no se ajusta al esperado en las derivadas de mutantes espontáneas.

Se decidió, pues, estudiar con más detalle el proceso de génesis de las citadas estirpes resistentes. Las experiencias se llevaron a cabo con la estirpe Rm2 y el bacteriófago DF2; éste presenta la ventaja sobre LOO y FAR de ser más fácilmente distinguible por su morfología al microscopio electrónico y por los caracteres de sus placas líticas.

Las condiciones generales que se describieron en el capítulo de Material y Métodos para la obtención de estirpes resistentes en medio líquido, se modificaron ligeramente, ya que se inocularon dos cultivos de Rm2 en matraces con 60 ml. de caldo 79M, a uno de los cuales se añadió DF2 para alcanzar una multiplicidad de infección aproximada de 2.

Se tomaron muestras periódicamente de ambos matraces para controlar el número de células viables y, en el caso del cultivo con fago, comprobar cuando empezaban a detectarse las estirpes resistentes.

Una última modificación consistió en que las muestras se trataron con suero anti DF2 en exceso, durante 15 min. a 37°C, antes de diluir y sembrar en placas de medio Th. El objeto de esta modificación fue asegurar la eliminación del fago y evitar por tanto, que éste pueda seguir actuando durante el crecimiento.

to de los distintos clones en medio sólido.

Se realizaron 4 muestreos del matraz que contenía el fago y 4 del cultivo control, a tiempos 4, 8, 24 y 33 horas y 0, 4, 8 y 24 horas, respectivamente.

Una vez crecidas, se tomaron 64 colonias de cada uno de los muestreos efectuados a partir del cultivo inoculado con fago, a excepción del muestreo realizado a las 33 horas, del que sólo se tomaron 48, que se sembraron en tubos del mismo medio. Igualmente se aislaron y recrecieron 112 colonias procedentes del muestreo realizado a las 24 horas a partir del cultivo control; los 112 cultivos obtenidos se ensayaron frente al fago DF2 por la técnica habitual, resultando ser todos ellos sensibles al fago.

En cuanto a los cultivos derivados de cada uno de los muestreos del cultivo inoculado con DF2, se ensayaron frente a los seis fagos para comprobar los cambios que hubiera experimentado el fagotipo.

En la figura 4 se ha representado la evolución del número de células viables en los dos cultivos, inoculado y no inoculado. En la figura 5 se ha representado la evolución del cultivo inoculado con DF2, desglosando dicho cultivo en tres curvas, una que representa el número total de células viables, y otras dos que, respectivamente, indican el número de células sensibles y resistentes a cualquiera de los 6 fagos. Los datos para obtener estas dos últimas curvas se obtuvieron considerando que la composición de las muestras de 64 y 48 colonias reflejan con cierta se-

guridad la composición del cultivo en cada momento, es decir, si la muestra de 24 hr. contenía un 60% de resistentes y un 40% de sensibles, se aceptó el que la composición del cultivo sería aproximadamente la misma.

Finalmente, en las figuras 6, 7 y 8, se ha representado el fagotipo de los clones aislados a partir de cada muestra; cada columna representa el porcentaje de clones con un determinado fagotipo, con respecto al total aislado. No se incluyen los datos correspondientes a la muestra tomada a las 4 hr. de incubación, ya que todos los clones aislados tuvieron un fagotipo Fs.

Los resultados obtenidos parecen indicar que el paso del fagotipo Fs a Fr no se lleva a cabo directamente en un solo paso sino, como parece deducirse de los datos del muestreo efectuado a las 8 hr., previa aparición de fagotipos Fa. Hay que destacar, sin embargo, que a las 24 y 33 hr., las Fr predominan ampliamente sobre cualquier otro fagotipo Fa.

Finalmente, el resultado más sorprendente de la experiencia consiste en que los clones resistentes exclusivamente - al fago DF2, usado en la selección, son minoría en relación con - los que muestran fagotipos Fr y Fa, fagotipo Fa que en ocasiones no incluye la resistencia a DF2.

Con objeto de comprobar si la obtención del fagotipo Fr era efectivamente un proceso secuencial, se eligieron 3 estirpes Fa y 3 Fr, que se cultivaron en caldo 79M en presencia y ausencia de DF2 durante 24 horas a 28°C, en agitación. Pasado éste tiempo, se lavaron las células varias veces para eliminar los

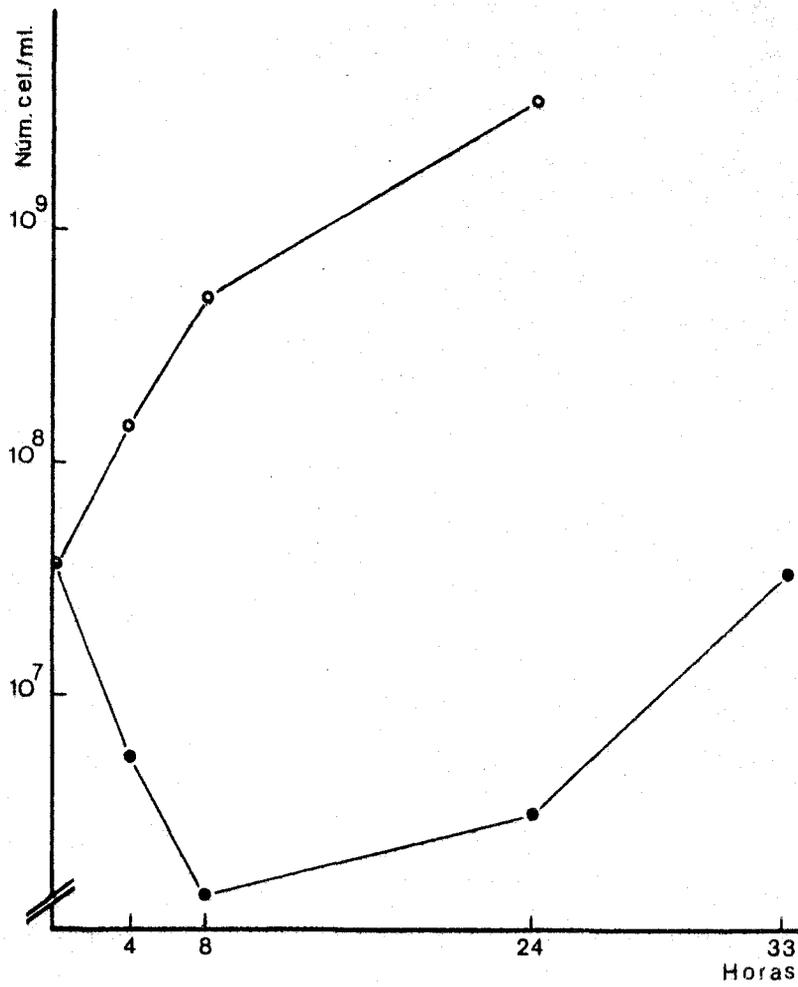


Figura 4. Número de células viables por ml. en dos cultivos de Rm2, uno de ellos inoculado con el fago DF2 a una m.d.i. aproximada de 2, a tiempos de incubación 0, 4, 8, 24 y 33 horas. ●: Cultivo inoculado con el fago. ○: Cultivo no inoculado.

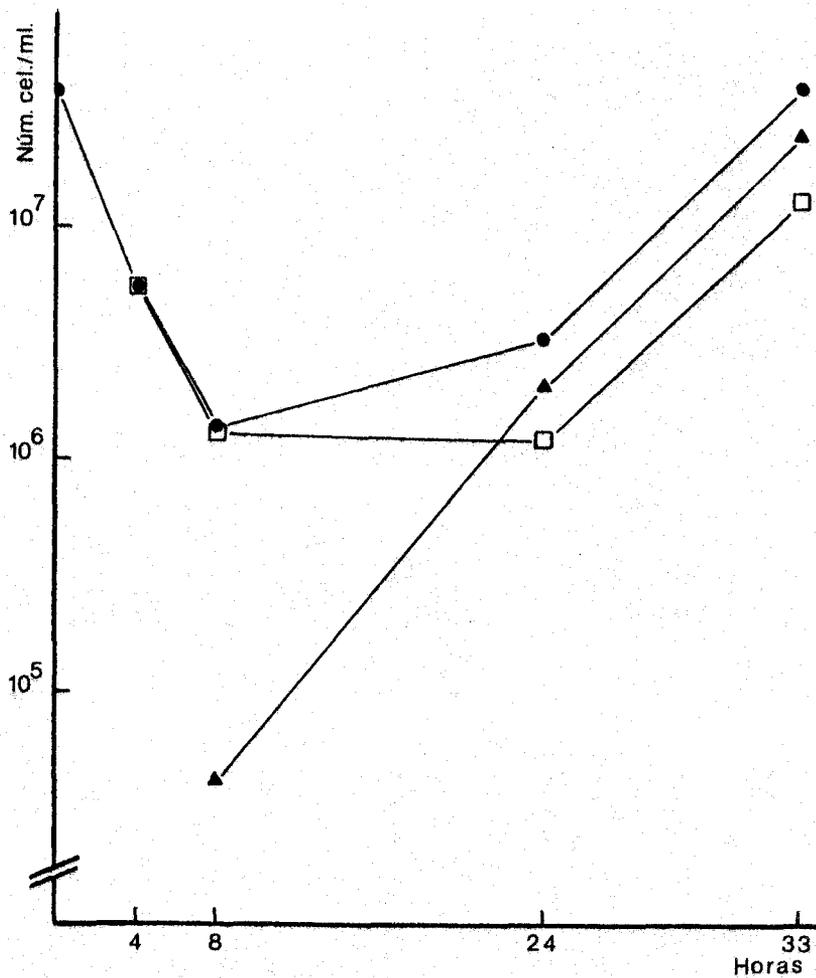


Figura 5. Evolución del número de células sensibles, número de células resistentes y número total de células viables, en un cultivo de Rm2 inoculado con el fago DF2, a lo largo de 33 horas de incubación, a 28°C y en agitación. ●: Núm. total de células viables. □: Núm. de células sensibles. ▲: Núm. de células resistentes.

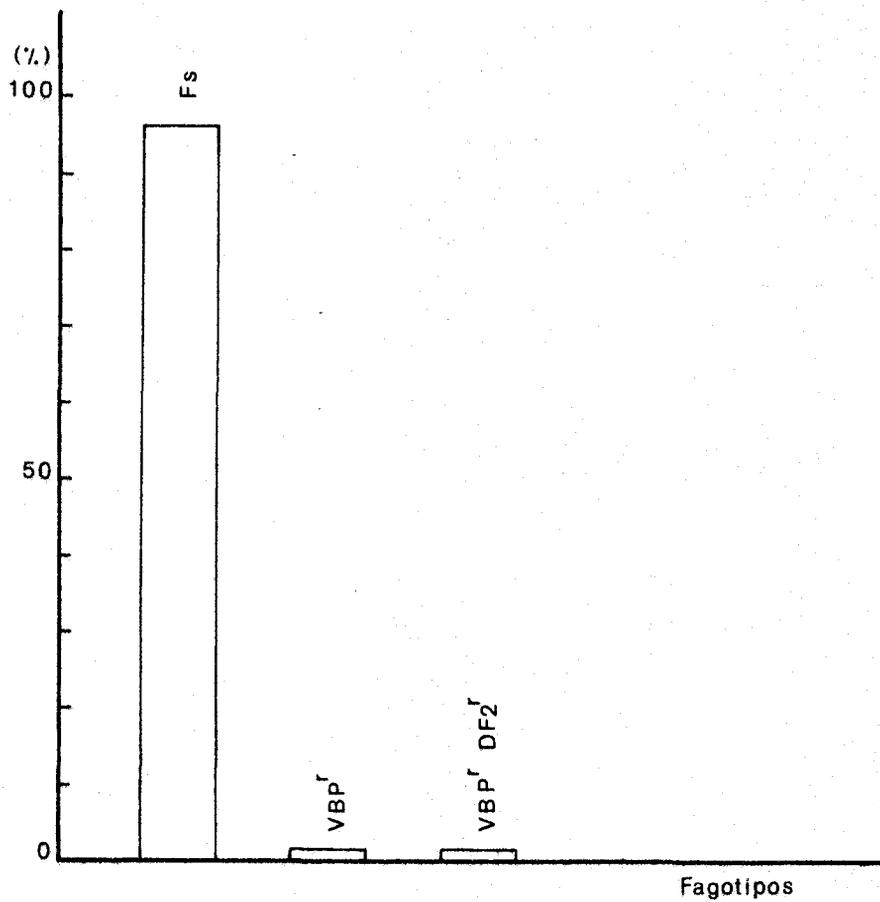


Figura 6. Composición, en cuanto a fagotipos, de la muestra tomada a las 8 horas de incubación, de un cultivo de Rm2, inoculado con el fago DF2.

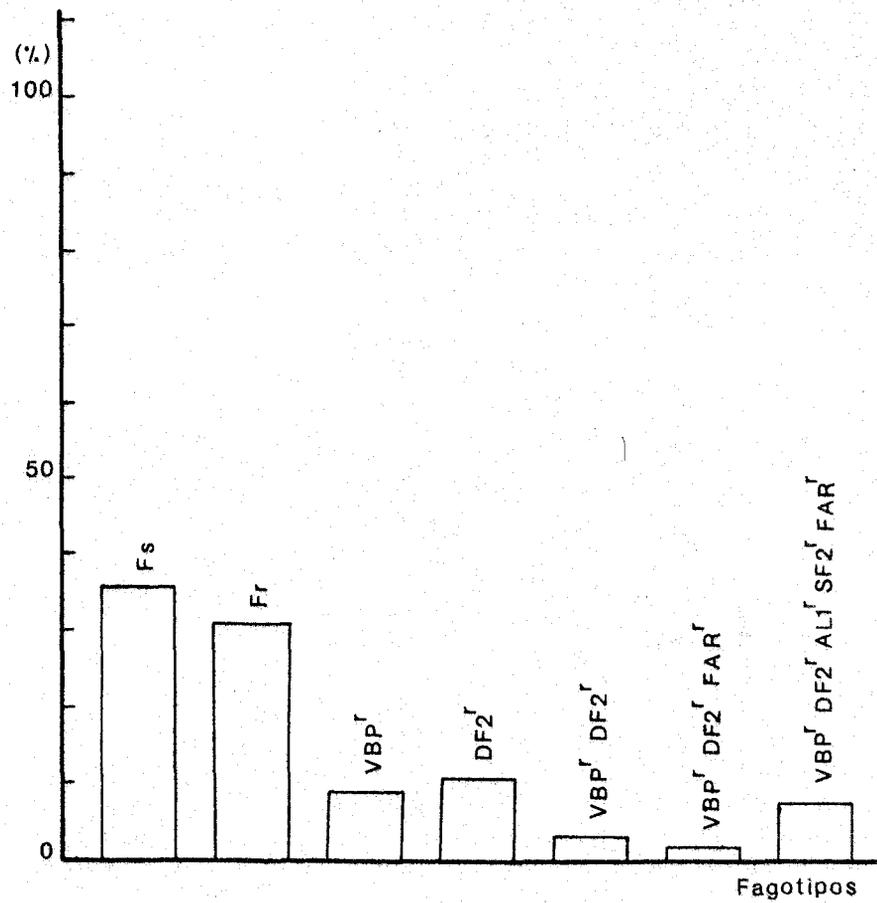


Figura 7. Composición, en cuanto a fagotipos, de la muestra tomada a las 24 horas de incubación, de un cultivo de Rm2, inoculado con el fago DF2.

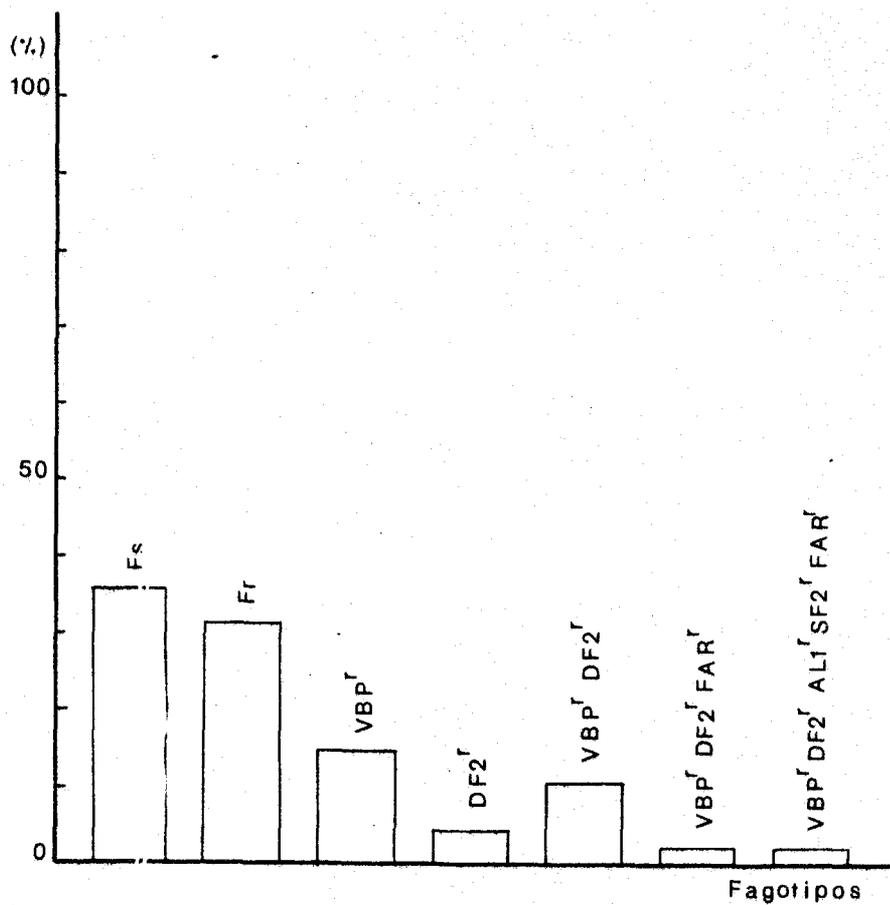


Figura 8. Composición, en cuanto a fagotipos, de la muestra tomada a las 33 horas de incubación, de un cultivo de Rm2, inoculado con el fago DF2.



fagos, diseminando en placas de medio Th. Como ya es habitual, - las colonias obtenidas se recrecieron y ensayaron frente a los 6 bacteriófagos, con el resultado de que se encontró que las estirpes Fa, en presencia de DF2, originaron clones Fr, mientras que las Fr no sufrieron cambio alguno en su fagotipo. Por su parte, - los cultivos control, en ausencia de DF2, tampoco experimentaron cambio alguno.

En consecuencia, parece claro que el bacteriófago DF2 es capaz de inducir o seleccionar de algún modo, la resistencia a él mismo y/o a los demás fagos, resistencia que se obtendría a través de una serie de estadíos intermedios, caracterizados por un fagotipo Fa.

3.3. Propiedades de las estirpes resistentes obtenidas en el laboratorio.

Todas las evidencias que se han obtenido hasta el momento acerca de las estirpes resistentes, conducen a descartar la mutación como explicación válida para la aparición de las citadas estirpes resistentes. No obstante, se consideró conveniente estudiar algunas de las propiedades de éstas, obtenidas mediante selección con el fago DF2, y de otras, Fa y Fr, procedentes de la colección de laboratorio y de los aislamientos a partir de los nódulos radicales que se describieron en el apartado 2.2..

Los aspectos que se han estudiado son, la adsor-

ción de los fagos por las estirpes resistentes, la posible relación entre el fagotipo y la morfología colonial y, finalmente, la reversión del carácter resistente de algunas estirpes Fa y Fr.

3.3.1. Ensayos de adsorción.

Como se indicó en los capítulos de Introducción y Material y Métodos, la adsorción es un proceso de resultados variables en la mayoría de las estirpes de Rhizobium sp.. No obstante, se consideró imprescindible el probar si las estirpes resistentes con las que se estaba trabajando eran o no capaces de adsorber a los fagos para los que habían ganado la resistencia, pues caso de llegarse a un resultado afirmativo, se tendría una evidencia segura de que la base de la resistencia era intracelular.

A continuación se exponen los resultados obtenidos en distintos ensayos en los que se utilizaron diferentes estirpes y fagos. En relación a las primeras, se han utilizado las estirpes Rm2 y 402 (Fs) y 4c (DF2s), de la colección de laboratorio, hv21 (DF2s) y v5 (Fr), procedentes de los aislamientos de nódulos radicales de Medicago sativa y, finalmente, las estirpes 2DA (Fr) y 2DBf (DF2r), obtenidas de la sensible Rm2, mediante selección con el fago DF2.

En un primer ensayo, según el método de la dilución en caldo B más el 10% de cloroformo, la suspensión del fago DF2 tenía un título de 5.3×10^7 ppii/ml. (partículas infectantes

por ml.). Como puede verse en la tabla 16, el porcentaje de adsorción no aumenta apreciablemente al aumentar el tiempo de contacto entre el fago y la bacteria. Se decidió por ello elegir el tiempo de 15 min. como más adecuado para ensayos posteriores, puesto que al utilizar tiempos de contacto mayores se corría el riesgo de que algunas células infectadas liberasen nuevas partículas virásicas, lo que, obviamente, falsearía los resultados.

Tabla 16. Porcentajes de adsorción del fago DF2 sobre la estirpe Rm2 a los 10, 20 y 30 minutos de contacto.

Tiempo (minutos)	Fagos libres ($\times 10^7$)	Fagos adsorbidos ($\times 10^7$)	Adsorción (%)
0	5'31	-	-
10	3'30	2'00	37'6
20	2'90	2'30	46'5
30	2'60	2'60	49'71

En el siguiente ensayo, con las estirpes Rm2 y 2DA, se pretendió comprobar si el título de la suspensión de DF2 utilizada afectaba de alguna forma a la adsorción. Para ello se obtuvieron las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-5} de una suspensión del fago, que contenían respectivamente, $5'6 \times 10^6$, $5'32 \times 10^5$ y $5'36 \times 10^3$

ppii/ml., las cuales se ensayaron por separado con las dos estirpes citadas, según el método de la dilución en caldo B más el 10% de cloroformo.

De acuerdo con los resultados obtenidos, que se exponen en la tabla 17, el título de fagos de la suspensión no afecta de forma sensible a su adsorción por la estirpe Rm2, ni tampoco por la 2DA. En cualquier caso, hay que destacar que esta última es Fr y, como puede observarse, adsorbe al fago DF2 en la misma cuantía que la sensible, Rm2.

Tabla 17. Porcentajes de adsorción del fago DF2 sobre las estirpes Rm2 y 2DA, en función del título de la suspensión del fago.

Título de la suspensión de DF2 ¹	% Adsorción sobre Rm2	% Adsorción sobre 2DA
5'6x10 ⁶	22'0	36'0
5'3x10 ⁵	39'1	26'3
5'3x10 ³	31'0	32'8

1 = ppii/ml.

Finalmente, se ensayaron los bacteriófagos LOO, DF2 y FAR frente a las estirpes Rm2 y 402 (Fs), 2DA y v5 (Fr)

y 2DBf, 4c y hv21 (Fa), según el método de la centrifugación intermedia, por lo que al tiempo de contacto de 15 min., hay que añadir otros 15 min. empleados en la citada centrifugación.

El título de las suspensiones de los fagos que se utilizaron en esta experiencia, fue de 5.5×10^4 , 1.5×10^5 y 4.2×10^4 - ppii/ml., para LOO, DF2 y FAR, respectivamente.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 18, e indican que, aun cuando los porcentajes de adsorción son generalmente mayores para aquellos fagos a los que son sensibles las estirpes ensayadas, éstas continúan adsorbiendo con bastante intensidad los bacteriófagos a los que son resistentes. Ello es especialmente patente en el caso del fago DF2.

La única excepción la constituye la estirpe v5, - de fagotipo Fr, capaz de adsorber al fago FAR, pero no a los LOO y DF2, puesto que los porcentajes obtenidos con éstos últimos pueden interpretarse como errores cometidos en la dilución - de las suspensiones.

Así pues, y aunque con las reservas derivadas de lo errático del proceso de adsorción de las estirpes de Rhizobium sp., parece claro que salvo excepciones, la resistencia a los bacteriófagos que muestran las citadas estirpes ensayadas no se debe a la alteración de los receptores específicos y que, por tanto, el fenotipo resistente se habría ganado a nivel intracelular.

Tabla 18. Porcentajes de adsorción de los fagos LO0, DF2 y FAR sobre varias estirpes Fs, Fr y Fa.

Estirpe	Fagotipo	% Adsorc. de LO0	% Adsorc. de DF2	% Adsorc. de FAR
Rm2	Fs	88	32	86
402	Fs	97	30	90
2DA	Fr	59	32	31
v5	Fr	8	3	28
2DBf	Fa(DF2r)	60	23	20
4c	Fa(DF2s)	47	28	16
hv213	Fa(DF2s)	51	71	22

3.3.2. Relación entre el fagotipo y la morfología colonial.

De acuerdo con la bibliografía, es frecuente que tras la selección con un bacteriófago, algunas de las estirpes resistentes muestren una morfología colonial distinta a la de la estirpe original. Este hecho es indicativo de un cambio en las estructuras superficiales de las células, lo que conlleva generalmente el fenotipo resistente al no poder adsorberse el fago, o hacerlo con dificultad.

Las colonias que forman las estirpes de R.melioti que se aíslan de los nódulos radicales, tienen el aspecto típico, mucosas, de color blanco grisáceo o transparente, según el medio de cultivo utilizado. Es característico además que crezcan bastante elevadas sobre el medio, mostrando una gran variabilidad en el tamaño.

Este tipo silvestre se llamó morfotipo A, para distinguirlo de otro tipo de colonias que aparecen de forma espontánea y con cierta frecuencia, en los cultivos en medio sólido, caracterizado por un tamaño menor, de aspecto denso y opaco y color amarillento o lechoso, al que se llamó morfotipo B (ver figuras 9b, 9d y 9e).

Por otra parte, como se indicó en el apartado 3.2.2.1., durante las experiencias de selección de estirpes resistentes con los fagos virulentos, se observó la aparición de colonias que mostraban una morfología distinta a la de las formas A y B.

Las colonias de este tercer tipo, al que se llamó morfotipo Bf, muestran un tamaño aún menor que el de las formas B, son de color amarillo-pardo u ocre, poco elevados sobre el medio y de superficie rugosa y estriada y borde irregular, tal como se muestra en la figura 9f.

En principio, tanto el morfotipo B como el Bf, parecen ser mutantes que han sufrido una alteración en su capacidad para producir el exopolisacárido típico de las formas A, por lo que se consideró interesante comprobar si la mencionada alteración suponía además, algún cambio concreto en el fagotipo.

En el caso del morfotipo B, que, como se ha dicho, aparece espontáneamente en los cultivos no inoculados con fago, se comprobó rápidamente que no sufre alteración alguna en el fagotipo, es decir, muestra el mismo patrón de resistencia o sensibilidad que las estirpes de procedencia de morfotipo A.

Por el contrario, el morfotipo Bf sólo se detecta en los cultivos previa selección con un fago virulento y siempre se ha observado un cambio en el fagotipo con respecto a la estirpe original.

En los primeros ensayos se comprobó que todas las estirpes con morfotipo Bf, independientemente del fago utilizado para seleccionarlas, eran resistentes al fago DF2 y sensibles a los demás, lo que hacía pensar que la morfología Bf iba ligada exclusivamente a este fagotipo. Sin embargo, en ensayos posteriores con la estirpe Rm2 y cada uno de los fagos virulentos se comprobó que no existía tal relación, como se desprende de los si--

guientes resultados:

- a) Siempre que se practica una selección con un bacteriófago virulento a partir de una estirpe sensible de morfotipo A, se obtiene una mezcla de estirpes, también de morfotipo A, que muestran un fagotipo alterado (Fa) o resistente (Fr), pero no siempre se detectan estirpes con morfotipo Bf.
- b) A través de un número suficiente de ensayos, se han aislado estirpes con morfotipo Bf que presentan la misma variedad de fagotipos que las que presentan el morfotipo A.
- c) Al igual que ocurre con las estirpes A de fagotipo Fa, la inoculación de una estirpe Bf y Fa con un fago virulento capaz de atacarla, provoca la aparición de estirpes Bf de fagotipo Fr.

Según lo que se ha expuesto, el morfotipo Bf no está ligado a un cambio concreto en el fagotipo. Queda, sin embargo, por aclarar el por qué las estirpes Bf resultan seleccionadas, en algunos casos, en los cultivos inoculados con fagos virulentos; en este aspecto, lo único que parece claro es que las estirpes Bf muestran una respuesta alterada frente a los fagos capaces de atacarla, ya que, en los ensayos en caldo, nunca se consigue un grado de aclaramiento comparable al que se consigue en el caso de las estirpes A y en placa, el halo de lisis que se forma con los distintos fagos es muy poco aparente, como se muestra en la figura 9c.

Finalmente, las características diferenciales más notables de los morfotipos B y Bf, se exponen en la tabla 19.



Tabla 19. Características diferenciales de los morfotipos B y Bf.

Carácter	Morfotipo B	Morfotipo Bf
Origen	Aparecen espontáneamente en los cultivos en medio-sólido.	Solo se detectan previa selección con bacteriófagos virulentos.
Fagotipo	No se altera respecto al de las estirpes A de <u>par</u> tida.	Siempre aparece alterado respecto al de las estirpes A de <u>par</u> tida.
Cultivo	Al prolongar la incubación las colonias toman un <u>as</u> pecto semejante a las de las estirpes A.	Si se prolonga la incubación se acentúan aún más las <u>ca</u> racterísticas propias.
Infectividad	No se altera respecto a las estirpes A de <u>par</u> tida.	No se altera respecto a las estirpes A de <u>par</u> tida.
Reversión	No se ha observado reversión espontánea al morfotipo A.	No se ha observado reversión espontánea a los morfotipos A ó B.

Figura 9. a. Halos de lisis producidos por los bacteriófagos utilizados en el fagotipado, sobre la estirpe Rm2. Comenzando en 1, y siguiendo en el sentido contrario al de las agujas del reloj, aparecen VBP, LOO, DF2, AL1, SF2 y FAR. Tamaño natural, aproximadamente.

b y d. Morfotipos A y B de la estirpe hv21, en medio Th, a los cuatro días de incubación a 28°. Aumentado 3 veces aproximadamente.

c. Halos de lisis producidos por los seis bacteriófagos utilizados en el fagotipado, sobre la estirpe 2DBf. Los resultados y aumentos son los mismos que los de la figura a.

e. Morfotipos A y B de la estirpe Rm2, en medio Vincent, a los tres días de incubación a 28°. Aumentado 4 veces, aproximadamente.

f. Morfotipo Bf de la estirpe Rm2, estirpe 2DBf, en medio Th, tras la incubación a 28° durante 6 días. Aumentado 8 veces, aproximadamente.

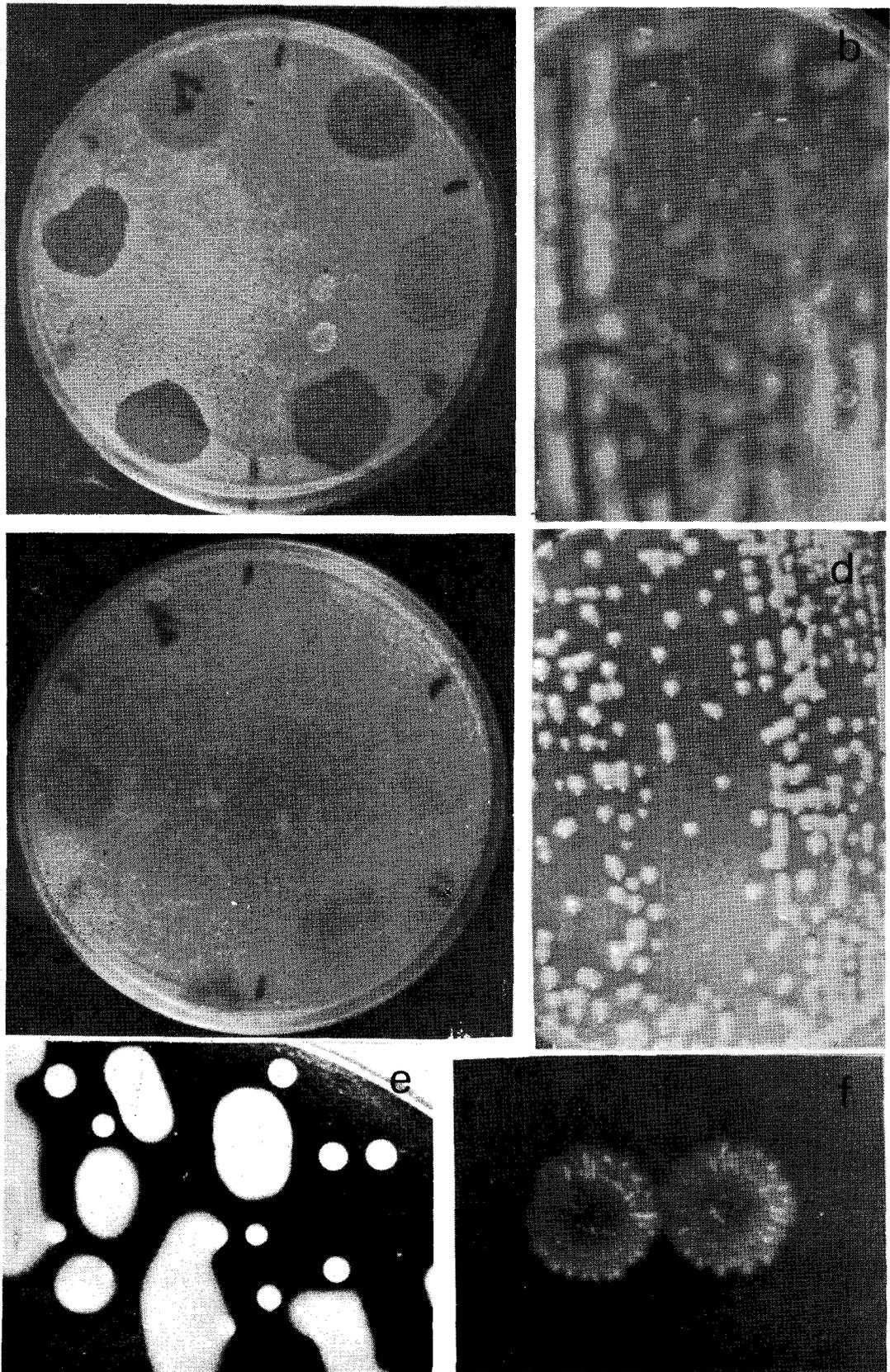


Figura 9.



3.3.3. Reversión del carácter resistente a los fagos.

Uno de los fenómenos que se estudiaron en relación con el fagotipo resistente fue la posibilidad de reversión total o parcial de este carácter en las estirpes 2DA, 2DBf y 2D2, obtenidas a partir de la sensible Rm2 por selección con el fago - DF2.

La estirpe 2DA se comporta como resistente a los seis bacteriófagos usuales pero en cambio, es sensible al fago - f2D, el cual origina sobre ella placas líticas turbias, típicas de un bacteriófago moderado.

De acuerdo con ésto, se intentó obtener una estirpe 2DA, lisogénica para el fago f2D; se inocularon fago y bacteria en caldo 79M, incubando a 28°C en agitación durante 4 a 6 horas, pasadas las cuales, se diseminó en placas de medio Th.- Finalmente, las colonias se recrecieron en el mismo medio y se ensayaron frente a los seis bacteriófagos habituales y el propio f2D.

El resultado que se esperaba, caso de que se hubiese producido la lisogenia, eran clones resistentes a los siete bacteriófagos. Sin embargo, lo que se obtuvo fue una mezcla de clones aparentemente lisogénicos y clones que habían revertido al fagotipo Fs. Estos resultados se muestran en la tabla 20, en la que se ha considerado imprescindible la utilización de nuevos símbolos, con objeto de describir lo más exactamente posible el comportamiento de las estirpes obtenidas en estos ensayos.

Tabla 20. Fagotipo de varios clones obtenidos de la interacción - de la estirpe 2DA con el fago f2D.

Clono	Fagotipo					
	VBP	LO0	DF2	AL1	SF2	FAR
2DA/f2D-1	tp	tp	t	t	tp	t
2DA/f2D-2	-	-	-	-	-	-
2DA/f2D-3	-	-	-	-	-	-
2DA/f2D-4	t	t	t	t	t	t
2DA/f2D-5	tp	tp	t	tp	tp	tp

- = Resistencia.

t = Halo de lisis turbio.

p = Placas líticas sueltas, individualizadas.

tp = Halo de lisis turbio, en cuyo interior se observan placas líticas más nítidas.

Por lo que se refiere a los clones 2 y 3 de la mencionada tabla 20, se comprobó, mediante los ensayos de inducción con mitomicina C y luz ultravioleta, descritos en Material y Métodos, que se trataba efectivamente de clones lisogénicos para el fago f2D.

Por el contrario, los clones 1, 4 y 5, que en principio habían revertido al fagotipo Fs, se comportaron inestablemente por subcultivo en placa y en caldo, perdiendo rápidamente

te el fagotipo Fs y pasando a ser nuevamente Fr y sensibles al fago f2D; por otra parte, no pudo demostrarse que los citados donos fuesen asociados, esto es, que liberasen al fago f2D.

A la vista de estos resultados que demostraban la posibilidad de la reversión temporal al fagotipo Fs, mediada por el fago f2D, se realizaron las mismas experiencias con las estirpes 2D2 y 2DBf, resistentes a los fagos VBP y DF2, respectivamente.

En los dos casos se obtuvieron igualmente clones lisogenizados y clones que habían pasado a ser sensibles, temporalmente, a los fagos para los que eran resistentes. Ahora bien, se comprobó que si el contacto entre el fago f2D y la estirpe en cuestión se prolongaba más de 6 a 8 horas, los clones sensibles se hacían indetectables, obteniéndose únicamente estirpes lisogenizadas.

Así pues, durante los primeros momentos de la interacción fago-bacteria, el fago f2D es capaz de provocar la reversión temporal del carácter Fr y Fa, en las estirpes de este tipo, obtenidas mediante selección con el fago DF2. Este resultado constituye una evidencia más de que las citadas estirpes Fa y Fr no se obtienen por mutación de la estirpe sensible Rm2.

3.4. Fenómenos de lisogenia yseudolisogenia y su relación con la resistencia a los fagos.

Como se expuso en el apartado 3., la otra causa a la que se hace responsable de la variabilidad en el fagotipo de las estirpes de R.meliloti, y por tanto, de la resistencia a los fagos, es la asociación fago-bacteria de tipo lisogénico o pseudolisogénico.

En lo que se refiere a las experiencias que se describen en esta memoria, la posibilidad de la lisogenia y pseudolisogenia surgió del hecho, citado en el apartado 2.4., de la existencia de estirpes recientemente aisladas de nódulos radicales, que se lisaban como consecuencia de una contaminación con bacteriófagos y del aislamiento de bacteriófagos moderados como AL1 y SF2 capaces de establecer asociación lisogénica con la estirpe sensible Rm2.

Ambos hechos aconsejaron, de un lado, el estudio de la interacción entre los fagos moderados y las estirpes sensibles, para comprobar si se establecía la asociación lisogénica, y de otro, la investigación del carácter lisogénico o pseudolisogénico de estirpes de la colección del laboratorio y de otras, aisladas de nódulos radicales.

3.4.1. Interacción entre los fagos moderados y la estirpe sensible Rm2.

Los ensayos se efectuaron según el método general que se aplicó en el caso de los fagos virulentos, consistente en inocular cada uno de los fagos VBP, AL1 y SF2, en cultivos en caldo 79M de la estirpe Rm2. Se incubó durante 24 horas a 28°C y en agitación, diseminando a continuación en placas de medio Th para obtener colonias separadas. Posteriormente, se re-crecieron las colonias en el mismo medio y se ensayaron, según la técnica habitual, frente a los seis fagos. Los resultados obtenidos con cada bacteriófago se muestran en la tabla 21.

Tabla 21. Fagotipo de las estirpes obtenidas de la interacción entre los fagos moderados y la estirpe Rm2.

Cultivo	Núm. clones ensayados	Fagotipo
Rm2/VBP	16	3 clones del tipo VBP ^r 13 clones Fs.
Rm2/AL1	16	16 clones AL1 ^r - SF2 ^r
Rm2/SF2	16	16 clones del tipo SF2 ^r

VBP^r, etc., = Resistencia a estos fagos y sensibilidad al resto.
Fs = Fagotipo sensible.

Se eligieron a continuación dos clones de los cultivos con AL1 y SF2, que se llamaron Rm2(AL1) y Rm2(SF2), comprobándose en primer lugar que se comportaban establemente por subcultivo y tras la incubación en presencia de Tween-80 al 1%.

El resultado de los subcultivos, en los que todos los clones obtenidos liberaban bacteriófagos, aseguraba la existencia de la asociación fago-bacteria y, de otra parte, el hecho de que tras la incubación en presencia de Tween-80, no se obtuvieron clones Fs que hubieran perdido la capacidad de liberar fagos, permitió decidir que la asociación era de tipo lisogénico.

Por último, se realizaron los ensayos de inducción con mitomicina C y luz ultravioleta, siguiendo el procedimiento descrito en Material y Métodos, con el resultado de que las dos estirpes fueron susceptibles a ambos agentes, es decir, se lisaron liberando a los fagos respectivos.

En lo que se refiere a las estirpes del cultivo Rm2/VBP, destaca sobre todo la escasa actividad del fago, que deja tras su ataque una proporción muy alta de estirpes sensibles. Se estudiaron, por los mismos procedimientos que se han citado, los tres clones VBP^r, con el resultado de que ninguno de ellos se comportó establemente por subcultivo o en presencia del Tween-80, sino que, en ambos casos, aparecieron clones Fs no contaminados con el fago. En consecuencia, no se siguió adelante, aceptando que la asociación que se había establecido era de tipo pseudolisogénico.

Así pues, estos resultados ponen de manifiesto la

existencia de dos tipos de bacteriófagos moderados. Uno de ellos establece asociaciones lisogénicas con la estirpe sensible, lo cual resulta efectivamente, en la resistencia al propio bacteriófago y, en el caso de la estirpe Rm2(AL1), a otro fago, probablemente relacionado con el primero.

El otro tipo, en cambio, establece preferentemente asociaciones de tiposeudolisogénico, inestables, que, no obstante, conducen igualmente a la resistencia al propio bacteriófago. Como se expone en el apartado siguiente, este tipo de asociación parece darse con cierta frecuencia en las estirpes silvestres de R.meliloti.

3.4.2. Estudios sobre la asociación fago-bacteria en estirpes silvestres y de laboratorio.

Los ensayos se llevaron a cabo sobre dos grupos de estirpes, uno de ellos formado por una muestra de las estirpes aisladas de los nódulos radicales y el otro, por las estirpes de la colección del laboratorio.

Los procedimientos utilizados fueron los clásicos, descritos en Material y Métodos, que se emplearon sobre las estirpes del primer grupo en la siguiente secuencia:

- 1) Ensayo de los sobrenadantes de los cultivos en caldo 79M de las distintas estirpes, sobre Rm2, en placa, con objeto de detectar los posibles fagos liberados por las estirpes en cuestión.



2) Si el ensayo anterior resultó positivo, es decir, si había fagos activos frente a Rm2, se procedió a subcultivar y reaislar las estirpes que los liberaban, repitiendo a continuación el ensayo descrito en 1). De esta forma se eliminaban aquellas estirpes que fueren simplemente contaminadas con fagos.

3) Las estirpes que, tras la fase de reaislamiento, continuaban liberando fagos, se irradiaron, de una parte, con luz ultravioleta (UV) a dosis que provocaban la inducción de la estirpe Rm2(AL1), y de otra, se cultivaron en presencia de mitomicina C (mit.C), a concentraciones desde 0'3 a 10 microgr./ml., según se expuso en Material y Métodos.

4) Independientemente de los resultados de los ensayos de inducción, las estirpes asociadas con fagos, se cultivaron en presencia de Tween-80, para eliminar una posible asociación de tipo pseudolisogénico.

Los resultados del ensayo descrito en 1), sobre una muestra de estirpes de los distintos aislamientos, se exponen en la tabla 22. En dicha tabla aparecen más estirpes del aislamiento a partir de nódulos de Medicago sp., debido a que fue en este aislamiento en el que se descubrió la contaminación con fagos de algunas estirpes.

Tras la fase de aislamiento, se encontró que todas las estirpes asociadas con fagos virulentos y una de las que iban asociadas con fagos moderados, habían perdido esta capacidad. Las dos estirpes restantes, v47 y hv21, continuaron liberan-

do fagos, por lo que se procedió a estudiar las características de la asociación en cada una de ellas.

Tabla 22. Estirpes silvestres de R.meliloti, procedentes de los - distintos aislamientos, asociadas con fagos activos frente a la estirpe Rm2.

Aislamiento	Núm.estirpes ensayadas	Núm.estirpes con fagos	Morfología placas líticas
Rmv	25	17	2 turbias 15 claras
Rmhv	5	1	1 turbia
Rml	2	0	-
Rmc	8	4	4 claras
Rmg	5	0	-

La estirpe hv21, asociada al fago fhv, mostró un comportamiento absolutamente extraño. Se comprobó que ni la mit.C ni la luz UV, ni tampoco la incubación en presencia de Tween-80, tenían efecto alguno sobre la citada estirpe. De otra parte, como

se expuso en el apartado 1.3., el fhv solo se multiplica sobre la propia hv21, lo cual indicaría que se trata de un caso de seuddisogenia, aunque, como se ha expuesto, tal asociación no se afectó por la incubación en presencia de Tween-80.

Por otro lado, la estirpe v47, asociada al fago f47, muestra un fagotipo Fa, resistente a los fagos VBP, SF2 y el propio f47 y sensible a los fagos virulentos, LOO, DF2 y FAR, mientras que los fagos AL1 y f2D, la atacan o no, según los casos.

Esta resistencia a varios bacteriófagos moderados parecía indicar que v47 era una estirpe lisogénica, con la reserva de su comportamiento variable frente a AL1 y f2D.

No se obtuvo lisis, ni siquiera aumento en el número de partículas de f47 al inducir la estirpe v47 con mit. C ó luz UV; ello no permite, no obstante, descartar la lisogenia, pues que existen profagos no inducibles por éstos agentes.

Sin embargo, cuando se la cultivó en presencia de Tween-80, se obtuvieron algunos clones Fs, no asociados con el f47 y, por supuesto, sensibles a este fago. Este hecho permitió decidir, sin ninguna duda, que la estirpe v47 va asociada al citado f47 de forma seudolisogénica.

En cuanto al grupo de estirpes de la colección de laboratorio, que comprendía a las estirpes Rm2, 2D2, 2D5, 2DA, 2DBf, 402 y 4c, se tropezó inicialmente con la dificultad de que ninguna de ellas liberaba fagos activos frente a Rm2, de forma espontánea. No obstante, existía la posibilidad de que alguna de ellas

liberarse algún bacteriófago no detectable por la sencilla razón de que no se disponía de la estirpe sensible adecuada.

Esta circunstancia hizo aconsejable el someterlas a los mismos ensayos que se han descrito para las estirpes silvestres, particularmente, la inducción con mit.C y luz UV y examinar, además, los sobrenadantes, al microscopio electrónico.

El resultado de los ensayos con las distintas estirpes fue negativo, es decir, no se detectaron bacteriófagos activos tras la inducción, ni tampoco se observaron partículas virásicas al microscopio electrónico.

En resumen, los resultados que se han expuesto demuestran la posibilidad de la asociación fago-bacteria, de tiposeudolisogénico, en estirpes silvestres de R.meliloti. Sin embargo, y con la excepción de las estirpes v47 y hv21, la mayoría de los casos estudiados pueden interpretarse como debidos a contaminaciones accidentales con fagos, durante la fase de aislamiento de las estirpes.

En consecuencia, ni laseudolisogenia, ni por supuesto, la lisogenia, parecen ser causas importantes en la aparición de resistencia a los fagos en R.meliloti.

3.5. Relación entre el fagotipo y la presencia de plásmidos.

Una última posibilidad que podría explicar la aparición de resistencia a uno o varios bacteriófagos, sería admitir la presencia en las estirpes sensibles de uno o varios plásmidos que condicionarían la sensibilidad a los distintos bacteriófagos. De esta forma, la alta frecuencia con que se obtienen estirpes Fa y Fr, tras la selección con los fagos virulentos podría deberse a la pérdida o alteración más o menos profunda, de los citados plásmidos.

En contra de esta hipótesis se puede aducir, obviamente, que las estirpes Fa y Fr adsorben a los fagos, hecho que obliga a admitir también que los supuestos plásmidos condicionarían la sensibilidad a nivel intracelular y que, en su ausencia, los fagos serían incapaces de multiplicarse en la célula hospedadora.

A favor de esta hipótesis se cuenta con los resultados obtenidos con las estirpes 402 y 4c, de la colección de laboratorio.

Como se expuso anteriormente, la estirpe 4c procede de la 402 por tratamientos con naranja de acridina (NA), habiéndose demostrado que dicho tratamiento supuso la pérdida de un plásmido de 59 Mdal., el pEZ1 (Palomares et al., 1978a y b).

Concordantemente con la pérdida del plásmido, la estirpe 4c alteró su fagotipo con respecto a la 402, como se muestra en la tabla 23, en la que puede observarse que la estirpe 4c

ha perdido la sensibilidad a cinco de los seis bacteriófagos. Es interesante hacer notar además, que la estirpe 402 era M^- precisamente para los cinco fagos a los que se hace resistente la 4c y que ésta última es también M^- para DF2.

Tabla 23. Fagotipo de las estirpes 402 y 4c.

Estirpe	Fagotipo					
	VBP	LOO	DF2	AL1	SF2	FAR
402	+ M^-	+ M^-	+	+ M^-	+ M^-	+ M^-
4c	-	-	+ M^-	-	-	-

+: Sensible. / -: Resistencia. / M^- : Multiplicación menos.

Sin embargo, no han podido obtenerse nuevas estirpes del tipo 4c, a partir de la 402, por tratamientos con NA y, por otra parte, tampoco se obtienen estirpes "curadas", es decir de fago tipo Fa ó Fr, a partir de la Rm2, por cultivo de ésta en presencia del citado agente.

Por tanto, y a pesar de lo atractivo del caso de las estirpes 402 y 4c, no parece que los resultados obtenidos con ellas puedan hacerse extensivos a las demás estirpes Fa y Fr.

4. FENOMENOS DE RESTRICCION Y MODIFICACION EN ESTIRPES DE R.MELILOTI

La posibilidad de que los fenómenos de restricción fuesen la base para explicar el comportamiento resistente de algunas de las estirpes que se han utilizado en este trabajo, proviene de la observación de la respuesta de algunas estirpes frente a determinados fagos, consistente en la aparición de sólo unas pocas - placas líticas individualizadas, cuando se ensaya, por la técnica - habitual, una suspensión que teóricamente contiene un número sufi - ciente de bacteriófagos para originar un halo de lisis confluyente.

Este tipo de respuestas llevó a estudiar una serie de estirpes Fr y Fa, así como la sensible Rm2, considerando que el fenotipo resistente sería simplemente el resultado de un fe - nómeno de restricción, llevado hasta sus últimas consecuencias.

El procedimiento seguido ha sido el clásico, con - sistente en el enriquecimiento de los fagos en distintas estirpes, - ensayando las suspensiones obtenidas, sobre otras, para controlar el número de placas líticas que aparecen en cada caso, esto es, - la e.o.p. ("efficiency of plating", eficacia en la formación de pla - cas líticas) de las citadas suspensiones.

Como se recordará, todos los fagos se obtuvieron frente a la estirpe Rm2, lo que ha hecho innecesario hasta el mo - mento, al nombrarlos, hacer referencia a la estirpe donde se ha - bían multiplicado, pero puesto que en los apartados siguientes se van a exponer los resultados obtenidos al ensayar fagos enriqueci -

dos sobre distintas estirpes, se ha considerado conveniente modificar la nomenclatura como sigue:

- Para designar a los fagos obtenidos sobre distintas estirpes, se escribirá el nombre completo del fago, seguido, entre paréntesis, del nombre de la estirpe sobre la que se ha enriquecido últimamente.
- Cuando un bacteriófago se haya enriquecido varias veces consecutivas sobre una misma estirpe, se escribirá como se ha dicho - en el párrafo anterior, seguido de un guión y un número, indicativo del pase de enriquecimiento de que se trate.
- Finalmente, en algún caso ha sido necesario indicar las dos últimas estirpes sobre las que se ha multiplicado un fago determinado. Ejemplo: DF2(Rm2)(2D2), que sería el fago DF2, enriquecido sobre la estirpe Rm2 y a continuación, sobre la estirpe 2D2.

4.1. Restricción y modificación del fago DF2(Rm2) por las estirpes hv21 y 402.

La estirpe hv21 se aisló de nódulos radicales de Medicago sativa, comportándose como sensible exclusivamente al fago DF2. Además, y como se expuso en el apartado 3.4.2., va asociada al fago moderado fhv.

Las experiencias realizadas con esta estirpe consistieron en el enriquecimiento, en tres pases consecutivos, del fago DF2(Rm2) sobre la citada hv21, ensayando las suspensiones -

obtenidas en cada pase sobre Rm2 y la propia hv21. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 24.

Tabla 24. e.o.p. de los fagos DF2(Rm2) y DF2(hv21) sobre las es tirpes Rm2 y hv21.

Fagos	e.o.p. sobre Rm2	e.o.p. sobre hv21
DF2(Rm2)	1	0'13
DF2(hv21)-1	1'19	1
DF2(hv21)-2	1'32	1
DF2(hv21)-3	1'30	1

Los datos expuestos demuestran que la estirpe -- hv21 es capaz de modificar al fago DF2, de manera que la e.o.p. de las nuevas suspensiones se acerca bastante a la que se obtiene sobre Rm2. Sin embargo, cabe preguntarse por qué no se igua lan el número de placas líticas obtenidas sobre las dos estirpes. No se conoce la respuesta, aunque a título de hipótesis, puede pen sarse que el fago fhv, asociado a hv21, podría haber establecido una restricción adicional para el fago DF2, en la citada estirpe.

En lo que se refiere a la estirpe 402, sólo ha po dido estudiarse su comportamiento frente al fago DF2, debido a - que, como ya se ha dicho, sólo es capaz de multiplicar a este fa

go.

Los resultados obtenidos al ensayar las suspensiones DF2(Rm2) y DF2(402) sobre las estirpes Rm2 y 402 se muestran en la tabla 25. Como puede observarse, tanto la restricción como la modificación son muy poco aparentes, por lo que podría cuestionarse su existencia real. No obstante, los resultados que se han expuesto en la tabla se han repetido a lo largo de ensayos sucesivos, lo cual permite descartar el que sean debidos a errores cometidos en la dilución de las suspensiones del fago.

Tabla 25. e.o.p. de los fagos DF2(Rm2) y DF2(402) sobre las estirpes Rm2 y 402.

Fagos	e.o.p. sobre Rm2	e.o.p. sobre 402
DF2(Rm2)	1	0'58
DF2(402)	0'75	1

Así pues, tanto la estirpe hv21, Fa y asociada al fago fhv, como la 402, Fs pero M⁻ para cinco bacteriófagos, parecen tener sistemas de restricción y modificación distintos a los de la estirpe sensible Rm2, aunque no es posible decidir acerca del origen de estos sistemas de restricción que, por otra parte, parecen ser muy poco efectivos.



4.2. Comportamiento de las estirpes 2D2 y 2D5, frente al bacteriófago DF2.

El estudio de los fenómenos de restricción y modificación en estas dos estirpes parecía muy interesante, puesto que ambas se habían obtenido a partir de la sensible Rm2, mediante selección con el fago DF2.

La estirpe 2D2 se comporta como resistente al fago VBP, mientras que la 2D5 es M^- para este fago y al mismo tiempo muestra un comportamiento variable frente a DF2.

No se encontró que hubiera restricción notable para los fagos LO0, AL1, SF2 y FAR, en ninguna de las dos estirpes, por lo que los ensayos se han limitado al bacteriófago -- DF2.

En la tabla 26 se muestran los resultados obtenidos al ensayar las suspensiones DF2(Rm2), DF2(2D2) y DF2(2D5) sobre las estirpes Rm2, 2D2 y 2D5. Como en casos anteriores, las suspensiones del fago se obtuvieron por enriquecimiento en caldo 79M.

Como puede observarse en la mencionada tabla, la estirpe 2D5 restringe fuertemente al DF2 obtenido en las estirpes 2D2 y Rm2, pero el hecho absolutamente inesperado es que también restringe al fago enriquecido sobre ella misma.

Este resultado, en principio absurdo, ha sido confirmado repetidas veces y solo puede ser explicado suponiendo que la estirpe 2D5 posee unos sistemas de restricción y modifica

ción muy poco activos en las condiciones fisiológicas que se desarrollan en los cultivos en caldo 79M. Por el contrario, el sistema de restricción sería muy activo en medio Vincent, con lo que el fago obtenido por el enriquecimiento en caldo 79M sería nuevamente restringido en los ensayos en placa.

Tabla 26. e.o.p. de los fagos DF2(Rm2), DF2(2D2) y DF2(2D5), -- sobre las estirpes Rm2, 2D2 y 2D5.

Fagos	e.o.p. <u>so</u> bre Rm2	e.o.p. <u>so</u> bre 2D2	e.o.p. <u>so</u> bre 2D5
DF2(Rm2)	1	0'35	2×10^{-7}
DF2(2D2)	0'56	1	1×10^{-2}
DF2(2D5)	4×10^7	4×10^7	1

De otra parte, y como se puede observar en la tabla, la estirpe 2D5 restringe con menor intensidad al fago obtenido sobre 2D2 que al obtenido sobre Rm2. Esta circunstancia llevó a pensar que la modificación debida a la estirpe 2D2 podría facilitar a su vez la modificación del fago por la estirpe -- 2D5, por lo que se obtuvo una suspensión de DF2, por enriquecimiento sucesivo sobre las estirpes 2D2 y 2D5.

Esta suspensión, DF2(2D2)(2D5), se ensayó fren-

te a las tres estirpes, actuando como control del resultado, una suspensión de DF2 enriquecida en dos pases sucesivos sobre la estirpe 2D2.

Los resultados obtenidos, que se muestran en la tabla 27, parecen confirmar la suposición anterior, puesto que la e.o.p. de la suspensión DF2(2D2)(2D5), es muy próxima en las estirpes 2D5 y 2D2, pudiendo interpretarse el resultado obtenido sobre la estirpe Rm2, como debido a que no todas las partículas del fago resultaron modificadas por la estirpe 2D5.

Tabla 27. e.o.p. de los fagos DF2(2D2)(2D5) y DF2(2D2)-2, sobre las estirpes Rm2, 2D2 y 2D5.

Fagos	e.o.p. sobre Rm2	e.o.p. sobre 2D2	e.o.p. sobre 2D5
DF2(2D2)(2D5)	20	2'8	1
DF2(2D2)-2	0'58	1	1×10^{-4}

En cualquier caso, está claro que las estirpes 2D2 y 2D5 restringen al fago DF2(Rm2), llegándose, en el caso de 2D5 a niveles muy próximos a la resistencia total.

Ello sugiere que la resistencia a los fagos podría ser debida a la actuación de enzimas de restricción, cuya activi-

dad en los casos límite, como la estirpe 2DA, podría provocar la resistencia a la mayoría de los bacteriófagos.

4.3. Modificación del fago AL1 por la estirpe 2DA.

La estirpe 2DA presenta un fagotipo Fr y se obtuvo, al igual que 2D2 y 2D5, a partir de Rm2, mediante selección con el fago DF2.

Sin embargo, como se expuso en el apartado 3.3.3, la estirpe 2DA es sensible al fago f2D, de cuya obtención tratan precisamente las experiencias que se describen en este apartado.

En los ensayos realizados para la caracterización de la estirpe 2DA, se observó que la adición simultánea de varios fagos virulentos o moderados a los cultivos de esta estirpe en caldo 79M, provocaba un ligero retraso en el crecimiento, con respecto a los cultivos no inoculados. Esta observación llevó a ensayar en placa el efecto de mezclas de fagos sobre la citada 2DA, al objeto de comprobar si alguna de las mezclas era capaz de provocar la aparición de placas de lisis.

Se obtuvieron resultados positivos con las mezclas AL1-FAR y AL1-DF2, lo que permitía suponer que las placas líticas que aparecieron se debían a un nuevo fago, híbrido de los anteriores, aunque, a juzgar por las características de los tres fagos implicados, tal hibridación parecía muy poco probable.

Se llamó f2D al nuevo bacteriófago, por su capa-

cidad de atacar a la estirpe 2DA. Este fago fue purificado y caracterizado por los métodos ya descritos, con el resultado de que era idéntico, tanto en su morfología como en su capacidad lisogénica, al fago AL1.

Esta identidad con AL1, unida a que no había evidencia de que el nuevo fago tuviese alguna propiedad de los fagos DF2 ó FAR, llevó a pensar que el fago f2D era realmente un AL1 modificado por la estirpe 2DA.

Para comprobar esta hipótesis, se ensayaron sobre la citada 2DA una serie de suspensiones de AL1, obtenidas sobre las estirpes Rm2, 2D2, 2D5 y 2DBf. Los resultados obtenidos, que se muestran en la tabla 28, demostraron claramente lo acertado de la hipótesis, puesto que las suspensiones AL1(2D2) y AL1(2D5) fueron capaces de originar placas líticas.

Tabla 28. Efecto de varias suspensiones del fago AL1 sobre las estirpes 2DA y Rm2.

Suspensión AL1	Efecto sobre 2DA	Efecto sobre Rm2
AL1(Rm2)	-	+
AL1(2D2)	p	+
AL1(2D5)	p	+
AL1(2DBf)	-	+

- = Resistencia. // + = Sensibilidad. // p = placas líticas sueltas.

El bacteriófago se enriqueció y purificó a partir de las placas líticas, realizándose con él las pruebas habituales - de caracterización, con el resultado de que demostró ser idéntico al fago f2D y, naturalmente, al AL1.

De acuerdo con estos resultados puede afirmarse que 2DA es capaz, en determinadas circunstancias, de modificar al fago AL1, lo que implica obviamente, que la resistencia de la estirpe para el citado AL1, está basada en un sistema de restricción.



DISCUSION



En el capítulo anterior se han expuesto los resultados obtenidos durante la realización de este trabajo y, al mismo tiempo, dichos resultados se han comentado más o menos extensamente, intentando resaltar su posible significado con referencia a los objetivos formulados en el Objeto del Trabajo, así como a las hipótesis propuestas para explicar los hechos observados.

En consecuencia, el presente capítulo de Discusión tiene como objeto el comentar brevemente y desde un punto de vista global, los resultados obtenidos y, sobre todo, y dada la aparente heterogeneidad de éstos, proponer postulados que los integren de forma coherente, recurriendo para ello a las informaciones que sobre el tema aporta la bibliografía especializada.

El primer resultado a destacar es la abundancia de bacteriófagos activos frente a R. meliloti, presentes en las muestras de suelo rizosférico en los que se cultiva regularmente la alfalfa. Este hecho demuestra suficientemente la coexistencia de dos poblaciones antagónicas, sin que, aparentemente, ninguna de las dos resulte eliminada, paradoja que lleva implícitas dos soluciones



alternativas: o bien el comportamiento de los bacteriófagos en el suelo no es el mismo que el que muestran en los medios de cultivo del laboratorio, o bien son las estirpes de R.meliloti las que han desarrollado los mecanismos oportunos para evitar ser eliminadas de la rizosfera de Medicago sativa.

Resulta evidente que ninguna de las dos alternativas es satisfactoria, ya que el alto número de bacteriófagos encontrado en la rizosfera sólo puede haberse obtenido por la multiplicación de éstos sobre las correspondientes estirpes sensibles y, además, no basta con que dicha multiplicación haya ocurrido, por así decirlo, una sola vez, sino que el mantenimiento de la población de fagos requiere el que constantemente se produzca el ciclo lítico productivo de nuevos viriones, ya que, en caso contrario, los fagos serían eliminados por el régimen de lavado del suelo, además de otras causas, como la adsorción inespecífica a partículas coloidales, etc. (Alexander,1977).

Por lo tanto, es necesario admitir que en la rizosfera de Medicago sativa, entendiéndolo por tal, la zona preferentemente colonizada por los Rhizobium, es decir, el mucigel o rizoplanea (Dart,1977), existe una población de R.meliloti sensible a los fagos, a costa de la cual, dichos bacteriófagos proliferan y se mantienen en números altos en la citada rizoplanea.

De otra parte, hay que destacar el hecho de que se detectaran y aislaran bacteriófagos en los nódulos radicales de los diversos hospedadores vegetales de R.meliloti. Ello concuerda con los resultados, ya muy antiguos, obtenidos por autores co

mo Demolon y Dunez y Vandecaveye y Katznelson (citados por — Allen y Allen, 1950), acerca de la capacidad de los bacteriófagos de R.meliloti para seguir a las estirpes de dicha especie hasta el interior del nódulo. Es necesario tener en cuenta, sin embargo, que no es posible asegurar la eficacia absoluta de la esterilización superficial de los nódulos por la solución de cloruro mercurico (Dart, 1977) por lo que, tanto los resultados obtenidos por los autores que se han citado, como los que se incluyen en esta Memoria, deben aceptarse con ciertas reservas.

En cualquier caso, resultado de los distintos ensayos efectuados sobre muestras de sudos rizosféricos y nódulos radicales, así como sobre estirpes silvestres de R.meliloti, fue el aislamiento de 13 bacteriófagos que se clasificaron en seis grupos distintos, de acuerdo con los parámetros utilizados en la caracterización, de la morfología de la nucleocápsica, espectro de actividad y caracteres morfológicos de las placas líticas. Este último parámetro puso de manifiesto la existencia de una alta proporción de fagos moderados, es decir, que originaban placas líticas turbias sobre la estirpe sensible, lo cual permitía suponer que — las asociaciones de tipo lisogénico yseudolisogénico serían frecuentes en las poblaciones silvestres de R.meliloti.

De entre los fagos aislados se eligieron seis, tres de ellos moderados y los otros tres virulentos, para ser utilizados en el fagotipado de las estirpes de R.meliloti. Previamente se comprobó la especificidad de dichos bacteriófagos, ensayándolos frente a estirpes de R.trifolii y R.leguminosarum, puesto que se

pretendía utilizar la sensibilidad a estos fagos como clave para la identificación de las nuevas estirpes, en sustitución del ensayo de infectividad.

Se fagotiparon un total de 271 estirpes, de las que 125 procedían de dos especies del género Medicago (M.sativa y M.lupulina) y 52 y 94, de nódulos radicales de Trigonella glauca y Melilotus parviflorus, respectivamente.

La muestra puede considerarse como heterogénea desde el punto de vista estadístico, en base a su procedencia geográfica y en base al número de estirpes examinadas en cada caso, por lo que no puede asegurarse que las proporciones obtenidas de los distintos fagotipos presentes en los nódulos de los hospedadores vegetales examinados, no resultarían alteradas al examinar muestras más homogéneas en cuanto a la procedencia geográfica ó al tamaño.

De otra parte, resulta evidente que no hay ningún fagotipo que pueda considerarse como característico de un hospedador determinado, sino que, como mucho, puede hablarse de la abundancia relativa de tal o cual fagotipo en los nódulos de un hospedador vegetal y siempre con las reservas debidas a la heterogeneidad de las muestras.

En lo que se refiere a la utilización de los bacteriófagos específicos para la identificación de las estirpes aisladas, como pertenecientes a R.meliloti, está claro que viene limitada por la existencia de estirpes que son resistentes a todos los bacteriófagos ensayados. Sin embargo, y teniendo en cuenta que dichas es

tirpes suponen un 30% del total, se convendrá en que con un 70% de las estirpes de un aislamiento hipotético, se puede evitar el tedioso ensayo de infectividad que, en términos de duración, supone de 20 a 30 días, como mínimo, mientras que el ensayo frente a los bacteriófagos queda resuelto en un máximo de 36 horas.

Por último, y como solución aún más cómoda para el problema de la identificación de estirpes, es necesario destacar el caso del bacteriófago DF2, activo, naturalmente, frente a todas las estirpes Fs y DF2s y, además, frente a un 56% de las estirpes Fa, con lo que resulta que un 64'56% del total de la muestra examinada es susceptible a su ataque. Por tanto, el citado fago es el idóneo para ser utilizado como instrumento en la clasificación de las estirpes aisladas "de novo", como pertenecientes a R.meliloti. Asimismo, y para concluir con el tema del fagotipado, los resultados obtenidos con las estirpes de la colección del laboratorio no alteran las conclusiones que se han expuesto más arriba, puesto que todas las estirpes de la citada colección son, con excepción de la sp57 y la 2DA, sensibles al fago DF2 y aún en el caso extremo de la citada 2DA, Fr, se dispone del fago f2D para su identificación como perteneciente a R.meliloti.

En cualquier caso, el hecho cierto es la abundancia de estirpes Fr y Fa en las poblaciones silvestres de R.meliloti, cuyo origen parecía problemático, como se demostró al contrastar las hipótesis de la mutación y la asociación fago-bacteria, como base para explicar la aparición de la resistencia a los fagos.

Una tercera posibilidad, concretamente la de la re-

lación entre los plásmidos y la sensibilidad a los bacteriófagos, merece una explicación aparte, puesto que en el caso de las estirpes 402 y 4c y Rm11 y 11c, es evidente la relación antes citada. Al mismo tiempo se comentará el problema del fenotipo M⁻, -equivalente a las mutaciones HD ("host defective") descritas en E.coli (Revel et al., 1980) y que, como se verá, se encuentra muy relacionado con el tema de los plásmidos.

El máximo exponente del fenotipo M⁻ es la estirpe 402, Fs, pero incapaz de multiplicar a los fagos VBP, LOO, AL1, SF2 y FAR y sí, en cambio, al DF2. De acuerdo con los resultados obtenidos por Palomares et al. (1978a) y Bedmar y Olivares (1979), dicha estirpe lleva un plásmido, el pEZ1, de 59 Mdal. de peso molecular y autotransmisible, que codifica para la síntesis de un exopolisacárido especialmente activo en la inducción de la enzima poligalacturonasa por las raíces de plántulas de Medicago sativa (Palomares et al., 1978b).

La estirpe 402 es susceptible de ser "curada" del citado plásmido por tratamiento con naranja de acridina, obteniéndose la estirpe 4c, no productora del exopolisacárido antes mencionado y además, de fagotipo DF2s, ya que es resistente a los fagos para los que la 402 era M⁻ y sensible, pero M⁻, para el propio DF2 (Corral et al., 1978).

Resulta, pues, evidente, que el plásmido pEZ1 lleva simultáneamente los caracteres S (Sensibilidad) y M (Multiplicación) para distintos bacteriófagos, ó, al menos, su presencia condiciona la expresión de dichos caracteres. Ahora bien, la es-

tirpe 402 no es sensible, "sensu stricto", lo cual la distingue — claramente de estirpes como la Rm11 que también lleva el pEZ1 — (Olivares, comunicación personal), pero que es FsM^+ para todos los bacteriófagos; este hecho llevaría a admitir que el mismo plásmido codifica en distintas estirpes los caracteres M^+ y M^- ó, alternativamente, que el pEZ1 de la estirpe 402 se encuentra alterado, bien por mutación ó por cualquier otra causa.

Entonces, ¿cómo se ha originado el fenotipo M^- y — por qué no han podido obtenerse más estirpes del tipo 4c y 11c?. Para responder a esta pregunta es necesario tener en cuenta los siguientes extremos:

La estirpe 402 no es la Rm4 que cita Palomares en sus trabajos (1975 y 1978a y b), sino un subcultivo obtenido a partir de un liofilizado de la citada Rm4, por lo que, en principio, no puede afirmarse que la 4c proceda de la actual 402. De otra parte, en lo que se refiere a la estirpe Rm11, el aislamiento original cedido igualmente por el Dpto. de Microbiología de la Estación Experimental del Zaidín, resultó ser una población contaminada con un bacteriófago, de la que se separaron por subcultivo y reaislamiento tres nuevas estirpes, la Rm11 actual, FsM^+ , la — Rm11w, no incluida en esta Memoria y caracterizada por una respuesta alterada a los seis bacteriófagos, consistente en que todos ellos originan halos de lisis muy turbios (pero no se ha comprobado que se trate de una estirpe M^-) y, finalmente, la estirpe — sp57, resistente al fago DF2 y sensible, aunque con la misma particularidad que la Rm11w, a los otros cinco fagos. Por lo tanto,

tampoco puede asegurarse que la estirpe 11c se obtuviera por curación de la Rm11 actual.

En suma, lo que se sugiere es que el citado tratamiento con NA sólo sería efectivo sobre estirpes que estarían presenten en los aislamientos originales obtenidos por Palomares, pero que no son, en modo alguno, las actuales 402 y Rm11; por el contrario, se trataría de las estirpes "inestables" que aparecen en las poblaciones contaminadas con fagos. En este sentido, no hace falta repetir lo que se ha dicho acerca de la estirpe Rm11 y, en lo que respecta a la 402, se dispone de una evidencia segura de que tuvo su origen en una contaminación con bacteriófagos. Dicha evidencia la constituye la estirpe 2D5, obtenida de la interacción Rm2-DF2 y que es M^- para el fago VBP, además de mostrar un comportamiento variable, restrictivo, para el propio DF2.

Así pues, y a modo de resumen, se propone el siguiente proceso para explicar la aparición de las estirpes curadas:

- Estirpes FsM^+ $pEZ1^+$, contaminadas con bacteriófagos.
- Aparición en las poblaciones anteriores de estirpes que, como consecuencia de la interacción con los bacteriófagos, llevan un plásmido inestable, susceptible de ser eliminado por el tratamiento con el NA. Por tanto, si éste se lleva a cabo, aparecerán estirpes del tipo 4c y 11c.
- Como se demostró en el capítulo de Resultados, al aislar clones a partir de los cultivos contaminados con bacteriófagos, aparecen

estirpes Fa, que son, por tanto, las equivalentes de la Rm11w y la sp57, mencionadas más arriba. Naturalmente, dichas estirpes, libres de la contaminación con los fagos son perfectamente estables y no son susceptibles de curación por el NA.

De acuerdo con lo que se ha expuesto acerca de la hipótesis de los plásmidos, resulta evidente que el caso de las estirpes 402 y 4c y Rm11 y 11c, aunque muy atrayente, debe ser considerado como particular, puesto que no se dispone de evidencia alguna que permita asegurar la existencia del plásmido pEZ1 en otras estirpes, sea cual sea su fagotipo.

La obtención de estirpes Fr y Fa se intentó mediante el tratamiento con NTG, sin resultado positivo; no obstante, y puesto que no se había optimizado previamente el citado tratamiento, no es posible afirmar que las estirpes resistentes no puedan obtenerse por un fenómeno de mutación.

Pese a este resultado negativo, se investigaron una serie de estirpes que presentaban una morfología colonial alterada, con objeto de descubrir si existía alguna conexión entre este carácter y la aparición de resistencia a uno o varios bacteriófagos.

Como se expuso en el apartado 3.3.2., la aparición del morfotipo B se corresponde bien con los fenómenos clásicos de mutación y no está relacionado en absoluto con la alteración en el fagotipo, ya que las estirpes en cuestión muestran invariablemente el mismo patrón de resistencia o sensibilidad que las estirpes A

de procedencia. Es interesante hacer notar a este respecto, que las estirpes de morfotipo B aparecen espontáneamente en los cultivos en forma A y que, además, acaban predominando sobre éstas en el transcurso de unos pocos subcultivos. Tal circunstancia podría indicar que el morfotipo B aparece como consecuencia de una mutación que afectaría la producción de exopolisacárido y que capacita a dichas estirpes para competir ventajosamente con las A, en los medios de cultivo de laboratorio. Del mismo modo, y ante el hecho de que no se aíslan estirpes de morfotipo B a partir de los nódulos radicales, habría que admitir que el exopolisacárido típico de las estirpes silvestres confiere algunas ventajas selectivas para dichas estirpes, en el hábitat natural.

En lo que se refiere al morfotipo Bf, fue más difícil demostrar que su aparición no iba asociada a cambios concretos en el fagotipo. La dificultad principal consistió en que no pudieron obtenerse estirpes Bf de forma espontánea, a partir de estirpes A ó B, sino que sólo se detectaron en las experiencias de selección con los fagos virulentos. Pese a todo, los resultados obtenidos al estudiar las características de las estirpes Bf, así como su génesis en los cultivos de estirpes A inoculados con fagos virulentos, pusieron de manifiesto que, al igual que el morfotipo B, el Bf es el resultado de una mutación que afecta también a la producción del exopolisacárido, pero que sólo resulta seleccionada en los medios de cultivo si al mismo tiempo se selecciona con algún fago virulento. La razón de este comportamiento estriba en que las estirpes Bf son menos susceptibles al ataque de los bacte

riófagos, por lo que es lógico que en los cultivos de estirpes A ó B inoculados con fagos, resulten favorecidas las estirpes Bf, frente a las citadas A y B.

Así pues, los morfotipos B y Bf constituyen dos — ejemplos claros de mutación que, si bien alteran las estructuras — superficiales de las células, no suponen cambios en el fagotipo de las estirpes afectadas, aunque en el caso concreto del morfotipo Bf, dicha mutación supone, por razones desconocidas, una cierta resistencia al ataque de los fagos.

Al contrario que el tratamiento con NTG, la utilización de los bacteriófagos para obtener estirpes resistentes sí dio el resultado apetecido y aún superó cualquier expectativa, ya que en las experiencias llevadas a cabo en medio sólido lo que se obtuvo fue el cambio del fagotipo Fs a Fr, en toda la población bacteriana y sin que se observara, por otra parte, una reducción en el crecimiento de las estirpes sobre las que se estaba llevando a cabo la selección. Es evidente que este comportamiento no se corresponde en absoluto con un fenómeno de mutación, sino que, por el contrario, sería análogo al de una población bacteriana en contacto con un bacteriófago capaz de establecer con ella una asociación de cualquier tipo.

Por otra parte, en los ensayos en caldo, el comportamiento de las estirpes sensibles inoculadas con fago es similar, en cuanto al resultado, al que se ha descrito para los medios sólidos, si bien, en el citado caso del medio líquido, sí se observó una reducción importante en el número de células viables.



Por último, y aparte del hecho de que no se detectaron estirpes Fa ó Fr en los cultivos no inoculados con fago, es necesario destacar que en las experiencias llevadas a cabo con el fago DF2 y la estirpe Rm2, en caldo, se obtuvo un conjunto de estirpes que presentaban todas las gradaciones de resistencia ó sensibilidad a los seis fagos ensayados, desde la resistencia a un solo bacteriófago, hasta la resistencia a todos ellos.

Como ya se ha dicho antes, todos los fenómenos observados en relación a la aparición de estirpes resistentes, durante la selección con bacteriófagos, conducen a descartar la mutación y conceden, en cambio, mayor crédito a la asociación fago-bacteria, como base de la resistencia a los fagos.

De acuerdo con ello, se investigó, según los métodos clásicos, la posibilidad de la asociación lisogénica y pseudolisogénica en una muestra de estirpes Fs, Fa y Fr, de distinta procedencia. El resultado de estos ensayos puso de manifiesto la ausencia de estirpes lisogénicas en la muestra examinada, pese a que se había encontrado anteriormente que los bacteriófagos AL1 y SF2 eran capaces de establecerse lisogénicamente en la estirpe sensible Rm2.

De otra parte, sí fueron relativamente abundantes los casos de asociación pseudolisogénica, pero dadas las características inestables de la mayoría de las asociaciones, se interpretó que eran debidas a contaminaciones accidentales durante la fase de aislamiento de las estirpes; como es obvio, este hecho concuerda perfectamente con la abundancia de bacteriófagos en la ri-

zosfera y en los nódulos radicales de los distintos hospedadores vegetales. Finalmente, se encontraron dos estirpes, v47 y hv21, asociadas de formaseudolisogénica con bacteriófagos moderados, aunque en el caso concreto de la estirpe hv21 casi podría hablarse de una asociación críptica, dadas las especiales características del fago fhv.

En resumen, los resultados obtenidos al estudiar la posibilidad de la asociación fago-bacteria excluyen claramente a la lisogenia clásica como fenómeno de importancia en la aparición de estirpes resistentes, en contra de los resultados obtenidos por Kowalski (1966), mientras que las asociacionesseudolisogénicas típicas, como en el caso de la estirpe v47 ó más extrañas, como en el caso de la hv21, sí podrían tener un papel relevante en la génesis de estirpes Fa y, quizá, Fr.

Se llegó así al estudio de las propiedades de las estirpes resistentes con objeto de averiguar, al menos, la base fisiológica de la resistencia. El resultado obtenido en tales estudios puede resumirse como sigue:

- La resistencia a los bacteriófagos no está basada en la alteración de los receptores celulares para dichos fagos, como lo demuestra el que las estirpes Fa y Fr continúen adsorbiendo a los fagos para los que han ganado la resistencia.
- El carácter resistente no es estable, sino que es susceptible de reversión, temporalmente, durante y como consecuencia de la interacción de las estirpes Fa y Fr con un bacteriófago moderado.

Los dos resultados que se han expuesto y sobre todo, el segundo, constituyen otras tantas evidencias en contra de la mutación como base de la resistencia. Es, sin duda, muy curioso que el carácter resistente se pierda temporalmente como consecuencia de la interacción con un fago moderado; esta circunstancia podría interpretarse en el sentido de que dicho fago moderado suprime la actividad de algún elemento genético que se estuviese expresando en ese momento en la célula y que fuese la causa de la resistencia.

Puesto que se había demostrado que la base de la resistencia era intracelular, era lógico investigar los fenómenos de restricción, ya que, caso de demostrarse su existencia, quedaría explicada la resistencia a los fagos y, al mismo tiempo, la posibilidad de la reversión temporal en las condiciones antes citadas.

El ejemplo más claro de estirpe restrictora es, sin duda, la 2D5, obtenida a partir de la sensible Rm2, mediante selección con el fago DF2. Esta estirpe restringe notablemente al propio DF2, al tiempo que es M^- para el fago VBP. Hay que destacar, además, el hecho de que sólo modifica al fago DF2 cuando éste se ha multiplicado previamente en la estirpe 2D2, obtenida igualmente a partir de la interacción Rm2-DF2 y ligeramente restrictora para este fago.

De otra parte, la estirpe 2DA, Fr y obtenida también de la interacción Rm2-DF2, es capaz de modificar al fago AL1, que pasa a ser el f2D, pero sólo cuando el citado AL1 se ha

enriquecido sobre las estirpes 2D2 ó 2D5, es decir, muestra un comportamiento análogo al del fago DF2 para las estirpes 2D2 y 2D5.

Parece claro, por tanto, que las estirpes 2D2, 2D5 y 2DA han ganado un sistema de restricción supernumerario pero, y esto es lo más sorprendente, que actúa sobre distintos bacteriófagos y con intensidad también diferente.

Sin embargo, las tres estirpes se obtuvieron de la misma forma, por interacción de la estirpe sensible Rm2 con el fago virulento DF2 y, en consecuencia, a la hora de preguntarse sobre el origen del citado sistema de restricción, es lógico pensar que sea debido a la actividad del fago, lo cual, obviamente, lleva implícito admitir que se ha establecido una asociación entre la estirpe sensible y el citado bacteriófago.

Por desgracia, no se han obtenido evidencias, utilizando los métodos clásicos, de que exista realmente dicha asociación. Esta falta de resultados lleva a suponer que el fago se ha establecido en la célula de una forma críptica, o bien, que la asociación es defectiva, con lo cual no llegarían a formarse partículas infectivas en aquellas células en que se produjese la "inducción" espontánea.

En cualquier caso, admitiendo que se haya producido la asociación entre el fago y la bacteria, queda por explicar el distinto comportamiento de las estirpes 2D2, 2D5 y 2DA. En este tema sólo es posible especular, aunque partiendo, naturalmente, de los resultados que se han expuesto en el capítulo anterior:

- La génesis de las estirpes Fr durante las experiencias llevadas a cabo con la estirpe Rm2 y el fago DF2, se demostró que era un proceso secuencial, caracterizado por la aparición de estadios intermedios, de fagotipo Fa. Dichos fagotipos Fa, varían desde la aparición del fenotipo M⁻ para un fago, hasta la resistencia a cinco de los seis bacteriófagos utilizados.
- Asimismo, se puso de manifiesto que las estirpes Fa son estables en ausencia del bacteriófago, continuando, en cambio, su evolución hacia el fagotipo Fr, al ser cultivadas nuevamente en presencia del bacteriófago.

En consecuencia, el citado proceso secuencial puede interpretarse como debido a la acumulación en las estirpes Fs, primero y Fa, después, de copias del ADN del fago, por reinfecciones sucesivas, es decir, las estirpes Fa de fagotipo distinto, serían otros tantos exponentes de estirpes que llevarían 1, 2, 3,n moléculas del ADN del bacteriófago.

El efecto de esta acumulación de ADN del fago sería, lógicamente, el aumento en el número de moléculas de endonucleasa presentes en el citoplasma bacteriano, con lo cual, en las estirpes Fr, ningún bacteriófago se vería libre de sufrir el ataque de dichas endonucleasas.

Como argumento a favor de esta hipótesis pueden citarse los trabajos de Staniewski y Kowalski (1965), quienes demostraron que las alteraciones en el fagotipo de estirpes lisogénicas de R. meliloti eran debidas no al establecimiento de la asocia

ción lisogénica, sino al número de copias del ADN del fago que -
consiguieran establecerse en la célula.

En resumen, lo que se postula es que el bacteriófago DF2 y, puesto que se comportan igual que él, los LOO y FAR, no son bacteriófagos virulentos en el sentido estricto de la palabra, sino que son capaces de establecer asociaciones, con una - frecuencia todo lo baja que se quiera, con las estirpes sensibles que infectan. Como consecuencia de dichas asociaciones aparecen nuevos caracteres fenotípicos, precisamente la capacidad de restringir, no sólo al propio bacteriófago asociado, lo cual constituye una inmunidad muy "sui generis", sino a otro número de bacteriófagos no relacionados con el primero.

Finalmente, hay que decir que el hecho de la asociación no ha sido demostrado de forma directa, pero que su existencia se hace necesaria para explicar los fenómenos observados. Por otra parte, el modo en que se lleva a cabo tal asociación, sea - por integración en el cromosoma bacteriano, por unión a sitios de membrana, integración en algún plásmido autóctono o permanencia en el citoplasma bacteriano como un nuevo plásmido, así como, a otro nivel, el efecto de la asociación sobre los caracteres simbióticos de las estirpes asociadas, son el objeto y la continuación previsible de los trabajos que se han expuesto en esta Memoria.



CONCLUSIONES



- 1ª) Tanto en la rizosfera como en los nódulos radicales de plantas del grupo de inoculación de Rhizobium meliloti, se encuentran bacteriófagos activos frente a las estirpes de la citada especie en número lo suficientemente elevado como para permitir su detección sin necesidad de enriquecimiento previo.
- 2ª) Mediante las técnicas adecuadas se han aislado y purificado un conjunto de 13 bacteriófagos activos frente a R.meliloti, de entre los que se seleccionaron 6, diferenciables por su estructura, capacidad para lisar o no lisar a las distintas estirpes de prueba empleadas y caracteres de las placas líticas que producen, con objeto de ser utilizados en las experiencias de fagotipado.
- 3ª) Dada la especificidad de los bacteriófagos empleados en el fagotipado, se considera que éste constituye un método rápido y eficaz para la identificación de las estirpes de R.meliloti, a pesar de las limitaciones impuestas por la existencia de estirpes resistentes.
- 4ª) La aparición de alteraciones en la morfología colonial de las estirpes de R.meliloti no supone un cambio concreto en el fagotipo de dichas estirpes. Por el contrario, la presencia de un plásmido ADN (pEZ1), condiciona la sensibilidad a varios bacteriófagos en las estirpes que llevan el citado pEZ1.



- 5^a) La heterogeneidad en el fagotipo de las estirpes ensayadas - no parece ser debida a fenómenos de mutación ó al establecimiento de asociaciones lisogénicas ó pseudolisogénicas de tipo clásico.
- 6^a) La interacción de estirpes sensibles con bacteriófagos virulentos da lugar a la aparición de clones progresivamente resistentes, no sólo a los bacteriófagos en cuestión, sino a otros no relacionados con los mismos. No obstante, dichos clones pueden revertir a sensibles, de forma temporal, por interacción con un bacteriófago moderado.
- 7^a) Se interpreta que estos fenómenos, así como la heterogeneidad del fagotipo de las estirpes silvestres de R. meliloti, son debidos al establecimiento de una asociación críptica entre los bacteriófagos virulentos y la estirpe sensible y que la actividad del bacteriófago de que se trate, en dicha asociación, sería la implantación de un sistema de restricción altamente efectivo que condicionaría la resistencia de las estirpes asociadas, tanto al bacteriófago en cuestión, como a otros bacteriófagos no relacionados con él.

BIBLIOGRAFIA



- ACKERMANN, H.V. 1978. La classification des phages d'Agrobacterium et Rhizobium. Patol.Biol., 26, 507.
- ADAMS, M.H. 1966. Bacteriophages. Ed. J. Wiley and Sons.
- ALEXANDER, M. 1977. Soil Microbiology. Ed. J. Wiley and Sons.
- ALLEN, E.K. y ALLEN, O.N. 1950. Biochemical and symbiotic properties of Rhizobia. Bact.Rev. 14, 273.
- APPLEBY, C.A. 1969. Electron transport systems of Rhizobium japonicum. Biochim.Biophys.Acta. 172, 71.
- APPLEBY, C.A. 1974. Leghaemoglobin. En "Biology of nitrogen — fixation". Ed. A.Quispel. North Holland Publ., 521.
- ARBER, W. 1965. Host controlled modification of bacteriophages. Ann.Rev.Microbiol. 19, 365.
- ARBER, W. y DUSSOIX, D. 1962. Host specificity of deoxyribonucleic acid produced by E.coli. I. Host controlled modification of bacteriophage. J.Mol.Biol. 5, 18.
- ATKINS, G.H. y HAYES, A.H. 1972. Surface changes in a strain of R.trifolii on mutation to bacteriophage resistance. J.gen.Microbiol. 73, 273.
- BARKSDALE, L. y ARDEN, S.B. 1974. Persisting bacteriophage infections, lysogeny and phage conversions. Ann.Rev.Microbiol. 28, 265.
- BARNET, Y. y VINCENT, J.M. 1970. Lysogenic conversion of R.trifolii. J.gen.Microbiol. 61, 319.
- BEDMAR, E.J. y OLIVARES, J. 1979. Nitrogen fixation (acetylene reduction) by free-living Rhizobium meliloti. Curr.Microbiol. 2, 11.

- BEDMAR, E.J. y OLIVARES, J. 1979. Autotransmissible resident plasmid of R.meliloti. Molec.gen.Genet. 174, 203.
- BENDER, R.A. y MAGASANIK, B. 1977. Regulatory mutations in the structural gene for Glutamine synthetase. J. Bacteriol. 132, 100.
- BENDER, R.A.; JANSSEN, K.A.; RESNICK, A.D.; BLUMENBERG, M.; FOOR, F. y MAGASANIK, B. 1977. Biochemical parameters of Glutamine synthetase from Klebsiella aerogenes. J.Bacteriol. 129, 1001.
- BERGERSEN, F.J. 1977. Physiological chemistry of dinitrogen — fixation. En "A treatise on dinitrogen fixation". Ed. R.W.F. Hardy y S.Silver. Wiley Interscience. 519.
- BERGERSEN, F.J. 1978. Physiology of legume symbiosis. En "Interactions between non-pathogenic soil microorganisms and plants." Ed. Y.R.Dommergues y S.V. Krupa. Elsevier Publ. Amsterdam. 305.
- BISHOP, P.E.; DAZZO, F.B.; APPLEBAUM, E.R.; MAIER, R.J. y BRILL, W.J. 1977. Intergeneric transfer of genes involved in the Rhizobium-legume symbiosis. Science. 198, 938.
- BONISH, P.M. 1973. Pectolytic enzymes in inoculated and uninoculated red clover seedlings. Plant Soil. 39, 319.
- BOOHLOOL, B.B. y SCHMIDT, E.L. 1974. Lectins: A possible basis for specificity in the Rhizobium-legume root nodule symbiosis. Science, 185, 269.
- BOOHLOOL, B.B. y SCHMIDT, E.L. 1976. Immunofluorescent polar tips of Rhizobium japonicum: possible site of attachment of lectin binding. J.Bacteriol. 125, 1184.

- BOYER, H.W. 1971. DNA restriction and modification mechanisms in bacteria. *Ann.Rev.Microbiol.* 25, 153.
- BROUGHTON, W.J. 1978. Control of specificity in legume-Rhizobium associations. *J.Appl.Bacteriol.* 45, 165.
- BROWN, C.M. y DILWORTH, M.J. 1975. Ammonium assimilation - by Rhizobium cultures and bacteroids. *J.gen.Microbiol.* 86, 38.
- CASADESUS, J. y OLIVARES, J. 1978. Rough and fine linkage mapping in Rhizobium meliloti. *Molec.gen.Genet.* 174, 203.
- CASADESUS, J. y OLIVARES, J. 1979. General transduction in R.meliloti by a thermosensitive mutant of bacteriophage DF2. *J.Bacteriol.* 139, 316.
- CASSE, F.; BOUCHER, C.; JULLIOT, J.S.; MICHEL, M. y DENARIE, J. 1979. Identification and characterization of large plasmids in Rhizobium meliloti using agarose gel electroforesis. *J.gen.Microbiol.* 113, 229.
- CHEN, A.P.T. y PHILLIPS, D. 1976. Attachment of Rhizobium to legume roots as the basis for specific interactions. *Physiol. Plant.* 38, 83.
- COLLINS, J. 1977. Gene cloning with small plasmids. *Curr. Top. Microbiol.Immunol.* 78, 121.
- CORRAL, E.; MONTOYA, E. y OLIVARES, J. 1978. Sensitivity to phages in Rhizobium meliloti as a plasmid consequence. *Microbios lett.* 5, 77.
- CURRIER, W.W. y STROBEL, G.A. 1976. Chemotaxis of Rhizobium spp. to plant root exudates. *Plant Physiol.(Lancaster)*, 57, 820.

- DARBYSHIRE, J.F. 1966. Studies on the physiology of nodule - formation. *Ann.Bot.* 30, 623.
- DART, P. 1977. Infection and development of leguminous nodules. En "A treatise on dinitrogen fixation". Ed. R.W.F. Hardy y S.Silver. Wiley Interscience. 367.
- DAZZO, F.B.; NAPOLI, C.A. y HUBBELL, D.H. 1976. Adsorption of bacteria to roots as related to host specificity in the Rhizobium-clover symbiosis. *Appl. Environ.Microbiol.* 32, 116.
- DAZZO, F.B.; URBANO, M.R. y BRILL, W.J. 1979. Transient appearance of lectin receptors on R.trifolii. *Curr. Microbiol.* 2, 15.
- DE LEY, J. y RASSEL, A. 1965. DNA base composition, flagellation and taxonomy of the genus Rhizobium. *J.gen. Microbiol.* 41, 85.
- DE LEY, J. 1968. DNA base composition and hybridisation in the taxonomy of phytopathogenic bacteria. *Ann.Rev.Phytopathol.* 6, 63.
- DILWORTH, M.J. 1966. Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations of Clostridium pasteurianum. *Biochim. — Biophys.Acta.* 127, 285.
- DIXON, R.O.D. 1969. Rhizobia (with particular reference to relationships with host plants). *Ann.Rev.Microbiol.* 23, 137.
- DOMMERGUES, Y. y MANGENOT, F. 1970. *Ecologie microbienne du sol.* Masson et Cie. Paris.
- DUNICAN, L.K.; O'GARA, F. y TIERNEY, A.B. 1976. Plasmid control of effectiveness in Rhizobium: transfer of nitrogen fixing genes on a plasmid from R.trifolii

- to Klebsiella aerogenes. En "Symbiotic nitrogen — fixation in plants. Ed. P.S.Nutman. Cambridge University Press. 77.
- DUNN, S.D. y KLUCAS, S.V. 1973. Studies on possible routes — of ammonium assimilation in soybean root nodule — bacteroids. Can. J. Microbiol. 19, 1493.
- FERNANDEZ VIVAS, M.A. 1979. Estudios sobre bacteriófagos de R. trifolii y R. leguminosarum. Tesina de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Granada.
- FRASER, D.K. 1957. Host range mutants and semitemperate mutants of bacteriophage T3. Virology. 3, 527.
- GRAHAM, P.H. 1964. The application of computer techniques to — the taxonomy of root nodule bacteria of legumes. J. gen. Microbiol. 35, 511.
- GRAHAM, P.H. 1976. Identification and classification of root nodule bacteria. En "Symbiotic nitrogen fixation in plants" Ed. P.S. Nutman. Cambridge University Press. 99.
- HAMBLIN, J. y KENT, S.P. 1973. Possible role of phytohaemagglutinin in Phaseolus vulgaris. Nat. New Biol. (London). 245, 28.
- HEBERLEIN, G.T.; DE LEY, J. y TIJTGAT, R. 1967. DNA and taxonomy of Agrobacterium, Rhizobium and Chromobacterium. J. Bacteriol. 94, 116.
- HIGASHI, S. 1967. Transfer of clover infectivity of R. trifolii to R. phaseoli as mediated by an episomic factor. J. — Appl. Microbiol. 13, 391.
- HIRSCH, P.R. 1979. Plasmid-determined bacteriocin production by Rhizobium leguminosarum. J. gen. Microbiol. 113, 356.

- HOCH, G.; SCHNEIDER, K.C. y BURRIS, R.H. 1960. Hydrogen evolution and exchange and conversion of N_2O to N_2 by soybean root nodules. *Biochim. Biophys. Acta.* 222, 135.
- HOMBRECHER, G. y BREWIN, N.J. 1979. Studies on the binding of pea seed lectins to species and strains of Rhizobium. *Int. Symp. Nitrogen Fixation*. Brighton. U.K.
- HUBBELL, D.H. 1970. Studies on the root hair "curling factor" of Rhizobium. *Bot. Gaz.* 131, 337.
- HUBBELL, D.H.; MORALES, V.M. y UMALI-GARCIA, M. 1978. Pectolytic enzymes in Rhizobium. *Appl. Environ. Microbiol.* 35, 210.
- JOHSTON, A.W.B.; BEYNON, J.L.; BUCHANAN-WOOLLASTON, A.V.; SETCHELL, S.M.; HIRSCH, P.R. y BERINGER, J.E. 1978. High frequency transfer of nodulating ability between strains and species of Rhizobium. *Nature* — (London), 276, 634.
- JORDAN, D.C. y ALLEN, O.N. 1974. Family III: Rhizobiaceae, Conn. 1938. En "Bergey's Manual of determinative Bacteriology" 8ª Ed. Williams and Wilkins Co.
- KAUSS, H. y BOWLES, D.J. 1976. Some properties of carbohydrate-binding proteins (lectins) solubilized from — cell walls of Phaseolus aureus. *Planta* (Berlin), — 130, 169.
- KEISTER, K.L. 1975. Acetylene reduction by pure cultures of — Rhizobia. *J. Bacteriol.* 123, 1265.
- KENNEDY, I.R. 1970. Kinetics of acetylene and CN^- reduction by the N_2 -fixing system of Rhizobium lupini. *Biochim. Biophys. Acta.* 222, 135.

- KINGDOM, H.J.; SHAPIRO, B.M. y STADTMAN, E.R. 1967. Regulation of Glutamine synthetase.VIII. ATP Glutamine synthetase adenylyltransferase. Proc.Natl. — Acad.Sci.U.S.A. 58, 1703.
- KLECZKOWSKA, J. 1945. A quantitative study of the interaction of bacteriophage with Rhizobium, using the technique of poured plates.J.Bacteriol. 50, 81.
- KLECZKOWSKA, J. 1950. A study of phage-resistant mutants of — R.trifolii. J.gen.Microbiol. 4, 298.
- KLECZKOWSKA, J. 1971. Genetical changes in Rhizobium bacteria and their bacteriophages during coexistence. Plant Soil. special vol.,47.
- KLECZKOWSKI, J. y KLECZKOWSKI, A. 1952. Effect of specific polysaccharides from the host bacteria and of ribonuclease on the multiplication of Rhizobium phages. J.gen.Microbiol. 7, 340.
- KLECZKOWSKI, J. y KLECZKOWSKI, A. 1953. The behaviour of Rhizobium bacteriophages during and after exposure to ultraviolet radiation. J.gen.Microbiol. 8, 135.
- KLECZKOWSKI, J. y KLECZKOWSKI, A. 1954. A study of the mechanism of inhibition of bacteriophage multiplication by chymotrypsin.J.gen.Microbiol. 10, 285.
- KLECZKOWSKI, J. y KLECZKOWSKI, A. 1954. The effect of ribonuclease on phage-host interaction.J.gen.Microbiol. 11, 451.
- KLECZKOWSKI, J. y KLECZKOWSKI, A. 1959. The effect of infection with bacteriophage on the electrokinetic potential of Rhizobium leguminosarum.J.gen.Microbiol. 21, 308.



- KOCH, B. y EVANS, H.J. 1966. Reduction of acetylene to ethylene by soybean root nodules. *Plant Physiol.* 47, 1748.
- KOCH, B.; WONG, P.; RUSSELL, S.A.; HOWARD, R. y EVANS, H.J. 1970. Purification and some properties of a nonheme iron protein from the bacteroids of soybean (*Glycine max.*) nodules. *Biochem. J.* 118, 773.
- KONDOROSI, A.; SVAB, Z.; KISS, G.B. y DIXON, R.O.D. 1977. Ammonia assimilation and nitrogen fixation in *Rhizobium meliloti*. *Molec. gen. Genet.* 151, 221.
- KOWALSKI, M. 1966. Lysogeny in *Rhizobium meliloti*. 1966. *Acta Microbiol. Polon.* 15, 119.
- KOWALSKI, M. 1967. Transduction in *R. meliloti*. *Acta Microbiol. Polon.* 16, 7.
- KOWALSKI, M. 1970. Genetical analysis by transduction of *R. meliloti* mutants with changed symbiotic activity. *Acta Microbiol. Polon.* 2, 115, 1970.
- KOWALSKI, M. y DENARIE, J. 1972. Transduction d'un gen contrôlant l'expression de la fixation de l'azote chez *R. meliloti*. *C.R. Acad. Sci. Paris. Ser. D.* 275, 141.
- KOWALSKI, M.; STANIEWSKI, R. y ZIEMIECKA, J.M. 1963. Recent polish studies on Rhizobiophages. *Ann. Inst. Pasteur.* 105, 237.
- KRSMANOVIC-SIMIC, D. y WERQUIN, M. 1973. Etude des bacteriophages de *Rhizobium meliloti*. *C.R. Acad. Sci. Paris.* 276, 2745.
- KURZ, W.G.W.; ROKOSH, D.A. y LARUE, T.A. 1975. Enzymes of ammonia assimilation in *Rhizobium leguminosarum*. *Can. J. Microbiol.* 21, 1009.

- LABENDRA, C.A. y VINCENT, J.M. 1975. Competition between - an introduced strain and native Uruguayan strains of Rhizobium trifolii. *Plant Soil.* 42, 327.
- LANGE, R.T. 1961. Nodule bacteria associated with the indigèous leguminosae of South Western Australia. *J.gen.Microbiol.* 26, 351.
- LANGE, R.T. 1966. *Symbiosis*. Ed.S.M.Henry. 1, 99.
- LAW, I.J. y STRIJDOM, B.W. 1977. Some observations on plant lectins and Rhizobium specificity. *Soil Biol.Biochem.* 9, 79.
- LEDEBOER, A.M.; KROLL, A.J.; DONS, J.J.M.; SPIER, F.; - SCHILPEROORT, R.A.; ZAENEN, I.; LAREBEKE, N.van, y - SCHELL, J. 1976. On the isolation of Ti plasmid from Agrobacterium tumefaciens. *Nucl.Ac.Res.* 3, 449.
- LIBBENGA, K.R. y TORREY, J.G. 1973. Hormone-induced endoreplication prior to mitosis in cultured pea root cortex cells. *Am.J.Bot.* 60, 293.
- LILLICH, T.T. y ELKAN, G.H. 1968. Evidence countering the role of polygalacturonase in invasion of root hairs of leguminous plants by Rhizobium spp. *Can.J.Microbiol.*; 14, 617.
- LJUNGGREN, H. 1969. Mechanism and pattern of Rhizobium invasion into leguminous root hairs. *Physiol.Plant.*, - suppl. V.
- LJUNGGREN, H. y FAHRAEUS, G. 1959. Effect of Rhizobium polysaccharide on the formation of polygalacturonidase in lucerne and clover. *Nature*, 184, 1578.
- LOTZ, W. y MAYER, F. 1972. Isolation and characterization of a phage tail-like bacteriocin from a strain of Rhizidium. *J.Virol.* 9, 160.

- LUDWIG, R.A. 1978. Control of ammonium assimilation in Rhizobium 32H1. J. Bacteriol. 135, 114.
- LUDWIG, R.A. y SIGNER, E. 1977. Glutamine synthetase and control of nitrogen fixation in Rhizobium. Nature, 267 245.
- LWOFF, A. 1953. Lysogeny. Bact. Rev. 17, 269.
- MACGREGOR, A.N. y ALEXANDER, M. 1972. Comparison of nodulating and non-nodulating strains of R. trifolii. Plant Soil. 36, 129.
- MARSHALL, K.C. 1956. A lysogenic strain of R. trifolii. Nature, - 177, 92.
- MCCOMB, J.A.; ELLIOT, J. y DILWORTH, M.J. 1975. Acetylene reduction by Rhizobium in pure culture. Nature, - 256, 409.
- MERCER, E.H. y BIRBECK, M.S.C. 1974. Manual de Microscopía electrónica para Biólogos. Ed. Blume.
- MINCHIN, F.R. y PATE, J.S. 1973. Carbon balance of a legume and the functional economy of its roots nodules. J. Exp. Bot. 24, 259.
- MOFFET, M.L. y COLWELL, R.R. 1968. Adansonian analysis of the Rhizobiaceae. J. gen. Microbiol. 51, 245.
- NAPOLI, C.A. y HUBBELL, D.H. 1975. Ultrastructure of Rhizobium-induced infection threads in clover root hairs. Appl. Microbiol. 30, 1003.
- NORRIS, D.O. 1965. Acid production by Rhizobium, a unifying concept. Plant Soil, XXII, 143.

- NUTI, M.P.; CANNON, F.C.; PRAKASH, R.K.; LEPIDI, A.A. y SCHILPEROORT, R.A. 1979. Extrachromosomal location of symbiotic genes in Rhizobium. VII North Ann. Rhiz. Conf. Houston.
- NUTI, M.P.; LEPIDI, A.A.; PRAKASH, R.K.; HOOYKAAS, P.J.J. y SCHILPEROORT, R.A. 1980. Preprint enviado al J. Mol. Biol. - Plant Tumours. Ed. G. Kohland y J. Schell. Acad. - Press.
- NUTMAN, P.S. 1965. The relation between nodule bacteria and the legume host in the rizosphere and the infection process. En "Ecology of soil-borne plant pathogens". Ed. K.F. Baker y W.C. Sijnder. Univ. of California Press. Berkeley. 231.
- NUTMAN, P.S. 1975. Rhizobium in the soil. En "Soil Microbiology". Ed. N. Walker. Butterworths Publ. 111.
- NUTMAN, P.S. 1977. Study frameworks for symbiotic nitrogen fixation. En "Recent developments in nitrogen fixation". Ed. W. Newton, J.R. Postgate y C. Rodríguez-Barrueco. Acad. Press. 443.
- O'GARA, F. y SHANMUGAN, K.T. 1976. Control of symbiotic nitrogen fixation in Rhizobia. Regulation of NH_4 assimilation. Biochim. Biophys. Acta. 451, 342.
- OLIVARES, J. 1964. Algunos aspectos de la simbiosis leguminosa-Rhizobium y aplicación al estudio de la misma de los anticuerpos fluorescentes. Ars. Pharm. 5, 3.
- OLIVARES, J. 1977. Algunos aspectos de la asociación Rhizobium-leguminosa: Especificidad e Infectividad. En "Aspectos actuales de las relaciones huésped-parásito e intermicrobianas". Ed. A. Portolés y F. Baquero. Soc. Esp. Microbiol. 305.

- OLIVARES, J.; MONTOYA, E. y PALOMARES, A. 1977. Some effects derived from the presence of extrachromosomal DNA in R.meliloti. En "Recent developments in nitrogen fixation". Ed. W.Newton, J.R. Postgate y C.Rodríguez-Barrueco. 375.
- OLIVARES, J.; CASADESUS, J. y BEDMAR, E.J. 1980. Method for testing degree of infectivity of R.meliloti strains. Appl.Environ.Microbiol. 39.
- ORME-JOHNSON, W.H. 1977. Biochemistry of nitrogenase. En — "Genetic engineering for nitrogen fixation". Ed. A.Hallaender. Plenum Press. 9, 317.
- PAGAN, J.D.; CHILD, J.J.; SCOWCROFT, W.R. y GIBSON,A.M. 1975. Nitrogen fixation by Rhizobium cultured in a defined medium. Nature, 256, 406.
- PALOMARES, A. 1975. Estudios sobre la producción de poligalacturonasa en la asociación Rhizobium-leguminosa. Tesis Doctoral. Univ. de Granada.
- PALOMARES, A.; MONTOYA, E. y OLIVARES, J. 1978a. Induction of polygalacturonase production in legume roots as a consequence of extrachromosomal DNA carried by R.meliloti. Microbios, 21, 33.
- PALOMARES, A.; MONTOYA, E. y OLIVARES, J. 1978b. Quality and rate of extracellular polysaccharides produced by R.meliloti and their inducing effect on polygalacturonase production in legume roots as derived from the presence of extrachromosomal DNA. Microbios, 22, 7.
- PANKHURST, C.E.; SCHWINGHAMER, E.A. y BERGERSEN,F.J. 1972. The structure and acetylene reducing activity of root nodules formed by a riboflavin-requiring mutant of R.trifolii. J.gen.Microbiol. 70, 161.

- PANKHURST, C.E.; SCHWINGHAMER, E.A.; THORNE, S.W. y BERGERSEN, F.J. 1974. Flavine contents of clover relative to symbiosis with a riboflavin requiring mutant of R. trifolii. Plant Physiol. 53, 198.
- PATE, J.S. 1977. Functional biology of Dinitrogen fixation by legumes. En "A treatise on Dinitrogen fixation". Ed. R.W.F. Hardy y S.Silver. Wiley Interscience. 473.
- PIRROTTA, V. 1976. The lambda repressor and its action. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 74, 21.
- POCHON, J. y BARJAC, H. de, . 1958. Traité de Microbiologie - des sols. Dunod. Paris.
- PRAKASH, R.K.; HOOYKAAS, P.J.J.; LEDEBOER, A.M.; KIJNE, J.; SCHILPEROORT, R.A.; NUTI, M.P.; LEPIDI, A.A.; CASSE, F.; BOUCHER, C.; JULLIOT, J.S. y DENARIE, J. 1979. Detection, isolation and characterization of large plasmids in Rhizobium. Proc. IIIrd Int. Symp. Nitrogen fixation. Ed. W.E. Newton y W.H. Orme-Johnson. University Park Press.
- RAO, A.V. e ISWARAN, V. 1976. Biochemical changes in the roots of legumes upon inoculation. Zentr. Bakt. Parasitenk. 131, 83.
- REPORTER, M.; RAVEED, D. y NORRIS, G. 1975. Binding of Rhizobium japonicum to cultured soybean root cells: morphological evidence. Plant Sci. Letters, 5, 73.
- REVEL, H.R.; STITT, B.L.; LIELAUSIS, I. y WOOD, W.B. — 1980. Role of host cell in bacteriophage T4 development. I. Characterization of host mutants that block T4 head assembly. J. Virol. 33, 366.
- ROBERTSON, J.G.; WARBURTON, M.P. y FARNDEN, W.J.F. — 1975. Induction of Glutamate synthase during nodule development in lupin. FEBS Lett. 55, 22.

- ROSLYCKY, E.B. 1967. Bacteriocin production in the Rhizobia - bacteria. *Can.J.Microbiol.* 13, 431.
- RYAN, E.; BODLEY, F. y FOTTRELL, P.F. 1971. Purification of aspartate aminotransferases from soybean root nodules and Rhizobium japonicum. *Plant Soil*, special vol. 545.
- SAHLMAN, K. y FAHRAEUS, G. 1963. An electron microscopy study of root-hair infection by Rhizobium. *J.gen. Microbiol.* 33, 425.
- SANCHEZ-CALLE, I.; BAREA, J.M. y RECALDE, L. 1978. Cuantificación de fitohormonas en cultivos de Rhizobium spp. usados en fertilización biológica. *Anal.Edaf. Agrobiol.* 37, 703.
- SCHWINGHAMER, E.A. 1965. Host-controlled modification of Rhizobium phages. *Aust.J.Biol.Sci.* 18, 333.
- SCHWINGHAMER, E.A. 1966. Factors affecting phage-restricting ability in Rhizobium leguminosarum strain L4. *Can. J.Microbiol.* 12, 395.
- SCHWINGHAMER, E.A. 1975. Properties of some bacteriocins — produced by R.trifolii. *J.gen.Microbiol.* 91, 403.
- SCHWINGHAMER, E.A. 1977. Genetics aspects of nodulation and dinitrogen fixation by legumes: the microsymbiont. En "A treatise on Dinitrogen fixation". Ed. R.W.F. Hardy y S. Silver. Wiley Interscience. 577.
- SCHWINGHAMER, E.A. y BROCKWELL, J. 1978. Competitive advantage of bacteriocin and phage-producing strains of Rhizobium. *Soil Biol.Biochem.* 10, 383.
- SCHWINGHAMER, E.A.; PANKHURST, C.E. y WHITFELD, P.R. 1973. A phage-like bacteriocin of R.trifolii. *Can.J. Microbiol.* 19, 359.

- SHANMUGAN, K.T.; STREICHER, S.L.; MORANDI, C.; AUSUBEL, F.; GOLDSBERG, R.B. y VALENTINE, R.C. 1974. Model for genetic regulation of dinitrogen fixation nif in Klebsiella pneumoniae. Proc. 1st Int. Symp. Nitrogen fixation. Ed. N.Nyman. Washington State University Press. 313.
- SIK, T. y OROSZ, L. 1971. Chemistry and genetic of R.meliloti phage 16-3. Plant Soil, special vol. 57.
- SOLHEIM, B. y RAA, J. 1971. Evidence countering the theory of specific induction of pectin-degrading enzymes as basis for specificity in Rhizobium-leguminosae associations. Plant Soil, 35, 275.
- SOLHEIM, B. y RAA, J. 1973. Characterisation of the substances causing deformation of root hairs of Trifolium repens when inoculated with R.trifolii. J.gen.Microbiol. 77, 241.
- SPITZBARTH, M.; PÜHLER, A. y HEUMANN, W. 1979. Characterization of plasmids isolated from R.meliloti. Archiv Mikrobiol. 121, 1.
- STANIEWSKI, R. 1970. Typing of Rhizobium by means of phages. Can.J.Microbiol. 16, 1003.
- STANIEWSKI, R. y KOWALSKI, M. 1965. Effect of lysogenization on variability of phage type in R.meliloti. Acta Microbiol.Polon. 14, 231.
- STANIEWSKI, R. y REGULA, A. 1975. Frequency of infection - and efficiency of transfection of R.meliloti cells - and spheroplasts. Acta Microbiol.Polon. 8, 151.
- STANIEWSKI, R.; KOWALSKI, M.; GOGACZ, E. y SOKOLOWSKI, F. 1962. Susceptibility of Rhizobium strains to phages. Acta Microbiol. Polon. 11, 245.

- STANIEWSKI, R.; LORKIEWICZ, Z. y CHOMICKA, Z. 1971. Transfection of R.meliloti. Acta Microbiol.Polon. III(XX), 97.
- STANIEWSKI, R.; JURZYK, I. y LORKIEWICZ, Z. 1973. Typing of R.trifolii mutants by means of phages. Acta Microbiol.Polon. 14, 231.
- STREICHER, S.L.; SHANMUGAN, K.T.; AUSUBEL, F.; MORANDI, C. y GOLDSBERG, R.B. 1974. Regulation of nitrogen fixation in Klebsiella pneumoniae : evidence for a role of glutamine synthetase as regulator of nitrogenase synthesis. J.Bacteriol. 120, 815.
- SUTTON, W.D. 1974. Some features of the DNA of Rhizobium — bacteroids and bacteria. Biochim.Biophys.Acta, — 366, 1.
- SVAB, Z.; KONDOROSI, A. y OROSZ, L. 1978. Specialized — transduction of cysteine marker by R.meliloti phage 16-3. J.gen.Microbiol. 106, 321.
- 't MANNETJE, L. 1967. A reexamination of the taxonomy of the genus Rhizobium and related genera using numerical analysis. Antoine van Leuwenhoek, 33, 477.
- TAKAHASHI, I. y QUADLING, C. 1961. Lysogeny in Rhizobium trifolii. Can.J.Microbiol. 7, 455.
- TSIEN, M.C.; CAIN, P.S. y SCHMIDT, E.L. 1977. Viability of Rhizobium bacteroids. Appl.Environ.Microbiol. 34, 854.
- TUZIMURA, K.; WATANABE, I. y SHI, J.F. 1966. Different — growth and survival of Rhizobium species in the rizosphere of various plants in different sorts of soil. Ecological studies on root nodule bacteria in — soil. Soil Sci.Plant Nutr. 12, 99.

- VERMA, D.P.S.; ZOGBI, V. y BAL, A.K. 1978. A cooperative action of plant and Rhizobium to dissolve the host cell wall during development of root nodule symbiosis. Plant Sci.Lett. 13, 137.
- VINCENT, J.M. 1977. Rhizobium: General Microbiology. En "A treatise on dinitrogen fixation". Ed. R.W.F.Hardy y S.Silver. Wiley Interscience. 277.
- WATSON, J.D. 1977. Molecular Biology of the Gene. W.A.Benjamin Inc.Menlo-Park.California.3rd Ed.
- WOLPERT, J.S. y ALBERSHEIM, P. 1976. Host-symbiont interactions.I. The lectins of legumes interact with the O-antigen-containing lipopolysaccharides of their symbiont Rhizobia. Biochem.Biophys.Res.Comm. - 70, 729.
- WONG, P.P. y EVANS, H.J. 1971. Poly-beta-hydroxy-butyrate utilization by soybean (Glycyne max.) nodules and assessment of its role in maintenance of nitrogenase activity. Plant Physiol. 47, 750.
- WONG, P.P.; EVANS, H.J.; KLUCAS, R.V. y RUSSELL, S. - 1971. Investigation into the pathways of electron transport to the nitrogenase from nodule bacteroids. Plant Soil, special vol. 525.
- ZAJAC, E.; RUSSA, R y LORKIEWICZ, Z. 1975. Lipopolysaccharide as receptor for phage 1P.J.gen.Microbiol. 90, 365.
- ZELAZNA-KOWALSKA, I. 1972. Induction of lysogenic strains of R.meliloti by mitomicyne C.Ann.Univ.Mariae Curie-Sklodowska, 27, 121.
- ZURKOWSKI, W. y LORKIEWICZ, Z. 1976. Plasmid deoxyribonucleic acid in R.trifolii. J.Bacteriol. 128, 481.





Biblioteca Universitaria de Granada



01067027