

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**Facultad de Ciencias Exactas**

**INTERACCION PLANTA-BACTERIA**

**Etapas tempranas de la simbiosis *Rhizobium phaseoli-***

***Phaseolus vulgaris* L.**

**Graciela Brelles Mariño**

**- TESIS 1993 -**

El presente trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Bioquímicas fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección del Profesor Doctor Osvaldo Miguel Yantorno.

"El objetivo final de la ciencia es el de proporcionar una única teoría que describa correctamente todo el universo. ...el descubrimiento de una teoría unificada completa puede no ayudar a la supervivencia de nuestra especie. Puede incluso no afectar nuestro modo de vida. Pero siempre, desde el origen de la civilización, la gente no se ha contentado con ver los acontecimientos como desconectados e inexplicables. Ha buscado incesantemente un conocimiento del orden subyacente del mundo. Hoy en día, aún seguimos anhelando saber por qué estamos aquí y de dónde venimos. El profundo deseo de conocimiento de la humanidad es justificación suficiente para continuar nuestra búsqueda. Y ésta no cesará hasta que poseamos una descripción completa del universo en el que vivimos."

Stephen W. Hawking  
Historia del Tiempo  
Del Big Bang a los agujeros negros

Mi reconocimiento:

A los Dres. R.J.J. Ertola y J.L. Boiardi, Director y Co-director de Beca respectivamente, por haberme brindado la oportunidad de realizar el presente trabajo en las instalaciones del Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales.

Al Dr. O.M. Yantorno, por haber aceptado dirigir mi trabajo de Tesis.

A la Facultad de Ciencias Exactas, por permitirme el uso de sus equipos e instalaciones.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por el otorgamiento de las becas que permitieron la realización de estos estudios.



Mi agradecimiento:

Al Dr. José Luis Boiardi, por permitir mi iniciación a la investigación científica.

Al Dr. Gabriel Favelukes, por sus sugerencias, su estímulo en los momentos de flaqueo y su afecto.

Al Dr. Jorge Arcas, por su amistad y su generosa y permanente disposición para ayudar.

Al Ing. Guillermo Costa, por haber soportado mis enojos en los momentos en que todo parecía salir mal, por su inestimable ayuda que casi no conoció fines de semana ni vacaciones, por sus cartas que tanto me acompañaron en los últimos meses.

A Víctor Inchaurredo, Aleca Bosch, Blas Dorta y Claudio Avignone, por los buenos momentos (que fueron muchos más que los malos) con "revueltos gramajo" y vino.

A mis compañeros del CINDEFI. En especial, a Carlos Castro, por su ayuda con la computadora y a Carlos Gallego, por su ayuda con el fermentador.

Al Dr. Néstor Caffini y su grupo, por la confianza depositada en mí al permitirme el uso de sus equipos e instalaciones aún en su ausencia.

Al Dr. R. Maronna, por su ayuda con la estadística del capítulo 5.

A mis compañeros de Química Biológica, Luis Wall, Marcelo Giménez y Aníbal Lodeiro, por permitirme el uso del equipo de electroforesis y por su buena disposición; y a Daniel Grasso y

Daniel Ghiringhelli, por ayudarme con el Sigmaplot.

Al Dr. Menestrina, del Laboratorio Central de Salud de la Provincia de Buenos Aires, por permitirme el uso del bioterio.

A las empresas Bagó y Síntesis Química, por colaborar con mi asistencia a la XV Reunión Latinoamericana de Rhizobiología (Guatemala, 1990) y a la 13th. North American Symbiotic Nitrogen Fixation Conference (Canadá, 1991).

A la empresa Biagro, por colaborar con mi asistencia a la XIV Reunión Latinoamericana de Rhizobiología (Chile, 1988).

A la ALAR (Asociación Latinoamericana de Rhizobiología), por el otorgamiento de una beca para asistir a la XV Reunión Latinoamericana de Rhizobiología (Guatemala, 1990).

Muy especialmente a todos aquellos que no creyeron en mí ni apoyaron mi trabajo, por haber sido el combustible que alimentó el motor de mi tosudez.

Finalmente (last but not least), al Dr. Eduardo Schröder sin cuyos apoyo y comprensión durante los últimos meses, este trabajo no se habría concretado.

**Abreviaturas:**

A. : *Azorhizobium*

ANOVA: análisis de varianza

B.: *Bradyrhizobium*

bv. o bv: biovar

CPS: polisacárido capsular

cv. o cv: cultivar

DO: densidad óptica

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EPS: exopolisacárido

FITC: isotiocianato de fluoresceína

fte.: fuente

kDa: kilodalton

LBA: buffer para estudio de ensayo de unión a lectina

LBP: polisacárido que se pega a lectina

LPS: lipopolisacárido

MM: medio de mantenimiento

MP: medio proceso

P.: *Phaseolus*

PBS: buffer fosfato salino

PI: medio preinóculo

pSym: plásmido simbiótico

R.: *Rhizobium*

S.: *Sinorhizobium*

SBL: lectina de semilla de soja

SCL: lectina de cultivo de células de soja

SDS: dodecil sulfato de sodio

SDS-PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio.

TEMED: N,N,N',N'-tetrametilen(bis)acrilamida

UDO: unidades de densidad óptica

ufc: unidades formadoras de colonias

Durante el transcurso de este trabajo de Tesis se publicaron y presentaron a congresos los trabajos que se detallan a continuación:

**a) Trabajos publicados:**

**1.- Purificación y diferencia de comportamiento de lectinas de dos cultivares de *Phaseolus vulgaris* L.** Brelles Mariño, G. y Boiardi, J.L. 1988. Memorias de la XIV Reunión Latinoamericana de Rhizobiología, Santiago, Chile, pp. 59-65.

**2.- Role of bean lectins in the *Rhizobium phaseoli*-*Phaseolus vulgaris* L. interactions. I. Some properties of lectins from two bean cultivars.** Brelles Mariño, G. y Boiardi, J.L. 1992. World J. Microbiol. 8 (6): 573-578.

**3.- Pretreatment of *R. phaseoli* with *P. vulgaris* seed lectin promotes infection thread formation.** Brelles Mariño, G.; Costa, G.A. y Boiardi, J.L. 1993. En: Nitrogen Fixation. Palacios, R; Mora, J. y Newton, W.E. (Eds.). Kluwer Pub., The Netherlands (en prensa).

**4.- Survival of a soil introduced *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* strain and subsequent root colonization and nodulation of common bean under laboratory and field conditions.** Brelles Mariño, G. y Boiardi, J.L. 1993. Aceptado para su publicación en Microbial Releases, Springer International.

**b) Trabajos presentados a Congresos:**

**1.- Purificación y diferencia de comportamiento de lectinas de dos cultivares de *Phaseolus vulgaris* L.** Brelles Mariño, G. y Boiardi, J.L. 1988. XIV Reunión Latinoamericana de Rhizobiología, Santiago, Chile.

**2.- Rol de lectinas de poroto en la interacción *R. phaseoli*-*P. vulgaris*.** Brelles Mariño, G. y Boiardi, J.L. 1989. XV Reunión de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica (SAIB).

**3.- Supervivencia e infectividad de una cepa de *Rhizobium phaseoli* introducida en suelos de Salta (en condiciones de laboratorio).** Brelles Mariño, G. y Boiardi, J.L. 1990. XV Reunión Latinoamericana de Rhizobiología, Guatemala.

**4.- Supervivencia e infectividad de una cepa de *Rhizobium phaseoli* introducida en suelos de Salta ( a campo).** Brelles Mariño, G. y Boiardi, J.L. 1990. XV Reunión Latinoamericana de Rhizobiología, Guatemala.

**5.- Influencia de lectina exógena de semilla de *P. vulgaris* sobre la nodulación de poroto.** Brelles Mariño, G.; Costa, G.A. y Boiardi, J.L. XV Reunión Latinoamericana de Rhizobiología, Guatemala.

**6.- Survival and root colonization of *R. phaseoli* introduced in soils during *Phaseolus vulgaris* L. cultivation (under laboratory**

**and field conditions). Brelles Mariño, G. y Boiardi, J.L. 1991. 13th. North American Symbiotic Nitrogen Fixation Conference.**

**7.- Pretreatment of *R. phaseoli* with *P. vulgaris* seed lectin promotes infection thread formation. Brelles Mariño, G.; Costa, G.A. y Boiardi, J.L. 1992. 9th. International Congress on Nitrogen Fixation, Cancún, Méjico.**

Además se están preparando dos manuscritos que estarán listos para enviar en el mes de marzo.

# PARTE 1

## CAPITULO 1: INTRODUCCION GENERAL

1.1. La fijación de nitrógeno	1
1.2. Una pequeña historia	2
1.3. Sistemas fijadores de nitrógeno	5
1.4. La simbiosis	6
1.5. La planta	7
1.6. La bacteria	8
1.7. Establecimiento de la simbiosis <i>Rhizobium</i> -leguminosa	10
1.7.1. Reconocimiento entre simbioses	13
1.7.2. Las lectinas y el proceso de reconocimiento	15
1.7.2.1. ¿Qué son las lectinas?	15
1.7.2.2. ¿Cómo se lleva a cabo el reconocimiento?	17
1.7.2.3. ¿Qué es la especificidad?	19
1.7.2.4. La hipótesis de la lectina	19
1.7.2.5. Soplan nuevos vientos...	28
1.7.3. La preinfección	31
1.7.3.1. Quimiotaxis y movilidad	31
1.7.3.2. Colonización rizosférica	34
1.7.3.3. Adsorción de los rizobios a la superficie radicular	37
1.7.3.4. Deformación, ramificación y enrulamiento de pelos radiculares	45
1.7.4. La infección y el desarrollo del nódulo	48
1.8. Objetivos de esta Tesis	53
1.8.1. Objetivos generales. ¿Por qué trabajar con el simbiótico <i>R. phaseoli</i> - <i>P. vulgaris</i> ?	53
1.8.1. Objetivos particulares	56

# PARTE 2

## CAPITULO 2: Supervivencia en suelo de una cepa introducida de *Rhizobium phaseoli* y subsecuentes colonización de raíces y nodulación de *P. vulgaris* en condiciones de laboratorio y campo.

2.1. Introducción	58
2.2. Materiales y métodos	59
2.2.1. Semillas	59
2.2.2. Microorganismos	60
2.2.3. Condiciones de cultivo	60
2.2.4. Medios de mantenimiento y cultivo de cepas	61
2.2.5. Medidas de la concentración celular	62
2.2.5.1. Recuento de microorganismos viables	62
2.2.5.2. Determinación del número de microorganismos totales	62

2.2.6. Esterilización de las semillas	63
2.2.7. Experimentos de laboratorio	63
2.2.7.1. Suelo	63
2.2.7.2. Inoculación del suelo	63
2.2.7.3. Experimentos en maceta	64
2.2.7.4. Aislamiento a partir de suelo y raíces	65
2.2.8. Experimentos a campo	66
2.2.8.1. Inoculación del suelo	67
2.2.8.2. Aislamiento a partir de suelo y raíces	67
2.3. Resultados	68
2.3.1. Experimentos de laboratorio	68
2.3.2. Experimentos a campo	74
2.4. Discusión	78

### PARTE 3

#### **CAPITULO 3: Aislamiento, purificación y caracterización de lectinas de semilla de poroto.**

3.1. Introducción	85
3.2. Materiales y métodos	86
3.2.1. Semillas	86
3.2.2. Purificación de aglutinina de poroto	86
3.2.3. Medidas de concentración proteica	89
3.2.4. Ensayos de hemaglutinación	90
3.2.5. Efecto de azúcares sobre la hemaglutinación	90
3.2.6. Electroforesis	91
3.2.7. Métodos inmunológicos	94
3.3. Resultados	95
3.4. Discusión	108

### PARTE 4

Introducción	114
--------------	-----

#### **CAPITULO 4: Estudio de la capacidad de unión rizobio-lectina marcada por fluorescencia en distintas fases de crecimiento de un cultivo en batch.**

4.1. Introducción	115
4.2. Materiales y métodos	116
4.2.1. Cepas utilizadas	116
4.2.2. Condiciones de cultivo	116
4.2.3. Medios de mantenimiento y cultivo de cepas	117
4.2.4. Lectinas	117
4.2.5. Preparación de lectina marcada por fluorescencia	117
4.2.6. Ensayo de unión bacteria-lectina marcada	117



4.3. Resultados	119
4.4. Discusión	123

**CAPITULO 5: Adsorción raíz-rizobio homólogo: influencia de lectina exógena de semilla de leguminosa sobre el proceso de adsorción.**

5.1. Introduucción	128
5.2. Materiales y métodos	129
5.2.1. Semillas y microorganismos	129
5.2.2. Lectinas	129
5.2.3. Medio de incubación de bacterias y raíces	130
5.2.4. Buffers	130
5.2.5. Germinación de semillas	130
5.2.6. Influencia de lectina exógena sobre la adsorción bacteria-raíz	131
5.2.6.1. Técnica con preincubación raíces-lectina exógena	131
5.2.6.2. Técnica con preincubación rizobio-lectina exógena	133
5.3. Resultados y discusión	134

**CAPITULO 6: Influencia de la preincubación de *R. phaseoli* con lectina exógena de semilla de *P. vulgaris* sobre la infectividad del microsimbionte y la nodulación de la leguminosa.**

6.1. Introduucción	140
6.2. Materiales y métodos	142
6.2.1. Semillas y lectinas	142
6.2.2. Microorganismos	142
6.2.3. Medios de incubación, mantenimiento y cultivo de cepas y plantas.	142
6.2.4. Cinética de crecimiento	143
6.2.4.1. Turbidimetría	143
6.2.4.2. Recuento de células	143
6.2.5. Influencia de la incubación de <i>R. phaseoli</i> con lectina exógena sobre la nodulación de <i>P. vulgaris</i> .	144
6.2.6. Influencia de la incubación de <i>R. phaseoli</i> con lectina exógena sobre la formación de hilos de infección.	146
6.3. Resultados	147
6.3.1. Cinética de crecimiento de la cepa F48 300 de <i>R. phaseoli</i> .	147
6.3.2. Resultados obtenidos con la cepa F45 de <i>R. phaseoli</i> .	149
6.3.3. Influencia de la incubación de rizobios con lectina exógena sobre la infectividad de los microorganismos.	153
6.3.4. Influencia de la incubación de <i>R. phaseoli</i> con	

lectina exógena sobre la nodulación.	163
6.4. Discusión	165

## PARTE 5

### **CAPITULO 7: Aspectos fisiológicos e infectividad de *R. phaseoli* crecido en cultivos continuos bajo diferentes sustratos limitantes.**

7.1. Introducción	171
7.1.1. ¿Por qué usar cultivos continuos para estudios fisiológicos? ¿Por qué emplear un medio sintético en lugar de uno complejo?	171
7.1.2. Infectividad de los rizobios crecidos bajo distintas limitaciones de sustrato.	173
7.2. Materiales y métodos	174
7.2.1. Microorganismos y medios de cultivo	174
7.2.2. Esterilización	176
7.2.3. Inóculos	176
7.2.4. Cultivos continuos	177
7.2.5. Nomenclatura	179
7.2.6. Control de espuma	180
7.2.7. Medidas de concentración celular	180
7.2.8. Medidas de pH	180
7.2.9. Medida del consumo de manitol	181
7.2.10. Medida de la formación de exopolisacárido (EPS)	181
7.2.11. Determinación del peso seco de biomasa	182
7.2.12. Determinación del consumo de O <sub>2</sub> y de la producción de CO <sub>2</sub>	182
7.2.13. Balances de materia y energía	184
7.2.14. Infectividad de <i>R. phaseoli</i> crecido bajo distintas limitaciones de sustrato	186
7.3. Resultados y discusión	187
7.3.1. Evaluación de la infectividad de <i>R. phaseoli</i> crecido bajo distintas limitaciones de sustrato	187
7.3.2. Balances de materia y energía	191

<b>CONCLUSIONES GENERALES</b>	<b>204</b>
-------------------------------	------------

<b>APENDICE I : Algunos aspectos taxonómicos de la cepa utilizada.</b>	<b>205</b>
--	------------

Materiales y métodos	206
Ensayo de nodulación de <i>Leucaena</i>	206
Determinación de genes nif	207
Resultados	207
Conclusión	208
Nota	209

**APENDICE II: Estadística**

210

**BIBLIOGRAFIA**

228

**PARTE 1**

**CAPITULO 1**

**INTRODUCCION GENERAL**

### **1.1. La fijación de nitrógeno:**

El nitrógeno forma parte de proteínas, ácidos nucleicos, aminoazúcares y otras moléculas esenciales para la vida. Hay tres grandes reservorios de nitrógeno en la biosfera que son la atmósfera, los mares y la tierra. La atmósfera es el principal reservorio de nitrógeno aprovechable ( $3,9 \times 10^{15}$  toneladas métricas). Sin embargo esta cantidad representa sólo el 2% del nitrógeno global. Hay enormes reservorios del elemento que resultan inaccesibles:  $14 \times 10^{15}$  toneladas métricas se hallan en rocas ígneas y  $4 \times 10^{15}$  en rocas sedimentarias (Blackburn, 1983).

Los tres reservorios de nitrógeno están interconectados constituyendo el llamado "ciclo del nitrógeno". La transición entre el reservorio atmosférico y el terrestre se lleva a cabo a través de fijación por procesos químicos, fijación natural por descargas lumínicas y otras reacciones atmosféricas y por fijación biológica. Burns y Hardy han estimado en 175 millones de toneladas métricas la cantidad de nitrógeno fijado biologicamente, otros autores dan cifras de 122 millones de toneladas métricas (Burris, 1980). La fijación biológica de nitrógeno comprende los procesos simbióticos y no simbióticos. Una de las principales ventajas de la fijación simbiótica es la de proveer de nitrógeno directamente a la planta mientras que en la fijación no simbiótica, las bacterias de vida libre retienen la mayor parte del nitrógeno fijado hasta su muerte y descomposición. Recién en ese momento, el nitrógeno está

disponible para las plantas. La fijación simbiótica de nitrógeno representa el 80% de la fijación biológica (Gustchick, 1980).

Cuando un ecosistema está en equilibrio el ciclo abastece al suelo del nitrógeno necesario pero cuando se altera, por ejemplo, en las explotaciones agrícolas, gran parte del nitrógeno fijado no retorna al suelo y éste se va empobreciendo gradualmente. En esas condiciones se hace imprescindible mantener la fertilidad del suelo. La utilización de fertilizantes nitrogenados es costosa y, a largo plazo, contamina los ecosistemas; en cambio la fijación biológica de nitrógeno representa una alternativa económica y no contaminante.

### **1.2. Una pequeña historia:**

La fijación simbiótica de nitrógeno por parte de las leguminosas no es un descubrimiento nuevo. Ya en el año 300 a.c. los romanos, aún sin conocer el proceso, utilizaban la rotación de cultivos con leguminosas para reponer la fertilidad del suelo y practicaban la inoculación de los suelos llevando tierras de campos donde se había cultivado una determinada leguminosa a otros donde se iba a realizar la siembra de la misma (Fred et al., 1932).

Muchas veces hemos visto en los grandes descubrimientos científicos tres situaciones en común: su aparición casi por azar al intentar buscar respuestas a problemas diferentes que los implicados en el descubrimiento en sí, la simultaneidad de avances en otros campos de la ciencia y que llevan a la confirmación del

descubrimiento, y la incomprensión de los contemporáneos. El descubrimiento de la fijación simbiótica de nitrógeno por parte del Hellriegel y Wilfarth no escapa a estas coincidencias.

Hellriegel fue puesto al frente de la Estación Experimental de Bernburg para desarrollar métodos que aumentaran los rendimientos de la remolacha azucarera (Schilling, 1988). Estudiando en forma comparativa la relación entre la nutrición nitrogenada y el rendimiento de distintas plantas, observó diferencias en las plantas leguminosas con respecto a las otras. Concluyó que las leguminosas podían usar el nitrógeno atmosférico y que la capacidad de hacerlo estaba relacionada con la presencia de nódulos en las raíces de estas plantas. Este trabajo fue publicado en 1886 y produjo una reacción que fue desde la profunda admiración hasta las más serias críticas, entre éstas últimas, las de Frank (en cuyo honor se puso el nombre de *Frankia* al actinomicete fijador de nitrógeno). Las críticas obligaron a Hellriegel a proseguir y completar sus investigaciones junto a su colaborador, Wilfarth. Estos investigadores observaron que plantas de arveja sin nitratos agregados daban altos rendimientos que no se observaban en plantas no leguminosas. Luego de analizar distintas explicaciones llegaron a la conclusión de que las arvejas utilizaban otra fuente de nitrógeno: la atmósfera. Como los resultados con y sin nitrato agregado eran erráticos sostuvieron que el uso del nitrógeno atmosférico estaba influenciado por algún "factor" no controlado en las condiciones experimentales. Postularon que ese factor debía ser la



presencia de un microorganismo en los nódulos típicos de las leguminosas.

Hellriegel y Wilfarth desarrollaron experimentos simples pero ingeniosos, sencillos pero al mismo tiempo rigurosos, donde no faltaban los controles y se trataba de evaluar un factor de variación por vez (para una descripción más detallada de los experimentos ver las amenas revisiones de Quispel, 1988 ó Schilling, 1988). Los resultados publicados en 1888 fueron contundentes: las plantas no leguminosas no reaccionaban a las inoculaciones y los controles de leguminosas sin inocular no presentaban nódulos ni indicación alguna de fijación de nitrógeno.

Simultáneamente, en 1888 Beijerinck aisló las bacterias responsables de la fijación de nitrógeno a partir de nódulos de raíces de leguminosas desinfectados en superficie. En 1890 describió cómo bacterias aisladas de nódulos de Vicia podían formar nódulos en raíces de Vicia. Ese mismo año Prazmowski también consiguió infectar arvejas y porotos con bacterias aisladas (Quispel, 1988). Estos descubrimientos simultáneos fueron avances que ayudaron a confirmar los trabajos de Hellriegel y Wilfarth.

Decía al principio que los grandes descubrimientos científicos suelen ir acompañados por la incomprensión de los contemporáneos, sean éstos científicos o no. Además de las críticas de colegas como Frank, los empresarios de la industria azucarera de Bernburg que financiaban la Estación Experimental decidieron quitar el apoyo económico a Hellriegel y Wilfarth por los magros resultados obtenidos en las investigaciones sobre rendimientos de remolacha

azucarera... Esta historia que ya tiene más de 100 años, no deja de ser actual... El objetivo de recordar aquí esta pequeña historia es el de rendir homenaje a todos esos científicos que con método y esfuerzo obtienen resultados que no siempre son comprendidos por sus pares (o por quienes financian sus trabajos) y sin embargo siguen adelante...

### 1.3. Sistemas fijadores de nitrógeno:

La fijación biológica de nitrógeno no ha sido encontrada en eucariotes pero está ampliamente distribuida tanto en Eubacterias como en Archeobacterias. Los organismos fijadores de nitrógeno (diazotróficos) son **procariotes** que presentan el sistema enzimático de la **nitrogenasa** responsable de catalizar la reducción del nitrógeno atmosférico a amonio. Estas son las únicas características en común de los diazótrofos que presentan gran diversidad morfológica, fisiológica y genética. Se ha encontrado fijación de nitrógeno en los siguientes organismos, entre otros (Young, 1992):

- *Firmibacteria*, géneros *Bacillus* y *Clostridium*.
- *Thallobacteria*, géneros *Actinobacter*, *Streptomyces* y *Frankia*.
- *Heliobacteria*, géneros *Heliobacillus* y *Heliospirillum*.
- *Cyanobacteria*, géneros *Anabaena* y *Nostoc*.
- *Campylobacter*, género *Campylobacter*.
- *Proteobacteria*, géneros *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Azorhizobium*, *Azospirillum*, *Beijerinckia*, *Bradyrhizobium*, *Rhodobacter*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodospirillum*, *Thiobacillus*, *Azotobacter*,

*Enterobacter*, *Erwinia*, *Rhizobium*, *Klebsiella*, entre otros (para una revisión completa de los fijadores de nitrógeno ver Young, 1992).

Entre estos organismos, los hay aerobios obligados, anaerobios estrictos, gram (+), gram (-), fototróficos, quimiotróficos y heterotróficos. Algunos de éstos son fijadores en vida libre, otros establecen asociaciones más o menos específicas llamadas biocoenosis o simbiosis asociativas y finalmente están los fijadores simbióticos.

#### **1.4. La simbiosis:**

El concepto de simbiosis fue introducido en 1878 por de Bary pero fue Schindler, en 1884, el primero en describir a las estructuras llamadas "nódulos" como el resultado de la simbiosis entre la planta y la bacteria (Quispel, 1888).

Los sistemas simbióticos pertenecen a uno de los siguientes tipos: asociaciones entre bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* con leguminosas; asociaciones entre el actinomicete *Frankia* y angiospermas no leguminosas y finalmente, la simbiosis entre cianobacterias con diversas plantas.

La simbiosis leguminosa-*Rhizobium* (con este término se abarca de aquí en más a los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*), la más significativa en términos de fijación global de nitrógeno, es una relación entre plantas y bacterias del suelo. La bacteria invade la raíz de la planta (o en raros casos, los tallos) e induce la formación de un nódulo dentro del cual se produce la reducción del

nitrógeno atmosférico a amonio y provee a la planta de compuestos nitrogenados a cambio de compuestos carbonados. La planta gana en aptitud para crecer en suelos pobres en nitrógeno y la bacteria gana un nicho protegido en el cual multiplicarse y del cual puede escapar cuando el nódulo senesce (Young y Johnston, 1989).

La asociación *Rhizobium*-leguminosa es de gran importancia económica dado que la explotación de las leguminosas está distribuida en todo el mundo ya sea para su utilización como forrajeras o como granos ricos en proteína.

### **1.5. La planta:**

Las leguminosas están ampliamente distribuidas y son muy diversas en morfología, habitat y ecología. Entre las 16.000 a 19.000 especies de leguminosas conocidas, hay formas arbustivas, árboles y especies forrajeras y productoras de granos. A pesar de esta diversidad, la gran mayoría son noduladas por rizobios.

La familia *Leguminosae* consta de tres subfamilias: *Caesalpinoidae*, *Papilionoidae* y *Mimosoideae*. La subfamilia *Caesalpinoidae* es la menos especializada de las tres, la más antigua desde el punto de vista evolutivo e incluye muchos géneros que no nodulan. Más del 90% de las especies examinadas de la subfamilia *Mimosoideae* nodulan y en varias de ellas, la infección es vía células epidérmicas porque carecen de pelos radiculares. En la subfamilia *Papilionoideae* el 97% de las especies examinadas nodulan (Sprent y Raven, 1992). Hasta el momento sólo se conoce una

planta no leguminosa que establece asociaciones simbióticas con los rizobios: se trata de *Parasponia* que pertenece a la familia *Ulmaceae* que no está relacionada con la *Leguminosae*.

#### **1.6. La bacteria:**

El género *Rhizobium* incluye a aquellas bacterias capaces de inducir la formación de nódulos morfológicamente definidos en el sistema radicular de las plantas leguminosas (Vincent, 1981). También se incluyen en este género a aquellas bacterias no infectivas que desciendan de cepas nodulantes.

Desde el punto de vista morfológico, los rizobios son bacilos gram (-) que miden entre 0,5-0,9 y 1,2-3,0  $\mu$ , son móviles en cultivos jóvenes por medio de flagelos peritricos, polares o sub-polares y presentan gránulos de poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) visibles por microscopía de contraste de fase. Se los encuentra aislados, de a pares y a veces en disposición estrellada. Algunas cepas desarrollan una estructura tipo cápsula en cultivos viejos (Dudman, 1968). Los cuerpos intracelulares incluyen ribosomas, gránulos de PHB y de polifosfatos, fibrillas y una zona nucleoide (Vincent, 1974). Con respecto a los requerimientos metabólicos, son quimiorganótrofos que crecen bien entre 25 y 30 °C. Si bien son aeróbicos, crecen bien a presiones de O<sub>2</sub> relativamente bajas (Ertola et al., 1969)

Las primeras caracterizaciones taxonómicas de las bacterias del género *Rhizobium* se llevaron a cabo determinando su potencial

rango de huésped. Se observó que existía una cierta especificidad entre los rizobios y las leguminosas hospedantes: rizobios que nodulaban a una determinada leguminosa no eran capaces de nodular otro género de leguminosa y viceversa. Fue así como Fred et al. (1932) propusieron la clasificación basada en los grupos de inoculación cruzada entre plantas y microorganismos. Posteriormente se llevaron a cabo estudios taxonómicos basados en el metabolismo de hidratos de carbono, susceptibilidad a antibióticos, serología, hibridación de ADN, análisis de ARN ribosomal 16S y relación de bases en el ADN. En la actualidad se prefiere clasificar a las bacterias del género *Rhizobium* de acuerdo a la velocidad de crecimiento en un medio de cultivo con extracto de levadura y un poliol (glicerol o manitol) como fuente de carbono. Los rizobios de crecimiento rápido (tiempo de generación de entre 2 y 4 h) comprenden los géneros *R. leguminosarum*, *R. meliloti*, *R. loti* y *R. galegae*. Los de crecimiento lento, *Bradyrhizobium* (tiempo de generación de entre 6 y 8 h) contienen sólo una especie reconocida: *B. japonicum* aunque se ha propuesto el nombre de *B. elkanii* (ver Apéndice I) a los organismos pertenecientes al grupo II de homología de ADN (Kuykendall et al., 1992).

Dos nuevos géneros han sido reconocidos: *Azorhizobium*, con sólo una especie reconocida (*A. caulinodans*) y *Sinorhizobium* con dos especies reconocidas (*S. fredii* y *S. xinjiangensis*). (Ver Apéndice I).

Los análisis de ARN ribosomal 16S han mostrado que tanto *Rhizobium* como *Bradyrhizobium* están filogenéticamente mucho más

cerca de sus vecinos no simbióticos (*Agrobacterium* y *Rhodopseudomonas* respectivamente) que entre sí (Young, 1992).

#### **1.7. Establecimiento de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa:**

La asociación exitosa entre rizobios y leguminosas se inicia con el primer encuentro, **reconocimiento**, entre la bacteria y la planta y culmina con la formación de una estructura especializada llamada **nódulo** en cuyo interior se produce la fijación de nitrógeno (reducción del nitrógeno atmosférico a amonio). Este proceso consta de una serie de etapas interdependientes que involucran funciones interactivas y complementarias de la bacteria y la planta. La complejidad del proceso de asociación permite muchas posibilidades de regulación del sistema.

Los rizobios próximos a la raíz reconocen y se adhieren a pelos radiculares de la planta huésped o a células que genéticamente están predispuestas a transformarse en pelos radiculares. El rizobio (microsimbionte) induce deformación, enrulamiento y ramificación de los pelos radiculares de la planta (macrosimbionte). Las bacterias quedan así atrapadas dentro de los rulos y penetran la pared celular de la planta. El huésped deposita material fibrilar alrededor de las bacterias. La deposición de dicho material, de naturaleza similar al de la pared de la célula epidérmica, y la multiplicación continua de los rizobios resulta en una estructura tubular llamada **hilo de infección**. El hilo de infección crece hacia la base de la célula epidérmica del pelo

radicular, precedido por el núcleo celular, y simultáneamente promueve una activa división de las células corticales adyacentes. Parece que el núcleo desempeña un rol importante en la infección dirigiendo la elongación del hilo de infección hacia la base de la célula (Nutman, 1959). La figura 1.1. muestra un esquema resumido de los procesos descriptos.

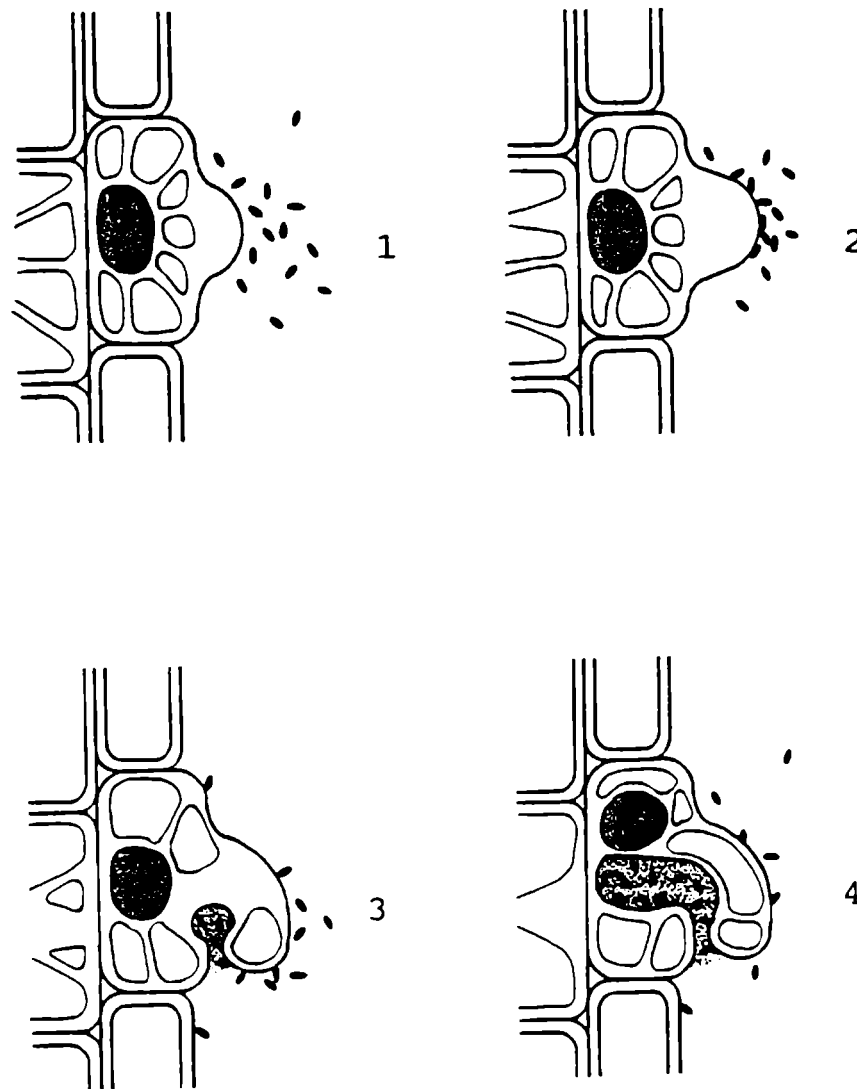


Figura 1.1: Etapas tempranas en la infección de un pelo radicular de leguminosa por bacterias del género *Rhizobium* (Kijne, 1992).

- 1.- intercambio de señales
- 2.- adsorción bacteriana
- 3.- enrulamiento del pelo radicular
- 4.- desarrollo del hilo de infección



El hilo de infección pasa a través de la pared celular del pelo radicular y comienza a ramificarse en las células corticales recientemente divididas. Los rizobios son luego liberados dentro de ellas, rodeados por una membrana plasmática derivada del huésped constituyendo el simbiosoma que es la unidad funcional de la fijación de nitrógeno. Luego de la liberación, numerosos procesos metabólicos se integran para producir las sustancias necesarias para mantener la simbiosis. Roth et al. (1988) propusieron el nombre de **simbiosoma** para referirse al compartimiento rodeado de membrana conteniendo uno o más simbiosomas y localizado en el citoplasma de células eucarióticas.

En el simbiosoma las bacterias se diferencian en **bacteroides** que aumentan de tamaño. La continua división de células corticales y de los bacteroides hacen que el nódulo se haga visible macroscópicamente. De esta forma el nódulo resulta ser la expresión fenotípica de la asociación de los dos genomas. En el nódulo los bacteroides utilizan nutrientes provenientes de la actividad fotosintética del macrosimbionte (fotosintato), inducen la síntesis de la enzima nitrogenasa y reducen el nitrógeno atmosférico a amonio que entregan al tejido nodular para que finalmente sea vertido como nitrógeno fijado en el torrente circulatorio de la planta (Dart, 1977).

Hasta hace unos años se decía que en los rizobios de crecimiento rápido, los genes importantes para el establecimiento de la simbiosis estaban localizados en plásmidos Sym (simbióticos) mientras que en los de crecimiento lento, estos genes estaban

localizados en el cromosoma. Actualmente se acepta que en los rizobios de crecimiento rápido hay además genes importantes para el desarrollo de la simbiosis fuera del pSym (Long, 1984; Appelbaum, 1989).

El proceso descrito muestra un alto grado de especificidad y sólo ciertas especies de bacterias pueden infectar ciertas especies de plantas. Por ej. *R. leguminosarum* biovar *trifolii* nodula trébol pero no poroto o lenteja en tanto que *R. leguminosarum* biovar *viciae* nodula arveja, lenteja y vicia pero no trébol o poroto. Algunos aspectos sobre la especificidad se discuten más adelante.

Resumiendo, el curso de la asociación simbiótica puede dividirse arbitrariamente en tres etapas que serán analizadas más adelante:

- preinfección
- infección y desarrollo del nódulo
- funcionamiento del nódulo.

#### **1.7.1. Reconocimiento entre simbiosis:**

El primer proceso que ocurre al iniciarse la asociación simbiótica es que huésped y microorganismo se reconocen de alguna manera. El reconocimiento es la respuesta selectiva o específica que presenta una célula u organismo hacia otra célula u organismo. Todo reconocimiento, para ser considerado como tal, debe expresar características de selectividad o especificidad no sólo durante el evento inicial sino también en las sucesivas etapas de interacción

(Bauer, 1981). Clarke y Knox (1978) definen a este proceso como un evento inicial de comunicación entre dos células que resulta en una respuesta bioquímica, fisiológica o morfológica definida.

El fenómeno de reconocimiento no es privativo de los sistemas simbióticos ni de las interacciones bacteria-planta sino que está ampliamente distribuido. En realidad poco se conoce sobre la naturaleza y el funcionamiento de los mecanismos de reconocimiento ya sea en interacciones microorganismo patógeno-planta como microorganismo simbiótico-planta. Albersheim y Anderson-Prouty (1975) postularon que el desarrollo de las interacciones entre plantas y microorganismos y la calidad de las mismas (patogenicidad, incompatibilidad o simbiosis) están determinados por la capacidad de reconocimiento de la planta hospedante. Es decir, la planta sería resistente a un determinado microorganismo sólo si fuese primero capaz de reconocerlo como patógeno potencial para luego activar una respuesta inducida ante la agresión. Si ese microorganismo no es capaz de sobrepasar las defensas constitutivas de la planta, entonces resultará no patógeno para ella. Si el microorganismo es capaz de sobrepasar las defensas pero no puede evitar el reconocimiento y el que se disparen las defensas inducibles, entonces será un patógeno incompatible de ese huésped. Sólo en el caso de que el microorganismo pudiese sobrepasar las defensas y escapar al reconocimiento (o tal vez suprimir la inducción de defensas en el huésped) podría colonizar exitosamente la planta.

De acuerdo a estos postulados, las simbiosis sólo tendrían lugar si el simbiote microbiano fuese reconocido por la planta huésped y fuese seleccionado respecto de los microorganismos del entorno. Indirectamente, esta teoría deja implícito el fenómeno de especificidad de la interacción.

A muchos compuestos se les ha atribuido la responsabilidad del reconocimiento entre los simbioses, entre ellos a las lectinas, glicoproteínas que se unen a carbohidratos. En secciones siguientes se discutirán más ampliamente ésta y otras posibilidades.

Es importante destacar que, para que se inicie el proceso de asociación simbiótica, ambos simbioses deben poseer la información genética necesaria para llevarlo a cabo. Es decir, uno o ambos simbioses deben estar preparados para producir y enviar la primer señal de reconocimiento previo al contacto entre ambos. Dada la naturaleza de este trabajo de tesis se excluye la discusión de los más que abundantes trabajos sobre genética de la asociación. Para mayor información pueden consultarse las revisiones de Appelbaum (1990) o Long (1992).

### **1.7.2. Las lectinas y el proceso de reconocimiento:**

#### **1.7.2.1. ¿Qué son las lectinas?**

El descubrimiento por parte de Stillmark (1888) de las propiedades hemaglutinantes de la proteína ricina constituye el comienzo del estudio de las lectinas. Diez años después Elfstrand

introduce el término **hemaglutinina** para referirse a estas proteínas.

El término **lectina** (del latín "legere", elegir) fue introducido por Boyd y Shapleigh (1954) para describir una clase de proteínas de plantas que aglutina células y exhibe especificidad de unión a azúcares semejante a la de los anticuerpos. Luego, y debido a que se encontraron sustancias similares tanto en animales como en plantas, se pensó en distintas definiciones (Goldstein et al., 1980; Kocourek y Horejsi, 1981). Hay una definición aceptada por el Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (Dixon, 1981) que dice que la lectina es una proteína que se une a hidratos de carbono, que es de origen no inmune, que aglutina células o precipita carbohidratos o glicoconjugados (Goldstein et al., 1980). Esta definición implica que las lectinas son multivalentes y poseen al menos dos sitios de unión que les permite aglutinar células animales o vegetales y/o precipitar polisacáridos, glicoproteínas, peptidoglicanos, ácidos teicoicos y glicolípidos. El término "no inmune" incluido en la definición permite diferenciar a las lectinas de los anticuerpos anti-carbohidratos que también pueden actuar como aglutininas. Además, y contrariamente a lo que sucede con los anticuerpos que son estructuralmente semejantes entre sí, las lectinas varían en tamaño molecular, composición de aminoácidos, requerimientos de metales y estructura tridimensional. Se encuentran tanto en animales como en vegetales, a diferencia de lo que ocurre con los anticuerpos que no son sintetizados por las plantas.

Algunos autores objetan el definir a las lectinas por su actividad biológica *in vitro* ya que el rol de las mismas en los sistemas vivos no está totalmente dilucidado (Kocourek y Horejsi, 1981). Sostienen que con esta definición se excluye a algunas proteínas tóxicas de las plantas tales como la ricina, que son muy semejantes a las lectinas pero que son muy pobres como aglutinantes.

Con respecto a la función, se cree que las lectinas actúan como determinantes para el reconocimiento en gran variedad de sistemas biológicos, en microorganismos, plantas y animales (para mayor detalle véase Liener et al., 1986). En bacterias, las lectinas de superficie median la adhesión azúcar-específica de las primeras a las células epiteliales lo cual es un prerrequisito esencial para la infección. En animales, las lectinas asociadas a membranas parecen funcionar en la clarificación de glicoproteínas del sistema circulatorio. En plantas, parecen actuar como agentes protectores frente a hongos fitopatógenos e intervenir de alguna manera en el proceso simbiótico entre rizobios y leguminosas. Este último aspecto es el que se desarrollará a continuación.

#### **1.7.2.2. ¿Cómo se lleva a cabo el reconocimiento?**

El reconocimiento *Rhizobium*-leguminosa puede ser considerado como un caso especial de reconocimiento célula-célula. Es un proceso complejo que debe requerir de la interacción de macromoléculas complementarias de la planta y del microorganismo de

modo tal que una de ellas lleve la información biológica para que la otra decodifique. Ambas macromoléculas deben ser capaces de ajustarse estereoquímicamente.

Se ha considerado que las macromoléculas mediadoras de los fenómenos de reconocimiento podrían ser lectinas y carbohidratos. Los carbohidratos pueden llevar gran cantidad de información en su constitución. Esta información está dada por el tipo de azúcares unidos, la secuencia, la posibilidad de uniones ramificadoras y de modificación posterior de los azúcares con sustituyentes no sacarídicos y por la posición y configuración anomérica de las uniones glicosídicas. Las lectinas, proteínas que unen carbohidratos en forma específica y no covalente, podrían participar en el reconocimiento celular no sólo a través de su unión a carbohidratos sino también a través de dominios capaces de reconocer otros ligandos no sacarídicos como a través de sus propios carbohidratos (Barondes, 1988). Se han identificado sitios de alta afinidad para la adenina en las lectinas de *P. vulgaris* y *G. max* (Roberts y Goldstein, 1983b) y poco se ha explorado el posible rol de las cavidades hidrofóbicas que también podrían participar en el proceso de reconocimiento.

Una de las lectinas cuya estructura ha sido más estudiada es la concanavalina A extraída de *Canavalia ensiformis* (véase revisión de Goldstein y Poretz, 1986). Se ha caracterizado su cavidad hidrofóbica y se conoce la secuencia de aminoácidos que la forman. Se ha observado que las lectinas de otras leguminosas presentan una cavidad hidrofóbica prácticamente igual a la de la concanavalina A

con sólo algunas sustituciones de aminoácidos. La conservación de la cavidad hidrofóbica a lo largo de la evolución sugiere que ésta es esencial en la función de las lectinas de la planta. Esta idea se ha visto reforzada al comprobar que la concanavalina A puede unir auxinas de plantas (Edelman y Wang, 1978) y otras lectinas pueden interaccionar con adenina y citoquinina vía su sitio de unión hidrofóbico (Roberts y Goldstein, 1983a, 1983b).

#### **1.7.2.3. ¿Qué es la especificidad?**

La especificidad de la simbiosis rizobio-leguminosa se manifiesta por:

- la imposibilidad de microorganismos del suelo que no sean rizobios de entrar efectivamente en la planta e inducir la formación de estructuras tales como el hilo de infección.
- el rango de especificidad de huésped entre miembros del grupo *Rhizobium* y la familia *Leguminosae*. Rizobios que infectan y nodulan soja, no pueden por ejemplo, nodular poroto o trébol blanco y viceversa. Esta especificidad de huésped es la base operacional de la diferenciación en especies y la clasificación en grupos de inoculación cruzada en el género *Rhizobium* y puede considerarse como la habilidad de un tipo particular de leguminosa de reconocer sólo ciertos tipos de rizobios como potenciales simbiosiontes.

#### **1.7.2.4. La hipótesis de la lectina:**

Un modelo para explicar el reconocimiento entre simbiosiontes y la especificidad de huésped es el llamado "hipótesis de



reconocimiento por lectinas". Este modelo ha sido ampliamente estudiado en los últimos 20 años y se ha presentado tanta evidencia a su favor como en su contra. Luego de una etapa inicial de intenso estudio durante la década del 70, la hipótesis de la lectina recibió menor atención por parte de los investigadores durante los años 80. Resultados de fines de esta década (Halverson y Stacey, 1986; Diaz et al., 1989) nuevamente pusieron en vigencia la teoría y se han propuesto nuevos roles para la proteína en la simbiosis, ampliando la hipótesis inicial (Roth y Stacey, 1991).

El modelo fue propuesto por Albersheim y Anderson-Prouty en 1975 (ver sección 1.7.1.) quienes postularon que las moléculas de lectina presentes en las células "blanco" del huésped, se pegan a moléculas de carbohidratos complementarias presentes en la superficie de las células microbianas provocando respuestas definidas en el huésped. Estas respuestas pueden resultar en la exclusión o inclusión de los microorganismos por parte del huésped. En los sistemas simbióticos esto podría de alguna manera determinar la iniciación del proceso de infección de la leguminosa huésped. En los sistemas planta-patógeno esto podría inducir defensas por parte de la planta (Bhuvanewari, 1981).

Albersheim y Anderson-Prouty (1975) enunciaron su teoría basándose en evidencia experimental previa. Hamblin y Kent (1973) trabajaron con el par simbiótico *R. phaseoli*-*P. vulgaris*. Estos autores brindaron evidencia experimental indirecta ya que sus

ensayos se basaban en pruebas de hemaglutinación con glóbulos rojos y no estudiaron el tema de la especificidad. Observaron que la bacteria tratada con lectina era capaz de aglutinar eritrocitos. Demostrando el pegado de eritrocitos a los pelos radiculares sugirieron la presencia de aglutinina en la raíz de la planta. Casi 20 años después, mucho se ha escrito sobre el rol de las lectinas en varios pares simbióticos pero acaso el citado sea el menos estudiado a ese respecto.

Bohloul y Schmidt (1974) usando lectinas de semillas marcadas con compuestos fluorescentes demostraron por primera vez la interacción específica. Encontraron que lectina de soja (*Glycine max*) se unía a 22 de 25 cepas de *R. japonicum* que nodulaban soja pero no a 23 especies de rizobios no infectivos. Estas observaciones fueron luego confirmadas (Bhuvanewari et al., 1977) y expandidas (Bhuvanewari y Bauer, 1978).

Los resultados de Hamblin y Kent (1973) y de Bohloul y Schmidt (1974) en combinación con el descubrimiento de que sólo células infectivas de *R. trifolii* eran unidas a la lectina de su huésped, *Trifolium repens*, llevaron a Dazzo y Hubbell (1975a) a proponer la teoría del "antígeno común". Trabajando con un anticuerpo contra la superficie radicular de trébol y la superficie de una cepa de *R. trifolii* mostraron que las raíces de trébol y las bacterias infectivas poseían un antígeno de superficie común a ambas. Este antígeno estaba presente en la superficie de células de cepas infectivas de *R. trifolii* pero ausente o presente en muy bajas cantidades en cepas no infectivas. Dazzo y Hubbell aislaron el

antígeno de *R. trifolii*, un heteropolisacárido ácido capsular compuesto por varios azúcares entre ellos 2-desoxiglucosa. Demostraron la presencia de una lectina, trifolina, en los extractos de semilla de trébol capaz de pegarse al antígeno capsular y a cepas de rizobio infectivas. Con estos resultados elaboraron una teoría sobre la adhesión específica de los rizobios a la superficie de la raíz de trébol proponiendo que la lectina actuaba como "puente" entre estructuras antigénicas comunes de la superficie del rizobio y la raíz.

Dazzo et al. (1976; 1978) brindaron más evidencia experimental en favor de la teoría. El pretratamiento de los rizobios con trifolina aumentaba su adsorción a la superficie radicular (Dazzo et al., 1976). Dazzo et al. (1978) observaron que 2-desoxiglucosa prevenía el pegado de polisacárido de *R. trifolii* a raíces de trébol y que anticuerpos anti-lectina de semilla daban reacción cruzada con una proteína localizada en la punta de los pelos radiculares de trébol. Fue así como, eluyendo con 2-desoxiglucosa, obtuvieron una trifolina de raíz que mediante técnicas electroforéticas e inmunológicas resultó ser idéntica a la de semilla.

De estos resultados (Dazzo y Hubbell 1975a; Dazzo et al. 1976; 1978) se desprende una perfecta correlación entre unión a lectina e infectividad en el par simbiótico *R. trifolii*-trébol. Sin embargo, Dazzo y Hubbell (1975b) no pudieron encontrar evidencia de que la lectina concanavalina A se pegara preferencialmente a cepas

que infectan a la leguminosa huésped, sugiriendo que tal vez la lectina jugara un rol no específico en esa simbiosis.

Los trabajos del grupo de Bauer (Bhuvanewari et al., 1977; Bhuvanewari y Bauer, 1978; Bauer y Bhuvanewari, 1979) confirmaron los trabajos de Bohlool y Schmidt (1974). Trabajando con lectina de semilla de soja marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) encontraron evidencia de especificidad ya que *R. japonicum* se pegaba a la lectina marcada y otros rizobios no lo hacían (Bhuvanewari et al., 1977). La correlación entre pegado a lectina e infectividad fue mejorada cuando la bacteria se incubó con raíces del huésped o con exudado de las mismas. Cepas de *R. japonicum* que no se pegaban a lectina en un medio artificial sí lo hacían luego de la preincubación (Bhuvanewari y Bauer, 1978). Bauer y Bhuvanewari (1979) proponen un modelo para el reconocimiento microbiano que establece que la interacción de lectina del huésped con receptores característicos en la superficie del microsimbionte actúa desencadenando las respuestas en el huésped y/o microsimbionte que llevan a una infección exitosa. Este modelo se diferencia del de Dazzo y Hubbell (1975a) en que el último no sugiere ninguna consecuencia inmediata en el huésped luego del reconocimiento mediado por lectina. De acuerdo a este modelo, el pegado de la bacteria a la superficie de la raíz determina el reconocimiento *per se* de modo tal que sólo cepas infectivas pueden unirse a los pelos radiculares de trébol.

Los modelos vistos proponen que la iniciación de la infección sería una consecuencia del reconocimiento exitoso. Esto sin embargo

no implica que todas las cepas rizobianas que poseen los receptores apropiados para lectina y que son reconocidas, pueden nodular al huésped. La interacción huésped-microorganismo puede bloquearse en cualquiera de los eventos aún después de un primer reconocimiento exitoso.

Muchos intentos de confirmar la hipótesis de que las lectinas de las plantas son responsables de la unión específica no pudieron ser obtenidos con pares simbióticos distintos de trébol-*R. trifolii* (Dazzo y Hubbell, 1975b; Chen y Phillips, 1976; Law y Strijdom, 1977; Pueppke, 1984; Shantharam y Wong, 1982; Shantharam, 1985; Vesper y Bauer, 1985; Boiardi y Galar, 1988). Inclusive Badenoch-Jones et al. (1985) no pudieron confirmar la hipótesis aún con el par trébol-*R. trifolii*. La hipótesis tampoco ha podido ser corroborada con el par arveja-*R. leguminosarum* biovar *viciae* (Smit et al., 1986; Kijne et al., 1988) que es un sistema evolutivamente muy cercano de trébol-*R. trifolii* ya que los rizobios involucrados son considerados biovares del mismo género *R. leguminosarum*. Se ha informado sobre rizobios que se unen a lectinas de plantas que no infectan ni nodulan (Dazzo y Hubbell, 1975b; Law y Strijdom, 1977; Kamberger, 1979; Wong, 1980; Seegers y La Rue, 1985; Boiardi y Galar, 1988).

Aún hoy no hay consenso respecto de la naturaleza bioquímica de los receptores para lectina. Dazzo y Hubbell (1975a) informaron que la lectina de trébol se unía a polisacárido capsular (CPS) de *R. trifolii*. Wolpert y Albersheim (1976) sugerían que las lectinas se unían a lipopolisacáridos (LPS) de rizobios simbióticos. Planqué

y Kijne (1977) demostraron que la lectina de arveja se unía a una especie de polisacárido que no era LPS ni exopolisacárido (EPS). Bhagwat y Thomas (1980) encontraban pegado de lectina de maní tanto a EPS como a LPS y proponían a ambos polisacáridos como posibles sitios de unión. Tsien y Schmidt (1980) observaban pegado de lectina a LBP (polisacárido de pegado a lectina) que forma parte del EPS. Bal y Shantharam (1981) informaban unión de lectina de soja a CPS mientras que Shantharam (1985) indicaba que la lectina de *P. vulgaris* se unía a CPS de rizobios homólogos y heterólogos. Estos resultados no son necesariamente conflictivos porque distintos rizobios pueden tener distintas o múltiples estructuras receptoras.

Algunos autores (Wong y Shantharam, 1984; Lepek, 1989; Lepek y Marechal, 1989) consideran que la interacción lectina-rizobio es iónica en lugar de involucrar un receptor oligosacarídico específico. Wong y Shantharam (1984) encontraron que compuestos iónicos como el NaCl y el piruvato inhibían la unión entre la lectina y el rizobio. Lepek (1989) y Lepek y Marechal (1989) no encontraron ninguna evidencia a favor de la especificidad de la interacción ya que células de *R. meliloti* fueron aglutinadas con proteínas de semillas de *Lotus* e inclusive por proteínas no vegetales con la condición de que su pI fuera superior al del ensayo de aglutinación.

Muchas de las contradicciones observadas entre los distintos grupos de trabajo podrían ser explicadas por las diferentes metodologías usadas que hacen difícil la comparación de resultados.

En la mayoría de los estudios se ha usado lectina de semilla. Sin embargo hay considerable evidencia de interacción de lectina de raíz con rizobios infectivos (Dazzo et al, 1976; Dazzo y Brill, 1977; Dazzo et al., 1978; Stacey et al., 1980; Law y Strijdom, 1984; Seegers y La Rue, 1985; Díaz et al., 1989; Lugtenberg et al., 1991). Muchos ensayos usan el método de hemaglutinación y su inhibición por polisacáridos bacterianos (Pueppke et al., 1980; Tsien y Schmidt, 1980 entre otros). Este método es cuantitativo y sencillo pero es sólo una medida indirecta de las interacciones lectina-polisacárido bacteriano porque se basa en la capacidad de estos polisacáridos de competir con un receptor glicoconjugado del eritrocito que puede estar estructuralmente no relacionado o tener distinta afinidad por la lectina (Truchet et al., 1983).

Si la lectina se une a receptores polisacarídicos de la superficie del rizobio, puede esperarse que la nutrición bacteriana y su estado fisiológico influyan en la química de polisacáridos de la superficie de la célula en relación a la unión de la lectina. Muchas de las contradicciones entre los distintos resultados podrían deberse al hecho de haber usado bacterias en diferentes fases de crecimiento. La presencia y accesibilidad de los receptores de lectina dependen de la fase de crecimiento y del suministro de nutrientes por lo tanto la unión de lectina al microorganismo dependerá de la fase de crecimiento del mismo. Evidencia en este sentido ha sido mostrada por los trabajos de Bhuvanewari et al. (1977), Mort y Bauer (1978), Dazzo et al.

(1979), Bhagwat y Thomas (1980), Bal y Shantharam (1981), Hrabak et al. (1981), Shantharam (1985), Boiardi y Galar (1988), entre otros.

Un aspecto que ha sido poco estudiado y que ofrece un interesante campo a la experimentación es el rol de las lectinas bacterianas en la asociación simbiótica. Mucho se ha dicho sobre las lectinas de las leguminosas pero poco se ha tenido en cuenta que estas proteínas están ampliamente distribuidas en la Naturaleza y que podrían ser las lectinas del rizobio las que estuvieran implicadas en la unión o adhesión. En una interesante revisión Bauer (1981) especula acerca de la posibilidad de que asociaciones favorables al huésped estén caracterizadas por una estrategia de unión mediada por lectina del huésped y que las asociaciones favorables al microorganismo, por una mediada por lectina bacteriana.

Es sabido que en muchas interacciones bacteria-célula hay lectinas bacterianas como en la interacción de *E. coli* con células epiteliales (Ofek et al., 1977) o la de *Pseudomonas* con células de hojas (Sequeira et al., 1977). En general, microorganismos de la familia *Enterobacteriaceae* poseen lectinas que median el pegado de la bacteria a la superficie de la mucosa de los tractos gastrointestinales y urinario jugando un rol en el inicio de la infección. Hay una lectina de *Actinomyces* que se pega a bacterias del género *Streptococcus* desempeñando un papel en la colonización dental y de otras superficies orales. No hay muchos resultados con respecto a lectinas del género *Rhizobium* y su posible rol en el proceso simbiótico. Kijne et al. (1983) aislaron una aglutinina de



*R. leguminosarum* específica de manosa y especularon acerca de su papel en la interacción rizobio-leguminosa. En el par simbiótico soja-*B. japonicum* resultados recientes (Ho et al., 1990, 1992; Loh et al., 1992) dan soporte a la idea de que la lectina reside en la bacteria mientras que las células de la planta ofrecen el ligando carbohidrato. En trabajos recientes Depierreux et al. (1991) y Wisniewski et al. (1992) aislaron y caracterizaron lectinas de *Agrobacterium tumefaciens* y de *Bradyrhizobium lupini*. Estos resultados dan apoyo a la hipótesis de interacciones proteína-azúcar entre la lectina bacteriana y el polisacárido de la pared celular de la planta.

#### **1.7.2.5. Soplan nuevos vientos...**

Como se indicó en la sección anterior, resultados obtenidos a fines de la década del 80 pusieron nuevamente en vigencia la hipótesis de la lectina aunque con diferentes alcances.

Se ha encontrado una lectina de cultivo de células de soja (SCL) que no está relacionada estructuralmente con la lectina de semilla de soja (SBL). SCL fue capaz de inducir en *B. japonicum* la producción de un factor de competencia capaz de estimular posteriormente el crecimiento de la planta. El efecto fue específico ya que lectinas de otras plantas no pudieron activar el factor de crecimiento y se sugirió que las lectinas podrían actuar como activadores interaccionando con glicolípidos localizados en la

membrana externa de las bacterias (Imbert y Mutaftschiev, 1988; Fantauzzo y Mutaftschiev, 1988)

A partir de recientes trabajos se ha propuesto un nuevo modelo para la adhesión bacteriana (véase revisión de Roth y Stacey, 1991 y sección 1.7.3.3.) Este modelo se postuló a partir de trabajos con *R. leguminosarum* biovar *viciae* crecido bajo distintas limitaciones de sustrato. La limitación por C lleva a un proceso de adhesión en dos etapas en el cual están involucradas una proteína  $\text{Ca}^{+2}$ -dependiente, la rihadhesina, y fibrillas de celulosa. La limitación por  $\text{Mn}^{+2}$  conduce a un proceso en el cual la lectina de arveja está involucrada junto con las fibrillas de celulosa (Smit et al., 1986; 1987; 1989a, 1989b, 1991; Kijne et al., 1988). Por lo tanto la lectina jugaría un rol en incrementar la afinidad de la bacteria por la superficie de la raíz pero no sería esencial para el proceso.

Halverson y Stacey (1984, 1985, 1986a) fueron los primeros en proveer datos mostrando un efecto directo de la lectina en la nodulación. En estos experimentos se encontró que el pretratamiento de células de *B. japonicum* con exudado de raíz o lectina de soja aumentaba la nodulación de la cepa salvaje y restauraba la aptitud nodulante de un mutante lento para nodular. Incubando los rizobios con la lectina y antibióticos inhibidores de la síntesis proteica no se observaba el mismo efecto por lo cual se sugirió que la lectina inducía en *B. japonicum* la síntesis *de novo* de proteínas necesarias para la eficiente iniciación del proceso de nodulación. Estos autores postularon que la lectina inducía un cambio

fisiológico en lugar de actuar como un simple puente entre estructuras antigénicas comunes del microorganismo y la planta y que desempeñaba un importante rol en la infección tal vez mediando en la formación de hilos de infección.

Uno de los resultados más contundentes a favor de la hipótesis de la lectina fue provisto por Díaz et al. (1989). Trabajaron con raíces de trébol hechas transgénicas mediante la introducción del gen de la lectina de arveja, usando *Agrobacterium rhizogenes* como vector. La expresión de esta lectina en las raíces transformadas de trébol hizo posible la infección de las mismas por *R. leguminosarum* infectivo en arveja pero no en raíces normales de trébol. Anteriormente Díaz et al. (1986) habían demostrado correlación entre la presencia de lectina en la superficie de los pelos radiculares de arveja y la infección de la raíz por el rizobio.

En una reciente revisión de Stacey y Roth (1991) se resumen los últimos resultados y se concluye que:

- la lectina parece influir en la adhesión del rizobio a la superficie del pelo radicular pero no es esencial;
- la lectina podría desempeñar un rol aumentando la afinidad de las bacterias por la superficie de la raíz a través de la interacción con polisacáridos bacterianos;
- la localización de lectina en la raíz estaría marcando aquellos sitios en los cuales puede ocurrir una infección exitosa;
- tal vez la lectina desempeñe un rol luego de las etapas de adhesión y enrulamiento del pelo radicular, posiblemente mediando en la formación de hilos de infección;

- las proteínas rizobianas inducidas por lectina podrían ser esenciales para la penetración de los microorganismos en la raíz y para la estimulación de la formación de hilos de infección.

Este resumen constituye una verdadera "hipótesis ampliada de la lectina" que sin excluir totalmente la anterior le da una mayor flexibilidad.

### **1.7.3. La preinfección:**

En esta etapa se incluyen la quimiotaxis hacia determinadas zonas de la raíz, la colonización rizosférica, la adsorción a la superficie y pelos radicales, deformación, ramificación y enrulamiento de los pelos.

#### **1.7.3.1. Quimiotaxis y movilidad:**

El género *Rhizobium* al igual que otras bacterias gram (-) como *E. coli* y *Pseudomonas spp.* presenta movilidad por medio de flagelos y fenómenos de quimiotaxis positiva o atracción hacia determinados compuestos.

Las funciones de movilidad y quimiotaxis no son imprescindibles para la asociación lo cual fue demostrado con mutantes para esas funciones (Hunter y Fähring, 1980; Napoli y Albersheim, 1980; Ames y Bergman, 1981; Caetano Anollés, 1985; Caetano Anollés et al., 1988). Sin embargo estas funciones microbianas les confieren a los microorganismos que las poseen

ventajas competitivas al determinar el éxito de la adsorción temprana (Caetano Anollés, 1985).

Es posible que la quimiotaxis sea importante para la colonización bacteriana inicial de la planta (Caetano Anollés, 1985; Mellor et al., 1987). Bajo estas condiciones la población rizosférica no está bien desarrollada y los quimioattractantes pueden difundir en el suelo (Roth y Stacey, 1991). El alto número de rizobios en las proximidades de las raíces puede deberse a quimioatracción hacia las mismas. La raíz no es homogénea en cuanto a su capacidad para atraer rizobios sino que hay determinados puntos de la superficie de la misma, cercanos al ápice radicular, que presentan una mayor aptitud (Gulash et al., 1984; Malek, 1989).

Los ensayos de quimiotaxis se han llevado a cabo con exudados de raíces o semillas (Currier y Strobel, 1976; Gitte et al., 1978; Malek, 1989; Gaworsewska y Carlile, 1982; Bergman et al., 1988; Barbour et al., 1991) o con sustancias puras, muchas de ellas reconocidas como componentes de los exudados (Malek, 1989; Burg et al., 1982; Gaworsewska y Carlile., 1982; Götz et al., 1982; Aguilar et al., 1988; Caetano Anollés et al., 1988; Barbour et al., 1991). De los citados trabajos se desprende que los aminoácidos, azúcares, ácidos orgánicos y metabolitos secundarios de la planta son quimioattractantes para rizobios aunque los exudados de raíces han demostrado ser superiores.

No sólo moléculas simples de bajo peso molecular han demostrado ser quimioattractantes sino también sustancias peptídicas de bajo peso molecular del exudado de alfalfa (Bergman et al.,

1988) e inclusive sustancias de alto peso molecular como una glicoproteína -quimiotactina- del exudado radicular de *Lotus corniculatus* (Currier y Strobel, 1977). Algunos de esos quimioattractantes actuarían sobre los rizobios con cierta selectividad: la luteolina exudada por raíz de alfalfa actúa sobre *R. meliloti* (Caetano Anollés et al., 1988) y la quimiotactina de *Lotus* atrae a su respectivo microsimbionte (Currier y Strobel, 1977). No se ha determinado especificidad en la quimiotaxis: se ha informado que tanto *E. coli* como *R. leguminosarum* bv. *viciae* muestran quimiotaxis positiva hacia exudados de raíz de arveja (Gaworsewska y Carlile, 1982).

*Rhizobium meliloti*, *R. leguminosarum* bv. *viciae* y bv. *phaseoli* mostraron quimiotaxis hacia sustancias flavonoides inductoras de sus respectivos genes de nodulación (Aguilar et al., 1988; Caetano Anollés et al., 1988). Como breve resumen, se puede decir que la planta huésped libera quimioattractantes y moléculas señal inductoras de genes nod y, como contraparte, los rizobios producen señales que influyen en el crecimiento y el metabolismo de las células de la raíz. Una o más de estas señales es un mitógeno específico que probablemente actúa influyendo en el balance endógeno de fitohormonas (Kijne, 1992).

La movilidad también ha sido considerada como un importante factor de competición. Mutantes no móviles de *B. japonicum* formaban sólo el 20% de los nódulos en plantas inoculadas con igual número de bacterias móviles y no móviles (Hunter y Fähring, 1980). Mutantes carentes de flagelo de *R. leguminosarum* bv. *viciae*

resultaron tener la misma aptitud para nodular que los flagelados en ensayos de laboratorio (Smit et al, 1989a) aunque probablemente fueran menos competitivos a campo. Muy recientemente se ha informado sobre la existencia de un factor de movilidad en ensayos de laboratorio con *R. meliloti*. Este factor aún no ha sido identificado y no se sabe si es sintetizado y secretado por *R. meliloti* en sus habitats naturales pero de ser así podría ser importante en la competencia de los rizobios (Bauer, 1992).

#### **1.7.3.2. Colonización rizosférica:**

El término **rizosfera** fue introducido por Hiltner (1904) para referirse a la zona del suelo circunscripta a la inmediata influencia de las raíces. Según algunos autores, estrictamente se extiende hasta 2 cm de la superficie de la raíz (Dowling y Broughton, 1986). La superficie externa de la planta, en íntimo contacto con las partículas del suelo, constituye el **rizoplano**. En un sentido más general, se puede considerar rizosfera al volumen de suelo cercano a la raíz de cualquier planta donde existe gran actividad microbiana debido a la exudación de sustancias orgánicas de la raíz de la planta hacia el suelo. Es una zona rica en nutrientes, particularmente hidratos de carbono, aminoácidos y vitaminas, por los cuales los microorganismos compiten. Además allí se llevan a cabo procesos de absorción de nutrientes inorgánicos por parte de la raíz, interacciones con bacterias, hongos y micorrizas y ataques de protozoarios predadores.

La rizosfera incluye una densa población microbiana donde generalmente predominan las bacterias gram (-). Las bacterias en el suelo y la rizosfera se agrupan en microcolonias y colonizan la raíz en forma discontinua (Foster y Bowen, 1982). Hay áreas hiperpobladas y otras prácticamente exentas de bacterias. Gran parte de la superficie radicular está cubierta por mucigel que es una capa polisacarídica cuya función parece ser la de incrementar áreas superficiales de la raíz y por lo tanto, la absorción de nutrientes (Foster y Bowen, 1982).

Los rizobios se multiplican en la rizosfera y se pegan a la planta huésped para iniciar la nodulación. Este aumento en la multiplicación en las proximidades de la raíz se denomina **efecto rizosférico**. El concepto de estimulación rizosférica fue propuesto por Nutman (1965) quien sostenía que la leguminosa tendía a promover la multiplicación de bacterias capaces de infectarla y no de otras. En cierta forma, Nutman proponía una estimulación específica por parte de la leguminosa huésped.

Tuzimura y Watanabe (1962a, 1962b) observaron que las rizosferas de leguminosas estimulaban el crecimiento de rizobios más que de otras bacterias del suelo y que los rizobios proliferaban más en rizosferas de leguminosas que en las de monocotiledóneas.

Se observó que *B. japonicum* crecía muy lentamente en suelo no rizosférico con tiempos de duplicación de 241-361 h (Schmidt, 1974) en tanto que en la rizosfera el tiempo de duplicación era de 9-12 h (Bowen y Rovira, 1976). Robert y Schmidt (1983) encontraron



estimulación rizosférica para *R. phaseoli* aunque el fenómeno no mostraba especificidad. Un ejemplo extremo de especificidad fue informado por Chatel et al. (1973) y por Robinson (1967) quienes observaron que *R. meliloti* sólo colonizaba rizosferas de su huésped *Medicago spp.*

Van Egeraat (1975) demostró que *R. leguminosarum* podía usar selectivamente homoserina como única fuente de nitrógeno y carbono. La homoserina es el principal material ninhidrina positivo que liberan las raíces. Esto fue considerado como un mecanismo de estimulación diferencial de *R. leguminosarum* en la rizosfera de arveja. Trabajos posteriores de Johnston (1988) mostraron que los genes para la utilización de homoserina están codificados en el pSym y este resultado fortaleció la proposición de que la utilización de homoserina tiene un rol importante en la asociación simbiótica.

Peña-Cabriales y Alexander (1983) encontraron que bajo condiciones de laboratorio, *B. japonicum* proliferaba más extensivamente en una variedad de rizosferas de no huésped que en las del huésped. Estos mismos autores observaron que *R. phaseoli* colonizaba pobremente las rizosferas de soja en ensayos de laboratorio en tanto que a campo, colonizaba mejor la rizosfera de soja que el *B. japonicum* indígena.

Moawad et al. (1984) observaron que poblaciones de *B. japonicum* de  $10^4$  células  $g^{-1}$  suelo de suelo sufrían una estimulación al ser introducidas en suelo rizosférico hasta alcanzar valores de  $10^6$  células  $g^{-1}$ . Las poblaciones introducidas en suelo no rizosférico

no sufrían estimulación. Si bien estos autores observaron efecto rizosférico, la especificidad no se expresaba en esta etapa de la interacción ya que los rizobios nodulantes no resultaban más estimulados que los no nodulantes. Además, bajo condiciones de campo, encontraron mayor efecto estimulador de la multiplicación de *B. japonicum* en rizosferas de soja que en las de avena.

De esta breve revisión se desprende que el efecto rizosférico está ampliamente demostrado en tanto que la especificidad de la estimulación por parte de suelos rizosféricos presenta resultados controversiales. Algunos autores sugieren que la estimulación rizosférica es específica de huésped y que determinadas plantas estimulan el crecimiento de su propio simbionte (Nutman, 1965; Robinson, 1967; Chatel et al., 1973; Van Egeraat, 1975). Sin embargo, los rizobios son encontrados en grandes números en la rizosfera de plantas no huésped (Peña-Cabriales y Alexander, 1983; Robert y Schmidt, 1983) aunque se observa que las rizosferas de plantas leguminosas estimulan más el crecimiento de rizobios que las plantas no leguminosas (Tuzimura y Watanabe, 1962a, 1962b; Moawad et al., 1984). Por estas razones algunos autores como Rovira (1969) prefieren considerar que existe una selectividad en la estimulación rizosférica en lugar de una especificidad.

#### **1.7.3.3. Adsorción de los rizobios a la superficie radicular:**

La adsorción de los rizobios a la superficie de la raíz es el primer paso en el que el macro y el microsimbionte se ponen en

contacto físico directo. La evidencia indica que las células de los rizobios resultan adsorbidas a la superficie de la raíz sólo unos minutos después de la inoculación (Chen y Phillips, 1976; Dazzo et al. 1979; Solheim, 1983). En algunos modelos, la adsorción es considerada como un paso requerido en el proceso de infección aunque no tiene por qué ser necesariamente el primer paso o el específico de huésped y podría ocurrir al mismo tiempo que otras interacciones señal-respuesta (véase revisión de Bauer, 1981). Favelukes y Caetano Anollés (1985) encontraron que la adsorción específica de *R. meliloti* a raíces de alfalfa constituye un paso obligado hacia la infección.

El proceso de adsorción se ha estudiado con varios pares simbióticos y la gran variedad de metodologías usadas hace difícil comparar resultados. Generalmente la adsorción se estudia incubando raíces de leguminosas en suspensiones bacterianas seguido de la cuantificación de células firmemente unidas. Esta cuantificación se ha llevado a cabo por observación microscópica directa de bacterias unidas a pelos radiculares (Dazzo et al., 1976; Stacey et al., 1980; Badenoch-Jones et al., 1985; Smit et al., 1986, 1989a, 1989b, 1991); por recuento de rizobios desorbidos por lavados de raíces y posterior plaqueo (Pueppke, 1984; Boiardi y Galar, 1988); mediante el uso de rizobios marcados radiactivamente (Chen y Phillips, 1976; Badenoch-Jones et al., 1985) y recuento de microcolonias sobre la superficie de la raíz (Caetano Anollés, 1985; Caetano Anollés y Favelukes, 1986b; Wall, 1990). Refiriéndose a la adsorción distintos autores la han diferenciado en específica-no específica

(Dazzo et al., 1986), firme y laxa (Vesper y Bauer, 1985), débil y firme (Van Rensburg y Strijdom, 1982), polar y no polar (Bohloul y Schmidt, 1974, 1976).

Algunos autores han pensado en la posibilidad de que la adsorción sea la etapa que determine la especificidad de huésped. En el par simbiótico *R. trifolii*-trébol la adhesión parece ser selectiva. Dazzo et al. (1976) propusieron la existencia de mecanismos de adhesión inespecífica, capaces de unir bajo número de rizobios no infectivos y mecanismos específicos (Dazzo et al., 1984) capaces de unir alto número de bacterias y que involucran una adhesión polar de los rizobios a la superficie del pelo radicular y el simultáneo acúmulo de los mismos en el ápice de la raíz. Esta forma de adsorción específica también se ha visto en *B. japonicum*-soja (Stacey et al., 1980) y en *R. meliloti*-alfalfa (Caetano Anollés y Favelukes, 1986b).

Otros autores no han podido encontrar evidencia de especificidad simbiótica en esta etapa (Chen y Phillips, 1976; Pueppke, 1984; Badenoch-Jones et al., 1985; Vesper y Bauer, 1985; Smit et al., 1986).

Se encontró adsorción mediada por lectina en los pares *R. leguminosarum* bv. *trifolii*-trébol (Dazzo et al., 1985), *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Kato et al., 1981; Solheim, 1983; Kijne et al., 1988) y para *B. japonicum*-soja (Stacey et al., 1980). Sin embargo el papel de las lectinas en la adsorción no ha podido ser demostrado en muchos otros casos (Chen y Phillips, 1976; Pueppke 1984, Badenoch-Jones et al. 1985; Mills y Bauer, 1985; Vesper y

Bauer, 1985, 1987; Caetano Anollés y Favelukes, 1986b; Smit et al. 1986; 1987).

Un factor que afecta la adsorción mediada por lectina es la aparición transitoria de los receptores bacterianos para la proteína. Algunos de esos resultados han sido revisados en la sección 1.7.2.4.

Al comenzar esta sección me referí a la gran cantidad de metodologías empleadas y a la dificultad de establecer comparaciones. La diferencia de resultados también podría explicarse en algunos casos por el uso de bacterias lavadas previo al ensayo de adsorción considerando que los determinantes de especificidad y quizás otros componentes necesarios para la adhesión se encuentran en la superficie del rizobio y podrían ser removidos por estos tratamientos (Wall, 1990). A este respecto, Vesper y Bhuvaneshwari (1988) consideran bacterias firmemente adheridas a aquellas que se asocian con las células de la raíz en un período de 1 hora de manera lo suficientemente firme como para soportar el protocolo de lavado usado. Si son éstas las bacterias cuantificadas en el ensayo de adsorción no habría demasiado inconveniente con el lavado. Las diversas metodologías usadas implican diferencias en la concentración del inóculo de células utilizado y esto contribuye también a complicar el análisis de los resultados.

Bauer (1981) destaca que hay cierto riesgo de sobrevalorar la adsorción mediada por lectina. Sostiene que es necesario recordar que los rizobios son exitosos microorganismos del suelo aún en

ausencia del huésped. La adsorción a cualquier fuente de nutrientes o a cualquier superficie es un carácter fuertemente seleccionado para el éxito de estos microorganismos. Los rizobios se pegan entre sí formando grumos, se pegan al vidrio y al plástico y a las raíces de plantas huésped como no huésped, o sea, se pegan a superficies sin que esté involucrada ninguna lectina. Inclusive se ha informado adsorción de grandes cantidades de rizobios a superficies de raíces de trigo y arroz y en menor proporción a otras superficies como fibras de algodón (Shimshik y Hebert, 1978).

Algunos autores especulan acerca de que la adhesión sea completamente no específica (un evento al azar) mientras que la infección podría ser específica y controlada por enzimas hidrolíticas producidas sólo por los rizobios invasivos (Chen y Phillips, 1976).

Los resultados controversiales con respecto al rol de la lectina en la adsorción llevaron a algunos investigadores a buscar mecanismos alternativos. Vesper y colegas (Vesper y Bhuvanewari, 1985, 1986; Vesper et al., 1987; Vesper y Bhuvanewari, 1988) presentaron evidencia en favor del rol de fimbrias en el proceso, sin embargo esta adsorción no mostró especificidad. Mutantes defectivos en la producción de fimbrias nodulaban normalmente aunque tenían reducida su capacidad de adsorción. Otros trabajos mostraron que los rizobios producen microfibrillas de celulosa que anclan la bacteria a la superficie de la raíz (Napoli et al., 1975; Smit et al., 1987). También en este caso, los mutantes defectivos

eran normales en su capacidad de nodular pero se adsorbían en menor proporción.

Decía en la sección 1.7.2.5. que a partir de trabajos recientes (Smit et al., 1986, 1987, 1989a, 1989b, 1991; Kijne et al., 1988) se ha propuesto un nuevo modelo para explicar el fenómeno de adsorción. Este modelo se basa en que las condiciones y la fase de crecimiento de los microorganismos son de fundamental importancia al considerar la adsorción bacteriana. Los trabajos se llevaron a cabo con el par *R. leguminosarum* bv. *viciae*-arveja y las bacterias empleadas para los ensayos fueron crecidas bajo distintas limitaciones de sustrato. En todos los casos, salvo en los cultivos  $\text{Ca}^{+2}$ -limitados, se encontró que la limitación de nutrientes coincide con una adsorción óptima. El crecimiento limitado en C resultó en células que se pegan a las superficies de las raíces de una manera no específica que no puede ser revertida por adición de haptenos para lectina de arveja. En estas condiciones, la adsorción es dependiente de la fase de cultivo (máxima en exponencial tardío a estacionario temprano), independiente del pSym y se ha observado formación de fibrillas celulósicas extracelulares involucradas en la adhesión que no eran fimbrias filamentosas proteicas (Smit et al., 1986, 1987). También se vio que el  $\text{Ca}^{+2}$  afectaba la capacidad de adsorción tanto de rizobios homólogos como heterólogos aunque la síntesis de fibrillas no era afectada por los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$ ; por lo tanto se pensó que existía una adhesina  $\text{Ca}^{+2}$ -dependiente. Esta proteína fue posteriormente purificada y se la denominó **rhicadhesina** (Smit et al., 1989a)

El crecimiento limitado en  $Mn^{+2}$  resultó en células que se pegan a las superficies de las raíces de una manera reversible por hapteno de lectina de arveja, indicando un rol para la proteína en el proceso de adsorción. Como en el caso anterior, no interviene el pSym. Al estudiar la infectividad de los rizobios se observó que era mucho mayor bajo ésta condición de crecimiento que en el caso de los rizobios limitados en C; en este último caso no se producían hilos de infección (Kijne et al., 1988).

La única limitación que no condujo a un aumento en la adsorción fue la de  $Ca^{+2}$  indicando un rol esencial del catión en este proceso. No se observó actividad de rhiCADhesina en la superficie celular de los rizobios  $Ca^{+2}$ -limitados aunque la producción de la proteína no estaba afectada por la concentración del catión. Se observó que lo que variaba era la relación rhiCADhesina unida a superficie/rhiCADhesina secretada. Se encontró que esta adhesina bacteriana estaba presente en toda la familia *Rhizobiaceae*, incluyendo *Agrobacterium* (Smit et al., 1989a, 1989b). Smit et al. (1991) proponen entonces que la rhiCADhesina bacteriana  $Ca^{+2}$ -dependiente reconoce algún receptor aún desconocido de la planta y de esta forma establece una primera adhesión.



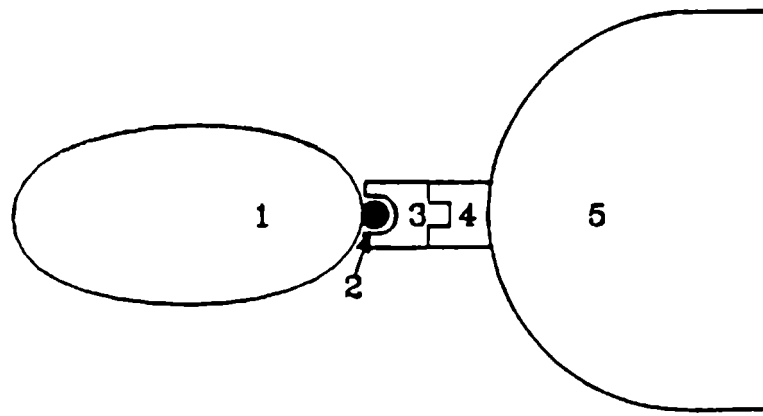


Figura 1.2: Modelo de adhesión (Smit et al., 1991)

1. rizobio
2.  $\text{Ca}^{+2}$
3. rhiCADhesina bacteriana
4. receptor en la superficie del pelo radicular
5. pelo radicular

Con todos estos resultados se propuso un nuevo modelo de adsorción en dos pasos: primero tiene lugar una unión inespecífica y reversible mediada por una adhesina dependiente del  $\text{Ca}^{+2}$  (que puede ser reemplazado por otros cationes divalentes). Luego hay una etapa de formación de acúmulos sobre la punta del pelo radicular mediada por microfibrillas de celulosa en rizobios crecidos con limitación de fuente de C, y por lectina cuando los rizobios provienen de un cultivo limitado en  $\text{Mn}^{+2}$ .

Si los rizobios en la rizosfera están bajo algún tipo de limitación, la simbiosis podría considerarse como un mecanismo por el cual las bacterias evitan la limitación en el crecimiento (Stacey y Roth, 1991). No se ha visto que la lectina esté involucrada en la adsorción cuando los rizobios están limitados en C. sin embargo considerando la composición de los exudados de la planta (Boulter et al., 1966), el C no es un nutriente limitante en

las rizosferas. Por lo tanto, los rizobios se adsorberían a la superficie del pelo radicular a través de un mecanismo inicial involucrando a la rha adhesina, un paso que parece ser favorecido por la lectina. La mayor infectividad de las células  $Mn^{+2}$ -limitadas con respecto a las C-limitadas está sugiriendo que la lectina está involucrada en la infección. El hecho de que la lectina de arveja está involucrada en la adhesión en el par *R.leguminosarum* bv. *viciae*-arveja también está apoyado por otros resultados (Díaz et al., 1989).

#### **1.7.3.4. Deformación, ramificación y enrulamiento de pelos radiculares:**

Una vez puestos en contacto la planta y el microorganismo, la primera respuesta visible del huésped es la deformación de los pelos radiculares. Esta respuesta puede ir desde una deformación leve hasta un enrulamiento marcado (mas de  $360^{\circ}$ ) que, en términos generales, ya es un indicador de infección exitosa. Las deformaciones en sus distintos grados (enrulado, ramificación, espiralización, presencia de pelos con dos o más "cabezas") pueden ser inducidas por inóculos de *Rhizobium* y en menor grado por filtrados de cultivos (Yao y Vincent, 1969; Solheim y Raa, 1973).

De acuerdo al grado de deformación de los pelos, Yao y Vincent (1969) establecen una clasificación en las siguientes categorías:

- ramificación: ramificaciones y abultamientos laterales;
- enrulado moderado: pelos con curvaturas menores de  $360^{\circ}$ ;

- enrulado marcado: pelos con curvaturas iguales o mayores de  $360^{\circ}$ .

Las dos primeras categorías no son indicio de especificidad y pueden ser producidas tanto por rizobios homólogos como por heterólogos. La última categoría está indicando interacción con rizobios homólogos y los pelos que presenten este tipo de deformación probablemente evolucionarán hacia la formación de hilos de infección (sección 1.7.4.). A pesar de que la tercera categoría solamente se observa en las interacciones homólogas, en trébol no hay evidencia de que las infecciones requieran enrulamiento marcado o que las infecciones ocurran más frecuentemente en pelos marcadamente enrulados. El enrulamiento marcado sería un síntoma de asociación compatible pero no un requerimiento para que ésta se establezca (Bauer, 1981). Se han observado también infecciones en pelos con enrulado moderado o con sólo ramificaciones (Fahraeus, 1957; Nutman, 1959; Higashi y Abe, 1980).

Si bien el enrulamiento fue descrito hace más de 100 años por Ward (citado por Bauer, 1981), poco se sabe del proceso en sí, del mecanismo de acción y de las sustancias inductoras. En los últimos años se ha informado sobre una serie de productos de determinados genes que inducen el enrulamiento de los pelos radicales. Aunque aquí no se va a hacer una revisión de los últimos hallazgos al respecto en el campo de la genética (para una revisión actualizada véase Stacey y Roth, 1991; Kijne, 1992; Long, 1992); brevemente se puede decir que Banfalvi y Kondorosi (1989) informaron que la expresión de los genes nod ABC (nod son los genes bacterianos necesarios para nodulación y que sólo se expresan en la presencia

del huésped, exudados o extractos de tejidos de la planta huésped) en *R. meliloti* y *E. coli* resulta en la liberación de sustancias en los sobrenadantes de cultivos que pueden inducir enrulamiento de los pelos en alfalfa y otras plantas. A partir de sobrenadantes de cultivos de *R. meliloti* se aislaron por lo menos tres compuestos activos que agregados separadamente inducen enrulamiento y cuando se agregan juntos llevan a la formación de estructuras tipo nódulos vacíos (Faucher et al., 1989). Se determinó la estructura de dos de los tres compuestos: Nod Rm-1 es un N-acil-tri-N-acetil-1,4-D-glucosamina tetrasacárido que porta un grupo sulfato en el C-6 del azúcar reductor (Lerouge et al., 1990). El segundo compuesto, Nod Rm-2 es idéntico al anterior pero sin el grupo sulfato.

Existe evidencia que sugiere que muchos de los genes nod, si no todos, están directa o indirectamente involucrados en la producción de fitohormonas que son sustancias que estimulan el crecimiento de los pelos radiculares y la división de células corticales (Stacey y Roth, 1991).

Con respecto a los mecanismos del enrulado se han propuesto dos modelos (Bauer, 1981; Hubbell, 1981) que postulan básicamente que el enrulado surge de una inhibición localizada de la síntesis de pared celular del pelo por parte de una o más células adheridas de *Rhizobium*. Al crecer esas zonas inhibidas dejarían atrapados a los rizobios en el punto de máxima curvatura. Así se vería favorecida la penetración de los rizobios y la formación del hilo

de infección en contra de la turgencia celular. Estos son modelos más o menos especulativos que aún no han sido confirmados.

#### **1.7.4. La infección y el desarrollo del nódulo:**

La penetración de los rizobios en la raíz, **infección**, y el desarrollo del nódulo son procesos que parecen ocurrir en forma simultánea. Se conocen tres modos de entrada de los organismos fijadores de nitrógeno a la raíz:

- a través de heridas particularmente donde hay raíces laterales o adventicias;
- a través de pelos radiculares;
- entre células epidérmicas no dañadas.

El primer caso es la clásica forma de invasión de *Agrobacterium* y ha sido estudiado extensamente en las leguminosas *Arachis hypogaea* y *Stylosanthes spp.* cuyos nódulos nunca presentan hilos de infección (véase Sprent y Faría, 1988).

El último caso admite dos posibilidades: una entrada directa a la célula y una entrada entre células pero plantea el problema de tener que vencer la turgencia de la célula intacta. No se ha visto que este mecanismo se produzca con bacterias (Huang, 1986) aunque ocurre en hongos que tienen una estructura de fijación especial que les permite vencer esa barrera (apresorios).

El segundo caso es el que se observa con las bacterias del género *Rhizobium* y las leguminosas que forman los característicos hilos de infección. En la no leguminosa *Parasponia* y en plantas de

la familia *Caesalpinoidea* y algunas *Papilionoidea* se forman hilos de infección pero luego no se liberan las bacterias. Estos hilos se consideran más primitivos desde el punto de vista evolutivo que los que se observan en leguminosas donde las bacterias son liberadas en estructuras rodeadas de membrana (Sprent y Faria, 1988).

Los hilos de infección son estructuras tubulares que llevan a las células de los rizobios, habitualmente en fila única, desde la superficie de la raíz hasta la corteza (ver 1.7.). Los rizobios son liberados del extremo del hilo de infección rodeados por una envoltura de membrana proveniente del huésped estableciendo al simbiote bacteriano en el citoplasma de células corticales del huésped y constituyendo el simbiosoma (Roth et al., 1988). Las células corticales son inducidas a dividirse y la bacteria se diferencia en cuerpos llamados **bacteroides**. El resultado es una estructura especializada llamada **nódulo**.

Aún falta mucho por saber sobre la formación inicial del hilo de infección, su crecimiento direccional hacia adentro en contra de la presión de turgencia del huésped, el pasaje a través de las paredes del pelo radical y las paredes de las células corticales y la posterior disolución para liberar los rizobios.

Fahraeus (1957) fue quien desarrolló una técnica microscópica que permite realizar continuas observaciones e informó que, previo a la formación de un hilo de infección visible, el citoplasma y el núcleo de la célula del pelo radicular se concentraban cerca del sitio de infección. El sitio de iniciación del hilo de infección aparecía como una mancha refringente. Varios investigadores

indicaron que la dirección de crecimiento de la punta del hilo de infección estaba gobernada por la posición y el movimiento del núcleo de la célula del pelo infectado pero no se ha explicado cómo este movimiento dirige o gobierna el crecimiento del hilo (Fahraeus, 1957; Nutman, 1959).

Hasta los trabajos de Callaham y Torrey (1981) se pensaba que los hilos de infección se producían por una invaginación de la pared celular. Estos autores encontraron cambios en la pared en la zona del sitio de infección. Observaron que el hilo de infección parecía ser formado por la deposición de material nuevo, fibrilar, de pared. Se concluyó que el rizobio penetraba directamente la pared del pelo por un proceso que involucraba la degradación de polisacáridos de pared en el sitio localizado. Este resultado también fue confirmado en *Macroptilium atropurpureum* por Ridge y Rolfe (1986) quienes observaron por microscopía electrónica que 22 horas luego de la inoculación, la microcolonia de rizobios parecía haber degradado la matriz de la pared celular dejando despolimerizada una capa de microfibrillas de la pared. Los rizobios producen pectinasa, hemicelulasa y celulasa (Hubbell et al., 1978; Martínez-Molina et al., 1979) y es posible que cuando la bacteria quede atrapada en bolsillos entre las paredes celulares, la concentración de esas enzimas aumente y se produzca una degradación local de las células de la pared (Solheim, 1983). Entre las pectinasas que participan en el proceso de infección se ha informado que, específicamente galacturonasas, podrían ser producidas por la planta inducidas por la presencia del rizobio

infectivo (Ljunggren, 1969) o bien por los mismos rizobios (López y Signer, 1986).

Está bien establecido que muchas infecciones abortan antes de llegar a la formación del nódulo. El alto porcentaje de infecciones abortadas puede ser una manifestación de auto-regulación del número de nódulos. Se sabe que agregando nitrato se aumenta la proporción de infecciones abortadas y que el desarrollo de los primeros nódulos inhibe subsecuentes infecciones en un estadio previo a la formación del hilo de infección (Bauer, 1981).

Con respecto al desarrollo del nódulo pueden considerarse dos grandes grupos:

- las leguminosas de clima templado (arveja, alfalfa, trébol) presentan nódulos llamados de crecimiento indiferenciado, con un sistema vascular abierto y la existencia de un meristema apical de células en división
- las leguminosas de clima tropical (poroto, soja) producen nódulos de crecimiento determinado con sistema vascular cerrado y sin zona meristemática (Sprent y Faria, 1988; Sprent y Raven, 1992).

La planta puede por sí sola inducir la formación de estructuras radiculares semejantes a nódulos en total ausencia de bacterias (Truchet et al., 1989). Estas estructuras se denominan **pseudonódulos** o nódulos vacíos, son similares a los nódulos verdaderos pero no contienen bacterias en su interior. Esto indica que la planta posee toda la información necesaria para formar estas estructuras.



En el nódulo funcional se expresan genes de la planta y de la bacteria. Un ejemplo de esto es la proteína de transporte **leghemoglobina** cuya apoproteína (globina) es una nodulina suministrada por la planta en tanto que el grupo hemo es sintetizado por la bacteria. Además en el nódulo funcional se expresa el complejo enzimático de la **nitrogenasa** y proteínas llamada **nodulinas** y se lleva a cabo el proceso de reducción del nitrógeno atmosférico a amonio.

Dada la naturaleza de este trabajo de Tesis, no se describirá el funcionamiento del nódulo ni las enzimas intervinientes en los diferentes procesos involucrados. Para mayor información pueden consultarse las revisiones actualizadas de Werner (1992) sobre la fisiología del nódulo o de Franssen et al (1992) sobre las diferentes nodulinas y sus funciones.

## **1.8. Objetivos de esta Tesis:**

### **1.8.1. Objetivos generales:**

¿Por qué trabajar con el par simbiótico *R. phaseoli-P. vulgaris*?

El poroto (*P. vulgaris* L.) es una fuente importante de calorías y proteína dietaria en Latinoamérica. En América Central y la cuenca del Caribe, representa la principal fuente de proteína vegetal y junto con el arroz, constituyen la base de la dieta (Mangual Crespo et al., 1987).

Los rendimientos en Latinoamérica son bajos, entre 500 y 600 kg ha<sup>-1</sup> a pesar de que se han demostrado rendimientos potenciales de 2000-3000 kg ha<sup>-1</sup>. Una gran proporción de esta diferencia puede ser atribuida a numerosos factores bióticos y edafo-climáticos que limitan la producción de porotos en países en desarrollo (Roca et al., 1988). Se calcula que para satisfacer la demanda en el año 2000, la producción de poroto en Latinoamérica debería aumentar un 32% respecto de los niveles actuales (Janssen, 1988).

De acuerdo a la información provista por FAO en 1986 (revisado por Lépiz, 1988), Brasil y Méjico son los países de Latinoamérica que más poroto producen. En el período 84/86 sobre un total de 4,45 x 10<sup>6</sup> toneladas, Brasil produjo 2,5 x 10<sup>6</sup> (65,4% del total) y Méjico 0,99 x 10<sup>6</sup> (22,2%) y ésto

representa el 77,6% del total de la región. Después de Méjico y Brasil, los principales productores son Argentina, Guatemala, Colombia y Chile que, en conjunto, producen el 12,2% del total. En el período 84/86 Argentina produjo 237 miles de toneladas representando el 5,3% del total, con un rendimiento medio de 1030 kg ha<sup>-1</sup>. Argentina, Chile y Bolivia tienen los mayores rendimientos de la región (1030, 1104 y 1333 kg ha<sup>-1</sup> respectivamente, en el período 84/86) Si bien estos guarismos son altos con respecto, por ejemplo, a Guatemala, Colombia y Brasil que en el mismo período obtuvieron respectivamente 542, 769 y 511 kg ha<sup>-1</sup>, distan mucho de los rendimientos potenciales.

En Argentina la producción y exportación de poroto (aproximadamente 200.000 toneladas por año) es una importante fuente de recursos para la economía de su zona de cultivo que comprende las provincias de Salta, Tucumán, Jujuy y Santiago del Estero y representa una importante fuente de divisas para el país.

En la región latinoamericana los suelos son generalmente pobres en nitrógeno (Graham y Halliday, 1977) y los fertilizantes nitrogenados son demasiado costosos para los pequeños productores (Londoño et al., 1978) además de ser contaminantes, de allí la importancia de la fijación biológica de nitrógeno. Sin embargo la situación general en la región indica que no se obtiene respuesta a la inoculación de poroto (Graham, 1981) y por este motivo sólo un pequeño porcentaje de

las siembras son inoculadas por sus productores. Se ha observado una excelente asociación simbiótica en condiciones controladas en muchos países de Latinoamérica como Argentina (Boiardi et al, 1983), Brasil (Freire et al,, 1968), Colombia y Guatemala (Graham, 1981). Sin embargo muchos de estos resultados no han podido ser reproducidos a campo (Graham y Halliday, 1977).

Se han citado muchas causas probables que podrían explicar la ineficiente interacción simbiótica *R. phaseoli*-*P. vulgaris* y para todas ellas se han obtenido resultados que indican que en parte son causas reales de una pobre nodulación o inadecuada fijación de nitrógeno pero la complejidad del manejo de tantas variables hace que hasta el momento no haya soluciones generales a este problema (Schröder, 1992).

El logro de una mejor asociación simbiótica y fijación de nitrógeno en poroto, conduciría a una mayor productividad de grano y de proteína y a una aumentada fertilidad de los suelos en Argentina en particular y en Latinoamérica en general. El objetivo general de mi trabajo de Tesis fue el de obtener un mayor conocimiento del funcionamiento de la simbiosis y de las etapas tempranas que la gobiernan a fin de contribuir a la solución de este problema en el par simbiótico *R. phaseoli*-*P. vulgaris* que, dicho sea de paso, es el menos estudiado entre las leguminosas de importancia económica.

### 1.8.2. Objetivos particulares:

Estudios previos de Boiardi et al. (1983) habían indicado la falta de respuesta a la inoculación de *P. vulgaris* cv. Alubia con *R. phaseoli* en ensayos a campo. Para este trabajo de Tesis se eligió trabajar no sólo con el citado cultivar sino con un poroto negro, cultivar Bat 76, considerado de buena aptitud simbiótica (CIAT, 1979). Se llevaron a cabo, a campo y en laboratorio, estudios de supervivencia de una cepa de *R. phaseoli* introducida en suelo, la subsecuente colonización de raíz y la nodulación obtenida con los dos cultivares de poroto (capítulo 2).

Trabajos previos en el CINDEFI habían demostrado que el pegado de lectina a bacterias del género *Rhizobium* no era específico y que el patrón de unión dependía de la fase de crecimiento del microorganismo (Boiardi y Galar, 1988). Estos estudios se llevaron a cabo con lectina comercial.

Se pensó que si la lectina de poroto estaba de alguna manera involucrada en el reconocimiento entre simbiosis o en algún otro paso de las etapas tempranas de la asociación, entonces era probable que cultivares de *P. vulgaris* con una distinta aptitud simbiótica presentaran distintas lectinas. En base a esta especulación, y en el marco del objetivo general ya planteado, se decidió encarar el aislamiento y purificación de lectinas de poroto (capítulo 3).

Con las lectinas purificadas, y habiendo encontrado algunas diferencias entre las mismas, se estudió el rol de ellas en algunos aspectos de las etapas de preinfección e infección. Se intentó dilucidar si las diferencias en el comportamiento simbiótico de los dos cultivares podrían ser atribuidas, al menos parcialmente, a las distintas lectinas encontradas (capítulos 4, 5 y 6).

Teniendo en cuenta que las limitaciones en algunos nutrientes están relacionadas con rizobios que presentan una adsorción óptima a las superficies radiculares y , en algunos casos, una infectividad máxima (Kijne et al, 1988; Smit et al., 1986, 1987, 1989a, 1989b, 1991) y que los sistemas de cultivo continuos son herramientas ideales para este tipo de estudio; se decidió evaluar el crecimiento de microorganismos en "estados fisiológicos" definidos, en cultivos continuos bajo distintas limitaciones de sustrato. También se estudió la infectividad de los rizobios en cada caso (capítulo 7).

**PARTE 2**

## CAPITULO 2

**SUPERVIVENCIA EN SUELO DE UNA CEPA INTRODUCIDA DE *Rhizobium phaseoli* Y SUBSECUENTES COLONIZACION DE RAICES Y NODULACION DE *P. vulgaris* EN CONDICIONES DE LABORATORIO Y CAMPO**



## 2.1. INTRODUCCION

El poroto es la leguminosa de grano más importante del mundo en cuanto a su utilización para alimentación humana (Velázquez et al., 1988). En Latinoamérica se lo cultiva en suelos que son generalmente deficientes en nitrógeno (Graham, 1981). Si bien el poroto responde a la fertilización nitrogenada, los productores latinoamericanos no pueden, en general, afrontar el alto costo que implica el uso de estos fertilizantes (Graham y Rosas, 1979). La explotación de la capacidad de los cultivos de leguminosas de fijar simbioticamente nitrógeno atmosférico podría ser una alternativa de muy bajo costo para subsanar el problema. Sin embargo, esta posibilidad está limitada hasta el momento por la inadecuada asociación simbiótica que se obtiene cuando se inocula poroto a campo (Barradas y Hungria, 1989; Graham, 1981) y que ha llevado a considerar a *P. vulgaris* como un fijador pobre de nitrógeno en comparación con otras leguminosas cultivadas (Graham, 1981; Pereira y Bliss, 1987). La imposibilidad de obtener una simbiosis efectiva podría ser atribuida a un bajo grado de nodulación (Fontes, 1972; Franco y Day, 1980) o a una fijación de nitrógeno ineficiente (Hardy et al., 1968; Janssen y Vitosh, 1974).

La producción de porotos en el Noroeste de Argentina presenta los mismos problemas que en el resto de Latinoamérica. Una de las causas principales de la falta de respuesta a la inoculación ha sido identificada como una seria deficiencia en lograr una buena nodulación (Boiardi et al., 1983; Tau et al., 1984). Por lo tanto,

el estudio desarrollado en esta parte del trabajo de Tesis fue evaluar el comportamiento ecológico y simbiótico de una cepa de *Rhizobium phaseoli* marcada por resistencia a antibióticos bajo condiciones de laboratorio y campo (desde la siembra hasta la floración) con el objetivo de relacionar la actividad rizobiana en suelos y sobre la superficie de la raíz con la nodulación de la planta huésped. El uso de mutantes de *Rhizobium* resistentes a antibióticos en estudios ecológicos ha sido descrito por diferentes autores (Bushby, 1981; Danso et al., 1975; Schwinghamer y Dudman, 1973).

Los resultados son presentados teniendo en cuenta los siguientes aspectos:

- i) supervivencia en suelos
  - ii) colonización de raíces
  - iii) nodulación obtenida
- con la cepa inoculada.

## **2.2. MATERIALES Y METODOS**

### **2.2.1. Semillas:**

Se utilizaron semillas de *Phaseolus vulgaris* L. de dos cultivares diferentes: a) Bat 76, poroto negro seleccionado en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT, Cali, Colombia) y b) Alubia, poroto blanco ampliamente distribuido en el Noroeste

Argentino y obtenido a través del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA, Cerrillos, Salta).

### **2.2.2. Microorganismos:**

Se utilizó un mutante espontáneo de *R. phaseoli* cepa F45, designado como F45MS (resistente a 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de estreptomicina y 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de espectinomicina). La cepa F45 salvaje es procedente del Departamento de Microbiología del INTA, Castelar y fue aislada en el Noroeste Argentino a partir de *P. vulgaris* inoculado con inoculante comercial. Los mutantes fueron obtenidos según Schwinghamer y Dudman (1973). Las eficiencias simbióticas del mutante y de la cepa salvaje fueron comparadas inoculando porotos en jarras de Leonard conteniendo arena estéril (Vincent, 1970). La nodulación y el contenido total de nitrógeno de la parte aérea de las plantas fueron iguales en ambos casos.

### **2.2.3. Condiciones de cultivo:**

Para la obtención de inóculos se partió de un cultivo de microorganismos en un medio de mantenimiento (MM) en agar inclinado, conservado en heladera a 4 °C. Con tres ansadas de este cultivo se sembraron erlenmeyers de 250 mL conteniendo 50 mL de un medio al que llamamos **preinóculo** (PI). Estos erlenmeyers se colocaron en agitador rotatorio a 30 °C y 200 rpm y al cabo de 72 horas el cultivo se utilizó para sembrar ( al 5% ) erlenmeyers de

500 mL conteniendo 100 mL de un medio al que llamamos **proceso** (MP) y que fueron sometidos a las mismas condiciones de cultivo. El MM también fue usado para hacer recuento de células viables.

#### **2.2.4. Medios de mantenimiento y cultivo de cepas:**

Medio de mantenimiento (MM): (en g L<sup>-1</sup>): Sacarosa, 5,0; extracto de levadura, 1,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,2; NaCl, 0,1; agar, 14,0; (en mL L<sup>-1</sup>): Cl<sub>3</sub>Fe.6H<sub>2</sub>O (sol. 10%), 0,1; MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O (sol. 10%), 0,1; (en mg L<sup>-1</sup>): sulfato de estreptomicina, 500; espectinomicina, 100; cicloheximida, 20 y nistatina, 10. Cicloheximida y nistatina fueron agregados para evitar la contaminación con hongos en los recuentos de microorganismos a partir de muestras de suelo.

Medio preinóculo (PI): (en g L<sup>-1</sup>): Sacarosa, 5,0; extracto de levadura, 1,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,75; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,6; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,2; NaCl, 0,1; (en mL L<sup>-1</sup>): Cl<sub>3</sub>Fe.6H<sub>2</sub>O (sol.10%), 0,1; MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O (sol.10%), 0,1; (en mg L<sup>-1</sup>): biotina, 0,2; sulfato de estreptomicina, 500 y espectinomicina, 100.

Medio proceso (MP): (en g L<sup>-1</sup>): Sacarosa, 10,0; extracto de levadura, 2,0; peptona (hidrolizado pepsínico de estómago de cerdo), 2,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,75; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,6; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,2; NaCl, 0,1; (en mg L<sup>-1</sup>): Cl<sub>3</sub>Fe.6H<sub>2</sub>O (sol.10%) 0,1; MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O (sol.10%), 0,1; (en mg L<sup>-1</sup>): sulfato de estreptomicina, 500 y espectinomicina, 100.

Al MM, que también se utilizó para el recuento de microorganismos viables (ver 2.2.5.1.), se le agregó 0,025% de Rojo Congo. Las soluciones de antibióticos se esterilizaron separadamente por filtración y se agregaron a los medios de cultivo previo a la preparación de las placas o a la inoculación de los cultivos líquidos.

#### **2.2.5. Medidas de la concentración celular:**

##### **2.2.5.1. Recuento de microorganismos viables:**

Se efectuó por el método de dilución en solución fisiológica (NaCl 0,85%) y siembra en cajas de Petri conteniendo medio MM. Las cajas fueron incubadas invertidas en cuarto estufa a 30 °C. Se realizaron dos repeticiones por cada dilución a evaluar. Luego de un período de incubación de aproximadamente tres días, se contaron las unidades formadoras de colonias (ufc).

##### **2.2.5.2. Determinación del número de microorganismos totales**

Se efectuó sobre diluciones apropiadas de la suspensión celular en agua destilada utilizando una cámara de recuento de Petroff-Hausser.

#### **2.2.6. Esterilización de las semillas**

Fueron esterilizadas en superficie mediante inmersión durante un minuto en etanol 96% y luego en HgCl<sub>2</sub> 0,5% acidificado con ClH durante seis minutos seguido de seis lavados con agua destilada estéril.

#### **2.2.7. Experimentos de laboratorio:**

##### **2.2.7.1. Suelo:**

Los experimentos de laboratorio se llevaron a cabo con suelo proveniente de Cerrillos, Salta, una de las áreas de cultivo de poroto más importantes del país. El suelo es de textura franco arcillosa, pH 6,5; contenido de materia orgánica, 1,5%; capacidad hídrica, 27%; fosfato asimilable (Bray I), 10 mg L<sup>-1</sup> y contenido total de nitrógeno, 0,12%.

##### **2.2.7.2. Inoculación del suelo:**

Los cultivos en medio líquido de la cepa F45MS fueron crecidos según lo indicado en 2.2.3., centrifugados y lavados en solución de Jensen (Vincent, 1970). Este último tratamiento se realizó para evitar el agregado de nutrientes del medio de cultivo (no incorporados por las bacterias) y que pudieran ser utilizados por las plantas. La suspensión bacteriana resultante fue empleada para

la inoculación del suelo. Alrededor de la mitad del suelo utilizado fue esterilizado en autoclave durante una hora a 121 °C. Antes del tratamiento con vapor, se hizo vacío dentro del autoclave de forma tal de lograr una adecuada penetración del mismo en el material.

Las porciones de suelo estéril y no estéril utilizadas en los experimentos en macetas fueron rociadas separadamente con la suspensión de rizobios de modo tal de obtener el recuento deseado:  $10^5 - 10^6$  ufc  $g^{-1}$  de suelo (base seca). El suelo fue mezclado manualmente de modo tal de obtener una distribución homogénea de células y el contenido de humedad se llevó a capacidad de campo con agua esterilizada antes de sembrar.

#### **2.2.7.3. Experimentos en maceta:**

Jarras tipo Leonard (Vincent, 1970) conteniendo alrededor de 1,5 kg de suelo inoculado (base húmeda) fueron plantadas con cuatro semillas del correspondiente cultivar de *Phaseolus vulgaris*. Se dejaron algunas macetas sin sembrar con el fin de evaluar la supervivencia de los rizobios en el suelo. Luego de la emergencia, se conservaron dos plantas por jarra cortándose las restantes. Cuando fue necesario, se agregó agua estéril para llevar el contenido de humedad del suelo a la capacidad de campo.

Se empleó un diseño enteramente al azar en el cual seis macetas por tratamiento fueron tomadas en cada uno de los ocho días de muestreo. Los tratamientos fueron:

- i) *P. vulgaris* cv Alubia, suelo estéril
- ii) *P. vulgaris* cv Alubia, suelo no estéril
- iii) *P. vulgaris* cv Bat 76, suelo estéril
- iv) *P. vulgaris* cv Bat 76, suelo no estéril

Los tratamientos ii y iv se llevaron a cabo para contar la población de rizobios en suelo.

Las jarras fueron colocadas en cámara de clima controlado bajo las siguientes condiciones: fotoperíodo, 16 horas; temperatura diurna, 28 °C; temperatura nocturna, 18°C (similares a las promedio en Cerrillos, Salta, donde se lleva a cabo la producción de porotos) y humedad relativa 45-55%.

La parte del diseño experimental relacionada con la supervivencia de rizobios en suelo estéril y no estéril fue repetida a tiempos independientes.

#### **2.2.7.4. Aislamientos a partir de suelo y raíces:**

Muestras de suelo de 10 g fueron recolectadas al azar de los 5 cm superficiales de macetas sin sembrar. Estas muestras fueron colocadas en erlenmeyers conteniendo 95 mL de agua destilada suplementada con 1% de Tween 80 que se ubicaron en un agitador rotatorio durante una hora a 200 rpm.

A partir de estas suspensiones de suelo se prepararon diluciones seriadas en PBS ( $KPO_4H_2$ , 3,16 mM;  $NaPO_4H$ , 10,4 mM; NaCl, 123 mM) con 1% de Tween 80. Cada suspensión se agitó durante 10 minutos y se plaquearon las diluciones apropiadas.



Se recuperó el sistema radical entero de cada una de las dos plantas por maceta (para cada cultivar) y se estimó la colonización bacteriana de la raíz y la nodulación. Las partículas de suelo que no estaban bien adheridas fueron removidas por agitación y, luego de que los nódulos fueron cuidadosamente arrancados (para evitar recuentos elevados irreales), las raíces fueron sumergidas en agua y suavemente agitadas. Se cambió el agua varias veces hasta que se observó que quedaba limpia. Las raíces lavadas, conteniendo microflora firmemente adherida, fueron sumergidas en 100 mL de PBS con 1% de Tween 80 y posteriormente procesadas como se describe para el recuento de rizobios en suelos.

#### **2.2.8. Experimentos a campo:**

Los ensayos a campo fueron llevados a cabo durante dos años consecutivos (1987-1988) con el mismo diseño experimental.

El experimento se realizó en parcelas en la localidad de Cerrillos, Salta. Se utilizaron parcelas de 3 m de largo y 2,1 de ancho, con tres surcos separados entre sí 70 cm. Las semillas de los dos cultivares fueron plantadas a razón de 50 plantas por m lineal. Se incluyeron cuatro tratamientos en parcelas por cuadruplicado ordenadas en un diseño completamente al azar.

Los tratamientos fueron:

- i) *P. vulgaris* cv Alubia inoculado
- ii) *P. Vulgaris* cv Alubia sin inocular
- iii) *P. vulgaris* cv Bat 76 inoculado
- iv) *P. vulgaris* cv Bat 76 sin inocular

#### **2.2.8.1. Inoculación del suelo:**

La inoculación del suelo se efectuó con un inoculante a base de turba preparado a partir de un cultivo líquido de la cepa F45MS (Boiardi, 1984). La turba fue previamente esterilizada en autoclave como se describe para suelos en 2.2.7.2. El recuento de células en el inoculante era de  $1-2 \times 10^9$  ufc por g de turba después de un mes de almacenamiento en heladera a 4 °C.

Dos días antes de la siembra, se cavaron 15 cm de profundidad de suelo y se mezclaron *in situ* con 50 L de agua por parcela donde se habían suspendido cantidades apropiadas del inoculante. La dosis del inoculante fue calculada sobre la base del peso total de suelo de los 15 cm superficiales de las parcelas y el recuento de viables del inoculante, de modo de obtener una población inicial de aproximadamente  $1 \times 10^5$  ufc por g de suelo seco. Suelo sin inocular fue tratado de la misma manera y regado con iguales volúmenes de agua que el suelo inoculado.

#### **2.2.8.2. Aislamiento a partir de suelo y raíces:**

Periodicamente, tres sub-muestras tomadas al azar, de aproximadamente 30 g de suelo fueron recolectadas a una profundidad

de 15 cm alrededor del surco central de cada parcela inoculada. Con cada sub-muestra se efectuaron recuentos de ufc en suelo como se describió en 2.2.7.4.

Seis plantas, seleccionadas al azar, de cada parcela (tres del surco central y tres de la bordura) fueron tomadas para determinar nodulación. Las muestras fueron tomadas de las parcelas inoculadas y de las sin inocular. Las plantas de los surcos centrales inoculados fueron las utilizadas para contar rizobios viables en las raíces.

## **2.3. RESULTADOS**

### **2.3.1. Experimentos de laboratorio:**

La supervivencia de *R. phaseoli* F45MS luego de la introducción en suelos bajo condiciones de laboratorio, se muestra en la figura 2.1.

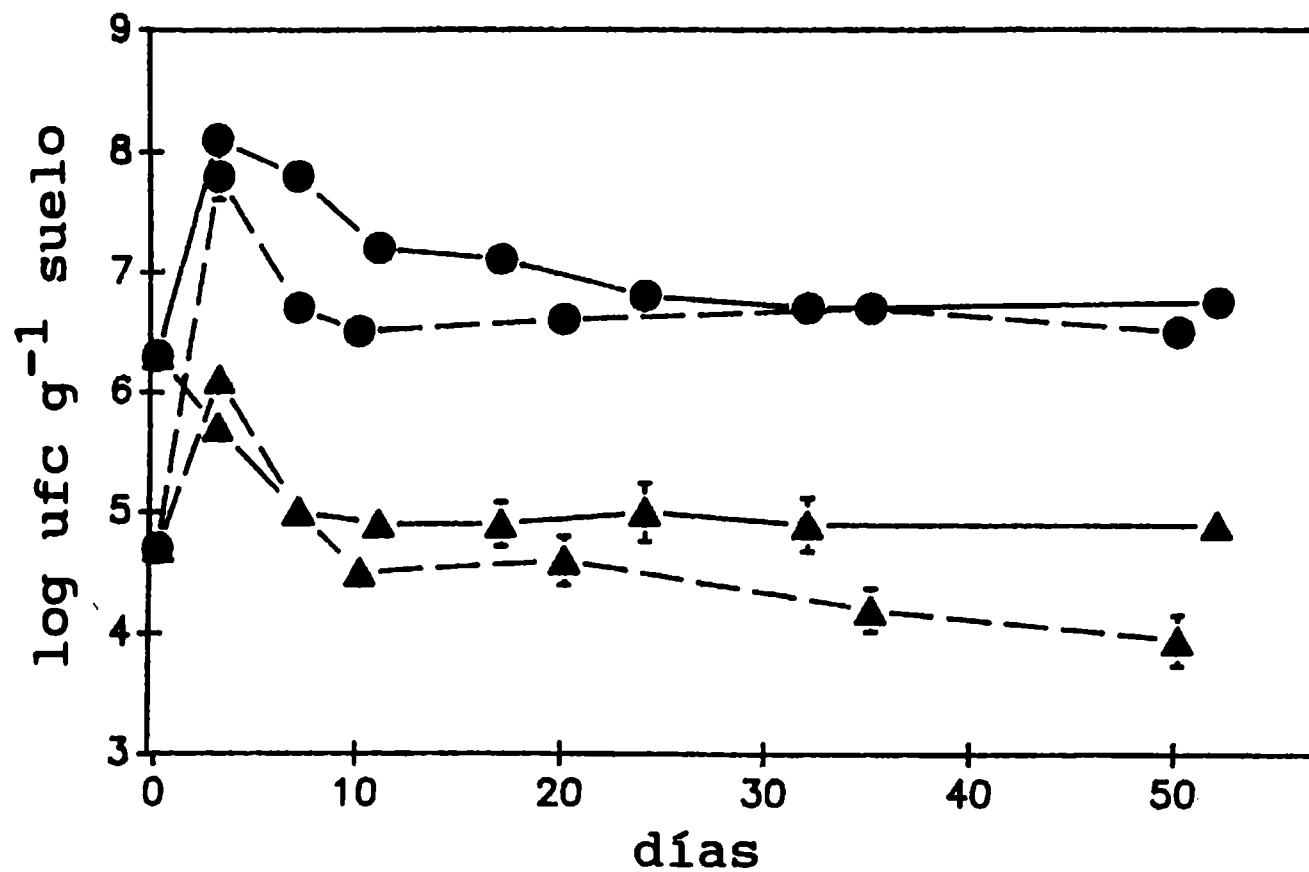


Figura 2.1: Supervivencia de *Rhizobium phaseoli* cepa F45MS introducida en suelo en condiciones de laboratorio.

Muestras de 10 g de suelo (inoculado según se indica en 2.2.7.2.) se recolectaron de los 5 cm superficiales de macetas sin sembrar, se colocaron en erlenmeyers con 95 mL de agua destilada suplementada con 1% de Tween 80 y se agitaron a 200 rpm durante 60 min. A partir de estas suspensiones se prepararon diluciones seriadas en PBS con 1% de Tween 80, se agitaron durante 10 min y se plaquearon en el medio apropiado (ver sección 2.2.4.). Cada punto es la media de 6 replicaciones. La desviación standard se encuentra dentro de los límites de cada símbolo excepto cuando se indica. Símbolos: [ ] desviación standard; ● suelo estéril; ▲ suelo no estéril; —experimento N° 1; ---experimento N° 2.

En dos experimentos independientes, en los cuales el contenido de humedad se llevó a capacidad de campo, se observó una mayor supervivencia en las macetas sin sembrar conteniendo suelo estéril que en las que contenían suelo no estéril. En las primeras, durante los primeros cinco días, el recuento de bacterias viables para la población introducida alcanzó un máximo (alrededor de  $10^8$  ufc  $g^{-1}$  de suelo) independiente de la población inicial. Luego, el número de bacterias disminuyó hasta alcanzar un equilibrio ( $10^6 - 10^7$  ufc  $g^{-1}$  de suelo). Por otra parte, los recuentos de células viables en suelo no estéril decrecieron durante el experimento en alrededor de 1 a 2 órdenes de magnitud con respecto al recuento inicial llegando también a una población de equilibrio de  $10^4-10^5$  ufc  $g^{-1}$  de suelo.

Se observó que, a mayor supervivencia de la cepa F45MS en suelo estéril, se obtenía mayor proliferación de rizobios en la raíz y una concomitante mejor colonización de raíces para los dos cultivares de *P. vulgaris*. La figura 2.2. muestra que la colonización de las raíces, antes del día 30, no sólo fue más abundante en suelo estéril sino que también se alcanzó antes el valor máximo.

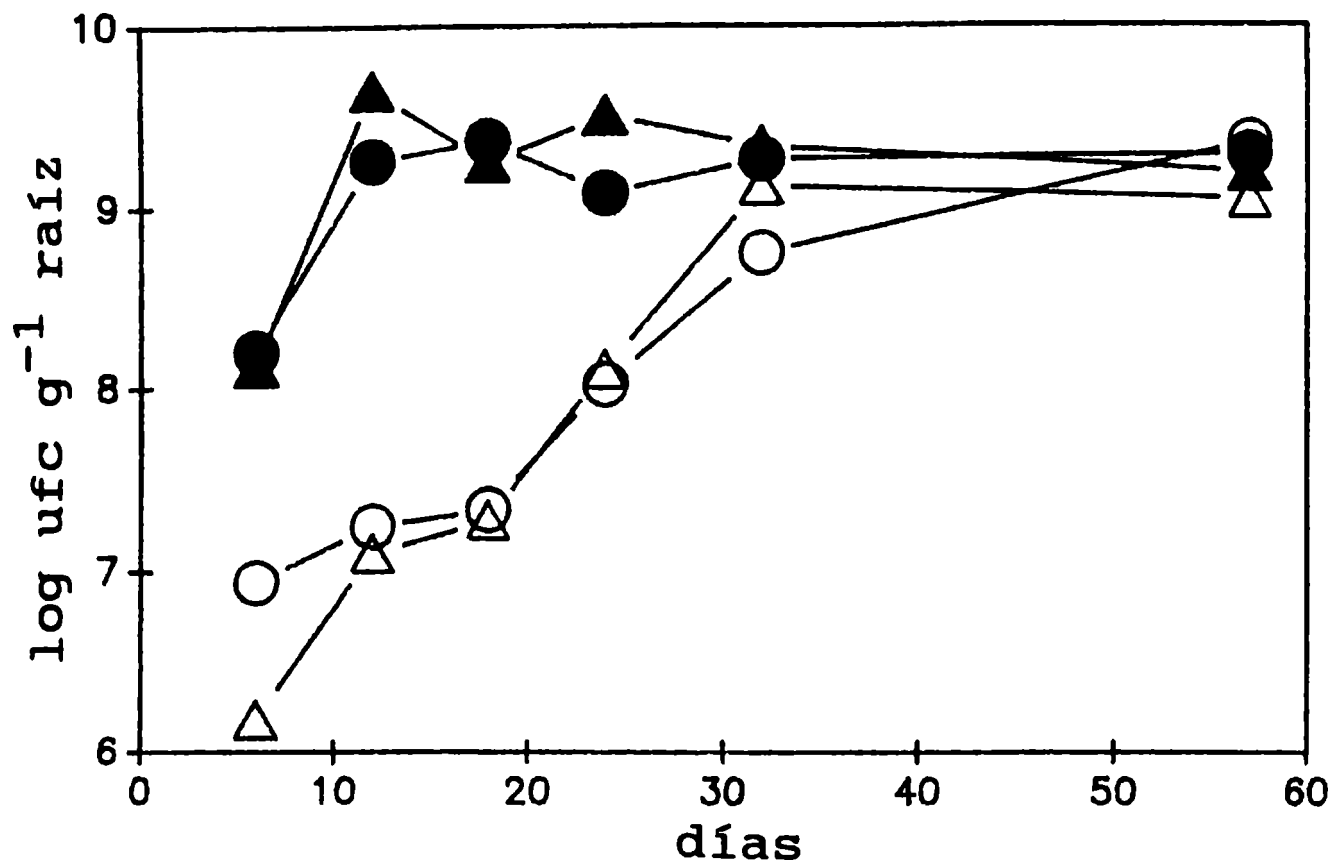


Figura 2.2: Colonización de raíces de poroto (*P. vulgaris*) por la cepa F45MS de *R. phaseoli* en condiciones de laboratorio.

Se recuperó el sistema radical entero de cada una de las 2 plantas por maceta de *P. vulgaris* (véase 2.2.7.3.) para cada cultivar. Las partículas sueltas de suelo fueron removidas por agitación, se arrancaron cuidadosamente los nódulos y las raíces fueron sumergidas en agua y suavemente agitadas. El agua se cambió varias veces hasta que se observó limpia. Las raíces lavadas fueron sumergidas en 100 mL de PBS con 1% de Tween 80 y procesadas según se describe para suelos en la figura 2.1. Cada punto es la media de 12 replicaciones. Las desviaciones standard están dentro de las dimensiones de los símbolos. Símbolos: ▲ *P. vulgaris* cv. Alubia en suelo estéril; △ *P. vulgaris* cv. Alubia en suelo no estéril; ● *P. vulgaris* cv. Bat 76 en suelo estéril; ○ *P. vulgaris* cv. Bat 76 en suelo no estéril.

Durante los 20 primeros días del experimento, los recuentos de rizobios en las raíces de plantas crecidas en suelo estéril fueron mayores en dos órdenes de magnitud que los recuentos de los tratamientos no estériles. En estos últimos, los recuentos de rizobios en las raíces indicaron el mismo grado de colonización en el día 30 pero esta proliferación tardía no resultó en un posterior incremento de la nodulación.

La mayor colonización de raíces en suelo estéril se correspondió con la más rápida y más abundante nodulación alcanzada. Es evidente, observando los resultados (figura 2.3.) que las plantas que crecieron en suelo estéril nodularon antes y en forma más abundante que aquellas provenientes de suelo no estéril, independientemente del cultivar de *P. vulgaris* usado. En suelo no estéril, la ocupación de los nódulos por la cepa introducida, determinada serologicamente por aglutinación según Vincent (1970), fue siempre mayor del 80% (resultados no mostrados).

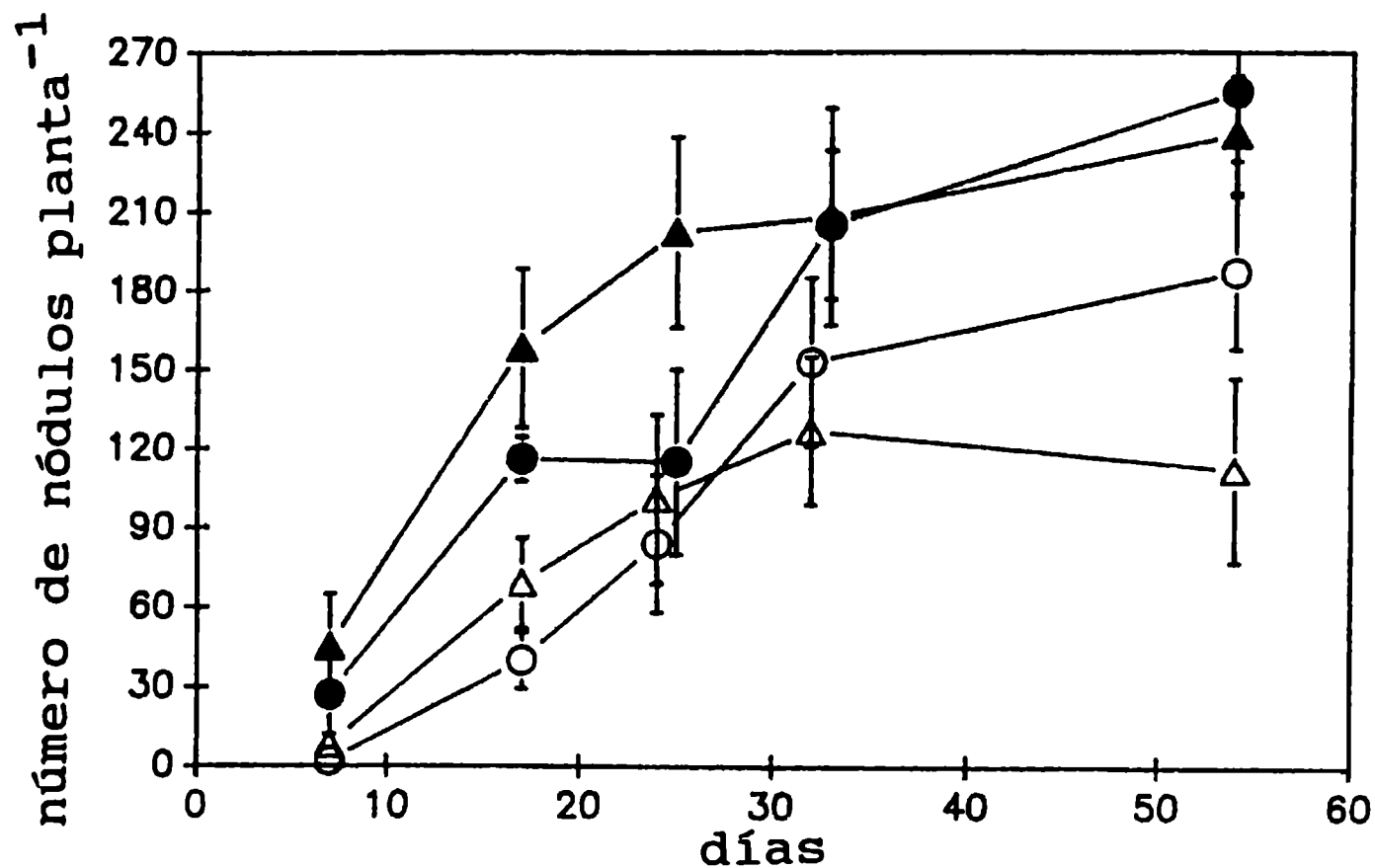


Figura 2.3: Nodulación de *P. vulgaris* por la introducción en suelo de *R. phaseoli* F45MS en condiciones de laboratorio.

Se recuperó el sistema radical entero de cada una de las 2 plantas por maceta de *P. vulgaris* (véase 2.2.7.3.) para cada cultivar. Luego de remover por agitación las partículas sueltas de suelo, se determinó el número de nódulos por planta para cada día de muestreo. Cada punto es el promedio de 6 plantas y los datos representan nodulación total. En suelo no estéril, la ocupación mínima de los nódulos por la cepa introducida se determinó serologicamente por aglutinación y fue mayor del 80% (no se muestra). Símbolos: [ desviación standard; ▲ *P. vulgaris* cv. Alubia en suelo estéril; △ *P. vulgaris* cv. Alubia en suelo no estéril; ● *P. vulgaris* cv. Bat 76 en suelo estéril; ○ *P. vulgaris* cv. Bat 76 en suelo no estéril.



### 2.3.2. Experimentos a campo:

En los estudios a campo, el grado de supervivencia de la población introducida fue aún más bajo que el obtenido en el laboratorio con suelo no estéril en los dos años en que el experimento fue realizado (figura 2.4.).

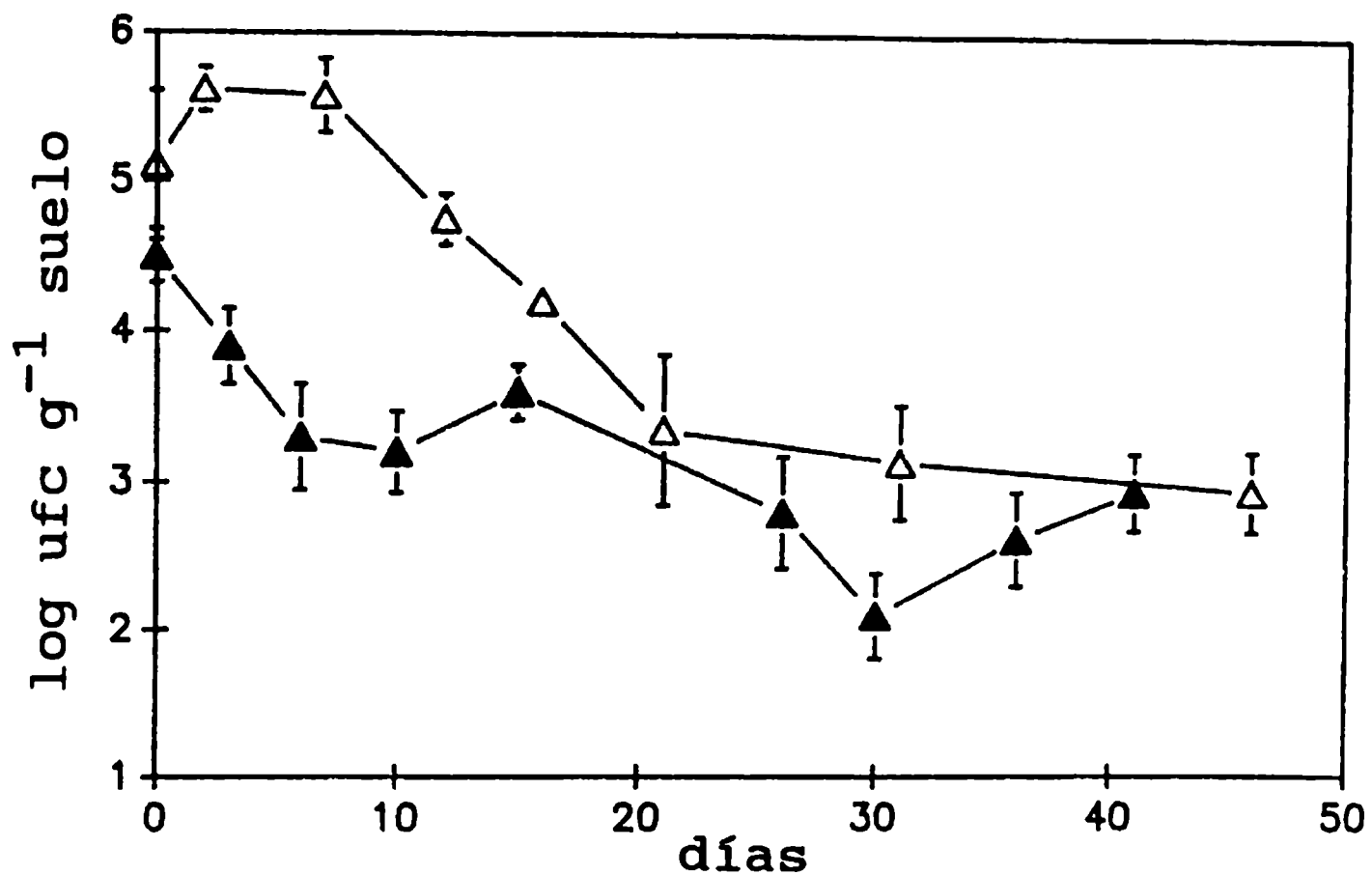


Figura 2.4: Supervivencia a campo de *R. phaseoli* cepa F45MS introducida en suelo.

Periodicamente, 3 muestras de 30 g de suelo fueron recolectadas a una profundidad de 15 cm alrededor del surco central de cada parcela inoculada (véase sección 2.2.8.1.). Con cada muestra se llevaron a cabo recuentos de células viables tal como se indica al pie de la figura 2.1. Cada punto es la media de 12 replicaciones. Símbolos:  $\perp$  desviación standard;  $\triangle$  ensayo de 1987;  $\blacktriangle$  ensayo de 1988.

La población final de equilibrio obtenida en ambos casos fue de alrededor de  $10^2$ - $10^3$  ufc  $g^{-1}$  de suelo, similar a la población nativa de *R. phaseoli* en el sitio donde se llevaron a cabo los experimentos ( J. Pacheco Basurco 1988, comunicación personal).

La dinámica de la población de la cepa introducida fue diferente entre los dos ensayos a campo en los primeros 10 días posteriores a la inoculación. En 1987, el recuento de viables en suelo permaneció constante en alrededor de  $10^5$  ufc  $g^{-1}$  durante todo ese período en lugar de la constante declinación observada en 1988 (de  $5 \times 10^4$  a  $1 \times 10^3$  ufc  $g^{-1}$  de suelo en el día 10). Las diferencias ambientales podrían ser responsables de los distintos comportamientos observados en los dos ensayos a campo. Los patrones de temperatura observados ambos años fueron similares durante todo el experimento a campo y sobre todo durante los 10 primeros días. La precipitación total durante ambos experimentos (hasta el 50% de floración) también fue similar: 127,3 mm en 1987 y 166,4 en 1988). Sin embargo, el patrón de precipitaciones fue diferente durante los dos años pudiendo haber sido ésta la causa de la diferente supervivencia de rizobios en los suelos durante los primeros días del ensayo.

Una mayor supervivencia en suelo de la cepa F45MS durante los primeros días en 1987 se correspondió con una excelente colonización de las raíces (figura 2.5.). Se observó una rápida y extensiva colonización de la superficie de las raíces con recuentos de viables similares a los obtenidos bajo condiciones de

laboratorio mientras que en 1988 la colonización radical fue menor durante todo el período.

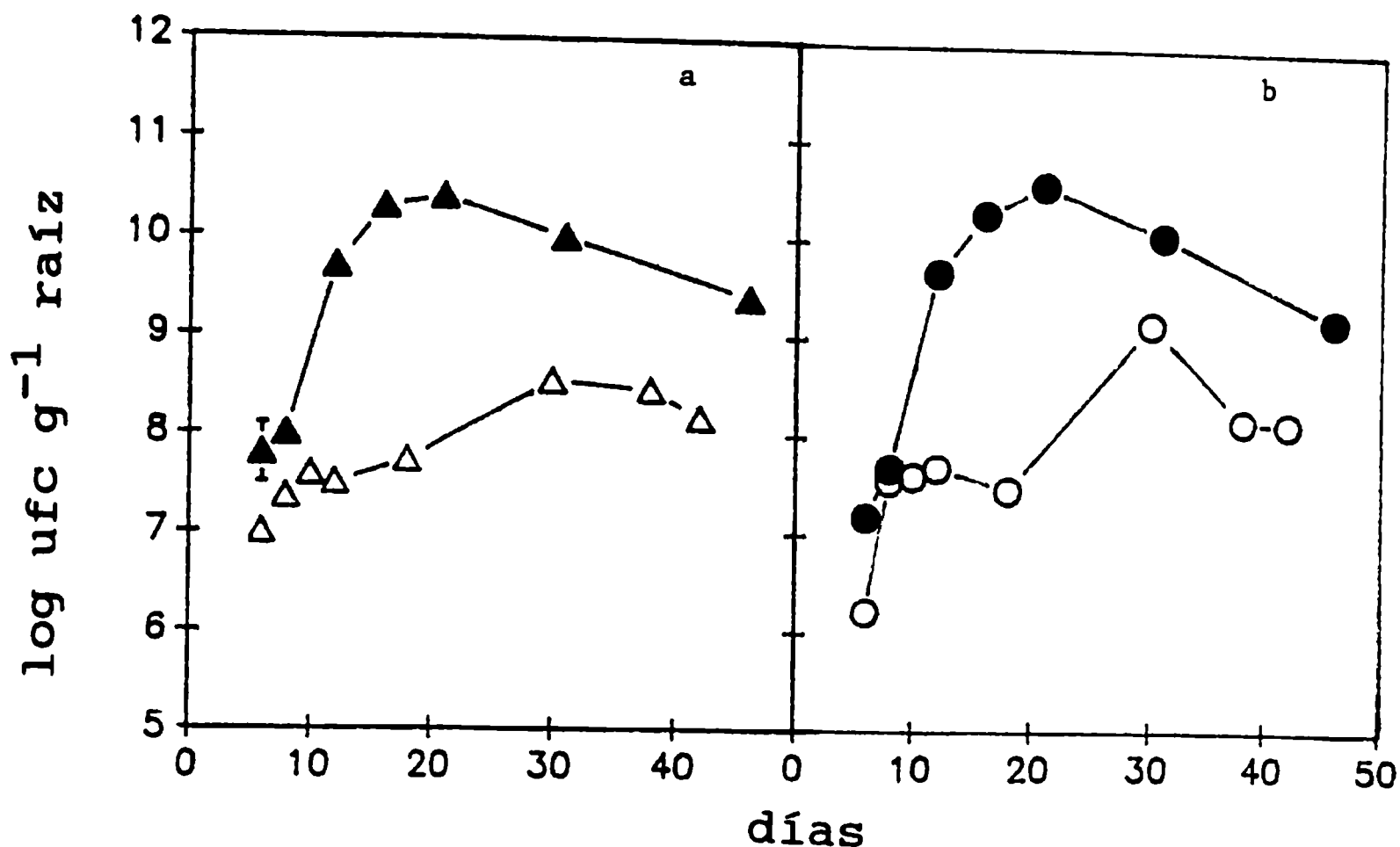


Figura 2.5: Colonización de raíces de *P. vulgaris* por *R. phaseoli* F45MS, a campo.

Periodicamente se tomaron 3 plantas (para cada cultivar usado) del surco central de parcelas inoculadas (véase sección 2.2.8.1.) y se determinó la colonización de las raíces según se indica al pie de la figura 2.2. Cada punto es la media de 6 replicaciones. La desviación standard se encuentra dentro de las dimensiones del símbolo. Símbolos: ▲, ● ensayo a campo en 1987; △, ○ ensayo a campo en 1988; a) cv. Alubia, b) cv. Bat 76.

En 1987, se logró una adecuada nodulación de las plantas con una diferencia significativa con respecto a los controles no inoculados (figura 2.6.).

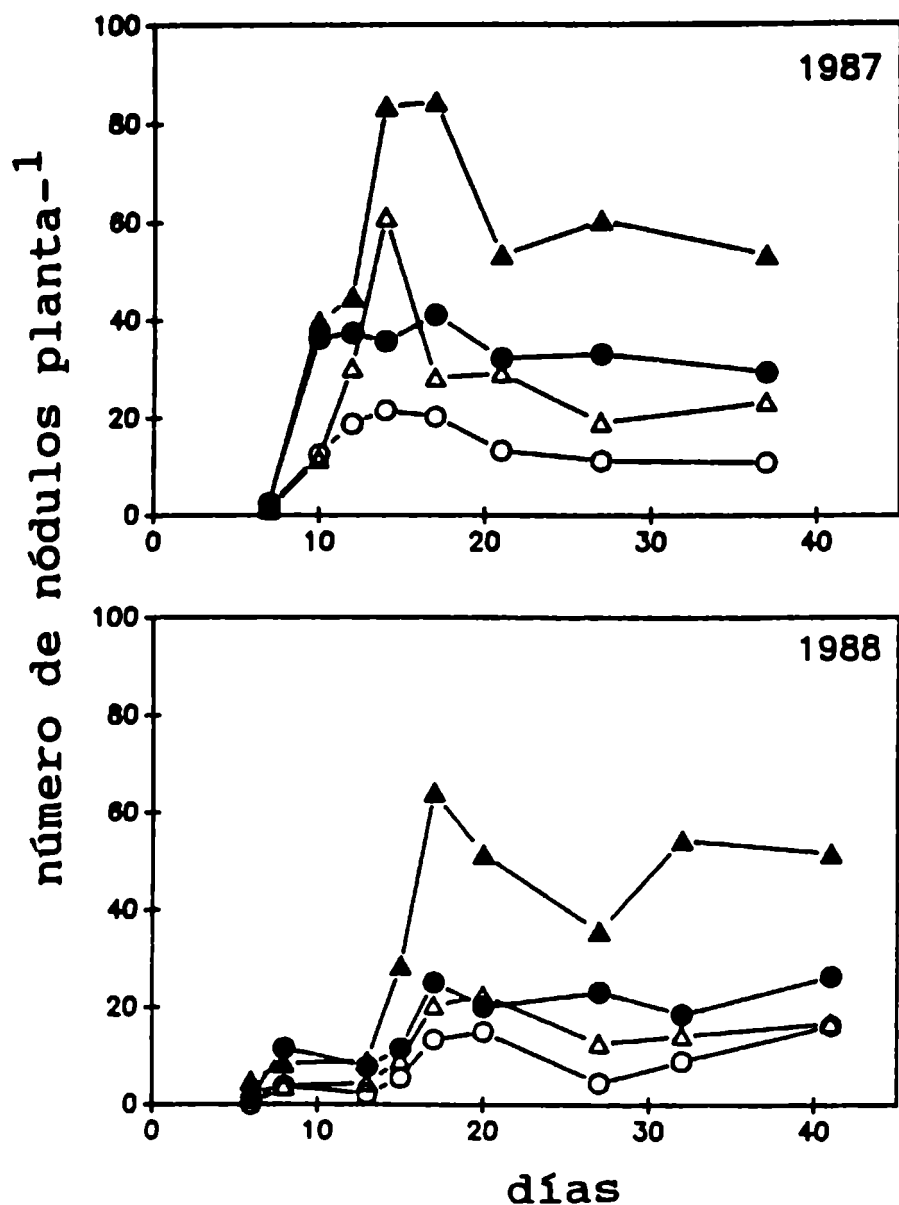


Figura 2.6: Nodulación de *P. vulgaris* a campo.

6 plantas de cada parcela, 3 del surco central y 3 de la bordura, fueron tomadas para determinar nodulación. Las muestras fueron tomadas de las parcelas inoculadas (sección 2.2.8.1.) y de las sin inocular. Luego de remover por agitación las partículas sueltas de suelo, se determinó el número de nódulos por planta para cada día de muestreo. Cada punto es la media de 6 plantas por parcela. La ocupación de los nódulos por la cepa introducida, determinada serológicamente por aglutinación, fue siempre mayor del 60% (no se muestra). Las variables medidas fueron estadísticamente analizadas con un ANOVA. Para cada día de muestreo, las medias de los tratamientos fueron comparadas con un test de Tuckey (5%) dando diferencias significativas entre los tratamientos inoculados y no inoculados y entre los cultivares Alubia y Bat 76. Símbolos: ▲ *P. vulgaris* cv. Alubia inoculado; △ *P. vulgaris* cv. Alubia sin inocular; ● *P. vulgaris* cv. Bat 76 inoculado; ○ *P. vulgaris* cv. Bat 76 sin inocular.

En 1988 también se obtuvo un incremento en la nodulación en los tratamientos inoculados con respecto a los no inoculados pero con un marcado retraso en alcanzar la nodulación final que, de cualquier forma, no fue tan abundante como la obtenida en 1987. Ambos años, la ocupación de los nódulos por la cepa introducida estuvo por encima del 60% para las parcelas inoculadas (resultados no mostrados). La mayor nodulación obtenida en 1987, en comparación con 1988, fue observada tanto en los tratamientos inoculados como en los controles sin inocular (figura 2.6.). Los resultados de colonización de raíces no mostraron diferencias significativas entre los dos cultivares de *P. vulgaris*, ya sea en condiciones de laboratorio o a campo. Se obtuvieron diferencias significativas entre los dos cultivares en la nodulación a campo.

#### 2.4. DISCUSION

De los dos cultivares de *P. vulgaris* usados, uno de ellos (Bat 76) se considera que posee una adecuada aptitud simbiótica (CIAT 1979) en tanto que el otro (Alubia) ha mostrado notables problemas de nodulación en condiciones de campo (Boiardi et al., 1983; Tau et al., 1984). Los resultados aquí presentados no muestran diferencias significativas en la colonización de raíces, tanto a campo como en laboratorio, entre los dos cultivares de *P. vulgaris* usados. Inclusive, en las condiciones de campo donde se llevó a cabo el

ensayo, contrariamente a lo indicado, Alubia mostró una mayor nodulación.

Los resultados concernientes a la supervivencia de *Rhizobium* en suelos coinciden con los de Postma et al. (1990) quienes informan que en suelos esterilizados, la población introducida de rizobios alcanza un equilibrio que no está afectado por la densidad del inóculo. La población de equilibrio obtenida en este estudio también concuerda con los resultados de Chao y Alexander (1982) con respecto a la dependencia de la supervivencia de rizobios con el contenido de materia orgánica del suelo. Estos autores encuentran para *R. phaseoli* introducido en suelo estéril, con 1,5% de materia orgánica, una población de equilibrio de alrededor de  $10^6$ - $10^7$  ufc g<sup>-1</sup> de suelo, similar a los resultados obtenidos en este caso con la cepa F45MS. De acuerdo a los resultados aquí presentados, la población introducida alcanza un equilibrio no sólo para suelo estéril sino también para el no estéril. Las diferencias que se observan en la supervivencia de *Rhizobium phaseoli* y otras especies de rizobios, según se trate de suelos estériles o no estériles fue previamente citada por otros autores (Acea et al., 1988; Danso et al., 1975; Heynen et al., 1988; Postma et al., 1990) y ha sido atribuida a factores biológicos adversos en el suelo no estéril incluyendo principalmente predación, parasitismo y competencia por los nutrientes disponibles, entre otros (Dowling y Broughton, 1986). La predación por protozoarios ha sido sugerida como el principal factor causante de la disminución de la población de *R.*

*phaseoli* en suelos no estériles y naturales (Lennox y Alexander, 1981; Ramírez y Alexander, 1980).

Resultados previos mostraron una excelente asociación simbiótica entre *R. phaseoli* y *P. vulgaris* bajo condiciones controladas (Graham, 1981). Inclusive, para la cepa F45, hay resultados previos (Boiardi et al., 1983) que muestran una excelente nodulación de poroto en experimentos de laboratorio. En el presente estudio se observó un alto grado de nodulación de poroto tanto en suelo estéril como no estéril aunque fue notablemente mejor en el primer caso. Si bien el par *Rhizobium phaseoli-Phaseolus vulgaris* tiene la capacidad de alcanzar una nodulación abundante y una asociación simbiótica eficiente (como se deduce a partir de los mencionados experimentos de laboratorio), no se observa generalmente una respuesta a la inoculación bajo condiciones de campo. Pareciera que las condiciones ambientales son la causa del fracaso de la inoculación y del bajo grado de nodulación alcanzado (Boiardi et al., 1983; Graham y Halliday, 1977). Una mejora en la nodulación de los tratamientos inoculados con respecto a los no inoculados no había sido observada en estudios previos en la zona (Boiardi et al., 1983; Tau et al., 1984).

Tanto en experimentos a campo como en laboratorio, se obtuvo una población final de equilibrio para la cepa introducida aunque, a campo, el recuento de células viables fue menor que el obtenido aún con suelo no estéril en el laboratorio. Los probables factores que podrían incidir en la menor supervivencia a campo son las altas

temperaturas y la baja humedad del suelo. Teniendo en cuenta que las temperaturas máximas y mínimas registradas fueron similares en el laboratorio y en los ensayos a campo, la humedad del suelo fue uno de los factores ambientales diferenciales que podría ser, al menos parcialmente, responsable de la diferente población final alcanzada en ambas condiciones experimentales. Ha sido bien establecida la susceptibilidad de *Rhizobium* a la desecación. Marshall (1964) informa un descenso de entre 100 y 1000 veces en el número de *R. trifolii* cuando el suelo se seca a 30 °C. Chao y Alexander (1982) encuentran que sometiendo el suelo a nueve días de desecación, de una población inicial de *R. phaseoli* de  $1,4 \times 10^6$  ufc g<sup>-1</sup> de suelo, sólo sobrevive el 2% y luego de esos primeros días se produce un descenso menor. Estos autores encuentran que *R. phaseoli* sobrevive pobremente a la desecación tanto en suelo estéril como en no estéril.

Una población adecuada de rizobios en el suelo, principalmente durante los primeros estadios del desarrollo de la planta, conduce a una colonización extensiva de la raíz y ha sido identificada como un paso necesario para lograr una nodulación temprana y bien ubicada (Chatel y Parker, 1973; Bohlool y Schmidt, 1973; Rice et al., 1977). De acuerdo con este trabajo, pareciera que una vez alcanzada una colonización extensiva de la raíz, un posterior descenso en el recuento de rizobios en el suelo no produce un efecto perjudicial en la proliferación radical del microsimbionte y en la nodulación.



Los resultados muestran que, tanto a campo como en laboratorio, una colonización más extensiva de las raíces de poroto por la cepa F45MS conduce a una mejor nodulación. Esto coincide con lo informado por Purchase y Nutman (1957) quienes muestran que las infecciones tempranas conducentes a nodulación se incrementan con la población de rizobios en la rizosfera. Sin embargo, y tal como fue anteriormente informado (Boiardi y Galar, 1988; Boiardi et al., 1988), para iniciar el proceso de infección no sólo se requiere un número adecuado de rizobios en el suelo cuando las raíces son susceptibles de ser infectadas, sino también un adecuado estado fisiológico de esa población. Por lo tanto, de acuerdo a los resultados de este trabajo que muestran una relación directa entre la proliferación de rizobios en la raíz y la nodulación, se puede asumir que el ambiente rizosfera-rizoplano, rico en sustratos de alto contenido energético y nutricional liberados por las raíces (Bowen y Rovira, 1976), permite un crecimiento activo de los rizobios colonizantes que lleva a una población suficiente del microsimbionte y un estado fisiológico favorable de la misma para la infección. Inclusive, como fue sugerido por Ramírez y Alexander (1980), las condiciones que llevan a una proliferación activa de los rizobios en la superficie la raíz pueden compensar, al menos parcialmente, la pérdida de microsimbiontes debido a la predación por protozoarios.

A pesar de la similitud en la población final introducida de la cepa F45MS en los años 1987 y 1988, se observan diferencias notables en el patrón de declinación de la misma. La alta

colonización y la buena nodulación obtenidas en 1987 parecen ser debidas al más alto recuento durante los diez primeros días del experimento. La viabilidad de la cepa F45MS durante ese período podría ser debida a la humedad del suelo ya que, si bien la precipitación total fue semejante en ambos años, el patrón de precipitaciones fue diferente. Según algunos autores (Morote et al., 1990) la baja humedad es una condición más limitante para la nodulación de soja que la alta temperatura del suelo de allí el beneficio de recurrir a cobertura o **mulching** de los surcos para impedir la pérdida de humedad. Piha y Munns (1987) encuentran para *P. vulgaris* que al aumentar la temperatura de la raíz se produce un aumento en el número de nódulos aunque hay una disminución en el tamaño de los mismos y el crecimiento de la planta. El aumento en el número de nódulos tal vez sea una respuesta al bajo tenor de nitrógeno interno de la planta (Gibson, 1977). A pesar de ese aumento en el número de nódulos, no hay mejoría en la fijación de nitrógeno y no se observan diferencias entre años con altas temperaturas y otros con bajas, por lo cual estos autores consideran que la temperatura no es el factor limitante en la fijación de nitrógeno.

El mejoramiento en la nodulación en 1987 también fue observado en los controles no inoculados. Esto podría indicar que las condiciones que llevan a una nodulación exitosa son similares para la población introducida como así también para la nativa. A la vista de estos resultados, se podría concluir que: i) la baja nodulación de poroto en el Noroeste Argentino pareciera estar

determinada por la falta de ese paso necesario que es la proliferación en suelos en los primeros días y la posterior colonización abundante de las raíces y ii) la protección de la población introducida de rizobios de las condiciones biológicas y ambientales desventajosas, sobre todo en los estadios tempranos del desarrollo de la planta, podría ser una forma de resolver el bajo grado de nodulación generalmente obtenido en los cultivos de poroto de Latinoamérica.

**PARTE 3**

**CAPITULO 3**

**AI SLAMI EN TO, PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LECTINAS DE  
SEMILLA DE POROTO**

### 3.1. INTRODUCCION

Tal como fue indicado en el capítulo 1, uno de los objetivos de este trabajo de Tesis fue estudiar algunos aspectos del proceso de infección de porotos (*P. vulgaris*) por *R. phaseoli* a fin de intentar relacionar la falta de respuesta a la inoculación de los mismos con las primeras etapas de la asociación bacteria-planta.

La iniciación del proceso simbiótico entre el rizobio y la leguminosa debe requerir de la interacción entre moléculas complementarias de la planta y el microorganismo. Unas de las macromoléculas más estudiadas en relación a estas interacciones son las lectinas de las plantas. Estas moléculas son capaces de unirse a la superficie de los rizobios en una forma hapteno-específica (sección 1.7.2.4.).

La hipótesis de reconocimiento por lectina (Albersheim y Anderson Prouty, 1975) propone que esta molécula es mediadora de la adsorción de los rizobios a la superficie radicular. Si bien esta hipótesis no ha sido unánimemente aceptada se considera que es probable que la lectina desempeñe algún rol significativo en las interacciones simbióticas entre el rizobio y las raíces de la planta. Por lo tanto, se decidió estudiar su interacción con *R. phaseoli* para este caso en particular. Se emplearon dos cultivares de *P. vulgaris*: Bat 76 con una adecuada aptitud simbiótica (CIAT, 1979) y Alubia, con notables problemas de nodulación en experimentos a campo (Boiardi et al., 1983). El objetivo de esta

parte del trabajo de Tesis fue aislar y purificar lectinas para luego determinar algunas de sus propiedades químicas con el fin de analizar si la diferente aptitud simbiótica de los dos cultivares podía ser debida, al menos parcialmente, a distintas interacciones lectina-microorganismo.

Cabe destacar que las lectinas sólo se caracterizaron parcialmente; por un lado, en el CINDEFI no se contaba con experiencia en aislamiento y purificación de proteínas ni con el equipamiento adecuado como para llevar a cabo una caracterización más completa de estas moléculas. Por otra parte, el objetivo del trabajo no era la caracterización en sí sino el utilizar estas proteínas para realizar estudios sobre la interacción microorganismo-lectina y lectina-raíz. Hay interesantes interrogantes que quedaron sin responder pero que escapan a los objetivos de este trabajo.

### **3.2 MATERIALES Y METODOS**

#### **3.2.1. Semillas:**

Ver sección 2.2.1.

#### **3.2.2. Purificación de aglutinina de poroto:**

La lectina de semilla de poroto fue aislada y parcialmente purificada de acuerdo a Takahashi et al. (1967) Las semillas (1 kg)

se molieron hasta obtener una harina fina que se suspendió en 10 L de agua destilada (en varias oportunidades, al repetir el proceso de purificación se trabajó con menores cantidades: 100 g de harina de semilla de poroto y 1 L de agua destilada). Luego de continua agitación durante 60 minutos en baño de hielo, se ajustó el pH del extracto a 4,6 con HCl 0,5 N y se lo dejó durante toda la noche en heladera a 4 °C. Luego de sifonar el sobrenadante, para separarlo del residuo de harina, se lo centrifugó a 8000 rpm durante 15 minutos a 4 °C hasta obtenerlo límpido. Este sobrenadante centrifugado constituye el **extracto crudo**. Se conservó una alícuota del extracto crudo para determinar concentración proteica (sección 3.2.3.) y hemaglutinación (3.2.4.). Al extracto crudo se le agregó  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  sólido hasta 50% de saturación. Precipitado y sobrenadante se separaron por centrifugación a 8000 rpm durante 15 minutos en centrífuga refrigerada. Al sobrenadante de la centrifugación se le agregó una cantidad adicional de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  sólido para llevarlo a 100% de saturación. Nuevamente, precipitado y sobrenadante se separaron por centrifugación en las condiciones antes citadas. Los precipitados obtenidos en las precipitaciones fraccionadas con 50% y 100% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  fueron dializados a 4 °C frente a agua destilada hasta no detectar más  $\text{NH}_4^+$  (negatividad frente al reactivo de Nessler). En todos estos pasos se conservaron alícuotas congeladas para posteriormente determinar concentración proteica y hemaglutinación. La mayor parte de la actividad hemaglutinante presente en el extracto crudo fue recuperada en la fracción precipitada entre 50 y 100% de saturación. Esta fracción fue



posteriormente purificada según Bessler y Goldstein (1973). Este método involucra dos etapas: una cromatografía de afinidad con Sepharosa 4B-Concanavalina A seguida de una cromatografía de permeación por geles con Sephadex G-200 superfino, ambas a temperatura ambiente. Para el primer paso se utilizó una columna de vidrio de 11,5 cm de largo x 2,5 de diámetro y, para el segundo, una de 110 cm de largo x 3,5 cm de diámetro. Ambas columnas contaban con una placa de vidrio fritado en la parte inferior.

Se introdujeron dos modificaciones en el procedimiento de Bessler y Goldstein: i) todos los pasos se llevaron a cabo a 4 °C; ii) una vez sembrada la muestra en la columna de afinidad e iniciada la corrida cromatográfica, se observó un marcado descenso en el flujo de buffer indicando taponamiento de la columna y excesiva compactación del gel. Esto llevó a introducir la segunda modificación que consistió en realizar la cromatografía con una técnica en batch (Feldsted et al., 1975): el gel de Sepharosa 4B-Concanavalina A fue agregado al extracto salino diluido, la suspensión fue mezclada suavemente por agitación durante 60 minutos y luego centrifugada a 6000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante fue removido y conservado para recuperar proteína en sucesivas etapas de absorción con gel regenerado. El precipitado fue suspendido en el mínimo volumen de PBS ( $\text{KPO}_4\text{H}_2$  3,16 mM,  $\text{Na}_2\text{PO}_4\text{H}$  10,4 mM, NaCl 123 mM) pH 6,8 conteniendo 0,1 mM de  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$  y  $\text{MnCl}_2$ . Con este precipitado suspendido en PBS se cargó la columna y se comenzó a eluir con el mismo buffer. Se colectaron fracciones de 10 mL a las cuales se les determinó absorbancia a 280 nm. Una vez

estabilizada la absorbancia, se comenzó la elución con metil- $\alpha$ -D-manopiranosido 20 g L<sup>-1</sup> en PBS y se colectaron fracciones que fueron analizadas espectrofotométricamente tal como se indicó. De acuerdo al tamaño de la muestra fue necesario efectuar de 4 a 6 batches de cromatografía de afinidad. Con muestras de 100  $\mu$ L de cada una de las fracciones se determinó hemaglutinación. Aquellas fracciones que presentaban actividad hemaglutinante fueron agrupadas en una sola que fue concentrada por ultrafiltración en una celda Amicon con membrana PM-10.

El retentato de la ultrafiltración se utilizó para sembrar la columna de permeación por geles a la que previamente se le había determinado el volumen muerto con un volumen de azul dextrano (2.5 mg mL<sup>-1</sup>) aproximadamente igual al 1% del volumen total de la columna. El buffer de elución usado fue PBS pH 6,8 y el flujo aproximado fue de 18 mL h<sup>-1</sup>. Nuevamente, el transcurso del proceso fue seguido por medidas de absorbancia a 280 nm y las fracciones activas se juntaron y concentraron por ultrafiltración como se indica más arriba. El retentato fue posteriormente liofilizado.

### **3.2.3. Medidas de concentración proteica:**

Se llevaron a cabo de acuerdo a Lowry et al. (1951) usando albúmina bovina (Sigma) como standard.

#### **3.2.4. Ensayos de hemaglutinación:**

Para determinar actividad se aprovechó la propiedad de las lectinas de aglutinar glóbulos rojos (sección 1.7.2.4.).

Eritrocitos humanos (grupos A, B, AB y O), obtenidos frescos de donantes o de bancos de sangre, fueron lavados tres veces en PBS pH 7,2 y usados en suspensión 3% en PBS para ensayos de rutina. La sangre obtenida de donantes fue extraída en el laboratorio y recogida sobre EDTA como anticoagulante; la sangre proveniente de banco estaba heparinizada.

La hemaglutinación fue determinada semicuantitativamente en placas para microtitulación con pocillos en forma de U (Nunc N 262170). La suspensión de eritrocitos (100  $\mu$ L) fue agregada a diluciones seriadas de la proteína en PBS (100  $\mu$ L). Luego de incubar durante 60 minutos a temperatura ambiente, la aglutinación se determinó macroscópicamente como la aparición de una "carpetita" continua de células en el fondo de los pocillos.

El título se definió como la recíproca de la mayor dilución a la cual ocurrió hemaglutinación en las condiciones del ensayo. La actividad específica se definió como el título por mg de proteína por mL.

#### **3.2.5. Efecto de azúcares sobre la hemaglutinación:**

Se preincubaron 50  $\mu$ L de lectinas en PBS con las diluciones seriadas de los distintos azúcares en PBS (50  $\mu$ L) en placas de

microtitulación. Luego de 60 minutos a temperatura ambiente, se llevó a cabo el ensayo de hemaglutinación tal como se indica en la sección 3.2.4. Se hicieron controles de hemaglutinación con los azúcares y con las lectinas por separado. Los azúcares probados fueron: N-acetil-D-galactosamina, N-acetil-D-glucosamina, D-galactosa, ramnosa, xilosa, ribosa, manosa, maltosa, arabinosa, trehalosa, sacarosa, lactosa, pentaeritritol, fructosa y eritritol.

### 3.2.6. Electroforesis:

La pureza de las lectinas fue determinada por electroforesis en geles de poliacrilamida bajo diferentes condiciones. Lectina de poroto comercial (Red kidney bean, Sigma) fue usada como control. Se llevaron a cabo electroforesis no desnaturizantes a pH 7,0 y electroforesis catódicas a pH 4,3 bajo condiciones no desnaturizantes en geles con 3,75% de acrilamida (Reisfeld, 1962).

La separación de polipéptidos desnaturizados con dodecil sulfato de sodio (SDS) se llevó a cabo en un sistema discontinuo según Laemmli (1970).

Gel de apilamiento: Acrilamida, 3 ó 4% (P/V);  
N,N'-metilen(bis)acrilamida, 0,11 ó 0,08% (P/V) respectivamente;  
Tris-HCl, 0,125 M (pH 6,8); SDS, 0,1% (P/V);  
N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED), 0,25% (V/V); persulfato de amonio, 0,025% (P/V).

Gel de separación: Acrilamida, 10, 12,5 ó 15% (P/V); N,N'-metilen(bis)acrilamida, 0,27, 0,33 ó 0,4% (P/V) respectivamente; Tris-HCl, 0,375 M (pH 8,8); SDS, 0,1% (P/V); TEMED, 0,1% (V/V); persulfato de amonio, 0,06% (P/V).

Buffer de electroforesis: Tris-HCl, 0,050 M (pH 8,3); glicina, 0,384 M; SDS, 0,1% (P/V).

Buffer de muestra: Tris-HCl, 0,010 M (pH 8,0); EDTA, 0,001 M; SDS, 4% (P/V);  $\beta$ -mercaptoetanol, 5% (V/V); glicerol, 10% (P/V); azul de bromofenol, aproximadamente 0,001% (P/V).

Algunos geles se corrieron sin agregado de  $\beta$ -mercaptoetanol. Generalmente se usaron placas de 18 x 20 cm x 1 mm de espesor y se sembraron cantidades variables entre 10 y 100  $\mu$ L. Las corridas se realizaron a temperatura ambiente, generalmente a 80 V para el gel de apilamiento y 150 V para el de resolución (aunque estas condiciones se variaron en distintos geles, tal como se indica en las leyendas de las figuras) hasta que el frente de azul de bromofenol llegara a 1 cm del borde del gel. En algunas ocasiones se usaron placas de 10 x 8 cm (Mini-PROTEAN II Dual Slab Cell BIORAD) y en esas oportunidades las corridas se efectuaron a voltaje constante de 200 V.

También se llevaron a cabo electroforesis SDS-PAGE con mapeo peptídico por proteólisis limitada de acuerdo a Cleveland et al. (1977). Este procedimiento se efectuó de dos maneras:

i) las proteínas liofilizadas se disolvieron en un buffer de muestra que contenía Tris-HCl, 0,125 M (pH 6,8); SDS, 0,5% (P/V); glicerol, 10% (P/V) y aproximadamente 0,001% (P/V) de azul de

bromofenol. Las muestras se calentaron a 100 °C durante 2 minutos. La proteólisis se realizó a 30 °C durante 30 minutos con proteasa V8 de *Staphylococcus aureus* (gentileza del Dr. Víctor Romanowski) y con tripsina (gentileza del Dr. Luis Gabriel Wall) y se detuvo por agregado de 10% (V/V) de  $\beta$ -mercaptoetanol y 2% (P/V) de SDS seguido de tratamiento a 100 °C durante 2 minutos. Los péptidos generados por proteólisis fueron analizados en geles con SDS y 15% de acrilamida.

ii) Proteólisis *in situ*: se realizó una electroforesis SDS-PAGE con 10 ó 12,5% de acrilamida. El gel, de 1,0 mm de espesor, se tiñó durante no más de 30 minutos con Coomassie Brilliant blue R-250, se destiñó brevemente en una solución acuosa con 40% (V/V) de metanol y 10% (V/V) de ácido acético. Las bandas de interés fueron recortadas con un escalpelo y sumergidas durante 30 minutos con ocasional agitación en una solución conteniendo Tris-HCl, 0,125 M (pH 6,8); SDS, 0,1% (P/V) y 1 mM de EDTA. Estas bandas recortadas fueron empujadas con ayuda de una espátula, al fondo de los pocillos de un segundo gel SDS-PAGE de 1,5 mm de espesor, con 15% de acrilamida. Los espacios alrededor de estas bandas se llenaron con 10  $\mu$ L del buffer citado más arriba pero conteniendo 20% de glicerol. Finalmente 10  $\mu$ L del mismo buffer pero con 10% de glicerol y una cantidad dada de proteasa se colocaron por encima de estas bandas. Se permitió que se llevara a cabo la proteólisis durante 30 minutos y al cabo de ese tiempo, se comenzó la corrida electroforética en las condiciones habituales.

Se llevaron a cabo electroforesis en dos dimensiones (2D) de acuerdo a Utsumi et al. (1984). Se recortaron con escalpelo las calles provenientes de una primera SDS-PAGE o de una electroforesis en condiciones no desnaturalizantes y se trataron tres veces durante 30 minutos con un buffer de equilibrio con 62,5 mM de Tris-HCl (pH 6,8), 1% (P/V) de SDS y 10% de sacarosa. Cada una de las calles obtenidas fue sembrada en una segunda dimensión SDS-PAGE (con distinto porcentaje de acrilamida si la primera dimensión también fue SDS-PAGE), sellada con agarosa 1% (P/V) en el buffer de equilibrio antes citado y con 0,01% de azul de bromofenol. La segunda dimensión se corrió en las condiciones habituales.

Todos los geles realizados fueron teñidos con Coomassie Brilliant blue, tinción con plata o una combinación de ambas técnicas.

### **3.2.7. Métodos inmunológicos:**

Se produjo suero anti-lectina de semilla de poroto en tres conejos blancos tipo New Zealand (uno para cada fracción activa). Un cuarto animal fue inyectado con PBS y usado como control.

Los conejos fueron inyectados en la vena marginal de la oreja con la lectina de semilla purificada (200  $\mu$ g de lectina y 1 mL de adyuvante completo de Freund). Luego de dos semanas se repitió la inoculación en las mismas condiciones y, un mes después, se efectuó otra inoculación con 400  $\mu$ g de proteína y 1 mL de adyuvante

incompleto de Freund (gentileza Dr. Menestrina, Lab. Central de Salud de la Pcia. de Bs. As.). Al cabo de veinte días se realizó punción cardíaca de los conejos. La sangre se dejó 1 hora a 37 °C (formación del coágulo) y luego una noche en heladera (retracción del coágulo).

Posteriormente se centrifugó la muestra, se conservó el suero congelado y con alícuotas del mismo se determinó concentración de proteínas séricas y se efectuó reacción de inmunoprecipitación con el método de doble difusión en porta-objetos (Ouchterlony y Nilsson, 1978). Los porta-objetos fueron revisados a las 24, 48, 72 y 96 horas y finalmente, teñidos con Negro amido.

### **3.3. RESULTADOS**

Las concentraciones, los títulos y las actividades específicas obtenidas durante la purificación de las fitohemaglutininas de los dos cultivares diferentes de *P. vulgaris* se muestran en la tabla 3.I.

Para *P. vulgaris* cultivar Alubia, la filtración por geles resolvió la preparación en tres picos como se ilustra en la figura 3.1. aunque sólo uno presentó actividad hemaglutinante. Para el cultivar Bat 76 la cromatografía en Sephadex mostró dos picos (figura 3.2.) con actividad hemaglutinante. El componente de mayor peso molecular presentó alrededor de siete veces más actividad que el de menor. De aquí en adelante, los dos picos activos del cultivar Bat 76 serán considerados dos proteínas diferentes y llamadas Bat-1 y Bat-2.



a) CULTIVAR ALUBIA					b) CULTIVAR BAT 76				
	1	2	3	4	1	2	3	4 <sub>1</sub>	4 <sub>2</sub>
Conc. (g L <sup>-1</sup> )	5.4	2.8	6.4	1.4	46.1	14.9	0.79	0.95	3.68
Título (a)	128	128	256	64	128	512	64	256	128
A . o (b)	24	46	80	45	2.8	34	81	269	35

**Tabla 3.I:** Concentraciones, títulos y actividades específicas obtenidas en la purificación de lectinas de *P. vulgaris*.

- a) Título: Inversa de la mayor dilución que presenta aglutinación
- b) Actividad específica: Título por mg de proteína por mL
- 1) Extracto crudo
  - 2) Precipitado al 100% de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
  - 3) Eluato de la cromatografía de afinidad
  - 4) Eluato de la cromatografía de permeación por geles
- 4<sub>1</sub> y 4<sub>2</sub>) Eluato de la cromatografía de permeación por geles, picos 1 y 2 correspondientes a las lectinas Bat-1 y Bat-2 (ver texto).

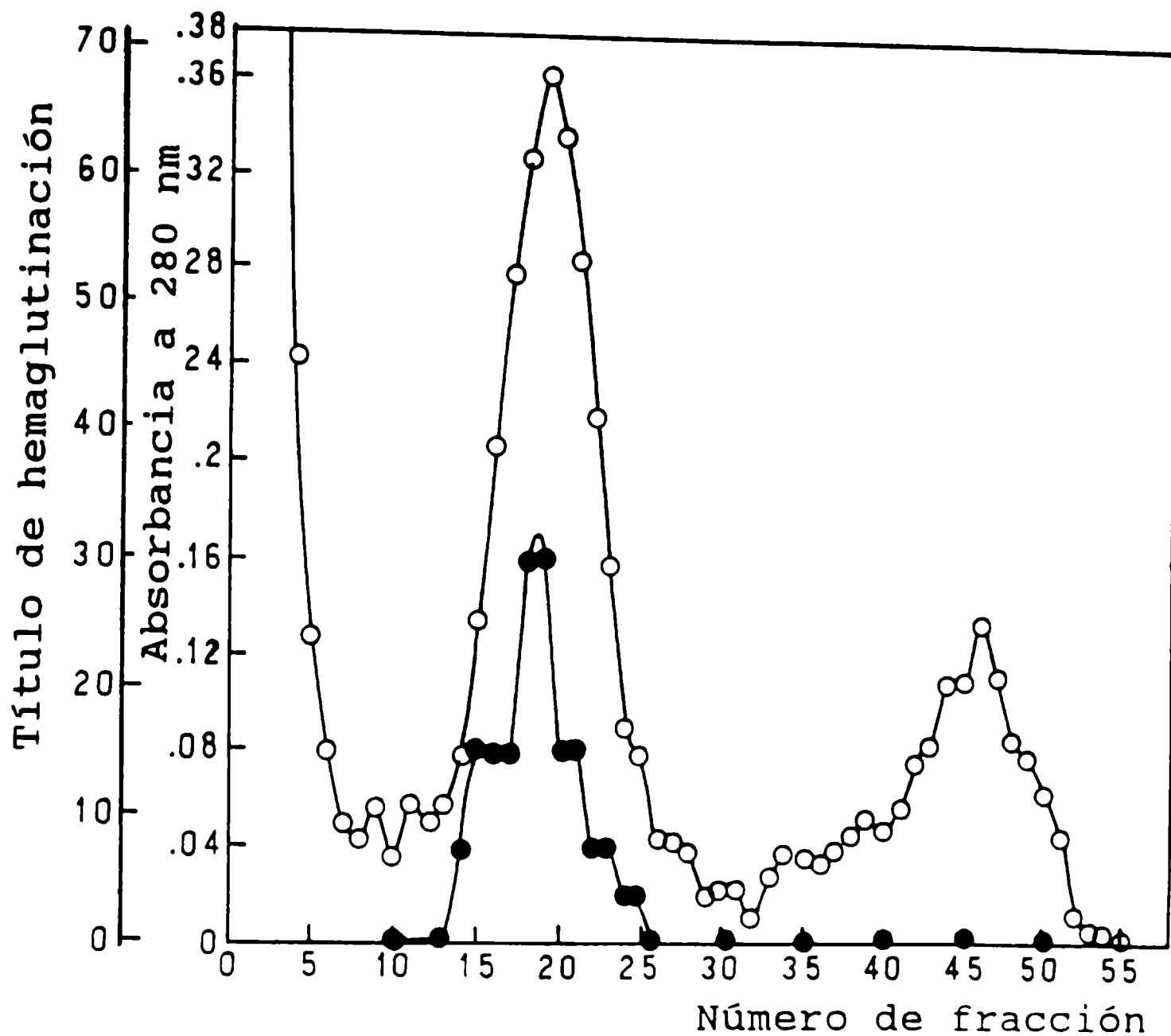


Figura 3.1: Perfil de elución de lectina de *P. vulgaris* cv Alubia en cromatografía de permeación por geles.

Aproximadamente 50 mL del retentato de una ultrafiltración de muestra eluída de una columna de afinidad fue sembrado en una columna de vidrio de 110 cm x 2,5 cm, rellena con Sephadex G-200 superfino. Se eluyó con PBS pH 6,8 a un flujo aproximado de 18 mL h<sup>-1</sup>. Se recogieron fracciones de 10 mL a las que se les determinó absorbancia a 280 nm y actividad como título de hemaglutinación (sección 3.2.4.). Este perfil corresponde a uno de los procesos de purificación y no representa el promedio de ellos. Símbolos: ○: Absorbancia a 280 nm; ●: Título.

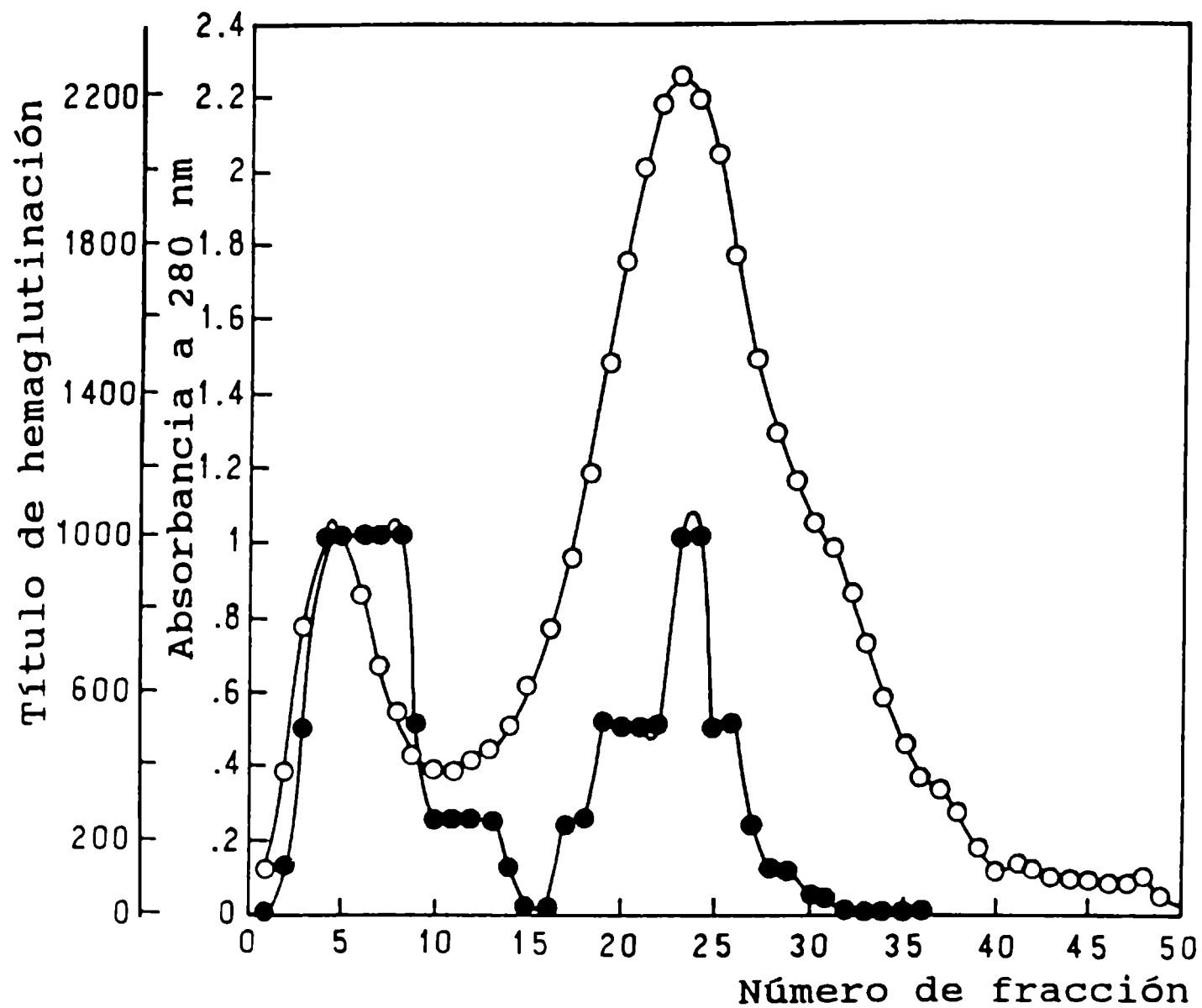
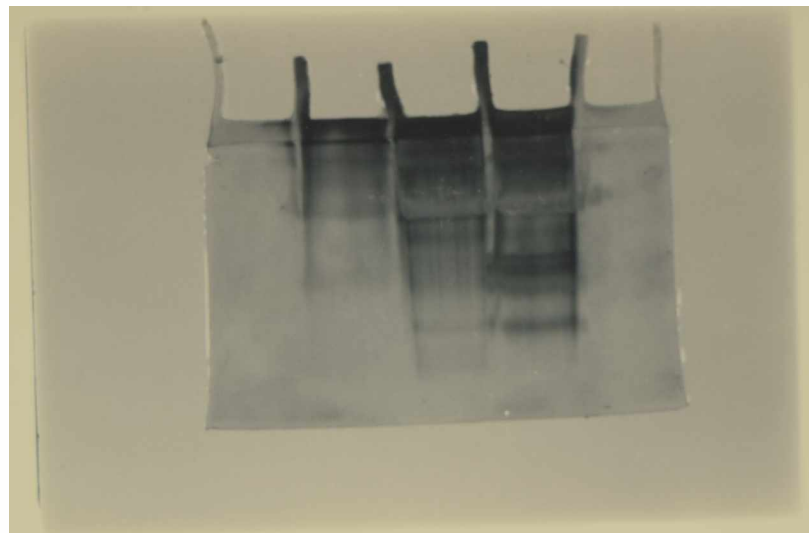


Figura 3.2: Perfil de elución de lectina de *P. vulgaris* cv Bat 76 en cromatografía de permeación por geles.

El procedimiento es el descrito en la figura 3.1. Símbolos: O: Absorbancia a 280 nm; ●: Título.

En electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones no desnaturizantes y a dos valores distintos de pH (7,0 y 4,3) las lectinas dieron una sola banda ancha, algo difusa. Al llevar a cabo una electroforesis no desnaturizante a pH 8,0 se obtuvo más de una banda para las lectinas Bat-1 y Bat-2 pero sólo una, para la lectina de Alubia. (figura 3.3.).



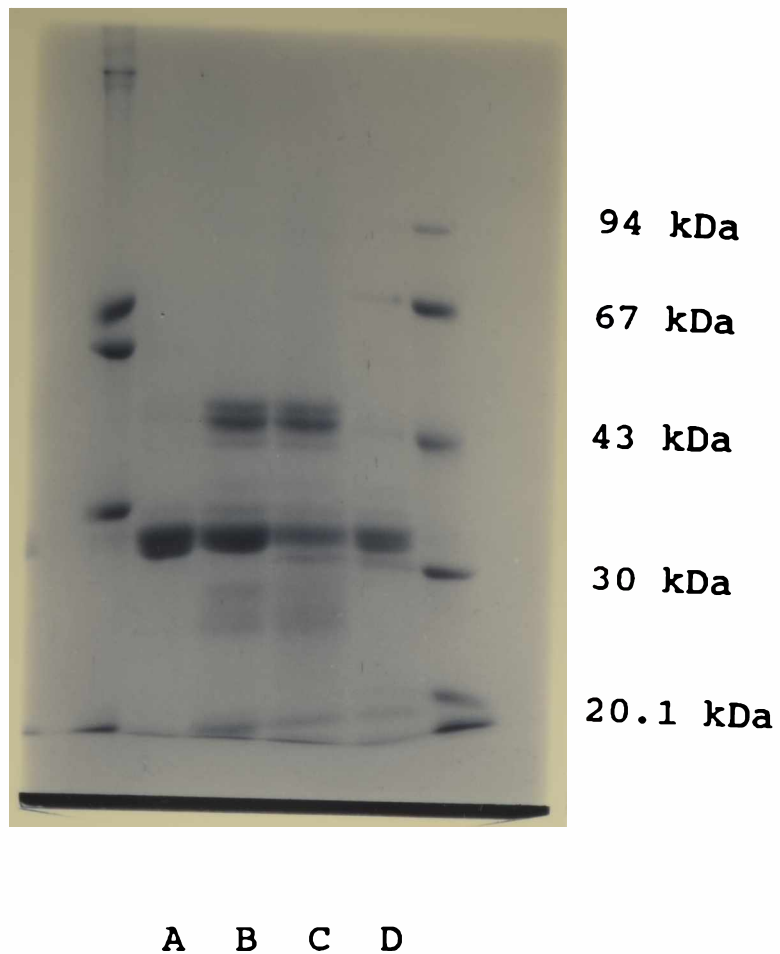
A B C

Figura 3.3.: Electroforesis no desnaturizante a pH 8,0.

100  $\mu$ L de muestra ( 1 mg mL<sup>-1</sup>) proveniente de la cromatografía de exclusión molecular fueron sembrados en cada pocillo de un gel de apilamiento con 4% de acrilamida. El gel de resolución, de 1 mm de espesor, contenía 7,5% de acrilamida. La electroforesis se llevó a cabo con un equipo Mini Protean II Dual Slab CII (BIORAD) a un voltaje constante de 200V. El gel fue teñido con Ag. Carril A: lectina Alubia; carril B: lectina Bat-1; carril C: lectina Bat-2.

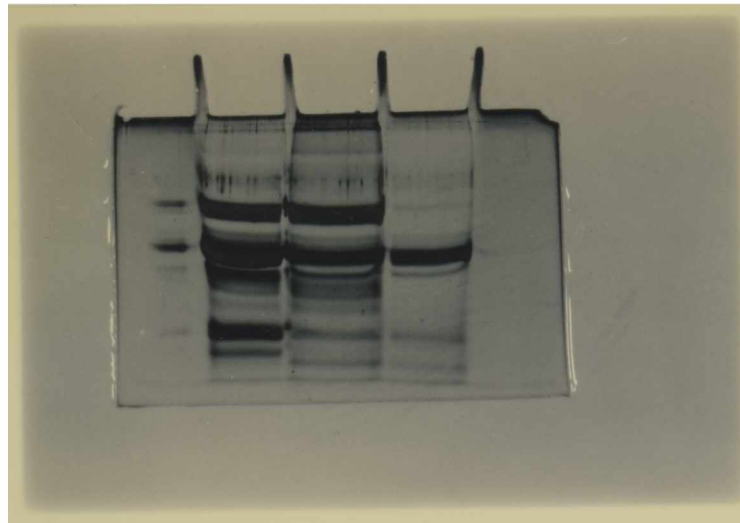
El comportamiento electroforético de las aglutininas en SDS-PAGE (tinción con Coomasie) se muestra en la figura 3.4. Como puede verse, las cuatro lectinas corridas presentan en común algunas bandas de alrededor de 30 kDa. Por otra parte, las lectinas de Bat 76 mostraron bandas de alrededor de 50 kDa que, al menos bajo las condiciones experimentales citadas, no estaban presentes en las lectinas de Alubia y comercial (Sigma).

Al efectuar tinción con plata (figura 3.5.) se confirmaron los resultados citados anteriormente. La electroforesis SDS-PAGE sin  $\beta$ -mercaptoetanol mostró diferencias con respecto a la realizada en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol (no se incluye foto).



**Figura 3.4:** Electroforesis de lectinas de semilla de poroto en geles de poliacrilamida con SDS.

Las muestras de lectinas purificadas según se describe en la sección 3.2.2. fueron sembradas en SDS-PAGE en un gel de resolución de 12,5% (P/V) de acrilamida y uno de concentración con 4% (P/V) de acrilamida. Se corrió a 50V en el gel de concentración y 100 V en el de resolución. Se efectuó tinción con Coomasie. En el carril de la derecha se indican los tamaños moleculares (kDa) correspondientes a sustancias patrones que son (de arriba hacia abajo): fosforilasa b, albúmina, ovoalbúmina, anhidrasa carbónica, inhibidor de tripsina y lactalbúmina. Carril A: lectina comercial (Red kidney bean, Sigma); carril B: lectina Bat-2; carril C: lectina Bat-1; carril D: lectina Alubia.

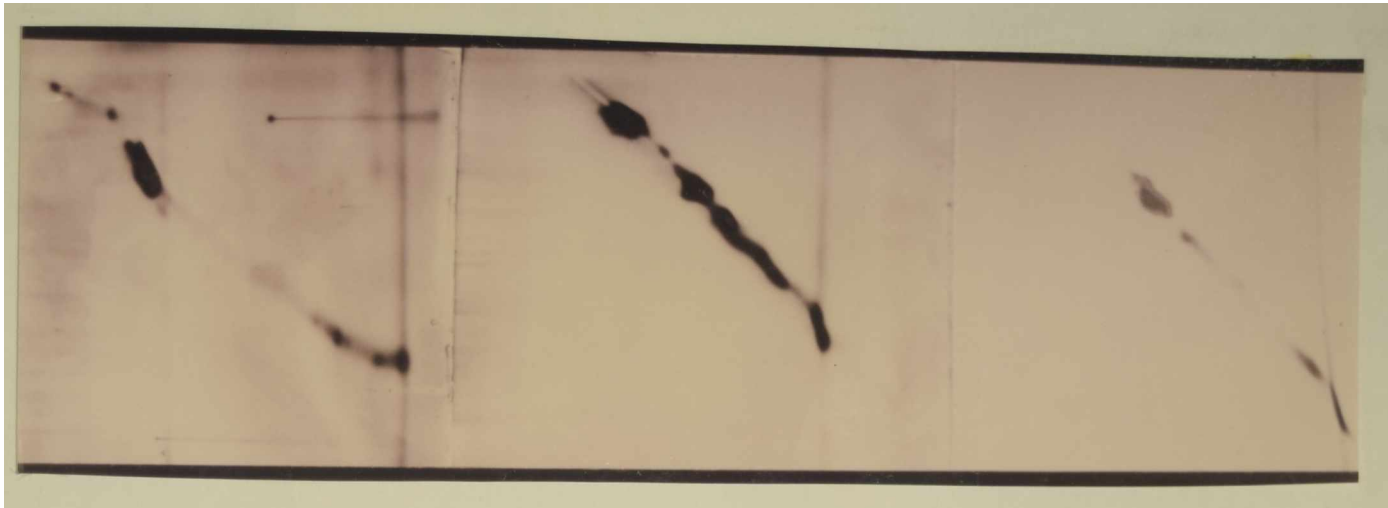


**C   B   A**

**Figura 3.5: Electroforesis de lectinas de semilla de poroto en geles de poliacrilamida con SDS.**

60  $\mu\text{L}$  de proteína ( 1 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) purificada según 3.2.2. se sembraron en un gel de concentración de 1 mm de espesor y con 4% (P/V) de acrilamida. El gel de resolución contenía 12,5% de acrilamida. La electroforesis se llevó a cabo a 200 V en un equipo Mini-Protean Dual Slab Cells (BIORAD) y se efectuó tinción con Ag. Carril A: lectina Alubia; carril B: lectina Bat-1; carril C: lectina Bat-2.

La electroforesis 2D (figura 3.6.) también mostró diferencias entre las lectinas Alubia, Bat-1 y Bat-2.



**A**

**B**

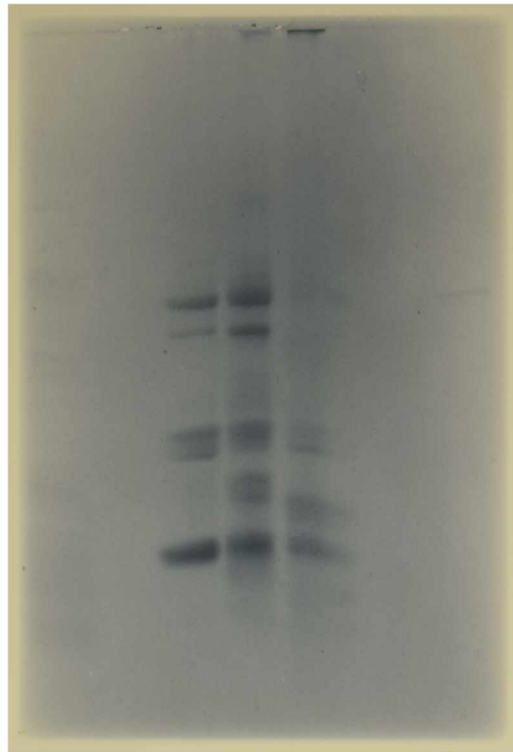
**C**

Figura 3.6: Análisis de las lectinas de poroto por electroforesis en geles de poliacrilamida en dos dimensiones (2D).

Se recortaron con escalpelo las calles correspondientes a una primera dimensión con geles de poliacrilamida de 1 mm de espesor y se trataron con buffer de equilibrio (sección 3.2.6.). Cada una de las calles fue sembrada en una segunda dimensión de 1,5 mm de espesor, sellada con agarosa 1% (P/V) en buffer de equilibrio con 0,01% de azul de bromofenol. La corrida se efectuó a 150 V y los geles se tiñeron con Ag. A: lectina Alubia; B: lectina Bat-1; C: lectina Bat-2.



El mapeo peptídico obtenido por proteólisis con proteasa V8 de *Staphylococcus aureus* previa a la electroforesis , también mostró diferencias entre las lectinas (figura 3.7.). Resultados similares se obtuvieron al hacer la proteólisis con tripsina (no se muestra).

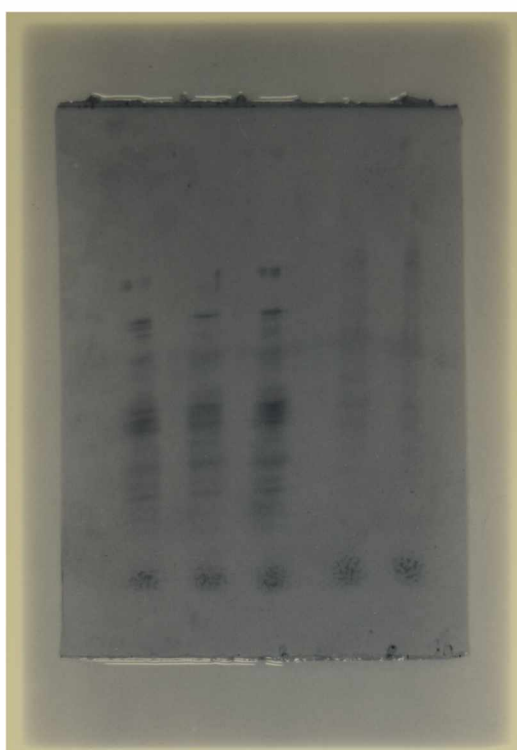


C B A

Figura 3.7: Análisis de los fragmentos peptídicos obtenidos por proteólisis de suspensiones de lectinas de semilla de poroto.

60  $\mu\text{L}$  de suspensión de lectina ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) Alubia, Bat-1 y Bat-2 (carriles A, B y C respectivamente) en buffer de muestra (sección 3.2.6.) fueron tratadas con 3  $\mu\text{L}$  de suspensión de proteasa V8 de *S. aureus* ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) durante 30 min a 25 °C. La proteólisis se detuvo con 5  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol y 10  $\mu\text{L}$  de SDS 10% a 100 °C durante 5 min. Los fragmentos resultantes se analizaron en un gel con 15% de acrilamida que posteriormente fue teñido con Ag.

Al efectuar la proteólisis **in situ** de las bandas recortadas de un primer gel SDS-PAGE, se obtuvo un buen mapeo (figura 3.8.), aún mejor que el obtenido con la técnica citada más arriba; pero no se aprecian claramente los fragmentos provenientes de la proteólisis de las bandas de 50 kDa. La proteólisis **in situ** se efectuó con tripsina ya que el buffer de equilibrio contiene EDTA que inactiva a la proteasa V8 de *Staphylococcus aureus*.

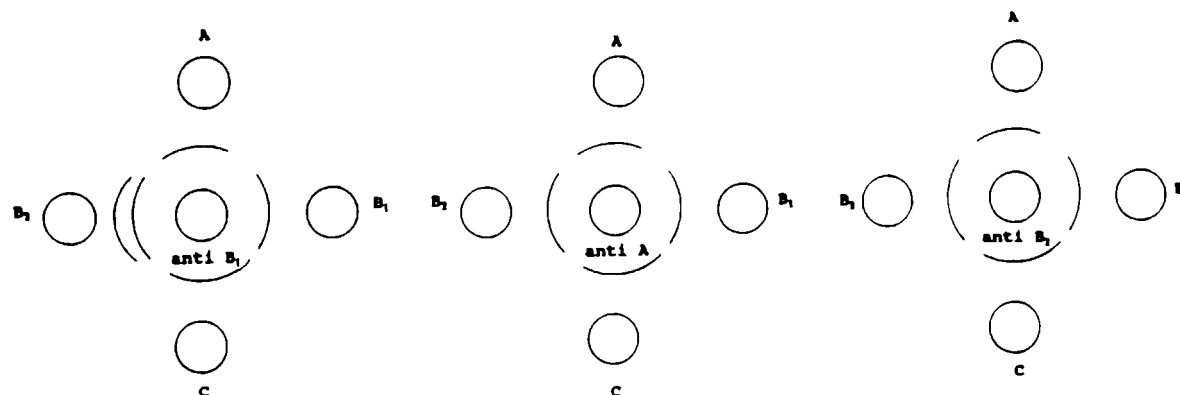


**Figura 3.8:** Análisis de los fragmentos peptídicos obtenidos por proteólisis *in situ* de las lectinas de semilla de poroto.

Se llevó a cabo un SDS-PAGE con 12,5% y 4% (P/V) de acrilamida en los geles de resolución y concentración respectivamente, en las condiciones indicadas (sección 3.2.6.). Las bandas de interés fueron recortadas con escalpelo, equilibradas en buffer (ver 3.2.6.) y sembradas en un segundo gel de 1,5 mm de espesor con 15% (P/V) de acrilamida en el gel de resolución. La proteólisis se llevó a cabo durante 35 min a temperatura ambiente con 25  $\mu\text{L}$  de tripsina ( $3 \text{ mg mL}^{-1}$ ) y 100  $\mu\text{L}$  de buffer sin paso de corriente. Al cabo de ese tiempo se conectó la fuente de poder y se llevó a cabo la electroforesis convencional. Las 3 primeras bandas corresponden a la proteólisis de las de 30 Kda de Alubia, Bat-1 y Bat-2 respectivamente; las dos últimas a las de 50 Kda de Bat-1 y Bat-2.

Con respecto al efecto de azúcares sobre la hemaglutinación (sección 3.2.5.), se encontró que N-acetil-D-galactosamina 200 mM inhibió la reacción de aglutinación entre los glóbulos rojos y las lectinas de Bat 76 pero no se observó ningún efecto inhibitorio sobre la lectina de Alubia. D-galactosa 200 mM sólo tuvo efecto sobre la reacción de aglutinación inducida por lectina Bat-1. Ninguno de estos azúcares, en concentraciones 100 mM, inhibió la reacción de hemaglutinación. No hubo inhibición de la hemaglutinación con los otros azúcares probados en concentraciones 100 mM y 200 mM.

Los patrones de doble difusión obtenidos en el ensayo de Ouchterlony (figura 3.9.) con cada suero anti-lectina y las diferentes proteínas, no mostraron diferencias entre las tres lectinas.



**Figura 3.9:** Esquema de los resultados del ensayo de doble difusión de Ouchterlony.

El ensayo se llevó a cabo con antisueros preparados según se indica en 3.2.7. y con lectinas purificadas según 3.2.2. En los pocillos centrales se colocó el antisuero y en los restantes, las suspensiones de lectina en PBS conteniendo entre 20 y 40 µg de proteína. El esquema corresponde al observado luego de 96 h de incubación. Símbolos: A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y C son las lectinas alubia, Bat-1, Bat-2 y comercial respectivamente.

### 3.4. DISCUSION

Hay resultados contradictorios con respecto a la capacidad de las fitohemaglutininas de *P. vulgaris* de reconocer específicamente monosacáridos. Por lo tanto se ha dicho que estas lectinas no muestran especificidad frente a la aglutinación de eritrocitos humanos (Kornfeld y Kornfeld, 1970). Dupuis y Leclair (1982) encontraron que la lectina de poroto aglutina preferentemente eritrocitos humanos del grupo A y más débilmente los de los grupos O y B. Sin embargo, Bessler y Goldstein (1973) consideran que la lectina de poroto es específica para glóbulos rojos del grupo A. Según Entlicher et al. (1970) se pueden distinguir principalmente dos tipos de fitohemaglutininas: aquellas que aglutinan glóbulos rojos de todos los grupos sanguíneos con igual actividad, llamadas **no específicas**; y aquellas que aglutinan selectivamente o preferencialmente uno u otro grupo sanguíneo, **específicas**. De acuerdo a los resultados aquí obtenidos, las tres lectinas usadas aglutinaron eritrocitos de los grupos A, B, AB y O (aunque la lectina Alubia pareció más eficiente frente a células del grupo A) por lo cual podrían considerarse hemaglutininas no específicas. Corresponde hacer la salvedad de que el método utilizado para determinar la actividad es semicuantitativo y la apreciación visual de la hemaglutinación puede llevar a considerar negativa una reacción débilmente positiva y por lo tanto introducir un error por defecto en la determinación del título. La misma salvedad debe tenerse en cuenta al analizar los resultados de las actividades

específicas, en donde un error por defecto llevaría a consignar actividades específicas menores en un factor de 2. Considero que es despreciable un probable error por exceso ya que es prácticamente imposible confundir una reacción negativa con una positiva. Cuando se confirman los resultados de la hemaglutinación, se lleva a cabo una resuspensión del contenido de los pocillos. En el caso de reacción negativa la resuspensión es total y queda una suspensión límpida y sin grumos que no puede confundirse con los grumos característicos de la reacción positiva.

Los datos obtenidos con las lectinas de Bat 76 confirman los trabajos previos en que se describe a N-acetil-D-galactosamina como inhibidor de la reacción de aglutinación de glóbulos rojos inducida por lectina de *P. vulgaris* (Borberg et al., 1966; Dupuis y Leclair, 1982; Wong y Shantharam, 1984). De acuerdo a los ensayos de aglutinación arriba mencionados, y dado que N-acetil-D-galactosamina y D-galactosa son los azúcares inmunodominantes en las membranas de los glóbulos rojos de los grupos A y B respectivamente, debería esperarse una inhibición de la reacción de hemaglutinación por estos azúcares. Sin embargo, N-acetil-D-galactosamina no resultó ser un inhibidor de la lectina de Alubia y D-galactosa no tuvo efecto sobre las lectinas Alubia y Bat-2, al menos bajo las condiciones experimentales ensayadas. Suponiendo un peso molecular aproximado de 120-130 kDa para la lectina de *P. vulgaris* (Takahashi et al., 1967), las condiciones del ensayo se diseñaron de modo tal de tener exceso de azúcar por

lo tanto, la negatividad de la reacción de inhibición de hemaglutinación no puede atribuirse a exceso de aglutinina.

La disminución en la actividad específica en el último paso del proceso de purificación (Tabla 3.I) se observó al efectuar la cromatografía de permeación por geles tanto a temperatura ambiente como en frío. Este efecto se atribuyó principalmente a dos causas: el retentato proveniente de la cromatografía en Sephadex fue liofilizado en un equipo poco eficiente con el cual la liofilización demora varios días. Se puede pensar que a lo largo de ese proceso se produce una pérdida de actividad por desnaturalización. Para comprobar esta posibilidad se determinó la actividad a una muestra de uno de los procesos de purificación, que no había sido sometida a liofilización, y se observaron diferencias. Además, otra causa probable es el largo tiempo que requiere la cromatografía en Sephadex en las condiciones experimentales citadas y con el equipamiento empleado. No se descarta que se produzca desnaturalización parcial de la proteína en esas condiciones. En principio, se había considerado posible que hubiera una contaminación del Sephadex o de los buffers y que esto condujera a una proteólisis. En un caso se observó contaminación al microscopio y, por lo tanto, se repitió el proceso de purificación trabajando con geles y buffer estériles y con agregado de azida sódica y aún así se observó descenso de la actividad específica en el último paso de purificación.

De acuerdo a los patrones de doble difusión de Ouchterlony, las lectinas de Alubia y Bat 76 parecen ser indistinguibles pero es

preciso tener en cuenta que este método tiene una baja sensibilidad.

Una diferencia importante encontrada entre las lectinas de Alubia y de Bat 76 es el comportamiento cromatográfico. Mientras que la cromatografía de afinidad dio sólo un pico con actividad hemaglutinante, para ambos tipos de lectina, la cromatografía en Sephadex mostró un pico activo para la lectina de Alubia y dos para la de Bat 76. Utilizando el mismo proceso de purificación, Bessler y Goldstein (1973) obtuvieron sólo un pico activo par las proteínas de *P. vulgaris*.

Gould y Scheinberg (1970) y Bessler y Goldstein (1973) informaron dos picos activos en la purificación de lectina de *Phaseolus lunatus*. En estos trabajos se encontró que el componente de alto peso molecular presentaba una actividad específica cuatro veces mayor que la del componente de bajo peso molecular. Estos autores informaron que todas las propiedades químicas, biológicas e inmunológicas indicaban que estos dos componentes representaban a la misma proteína en dos estados de agregación diferentes. Se podría estar ante un caso semejante con la lectina de Bat 76 que presenta un componente de mayor peso molecular y con una actividad específica siete veces mayor que la del componente de menor peso molecular.

Los resultados obtenidos por electroforesis SDS-PAGE mostraron una diferente composición polipeptídica para las lectinas de Alubia y Bat 76 (figuras 3.4. y 3.5.). Alubia mostró un patrón de bandas similar al de la lectina comercial (Sigma). Las bandas de



aproximadamente 30 kDa ya habían sido descritas (Pusztai et al., 1981). Las lectinas de Bat 76 presentaron un grupo extra de bandas de alrededor de 50 kDa. De acuerdo a estos resultados, no se encontraron diferencias entre las lectinas Bat-1 y Bat-2 salvo en la composición relativa de las bandas (figura 3.5.). La electroforesis SDS-PAGE en ausencia de  $\beta$ -mercaptoetanol mostró diferencias con respecto a la efectuada en presencia del reactivo, sugiriendo la existencia de al menos un puente disulfuro entre los péptidos.

Los resultados obtenidos con geles no desnaturizantes muestran la presencia de bandas anchas y difusas a los dos valores de pH distintos. Esto coincide con lo informado por otros autores (Bessler y Goldstein, 1973) y podría estar indicando la presencia de una serie de componentes (tal vez isolectinas) que difieren en su carga. El resultado sorprendente obtenido a pH 8,0 (figura 3.3) en el que se observa más de una banda para Bat-1 y Bat-2, podría indicar una disociación o asociación a ese pH o bien una desnaturalización proteica. Rutherford et al. (1986) describen, para lectina de soja, una banda difusa de peso molecular aproximadamente 45 kDa e informan que preparaciones de lectina conservadas durante largos períodos presentaban una banda de 100 kDa que podría representar una forma dimérica de las subunidades de lectina no completamente separadas por el SDS. La electroforesis de las lectinas de poroto se llevó a cabo con muestras conservadas congeladas durante mucho tiempo, por lo tanto, podría haber ocurrido un fenómeno similar al citado por Rutherford et al.

aunque, precisamente por el tiempo prolongado de conservación de estas muestras, tampoco puede descartarse una desnaturalización.

En el método de Cleveland (1977) las proteasas digieren parcialmente la proteína o los polipéptidos y el patrón de bandas que se obtiene es característico de la proteína usada como sustrato y de la enzima proteolítica empleada, de modo tal que la relación entre los polipéptidos obtenidos es fácilmente determinable comparando el patrón de bandeo de estos péptidos. En este caso, las tres lectinas produjeron diferentes patrones de bandeo cuando la digestión se llevó a cabo con tripsina y con proteasa V8 de *Staphylococcus aureus* (figura 3.6.) Asimismo se obtuvieron diferencias entre los electroforegramas de las tres lectinas al efectuar electroforesis 2D.

Como conclusión y de acuerdo a los resultados obtenidos en la cromatografía en Sephadex G-200, en la inhibición de la hemaglutinación por N-acetil-D-galactosamina y principalmente en los ensayos electroforéticos (SDS-PAGE, 2D y método de Cleveland) se podría afirmar que Bat 76 y Alubia no presentan la misma lectina.

Si es cierta la hipótesis de la lectina o si la proteína está involucrada de alguna manera en la asociación simbiótica, se podría pensar que la distinta aptitud simbiótica de los dos cultivares usados podría deberse, al menos parcialmente, al hecho de tener lectinas diferentes. Esto motivó la continuación de los estudios.

**PARTE 4**

## INTRODUCCION

La secuencia que culmina en la nodulación de la raíz de una leguminosa por un determinado *Rhizobium* consta de una serie de etapas. Tal como se indica en el capítulo 1, debe haber un reconocimiento mutuo de las partes o bien de determinadas señales enviadas por las partes involucradas en la simbiosis. En la etapa previa a la infección de la raíz por los rizobios, **preinfección**, ocurren una serie de eventos que involucran, entre otros, la unión de los rizobios a la superficie de la raíz y su posterior anclaje sobre la misma.

De ser válida la hipótesis de la lectina (ver Introducción general, capítulo 1) ésta podría mediar en los procesos de unión y adhesión del rizobio a la leguminosa huésped. En esta parte del trabajo de Tesis se estudiará la unión rizobio-lectina aislada y purificada de semilla de *Phaseolus vulgaris* (capítulo 4). Se evaluará la influencia del agregado de lectina exógena sobre los procesos de adhesión raíz-rizobio homólogo (capítulo 5), formación de hilos de infección y nodulación de poroto (capítulo 6).

**CAPITULO 4**

**ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE UNION RIZOBIO-LECTINA MARCADA POR  
FLUORESCENCIA EN DISTINTAS FASES DE CRECIMIENTO DE UN CULTIVO EN  
BATCH**

#### 4.1. INTRODUCCION

Los primeros estudios sobre la unión lectina-rizobios fueron realizados por Hamblin y Kent (1973) quienes aportaron algunas de las evidencias experimentales sobre las que se basaron luego Albersheim y Anderson-Prouty (1975) para enunciar la hipótesis de que la lectina podría pegar bacterias a la raíz. Trabajaron con una sola cepa de *R. phaseoli* y encontraron que la bacteria incubada con lectina era capaz de aglutinar eritrocitos. Demostraron el pegado de glóbulos rojos a los pelos radiculares de la planta y sugirieron la presencia de la aglutinina en la planta. Fueron Bohlool y Schmidt (1974) usando lectinas de semillas marcadas con compuestos fluorescentes quienes por primera vez demostraron interacción específica de las lectinas con los rizobios. En 1975 Dazzo y Hubbell proponen su modelo del **antígeno común** según el cual estructuras antigénicas comunes, tanto en la planta como en la bacteria, serían responsables del reconocimiento simbiótico en las etapas tempranas. Ambas estructuras unirían lectina que actuaría de puente o nexo entre los simbioses.

Muchos son los estudios que se han llevado a cabo hasta la fecha sobre la unión lectina-bacteria y muchos son los resultados contradictorios obtenidos (para una revisión más amplia, ver capítulo 1). La mayor parte de los trabajos publicados se ocupan de dilucidar el aspecto de la especificidad de la unión (Bohlool y Schmidt, 1974; Dazzo y Hubbell, 1975a; Chen y Phillips, 1976; Wolpert y Albersheim, 1976; Bhuvaneshwari et al., 1977; Dazzo et

al., 1979; Wong y Shantharam, 1984; Shantharam, 1985; Ridge y Rolfe, 1986; entre otros).

Muchas de las contradicciones podrían ser explicadas por el hecho de que la presencia y accesibilidad de los receptores para lectina en los rizobios podrían depender de la fase de crecimiento del microorganismo tal como fue indicado por Bhuvaneswari et al.(1977). En este capítulo se intentó correlacionar la capacidad de unión lectina-rizobio con las distintas fases de crecimiento de un cultivo en batch de *R. phaseoli*

## **4.2. MATERIALES Y METODOS**

### **4.2.1. Cepas utilizadas:**

Se utilizó un mutante espontáneo de la cepa F45 de *R. phaseoli* designado F45 300, resistente a 300 mg L<sup>-1</sup> de estreptomicina. La cepa parental proviene del Departamento de Microbiología del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Castelar, con esa denominación y aislada de poroto cultivado en la Provincia de Tucumán que había sido inoculado con inoculante comercial norteamericano.

### **4.2.2. Condiciones de cultivo:**

Idem 2.2.3.

#### **4.2.3. Medios de mantenimiento y cultivo de cepas:**

El medio de mantenimiento (MM) se preparó según se indica en 2.2.4. pero con 300 mg mL<sup>-1</sup> de sulfato de estreptomicina y sin agregado de espectinomicina, cicloheximida y nistatina. Los medios preinóculo y proceso (PI y MP) se prepararon según se indica en 2.2.4. pero con 300 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de estreptomicina y sin agregado de espectinomicina.

#### **4.2.4. Lectinas:**

Las lectinas empleadas fueron aisladas de *P. vulgaris* cultivares Alubia y Bat 76 y purificadas según se indica en 3.2.2.

#### **4.2.5. Preparación de lectina marcada por fluorescencia:**

Se siguió la técnica descrita por van der Schaal et al. (1983) con algunas modificaciones. 100 µL de solución de isotiocianato de fluoresceína (FITC) (5 mg mL<sup>-1</sup> en buffer Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,5 M pH 9,5) se añadieron a 1 mL de solución de lectina al 1% en NaCl 0,15 M. Luego de 16-24 horas de incubación a oscuras y a 4 °C, el conjugado se dializó frente a PBS hasta desaparición del color naranja-amarillento característico del FITC. El conjugado se centrifugó durante 2 minutos a 14.000 g en centrífuga refrigerada y se conservó a -20 °C. Antes y después del proceso de marcado se determinó la actividad hemaglutinante según se consigna en 3.2.4.



ya que no debe producirse pérdida de la misma como consecuencia de este proceso.

#### **4.2.6. Ensayo de unión bacteria-lectina marcada:**

Se cosecharon en forma estéril 5 mL de un cultivo bacteriano de *R. phaseoli* crecido en MP (ver secciones 2.2.3. y 2.2.4.), hasta la fase de crecimiento deseada. Esta suspensión se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 minutos y a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó con 5 mL de PBS frío para eliminar restos de medio de cultivo y polisacáridos extracelulares. Se llevó a cabo una nueva centrifugación en las mismas condiciones, y finalmente, un último lavado y centrifugado. El pellet se resuspendió en PBS hasta densidad óptica (a 625 nm) de 0,1. Con esta suspensión se prepararon los porta-objetos destinados a la evaluación microscópica de la unión bacteria-lectina-FITC.

Una gota de 40  $\mu$ L de esta suspensión se colocó sobre cada porta-objeto perfectamente limpio, se secó en corriente de aire frío y luego se fijó con tres pasajes por calor. Los porta-objetos se lavaron con abundante cantidad de agua. Una vez secos, se colocaron sobre cada uno de ellos dos gotas de 15  $\mu$ L de la suspensión lectina-FITC. Se incubaron en cámara húmeda y a oscuras durante 1 hora; al cabo de ese tiempo se llevaron a cabo tres lavados de 20 minutos cada uno con PBS. Los porta-objetos se secaron y se observaron al microscopio consignando el total de bacterias contadas por contraste de fase y el total de bacterias

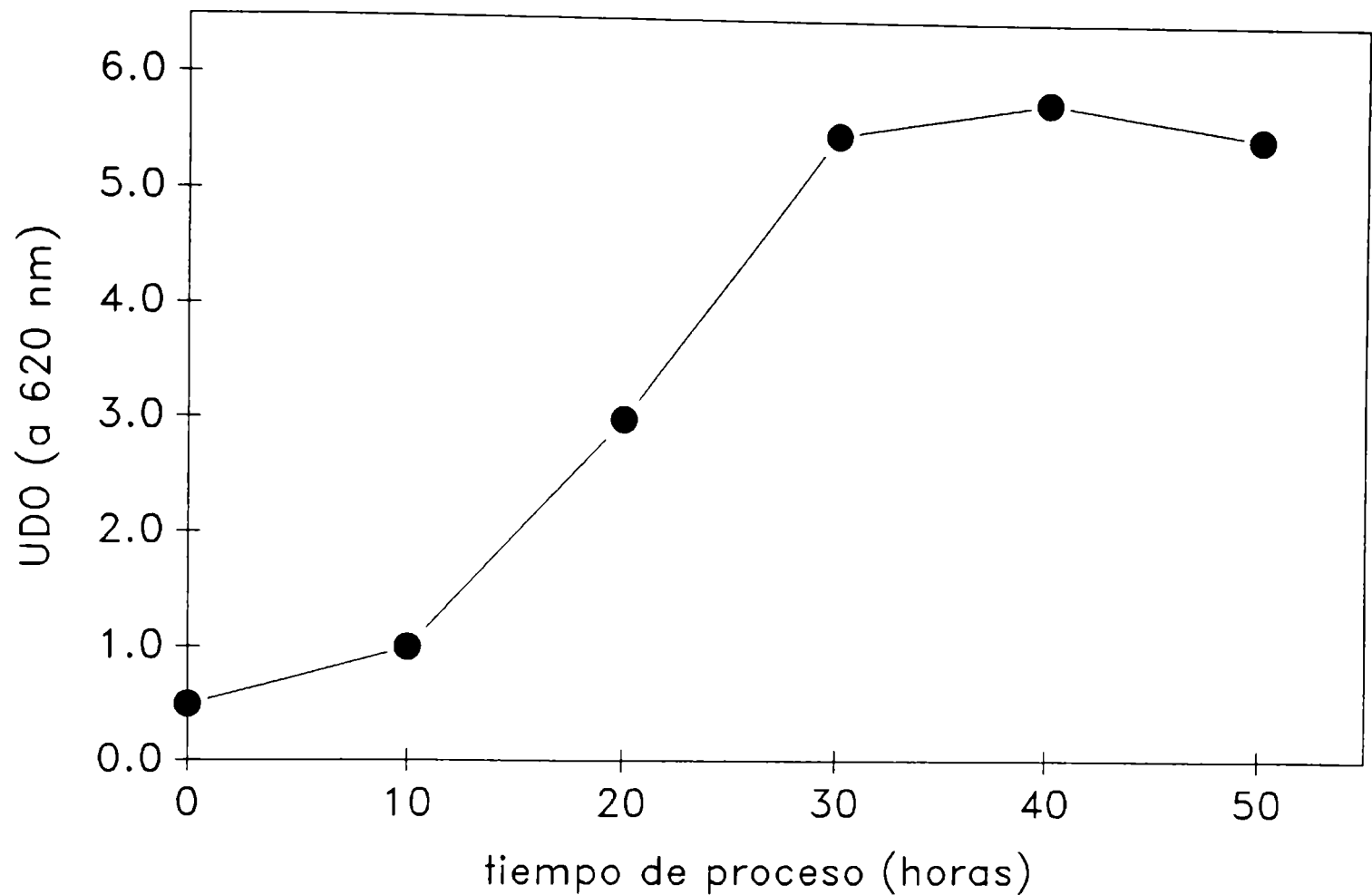
fluorescentes (por epifluorescencia). Los resultados se expresaron como porcentaje de bacterias fluorescentes, tomando 15 campos microscópicos por determinación. Como solución de montaje se empleó una mezcla de 90 mL de glicerol y 10 mL de PBS. Como control de autofluorescencia, se prepararon porta-objetos con los microorganismos tratados como se indica más arriba pero efectuando la incubación sin lectina. También se hizo un control tratando un porta-objetos solamente con lectina marcada por fluorescencia.

#### **4.3. RESULTADOS**

Para estudiar la unión lectina marcada-rizobios las bacterias fueron cosechadas a los siguientes tiempos (en horas): 2,5; 6; 13; 18; 23; 47 y 95 que corresponden a las fases lag, exponencial temprano, exponencial medio, exponencial tardío, estacionario temprano, estacionario medio y estacionario tardío respectivamente de un cultivo en batch de *R. phaseoli* F45 300 en el medio citado en 4.2.3. y en las condiciones dadas en 2.2.3 (figura 4.1.). En todas las fases de crecimiento y con todas las lectinas empleadas (Alubia, Bat-1 y Bat-2) se observó una fluorescencia nítida, intensa al principio y que iba desapareciendo en forma rápida. Los controles sin lectina no presentaron fluorescencia en ningún caso y el control de lectina fue absolutamente fluorescente. Al analizar los porcentajes de bacterias fluorescentes en función del tiempo para cada fase de crecimiento y en cada batch de cultivo, se

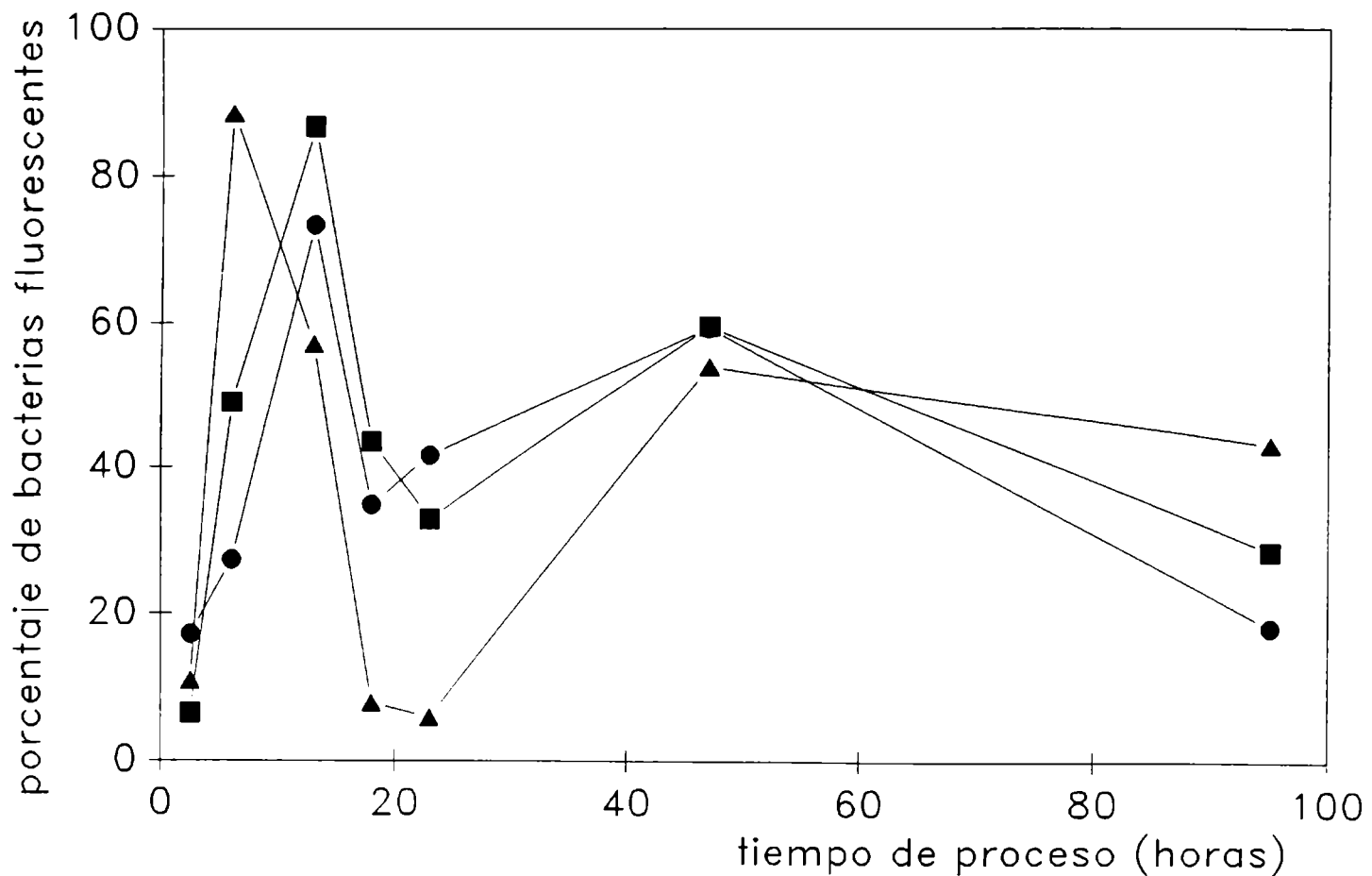
obtuvieron resultados muy variables en valor absoluto. Esto impidió hacer un análisis estadístico de los datos.

Si bien los resultados provenientes de distintos batches de cultivos no son comparables en valor absoluto, sí lo son en cuanto a la tendencia mostrada. Con las tres lectinas utilizadas, la dependencia temporal del porcentaje de bacterias fluorescentes mostró una curva con dos máximos: el primero correspondiente a la fase exponencial temprana para Bat-1 y media para Alubia y Bat-2; y el segundo, en el estacionario medio. En todos los casos, el segundo máximo tenía un valor absoluto de alrededor de 60 a 80% del máximo correspondiente al primer pico (figura 4.2.).



**Figura 4.1:** Curva de crecimiento en batch de *R. phaseoli* F45.

Se llevó a cabo un proceso en batch con un medio de cultivo apropiado (sección 2.2.4.) incubado a 29°C y 200 rpm. A distintos tiempos se tomaron muestras por duplicado para determinar biomasa espectrofotométricamente. El valor de biomasa se expresó como unidades de densidad óptica (UDO) que es el producto de la DO leída a 620 nm y la dilución efectuada.



**Figura 4.2.:** Porcentaje de bacterias unidas a lectina-FITC.

5 mL de cultivo bacteriano crecido en el medio y las condiciones antes descriptas (2.2.3. y 2.2.4.) se cosechó en forma estéril y se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 min y a 4 °C. El pellet se lavó 2 veces en PBS y se centrifugó como se indica más arriba. Luego se resuspendió en PBS hasta DO (a 620 nm) de 0,1. Con la suspensión se hicieron preparados que luego de secados, fijados y lavados se incubaron 60 min a oscuras con suspensión de lectina-FITC. Luego de lavados, los porta-objetos se observaron al microscopio. Símbolos: ●: lectina Alubia;▲ lectina Bat-1; ■ lectina Bat-2.

#### 4.4. DISCUSION

La falta de reproducibilidad obtenida entre los diferentes batches usados puede deberse a una serie de factores. Tal como se indica en 2.2.3. el medio proceso para el crecimiento en batch se inicia a partir de un medio preinóculo o "starter" crecido hasta estado estacionario tardío (entre 72 y 96 o más horas de proceso) del cual se toman 5 mL para sembrar el MP. Se tuvieron en cuenta las curvas de crecimiento previamente efectuadas en el laboratorio por lo tanto las muestras de bacterias en las distintas fases de crecimiento se tomaron a tiempos fijos (2,5; 6; 13; 18; 23; 47 y 95 horas) y no se determinó el recuento celular ni el número de bacterias viables como así tampoco se consideró si provenían de un PI de 72 ó 96 horas de crecimiento. Se efectuaron los lavados y la resuspensión hasta una determinada densidad óptica (ver 4.2.5.). Es posible que en suspensiones de distintos cultivos con igual DO haya diferente número de células viables por mililitro y también distinta concentración de EPS. En principio, las células no viables podrían tener un comportamiento diferente en la unión a la lectina que las viables; ésto podría deberse a un menor número de receptores para la lectina o a que éstos no estuvieran en las condiciones apropiadas para la unión. Los dos lavados previos a la preparación de los porta-objetos tienden a minimizar la cantidad de EPS u otro material extracelular que podría ser fijado por calor (receptores sacarídicos liberados al medio) en el preparado final pero no puede descartarse que algo de EPS quede en el pellet y que

también se pegue a la lectina marcada (Chen y Phillips, 1976). Esta interferencia, si la hubiere, es prácticamente descartable ya que cada mancha fluorescente fue revisada por óptica de contraste de fase para confirmar que correspondía a bacterias y no a suciedad o fluorescencia inespecífica.

Las células en pequeños agregados fluorescentes fueron contadas individualmente. En los pocos casos en que la resuspensión no había sido completa y quedaban grandes agregados, éstos no se contaban. Esto puede haber introducido una fuente de variación considerable. Chen y Phillips (1976) encuentran una mayor fluorescencia en células pegadas en un grumo que en las aisladas y describen a algunos *R. leguminosarum* con gran tendencia a flocular y que producen intensidades de fluorescencia mayores. Hay fases de crecimiento en donde la aglutinabilidad de las células es mayor que en otras y si esos grumos, con mayor fluorescencia, son dejados de lado al hacer el recuento se evaluará un porcentaje de fluorescencia menor que el real.

El medio de cultivo usado (ver 4.2.3.) tiene extracto de levadura. Van der Schaal et al. (1983) encuentran que si se omite el procedimiento de lavado en el método de fluorescencia, el extracto de levadura cristaliza en el porta-objetos y se une muy bien a lectina de arveja. Esta interferencia es muy poco probable en el método empleado ya que, además de los tres lavados indicados, se revisa cada mancha para descartar fluorescencia inespecífica.

La figura 4.2. muestra una clara relación entre la unión a lectina y la edad del cultivo, indicando la posibilidad de que los

receptores bacterianos para la lectina sean transitorios. Estos resultados coinciden con los informados por otros autores para otros pares simbióticos como trébol-*R. trifolii* (Dazzo et al., 1979; Hrabak et al., 1981), soja-*B. japonicum* (Bhuvanewari et al., 1977), e inclusive para el par poroto-*R. phaseoli* (Boiardi y Galar 1988). Estos últimos también demostraron que la infectividad (medida como nodulación) era dependiente de la edad del cultivo. Otros autores (Caetano Anollés, 1985) citan a la adsorción a las raíces como una etapa dependiente de la edad del cultivo en la simbiosis alfalfa-*R. meliloti*.

En el caso de trébol-*R. trifolii* se observa una curva con dos máximos, semejante a la descrita en este capítulo. Bhuvanewari et al. (1977) encuentran un mayor porcentaje de bacterias unidas a lectina fluorescente en el exponencial medio con la cepa 3I1b 138 de *R. japonicum* (hoy *Bradyrhizobium japonicum* USDA 138). Con la cepa 3I1b 123 observan un distinto patrón de variación con máximos en las fases lag, exponencial temprana y estacionaria.

En el caso de poroto-*R. phaseoli*, Boiardi y Galar (1988) encuentran que la lectina marcada con FITC se une en mayor proporción a *R. phaseoli* al comienzo de la fase exponencial y también, aunque en menor proporción, en exponencial tardío. En fase estacionaria no detectan unión apreciable. Estos autores informan valores absolutos de porcentaje de bacterias fluorescentes mucho menores que los que aquí se indican (alrededor del 15% al inicio de fase exponencial y un 10% en el exponencial tardío). Esto podría



deberse a que trabajaron con lectina marcada comercial en lugar de lectina "fresca", marcada inmediatamente antes del uso.

Hay muchos resultados contradictorios con respecto a la utilización de microscopía de fluorescencia para evaluar la unión lectina-rizobio. Debido a las diferentes metodologías empleadas por los distintos autores es muy difícil establecer comparaciones y sacar conclusiones contundentes. Bhuvanewari et al. (1977) encuentran resultados variables con respecto a la proporción de células de *R. japonicum* unidas a lectina de soja marcada con FITC y ante la dificultad de cuantificar la unión desarrollan un método de unión a lectina radiactiva.

Bhagwat y Thomas (1980) proponen dos sitios de unión en la superficie de *Rhizobium* sp. para la lectina de maní: EPS y LPS. Observan un aumento en el pegado de EPS y LPS a lectina marcada radiactivamente con la edad del cultivo y llevan a cabo ensayos con rizobios lavados con buffer fosfato y rizobios sin lavar. En el primer caso encuentran un menor porcentaje de unión que cuando usaron rizobios sin lavar. Esto parece deberse a que los EPS se excretan al medio de cultivo y al efectuar lavados, son eliminados permaneciendo sólo el LPS como probable sitio de unión.

Chen y Phillips (1976) observan que el porcentaje de células uniéndose a lectina-FITC fue reproducible entre diferentes batches de la misma bacteria aunque encuentran sólo un 10% de células pegadas a proteína marcada. Estos valores son sensiblemente más bajos que los que aquí se consignan y que los informados por otros autores (Dazzo et al., 1979; Bhuvanewari et al., 1977).

Van der Schaal et al. (1983) trabajaron con un ensayo basado en la disminución de DO de una suspensión bacteriana luego de que los complejos lectina-bacteria aglutinada fueron filtrados de la suspensión. Encontraron que *R. leguminosarum* aglutinaba con la lectina de la planta homóloga sólo en la primera parte de la fase logarítmica (exponencial temprano o medio). Sin embargo, con la técnica de unión a lectina fluorescente de arveja, no encontraron correlación entre la unión de lectina y la edad del cultivo.

Como última observación, al proseguir este trabajo de Tesis encontré resultados que me llevaron a decidir no continuar con el uso de la cepa F45 300 de *R. phaseoli*. Como se explica en el capítulo 6, no pudo observarse microscópicamente la formación de hilos de infección con esta cepa. Sin embargo, previamente se la había empleado en el laboratorio (Boiardi y Galar 1988) y se habían obtenido nodulación y formación de hilos de infección, por lo cual se pensó en la posibilidad de alguna mutación en dicha cepa. Por tal motivo, la falta de reproducibilidad de algunos resultados también podría tener su origen en la cepa utilizada.

De todas formas, y a pesar de la variabilidad de los resultados, resulta evidente que en este par simbiótico existe una dependencia, en la capacidad de los rizobios de unirse a las lectinas, con la fase de crecimiento del cultivo en batch de donde fueron obtenidos los microorganismos. Por otra parte, no se observan marcadas diferencias según se trate de lectina del cultivar Bat 76 o Alubia.

**CAPITULO 5**

**ADSORCION RAIZ-RIZOBIO HOMOLOGO: INFLUENCIA DE LECTINA EXOGENA  
DE SEMILLA DE LEGUMINOSA SOBRE EL PROCESO DE ADSORCION**

## 5.1. INTRODUCCION

La evidencia indica que la adsorción de los rizobios a las raíces de las leguminosas ocurre pocos minutos después de la inoculación (Chen y Phillips, 1976; Dazzo et al., 1979; Solheim, 1983). Por lo tanto se cree que la adsorción constituye probablemente uno de los primeros pasos en la secuencia simbiótica que culmina con la formación de nódulos funcionales donde se fija el nitrógeno atmosférico.

Se ha propuesto que en esta etapa se expresa la selectividad y especificidad que caracteriza al proceso simbiótico (ver capítulo 1). También se ha especulado mucho sobre el rol de la lectina en el proceso de adsorción. La adsorción mediada por lectinas fue informada en los pares *R. trifolii*-trébol (Dazzo et al., 1985); *R. viciae*-arveja (Kato et al., 1981; Kijne et al., 1988) y *B. japonicum*-soja (Stacey et al., 1988). Otros autores no pudieron encontrar evidencia experimental que demostrara a la lectina involucrada en la adsorción a sus huéspedes. (Chen y Phillips, 1976; Pueppke, 1984; Badenoch-Jones et al., 1985; Mills y Bauer, 1985; Vesper y Bauer, 1985, 1987; Lepek, 1989; entre otros).

Tal como se indica en el capítulo anterior, también aquí la gran variedad de diseños experimentales usados dificulta la comparación de resultados. En muchos casos la adsorción se estudia por microscopía directa de bacterias adheridas a pelos radiculares

(Badenoch-Jones et al., 1985; Dazzo et al., 1976; Stacey et al., 1980), por conteo de rizobios como microcolonias en la superficie de la raíz (Caetano Anollés, 1985; Caetano Anollés y Favelukes, 1986a; Wall, 1990), recuento por plaqueo de los rizobios despegados de la raíz por trituración de la misma (Boiardi y Galar, 1988; Pueppke, 1984), por trituración de raíces previa incubación con rizobios marcados radiactivamente (Chen y Phillips, 1976). Además estas diferentes metodologías implican diferencias en la concentración del inóculo usado lo que complica aún más las comparaciones.

El objetivo del estudio desarrollado en esta parte del trabajo de Tesis fue determinar si había alguna influencia de la lectina exógena de semilla sobre el proceso de adsorción raíz-rizobio homólogo en el sistema *R.phaseoli-P. vulgaris* que es el menos estudiado entre los pares simbióticos de importancia económica.

## **5.2. MATERIALES Y METODOS**

### **5.2.1. Semillas y microorganismos:**

Idem 2.2.1. y 4.2.1. respectivamente

### **5.2.2. Lectinas:**

Las lectinas empleadas fueron aisladas y purificadas según se indica en 3.2.2.

### **5.2.3. Medio de incubación de bacterias y raíces:**

Medio de Jensen: (en g L<sup>-1</sup>): CaHPO<sub>4</sub>, 1,0; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,2; NaCl, 0,2; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2; FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O, 0,1; y 1 mL L<sup>-1</sup> de la siguiente solución de micronutrientes (en g L<sup>-1</sup>): H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 2,86; MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 1,538; CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 0,079; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,22; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O, 0,092 (Jensen, 1942).

### **5.2.4. Buffers:**

Buffer LBA (Lectin binding assay): Solución A (en g L<sup>-1</sup>): K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,61; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4,76. Solución B (en % P/V): MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 2,03; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 1,47; MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 1,98. Las soluciones A y B se esterilizan por separado durante 15 minutos y luego se mezcla 1 mL de A por cada L de B (Wong y Shantharam, 1984).

### **5.2.5. Germinación de semillas:**

Aproximadamente 50 semillas de poroto esterilizadas según se indica en 2.2.6. fueron pregerminadas entre papeles de filtro

humedecidos, en cajas de Petri estériles de 15 cm de diámetro. Las cajas fueron regadas diariamente con 5 mL de agua destilada estéril.

#### **5.2.6. Influencia de lectina exógena sobre la adsorción bacteria-raíz:**

Para estudiar la influencia de lectina exógena sobre la adsorción rizobio-raíz de planta huésped, se trabajó con dos concentraciones de lectina: 1 y 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (además del control sin lectina) y dos concentraciones de rizobios:  $10^4$  y  $10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$ .

Los rizobios provenientes de un PI (sección 4.2.3.) se hicieron crecer en un MP (sección 4.2.3.) en batch en las condiciones indicadas en 2.2.3. hasta fase exponencial media (aproximadamente 13 horas de proceso). Las semillas de poroto fueron esterilizadas en superficie y germinadas según se indica en 2.2.6. y 5.2.5. Al cabo de cuatro días de germinación para el cultivar Bat 76 y de cinco días para Alubia, se obtuvieron raíces secundarias de aproximadamente 2.5 cm de longitud que fueron utilizadas en el ensayo.

El experimento se llevó a cabo mediante dos técnicas diferentes. En ambos casos se trabajó en forma estéril en banco de flujo laminar. Las técnicas experimentales se describen a continuación.

#### **5.2.6.1. Técnica con preincubación raíces-lectina exógena:**

Las raíces secundarias de 2.5 cm de longitud fueron arrancadas cuidadosamente con pinza apoyándolas sobre papel de filtro húmedo para evitar que se secaran. Luego fueron incubadas en tubo de vidrio con la suspensión de lectina en PBS durante 60 minutos y a 30 °C.

A partir del cultivo de rizobios de aproximadamente 13 horas de proceso, se efectuó recuento de células en cámara de Petroff-Hausser (sección 2.2.5.) y diluciones seriadas en erlenmeyers de 250 mL conteniendo 100 mL de solución fisiológica estéril con 1% de Tween 80 para evitar la formación de grumos o agregados. La dilución que posteriormente se utilizaría para incubar las raíces, se llevó a cabo en medio de Jensen pH 6,3 (Pueppke, 1984) en lugar de solución fisiológica. De estas diluciones también se tomó muestra para efectuar el recuento inicial de unidades formadoras de colonias (ufc) mediante plaqueo por duplicado en medio agarizado (sección 4.2.3.).

Una vez concluída la preincubación de la suspensión de lectina con las raíces, éstas se secaron suavemente entre papeles de filtro estériles y se incubaron en el erlenmeyer de 250 mL conteniendo la suspensión de rizobios en medio de Jensen durante 60 minutos, a 30 °C y en agitador rotatorio a 100 rpm. Luego de extraer las raíces, se secaron entre papeles de filtro estériles y se lavaron en erlenmeyer de 1 L con 700 mL de agua destilada estéril, a 30 °C y 120 rpm durante 30 minutos. Al cabo de ese tiempo se hizo un



segundo lavado suave con 700 mL de agua destilada estéril agitando manualmente durante diez segundos. Finalmente las raíces se secaron entre papeles de filtro y se procesaron.

De acuerdo a resultados previos obtenidos en el CINDEFI (Boiardi y Galar, 1988), se eligieron 42 raíces al trabajar con suspensión de rizobios de  $10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$ , y 30 raíces en el caso de suspensión de  $10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$ . Las raíces elegidas se repartieron entre seis morteros de vidrio (siete raíces por mortero para  $10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$  y cinco para  $10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$ ) a los que se les agregó 0,1 mL de Tween al 0.1% en solución fisiológica. Las raíces fueron trituradas con los pilones hasta homogeneidad y se completó el volumen en el mortero a 5 mL con la solución de Tween al 0,1%. De cada mortero se tomaron 2 mL de homogenado para llevar a cabo el recuento de ufc en placa de Petri por duplicado. El plaqueo se efectuó con 1 mL de este homogenado, 1 mL de solución de estreptomicina 0,33% (P/V) y 10 mL de MM fundido (sección 4.2.3.). Las ufc se contaron luego de tres días de incubación a 30 °C.

#### **5.2.6.2. Técnica con preincubación rizobio-lectina exógena:**

Un volumen de 0,5 mL del caldo de rizobios de 13 horas de crecimiento (al que previamente se le efectuó recuento celular en cámara de Petroff-Hausser) se puso en contacto con 0,5 mL de

suspensión de lectina en PBS en un tubo eppendorf durante 30 minutos y a 30 °C. También se incubó 1 mL de suspensión de rizobios (control sin lectina), en las mismas condiciones para que estuviera sometido al mismo tratamiento. Una vez concluida la preincubación, los tubos eppendorf fueron centrifugados durante 20 segundos en microcentrífuga Eppendorf centrifuge 5414S; el sobrenadante fue descartado y el pellet fue lavado con buffer LBA. Se efectuó una segunda centrifugación y resuspensión y a partir de allí se efectuaron las diluciones en solución fisiológica. Al igual que en el experimento anterior, la dilución para incubación de raíces se efectuó en medio de Jensen. Las raíces fueron incubadas, lavadas y procesadas como se indica en 5.2.6.1.

### **5.3. RESULTADOS Y DISCUSION**

Se llevaron a cabo nueve experimentos de adsorción de rizobios a raíces del cultivar Alubia, con preincubación de las raíces a lectina exógena (véase sección 5.2.6.1.). En seis de ellos se obtuvo un aumento en el número de ufc por raíz en los tratamientos con lectina con respecto a los controles (con las dos concentraciones de lectina y las dos concentraciones de rizobios usadas). Si bien se dispone de un gran número de resultados, ya que cada experimento incluye 12 determinaciones de ufc para cada

tratamiento (seis puntos por duplicado), los valores absolutos difieren mucho y no son comparables entre sí. Aunque en la mayoría de los experimentos pareciera observarse una tendencia que indica estimulación de la adsorción bacteria-raíz en los tratamientos con lectina, no pueden sacarse conclusiones contundentes ya que en tres de los nueve experimentos el número de ufc por raíz fue menor en el tratamiento que en el control.

En el caso de *P. vulgaris* cv Bat 76, se llevaron a cabo experimentos independientes con las lectinas Bat-1 y Bat-2. En todos los experimentos realizados con lectina Bat-1 y en ocho de los nueve efectuados con lectina Bat-2, se observó un aumento en el número de ufc por raíz para los tratamientos con proteína con respecto a los controles (para las dos concentraciones de rizobios y las dos de lectina). Tal como se indica anteriormente para Alubia, los valores absolutos fueron muy diferentes. Es importante destacar que estos resultados deben ser considerados como indicativos de una tendencia solamente. Al efectuar análisis estadístico de los datos, se observó que no seguían una distribución normal ni pudo encontrarse una transformación apropiada que los normalizara. Por esta razón se aplicaron tests no paramétricos a cada variedad por separado (Randles, 1979). Se empleó el método de Kruskal-Wallis, que es un test de rangos, y no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ni entre las variedades.

Con la segunda técnica experimental, preincubación lectina exógena-rizobio, no se obtuvieron resultados que pudieran ser comparados. Los valores absolutos del número de ufc por raíz fueron muy diferentes entre los experimentos y ni siquiera pudo observarse una tendencia en el comportamiento de los mismos.

La segunda técnica se diseñó con la intención de disminuir la posibilidad de pegado inespecífico raíz-lectina. Algunas condiciones experimentales, escogidas como solución de compromiso entre ventajas y desventajas, tal vez puedan haber conducido al fracaso de estos experimentos. En un principio se comenzó trabajando con una dilución del caldo de cultivo ( $10^5$  células mL<sup>-1</sup>). Al efectuar la primera centrifugación luego de la preincubación, se observó que quedaba un pellet demasiado pequeño y que no era sencillo visualizar si se producía una correcta resuspensión al lavar. Por ese motivo, se decidió preincubar la lectina con la suspensión de rizobios sin diluir. La muestra se tomó en forma estéril directamente del medio proceso y no se llevó a cabo ningún lavado para eliminar los componentes del medio de cultivo por lo tanto no puede descartarse alguna interacción entre la lectina y algún componente del mismo. Se han citado (van der Schaal et al., 1983) interacciones entre lectina de arveja y extracto de levadura cristalizado en porta-objetos. Por otra parte, el uso de bacterias lavadas previamente al ensayo de adsorción también es bastante cuestionable si se considera que los determinantes de especificidad

y tal vez otros componentes involucrados en la adsorción se encuentran en la superficie del rizobio y podrían ser eliminados por el proceso de lavado.

La principal crítica que puedo hacerle a esta técnica y a otras que han sido empleadas por distintos autores para estudiar adsorción bacteria-raíz (Pueppke, 1984; entre otros) es que involucran centrifugaciones y lavados más o menos exhaustivos de las bacterias. Si la adsorción depende de sutiles interacciones en las que pueden estar involucradas exoestructuras del rizobio o productos de secreción del microorganismo, estas interacciones podrían resultar destruídas por las centrifugaciones. Si en lugar de incubar bacterias sin lavar, hubiese decidido llevar a cabo las centrifugaciones y lavados seguramente no habría incluido componentes del medio de cultivo pero tal vez habría alterado propiedades o componentes de la bacteria involucrados en la adsorción. Estudios de adsorción realizados por preincubación de *R. meliloti* en medio mineral (Wall, 1990) evidenciaron la participación de componentes estructurales frágiles de los rizobios (posiblemente flagelos y/o fimbrias) en ese proceso y su alteración por tratamientos de centrifugación y resuspensión de las bacterias aún en el mismo medio sobrenadante.

Se ha demostrado que la adsorción ocurre pocos minutos después de la inoculación (Chen y Phillips, 1976; Solheim, 1983). En las dos técnicas que emplee, el tiempo de incubación raíces-bacterias

fue de una hora con lo cual se minimizan fenómenos secundarios tales como proliferación bacteriana o pegado tardío a las bacterias conocido como fase II de la adsorción (ver capítulo 1; Dazzo et al, 1984). Comparando ambas técnicas utilizadas, la primera pareciera ser más apropiada para el estudio de la adsorción en este par simbiótico. Se fijaron cuidadosamente las condiciones experimentales como los estados fisiológicos de bacterias y plantas, los procedimientos de lavado, medios de cultivo e incubación, velocidad de agitación, etc. pero aún así no pudo obtenerse buena reproducibilidad, sobre todo en el caso del cultivar Alubia. Un factor que puede ser una de las causas de la alta variabilidad es que Alubia en realidad no puede ser considerado una variedad ya que los genotipos comerciales utilizados en este estudio han sido sometidos a cruza sin respetar la cantidad de ciclos de reproducción necesarios para obtener variedades definidas (homocigosis). Probablemente por esa razón, no siempre se pudo obtener la misma respuesta (ver capítulo 6).

Muchos han sido los métodos de estudio empleados por los distintos autores para estudiar adsorción y diversos autores han empleado el método basado en contar los microorganismos desorbidos de la raíz por trituración de la misma (Chen y Phillips, 1976; Pueppke, 1984; Boiardi y Galar, 1988). Se ha criticado este método de estudio (Caetano Anollés, 1985) porque al no conservarse las plántulas enteras pueden ocurrir artificios experimentales como el

posible efecto de exudados radiculares de heridas y/o exposición de tejidos internos de raíz sobre la adsorción y viabilidad bacterianas. Considero que esta crítica es válida pero debido a la complejidad del sistema radicular de *P. vulgaris* no pueden adaptarse con facilidad las técnicas aplicadas a raíces de otras leguminosas.

**CAPITULO 6**

**INFLUENCIA DE LA PREINCUBACION DE *R. phaseoli* CON LECTINA  
EXOGENA DE SEMILLA DE *P. vulgaris* SOBRE LA INFECTIVIDAD DEL  
MICROSIMBIONTE Y LA NODULACION DE LA LEGUMINOSA**



## 6.1. INTRODUCCION

En el proceso de asociación simbiótica entre rizobios y leguminosas ocurren una serie de etapas previas a la infección que incluyen el reconocimiento entre los simbioses, la colonización de la rizosfera por parte del microsimbionte y la adsorción del mismo a la superficie de la raíz de la planta huésped con la consiguiente deformación y posterior enrulamiento de los pelos radiculares jóvenes. Estos pasos constituyen la **preinfección** de la planta por parte del microorganismo. Posteriormente se produce la infección de la planta por formación de la estructura tubular llamada **hilo de infección** que transporta a los rizobios hacia las células corticales de la planta donde son liberados y se diferencian en **bacteroides**. Finalmente las células corticales son inducidas a dividirse y diferenciarse y ocurre la formación del **nódulo funcional** donde se producirá la fijación de nitrógeno atmosférico por parte de los bacteroides maduros.

El **enrulamiento** es la primera respuesta obvia del huésped a la presencia del rizobio y ya fue descrito por Ward en 1887 (citado por Bauer, 1981). Aún no se sabe con certeza cómo se altera la síntesis de las células normales de la pared para producir esas deformaciones características ni la función exacta de las mismas. Parece que el enrulamiento marcado es un síntoma de asociación compatible pero no un requerimiento para producirla. Luego del enrulamiento ocurre una ramificación o **deformación** de los pelos

radiculares cuyo significado biológico no está muy claro ya que las infecciones que conducen a nodulación ocurren tanto en pelos ramificados como en los no ramificados (Fahraeus, 1957; Nutman, 1959). Posteriormente se produce la formación del hilo de infección.

Una de las primeras demostraciones de la presencia de hilos de infección fueron los trabajos de Bieberdorf en 1932 en soja (citado por Ranga Rao y Keister, 1978). Yao y Vincent (1969) fueron los primeros en llevar a cabo un estudio detallado y comparativo de las deformaciones inducidas en pelos radiculares de trébol por rizobios homólogos y heterólogos. La formación de hilos de infección se ha estudiado detalladamente tanto en trébol como en soja y arveja pero pocos son los resultados de que se dispone en bibliografía para el caso de *P. vulgaris*.

En los capítulos 4 y 5 se analizaron algunos aspectos del proceso de preinfección y el rol de lectina exógena en los mismos. Si la lectina media en alguno de los procesos de preinfección, tal como adsorción a la superficie de la raíz, cabría esperar que esto se tradujese en algún efecto sobre la formación de nódulos activos. En este capítulo se estudiará la influencia de la incubación de *R. phaseoli* con lectina exógena de semilla, en los procesos de infección (medidos como formación de hilos de infección) y de nodulación. Se intentará dilucidar si alguna de las diferencias en

la aptitud simbiótica de los dos cultivares de *P. vulgaris* usados puede relacionarse con la diferente lectina de los mismos.

## **6.2. MATERIALES Y METODOS**

### **6.2.1. Semillas y lectinas:**

Idem 2.2.1. y 5.2.2. respectivamente.

### **6.2.2. Microorganismos:**

Además de la cepa de *Rhizobium phaseoli* F45 300 (ver 4.2.1.) se utilizó la cepa F48 300 mutante espontáneo resistente a 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de estreptomicina. La cepa salvaje F48 es procedente del Departamento de Microbiología del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Castelar, con esa denominación y aislada de poroto (*Phaseolus vulgaris* L.) en la localidad de Timbolar (Tucumán).

### **6.2.3. Medios de incubación, mantenimiento y de cultivo de cepas y plantas:**

Además de los indicados en 4.2.3. y 5.2.3. se utilizó también el siguiente medio exento de nutrientes nitrogenados:

Medio de Fahraeus (en g  $\text{L}^{-1}$ ):  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,114;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,12;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,15; citrato férrico, 0,005 y 1 mL  $\text{L}^{-1}$  de la solución de

micronutrientes indicada para el medio de Jensen (5.2.3.)

(Fahraeus, 1957).

#### **6.2.4. Cinética de crecimiento:**

A partir de un PI en fase estacionaria se sembraron dos MP y se incubaron a 29 °C y 200 rpm. De cada MP se tomaron muestras a distintos tiempos para determinar biomasa, por duplicado, mediante turbidimetría o recuento de células.

##### **6.2.4.1. Turbidimetría:**

La densidad óptica de las suspensiones bacterianas fue determinada usando un espectrofotómetro Pye Unicam. Para efectuar las diluciones se empleó agua destilada. El valor de biomasa se expresó en unidades de densidad óptica (UDO) que surge del producto de la DO leída por la dilución efectuada.

##### **6.2.4.2. Recuento de células:**

En cámara de Petroff-Hausser según se indica en 2.2.5.2.

#### **6.2.5. Influencia de la incubación de *R. phaseoli* con lectina exógena sobre la nodulación de *P. vulgaris*:**

Los estudios de influencia de lectina exógena sobre la nodulación se efectuaron con plantas de poroto crecidas en hidroponia en bolsitas (pouches) de plástico. Los pouches (de 16 x 16 cm) preparados en nuestro laboratorio, fueron esterilizados por microondas; en su interior se colocaron toallitas de papel absorbente recortadas a la medida y con una lengüeta superior plegada donde se efectuaron perforaciones a los fines de sostener la semilla. Estas toallitas de papel fueron previamente lavadas con PBS, enjuagadas con abundante agua destilada y esterilizadas en autoclave durante 15 minutos.

Las semillas de poroto de los dos cultivares usados fueron esterilizadas según 2.2.6. y pregerminadas como se indica en 5.2.5. Al cabo de dos días para el cv. Bat 76, y de tres días, para Alubia, las semillas pregerminadas fueron transferidas a los pouches de plástico que contenían 25 mL de solución de Fahraeus exenta de nitrógeno.

Rizobios cosechados a partir de un MP en fase exponencial (ver 2.2.3. y 4.2.3.) fueron incubados con suspensiones de lectina de 1 y 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  tal como se indica en 5.2.6.2. con la diferencia de que los 0,5 mL de caldo contenían  $2 \times 10^9$  células  $\text{mL}^{-1}$  por lo que previamente se hizo recuento de células totales en cámara de Petroff-Hausser y diluciones en SF. Luego de efectuadas las diluciones indicadas en esa sección, se inocularon semillas de

poroto. También se efectuaron diluciones apropiadas de rizobios que no habían sido incubados con la proteína (control sin lectina) y se utilizaron para inocular semillas. Además se incluyó un control de porotos sin inocular.

Cuando las semillas de poroto crecidas en hidroponia en los pouches presentaron raíces secundarias de alrededor de 1,5 cm de longitud, fueron inoculadas con 1 mL por planta de la suspensión de rizobios. La inoculación se llevó a cabo levantando la cara anterior de los pouches y bañando cuidadosamente con la suspensión cada una de las raíces secundarias y también la primaria.

Las plantas fueron colocadas en un sistema tipo invernáculo con un banco de luces (Sylvania GroLux) y sometidas a un fotoperíodo de 16 horas. Al no contar con una cámara de clima controlado, la temperatura fue mantenida constante a 24-27 °C. La humedad del invernáculo se mantuvo más o menos constante mediante evaporación de agua de bandejas colocadas en la parte inferior del sistema. La constancia fue verificada con un higrómetro. Las plantas fueron regadas diariamente con agua destilada estéril y cada cuatro días con solución de Fahraeus exenta de nitrógeno.

Diariamente se revisaron las plantas para determinar la cinética de aparición de nódulos y el porcentaje de plantas noduladas en función del tiempo. Al cabo de tres semanas se eliminó la parte aérea de las plantas y se determinó el número de nódulos por raíz mediante el uso de una lupa y contando todos los nódulos que aparecían en la zona preexistente al momento de la inoculación, de modo tal de evaluar los nódulos formados por células del

inóculo. En algunos experimentos se arrancaron cuidadosamente los nódulos de 25 plantas y se colocaron en pesafiltros en estufa a 105°C hasta peso constante. Se determinó, por lo tanto, el peso seco total de nódulos y el peso seco promedio de cada nódulo.

Se trabajó con 50 plantas por tratamiento (control sin inocular, control inoculado sin incubación con lectina y plantas inoculadas con rizobios previa incubación con las dos concentraciones de lectina elegidas). Los experimentos completos se realizaron en varias oportunidades con la cepa F45 300. Con la cepa F48 300 se llevaron a cabo cuatro experimentos independientes completos.

#### **6.2.6. Influencia de la incubación de *R. phaseoli* con lectina exógena sobre la formación de hilos de infección:**

Semillas de poroto fueron esterilizadas en superficie, germinadas en cajas de Petri, transferidas a pouches plásticos e inoculadas con  $10^7$  rizobios  $\text{mL}^{-1}$  previamente incubados con y sin la suspensión de lectina (según se indica en la sección anterior). También se incluyó control sin inocular. En algunos experimentos preliminares se utilizó suspensión de rizobios de  $10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$ . Al cabo del tiempo deseado, se arrancaron cuidadosamente las raíces, se sumergieron en solución 0,05% de azul de o-toluidina en PBS pH 7,2 durante 15 segundos. (Pueppke, 1983) y se secaron cuidadosamente entre papeles de filtro. Con un escalpelo obtuso se obtuvieron finas lonjas de raíces que se montaron sobre porta-

objetos de vidrio con PBS. Para estandarizar el procedimiento, siempre se cortaron 5 cm de raíces alrededor de la zona donde se había producido la inoculación y se obtuvieron entre 10 y 20 lonjas finas de toda la longitud de raíz elegida. Todas las lonjas de tejido fueron observadas al microscopio usando óptica de campo claro para localizar regiones apropiadas (cortes muy delgados sin superposiciones ni pelos destruidos) que luego se observaban con mayor aumento. Se determinó presencia de enrulamientos (curling), pelos deformados, pelos en cayado de pastor (shepherd's crook) e hilos de infección. En los casos en que se observaron hilos de infección, éstos fueron cuantificados en todos los preparados pertenecientes a cada raíz. Esta técnica se empleó tanto con la cepa F45 como con la F48 de *Rhizobium phaseoli*.

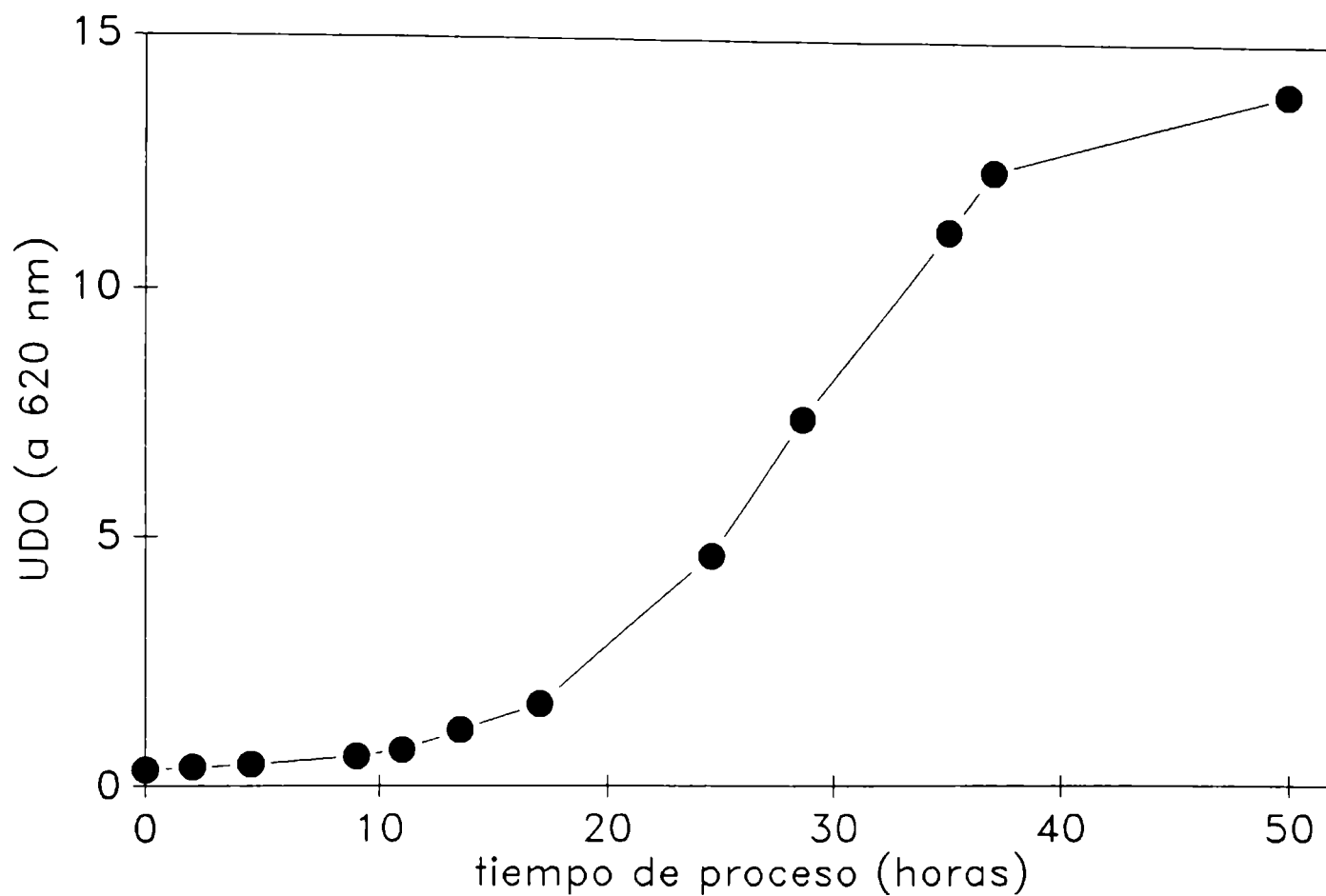
### **6.3. RESULTADOS**

#### **6.3.1. Cinética de crecimiento de la cepa F48 300 de *R. phaseoli*:**

Debido a razones que ya fueron adelantadas en la discusión del capítulo 4, y que se discuten más adelante, se comenzó a trabajar con la cepa F48 300 de *R. phaseoli*. Como no se conocía la velocidad específica de crecimiento de la cepa, se llevó a cabo una cinética de crecimiento en batch. El valor de biomasa (expresado en unidades de DO) en función del tiempo se muestra en la figura 6.1. De



acuerdo a esa gráfica, se trabajó con MP de *R. phaseoli* de 24 horas de crecimiento (fase exponencial media).



**Figura 6.1:** Curva de crecimiento para *R. phaseoli* F48 300.

Se llevó a cabo un proceso en batch con un medio de cultivo apropiado (sección 4.2.3.) incubado a 29 °C y 200 rpm. A distintos tiempos se tomaron muestras para determinar biomasa espectrofotométricamente. El valor de biomasa se expresó como unidades de densidad óptica (UDO) que es el producto de la DO leída a 620 nm y la dilución efectuada.

### **6.3.2. Resultados obtenidos con la cepa F45 300 de *R. phaseoli*:**

En principio se llevaron a cabo experimentos de influencia de la incubación de rizobios con lectina exógena sobre la nodulación y sobre la infectividad de los microorganismos (medida como el número de hilos de infección por raíz) con *R. phaseoli* F45 300. Se encontraron muchas dificultades en el transcurso de los ensayos de nodulación. En algunos casos las plantas presentaban un deficiente estado fitosanitario con marcada clorosis tanto en el control como en los distintos tratamientos. En otros casos las plantas no presentaron nódulos a los 21 días post-inoculación y las raíces inferiores se observaron secas lo cual llevó a pensar que algún stress hídrico en los primeros estadios había provocado la falta de nodulación.

Una vez optimizadas las condiciones, se obtuvo en algunos casos un número medio de nódulos por planta de entre 0,17 y 0,92 cuando resultados previos obtenidos en el CINDEFI con la misma cepa indicaban otros valores medios tales como 33,5 nódulos promedio por planta (Boiardi y Galar, 1988). En más de una oportunidad, la supervivencia de las plantas fue escasa y quedaban muy pocas muestras como para poder sacar conclusiones válidas. En todos los casos los nódulos fueron pequeños y blancuzcos.

En los experimentos preliminares de formación de hilos de infección llevados a cabo con la cepa F45 300 se tomaron muestras a las 3, 6 y 24 horas y a los 2, 4, 7 y 10 días post-inoculación con el fin de determinar la cinética de aparición de los mismos y

de evaluar la deformación y el enrulamiento de los pelos radiculares en función del tiempo.

A las 3 horas post-inoculación no pudo verse deformación ni enrulamiento de los pelos radiculares con ninguno de los dos cultivares. Se incluye como ejemplo la figura 6.2.

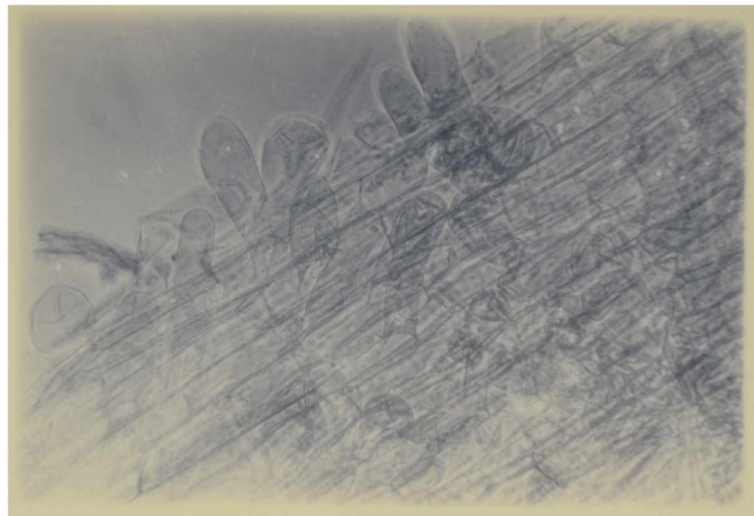


Figura 6.2: Pelos radiculares de *P. vulgaris* inoculados con *R. phaseoli*.

Preparado obtenido a las 3 h luego de la inoculación de *P. vulgaris* cv. Bat 76 con 1 mL de suspensión de *R. phaseoli* F45 300 ( $10^5$  cél. mL<sup>-1</sup>). La suspensión de rizobios (0,5 mL) fue previamente incubada durante 30 min con 0,5 mL de suspensión de lectina Bat-1 (1  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) en PBS según se indica en Materiales y Métodos. Aumento: 400x.

A las 6 horas post-inoculación recién comenzó a verse un poco de enrulamiento de los pelos jóvenes pero no se observó deformación de los mismos ni aparición de hilos de infección. Recién a las 24 horas luego de la inoculación se vió alto grado de enrulamiento y pelos deformados, tanto en el control sin lectina como en los tratamientos (figura 6.3.). El mismo aspecto se observó con las muestras obtenidas 48 horas después de la inoculación.



Figura 6.3: Enrulamiento en pelos radiculares de *P. vulgaris* inoculado con *R. phaseoli*.

Preparado obtenido a las 24 h luego de la inoculación de *P. vulgaris* cv. Alubia con 1 mL de suspensión de *R. phaseoli* F45 300 ( $10^5$  cél. mL<sup>-1</sup>) previamente incubada con suspensión en PBS de lectina de Alubia (1  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>). Aumento: 400x.

A las 72 horas se vió considerable enrulamiento tanto en los controles como en los tratamientos con los dos cultivares de *P. vulgaris*. En los preparados de cuatro días post-inoculación pudo verse un mayor enrulamiento pero no se observaron hilos de infección. El mismo comportamiento se obtuvo a los siete y diez días. En ningún caso se vió enrulamiento ni deformación en los controles sin inocular (figura 6.4.).



**Figura 6.4:** Pelos radiculares jóvenes de *P. vulgaris* sin inocular (control).

La figura corresponde al cv. Alubia. Aunque no se incluye foto, el aspecto obtenido con el cv. Bat 76 es semejante al aquí mostrado. Aumento: 400x.

En el CINDEFI, Boiardi y Galar (datos sin publicar) habían observado previamente la formación de hilos de infección con la cepa F45 300 a los 5-6 días post-inoculación. A pesar de que en el transcurso de este experimento se revisaron más de 200 preparados, nunca pudo verse un hilo de infección. Este resultado, sumado a los problemas que se presentaron durante los experimentos de nodulación llevaron a pensar que tal vez la cepa, que fue mantenida durante años por sucesivos pasajes en medio agarizado, presentase algún tipo de mutación. (La resolución de esta cuestión escapa a los alcances de la presente Tesis). Por esas razones, se decidió no continuar los estudios con la citada cepa y recomenzar el estudio con la F48 300.

### **6.3.3. Influencia de la incubación de rizobios con lectina exógena sobre la infectividad de los microorganismos:**

Los experimentos preliminares llevados a cabo con la cepa F48 300 de *R. phaseoli* indicaron que hasta el quinto o sexto día post-inoculación no se observaban hilos de infección. Por este motivo, se decidió tomar muestra a los nueve días luego de la inoculación.

En todos los casos se evaluó, además del número de hilos de infección por raíz, la presencia de enrulamiento y de deformación de los pelos radicales. A mayor número de hilos de infección por raíz menor era la deformación presente en los pelos. En el caso de plantas noduladas se hicieron cortes de las raíces incluyendo el

nódulo y se observaron hilos de infección persistentes dentro del mismo (figuras 6.5.; 6.6. y 6.7.).

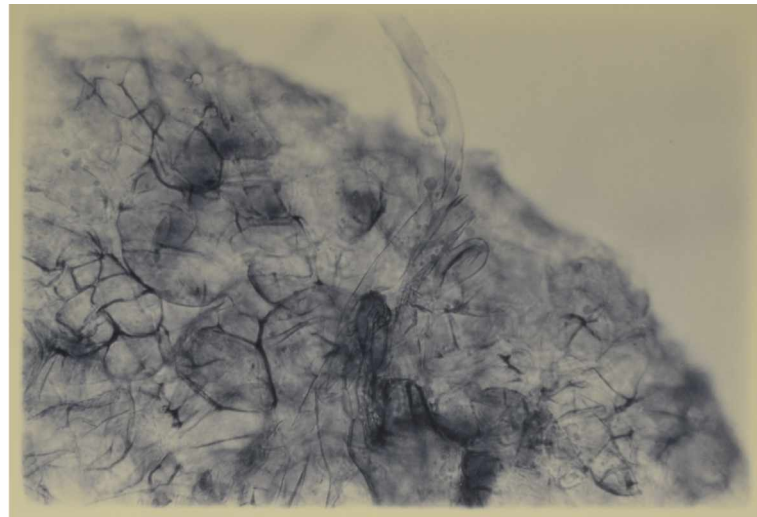


Figura 6.5: Hilo de infección localizado en nódulo de *P. vulgaris*. Raíces de poroto del cv. Bat 76 fueron inoculadas con  $10^7$  cél.  $\text{mL}^{-1}$  de *R. phaseoli* F48 300 previa incubación con  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  de lectina Bat-1. Aumento: 400x.



Figura 6.6: Detalle ampliado de la figura anterior. Aumento: 1000x.



**Figura 6.7:** Hilo de infección.

Hilo de infección ramificado localizado en nódulo de *P. vulgaris* cv. Bat 76. Inoculación con  $10^7$  cél.  $\text{mL}^{-1}$  de *R. phaseoli* F48 300 previa incubación con suspensión de lectina Bat-1 ( $10\mu\text{g mL}^{-1}$ ) en PBS. Aumento: 1000x.

Con frecuencia se observaron varios hilos de infección en cada pelo radicular (figuras 6.6.; 6.7.; 6.8.; 6.9.; 6.10.; 6.13. y 6.14.).

Algunos hilos aparecieron en pequeños pelos salidos como proyección de células epidérmicas. (figuras 6.8.; 6.9. y 6.10.).

Se observó que los hilos aparecían cerca de la punta del pelo radical y seguían su mismo patrón de enrulamiento (figuras 6.9.; 6.10. y 6.11.). Luego de emerger de los pelos radiculares, se



observaron hilos ramificándose en la corteza (figuras 6.8.; 6.13. y 6.14.). Los pelos radiculares de *P. vulgaris* cv. alubia y cv. Bat 76 no inoculados permanecieron rectos y no deformados a lo largo de todo el experimento (figura 6.4.).



Figura 6.8: Hilo de infección ramificado.

Preparado obtenido a partir de raíces de *P. vulgaris* cv. Bat 76 inoculado con *R. phaseoli* F48 300 previamente incubado con lectina Bat-1 ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) en PBS. Aumento: 1000x.



**Figura 6.9:** Hilo de infección.

Hilo de infección en *P. vulgaris* cv. Bat 76 inoculado con la cepa F48 300 de *R. phaseoli* incubado con 0,5 mL de suspensión de lectina Bat-2 en PBS ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Aumento: 1000x.



**Figura 6.10:** Hilo de infección.

Raíces de *P. vulgaris* cv. Bat 76 fueron inoculadas con *R. phaseoli* F48 300 previamente incubado con lectina Bat-1 ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Aumento: 1000x.



**Figura 6.11:** Hilo de infección.

Hilo de infección localizado en pelo radicular lateral de *P. vulgaris* cv. Bat 76 inoculado con rizobios que habían sido incubados con 0,5 mL de suspensión de lectina Bat-1 ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Aumento: 1000x.



**Figura 6.12:** Hilo de infección.

Hilo de infección en pelo radicular de *P. vulgaris* cv. Bat 76 inoculado con  $10^7$  rizobios  $\text{mL}^{-1}$  (cepa F48 300). Obsérvese el menor grado de desarrollo del hilo con respecto al de la figura 6.11. (preparados obtenidos al mismo tiempo).



**Figura 6.13:** Hilo de infección en pelo radicular de poroto.

Raíces del cv. Alubia fueron inoculadas con  $10^7$  rizobios  $\text{mL}^{-1}$  que habían sido previamente incubados con suspensión de lectina Alubia ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Aumento: 1000x.



**Figura 6.14:** Idem figura 6.13.



Figura 6.15: Idem figura 6.13.



Figura 6.16: Hilo de infección en pelo radicular de *P. vulgaris*. Raíces del cv. Alubia fueron inoculadas con  $10^7$  cél. mL<sup>-1</sup> de la cepa F48 300 de *R. phaseoli* (control sin lectina). Aumento: 1000x.

Con respecto a la cuantificación del número de hilos de infección por raíz, los resultados (tabla 6.I) muestran un marcado aumento de la infectividad de los rizobios incubados con suspensión de lectina exógena salvo para el caso del cv. Bat 76 inoculado con *R. phaseoli* incubado con  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  de lectina Bat-1. Salvo en el caso citado, los aumentos en la infectividad de los rizobios oscilan entre 44 y 226% con respecto al control.

**TABLA 6.I**

TRATAMIENTO	CULTIVAR ALUBIA		CULTIVAR BAT 76 (1)		CULTIVAR BAT 76 (2)	
	N° de hilos de infección/raíz	% de incremento del N° hilos/raíz frente al control	N° de hilos de infección/raíz	% de incremento del N° hilos/raíz frente al control	N° de hilos de infección/raíz	% de incremento del N° hilos/raíz frente al control
Control sin lectina	7.80 (0.3)	-	4.52 (2.1)	-	4.52 (2.1)	-
Lectina 1 µg mL <sup>-1</sup>	17.17 (3.2)	120	3.98 (0.3)	-12	6.50 (1.2)	44
Lectina 10 µg mL <sup>-1</sup>	17.27 (5.6)	121	14.77 (0.9)	226	13.58 (5.3)	200

**Tabla 6.I:** N° de hilos de infección en raíces de poroto inoculadas con *R. phaseoli* previamente incubados con lectina exógena de semilla de *P. vulgaris*.

En cada experimento se revisaron entre 8 y 12 cortes de los 5 cm de raíz alrededor de la zona de inoculación, usando entre 2 y 8 raíces por tratamiento. De allí se obtuvo un primer valor medio para cada tratamiento. Los valores indicados en la tabla son, a su vez, promedio de 3 experimentos independientes. Los valores indicados entre paréntesis corresponden a la desviación standard calculada a partir del promedio de los 3 experimentos independientes.

(1) la lectina empleada es la llamada Bat-1 (cap.3).

(2) la lectina empleada es la llamada Bat-2 (cap.3).

#### **6.3.4. Influencia de la incubación de *R. phaseoli* con lectina exógena sobre la nodulación:**

Con respecto a la cinética de nodulación, en todos los casos los nódulos comenzaron a aparecer entre los ocho y diez días post-inoculación. No hubo diferencia entre el control y los tratamientos ni entre los distintos cultivares. El porcentaje de plantas noduladas osciló entre 88 y 96. En los pesos secos de nódulos no se observaron diferencias notables entre los tratamientos ni entre los distintos cultivares usados.

El parámetro "número de nódulos por planta" se utilizó para efectuar las siguientes comparaciones para cada tipo de semilla:

i) Número de nódulos por planta en el control vs. el número en los tratamientos.

ii) Número de nódulos por planta obtenidos incubando los rizobios con suspensiones de lectina de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  y de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

iii) Para el caso del cv. Bat 76, efecto de incubación de rizobios con suspensiones de lectina Bat-1 y Bat-2 al nivel de concentración de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

iv) Para el caso del cv. Bat 76, efecto de incubación de rizobios con suspensiones de lectina Bat-1 y Bat-2 al nivel de concentración de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Se intentó llevar a cabo un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar estos contrastes pero no se pudo hacer dado que los datos no cumplen con los supuestos requeridos para dicho análisis ya que presentan marcada asimetría y heterogeneidad de varianzas. Se



intentó encontrar una transformación de los datos que satisficiera los supuestos para el ANOVA y por lo tanto, se probaron las siguientes funciones sobre los datos de cada uno de los ensayos:

- i) raíz cuadrada del número de nódulos por planta
- ii) raíz cúbica del número de nódulos por planta
- iii) log del número de nódulos por planta
- iv) log de (número de nódulos por planta) + 1
- v) raíz quinta de (número de nódulos por planta)<sup>2</sup>
- vi) arco seno del número de nódulos por planta
- vii) arco tangente del número de nódulos por planta
- viii) (número de nódulos por planta)<sup>-1</sup>

Las únicas transformaciones de datos que lograron pasar las pruebas de los supuestos del análisis de varianza fueron las correspondientes a la transformación raíz cuadrada en los ensayos número 4 del cv. alubia y número 4 de Bat 76 por lo cual fueron los únicos analizados por este método.

También se intentó realizar tests no paramétricos pero los datos ni siquiera cumplían con el supuesto de homogeneidad de distribuciones por lo que ello resultó imposible.

Ante la imposibilidad de efectuar tests en gran cantidad de ensayos se decidió realizar un análisis descriptivo de los mismos. Todos los resultados de estos análisis se incluyen en el Apéndice II.

La única regularidad que se observa es que para el cv. alubia en tres de los cuatro experimentos independientes llevados a cabo, el número de nódulos por planta fue menor en el control que en los

tratamientos. No pudo encontrarse ninguna regularidad para el cv. Bat 76.

Analizando los resultados que se muestran en el Apéndice II, pueden sacarse las siguientes conclusiones:

- En la mayoría de los casos las distribuciones son marcadamente asimétricas hacia la derecha.

- De la comparación de los boxplots se puede ver que las distribuciones correspondientes a distintos tratamientos son bastante diferentes, es decir que no sólo difieren en las medias, y ésto es lo que invalida la aplicación de técnicas no paramétricas.

1) De las tablas comparativas se visualiza que las medias de los distintos experimentos varían en rangos completamente diferentes (¿condiciones experimentales no mantenidas?).

2) Entre experimentos se presentan resultados contradictorios.

3) En los experimentos a los cuales pudo aplicarse el análisis de varianza puede concluirse que:

i) para el cv. alubia difieren significativamente las concentraciones 1 y 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

ii) en el cv. Bat 76 el tratamiento control presenta diferencias significativas con el promedio de los tratamientos con lectina en sus distintas concentraciones.

#### **6.4. DISCUSION**

Pocos son los resultados de que se dispone en bibliografía sobre enrulamiento, deformación y formación de hilos de infección

en *P. vulgaris*. La mayoría de los estudios fueron llevados a cabo en soja y trébol.

Según la clasificación de Yao y Vincent (1969), el enrulamiento marcado de los pelos radicales sólo se produce cuando la leguminosa es inoculada con su rizobio homólogo. Las otras dos categorías (enrulamiento moderado y ramificación) pueden ser inducidas por rizobios heterólogos (ver capítulo 1). Bhuvaneswari y Solheim (1985) en lugar de referirse a ramificaciones, usan el término más general de **pelos deformados** para indicar todo tipo de deformaciones incluyendo la ramificación. Coincido con esta apreciación ya que frecuentemente pueden verse deformaciones como pelos de dos ó tres puntas que no constituyen estrictamente una ramificación.

En soja se observa enrulamiento, pero no hilos de infección, a los cinco días post-inoculación (Ranga Rao y Keister, 1978). Shantharam y Wong (1982) encuentran hilos de infección a los dos días de inocular *P. lunatus* con su rizobio homólogo pero con *P. vulgaris* y *R. phaseoli* cepa 127K14 encuentran hilos de infección a los cinco días. En este estudio comencé a observar hilos de infección al quinto día post-inoculación y en términos generales, el número máximo se observó entre los siete y los diez días. Se hicieron experimentos comparativos (no se muestra) cuantificando el número de hilos de infección por raíz a los siete y a los catorce días y no se encontraron diferencias apreciables.

Se dice que las infecciones por *Rhizobium* ocurren más frecuentemente en pelos deformados aunque la deformación no es una

etapa requerida (Bhuvanewari y Solheim, 1985). En el caso que estudié, los preparados que presentaban menor número de deformaciones eran justamente los que mostraban mayor número de hilos de infección por raíz; lo que lleva a pensar que la mayor parte de las deformaciones que pudieran haber ocurrido en los primeros días (tal vez horas) post-inoculación evolucionaron hasta dar un hilo de infección.

De acuerdo a los resultados de la tabla 6.I puede observarse un efecto promotor de la formación de hilos de infección debido a la incubación de los rizobios con lectina exógena. Se ha citado la existencia de factores que causan deformaciones (Bhuvanewari y Solheim, 1985) y de factores promotores de enrulamiento y formación de hilos de infección (Abe et al., 1984; Higashi y Abe, 1980). Abe et al. (1984) encuentran aumento en el número de hilos de infección tratando las raíces de trébol con CPS y un fragmento oligosacarídico obtenido a partir del CPS. Higashi y Abe (1980) muestran el efecto promotor de una sustancia obtenida del espacio periplásmico de *R. trifolii* luego del shock osmótico. Obtienen, con esta sustancia, valores del porcentaje de incremento en el número de hilos mucho menores que los que aquí informo. Higashi y Abe especulan que ese factor podría tanto estimular el sistema sintético de formación del hilo de infección como también favorecer la adsorción a raíces. En mi caso, no puedo pensar que la lectina favorezca la formación de hilos mediante un aumento de la adsorción a raíces, ni siquiera mediante un aumento del pegado lectina-bacteria ya que ésto no ha podido ser probado con el par

simbiótico estudiado (capítulos 4 y 5). Aunque sí puede considerarse que tal vez la lectina induzca una respuesta fisiológica que estimule la formación del hilo de infección. El por qué este aumento en el número de hilos no se traduce en un aumento de nodulación resulta difícil de explicar. Si bien no se obtuvieron resultados estadísticamente analizables, sí pudo verse en la mayoría de los casos (ver Apéndice II) un aumento en el número de nódulos por planta de los tratamientos frente al control. Tal vez se debería rediseñar el experimento a fin de obtener resultados estadísticamente útiles que puedan explicar algunos efectos que eran observables a simple vista tales como el mejor estado fitosanitario de las plantas inoculadas con rizobios tratados con lectina frente al control y el mejor aspecto de los nódulos. Este último efecto pretendió cuantificarse mediante la determinación de los pesos secos de nódulos pero las diferencias observadas están dentro del error de pesada de la balanza analítica.

Por otra parte, en el ensayo de cuantificación del número de hilos de infección se usó un inóculo mayor que en el experimento de influencia de lectina sobre la nodulación ( $10^7$  células  $\text{mL}^{-1}$  en el primer caso frente a  $10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$  en el segundo). Es posible que el menor inóculo usado en el segundo caso no permita ver efectos que tal vez podrían observarse con un inóculo mayor. Se decidió emplear en los ensayos de nodulación el mismo tamaño de inóculo que en los experimentos a campo y en laboratorio descriptos en el capítulo 2 y en los estudios de influencia de lectina sobre la unión rizobio-bacteria y sobre la adsorción bacteria-raíz

descriptos en los capítulos 4 y 5. Considero que, si bien un mayor tamaño de inóculo me permitiría comparar con los resultados del número de hilos de infección por raíz, inóculos mayores se alejan cada vez más de los rangos fisiológicos de acción de los rizobios en el suelo. En los ensayos de determinación del número de hilos de infección por raíz se usó un tamaño de inóculo semejante al empleado por otros autores (Higashi y Abe, 1980) ante la dificultad de cuantificar resultados con inóculos menores.

La falta de correlación entre el aumento en el número de hilos de infección por raíz y la nodulación tal vez también podría explicarse por la presencia de varios hilos de infección dentro de los nódulos (figuras 6.8. y 6.9.). Es de esperar que estos hilos, ya localizados dentro de un nódulo, no den origen a otro nódulo por lo tanto, a pesar de aumentar el número de hilos de infección, no aumenta el número de nódulos por raíz.

Halverson y Stacey (1984) trabajaron con un mutante de *B. japonicum* lento para nodular, la cepa HS 111, y primero sugirieron (1984) y luego demostraron (1985; 1986) que el pegado de lectina a células de esa cepa aumentaba la velocidad de nodulación hasta igualarse a la de la cepa salvaje. Sugirieron que la velocidad de nodulación podía aumentarse induciendo el desarrollo de un receptor apropiado para el pegado a la planta o induciendo otra respuesta fisiológica que mejorara la iniciación de la nodulación. Estos mismos autores (1985) incuban  $2 \times 10^9$  rizobios mL<sup>-1</sup> y luego inoculan plantas con  $10^8$  células mL<sup>-1</sup>. Como se discute más arriba,

probablemente este mayor tamaño de inóculo les permita ver efectos difíciles de cuantificar con inóculos menores.

Los experimentos de nodulación que llevé a cabo siempre se realizaron en pouches. Halverson y Stacey (1986) encuentran que lectina de semilla de soja o exudado radicular de la misma planta no tienen efecto sobre las características de nodulación de la cepa salvaje cuando se mide por ensayo en pouches y sólo observan el efecto cuando trabajan en macetas con vermiculita. Estos autores encuentran que el tratamiento con lectina o exudado no afecta la adsorción del rizobio a la superficie de la raíz como así tampoco la capacidad de enrulamiento (coincide con lo informado en estos dos últimos capítulos para el par simbiótico *P. vulgaris* - *R. phaseoli*). También incuban células con lectina y con antibióticos que inhiben síntesis proteica y no observan efecto estimulador del pretratamiento por lo cual sugieren que la lectina induce en *B. japonicum* síntesis *de novo* de proteínas que son requeridas para la eficiente iniciación del proceso de nodulación.

Los resultados de este capítulo no demuestran ninguna diferencia entre los dos cultivares empleados.

En virtud de los resultados aquí expuestos y discutidos puede concluirse que la incubación con lectina promueve el aumento en el número de hilos de infección por raíz. Como esto no se traduce en un aumento en el número de nódulos por planta ni puede explicarse por un aumento en la adsorción de rizobios a las raíces (capítulo 5), se puede pensar que la acción de la lectina sea provocar un cambio fisiológico, tal vez en el sistema sintético del hilo de infección y no el actuar simplemente como "brazo de unión" entre rizobios y raíces.

**PARTE 5**



**CAPITULO 7**

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS E INFECTIVIDAD DE *R. phaseoli* CRECIDO  
EN CULTIVOS CONTINUOS BAJO DIFERENTES SUSTRATOS LIMITANTES**

## **7.1. INTRODUCCION**

### **7.1.1. ¿Por qué usar cultivos continuos para estudios fisiológicos? ¿Por qué emplear un medio sintético en lugar de uno complejo?**

Un quimiostato es un sistema de cultivo a volumen constante en el cual medio fresco entra al fermentador y caldo de cultivo con biomasa (y eventualmente productos) sale del mismo a la misma velocidad. Los principios del quimiostato (Pirt, 1975) indican que se alcanzará un estado estacionario auto-regulable en el cual la biomasa permanecerá constante.

En un sistema continuo, el crecimiento de los microorganismos puede ser prolongado indefinidamente proveyendo medio fresco a una velocidad suficiente para mantener constante la densidad de la población a una velocidad específica de crecimiento menor o igual al valor máximo. Con una población constante las velocidades específicas de utilización de sustrato también serán constantes. El crecimiento seguirá una cinética exponencial porque en el estado estacionario, la velocidad específica de crecimiento iguala a la velocidad de dilución que es una función exponencial (Pritchard y Tempest, 1982).

Cuando los organismos crecen en un medio complejo en un quimiostato, los cambios ambientales que llevan al cultivo a estado estacionario, no pueden conocerse precisamente; pero con un medio definido es sencillo elegir un nutriente en una concentración lo suficientemente baja como para limitar la densidad de la población.

cualquier compuesto o nutriente para el cual el organismo tenga un absoluto requerimiento para el crecimiento puede hacerse el nutriente limitante. En un cultivo en quimiostato, la concentración del sustrato limitante en el medio de alimentación determina la densidad de la población y la velocidad de suministro de ese sustrato determina la velocidad de crecimiento. En realidad no es la velocidad de dilución ( $D$ ) *per se* quien regula la velocidad de crecimiento sino la concentración del sustrato limitante en el flujo de medio, que varía con  $D$  (Pritchard y Tempest, 1982).

La mayoría de los estudios relacionados con fisiología de *Rhizobium* en el laboratorio se han concentrado en cultivos en batch donde las condiciones fisiológicas cambian permanentemente en función del tiempo de cultivo. En contraste el quimiostato ofrece la oportunidad de alcanzar una variedad de estados estacionarios y facilita la elucidación de las respuestas microbianas a las condiciones del medio ya que lo independiza del tiempo y los microorganismos se desarrollan en un ambiente constante. Además las células de diferentes "estados fisiológicos" (Malek, 1972), es decir, crecidas a distintas velocidades de dilución o con distintos sustratos limitantes en cultivos continuos constituyen un material estadísticamente mucho más homogéneo y más fácilmente reproducible que el tomado en diferentes etapas de un cultivo discontinuo clásico.

El medio ambiente del microsimbionte en suelos es claramente diferente de las condiciones de cultivo en laboratorio; por ejemplo, la disponibilidad de oxígeno y de fuente carbonada en el

ambiente rizosférico es distinta de la que existe en un clásico cultivo en medio rico. Los cultivos en quimiostato ofrecen la posibilidad de estudiar el comportamiento de los microorganismos en condiciones muy controladas, inclusive "imitando" con un medio sintético el ambiente natural del microorganismo. De esta forma se intenta conocer más acabadamente la fisiología de los rizobios en condiciones ambientales estrictamente controladas para luego extrapolar a condiciones naturales.

#### **7.1.2. Infectividad de los rizobios crecidos bajo distintas limitaciones de sustrato:**

Se ha observado que las condiciones bajo las cuales crecen los rizobios son de fundamental importancia en su aptitud para adherirse a las raíces de la leguminosa huésped (Smit et al., 1986, 1987, 1989, 1991; Kijne et al., 1988). En estos trabajos se informa que la limitación en nutrientes casi siempre coincide con una adhesión óptima. La limitación en C induce en *R leguminosarum* biovar *viciae*, un mecanismo de adhesión no específico de huésped que puede ser explicado por un proceso en dos etapas. En la primera etapa se produce una adhesión de la bacteria a la superficie de la raíz por medio de una adhesina  $Ca^{+2}$ -dependiente (rhicadhesina) presente en toda la familia *Rhizobiaceae*. En un segundo paso, la agregación de las bacterias a la punta del pelo radicular está mediada por fibrillas de celulosa (Smit et al., 1986, 1987). La limitación en  $Mn^{+2}$  involucra un mecanismo más complejo en el cual

tanto la rhibadhesina, como la lectina del huésped y las fibrillas de celulosa están involucradas. En estudios recientes, Smit et al. (1991) encuentran que la limitación por  $\text{Ca}^{+2}$  conduce a una adhesión pobre y que no puede recuperarse actividad de rhibadhesina de la superficie celular de los rizobios  $\text{Ca}^{+2}$ -limitados.

Si la adhesión de los rizobios a la superficie del pelo radicular, que es una etapa temprana de la preinfección, es altamente dependiente de las condiciones bajo las cuales han crecido estos rizobios; se podría pensar que los procesos de infección también podrían depender de las condiciones de crecimiento del microorganismo. Hay pocos estudios al respecto pero en el trabajo de Kijne et al. (1988) se encuentra que las diferencias en la adhesión de los rizobios  $\text{C}$  y  $\text{Mn}^{+2}$  limitados se correlacionan con la infectividad de los mismos.

El objetivo de esta parte del trabajo de Tesis fue intentar conocer algunos aspectos de la fisiología de *R. phaseoli* crecido en cultivos continuos bajo diferentes limitaciones de sustrato y evaluar la infectividad de esos rizobios.

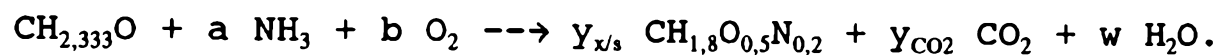
## **7.2. MATERIALES Y METODOS**

### **7.2.1. Microorganismos y medios de cultivo:**

Se empleó la cepa F48 de *Rhizobium phaseoli* (sección 6.2.2.) y el medio sintético de Götz con modificaciones (Götz et al., 1982). La composición de dicho medio es la siguiente (en g  $\text{L}^{-1}$ ):

Manitol, 10,0;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,13;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1,06;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,52;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,25;  $\text{CaCl}_2$ , 0,011;  $\text{NaCl}$ , 0,006;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , 0,002. Componentes minoritarios (en  $\mu\text{g L}^{-1}$ ):  $\text{FeSO}_4$ , 150; Riboflavina, 20; Acido p-aminobenzoico, 20; Piridoxina-HCl, 20; Tiamina-HCl, 20 y Biotina, 20.

Se hicieron cálculos aproximados de los coeficientes estequiométricos de la siguiente ecuación, considerando biomasa de composición standard, sin formación de producto, con una concentración de biomasa de  $1 \text{ g L}^{-1}$  y un rendimiento experimental en biomasa ( $Y_{x/s \text{ exp.}}$ ) igual al 60% del máximo teórico:



Con esos coeficientes aproximados se modificó el medio de Götz de modo tal de trabajar con las siguientes limitaciones:

- cultivo limitado en fuente de C sin agregado de  $\text{Mn}^{+2}$ .
- cultivo limitado en fuente de C con agregado de  $\text{Mn}^{+2}$ .
- cultivo limitado en fuente de N sin agregado de  $\text{Mn}^{+2}$ .
- cultivo limitado en fuente de N con agregado de  $\text{Mn}^{+2}$ .

El medio limitado en fuente de C resultó con la siguiente composición (en  $\text{g L}^{-1}$ ): Manitol, 2,00;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2,60;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,71;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,25. No se utilizó  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y el resto de los componentes se agregó en las cantidades indicadas más arriba. El medio limitado en fuente de N resultó con la siguiente composición (en  $\text{g L}^{-1}$ ): Manitol, 10,00;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,52. El resto de los componentes se agregó en las cantidades indicadas anteriormente. Los sustratos

limitantes se agregaron en cantidades tales como para producir 1 g L<sup>-1</sup> de biomasa. El resto de los componentes fueron calculados para que hubiera un exceso tal como para formar 5 g L<sup>-1</sup> de biomasa.

Los agregados de Mn<sup>+2</sup> se llevaron a cabo con 1 mL por L de medio de una solución 1 μM de MnSO<sub>4</sub>.

Para verificar que los medios sin agregado de Mn<sup>+2</sup> realmente carecían de este elemento y ni siquiera se encontraba como impureza de las drogas utilizadas, se llevó a cabo una destrucción de materia orgánica por digestión con HNO<sub>3</sub> sobre 100 mL de medio de Götz. Posteriormente se hizo la determinación de Mn<sup>+2</sup> por espectrofotometría de llama que detecta 0,002 ppm de Mn<sup>+2</sup>. La digestión con HNO<sub>3</sub> se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones de "Standard methods for the examination of water and waste water" (1985) 16 th. edition, American Public Health Association p.148.

#### **7.2.2. Esterilización:**

Los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave, dentro del biorreactor, durante 45 minutos. La solución stock de vitaminas, a excepción de la riboflavina que fue agregada directamente al medio, se esterilizó por filtración a través de membrana de 0,2 μ de tamaño de poro y se conservaron alícuotas congeladas. El medio sintético fue suplementado con 1 ml L<sup>-1</sup> de la solución stock estéril de vitaminas antes de la inoculación.

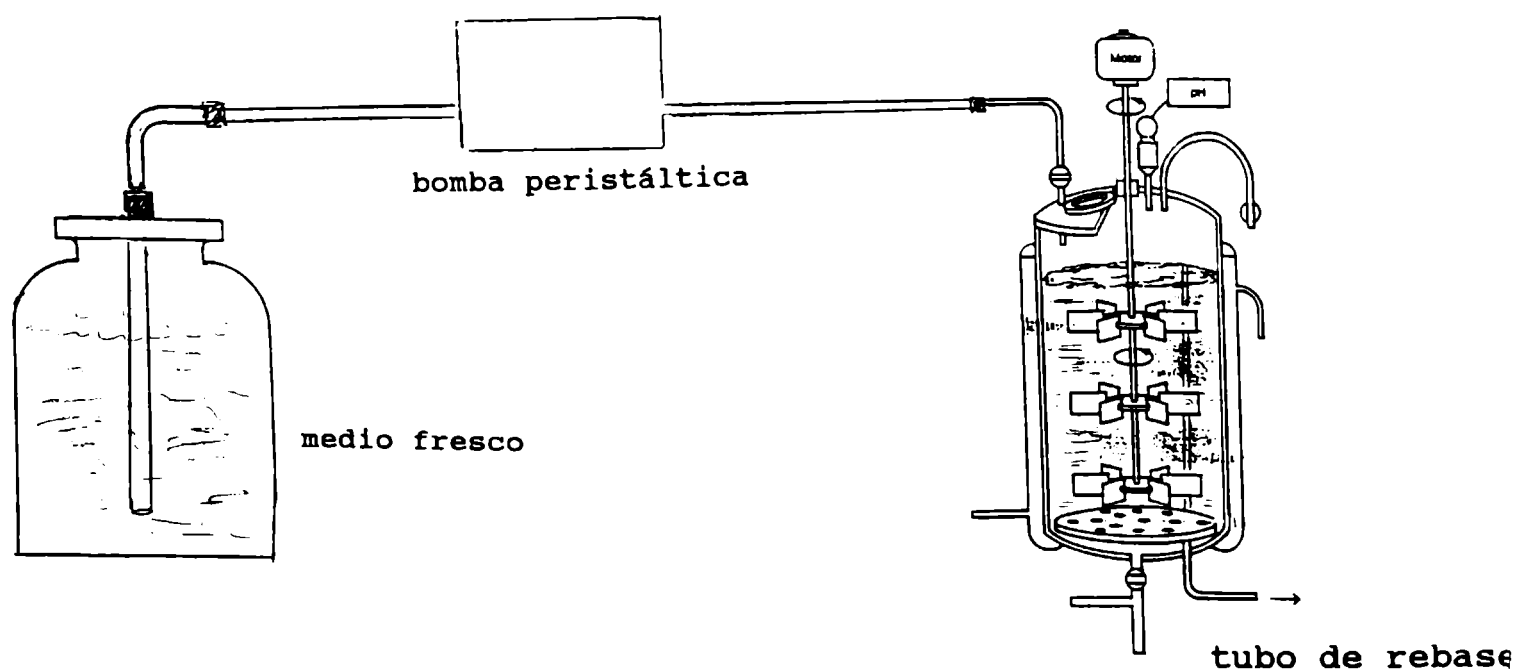
#### **7.2.3. Inóculos:**

Para la obtención de inóculos se partió de un cultivo en agar inclinado conservado en heladera (4 °C) crecido en medio sintético

de Götzt. Con 3 ansadas de este cultivo se sembraron 50 mL del mismo medio contenido en erlenmeyers de 250 mL. Los erlenmeyers sembrados se colocaron en agitador rotatorio a 200 rpm y 30 °C. El desarrollo obtenido se utilizó para la inoculación de los fermentadores.

#### 7.2.4. Cultivos continuos:

Los experimentos se llevaron a cabo en planta de fermentación LKB Bromma modelo 1001 Ultroferm y en algunos casos, en planta New Brunswick BioFlo modelo C 30. El agregado de medio de cultivo fresco al fermentador se efectuó mediante una bomba peristáltica y el vaciado de caldo del fermentador por un tubo de rebase de manera tal que el volumen dentro del biorreactor se mantuvo constante en el tiempo. El volumen de trabajo (V) fue de alrededor de 2,5 L en la planta LKB y de 0,4 L en la planta New Brunswick. La figura 7.1. muestra un esquema del equipo utilizado.





Los caldos usados para inocular el fermentador se prepararon como se indica en 7.2.3. Luego de la inoculación y una vez obtenido un buen crecimiento en batch se conectó el reservorio de medio de cultivo a los fines de comenzar el sistema de cultivo continuo. Se dejó que el cultivo llegara a estado estacionario. El establecimiento del mismo se verificó por constancia en el tiempo de los siguientes parámetros: recuento celular, UDO y porcentaje de  $O_2$  y  $CO_2$  en los gases de salida del fermentador. Como control de asepsia de los cultivos se efectuaron observaciones microscópicas directas de preparados, en contraste de fase.

Los cultivos continuos se llevaron a cabo a  $30\text{ }^\circ\text{C}$ , caudal de aire entre  $8$  y  $10\text{ L h}^{-1}$  en la planta LKB y entre  $11,5$  y  $16,5\text{ L h}^{-1}$  en la New Brunswick. La velocidad de agitación y el flujo de medio de cultivo fueron regulados de modo tal de tener una velocidad de dilución (D) de  $0,03\text{ h}^{-1}$ .

Una vez obtenido estado estacionario, se tomaron muestras con las cuales se determinó biomasa, consumo de sustrato y formación de producto según se indica más adelante. Estas medidas, junto con los porcentajes de  $O_2$  y  $CO_2$  a la salida del fermentador, el volumen de trabajo, el caudal de aire y el flujo de medio de cultivo fueron utilizados para calcular los parámetros cuya nomenclatura se detalla a continuación. Con los parámetros medidos y calculados se llevó a cabo un análisis de consistencia de los datos mediante balances de materia y energía (Erickson et al., 1978a,b). Se calcularon los coeficientes estequiométricos de la ecuación que describe el proceso fermentativo.

### 7.2.5. Nomenclatura:

$\bar{X}$ : concentración de biomasa en estado estacionario (g L<sup>-1</sup>).

$\bar{S}$ : concentración de sustrato limitante en estado estacionario (g L<sup>-1</sup>).

$\bar{P}$ : concentración de producto en estado estacionario (g L<sup>-1</sup>).

F: caudal de alimentación (L h<sup>-1</sup>).

V: volumen de cultivo en el fermentador (L).

$Y_{x/s}$ : rendimiento en biomasa (g biomasa g<sup>-1</sup> sustrato).

$Y_{p/s}$ : rendimiento en producto (g biomasa g<sup>-1</sup> sustrato).

$Y_{x/s}$ : C-moles de biomasa formada por cada C-mol de fuente de C y Energía.

$Y_{p/s}$ : C-moles de producto formado por cada C-mol de fuente de C y Energía.

$Y_{CO_2}$ : moles de CO<sub>2</sub> producido por cada C-mol de fuente de C y Energía.

$Y_{x/O_2}$ : C-moles de biomasa producida por mol de O<sub>2</sub> consumido.

$\nabla_x$ : fracción de C en la biomasa.

$\nabla_s$ : fracción de C en el sustrato.

$\nabla_p$ : fracción de C en el producto.

$\xi$ : fracción de energía del sustrato transferida al O<sub>2</sub>.

$\eta$ : fracción de energía del sustrato transferida a la biomasa.

$\xi_p$ : fracción de energía del sustrato transferida al producto.

$q_{CO_2}$ : velocidad específica de producción de CO<sub>2</sub> (mmol de CO<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>)

$q_{O_2}$ : velocidad específica de consumo de O<sub>2</sub> (mmol de O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>).

$q_s$ : velocidad específica de consumo de sustrato (g sustrato g biomasa<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>).

#### **7.2.6. Control de espuma:**

Se realizó por agregado de agente antiespumante en solución acuosa al 5% V/V. Las plantas de fermentación usadas vienen equipadas con un electrodo antiespuma por lo que el agregado de antiespumante fue automático.

#### **7.2.7. Medidas de concentración celular:**

Se efectuaron según se indica en 2.2.5.

#### **7.2.8. Medidas de pH:**

Se efectuaron mediante un peachímetro Metrohm Herisau E 369 B. El medio de Götz modificado carece de capacidad buffer por lo tanto el pH dentro del biorreactor se reguló con soluciones de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  y NaOH y se mantuvo durante el cultivo entre 6,8 y 7,1.

#### **7.2.9. Medida del consumo de manitol:**

Fue efectuada sobre los sobrenadantes de las suspensiones celulares centrifugadas a 6000 g durante 10 minutos empleando el método colorimétrico de Lambert y Neisch (1950).

#### **7.2.10. Medida de la formación de exopolisacárido (EPS):**

Se llevó a cabo por técnicas gravimétricas y colorimétricas. En el primer caso, el sobrenadante de las suspensiones celulares centrifugadas a 6000 g durante 10 minutos fue sometido a una centrifugación a 10.000 g durante media hora para eliminar cualquier posible resto de bacterias. Se tomaron 2 mL de este nuevo sobrenadante y se mezclaron con 6 mL de etanol. Luego de agitarlos vigorosamente se dejaron a 4 °C durante toda la noche. Al cabo de ese lapso de tiempo, las muestras se centrifugaron a 10.000 durante 10 minutos, el pellet se lavó con etanol y se centrifugó en las mismas condiciones. El pellet se resuspendió en agua y se colocó en pesafiltro tarado (por duplicado) en estufa de 105 °C hasta peso constante.

La técnica colorimétrica se llevó a cabo también con el sobrenadante de las suspensiones celulares. Se analizaron carbohidratos totales por el método de antrona (Herbert et al., 1971).

### 7.2.11. Determinación de peso seco de biomasa:

Muestras por duplicado de 10 mL cada una fueron centrifugadas a 6000 g durante 10 minutos en centrífuga refrigerada a 4 °C. Los pellets se lavaron dos veces y se resuspendieron en un pequeño volumen de agua destilada. Los resuspendidos se trasvasaron a pesafiltros tarados que se colocaron en estufa de 105 °C hasta peso constante.

### 7.2.12. Determinación del consumo de O<sub>2</sub> y de la producción de CO<sub>2</sub>:

El consumo de O<sub>2</sub> se calculó con la siguiente expresión (Cooney et al., 1977):

$$R_{O_2} = \frac{FN_2}{V} \left[ \frac{(pO_2)_1}{p - (pO_2)_1 - (pCO_2)_1} - \frac{(pO_2)_2}{p - (pO_2)_2 - (pCO_2)_2} \right]$$

$R_{O_2}$  : velocidad de consumo de O<sub>2</sub> (mmol O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>).

$FN_2$ : caudal de suministro de gas inerte (L h<sup>-1</sup>).

$p$ : presión total.

$V$ : volumen de cultivo.

$(pO_2)_1$ : presión parcial de O<sub>2</sub> en el gas que ingresa al fermentador.

$(pCO_2)_1$ : presión parcial de CO<sub>2</sub> en el gas que ingresa al fermentador.

$(pO_2)_2$ : presión parcial de O<sub>2</sub> en el gas que egresa del fermentador.

$(pCO_2)_2$ : presión parcial de  $CO_2$  en el gas que egresa del fermentador.

No se incluye en la expresión la presión de vapor de agua porque los gases de salida del biorreactor, antes de analizarlos, se hicieron pasar por un tren de secado con silicagel. Esto tiene por objeto eliminar interferencias por el efecto dilutorio de la humedad del gas sobre la concentración del resto de los gases a medir y además, evitar el daño de los analizadores.

La expresión de  $RO_2$  se simplifica si se tiene en cuenta la proporcionalidad directa entre la presión parcial y la fracción molar de un gas (ley de Henry) y si se considera que como el contenido de  $CO_2$  en el aire es sumamente bajo ( $X CO_2 = 3 \times 10^{-4}$ ), con lo cual la composición del aire que ingresa al biorreactor estará dada por:

$$(X O_2)_1 = 0,21$$

$$(X N_2)_1 = 0,79$$

$$(X CO_2)_1 = 0$$

Así la ecuación se reduce a:

$$RO_2 = - \frac{0,79 F1}{V} \left[ \frac{(X O_2)_2}{1 - (X O_2)_2 - (X CO_2)_2} - \frac{0,21}{0,79} \right]$$

Con una expresión similar se calcula la velocidad de producción de  $CO_2$ :

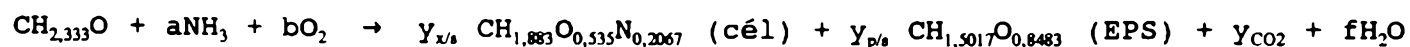
$$RCO_2 = \frac{0,79 F1}{V} \left[ \frac{(X CO_2)_2}{1 - (X O_2)_2 - (X CO_2)_2} \right]$$

La medida de O<sub>2</sub> en los gases de salida se efectuó con un analizador Beckman modelo OM-14 mientras que la de CO<sub>2</sub> con un analizador infrarrojo Horiba Pir-2000.

### 7.2.13. Balances de materia y energía:

La ecuación estequiométrica que se utilizó para los balances de materia fue la propuesta por De Hollander et al. (1979) quienes determinaron la composición celular bacteriana para *R. trifolii* por análisis elemental y para el cálculo de la fórmula de EPS usaron datos de Zevenhuizen (1971) referidos a la composición de monómeros de polisacáridos de diversos rizobios. Este procedimiento es válido teniendo en cuenta que la composición de EPS de los rizobios de crecimiento rápido es marcadamente constante (Bailey et al., 1971; Dudman, 1978).

La ecuación propuesta es la siguiente (para 1 C-mol de fuente de Carbono y Energía):



(1)

El balance de C fue establecido usando velocidades específicas de consumo de sustrato (manitol), consumo de O<sub>2</sub> y producción de CO<sub>2</sub>, parámetros calculados con los valores experimentales de acuerdo a las siguientes ecuaciones (Erickson et al., 1978)

$$Y_{x/s} = Y_{x/s} (\sigma_x / \sigma_s) \quad (\text{C-mol biomasa/C-mol sustr.})$$

$$Y_{p/s} = Y_{p/s} (\sigma_p / \sigma_s) \quad (\text{C-mol producto/C-mol sustr.})$$

$$Y_{\text{CO}_2} = (q_{\text{CO}_2} / q_s) 30,33 \cdot 10^{-3} \quad (\text{mol O}_2/\text{C-mol de sustrato})$$

donde:

$$q_{\text{CO}_2} = R_{\text{CO}_2} / \bar{X} \quad (\text{mmol de O}_2/ \text{L} \cdot \text{h})$$

$$q_s = D (S_R - \bar{S}) / \bar{X} \quad (\text{g sustrato/ g biomasa} \cdot \text{h})$$

(Ver Nomenclatura 7.2.5.)

Con respecto a los balances de energía, se calcularon los parámetros  $b$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  y  $\xi_p$  (ver Nomenclatura). El coeficiente  $b$  de la ecuación (1), número de moles de  $\text{O}_2$  consumido por C-mol de manitol se calculó mediante las siguientes fórmulas:

- como cociente de velocidades específicas

$$b = (q_{\text{O}_2} / q_s) \times 30,33 \cdot 10^{-3}$$

- por balance de grados de reducción

$$b = 1/4 [ \gamma_s - ( Y_{x/s} \gamma_x + Y_{p/s} \gamma_p ) ]$$



Los restantes parámetros se determinaron según las ecuaciones (Erickson et al., 1978):

$$\epsilon = 4b/\gamma_s$$

$$\eta = Y_{x/s} \gamma_x / \gamma_s$$

$$\xi = Y_{p/s} \gamma_p / \gamma_s$$

#### **7.2.14. Infectividad de *R. phaseoli* crecido bajo distintas limitaciones de sustrato:**

La infectividad de *R. phaseoli* en los distintos cultivos continuos se evaluó mediante la formación de hilos de infección. De cada cultivo continuo se tomó muestra, se efectuó recuento de células totales en cámara de Petroff-Hausser y se llevaron a cabo las diluciones apropiadas en SF a fin de contar con un inóculo de  $10^7$  rizobios  $\text{mL}^{-1}$ . Semillas de *P. vulgaris* de los cultivares Alubia y Bat-76 fueron pregerminadas en cajas de Petri, transferidas asépticamente a pouches de plástico e inoculadas con la suspensión de rizobios. Al cabo de 8 y 14 días se cuantificaron los hilos de infección según se indica en 6.2.6.

### **7.3 RESULTADOS Y DISCUSION**

#### **7.3.1. Evaluación de la infectividad de *R. phaseoli* crecido bajo distintas limitaciones de sustrato:**

Los resultados del número de hilos de infección por raíz obtenidos a los 8 y 14 días post-inoculación en cada condición de crecimiento se muestran en la tabla 7.I. Los valores obtenidos a los dos tiempos de muestreo fueron analizados estadísticamente mediante el test t y no se obtuvieron diferencias significativas entre ambos. Por lo tanto, el número de hilos de infección no parece aumentar entre los 8 y los 14 días post-inoculación.

**TABLA 7.I.**

**Número de hilos de infección por raíz**

Condición de crecimiento	Semillas de <i>P. vulgaris</i>			
	Alubia		Bat 76	
	1	2	1	2
1) Limitado en fte. de C sin Mn <sup>+2</sup>	1,0	4,5	1,0	0,9
2) Limitado en fte. de C con Mn <sup>+2</sup>	2,5	4,4	2,2	3,3
3) Limitado en fte. de N sin Mn <sup>+2</sup>	31,5	32,9	4,6	5,4
4) Limitado en fte. de N con Mn <sup>+2</sup>	16,0	27,2	7,5	7,3

*R. phaseoli* fue crecido en quimiostato hasta estado estacionario. La suspensión bacteriana fue diluída en SF hasta una concentración de 10<sup>7</sup> células mL<sup>-1</sup> y se usó para inocular raíces de *P. vulgaris* a razón de 1 mL de suspensión por raíz. Al cabo de 8 y 14 días las raíces fueron analizadas al microscopio y se evaluó el número de hilos de infección. Cada valor consignado es el promedio de, por lo menos, 5 raíces. De cada una de ellas, se revisaron todos los cortes correspondientes a los 5 cm alrededor de la zona de inoculación. La columna 1 corresponde a las muestras obtenidas a los 7 días post-inoculación en tanto que la columna 2 corresponde a las muestras obtenidas a los 14 días. Los valores obtenidos a los 8 días post-inoculación fueron analizados mediante un test t. Se obtuvieron diferencias altamente significativas (p = 0.01) al comparar los tratamientos 1 y 3 para el cv Alubia y los tratamientos 2 y 4 para ambos cultivares. Se obtuvieron diferencias significativas (p = 0.05) al comparar los tratamientos 1 y 3 para el cultivar Bat 76.

Se observa una muy marcada diferencia en el número de hilos de infección por raíz según se trate de cultivos C-limitados y N-limitados. El número de hilos de infección por raíz obtenido con rizobios C-limitados es aún menor que el que se obtenía inoculando los controles con rizobios crecidos en batch en un medio complejo (ver Tabla 6.I.).

La mayor infectividad de los rizobios N-limitados podría explicarse por la mayor producción de EPS en esas condiciones de crecimiento (ver próxima sección). Aunque el EPS no es esencial para la adsorción (Bauer, 1981) sí es cierto que la favorece. Se podría pensar que al favorecer esta etapa temprana de preinfección facilita o colabora en la infección. Aunque, tal como se indica en capítulos anteriores, no he podido encontrar una relación directa entre la adsorción y el aumento en el número de hilos de infección, las condiciones experimentales son en este caso, muy diferentes y no puede descartarse una correlación de ese tipo.

Ha sido previamente descrito que la síntesis de EPS en *R. meliloti* aumenta mucho si las células están limitadas en N, P o S en presencia de una apropiada fuente de C (Leigh et al., 1985). También se ha visto este efecto con *Pseudomonas* crecida en cultivo continuo bajo limitación de N y exceso de sustrato carbonado.

El efecto del agregado de  $Mn^{+2}$  es contradictorio. En el caso de los rizobios C-limitados, y considerando las muestras obtenidas a los ocho días post-inoculación, el agregado de  $Mn^{+2}$  pareciera producir un incremento de la infectividad para el caso del cultivar Bat 76 (diferencias significativas por test t) mientras que no se

observan diferencias significativas para el cultivar Alubia. En los rizobios crecidos bajo limitación de N, hay una disminución de la infectividad en el caso del cultivar Alubia (diferencias altamente significativas a los ocho días post-inoculación) pero no se observa ningún efecto significativo sobre el cultivar Bat 76. No he podido encontrar explicación satisfactoria alguna para este efecto.

Hay muy pocos trabajos acerca de la influencia de las limitaciones de nutrientes en los procesos de pre-infección e infección. Un interesante aporte lo constituyen los trabajos de Smit et al., (1986, 1987, 1989, 1991) y Kijne et al., (1988) con *R. leguminosarum* biovar *viciae*. Estos autores demuestran que la limitación de nutrientes coincide con una adhesión bacteriana óptima salvo en el caso de los cultivos  $Ca^{+2}$  limitados (Smit et al., 1991) y encontraron una correlación entre la adhesión y la infectividad de los rizobios. Kijne et al. (1988) observaron que los rizobios crecidos en limitación de  $Mn^{+2}$  producían un mayor número de hilos de infección en tanto que los rizobios provenientes de un medio limitado en C no inducían la formación de hilos de infección. En este último caso, la presencia prolongada de los rizobios en la rizosfera de arveja llevaba a la formación de hilos de infección. Estos resultados mostraban que el retraso en la formación del hilo de infección se correlacionaba con el atraso en el proceso de adhesión y las diferencias en la adhesión entre rizobios  $Mn^{+2}$  y C-limitados se relacionaba con diferencias en la infectividad. Los trabajos del grupo de Kijne postulan que la limitación en  $Mn^{+2}$  en presencia de exceso de fuente de C

aparentemente permite la síntesis y exposición de moléculas receptoras para lectina. Como se ha citado que los receptores microbianos para lectina se encuentran en varias fracciones de polisacáridos de superficie: EPS, CPS y LPS (Abe et al., 1984; Dazzo y Brill, 1979; Mort y Bauer, 1980, 1981; Planqué y Kijne, 1977 y Wolpert y Albersheim, 1976; entre otros) y bajo esas condiciones se producen cantidades mayores de polisacáridos, se podría explicar la mejor adhesión. De todas formas, estos autores no dan una explicación más detallada del rol del  $Mn^{+2}$ .

Si bien los resultados de bibliografía son comparables a los obtenidos en mi caso con los rizobios C-limitados con y sin  $Mn^{+2}$  (bajo número de hilos de infección), no pueden explicar la mayor infectividad obtenida en el caso de limitación por N, aunque, como se dijo anteriormente, podría estar relacionada con la mayor producción de EPS en esas condiciones.

### **7.3.2. Balances de materia y energía:**

Con los parámetros calculados en 7.2.12. y las ecuaciones presentadas en 7.2.13. se planteó el balance de C:

$$Y_{x/s} + Y_{p/s} + Y_{CO_2} = 1$$

para cada uno de los estados estacionarios obtenidos en los 4 cultivos limitados. Los valores medios obtenidos se indican en la tabla 7.II.

**TABLA 7.II.**

**Balance de Carbono en los cultivos en quimiostato bajo distintas limitaciones de sustrato**

Condición de crecimiento	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$	$Y_{CO_2}$	suma
limitado en C sin $Mn^{+2}$	0,31	0,005	0,80	1,115
limitado en C con $Mn^{+2}$	0,67	0,004	0,35	1,024
limitado en N sin $Mn^{+2}$	0,23*	0,01*	0,36*	0,60
limitado en N con $Mn^{+2}$	0,42	0,07	0,50	0,99

Los valores indicados con \* no satisfacen el balance de C ya que su suma da un valor menor que 1. Esto podría indicar:

- errores en las determinaciones experimentales del cultivo continuo o en la analítica llevada a cabo con las muestras;
- formación de algún producto no tenido en cuenta en el planteo de la ecuación de balance.

La primera causa de error no parece factible teniendo en cuenta que las determinaciones analíticas de todos los cultivos continuos se llevaron a cabo simultáneamente y, por lo menos, por triplicado. De

cometerse error, éste sería de tipo sistemático y cabría haber esperado cometer el mismo error en todos los cultivos continuos. Por las razones antes citadas, se piensa que es posible que se forme algún otro producto. Obviamente este producto sería de tipo extracelular ya que, caso contrario, sería determinado gravimétricamente junto con la biomasa. Según resultados de Neijssel y Tempest (1975, 1979) con *Klebsiella aerogenes* es común que en condiciones de limitación de N se produzcan fundamentalmente oxoglutarato y en menor proporción acetato y piruvato ya que se observa en esos cultivos sobreflujo de fuente de C. La explicación a este fenómeno está dada por la forma en que el amonio se metaboliza (Neijssel y Tempest, 1985). En las células C-limitadas, el amonio (presente en altas concentraciones) se incorpora vía glutamato deshidrogenasa. En las N-limitadas, el amonio se consume vía glutamina sintetasa y glutamato sintasa (Tempest et al., 1973). El glutamato formado es luego usado para la síntesis de los otros aminoácidos necesarios para la síntesis proteica. Un metabolismo aumentado de la fuente de carbono debe proveer una alta concentración de reactantes "clave" como ATP, NADPH y oxoglutarato para permitir a las enzimas reaccionar con niveles traza de amonio. Esto resulta en una acumulación y/o excreción de productos del metabolismo de la fuente de carbono, de alto peso molecular (como glucógeno intracelular o polisacárido extracelular) y la excreción de sustancias de bajo peso molecular para las cuales la membrana celular es permeable como acetato, piruvato y oxoglutarato.



Con respecto al balance de energía, tal como se indica en la sección 7.2.13., el coeficiente  $b$  (moles de  $O_2$  consumido/C-mol de sustrato) se calculó como cociente de velocidades específicas y por balance de grados de reducción. En el primer caso, el valor de "b" depende de las siguientes medidas experimentales: porcentaje de  $O_2$  en los gases de salida,  $F$ ,  $V$ ,  $[S_r]$  en estado estacionario y  $[S]$  en el medio de alimentación. Como la medida del porcentaje de  $O_2$  en los gases de salida tenía mucho error porque se leían valores pequeños, se prefirió el cálculo de "b" mediante la segunda fórmula que depende de las determinaciones de  $\bar{X}$ ,  $\bar{S}$  y  $\bar{P}$ . El procedimiento está justificado teniendo en cuenta que el análisis de consistencia daba valores confiables y esto permite estimar algún parámetro no medido o despejar una incógnita de una igualdad pre-establecida. Los restantes parámetros se calcularon como se indica en la sección 7.2.13. y se indican en la tabla 7.III.

**TABLA 7.III.**

**Balance de energía de los cultivos en quimiostato con distintos sustratos limitantes**

Condiciones de crecimiento	$\epsilon$	$\eta$	$\xi_p$	suma
limitado en C, sin $Mn^{+2}$	0,69	0,30	0,004	0,994
limitado en C, con $Mn^{+2}$	0,34	0,65	0,004	0,994
limitado en N, sin $Mn^{+2}$	0,77	0,22	0,008	0,998
limitado en N, con $Mn^{+2}$	0,52	0,41	0,060	0,990

Analizando esta tabla se observa que los valores más altos de  $\epsilon$  corresponden a los cultivos llevados a cabo sin agregado de  $Mn^{+2}$ . Siendo  $\epsilon$  la fracción de energía que va al  $O_2$ , estos resultados indican un desacople entre la respiración y la fosforilación oxidativa en ausencia de  $Mn^{+2}$ .

Con un balance de N se calculó el coeficiente "a" de la ecuación 1 y con balance de H, el coeficiente "f". Los coeficientes "a", "b" y "f" se indican en la tabla 7.IV.

**TABLA 7.IV.**

**Cálculo de coeficientes estequiométricos de los cultivos en  
quimiostato con diferentes sustratos limitantes**

Condición de cultivo	a	b	f
limitado en C, sin Mn <sup>+2</sup>	0,06	0,75	0,97
limitado en C, con Mn <sup>+2</sup>	0,14	0,38	0,74
limitado en N, sin Mn <sup>+2</sup>	0,045	0,83	1.07
limitado en N, con Mn <sup>+2</sup>	0,09	0,56	0,85

Resumiendo:

TABLA 7.V.

A	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$	$Y_{x/o}$	$Y_{CO_2}$	$q_s$	$q_{O_2}$	$q_{CO_2}$
1	0,31	0,005	0,413	0,80	0,10	2,10	2,80
2	0,67	0,004	1,763	0,35	0,05	0,60	0,57
3	0,23	0,01	0,277	0,36	0,15	1,94	1,77
4	0,42	0,07	0,750	0,50	0,08	1,57	1,50

Símbolos: A: condiciones de cultivo; 1: limitado en fuente de carbono, sin  $Mn^{+2}$ ; 2: limitado en fuente de carbono, con  $Mn^{+2}$ ; 3: limitado en fuente de nitrógeno, sin  $Mn^{+2}$ ; 4: limitado en fuente de nitrógeno, con  $Mn^{+2}$ .

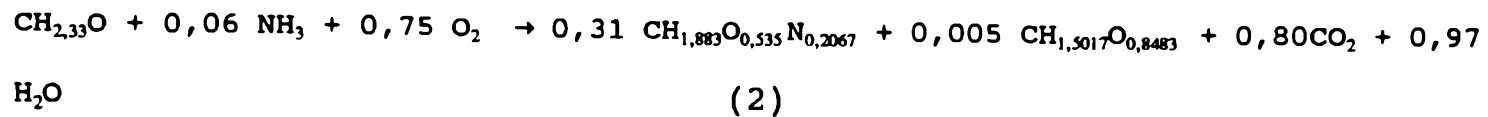
Analizando los valores de  $q_s$  de la tabla anterior se observa que, en el caso de ausencia de  $Mn^{+2}$ , hay un mayor consumo de sustrato además de una mayor fracción de energía que va al  $O_2$  (tabla 7.III). Esto estaría reforzando la idea de que la limitación de  $Mn^{+2}$  actúa como desacoplante. Además, al hacer la relación entre el  $Y_{x/o}$  de los cultivos con y sin  $Mn^{+2}$  se obtuvieron los siguientes valores: 4,2 para el caso del cultivo limitado en carbono, y 2,7 para el cultivo limitado en nitrógeno; lo que indica que la ausencia de  $Mn^{+2}$

hace perder entre aproximadamente 3 y 4 veces la eficiencia del uso del oxígeno. Ratcliffe et al. (1983) informaron valores de  $Y_{x/s}$  (g biomasa mol<sup>-1</sup> glucosa) y de  $Y_{x/o}$  (g biomasa mol<sup>-1</sup> O<sub>2</sub>) de 80,3 y 25,6 respectivamente para *R. leguminosarum* creciendo bajo limitación de glucosa. Estos autores informan que dichos valores son menores que los obtenidos con otras bacterias que tienen 2 ó 3 sitios de fosforilación y O<sub>2</sub> como aceptor electrónico final (Jones et al., 1977). En este trabajo de Tesis, los cultivos continuos en ausencia de Mn<sup>+2</sup> mostraron valores aún menores que los citados por Ratcliffe et al. (1983): 49,6 y 36,8 g biomasa mol<sup>-1</sup> manitol para el  $Y_{x/s}$  de los cultivos C y N-limitados respectivamente; y 11,0 y 7,38 g biomasa mol<sup>-1</sup> de O<sub>2</sub> para el  $Y_{x/o}$  de los mismos cultivos. Estos resultados también sugieren la expresión de un número menor de sitios de fosforilación cuando el Mn<sup>+2</sup> está ausente en el medio de cultivo.

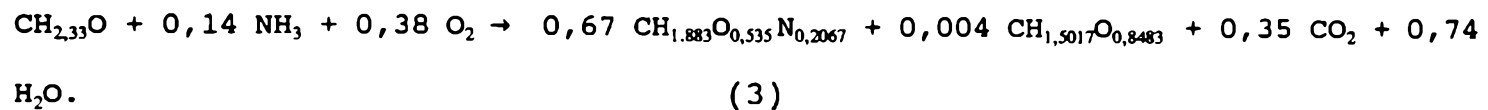
Es importante destacar que todos estos cultivos se llevaron a cabo en presencia de exceso de Mg<sup>+2</sup>. Habitualmente se encuentra en bibliografía que Mn<sup>+2</sup> y Mg<sup>+2</sup> son equivalentes entre sí en cuanto a su función como cofactores enzimáticos. Sin embargo, los resultados aquí mostrados indican un diferente comportamiento de *R. phaseoli* en presencia y ausencia de Mn<sup>+2</sup> por lo tanto el rol de este catión divalente no sería reemplazado por el Mg<sup>+2</sup> presente en exceso.

Con estos datos se plantearon las siguientes ecuaciones estequiométricas:

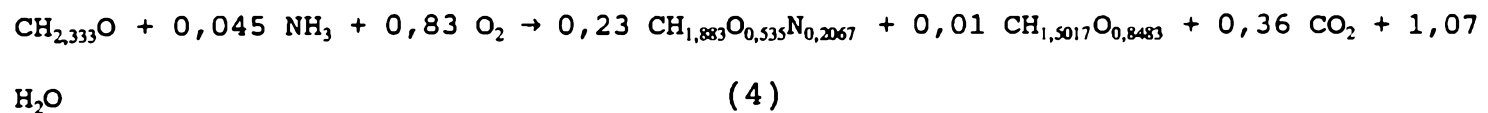
- Cultivo limitado en fuente de C, sin  $Mn^{+2}$ :



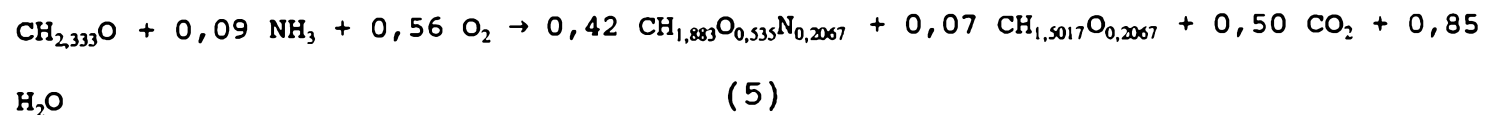
- Cultivo limitado en fuente de C, con  $Mn^{+2}$ :



- Cultivo limitado en fuente de N, sin  $Mn^{+2}$ :



- Cultivo limitado en fuente de N, con  $Mn^{+2}$ :



Es necesario recalcar que en el caso de la ecuación (4) el balance de C daba menor que 1, por lo tanto, es probable que se forme algún otro producto además de EPS; podría ser

fundamentalmente oxoglutarato y, en menor proporción, acetato y piruvato, de acuerdo a lo discutido previamente. Los principales productos del género *Rhizobium* lo constituyen el EPS y el PHB (poli- $\beta$ - hidroxibutirato) siendo éste último un producto intracelular (Vincent, 1974). Se ha citado la producción de otros metabolitos en condiciones especiales (Vincent, 1974). Recientemente se ha informado de la existencia de un "factor de movilidad" que se excreta al medio de cultivo, tanto en cultivos en batch como en continuos y que aún no ha sido identificado (Bauer, 1992). Los resultados aquí presentados abren la puerta al estudio de metabolitos aún no identificados que podrían producirse en distintas condiciones de crecimiento.

La observación hecha con *Klebsiella aerogenes* de que la producción de EPS sólo tiene lugar en cultivos con suficiente fuente de C (Neijssel y Tempest, 1976) no parece ser válida para *Rhizobium phaseoli*. Producción de EPS fue encontrada tanto en los medios limitados en C como en los limitados en N aunque claramente hay una mayor proporción de polisacárido en los cultivos no limitados en C. Resultados similares fueron informados por De Hollander et al. (1979) con cultivos en quimiostato de *R. trifolii*. En cultivos continuos de *Azotobacter vinelandii* se observó producción de EPS tanto en condiciones de limitación de C como de N y sólo la limitación de O<sub>2</sub> hacía descender su producción. Los resultados con cultivos continuos de *Pseudomonas* son conflictivos: mientras Mian et al. (1978) encuentran producción de EPS en cultivos N-limitados como en C-limitados, aunque en éstos últimos

en menor proporción; Williams y Wimpenny (1978) no observan formación del polisacárido bajo limitación de C.

Comparando las ecuaciones (2) con (3) y (4) con (5), se observa una mayor producción de biomasa al agregar  $1 \mu\text{M}$  de  $\text{MnSO}_4$ . Si definimos al sustrato limitante como aquel que está en defecto respecto de los requerimientos del microorganismo y determina la concentración final de biomasa o producto, se puede concluir que el  $\text{Mn}^{+2}$  también constituye un sustrato limitante del crecimiento por lo cual, los cultivos limitados en C y N, sin agregado de  $\text{Mn}^{+2}$ , constituyen en realidad cultivos con doble limitación de sustrato.

Varias conclusiones pueden extraerse de esta parte del trabajo de Tesis. Por un lado, se puede decir que el uso del sistema de cultivo continuo ha sido de suma utilidad. Se ha visto la influencia de los diferentes sustratos limitantes utilizados sobre la formación de biomasa y producto. Se ha determinado el rol del  $\text{Mn}^{+2}$  como un nutriente muy importante para *Rhizobium*. Asimismo se ha sugerido que la ausencia de este catión actuaría como desacoplante de la fosforilación oxidativa y el efecto no sería revertido por el  $\text{Mg}^{+2}$ , lo cual constituye un aporte totalmente novedoso.

Por otra parte, se ha podido correlacionar la infectividad de los rizobios con las distintas condiciones de crecimiento del microorganismo. Estos resultados demuestran la potencialidad del cultivo en quimiostato como herramienta de trabajo y abren la puerta a futuros estudios. El ambiente rizosférico donde el microorganismo se desarrolla es claramente diferente de las



clásicas condiciones de un cultivo en batch en el laboratorio. El uso del quimiostato permite la posibilidad de llevar a cabo estudios con medios sintéticos que "imiten" o reproduzcan las condiciones bajo las cuales el microorganismo debe proliferar e infectar la planta huésped. Inclusive puede estudiarse la respuesta del rizobio mediante agregados instantáneos o "pulsos" de sustancias tales como los exudados proteicos radiculares involucrados en el proceso de preinfección (Wall, 1990) u otras sustancias excretadas por la planta.

## **CONCLUSIONES GENERALES:**

En resumen, las conclusiones que se extraen de este trabajo de Tesis son las siguientes:

- 1.- En la evaluación del comportamiento simbiótico y ecológico de una cepa introducida de *R. phaseoli* se observa que a mayor supervivencia de la cepa introducida se obtiene una mayor proliferación de rizobios en la raíz y una concomitante mejor colonización de las raíces para los dos cultivares de *P. vulgaris*. La colonización más extensiva de las raíces, tanto a campo como en laboratorio, conduce a una mejor y más rápida nodulación. Contrariamente a lo indicado en bibliografía, Alubia mostró una mayor nodulación a campo que Bat 76.
- 2.- Con respecto a las lectinas aisladas y purificadas a partir de los dos cultivares de *P. vulgaris*, y en virtud de los resultados obtenidos en cromatografía de permeación por geles, inhibición de la hemaglutinación por N-acetil-D-galactosamina y ensayos electroforéticos, se concluye que Bat 76 y Alubia presentan diferente lectina.
- 4.- En el par simbiótico *R. phaseoli* - *P. vulgaris* existe una dependencia, en la capacidad de los rizobios de unirse a las lectinas, con la fase de crecimiento de un cultivo en batch de donde fueron obtenidos los microorganismos. No se observan marcadas diferencias según se trate de lectina del cultivar Bat 76 o Alubia.
- 5.- No se observa influencia de la preincubación de los rizobios

con lectina exógena de semilla sobre el proceso de adsorción de los microorganismos a las raíces de la planta huésped.

6.- No se observa un efecto claro de la preincubación de rizobios con lectina exógena de semilla y posterior inoculación, sobre el proceso de nodulación de poroto.

7.- Se concluye que el tratamiento de rizobios con lectina exógena de semilla aumenta la infectividad de los microorganismos (medida como aumento en el número de hilos de infección producidos). No se observan diferencias entre los dos cultivares usados.

8.- Trabajando en quimiostato con distintos sustratos limitantes, se determina que la infectividad de los rizobios (medida como aumento en el número de hilos de infección producidos) se correlaciona con las distintas condiciones de crecimiento del microorganismo.

9.- Se determinó el rol del  $Mn^{+2}$  como un nutriente muy importante para *Rhizobium*. Se sugiere que la ausencia de este catión actuaría como desacoplante de la fosforilación oxidativa. El efecto de la ausencia de  $Mn^{+2}$  como posible desacoplante no es revertido por la presencia de  $Mg^{+2}$ .

11.- Se determinó la influencia de diferentes sustratos limitantes sobre los procesos de formación de biomasa y producto y se determinaron las ecuaciones estequiométricas que corresponden a los cultivos continuos llevados a cabo.

APENDICE I

## APENDICE I

### ALGUNOS ASPECTOS TAXONOMICOS DE LA CEPA UTILIZADA:

A lo largo de este trabajo de Tesis me he referido a la cepa utilizada como *Rhizobium phaseoli*. Esta nomenclatura, que he usado por su sencillez, es en realidad antigua. Desde hace algunos años (Jordan, 1984) los rizobios que infectan arveja, trébol y poroto han sido incluidos en la especie *Rhizobium leguminosarum* que tiene tres biovars: *R. leguminosarum* biovar *viciae*, *R. leguminosarum* biovar *trifolii* y *R. leguminosarum* biovar *phaseoli*. Estos biovars tienen distintos plásmidos simbióticos cuyos genes codifican para una diferente especificidad de nodulación.

La investigación de rizobios que nodulan plantas de *P. vulgaris* ha revelado frecuentemente cepas con un comportamiento considerado atípico para *R. leguminosarum* (revisado por Martínez-Romero et al., 1991) y sin embargo todos estos organismos fueron clasificados dentro del biovar *phaseoli* dando como resultado un grupo muy heterogéneo. Esta heterogeneidad ha sido determinada usando diferentes criterios como patrón proteico, tipos serológicos, resistencia a antibióticos, comportamiento en electroforesis de multilocus enzimático, datos de hibridización de ADN, perfil de plásmidos y estructura de EPS.

En principio se distinguieron dos tipos de cepas entre los aislamientos obtenidos a partir de nódulos de poroto y se encontraron diferencias en sus plásmidos simbióticos (Martínez-

Romero et al., 1985; 1987; 1988). Las características fundamentales de cada tipo son:

Tipo I: copias múltiples de los genes de la nitrogenasa, nifH; estrecho rango de nodulación de huéspedes; hibridiza con el gen psi (inhibición de polisacáridos).

Tipo II: copia única de los genes nif, nodula *Leucaena* spp., no hibridiza con el gen psi; retiene el plásmido simbiótico aún después de incubación prolongada a 37 °C.

Posteriormente, se hicieron más estudios para definir la posición taxonómica y el parentesco genético de cepas del tipo II y se propuso que estas cepas fueran asignadas a la nueva especie *Rhizobium tropici* (Martínez-Romero et al., 1991).

Como complemento a este trabajo de Tesis, llevé a cabo dos ensayos clave para determinar si la cepa utilizada correspondía a *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* o si se trataba de *R. tropici*: ensayos de nodulación de *Leucaena* y determinación de genes nif.

## **Materiales y métodos**

### **- Ensayo de nodulación de *Leucaena*:**

Semillas de *Leucaena leucocephala* fueron esterilizadas en superficie por inmersión en  $\text{SO}_4\text{H}_2$  concentrado durante 10 minutos y posteriores seis lavados con agua destilada estéril. Las semillas fueron luego pregerminadas en cajas de Petri y transferidas a pouches plásticos tal como fue indicado para las semillas de poroto

en la sección 6.2.5. Posteriormente, las raíces fueron inoculadas con 1 mL de una suspensión de *R. phaseoli* F48 crecido en medio YEM. Las plantas fueron regadas con agua destilada estéril y observadas para determinar aparición de nódulos.

**- Determinación de genes nif:**

A partir de 1,5 mL de un cultivo de la cepa en medio TY (Meade et al., 1982) se llevó a cabo un miniprep de ADN genómico bacteriano (Meade et al., 1982). El ADN total fue digerido con la enzima BamHI, sometido a una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% y transferido a una membrana de nylon durante toda la noche. La prehibridización se llevó a cabo durante 3 horas a 45 °C (Quinto et al., 1982, con modificaciones). Posteriormente el ADN se hibridó con el plásmido CQ152 (sonda) conteniendo una secuencia interna de 300 pb del gen nifH de *R. leguminosarum* bv *phaseoli* CFN42 marcado con <sup>32</sup>P-dATP por nick translation (Maniatis et al., 1982). Luego de agregada la sonda, se incubó de 12 a 20 horas a 45 °C. Se llevaron a cabo dos lavados y se expuso a -70 °C durante 72 horas. Se obtuvieron fotografías con película Kodak X-Omat AR.

**Resultados**

Los ensayos de nodulación de *Leucaena* no mostraron la presencia de nódulos (ver fotografía).

La determinación de genes nif mostró la presencia de copias múltiples de los mismos (no se muestra).



Figura 1: *Leucaena leucocephala* crecida en pouches en hidroponia. Semillas pregerminadas de *L. leucocephala* fueron transferidas a pouches y sus raíces inoculadas con la cepa F48 de *R. phaseoli*. La fotografía corresponde a los 30 días post-inoculación.

### **Conclusión**

La cepa utilizada es *R. leguminosarum* biovar *phaseoli*.



Nota: Con posterioridad a la finalización de este trabajo de Tesis, el Subcomité Internacional de Taxonomía de *Rhizobium* y *Agrobacterium* reunido en Cancún con motivo del 9th. International Congress on Nitrogen Fixation (diciembre de 1992) estableció nuevas reglas de nomenclatura. Entre ellas:

- no se acepta el uso de los nombres *Sinorhizobium fredii* y *Sinorhizobium xinjiangensis*. Se acepta como correcto el nombre *Rhizobium fredii*.
- aún no se ha resuelto la aprobación de la especie *R. elkani*.
- se recomienda el nombre de *R. tropicii* para las antes llamadas cepas tipo II de *R. leguminosarum* biovar *phaseoli*.
- se recomienda el nombre de *R. etli* para las antes llamadas cepas tipo I de *R. leguminosarum* biovar *phaseoli*. Se notifica que no debe usarse el nombre *Rhizobium phaseoli* y que *R. leguminosarum* bv *phaseoli* es el nombre apropiado sólo para las cepas cuyo cromosoma es similar al de otros biovares de *R. leguminosarum*.

En virtud de estas nuevas recomendaciones, se debe tener en cuenta que la cepa a la que me he referido en este trabajo correspondería actualmente a la especie *R. etli*.

Los ensayos de nodulación de *Leucaena* fueron llevados a cabo en el Laboratorio BNF, Departamento de Agronomía y Suelos, Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez.

Los ensayos de determinación de genes *nif* fueron realizados por el Lic. Ramón González quien perteneciera hasta mayo de 1992, al Laboratorio de la Cátedra de Química Biológica I, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.

APENDICE II

## APENDICE II

Los resultados aquí presentados constituyen el análisis estadístico de los datos correspondientes a los ensayos de nodulación del capítulo 6.

La variable considerada para el análisis es el número de nódulos por planta encontrado para cada tratamiento y cada cultivar de *P. vulgaris*. En el capítulo 6 se discute la importancia de algunos de estos resultados. El resto de ellos se incluyen aquí a fin de permitir un análisis más profundo al lector interesado.

### I. Símbolos:

- A1: Tratamiento con lectina de alubia a la concentración de 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .
- A2: Tratamiento con lectina de alubia a la concentración de 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .
- AC: Tratamiento control sin lectina.
- B11: Tratamiento con lectina Bat-1 a la concentración de 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .
- B110: Tratamiento con lectina Bat-1 a la concentración de 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .
- B21: Tratamiento con lectina Bat-2 a la concentración de 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .
- B210: Tratamiento con lectina Bat-2 a la concentración de 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .
- BC: Tratamiento control sin lectina.

## II - ANALISIS DE VARIANZA

### II.1 - ENSAYO 4 DE ALUBIA

#### Tabla de Análisis de Varianza

Variable dependiente: Raiz cuadrada del nro. de nódulos

Fuente de Variación	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F	Pr > F
Modelo	2	148.669110	74.334555	11.91	0.0001
control vs lectinas	1	7.279074	7.279074	1.17	0.2825
concl vs conc2	1	143.103223	143.103226	22.93	0.0001
Error	115	717.8271723	6.2419754		
Total Corregido	117	866.4962827			

### II.2 - ENSAYO 4 DE BAT 76

#### Tabla de Analisis de Varianza

Variable Dependiente: Raiz cuadrada del nro. de nódulos

Fuente de Variación	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F	Pr > F
Modelo	4	46.8181752	11.7045438	3.15	0.0153
control vs lectinas	1	43.2190507	43.2190507	11.65	0.0008
concl vs concl0	1	0.8117143	0.8117143	0.22	0.6405
bat1 vs bat2 (concl)	1	1.2399085	1.2399085	0.33	0.5639
bat1 vs bat2 (concl0)	1	1.4013223	1.4013223	0.38	0.5395
Error	200	742.07091470	3.71035457		
Total Corregido	204	788.88908991			

### III - ANALISIS DESCRIPTIVO

#### ENSAYO 1 DE ALUBIA

##### \* Tratamiento A1: Medidas descriptivas

Nro Obs	41	Rango	94	100% Max	94
Media	25.73171	Suma	1055	75% Q3	40
Desvio St	28.07848	Variancia	788.4012	50% Med	15
Simetria	1.186663	Kurtosis	0.246206	25% Q1	5
Coef Var	109.1202	Error St	4.385122	0% Min	0
Q3-Q1	35	Moda	0		

Stem Leaf	#	Boxplot
8 0594	4	0
6 003	3	:
4 00014	5	+-----+
2 02279	5	: + :
0 000001122256888811445599	24	*-----*

-----+-----+-----+-----+-----  
 Multiply Stem.Leaf by 10\*\*+1

##### \* Tratamiento A2: Medidas descriptivas

Nro Obs	44	Rango	100	100% Max	100
Media	24.11364	Suma	1061	75% Q3	37
Desvio St	25.27359	Variancia	638.7542	50% Med	14
Simetria	1.284255	Kurtosis	0.927585	25% Q1	5.5
Coef Var	104.8104	Error St	3.810137	0% Min	0
Q3-Q1	31.5	Moda	0		

Stem Leaf	#	Boxplot
10 0	1	0
8		
6 07448	5	:
4 1469	4	:
2 133559	6	+-----+
0 0000034455566677891233556679	28	*-----*

-----+-----+-----+-----+-----  
 Multiply Stem.Leaf by 10\*\*+1

##### \* Tratamiento AC: Medidas descriptivas

Nro Obs	44	Rango	77	100% Max	77
Media	18.29545	Suma	805	75% Q3	27
Desvio St	18.60555	Variancia	346.1665	50% Med	14.5
Simetria	1.333896	Kurtosis	1.662428	25% Q1	2
Coef Var	101.6949	Error St	2.804892	0% Min	0
Q3-Q1	25	Moda	0		

Stem Leaf	#	Boxplot
6 77	2	0
4 01391	5	:
2 2340233	7	+-----+
0 000000000004689900033455667889	30	*---+---*

-----+-----+-----+-----+-----  
 Multiply Stem.Leaf by 10\*\*+1

ENSAYO 2 DE ALUBIA

\* Tratamiento A1: Medidas descriptivas

Nro Obs	45	Rango	85	100% Max	85
Media	27.6	Suma	1242	75% Q3	39
Desvio St	23.88647	Variancia	570.5636	50% Med	18
Simetria	1.111968	Kurtosis	0.348148	25% Q1	12
Coef Var	86.5452	Error St	3.560785	0% Min	0
Q3-Q1	27	Moda	0		

Stem Leaf	#	Boxplot
8 0125	4	0
6 38	2	:
4 02834	5	:
2 13457702359	11	+---+---
0 00034666770234445556788	23	*-----*

-----+-----+-----+-----+-----+  
 Multiply Stem.Leaf by 10\*\*+1

\* Tratamiento A2: Medidas descriptivas

Nro Obs	43	Rango	80	100% Max	80
Media	27.48837	Suma	1182	75% Q3	44
Desvio St	23.1047	Variancia	533.8272	50% Med	21
Simetria	0.642586	Kurtosis	-0.68921	25% Q1	8
Coef Var	84.05264	Error St	3.523434	0% Min	0
Q3-Q1	36	Moda	13		

Stem Leaf	#	Boxplot
8 0	1	:
6 4701	4	:
4 02468579	8	+-----+
2 01166790189	11	*---+---*
0 0001123357899333356	19	+-----+

-----+-----+-----+-----+-----+  
 Multiply Stem.Leaf by 10\*\*+1

\* Tratamiento AC: Medidas descriptivas

Nro Obs	45	Rango	80	100% Max	82
Media	24.28889	Suma	1093	75% Q3	35
Desvio St	20.85951	Variancia	435.1192	50% Med	18
Simetria	1.074899	Kurtosis	0.396974	25% Q1	8
Coef Var	85.88088	Error St	3.109552	0% Min	2
Q3-Q1	27	Moda	5		

Stem Leaf	#	Boxplot
8 2	1	0
6 053	3	:
4 0134677	7	:
2 234789135	9	+---+---
0 2223455556689001125556899	25	*-----*

-----+-----+-----+-----+-----+  
 Multiply Stem.Leaf by 10\*\*+1

ENSAYO 3 DE ALUBIA

\* Tratamiento A1: Medidas descriptivas

Nro Obs	36	Rango	131	100% Max	132
Media	41.13889	Suma	1481	75% Q3	65
Desvio St	32.67778	Variancia	1067.837	50% Med	27.5
Simetria	0.801003	Kurtosis	0.023518	25% Q1	16
Coef Var	79.43282	Error St	5.446297	0% Min	1
Q3-Q1	49	Moda	1		

Stem Leaf	#	Boxplot
12 2	1	
10 0	1	
8 339	3	
6 00038	5	+-----+
4 046788	6	+
2 112245690	9	*-----*
0 11458902668	11	+-----+

-----+-----+-----+-----+  
Multiply Stem.Leaf by 10\*\*+1

\* Tratamiento A10: Medidas descriptivas

Nro Obs	41	Rango	111	100% Max	111
Media	33.07317	Suma	1356	75% Q3	53
Desvio St	30.01865	Variancia	901.1195	50% Med	23
Simetria	0.908614	Kurtosis	-0.07353	25% Q1	8
Coef Var	90.76436	Error St	4.688126	0% Min	0
Q3-Q1	45	Moda	23		

Stem Leaf	#	Boxplot
10 01	2	
8 23	2	
6 5125	4	
4 53379	5	+-----+
2 113336600477	12	*---+---*
0 0112234457890256	16	+-----+

-----+-----+-----+-----+  
Multiply Stem.Leaf by 10\*\*+1

\* Tratamiento AC: Medidas descriptivas

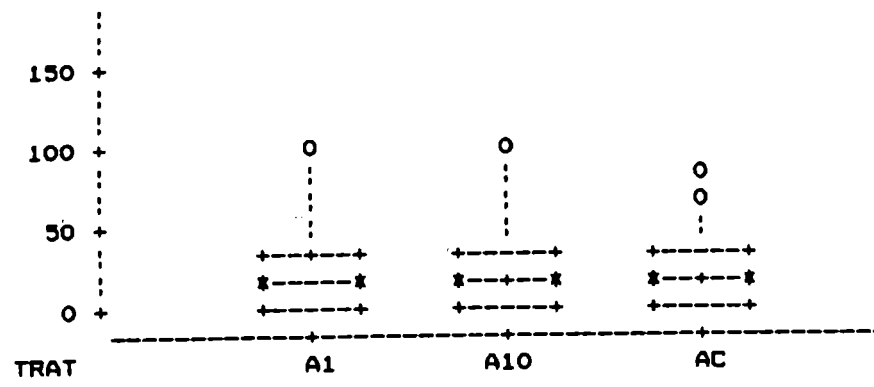
Nro Obs	39	Rango	102	100% Max	102
Media	27.17949	Suma	1060	75% Q3	44
Desvio St	27.40138	Variancia	750.8354	50% Med	17
Simetria	1.069797	Kurtosis	0.340812	25% Q1	4
Coef Var	100.8164	Error St	4.387732	0% Min	0
Q3-Q1	40	Moda	0		

Stem Leaf	#	Boxplot
10 2	1	
8 07	2	
6 90	2	
4 48456	5	+-----+
2 14334578	8	+
0 000013444456678234478	21	*-----*

-----+-----+-----+-----+  
Multiply Stem.Leaf by 10\*\*+1

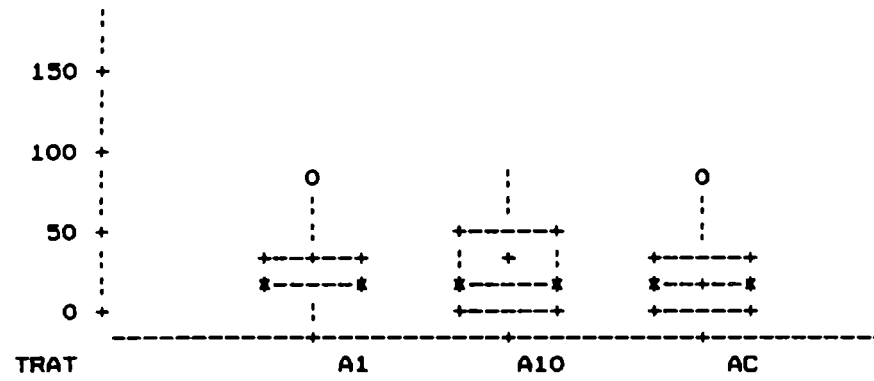
COMPARACION DE BOXPLOTS

ENSAYO 1 DE ALUBIA



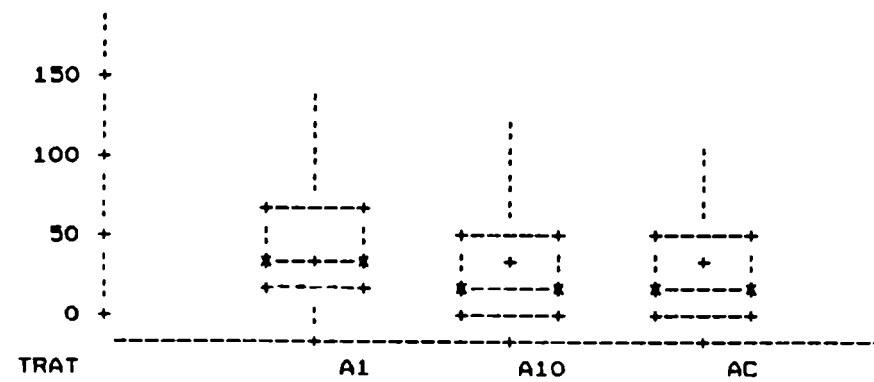
COMPARACION DE BOXPLOTS

ENSAYO 2 DE ALUBIA



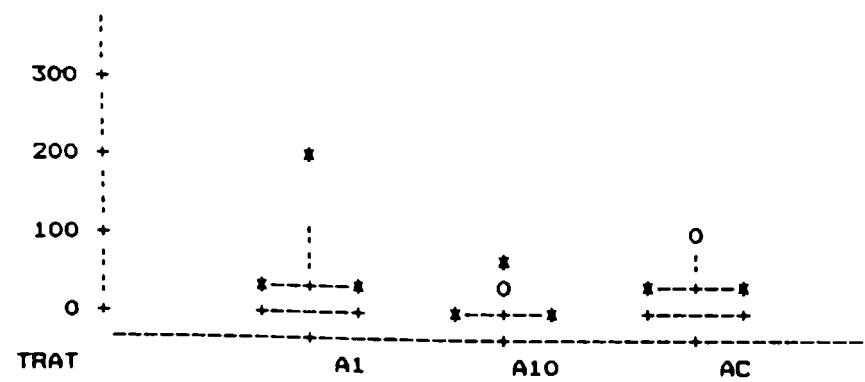
COMPARACION DE BOXPLOTS

ENSAYO 3 DE ALUBIA



COMPARACION DE BOXPLOTS

ENSAYO 4 DE ALUBIA





ENSAYO 4 DE ALUBIA

\* Tratamiento A1: Medidas descriptivas

Nro Obs	42	Rango	201	100% Max	202
Media	32.78571	Suma	1377	75% Q3	41
Desvio St	35.22993	Variancia	1241.148	50% Med	29.5
Simetria	2.911026	Kurtosis	12.35808	25% Q1	9
Coef Var	107.4551	Error St	5.436096	0% Min	1
Q3-Q1	32	Moda	1		

Stem Leaf	#	Boxplot
2 0	1	*
1		
1		
0 55567789	8	:
0 0000000011111222222333333344444	33	+---+---+
-----+-----+-----+-----+-----+-----		

Multiply Stem.Leaf by 10\*\*+2

\* Tratamiento A10: Medidas descriptivas

Nro Obs	38	Rango	55	100% Max	55
Media	9.315789	Suma	354	75% Q3	11
Desvio St	12.32248	Variancia	151.8435	50% Med	4.5
Simetria	1.962357	Kurtosis	4.303365	25% Q1	1
Coef Var	132.2752	Error St	1.99897	0% Min	0
Q3-Q1	10	Moda	0		

Stem Leaf	#	Boxplot
5 5	1	*
4		
3 8	1	0
2 13678	5	0
1 0011146	7	+-----+
0 000000001111112233456688	24	*---+---*
-----+-----+-----+-----+-----		

Multiply Stem.Leaf by 10\*\*+1

\* Tratamiento AC: Medidas descriptivas

Nro Obs	38	Rango	92	100% Max	92
Media	24.84211	Suma	944	75% Q3	38
Desvio St	23.58255	Variancia	556.1366	50% Med	18.5
Simetria	0.890076	Kurtosis	0.161694	25% Q1	6
Coef Var	94.92975	Error St	3.825594	0% Min	0
Q3-Q1	32	Moda	0		

Stem Leaf	#	Boxplot
8 2	1	0
6 49	2	:
4 900334	6	:
2 0378944688	10	+---+---+
0 0000024456666677347	19	*-----*
-----+-----+-----+-----		

Multiply Stem.Leaf by 10\*\*+1

ENSAYO 1 DE BAT 76

\* Tratamiento B11: Medidas descriptivas

Nro Obs	40	Rango	50	100% Max	53
Media	28.225	Suma	1129	75% Q3	40
Desvio St	13.89796	Variancia	193.1532	50% Med	31.5
Simetria	-0.099	Kurtosis	-0.96516	25% Q1	16
Coef Var	49.23988	Error St	2.19746	0% Min	3
Q3-Q1	24	Moda	32		

Stem Leaf	#	Boxplot
5 113	3	:
4 00012556	8	+-----+
3 1222334457	10	*-----*
2 244569	6	: + :
1 034456677	9	+-----+
0 3566	4	:

-----+-----+-----+  
 Multiply Stem.Leaf by 10\*\*+1

\* Tratamiento B110: Medidas descriptivas

Nro Obs	41	Rango	50	100% Max	50
Media	11.68293	Suma	479	75% Q3	14
Desvio St	12.16232	Variancia	147.922	50% Med	9
Simetria	1.580373	Kurtosis	2.384904	25% Q1	3
Coef Var	104.1033	Error St	1.899435	0% Min	0
Q3-Q1	11	Media	0		

Stem Leaf	#	Boxplot
5 0	1	*
4 5	1	0
3 17	2	0
2 0158	4	:
1 000001234468	12	+---+---+
0 000000012233455679999	21	*-----*

-----+-----+-----+  
 Multiply Stem.Leaf by 10\*\*+1

\* Tratamiento B21: Medidas descriptivas

Nro Obs	45	Rango	54	100% Max	54
Media	21.42222	Suma	964	75% Q3	31
Desvio St	13.73861	Variancia	188.7495	50% Med	21
Simetria	0.399384	Kurtosis	-0.49463	25% Q1	10
Coef Var	64.13253	Error St	2.048032	0% Min	0
Q3-Q1	21	Moda	22		

Stem Leaf	#	Boxplot
5 04	2	:
4 34	2	:
3 12555699	8	+-----+
2 012222557889	12	*---+---*
1 0234566678	10	+-----+
0 00125667899	11	:

-----+-----+-----+  
 Multiply Stem.Leaf by 10\*\*+1

\* Tratamiento B210: Medidas descriptivas

Nro Obs	44	Rango	39	100% Max	39
Media	15.70455	Suma	691	75% Q3	21.5
Desvio St	9.730268	Variancia	94.67812	50% Med	14
Simetria	0.503709	Kurtosis	-0.50432	25% Q1	8
Coef Var	61.95829	Error St	1.466893	0% Min	0
Q3-Q1	13.5	Moda	7		

Stem Leaf	#	Boxplot
3 1449	4	:
2 000112566789	12	+-----+
1 0012223555789	13	*---+---*
0 003356777888999	15	+-----+

-----+-----+-----+-----+  
 Multiply Stem.Leaf by 10\*\*+1

\* Tratamiento BC: Medidas descriptivas

Nro Obs	45	Rango	49	100% Max	49
Media	14.73333	Suma	663	75% Q3	19
Desvio St	12.79808	Variancia	163.7909	50% Med	14
Simetria	0.934785	Kurtosis	0.126133	25% Q1	4
Coef Var	86.86481	Error St	1.907825	0% Min	0
Q3-Q1	15	Moda	0		

Stem Leaf	#	Boxplot
4 019	3	0
3 1259	4	:
2 0789	4	:
1 023444455567789	15	+---+---+
0 0000022233445667889	19	+-----+

-----+-----+-----+-----+  
 Multiply Stem.Leaf by 10\*\*+1

ENSAYO 2 DE BAT 76

\* Tratamiento B11: Medidas descriptivas

Nro Obs	47	Rango	50	100% Max	50
Media	19.42553	Suma	913	75% Q3	25
Desvio St	12.51737	Variancia	156.6846	50% Med	20
Simetria	0.56098	Kurtosis	0.377055	25% Q1	11
Coef Var	64.43772	Error St	1.825846	0% Min	0
Q3-Q1	14	Moda	0		

Stem Leaf	#	Boxplot
5 00	2	0
4 8	1	0
3 002348	6	:
2 000011122244599	15	+-----+
1 133457777889	12	+---+---
0 00003445689	11	:

-----+-----+-----+-----+  
 Multiply Stem.Leaf by 10\*\*+1

\* Tratamiento B110: Medidas descriptivas

Nro Obs	42	Rango	53	100% Max	53
Media	16.83333	Suma	707	75% Q3	21
Desvio St	11.11781	Variancia	123.6057	50% Med	16
Simetria	0.989022	Kurtosis	1.602733	25% Q1	9
Coef Var	66.04639	Error St	1.715515	0% Min	0
Q3-Q1	12	Moda	14		

Stem Leaf	#	Boxplot
5 3	1	0
4		
3 23368	5	:
2 00012348	8	+-----+
1 00334444566667789	17	*---+---*
0 00034668889	11	+-----+

-----+-----+-----+-----+  
 Multiply Stem.Leaf by 10\*\*+1

\* Tratamiento B21: Medidas descriptivas

Nro Obs	44	Rango	72	100% Max	72
Media	21.84091	Suma	961	75% Q3	31.5
Desvio St	17.645	Variancia	311.3462	50% Med	18
Simetria	1.018356	Kurtosis	0.600342	25% Q1	9
Coef Var	80.78878	Error St	2.660085	0% Min	0
Q3-Q1	22.5	Moda	0		

Stem Leaf	#	Boxplot
6 42	2	0
4 3023	4	:
2 002223589125899	15	+---+---
0 00004556789900011356779	23	*-----*

-----+-----+-----+-----+  
 Multiply Stem.Leaf by 10\*\*+1

\* Tratamiento B210: Medidas descriptivas

Nro Obs	42	Rango	67	100% Max	67
Media	21.09524	Suma	886	75% Q3	33
Desvio St	16.32417	Variancia	266.4785	50% Med	16
Simetria	0.779991	Kurtosis	0.07744	25% Q1	9
Coef Var	77.3832	Error St	2.518874	0% Min	0
Q3-Q1	24	Moda	0		

Stem Leaf	#	Boxplot
6 7	1	
5 02	2	
4 09	2	
3 0022346668	10	+-----+
2 246	3	+
1 01244556678	11	*-----*
0 0002355577999	13	+-----+

-----+-----+-----+-----+-----+  
 Multiply Stem.Leaf by 10\*\*+1

\* Tratamiento BC: Medidas descriptivas

Nro Obs	47	Rango	89	100% Max	89
Media	25.04255	Suma	1177	75% Q3	34
Desvio St	19.07304	Variancia	363.7808	50% Med	21
Simetria	1.342748	Kurtosis	1.842301	25% Q1	11
Coef Var	76.16251	Error St	2.782088	0% Min	0
Q3-Q1	23	Moda	15		

Stem Leaf	#	Boxplot
8 9	1	0
6 37	2	
4 18369	5	
2 11234455668894579	17	+-----+
0 0245577999013455556788	22	+-----+

-----+-----+-----+-----+-----+  
 Multiply Stem.Leaf by 10\*\*+1

ENSAYO 3 DE BAT 76

\* Tratamiento B11: Medidas descriptivas

Nro Obs	29	Rango	98	100% Max	98
Media	39.86207	Suma	1156	75% Q3	48
Desvio St	22.70734	Variancia	515.6232	50% Med	39
Simetria	0.602405	Kurtosis	0.721768	25% Q1	25
CV	56.96477	Std Mean	4.216647	0% Min	0
Q3-Q1	23	Moda	25		

Stem Leaf	#	Boxplot
8 88	2	0
6 112	3	:
4 145568845	9	+---+---
2 5558012669	10	*-----*
0 03136	5	:

-----+-----+-----+-----+  
 Multiply Stem.Leaf by 10\*\*+1

\* Tratamiento B110: Medidas descriptivas

Nro Obs	34	Rango	89	100% Max	89
Media	29.23529	Suma	994	75% Q3	44
Desvio St	21.86745	Variancia	478.1854	50% Med	23
Simetria	0.620498	Kurtosis	0.069113	25% Q1	11
CV	74.79812	Std Mean	3.750237	0% Min	0
Q3-Q1	33	Moda	0		

Stem Leaf	#	Boxplot
8 9	1	:
6 07	2	:
4 00344456936	11	+-----+
2 0112460	7	*---+---*
0 0000200013789	13	+-----+

-----+-----+-----+-----+  
 Multiply Stem.Leaf by 10\*\*+1

\* Tratamiento B21: Medidas descriptivas

Nro Obs	37	Rango	111	100% Max	111
Media	37.37838	Suma	1383	75% Q3	53
Desvio St	24.28117	Variancia	589.5751	50% Med	34
Simetria	1.187506	Kurtosis	1.957834	25% Q1	24
CV	64.96046	Std Mean	3.991799	0% Min	0
Q3-Q1	29	Moda	36		

Stem Leaf	#	Boxplot
10 21	2	0
8		
6 0448	4	:
4 133399	6	+-----+
2 14455890344556667	17	*---+---*
0 04533469	8	:

-----+-----+-----+-----+  
 Multiply Stem.Leaf by 10\*\*+1

\* Tratamiento B210: Medidas descriptivas

Nro Obs	35	Rango	85	100% Max	85
Media	34.02857	Suma	1191	75% Q3	52
Desvio St	22.04339	Variancia	485.9109	50% Med	34
Simetria	0.328775	Kurtosis	-0.46278	25% Q1	14
CV	64.77906	Std Mean	3.726013	0% Min	0
Q3-Q1	38	Moda	0		

Stem Leaf	#	Boxplot
8 5	1	
6 0028	4	
4 02502559	8	+-----+
2 056901245566	12	*---+---*
0 0036890049	10	+-----+

-----+-----+-----+-----+  
 Multiply Stem.Leaf by 10\*\*+1

\* Tratamiento BC: Medidas descriptivas

Nro Obs	32	Rango	65	100% Max	65
Media	23.78125	Suma	761	75% Q3	38.5
Desvio St	18.40711	Variancia	338.8216	50% Med	22.5
Simetria	0.402551	Kurtosis	-0.77533	25% Q1	8.5
CV	77.40176	Std Mean	3.253947	0% Min	0
Q3-Q1	30	Moda	0		

Stem Leaf	#	Boxplot
6 5	1	
5 44	2	
4 00058	5	
3 3567	4	+-----+
2 14456	5	*---+---*
1 0115688	7	
0 00002337	8	+-----+

-----+-----+-----+-----+  
 Multiply Stem.Leaf by 10\*\*+1

ENSAYO 4 DE BAT 76

\* Tratamiento B11: Medidas descriptivas

Nro Obs	42	Rango	66	100% Max	66
Media	24.14286	Suma	1014	75% Q3	38
Desvio St	17.22388	Variancia	296.662	50% Med	23
Simetria	0.580036	Kurtosis	-0.47514	25% Q1	9
Coef Var	71.34151	Error St	2.657702	0% Min	0
Q3-Q1	29	Moda	4		

Stem Leaf	#	Boxplot
6 16	2	:
5 3	1	:
4 144667	6	:
3 0489	4	+-----+
2 1156667899	10	*---+---*
1 226789	6	:  :
0 0344456677999	13	+-----+

-----+-----+-----+-----+  
 Multiply Stem.Leaf by 10\*\*+1

\* Tratamiento B110: Medidas descriptivas

Nro Obs	40	Rango	58	100% Max	58
Media	20.525	Suma	821	75% Q3	27.5
Desvio St	15.49026	Variancia	239.9481	50% Med	17
Simetria	0.882382	Kurtosis	0.093229	25% Q1	8
Coef Var	75.47019	Error St	2.449225	0% Min	0
Q3-Q1	19.5	Moda	6		

Stem Leaf	#	Boxplot
5 0338	4	0
4 6	1	:
3 2347	4	:
2 01166778	8	+---+---+
1 04455666889	11	*-----*
0 003345666799	12	+-----+

-----+-----+-----+-----+  
 Multiply Stem.Leaf by 10\*\*+1

\* Tratamiento B21: Medidas descriptivas

Nro Obs	42	Rango	67	100% Max	67
Media	21.95238	Suma	922	75% Q3	31
Desvio St	17.11931	Variancia	293.0708	50% Med	18.5
Simetria	0.953396	Kurtosis	0.133588	25% Q1	9
Coef Var	77.98385	Error St	2.641567	0% Min	0
Q3-Q1	22	Moda	12		

Stem Leaf	#	Boxplot
6 7	1	0
5 148	3	:
4 888	3	:
3 1336	4	+-----+
2 0135579	7	:  +  :
1 122246678999	12	*-----*
0 013345667799	12	+-----+

-----+-----+-----+-----+  
 Multiply Stem.Leaf by 10\*\*+1



\* Tratamiento B210: Medidas descriptivas

Nro Obs	42	Rango	76	100% Max	76
Media	22.61905	Suma	950	75% Q3	28
Desvio St	16.63519	Variancia	276.7294	50% Med	18.5
Simetria	1.238457	Kurtosis	1.728518	25% Q1	11
Coef Var	73.54503	Error St	2.566865	0% Min	0
Q3-Q1	17	Moda	23		

Stem Leaf	#	Boxplot
6 6	1	0
4 88049	5	0
2 03333678888013	14	+---+---+
0 0222477880145557778889	22	*-----*

-----+-----+-----+-----+-----+  
 Multiply Stem.Leaf by 10\*\*+1

\* Tratamiento BC: Medidas descriptivas

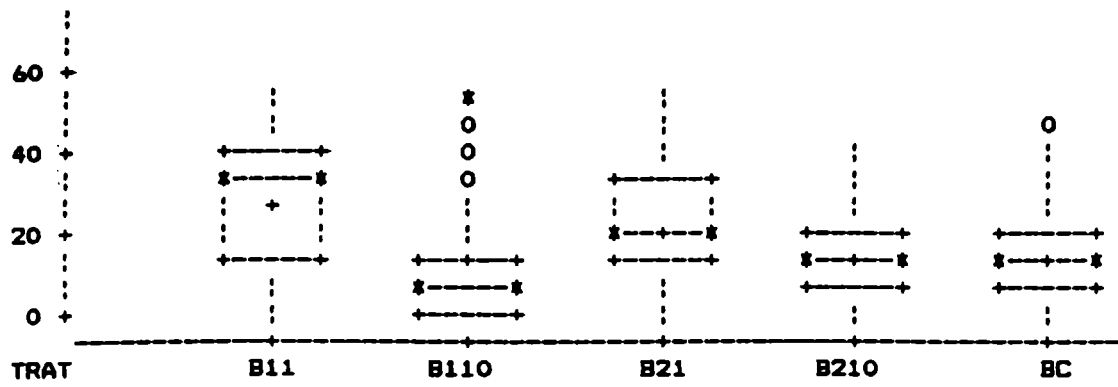
Nro Obs	39	Rango	67	100% Max	67
Media	14.61538	Suma	570	75% Q3	21
Desvio St	15.39415	Variancia	236.9798	50% Med	12
Simetria	1.621943	Kurtosis	2.978439	25% Q1	2
Coef Var	105.3284	Error St	2.465036	0% Min	0
Q3-Q1	19	Moda	0		

Stem Leaf	#	Boxplot
6 7	1	0
5 4	1	0
4 00	2	:
3 1	1	:
2 0113367	7	+-----+
1 022233458	9	*---+---*
0 000000012224578999	18	+-----+

-----+-----+-----+-----+  
 Multiply Stem.Leaf by 10\*\*+1

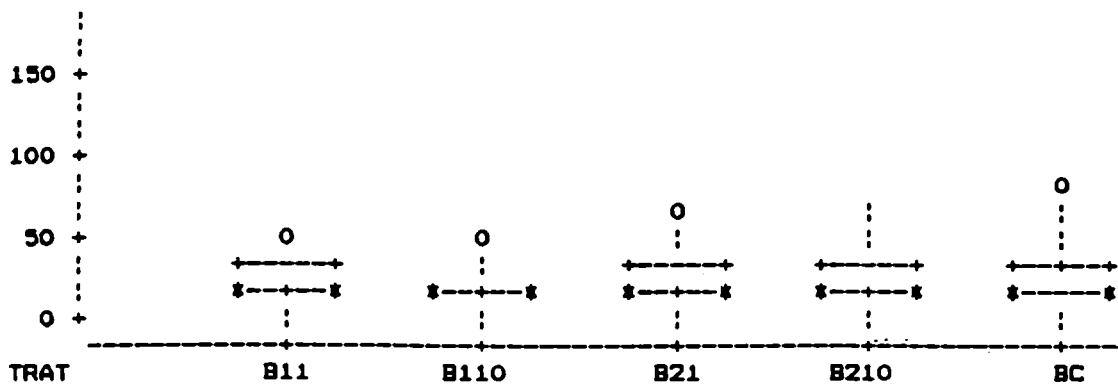
COMPARACION DE BOXPLOTS

ENSAYO 1 DE BAT 76



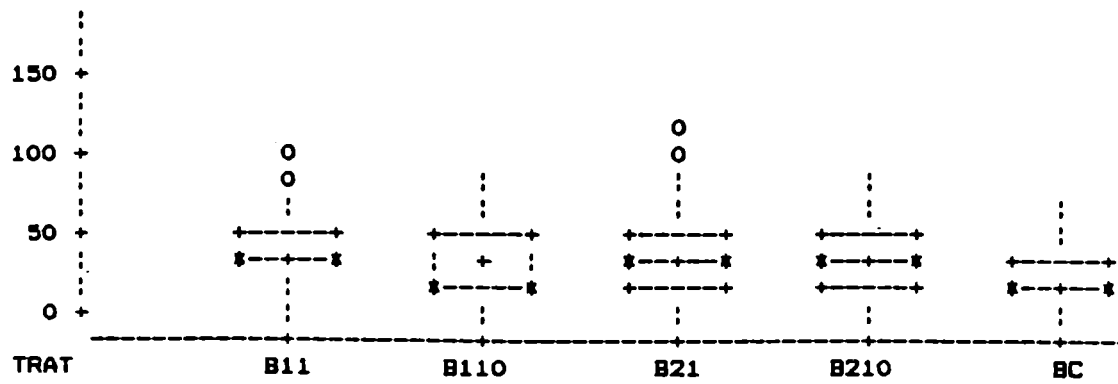
COMPARACION DE BOXPLOTS

ENSAYO 2 DE BAT 76



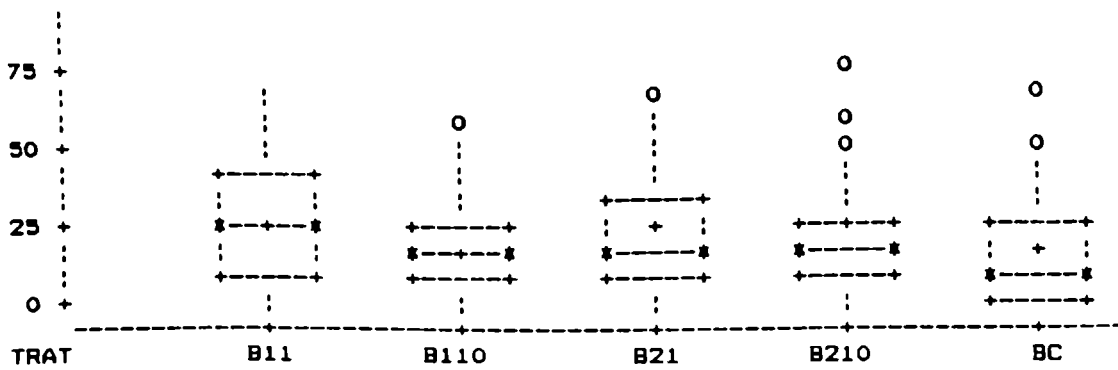
COMPARACION DE BOXPLOTS

ENSAYO 3 DE BAT 76



COMPARACION DE BOXPLOTS

ENSAYO 4 DE BAT 76



**IV - TABLAS COMPARATIVAS**

ALUBIA			
Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4
A1  A10  AC	A1 A10  AC	A1  A10  AC	A1  AC  A10

BAT 76			
Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4
B11		B11	
		B21	
		B210	
		B110	
		BC	B11
B21		BC	B210
	B21B210		B21
	B11		B110
	B110		
			BC
B210 BC			
B110			

BIBLIOGRAFIA

- ABE, M.; SHERWOOD, J.E.; HOLLINGSWORTH, R.I. y DAZZO, F.B. 1984.** Stimulation of clover root hair infection by lectin-binding oligosaccharides from the capsular and extracellular polysaccharides of *Rhizobium trifolii*. *J. Bacteriol.* 160: 517-520.
- ACEA, M.J.; MOORE, C.R. y ALEXANDER, M. 1988.** Survival and growth of bacteria introduced into soil. *Soil Biol. Biochem.* 20: 509-515.
- AGUILAR, J.M.M.; ASHBY, A.M.; RICHARDS, A.J.M.; LOAKE, G.J.; WATSON, M.D. y SHAW, C.H. 1988.** Chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* towards flavonoid inducers of the symbiotic nodulation genes. *J.Gen. Microbiol.* 134: 2741-2746.
- ALBERSHEIM, P. y ANDERSON-PROUTY, J. 1975.** Carbohydrates, proteins, cell surfaces and the biochemistry of pathogenesis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 26: 31-52.
- AMES, P. y BERGMAN, K. 1981.** Competitive advantage provided by bacterial motility in the formation of nodules by *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 148: 728-729.
- APPELBAUM, E. 1989.** The *Rhizobium/Bradyrhizobium*-legume symbiosis. En: *Molecular Biology of Nitrogen Fixation*. Gresshoff, P.M. (Ed.). CRC Press, Boca Raton, Fla.
- BADENOCH-JONES, J; FLANDERS, D.J. y ROLFE, B.G. 1985.** Association of *Rhizobium* strains with roots of *Trifolium repens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 1511-1520.

**BAILEY, R.W.; GREENWOOD, R.M. y CRAIG, A. 1971.** Extracellular polysaccharides of *Rhizobium* strains associated with *Lotus* species. *J. Gen. Microbiol.* 65: 315-324.

**BAL, A.K. y SHANTHARAM, S. 1981.** Lectin receptors sites in the cell wall of *Rhizobium japonicum*. *Microbios Lett.* 16: 141-144.

**BANFALVI, Z. y KONDOROSI, A. 1989.** Production of root hair deformation factors by *Rhizobium meliloti* nodulation genes in *Escherichia coli*: HsnD (Nod H) is involved in the plant host-specific modification of the Nod ABC factor.

**BARBOUR, W.M.; HATTERMAN, D.R. y STACEY, G. 1991.** Chemotaxis of *Bradyrhizobium japonicum* to soybean exudates. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2635-2639.

**BARONDES, S.H. 1988.** Bifunctional properties of lectins: lectins redefined. *Trends Biochem. Sci.* 13: 480-482.

**BARRADAS, C.A. y HUNGRIA, M. 1989.** Seleção de estirpes de *Rhizobium* para o feijoeiro. I. Precocidade para nodulação e fixação de Nitrogenio. *Turrialba*, 39: 236-242.

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

**BAUER, W.D.; ESTES, D.; ANURADHA, S. y ELLIOT, L. 1992.** A motility factor of *Rhizobium meliloti*. Abstract N° 47, 6th. International Symposium on molecular plant-microbe interactions, Seattle, USA.

- BERGMAN, K.; GULASH-HOFEE, M.; HOVESTADT, R.E.; LAROSILIERE, R.C.; RONCO II, P.G. y SU, L. 1988.** Physiology of behavioral mutants in *Rhizobium meliloti*: evidence for a dual chemotaxis pathway. *J. Bacteriol.* 170 : 3249-3254.
- BESSLER, W. y GOLDSTEIN, I.J. 1973.** Phytohemagglutinin purification: a general method involving affinity and gel chromatography. *FEBS Lett.* 34: 58-61.
- BHAGWAT, A.A. y THOMAS, J. 1980.** Dual binding sites for peanut lectin on Rhizobia. *J. Gen. Microbiol.* 117:119-125.
- BHUVANESWARI, T.V. 1981.** Recognition mechanisms and infection process in legumes. *Economic Botany.* 35: 204-223.
- BHUVANESWARI, T.V. y BAUER, W.D. 1978.** Role of lectins in plant-microorganism interactions. III. Influence of rhizosphere/rhizoplane culture conditions on the soybean lectin-binding properties of rhizobia. *Plant Physiol.* 62: 71-74.
- BHUVANESWARI, T.V.; PUEPPKE, S.G. y BAUER, W.D. 1977.** Role of lectins in plant-microorganism interactions. I. Binding of soybean lectin to rhizobia. *Plant Physiol.* 60: 486-491.
- BHUVANESWARI, T.W. y SOLHEIM, B. 1985.** Root hair deformation in the white clover-*Rhizobium trifolii* symbiosis. *Physiol. Plant.* 63: 25-34.
- BLACKBURN, T.H. 1983.** The microbial nitrogen cycle. En: *Microbial Geochemistry.* Krumbein, E. (Ed.). Blackwell Scientific Publications, Oxford, England, pp. 63-89.



**BOHLOOL, B.B. y SCHMIDT, E.L. 1973.** Persistence and competition aspects of *Rhizobium japonicum* observed in soil by immunofluorescence microscopy. Proc. Soil Sci. Soc. Am. 37: 561-564.

**BOHLOOL, B.B. y SCHMIDT, E.L. 1974.** Lectins: a possible basis for specificity in the *Rhizobium*-legume root nodule symbiosis. Science. 185: 269-271.

**BOHLOOL, B.B. y SCHMIDT, E.L. 1976.** Immunofluorescent polar tips of *Rhizobium japonicum*: possible site of attachment or lectin lectin binding. J. Bacteriol. 125: 1188-1194.

**BOIARDI, J.L. 1984.** Fijación simbiótica de nitrógeno: obtención y evaluación de inoculantes para *Phaseolus vulgaris*. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata. Argentina.

**BOIARDI, J.L.; ARRARAS, E.A.; MAZZA, L.A. y BALATTI, P.A. 1983.** Falta de respuesta a la inoculación de poroto alubia con cepas de *Rhizobium phaseoli* en el noroeste argentino. Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires. 4: 263-270.

**BOIARDI, J.L. y GALAR, M.L. 1988.** Nodulation of *Phaseolus vulgaris* L. as affected by *Rhizobium phaseoli* growth phase. Can J. Microbiol. 34: 63-67.

**BOIARDI, J.L.; MORENI, N. y GALAR, M.L. 1988.** Survival and infectivity of a *Rhizobium meliloti* strain maintained in water and buffer suspensions. J. Appl. Bacteriol. 65: 189-193.

**BORBERG, J.; WOODREIFF, J.; HIRSCHHORN, J.; GESNER, B.; MIESCHNER,**

**P. y SIEBER, R. 1966.** Phytohemagglutinin: inhibition of the agglutinating activity by N-acetyl-D-galactosamine. *Science* 154: 1019-1020.

**BOULTER, D.; JEREMY, J.J. y WILDING, M. 1966.** Aminoacids liberated into the culture medium by pea seedling roots. *Plant Soil*. 24: 121-127.

**BOWEN, G.D. y ROVIRA, D. 1976.** Microbial colonization of plant roots. *Annu. Rev. Phytopathol.* 14: 121-144.

**BURRIS, R.H. 1980.** The global nitrogen budget. *Science or seance*. En: Nitrogen Fixation. Vol I. Newton, W. E. y Orme-Johnson, W.H. (Eds.). University Park Press, Baltimore, pp.3-16.

**BURRIS, R.H. 1988.** 100 years of discoveries in biological nitrogen fixation. En: Nitrogen Fixation: hundred years after. Bothe, H; de Bruijn, F.J. y Newton, W.E. (Eds.). Gustav Fischer, Stuttgart, New York. pp. 21-30.

**BUSHBY, H.V.A. 1981.** Quantitative estimation of rhizobia in non-sterile soil using antibiotics and fungicides. *Soil Biol. Biochem.* 13: 237-239.

**CAETANO-ANOLLES, G. 1985.** La asociación simbiótica de rizobios y leguminosas. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata. Argentina.

**CAETANO-ANOLLES, G.; CRIST-ESTES, D.K. y BAUER, W.D. 1988.** Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* to the plant flavone luteolin requires functional nodulation genes. *J. Bacteriol.* 170: 3164-3169.

**CAETANO-ANOLLES, G. y FAVELUKES, G. 1986a.** Quantitation of adsorption

of rhizobia in low numbers to small legume roots. Appl. Environ. Microbiol. 52: 371-376.

**CAETANO-ANOLLES, G. Y FAVELUKES, G. 1986b.** Host-symbiont specificity expressed during early adsorption of *Rhizobium meliloti* to the root surface of alfalfa. Appl. Environ. Microbiol. 52: 377-382.

**CAETANO-ANOLLES, G.; WALL, L.G.; DE MICHELI, A.T.; MACCHI, E.M.; BAUER, W.D. y FAVELUKES, G. 1988.** Role of motility and chemotaxis in efficiency of nodulation by *Rhizobium meliloti*. Plant Physiol. 86: 1228-1235.

**CALLAHAM, D.A. y TORREY, J.G. 1981.** The structural basis for infection of root hairs of *Trifolium repens* by *Rhizobium*. Can. J. Bot. 59: 1647-1664.

**CHAO, W.L. y ALEXANDER, M. 1982.** Influence of soil characteristics on the survival of *Rhizobium* in soils undergoing drying. Soil Sci. Soc. Am. J. 46: 949-952.

**CHATEL, D.L. y PARKER, C.A. 1973.** The colonization of host-root and soil by rhizobia. 1. Species and strain differences in the field. Soil Biol. Biochem. 5: 425-432.

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

**CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1979.** Informe Anual de Frijol. 36-38.

**CLARKE, A.E. y KNOX, R.B. 1978.** Cell recognition in flowering plants. Quart. Rev. Biol. 53: 3-28.

**CLEVELAND, D.W.; FISCHER, S.G.; KIRSCHNER, M.W.; LAEMMLI, U.K. 1977.** Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 252: 1102-1106.

**COONEY, C.L.; WANG, H. y DANIEL, I.C. 1977.** Computer-aided material balancing for prediction of fermentation parameters. Biotech. Bioeng. 19: 55-67.

**CURRIER, W.W. y STROBEL, G.A. 1976.** Chemotaxis of *Rhizobium* spp. to plant root exudates. Plant Physiol. 57: 820-823.

**CURRIER, W.W. y STROBEL, G.A. 1977.** Chemotaxis of *Rhizobium* spp. to a glycoprotein produced by birdsfoot trefoil roots. Science 196: 434-436.

**DANSO, S.K.; KEYA, S.O. y ALEXANDER, M. 1975.** Protozoa and the decline of *Rhizobium* populations added to soil. Can. J. Microbiol. 21: 884-895.

**DART, P. 1977.** Infection and development of leguminous nodules. En: A treatise of dinitrogen fixation. Sect III, cap. 8. Hardy, R.W.F. y Silver, W. (Eds.). John Wiley & sons, New York, pp. 367-472.

**DAZZO, F.B. y BRILL, W.J. 1977.** Receptor site on clover and alfalfa roots for *Rhizobium*. Appl. Environ. Microbiol. 33: 132-136.

**DAZZO, F.B.; HOLLINGSWORTH, R.I.; SHERWOOD, J.E.; ABE, M; HRABAK,**

**E.M.; GARDIOL, A.E.; PANKRATZ, H.S.; SMITH, K.B. y YANG, H. 1985.**

Recognition and infection of clover root hairs by *Rhizobium trifolii*. En: Nitrogen Fixation research progress. Evans, H.J.; Bottomley, P.J. y Newton, W.E (Eds). Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, pp. 239-245.

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

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

**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: 166-171.

**DAZZO, F.B.; TRUCHET, G.L.; SHERWOOD, J.E.; HRABAK, E.M.; ABE, M. y PANKRATZ, S.H. 1984.** Specific phases of root hair attachment in the *Rhizobium trifolii*-clover symbiosis. Appl. Environ. Microbiol. 48: 1140-1150.

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

**DAZZO, F.B.; YANKE, W.E. y BRILL, W.J. 1978.** Trifoliin: A *Rhizobium* recognition protein from white clover. Biochim. Biophys. Acta. 539: 276-286.

**DE HOLLANDER, J.A.; BETTENHAUSSEN, C.W. y STOUTHAMER, A. 1979.**

Growth yields, polysaccharide production and energy conservation in chemostat cultures of *Rhizobium trifolii*. *Antonie van Leeuwenhoek* 45: 401-415.

**DEPIERREUX, C.; KANG, H.C.; GUERIN, B.; MONSIGNY, M. y DELMOTTE, F. 1991.** Characterization of an *Agrobacterium tumefaciens* lectin. *Glycobiol.* 6: 643-649.

**DIAZ, C.L. 1989.** Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the *Rhizobium*-legume symbiosis. PhD Thesis, Leiden University, The Netherlands.

**DIAZ, C.L.; MELCHERS, L.S.; HOOYKAAS, P.J.J.; LUGTENBERG, B.J.J. y KIJNE, J.W. 1989.** Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Nature.* 338: 579-581.

**DIAZ, C.L.; van SPRONSEN, P.C.; BAKHUIZEN, R.; LOGMAN, G.J.J.; LUGTENBERG, B.J.J. y KIJNE, J.W. 1986.** Correlation between infection by *Rhizobium leguminosarum* and lectin on the surface of *Pisum sativum* L. roots. *Planta.* 168: 350-359.

**DIXON, H.B.F. 1981.** Defining a lectin. *Nature.* 292: 192.

**DOWLING, D.N. y BROUGHTON, W.J. 1986.** Competition for nodulation of legumes. *Ann. Rev. Microbiol.* 40: 131-157.

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

**DUDMAN, W.F. 1978.** Structural studies of the extracellular polysaccharide of *Rhizobium japonicum* strains 71A, CC708 and CB1795. *Carbohydrate Res.* 66: 9-24.

**DUPUIS, G; y LECLAIR, B. 1982.** Studies on *Phaseolus vulgaris* phytohemagglutinin. Structural requirements for simple sugars to inhibit the agglutination of human group A erythrocytes. *FEBS Lett.* 144: 29-32.

**EDELMAN, G.M. y WANG, J.L. 1978.** Binding and functional properties of Concanavalin A and its derivatives. III. Interactions with indolacetic and other hydrophobic ligands. *J. Biol. Chem.* 253: 3016-3022.

**ENTLICHER, G; KOSTIR, J.V. y KOCOUREK, J. 1970.** Studies on phytohemagglutinin. III. Isolation and characterization of hemagglutinins from the pea (*Pisum sativum* L). *Biochim. Biophys. Acta.* 221: 272-281.

**ERICKSON, L.E.; MINKEVICH, I.G. y EROSHIN, V.K. 1978a.** Application of mass and energy balance regularities in fermentation. *Biotech. Bioeng.* 20: 1595-1621.

**ERICKSON, L.E.; SELGA, S.E. y VIESTURS, V.E. 1978b.** Application of mass and energy balance regularities to product formation. *Biotech. Bioeng.* 20: 1623-1638.

**ERTOLA, R.J.J.; MAZZA, L.A.; BALATTI, A.P.; CUEVAS, C.M. y DAGUERRE, R. 1969.** Effect of composition of medium and oxygen supply rates on growth of *Rhizobium meliloti*. *Soil Science.* 108: 373-380.

**FAHRAEUS, G. 1957.** The infection of clover root hair by nodule bacteria

studied by a simple glass slide technique. J. Gen. Microbiol. 16: 374-381.

**FANTAUZZO, F. y MUTAFTSCHIEV, S. 1988.** Soybean cell culture specifically induce the competence of *Bradyrhizobium* to stimulate plant cell growth. En: Nitrogen fixation: Hundred years after. Bothe, H; de Bruijn, F.J. y Newton, W.E. (Eds.). Gustav Fischer, New York, Stuttgart, pp. 450.

**FAUCHER, C.; CAMUT, S.; DENARIE, J. y TRUCHET, G. 1989.** The nodH and nodQ host range genes of *Rhizobium meliloti* behave as avirulence genes in *R. leguminosarum* bv. *viciae* and determine changes in the production of plant-specific extracellular signals. Mol. Plant-Microbe Inter. 2: 291-300.

**FAVELUKES, G. y CAETANO-ANOLLES, G. 1985.** *Rhizobium meliloti* specifically attached to alfalfa roots, obligatory precursor towards nodulation. En: Nitrogen fixation research progress. Evans, H.J.; Bottomley, P.J. y Newton, W.E. (Eds.). Dordrecht, Martinus Nijhoff Publishers, pp. 259.

**FELDESTED, R.L.; LEAVITT, R.D. y BACHUR, N.R. 1975.** Purification of the phytohemagglutinin family of proteins from red kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) by affinity chromatography. Biochim. Biophys. Acta. 405: 72-81.

**FONTES, L.A.N. 1972.** Note on the effects of the application of nitrogen and phosphate fertilizers, lime and inoculant on a crop of beans. (*Phaseolus vulgaris* L.). Rev. Ceres. 19: 211-216.

**FOSTER, R.R. y BOWEN, G.D. 1982.** Plant surfaces and bacterial growth. The rhizosphere and rhizoplane. En: Phytopathogenic prokaryotes. Mount, M.S. y Lacy, G.H. (Eds.). Academic Press, New York, pp. 159-186.



**FRANCO, A.A. y DAY, J.M. 1980.** Effects of lime and molybdenum on nodulation and nitrogen fixation of *Phaseolus vulgaris* L. in acids soils of Brazil. Turrialba. 30: 99-105.

**FRANSSEN, H.J.; NAP, J.P. y BISSELING, T. 1992.** Nodulins in root nodule development. En: Biological Nitrogen Fixation. Stacey, G; Burris, R.H. y Evans, H.J. (Eds.). Chapman and Hall, New York, London, pp. 560-597.

**FRED, E.B.; BALDWIN, I.L. y Mc.COY, E. 1932.** Root nodule bacteria and leguminous plants. The University of Wisconsin Press, Madison.

**FREIRE, J.R.J.; GOEPFERT, C.P. y VIDOR, C. 1968.** Alguns factores limitantes da fixação de nitrogênio e produtividade das leguminosas do Rio Grande do Sul. En: Progressos em Biodinamica e Produtividade do Solo. Primavesi, A. (coord.). Univ. Fed. Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, pp. 9-16.

**GAWORZEWSKA, E.T. y CARLILE, M.J. 1982.** Positive chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* and other bacteria towards root exudates from legumes and other plants. J. Gen. Microbiol. 128: 1179-1188.

**GIBSON, A.H. 1977.** The influence of the environment and managerial practices on the legume-*Rhizobium* symbiosis. En: Treatise on Dinitrogen Fixation. IV Agronomy and Ecology. Hardy, R.W.F. y Gibson, A.H. (Eds.), NY. pp. 393-450.

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

**GOLDSTEIN, I.J.; HUGHES, R.C.; MONSIGNY, M.; OSAWA, T. y SHARON, N.**

1980. What should be called a lectin? *Nature*. 285: 66.

**GOLDSTEIN, I.J. y PORETZ, R.D. 1986.** Isolation, physicochemical characterization and carbohydrate-binding specificity of lectins. En: *The lectins: properties, functions and applications in Biology and Medicine*. Liener, I.E.; Sharon, N. y Goldstein, I.J. (Eds.). Academic Press Inc., Orlando, pp. 33-247.

**GRAHAM, P.H. 1981.** Some problems of nodulation and symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L: a review. *Field Crops Res.* 4: 93-112.

**GRAHAM, P.H. y HALLIDAY, J. 1977.** Inoculation and nitrogen fixation in the genus *Phaseolus*. En: *Exploiting the legume-Rhizobium symbiosis in Tropical Agriculture*. Vincent, J.M.; Whitney, A.S. y Bose, J. (Eds.). College of Tropical Agriculture, Miscellaneous Publications, University of Hawaii, Honolulu, p. 313.

**GRAHAM, P.H. y ROSAS, J.C. 1979.** Phosphorus fertilization and symbiotic nitrogen fixation in common bean. *Agron. J.* 71: 925-926.

**GÖTZ, R.; LIMMER, N; OBER, K. y SCHMIDT, R. 1982.** Motility and chemotaxis in two strains of *Rhizobium* with complex flagella. *J. Gen. Microbiol.* 128: 789-798.

**GOULD, N.R. y SCHEINBERG, S.L. 1970.** Isolation and partial characterization of two anti-A hemagglutinins from *P. lunatus*. *Arch. Bioch. Biophys.* 137: 1-11.

**GULASH, M.; AMES, P.; LAROSILIERE, R.C. y BERGMAN, K. 1984.** Rhizobia are attracted to localized sites on legume roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:

149-152.

**GUTSCHICK, V.P. 1980.** Energy flows in the nitrogen cycle, especially in fixation. En: Nitrogen Fixation, vol. I. Newton, W.E. y Orme-Johnson, W.H. (Eds.). University Park Press, Baltimore, pp. 17-27.

**HALVERSON, L.J. y STACEY, G. 1984.** Host recognition in the *Rhizobium*-soybean symbiosis. Detection of a protein factor in soybean root exudate which is involved in the nodulation process. *Plant Physiol.* 74: 84-89.

**HALVERSON, L.J. y STACEY, G. 1985.** Host recognition in the *Rhizobium*-soybean symbiosis. Evidence for the involvement of lectin in nodulation. *Plant Physiol.* 77: 621-625.

**HALVERSON, L.J. y STACEY, G. 1986.** Effect of lectin on nodulation by wild type *Bradyrhizobium japonicum* and a nodulation-defective mutant. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 753-760.

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

**HARDY, R.W.F.; HOLSTEIN, R.D.; JACKSON, E.K. y BURNS, R.C. 1968.** The acetylene-ethylene assay for N<sub>2</sub> fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.* 43: 1185-1207.

**HERBERT, D.; PHIPPS, P.J. y STRANGE, R.E. 1971.** Chemical analysis of microbial cells. En: *Methods in Microbiology.* Norris, J.R. y Ribbons, D.W. (Eds.). Academic Press, London, New York, pp. 265-272.

**HEYNEN, C.E.; VAN ELSAS, J.C.; KUIKMAN, P.J. y VAN VEEN, J.A. 1988.**

Dynamics of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* introduced into soil: the effect of bentonite clay on predation by protozoa. *Soil Biol. Biochem.* 29: 483-488.

**HIGASHI, S. y ABE, M. 1980.** Promotion of infection thread formation by substances from *Rhizobium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 297-301.

**HRABAK, E.M.; URBANO, M.R. y DAZZO, F.W. 1981.** Growth-phase dependent immunodeterminants of *Rhizobium trifolii* lypopolysaccharide which bind Trifoliin A, a white clover lectin. *J. Bacteriol.* 148: 697-711.

**HO, S.C.; WANG, J.L. y SCHINDLER, M. 1990.** Carbohydrate binding activities of *Bradyrhizobium japonicum*. I. Saccharide-specific inhibition of homotypic and heterotypic adhesion. *J. Cell Biol.* 111 : 1631-1638.

**HO, S.C.; WANG, J.L.; SCHINDLER, M. y LOH, J. 1992.** Topological distribution of *Bradyrhizobium japonicum* binding to soybean root. En: 9th. International Congress on Nitrogen Fixation, Abstract 149, Cancún, Méjico.

**HUBBELL, D.H. 1981.** Legume infection by *Rhizobium*: a conceptual approach. *Bioscience* 31: 832-837.

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

**HUNTER, W.J. y FAHRING, C.J. 1980.** Movement by *Rhizobium* and nodulation of legumes. *Soil Biol. Biochem.* 12: 537-542.

**IMBERT, A. y MUTAFTSCHIEV, S. 1988.** Soybean lectins elicit a novel physiological function in *Bradyrhizobium japonicum*. En: Nitrogen Fixation: hundred years after. Bothe, H; de Bruijn, F.J. y Newton, W.E. (Eds.). Gustav Fischer, Stuttgart, New York, pp. 451.

**JANSSEN, W. 1988.** Dry bean production and consumption in the year 2000: projections thoughts and guesses with emphasis on Latin America and Africa. En: Current Topics in breeding of common bean. Working document N° 47, Bean program, CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Bebbe, S. (Ed.).pp. 329-350.

**JANSSEN, K.A. y VITOSH, M.L. 1974.** Effect of lime, sulphur and molybdenum on N<sub>2</sub> fixation and yield of dark red kidney beans. Agron. J. 66: 736-740.

**JENSEN, H.L. 1942.** Nitrogen fixation in leguminous plants. I. General characters of root nodule bacteria isolated from species of *Medicago* and *Trifolium* in Australia. Proc. Linn. Soc. N.S.W. 66: 98-108.

**JORDAN, D.C. 1984.** Family III: *Rhizobiaceae*, p. 234-256. En: Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 1. J.G.Holt y N.R. Krieg (Eds.). The Williams & Wilkins Co., Baltimore.

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

**KATO, G.; MARUYAMA, Y y NAKAMURA, M. 1981.** Involvement of lectins in *Rhizobium*-pea recognitions. Plant Cell Physiol. 22: 759-771.

**KIJNE, J.W. 1992.** The *Rhizobium* infection process. En: Biological Nitrogen Fixation. Stacey, G; Burris, R.H. y Evans, H.J. (Eds.). Chapman y Hall, New York, London pp. 349-398.

**KIJNE, J.W.; SMIT, G.; DIAZ, C.L. y LUGTENBERG, J.J. 1988.** Lectin-enhanced accumulation of Manganese-limited *Rhizobium leguminosarum* cells on pea root hair tips. J. Bacteriol. 170: 2994-3000.

**KIJNE, J.W.; VAN DER SCHAAL, A.M.; DIAZ, C.L. y VAN IREN, F. 1983.** Mannose-specific lectins and the recognition of pea roots by *Rhizobium leguminosarum*.

**KOCOUREK, J. y HOREJSI, V. 1981.** Defining a lectin. Nature. 290: 188.

**KORNFELD, R. y KORNFELD, S. 1970.** The structure of a phytohemagglutinin receptor site from human erythrocytes. J.Biol. Chem. 245: 2536-2545.

**KUYKENDALL, L.D.; SAYENA, B.; DEVINE, T.E. y UDELL, S.E. 1992.** Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. Can. J. Microbiol. 38: 501-505.

**LAMBERT, M. y NEISCH, A.C. 1950.** Rapid method for estimation of glycerol in fermentation solutions. Can. J. Res. B. 28: 83-89.

**LAEMMLI, U.K. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685.

**LAW, I.J. y STRIJDOM, B.W. 1977.** Some observations on plant lectins and

*Rhizobium* specificity. Soil Biol. Biochem. 9: 79-84.

**LAW, I.J. y STRIJDOM, B.W. 1984.** Role of lectins in the specific recognition of *Rhizobium* by *Lotononis bainesii*. Plant Physiol. 74: 779-785.

**LENNOX, L.B. y ALEXANDER, M. 1981.** Fungicide enhancement of nitrogen fixation and colonization of *Phaseolus vulgaris* by *Rhizobium phaseoli*. Appl. Environ. Microbiol. 41: 404-411.

**LEPEK, V.C. 1989.** Estudios bioquímicos y fisiológicos de la interacción bacteria-planta. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Buenos Aires. Argentina.

**LEPEK, V.C. y MARECHAL, L.R. 1989.** Alfalfa agglutinin-*Rhizobium meliloti*: an interaction revisited. An. Asoc. Quim. Arg. 77: 159-167.

**LEPIZ, R. 1988.** The future of small bean producers in Mexico and their relationship with commercial farming. En: Current Topics in breeding of common bean. Working document N° 47, CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Bebbe, S. (Ed.), pp. 351-380.

**LEROUGE, P.; ROCHE, P.; FAUCHER, C.; MAILLET, F.; TRUCHET, G.; PROMÉ, J.C. y DENARIE, J. 1990.** Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. Nature. 344: 781-784.

**LIENER, I.E.; SHARON, N. y GOLDSTEIN, I.J. (Eds.). 1986.** The lectins: properties, functions and applications in Biology and Medicine. Academic Press Inc., Orlando, Fla.

**LJUNGGREN, H. 1969.** Mechanism and pattern of *Rhizobium* invasion into leguminous root hairs. *Physiol. Plant. Supp.V.*

**LOH., J; SCHINDLER, M; WANG, J y HO, S.C. 1992.** Immunolocalization of the lectin BJ38 on *Bradyrhizobium japonicum*. En: 9th. International Congress on Nitrogen Fixation, Abstract 147, Cancún, Méjico.

**LONG, S.R. 1984.** Genetics of *Rhizobium* nodulation. En: *Plant Microbe Interactions*. Nester, F. y Kosuge, T. (Eds.). Mac Millan Press, New York, pp. 265-306.

**LONG, S.R. 1992.** Genetic Analysis of *Rhizobium* nodulation. En: *Biological Nitrogen Fixation*. Stacey, G.; Burris, R.H. y Evans, H.J. (Eds.). Chapman and Hall, New York, London, pp. 560-597.

**LOPEZ, M.F. y SIGNER, E.R. 1986.** Hydrolytic enzymes in *Rhizobium meliloti*. En: *Third International Symposium on the molecular genetics of plant-microbe interactions*. Book of Abstracts, Montreal, Canada, pp.101.

**LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. y RANDALL, R.J. 1951.** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.

**LUGTENBERG, B.J.J.; DIAZ, C.; SMIT, G.; de PATER, S. y KIJNE, J.W. 1991.** Roles of lectin in the *Rhizobium*-legume symbiosis. En: *Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions*, vol I. Hennecke, H. y Verma, D.P.S. (Eds.). Kluwer Academic Publishers, pp. 174-181.



**MALEK, I. 1972.** Environmental control of cell synthesis and function. *J. Appl. Chem. Biotechnol.* 22: 65-70.

**MALEK, W. 1989.** Chemotaxis in *Rhizobium meliloti* strain LS-30. *Arch. Microbiol.* 152: 611-612.

**MANGUAL-CRESPO, G.; KLUSON, R. y SCHRÖDER, E.C. 1987.** Effect of various nitrogen levels and *Rhizobium* inoculation on yields of native white bean (*Phaseolus vulgaris* L). *J. Agric. Univ. P.R.* 71: 1-6.

**MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F. y SAMBROOK, J. 1982.** Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, CSH, New York.

**MARSHALL, K.C. 1964.** Survival of root-nodule bacteria in dry soils exposed to high temperatures. *Aus. J. Agric. Res.* 15: 273-281.

**MARTINEZ, E.; FLORES, M.; BROM, S.; ROMERO, D.; DAVILA, G. y PALACIOS, R. 1988.** *Rhizobium phaseoli*: a molecular genetics view. *Plant Soil* 108: 179-184.

**MARTINEZ, E.; PALACIOS, R. y SANCHEZ, F. 1987.** Nitrogen-fixing nodules induced by *Agrobacterium tumefaciens* harboring *Rhizobium phaseoli* plasmids. *J. Bacteriol.* 169: 2828-2834.

**MARTINEZ, E.; PARDO, M.A.; PALACIOS, R. y CEVALLOS, M.A. 1985.** Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. *J. Gen. Microbiol.* 131: 1779-1786.

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

**MARTINEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, L.; MERCANTE, F.B.; FRANCO, A.A.; GRAHAM, P. y PARDO, M.A. 1991.** *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41: 417-426.

**MEADE, H.M.; LONG, S.R.; RUVKUN, G.B.; BROWN, S.E. y AUSUBEL, F.M. 1982.** Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. *J. Bacteriol.* 149: 114-122.

**MELLOR, H.Y.; GLENN, A.R.; ARWAS, R. y DILWORTH, M.J. 1987.** Symbiotic and competitive properties of motility mutants of *Rhizobium trifolii* TA1. *Arch. Microbiol.* 148: 34-39.

**MIAN, F.A.; JARMAN, T.R. y RIGHELATO, R.C. 1978.** Biosynthesis of exopolysaccharide by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 134: 418-422.

**MILLS, K.M. y BAUER, W.D. 1985.** *Rhizobium* attachment to clover roots. *J. Cell. Sci. Suppl.* 2: 333-345.

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

- MOROTE, C.G.B.; VIDOR, C.; MENDES, N.G. y PEREIRA, J.S. 1990.** Melhoria da nodulação da soja pela cobertura do solo e inoculação com *Bradyrhizobium japonicum*. R. bras. Ci. Solo, Campinas. 14: 143-150.
- NAPOLI, C. y ALBERSHEIM, P. 1980.** Infection and nodulation of clover by nonmotile *Rhizobium trifolii*. J. Bacteriol. 141: 979-980.
- NAPOLI, C.; DAZZO, F. y HUBBELL, D. 1975.** Production of cellulose microfibrils by *Rhizobium*. Appl. Environ. Microbiol. 30: 123-131.
- NEIJSSSEL, O.M. y TEMPEST, D.V. 1975.** The regulation of carbohydrate metabolism in *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 in aerobic chemostat culture. FEMS Microbiol. Lett. 1: 47-50.
- NEIJSSSEL, O.M. y TEMPEST, D.W. 1976.** Bioenergetic aspects of aerobic growth of *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 in carbon-limited and carbon-sufficient chemostat culture. Arch. Microbiol. 107: 215-221.
- NEIJSSSEL, O.M. y TEMPEST, D.W. 1979.** The physiology of metabolite overproduction. En: Microbial Technology: current state, future prospects. 29th. Symposium of the Society for General Microbiology. Bull, A.T.; Elwood, D.C. y Ratledge, C. (Eds.). Cambridge University Press, Cambridge, pp. 53-82.
- NEIJSSSEL, O.M. y TEMPEST, D.W. 1985.** Overproduction of microbial metabolites. En: Comprehensive Biotechnology, vol I. Murray Moo-Young (Ed.). Pergamon Press, Oxford, pp. 605-615.
- NUTMAN, P.S. 1959.** Some observations on root-hair infection by nodule

bacteria. J. Exp. Bot. 10: 250-263.

**OFEK, I; MIRELMAN, D. y SHARON, N. 1977.** Adherence of *Escherichia coli* to human mucosal cells mediated by mannose receptors. Nature 265: 623-625.

**OUCHTERLONY, O. y NILSSON, L.A. 1978.** Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. En: Handbook of Experimental Immunology, vol.1, Immunochemistry, Blackwell Scientific Publications, Oxford. pp 19.1-19.44. D. M. Weir (Ed.).

**PEREIRA, P.A.A. y BLISS, F.A. 1987.** Nitrogen fixation and plant growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L) at different levels of Phosphorus availability. Plant Soil. 104: 79-84.

**PIHA, M.I. y MUNNS, D.M. 1987.** Sensitivity of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) symbiosis to high soil temperatures. Plant Soil 98: 183-194.

**PIRT, J. 1975.** Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, pp. 274.

**POSTMA, J.; HOK-A-HIN, C.H. y OUDE VOSHAAR, J.H. 1990.** Influence of the inoculum density on the growth and survival of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* introduced into sterile and non-sterile loamy sand and silt loam. FEMS Microbiol. Ecol. 73: 49-58.

**PRITCHARD, R.H. y TEMPEST, D.W. 1982.** Growth: cells and populations. En: Biochemistry of bacterial growth, Third edition. Mandelstam, J.; Mc Quillen, K. y Dawes, I. (Eds.). Blackwell Scientific Publications, pp. 99-123.

**PUEPPKE, S.G. 1983.** *Rhizobium* infection threads in root hairs of *Glycine max* (L). Merr, *Glycine soja* Sieb and Zucc, and *Vigna unguiculata* (L). Walp. Can. J. Microbiol. 29: 69-76.

**PUEPPKE, S. 1984.** Adsorption of slow-and fast-growing rhizobia to soybean and cowpea roots. Plant Physiol. 75: 924-928.

**PUEPPKE, S.G.; FREUND, T.G.; SCHULZ, B.C. y FRIEDMAN, H.P. 1980.** Interaction of lectins from soybean and peanut with rhizobia that nodulate soybean, peanut or both plants. Can. J. Microbiol. 26: 1489-1497.

**PURCHASE, H.F. y NUTMAN, P.S. 1957.** Studies on the physiology of nodule formation. VI. The influence of bacterial numbers in the rhizosphere on nodule initiation. Ann. Bot. (London). 21: 434-454.

**PUSZTAI, A; GRANT, G. y STEWART, J.C. 1981.** A new type of *Phaseolus vulgaris* (cv. Pinto 111) seed lectin. Isolation and characterization. Biochim. Biophys. Acta. 671: 146-154.

**QUINTO, C.; DE LA VEGA, H.; FLORES, M.; FERNANDEZ, L.; BALLADO, T.; SOBERON, G. y PALACIOS, R. 1982.** Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in *Rhizobium phaseoli*. Nature. 299: 724-726.

**QUISPEL, A. 1988.** Hellriegel and Wilfarth's discovery of (symbiotic) nitrogen fixation hundred years ago. En: Nitrogen Fixation: Hundred Years After. Bothe, H.; de Bruijn, F. y Newton, W (Eds). Gustav Fischer, Stuttgart, New York, pp. 3-12.

- RAMIREZ, C. y ALEXANDER, M. 1980.** Evidence suggesting protozoan predation on *Rhizobium* associated with germinating seeds and in the rhizosphere of beans. *Appl. Environ. Microbiol.* 40: 492-499.
- RANDLES, R.H. 1979.** Introduction to the theory of non-parametric statistics. Publicado por Wiley & Sons.
- RANGA RAO, V. y KEISTER, D.L. 1978.** Infection threads in the root hairs of soybean (*G. max.*) plants inoculated with *R. japonicum*. *Protoplasma* 97: 311-316.
- REISFELD, R.A.; LEWIS, U.J. y WILLIAMS, D.E. 1962.** Disk electrophoresis of basic proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Nature.* 195: 281-283.
- RICE, W.A.; PENNY, D.C. y NYBORG, M. 1977.** Effects of soil acidity on rhizobia number, nodulation and nitrogen fixation by alfalfa and red clover. *Can. J. Soi. Sci.* 57: 197-203.
- RIDGE, R.W. y ROLFE, B.G. 1986.** Lectin binding to the root and root hair tips of the tropical legume *Macroptilium atropurpureum* Urb. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 328-332.
- ROBERTS, D.D. y GOLDSTEIN, I.J. 1983a.** Binding of hydrophobic ligands to plant lectins: titration with arylaminonaphthalenesulfonates. *Arch. Biochem. Biophys.* 224: 479-484.
- ROBERTS, D.D. y GOLDSTEIN, I.J. 1983b.** Adenine binding sites of the lectin from Lima beans (*Phaseolus lunatus*). *J. Biol. Chem.* 258: 13820-13824.

**ROCA, W.M.; RAMIREZ, H.; CHAVARRIAGA, P. AND MUÑOZ, L.C. 1988.**

Potential of biotechnology in germplasm evaluation and the genetic improvement of *Phaseolus* beans. En: Current topics in breeding of common beans. Working document N°. 47. Bebbe, S. (Ed.). pp. 99-110.

**ROTH, L.E.; JEON, K. y STACEY, G. 1988.** Homology in endosymbiotic systems: the term "symbiosome". En: Molecular genetics of plant-microbe interactions. Palacios, R; Verma, D.P.S. (Eds.). The American Phytopathological Society, St. Paul, Minn., pp. 220-225.

**ROTH, L.E. y STACEY, G. 1991.** *Rhizobium*-legume symbiosis. En: Microbial cell-cell interactions. Dworkin, M. (Ed.). American Society for Microbiology, Washington D.C.

**ROVIRA, A.D. 1969.** Plant root exudates. Bot. Rev. 35: 35-57.

**RUTHERFORD, W.M.; DICK, W.E. Jr.; CAVINS, J.F.; DOMBRINK-KURTZMAN, M.A. y SLODKI, M.E. 1968.** Isolation and characterization of a soybean lectin having 4-O-Methylglucuronic acid specificity. Biochemistry. 952-958.

**SCHILLING, G. 1988.** Hellriegel and Wilfarth and their discovery of nitrogen fixation at Bernburg. In: Nitrogen Fixation: Hundred Years After. Bothe, H; de Bruijn, F.J. y Newton, W.E. (Eds.). Gustav Fischer, Stuttgart, New York. pp 13-19.

**SCHMIDT, E.L. 1974.** Quantitative autecological study of microorganisms in soil by immunofluorescence. Soil Sci. 118: 141-149.

**SCHRÖDER, E.C. 1992.** Improvement of the *Phaseolus/Rhizobium* symbiosis, with particular reference to the Caribbean region. En: Biological Nitrogen Fixation and Sustainability of Tropical Agriculture. Mulongoy, K.; Gueye, M. y Spencer, D.S.C. (Eds.). Publicado por Wiley-Sayce Co. pp. 79-95.

**SCHWINGHAMER, E.A. y DUDMAN, W.F. 1973.** Evaluation of spectinomycin resistance as a marker for ecological studies with *Rhizobium* spp. J. Appl. Bacteriol. 36: 263-272.

**SEEGERS, R. y LA RUE, T.A. 1985.** Legume agglutinins that bind to *Rhizobium meliloti*. J. Bacteriol. 162: 784-789.

**SEQUEIRA, L; GAARD, G y DE ZOETEN, G.A. 1977.** Interaction of bacteria and host cell walls: its relation to mechanisms of induced resistance. Physiol. Plant Pathol. 10: 43-50.

**SHANTHARAM, S. 1985.** Pole lectin binding to rhizobia: lack of correlation to specificity in root nodule symbiosis. Microbios Lett. 30: 43-50.

**SHANTHARAM, S. y WONG, P.P. 1982.** Recognition of leguminous hosts by a promiscuous *Rhizobium* strain. Appl. Environ. Microbiol. 43: 677-685.

**SHARON, N. 1986.** Bacterial lectins. En: The lectins: properties, functions and applications in Biology and Medicine. Liener, I.E.; Sharon, N y Goldstein, I.J. (Eds.). Academic Press, London pp. 493-526.

**SHIMSHIK, E.J. y HEBERT, R.R. 1978.** Adsorption of rhizobia to cereal roots. Biochem. Biophys. Res. Comm. 84: 736-742.



**SMIT, G.; KIJNE, J.W. y LUGTENBERG, B.J.J. 1986.** Correlation between extracellular fibrils and attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hair tips. J. Bacteriol. 168: 821-827.

**SMIT, G.; KIJNE, J.W. y LUGTENBERG, B.J.J. 1987.** Involvement of both cellulose fibrils and a  $\text{Ca}^{+2}$ -dependent adhesin in the attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hair tips. J. Bacteriol. 169: 4292-4301.

**SMIT, G; KIJNE, J.W. y LUGTENBERG, B.J.J. 1989a.** Roles of flagella, lipopolysaccharide and a  $\text{Ca}^{+2}$  dependent cell surface protein in attachment of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* to pea root hair. J. Bacteriol. 171: 569-572.

**SMIT, G; LOGMAN, T.J.J.; BOERRIGTER, M.E.T.I.; KIJNE, J.W. y LUGTENBERG, B.J.J. 1989b.** Purification and partial characterization of the *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*  $\text{Ca}^{+2}$ - dependent adhesin, which mediates the first step in attachment of cells of the family *Rhizobiaceae* to plant root hair tips. J. Bacteriol. 171: 4054-4062.

**SMIT, G.; TUBBING, D.M.J.; KIJNE, J.W. y LUGTENBERG, B.J.J. 1991.** Role of  $\text{Ca}^{+2}$  in the activity of rhicadhesin from *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*, which mediates the first step in attachment of *Rhizobiaceae* cells to plant root hair tips. Arch. Microbiol. 155: 278-283.

**SOLHEIM, B. 1983.** Possible role of lectins in binding rhizobia to host roots. En: Lectins, vol III. BøG Hansen Spengler (Ed.). Publicado por W. de Gruyter & Co. pp. 539-547.

**SPRENT, J.I. y FARIA, S.M. 1988.** Mechanism of infection of plants by nitrogen fixing organisms. *Plant Soil*. 110: 157-165.

**SPRENT, J.I. y RAVEN, J.A. 1992.** Evolution of Nitrogen-Fixing Symbioses. En: *Biological Nitrogen Fixation*. Stacey, G.S., Evans, H.J. y Burris, R.H. (Eds.). Chapman and Hall Inc., Londres, N. York. pp. 461-496.

**STACEY, G; PAAU, A.S. y BRILL, W.1980.** Host recognition in the *Rhizobium*-soybean symbiosis. *Plant Physiol*. 66: 609-614.

**TAKAHASHI, T; RAMACHANDRAMURTHY, P. y LIENER, I.E. 1967.** Some physical and chemical properties of a phytohemagglutinin isolated from *Phaseolus vulgaris*. *Biochim. Biophys. Acta*. 133: 123-133.

**TAU, J.L.; ARRARAS, E.A. y ERTOLA, R.J. 1984.** Inoculación de poroto alubia (*Phaseolus vulgaris* L) con rizobios en dos localidades de Salta. *Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad de La Plata*. LX: 121-125.

**TRUCHET, G.L.; BARKER, D.G.; CAMUT, S.; de BILLY, F.; VASSE, J. y HUGUET, T. 1989.** Alfalfa nodulation in the absence of *Rhizobium*. *Mol. Gen. Genet*. 219: 65-68.

**TRUCHET, G.L.; DAZZO, F.B. y VASSE, J. 1983.** Agglutination of *Rhizobium japonicum* 3I1b110 by soybean lectin. *Plant Soil* 265-268.

**TSIEN, H.C. y SCHMIDT, E.L. 1980.** Accumulation of soybean lectin-binding polysaccharide during growth of *Rhizobium japonicum* as determined by hemagglutination inhibition assay. *Appl. Environ. Microbiol*. 39: 1100-1104.

**TUZIMURA, K. y WATANABE, T. 1962a.** The effect of rhizosphere of various plants on the growth of *Rhizobium*. Ecological studies of root nodule bacteria (Part III). Soil. Sci. Pl. Nutr. 8: 13-17.

**TUZIMURA, K. y WATANABE, T. 1962b.** The growth of *Rhizobium* in the rhizosphere of the host plant. Ecological studies of root nodule bacteria. Soil. Sci. Pl. Nutr. 8: 19-24.

**UTSUMI, S; DAMODARAN, S. y KINSELLA, J.E. 1984.** Heat-induced interaction between soybean proteins: preferential association of 11 S basic subunits and  $\beta$  subunits of 7 S. J. Agric. Food Chem. 32: 1406-1412.

**VAN DER SCHAAL, I.; KIJNE, J.; DIAZ, C.L. y VAN IREN, F. 1983.** Pea lectin binding by *Rhizobium* En: Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical biochemistry. vol 3. Bøg-Hansen T.C.; Spengler, G.A.( Eds.). W. de Gruyter, Berlin, New York, pp. 531-538.

**VAN EGERAAT, A.M.S.M. 1975.** The possible role of homoserine in the development of *Rhizobium leguminosarum* in the rhizosphere of pea seedlings. Plant Soil. 42: 381-386.

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

**VESPER, S.J. y BAUER, W.D. 1985.** Characterization of *Rhizobium* attachment to soybean roots. Symbiosis 1: 139-162.

**VESPER, S.J. y BHUVANESWARI, T.V. 1988.** Nodulation of soybean roots by

an isolate of *Bradyrhizobium japonicum* with reduced firm attachment ability. Arch. Microbiol. 150 : 15-19.

**VESPER, S.J.; MALIK, N.S.A. y BAUER, W.D. 1987.** Transposon mutants of *Bradyrhizobium japonicum* to soybean roots. Appl. Environ. Microbiol. 52: 134-141.

**VINCENT, J.M. 1970.** A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. IBP Handbook 15. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

**VINCENT, J.M. 1974.** Root nodule symbiosis with *Rhizobium*. En: The biology of nitrogen fixation. Quispel, A. (Ed.). North-Holland Publishing Company, Amsterdam, pp. 265-341.

**VINCENT, J.M. 1981.** The genus *Rhizobium*. En: The prokaryotes: a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria. Starr, M.P.; Stolp, H.; Trüper, H.G.; Balows, A. y Schlegel, H.G. (Eds.). Springer-Verlag, Berlin.

**VELAZQUEZ, Y.A.; KLUSON, R.A. y SCHRÖDER, E.C. 1988.** *Rhizobium* inoculation of *Phaseolus vulgaris* in Lajas, Puerto Rico. J. Agric. Univ. PR. 72: 427-436.

**WALL, L.G. 1990.** La asociación simbiótica de rizobios y leguminosas: estudios sobre las etapas tempranas de la preinfección. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata. Argentina.

**WERNER, D. 1992.** Physiology of nitrogen-fixing legume nodules: compartments and functions. En: Biological Nitrogen Fixation. Stacey, G.; Burris, R.H. y Evans, H.J. (Eds.). Chapman and Hall, New York, London, pp. 399-431.

**WILLIAMS, A.G. y WIMPENNY, J.W.T. 1978.** Exopolysaccharide production by *Pseudomonas* NCIB 11264 grown in continuous culture. *J. Gen. Microbiol.* 104: 47-57.

**WILSON, P.W. 1971.** The background. En: *The chemistry and biochemistry of nitrogen fixation*. Postgate, J.R. (Ed.). Plenum Press, London, New York, pp. 1-18.

**WISNIEWSKI, J.P.; KANG, H.C.; DEPIERREUX, C; GUERIN, B; MONSIGNY, M y DELMOTTE, F. 1992.** Characterization and purification of lectins from *Bradyrhizobium lupini* and *Agrobacterium tumefaciens* strains. Abstract N° 8. Sixth International Symposium on molecular plant-microbe interactions, Seattle, USA.

**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: 729-737.

**WONG, P.P. y SHANTHARAM, S. 1984.** Binding between pole bean (*Phaseolus vulgaris* L.) lectin and rhizobia that do or do not nodulate the pole bean. *Can. J. Microbiol.* 30: 1349-1355.

**YAO, P.Y. y VINCENT, J.M. 1969.** Host specificity in the root hair "curling factor" of *Rhizobium* spp. *Aust. J. Biol. Sci.* 22: 413-423.

**YOUNG, J.P.W. 1992.** Phylogenetic classification of Nitrogen-Fixing Organisms. En: *Biological Nitrogen Fixation*. Stacey, G.S.; Evans, H.J. y Burris, R.H. (Eds), Chapman and Hall, Inc. Londres, N. York, pp. 43-86.

**YOUNG, J.P.W. y JOHNSTON, A.W.B. 1989.** The evolution of specificity in the Legume-*Rhizobium* symbiosis. Trends Ecol. Evol. 4: 341-349.

**ZEVENHUIZEN, L.P.T.M. 1971.** Chemical composition of exopolysaccharides of *Rhizobium* and *Agrobacterium*. J. Gen. Microbiol. 68: 239-243.

#### FE DE ERRATAS

nº. de página	donde dice	debe leerse
184, línea 16	Y <sub>CO2</sub>	Y <sub>CO2</sub> CO <sub>2</sub>
185, línea 3	mol O <sub>2</sub> /C-mol de sustrato	mol CO <sub>2</sub> /C-mol de sustrato
185, línea 5	mmol O <sub>2</sub> /L.h	mmol CO <sub>2</sub> /L.h
188, línea 8 (leyenda)	7 días	8 días
200. línea 9	Bauer, 1992	Bauer et al., 1992