



1 304406  
2ej...

**UNIVERSIDAD SIMON BOLIVAR**

**INCORPORADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

EVALUACION DE LA CAPACIDAD DE NODULACION Y  
FIJACION DE NITROGENO DE MUTANTES DEFICIENTES  
EN LA PRODUCCION DE EXOPOLISACARIDOS DE  
Rhizobium phaseoli (CEPAS MSBV 01 A 07) EN  
SU INTERACCION CON Phaseolus vulgaris  
var. CANARIO 107

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
LICENCIADO EN BIOLOGIA  
P R E S E N T A :  
GRACIELA MARTINEZ RUBALCAVA

MEXICO, D. F.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1991



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# I N D I C E

	Pág.
LISTA DE FIGURAS, TABLAS Y GRAFICAS .....	III
ABREVIATURAS .....	VIII
RESUMEN .....	IX
INTRODUCCION .....	1
Generalidades .....	1
Ciclo del nitrógeno en la naturaleza .....	1
Importancia del estudio de la fijación simbiótica del nitrógeno .....	7
Estructura y desarrollo de los nódulos .....	8
Mecanismo bioquímico de la fijación simbiótica del nitrógeno .....	13
Factores que modifican la eficiencia de la fijación simbiótica del nitrógeno .....	19
Parámetros fisiológicos usados para estimar el crecimiento de la planta .....	24
Genética de <u>Rhizobium</u> .....	27
Antecedentes .....	35
JUSTIFICACION DEL PROYECTO .....	40
OBJETIVOS .....	42
ESTRATEGIA .....	43
METODOLOGIA .....	44
I. Inoculación de las semillas de <u>Phaseolus</u> <u>vulgaris</u> var. Canario 107 .....	44
II. Pruebas de infectividad .....	44
III. Pruebas de efectividad .....	48

A. Construcción del dispositivo de "jarra- botella" de Leonard modificada .....	48
B. Tratamientos .....	51
C. Análisis morfométricos .....	51
D. Análisis estadístico .....	80
RESULTADOS .....	61
DISCUSION .....	86
Papel de los exopolisacáridos en el proceso de infección .....	88
CONCLUSIONES .....	95
PERSPECTIVAS .....	96
BIBLIOGRAFIA .....	97
APENDICE .....	108

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Pág.
1	Ciclo del nitrógeno ..... 3
2	Desarrollo de un nódulo sobre una raíz primaria de una leguminosa (guisante). Esquemático ..... 10
3	Mecanismo de la fijación de nitrógeno ..... 14
4	Esquema de la fijación de nitrógeno por el nódulo de una leguminosa ..... 18
5	Secuencia hipotética de sucesos en la fijación de nitrógeno ..... 18
6	Factores que influyen en la eficiencia de la fijación simbiótica de nitrógeno ..... 20
7	Papel de las nodulinas en el proceso de infección de <u>Rhizobium</u> a las leguminosas ..... 34
8	Fotografía y esquema de una unidad CP ..... 48
9	Dispositivo de "jarra-botella" de Leonard (modificada) ..... 49
10	Distribución de las bacterias de cepas de <u>Rhizobium</u> <u>phaseoli</u> sobre los pelos radiculares de <u>Phaseolus</u> <u>vulgaris</u> var. Canario 107 ..... 62
11	Curvamiento del pelo radicular de <u>Phaseolus</u> <u>vulgaris</u> var. Canario 107 a los tres días ..... 63
12	Distribución de los nódulos a los 30 días en raíces de <u>Phaseolus vulgaris</u> var. Canario 107, inducidos por cepas mutantes de <u>Rhizobium phaseoli</u> ..... 65

- 13 Nódulos inducidos por Rhizobium phaseoli cepas CIAT 899 y MSBV 01 a 07 en Phaseolus vulgaris var. Canario 107 ..... 66
- 14 Cortes longitudinales de nódulos de Phaseolus vulgaris var. Canario 107 en diferentes etapas de desarrollo ..... 71
- 15 Anatomía de los nódulos diferenciados de Phaseolus vulgaris var. Canario 107 inoculado con Rhizobium phaseoli cepas CIAT y cepas mutantes a los 30 días 72
- 16 Resistencia a antibióticos (rifampicina y kanamicina) en medio Ym de las cepas de Rhizobium phaseoli inoculadas y recuperadas de los nódulos de Phaseolus vulgaris var. Canario 107 ..... 85

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Pág.
1 Medida espectrofotométrica de la cantidad de leghemoglobina (Lg) extraída por la solución Drabkin de los nódulos de <u>Phaseolus vulgaris</u> a los 30 días después de inocular con las cepas bacterianas de <u>Rhizobium phaseoli</u> , teniendo como control a la cepa CIAT 899 .....	67
2 Características asociadas a los nódulos inducidos en <u>Phaseolus vulgaris</u> var. Canario 107 por las cepas mutantes deficientes en la producción de exopolisacáridos (EPS) de <u>Rhizobium phaseoli</u> .....	69
3 Datos morfométricos de las plantas de <u>Phaseolus vulgaris</u> var. Canario 107 infectadas con <u>Rhizobium phaseoli</u> CIAT 899 y con mutantes deficientes en la producción de exopolisacáridos (EPS) derivadas de ella .....	74
4 Reducción de acetileno por los nódulos formados de las mutantes y la cepa silvestre CIAT de <u>Rhizobium phaseoli</u> a los 30 días. Promedio de 3 mediciones por tratamiento .....	82

## LISTA DE GRAFICAS

Gráfica	Pág.
1 Cantidad de leghemoglobina presente en nódulos de <u>Phaseolus vulgaris</u> var. Canario 107 inducidos por <u>Rhizobium phaseoli</u> (cepas CIAT 899 y MSBV 01 a 07). Promedio de 3 repeticiones .....	86
2 Efecto de la inoculación de mutantes de <u>Rhizobium phaseoli</u> (cepas MSBV 01 a 07) en el peso seco de los nódulos de <u>Phaseolus vulgaris</u> var. Canario 107. Promedio de 2 mediciones con 5 repeticiones en cada una .....	75
3 Efecto de la inoculación de mutantes de <u>Rhizobium phaseoli</u> (cepas MSBV 01 a 07) en el peso seco total aéreo de <u>Phaseolus vulgaris</u> var. Canario 107. Promedio de 2 mediciones con 5 repeticiones en cada una .....	76
4 Efecto de la inoculación de mutantes de <u>Rhizobium phaseoli</u> (cepas MSBV 01 a 07) en el peso seco total de <u>Phaseolus vulgaris</u> var. Canario 107. Promedio de 2 mediciones con 5 repeticiones en cada una .....	77
5 Efecto de la inoculación de mutantes de <u>Rhizobium phaseoli</u> (cepas MSBV 01 a 07) en la relación de vástago/raíz de <u>Phaseolus vulgaris</u> var. Canario 107. Promedio de 2 mediciones con 5 repeticiones en cada una .....	78



- 6 Efecto de la inoculación de mutantes de Rhizobium phaseoli (cepas MSBV 01 a 07) en la razón de área foliar de Phaseolus vulgaris var. Canario 107. Promedio de 2 mediciones con 5 repeticiones en cada una ..... 79
- 7 Efecto de la inoculación de Rhizobium phaseoli (cepas CIAT 899 y MSBV 01 a 07) en los parámetros morfométricos de Phaseolus vulgaris var. Canario 107. Promedio de 2 experimentos con 5 repeticiones en cada uno ..... 80
- 8 Efecto de la inoculación de mutantes de Rhizobium phaseoli (cepas MSBV 01 a 07) a Phaseolus vulgaris var. Canario 107 en la reducción de acetileno teniendo como control a la cepa CIAT 899. Promedio de 3 mediciones por tratamiento .. 83

## ABREVIATURAS

- Nod<sup>-</sup> = Bacterias simbióticas incapaces de nodular a sus huéspedes
- EPS= Exopolisacáridos
- Rif= Rifampicina
- Km= Kanamicina
- Lg= Leghemoglobina
- g= gramos
- cel/ml= células por mililitro
- PSTA= Peso seco total aéreo (g)
- PSTP= Peso seco total de la planta (g)
- PSN= Peso seco de nódulos (g)
- (LEG)= Concentración de leghemoglobina (absorbancia a 540 nm)
- V/R= Razón vástago-raíz
- AF= Area foliar (cm<sup>2</sup>)
- RAF= Razón de área foliar (cm<sup>2</sup>/g)
- REDACET= Reducción de acetileno (etileno en nanomoles)
- S/N= Control sin nitrógeno
- C/N= Control con nitrógeno
- MSBV01 a 07= Cepas mutantes deficientes en EPS de Rhizobium phaseoli
- CIAT 899= Cepa silvestre de Rhizobium phaseoli

Resumen.

Entre las moléculas que intervienen en el proceso de infección de parte de Rhizobium a una leguminosa, se propone que los exopolisacáridos (EPS) tengan un papel relevante en los eventos iniciales de la infección, como es el curvamiento del pelo radicular y la formación del tubo infeccioso.

Las bacterias mutantes MSBV 01 a 07 (provenientes de la cepa CIAT 899 de Rhizobium phaseoli), deficientes en la producción de exopolisacáridos (EPS), fueron aisladas para investigar su papel en la habilidad para infectar, nodular y fijar nitrógeno en Phaseolus vulgaris var. Canario 107. Se verificó la infectividad de las mutantes (capacidad de establecer una simbiosis efectiva), en plantas de frijol crecidas en unidades CP, como es la adhesión y curvamiento de pelos radiculares mediante la tinción con rosa de bengala y la morfología del nódulo en diferentes etapas de desarrollo con safranina-azul de metileno. Por otro lado, la eficiencia del fenotipo de fijación de nitrógeno (Fix+) se midió por el método de reducción de acetileno en plantas de 30 días crecidas en el sistema de "jarra-botella" de Leonard.

En resultados obtenidos todas las mutantes presentaron nódulos con presencia de bacteroides y efectivos a excepción de la mutante 04 que resultó inefectiva. En conclusión, podemos sugerir que los EPS no intervinieron en el proceso de infección y de fijación de nitrógeno y probablemente sean los lipopolisacáridos los que posean un papel relevante en el proceso de fijación simbiótica de nitrógeno.

Evaluación de la capacidad de nodulación y fijación de nitrógeno de mutantes deficientes en la producción de exopolisacáridos de Rhizobium phaseoli (cepas MSBV 01 a 07) en su interacción con Phaseolus vulgaris var. Canario 107.

### Introducción.

#### Generalidades.

El nitrógeno es un constituyente esencial de las proteínas, y se necesitan grandes cantidades del mismo para todas las formas de vida. Sin embargo, aunque se encuentra constituyendo casi el 80% de la atmósfera terrestre, es químicamente inerte, y no puede ser aprovechado por la mayoría de los organismos. Todas las plantas y animales, así como la mayoría de los microorganismos, dependen de una fuente de nitrógeno combinado o fijado para su nutrición. El nitrógeno combinado en forma de amonio, nitrato y compuestos orgánicos, es realmente escaso en el suelo y agua y a menudo constituye una limitante para el desarrollo de los seres vivos. Por esta razón el ciclo de transformación de los compuestos del nitrógeno, es de gran importancia para el abastecimiento de las formas de nitrógeno requerido para las diversas clases de organismos de la biosfera (Brill, 1981; Fassbender y Bornemisza, 1987; Döbereiner, 1989).

#### Ciclo del nitrógeno en la naturaleza.

Antes de analizar el metabolismo nitrogenado en las

plantas, describiremos lo que se conoce como el ciclo del nitrógeno en la naturaleza (figura 1):

Alguna cantidad del nitrógeno atmosférico, puede ser fijado mediante descargas eléctricas, luz ultravioleta, equipo eléctrico y por combustión interna, sin embargo estos procesos no biológicos son cuantitativamente insignificantes, juntos aportan solo el 0.5% de la fijación total de nitrógeno. Adn la fijación industrial, que involucra el proceso de Haber, en el cual el nitrógeno molecular es reducido a amoníaco empleándose condiciones de 100-300 atmósferas de presión y temperaturas de 400-600°C en presencia de catalizadores, contribuye con tan solo el 5%. Así, cerca del 90% de todo el nitrógeno fijado es aportado por la fijación biológica (Postgate, 1976; Brill, 1981; Fassbender y Bornemisza, 1987).

El nitrógeno atmosférico es fijado por algunos microorganismos (fijadores) y convertido en nitrógeno inorgánico reducido (amonio), el cual puede ser oxidado a nitrito por las bacterias autotróficas del género Nitrosomas, mientras que las del género Nitrobacter convierten este nitrito en nitrato, proceso denominado nitrificación. Este nitrato es absorbido por las plantas y reducido hasta amonio e incorporado en algunos aminoácidos y otros compuestos nitrogenados como proteínas, ácidos nucleícos, vitaminas, etc. Los compuestos vegetales son ingeridos por los animales, quienes los degradan para incorporarlos a sus propios componentes nitrogenados. El nitrógeno pasa así de un animal

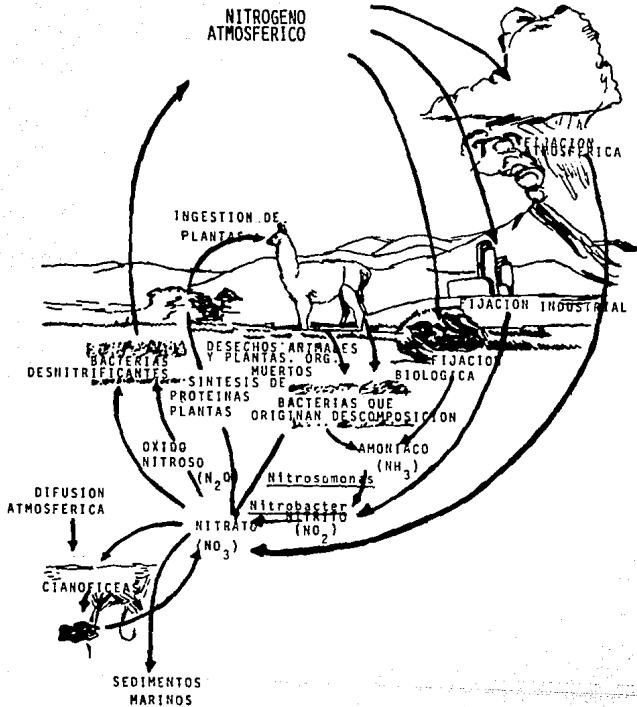


FIGURA 1. CICLO DEL NITROGENO. MODIFICADO DE BRILL, 1981 Y DEVLIN, 1982.

a otro devolviéndolo finalmente al suelo cuando el animal muere o excreta sus productos de desecho; la flora microbiana aprovecha estos compuestos para su propio crecimiento y de esta manera, el nitrógeno puede ser convertido de nuevo en amonio o nitratos que podrán ser asimilados por las plantas y así sucesivamente. Finalmente existen algunos microorganismos que reducen el nitrato nuevamente en nitrógeno molecular (desnitrificación) y de esta manera lo regresan nuevamente a la atmósfera (Brill, 1981; Döbereiner, 1989).

La fijación biológica del nitrógeno molecular, puede ser llevado a cabo solamente por un limitado número de organismos entre los que se encuentran (Mazliak, 1976; Postgate, 1976; Fassbender y Bornemisza, 1987):

A. Microorganismos autónomos fijadores de nitrógeno. En este grupo se incluyen:

- Bacterias aerobias, por ejemplo: Aerobacter, Azotobacter, Beijerinckia; y las anaerobias como bacterias fotosintéticas y Clostridium spp.

- Algas azules (cianofíceas) de los géneros Anabaena, Colothrix, Fischerella y Nostoc.

- Hongos microscópicos como son Rhodotorula, Pullularia y Nocardia.

B. Vegetales simbióticos fijadores del nitrógeno:

- Los miembros de la familia de las leguminosas como el guisante, el trébol, la soya, etc.; que establecen relación con bacterias endófitas del género Rhizobium.

\* Ciertos vegetales pertenecientes a otras familias de angiospermas, los cuales también son portadores de nódulos: Myrica gale, Hippophae rhamnoides, en los que el microorganismo endófito es un hongo actinomicete.

La fijación de nitrógeno en las leguminosas requiere de la cooperación de la planta huésped con las bacterias presentes en los nódulos radicales, denominándose a este proceso, fijación simbiótica del nitrógeno. Las bacterias que invaden las raíces de las leguminosas son principalmente especies del género Rhizobium (Devlin, 1982).

La familia Leguminosae posee 13 000 especies, de las cuales 200 son cultivadas por el hombre. Esta familia se divide en tres subfamilias; la más grande de las tres es la Papilionoidae, a la cual pertenecen los géneros Trifolium, Melilotus, Medicago, Lotus, Phaseolus, Dalea, Crotalaria, Vicia, Pisum y Lathyrus (Jones y Luchsinger, 1979).

El frijol Phaseolus vulgaris L. pertenece a la familia Leguminosae, subfamilia Papilionoidae, tribu Phaseoleae, subtribu Phaseolinae. El género Phaseolus cuenta con 180 especies aproximadamente, de las cuales, se pueden encontrar 50 en México. Las principales especies que se cultivan en nuestro país son: Phaseolus vulgaris L. (frijol común), P. coccineus L. (frijol ayacote), P. lunatus L. (frijol lima) y P. acutifolius Gray (frijol tepary). La especie más importante cultivada para la alimentación en nuestro país es Phaseolus vulgaris L., la cual se cultiva en lugares que oscilan entre cero y 2200 metros sobre el nivel del mar, pero



en general crece en climas templados y cálido húmedos. El frijol crece en todo tipo de suelos, donde no exista exceso de sales ni encharcamientos, aunque se da mejor en los suelos ligeros, no crece bien en tierras muy ácidas o alcalinas (Miranda, 1979).

La familia Rizobiaceae esta caracterizada por el género Rhizobium cuya principal característica radica en la capacidad de nodular principalmente a las leguminosas. Esta bacteria es gram negativa, no forma esporas, es un bacilo aerobio de 0.5 a 0.9 $\mu$  de ancho y de 1 a 3 $\mu$  de largo (Vincent, 1980; Okon et al, 1987).

Dentro del género Rhizobium se distinguen seis especies diferentes, que se clasifican de acuerdo al tiempo de generación y según el tipo de huésped que infecten en:

1. Tiempo corto de generación. Las bacterias de este tipo se reproducen en un tiempo de 2 a 4 horas, y son capaces de producir ácidos en los medios de cultivo. Pertenecen a este grupo R. leguminosarum que infecta al chícharo, R. meliloti a la alfalfa, R. phaseoli al frijol y R. trifolii al trébol.

2. Tiempo largo de generación. Estas bacterias se reproducen en un tiempo de 6 a 8 horas, y producen condiciones alcalinas en el medio. En este grupo se clasifica el género Bradyrhizobium caracterizado por B. japonicum que infecta al frijol de soya (Alexander, 1960; Okon et al, 1987 y Long, 1989).

Importancia del estudio de la fijación simbiótica del nitrógeno.

La mayoría de las leguminosas son de importancia agrícola y económica, pues debido a su riqueza nutricional, son cultivadas para alimento humano y forraje. Además tienen la habilidad de crecer en suelos deficientes de nutrientes y contribuyen a la fertilización del suelo por la simbiosis que establecen con las bacterias fijadoras de nitrógeno.

Asimismo, se obtienen drogas, resinas, recursos industriales como concentrados proteínicos, mucílagos y otras materias primas; además de ser una de las plantas con mayor calidad alimenticia que se conoce, ya que es una fuente de proteínas que se consigue a bajo precio; además, es una de las plantas más aprovechadas, se comen sus flores, sus vainas frescas (ejotes) y las semillas tiernas o secas y la planta sirve como abono. Durante su desarrollo, el frijol fija nitrógeno al suelo (5 Kg de N/ha/año), mientras que su contenido de proteína y triptofano en 100 g de materia seca es de 34.21 y 0.345 gramos respectivamente (Fassbender y Bornemisza, 1987).

En México, la importancia del cultivo de leguminosas especialmente el frijol, es notable. Aproximadamente el 70% de la superficie total cultivable de nuestro país se destina a productos básicos de la demanda alimenticia popular. El frijol ocupa, el segundo lugar en importancia después del maíz. En 1983 la superficie cosechada de frijol fue de 1,763,347 hectáreas, de las cuales se obtuvo una producción

de 1,282,000 toneladas (INEGI, 1986).

La investigación de la fijación del nitrógeno se ha incrementado debido a la importancia que tiene en la agricultura el agotamiento de las fuentes de nitrógeno en el suelo, la crisis mundial de alimentos y el hecho de la utilización de fertilizantes nitrogenados, obtenidos por el proceso de Haber, que requiere de gran cantidad de energía (Alexander, 1980; Okon *et al.*, 1987).

Se ha observado que una de las alternativas para aumentar la producción en las cosechas de las plantas de leguminosas, es el de la inoculación suplementaria en el suelo de cepas bacterianas, obteniendo resultados de gran importancia agronómica (Alexander, 1980).

Se ha estimado que Rhizobium en asociación simbiótica con las leguminosas fija alrededor de  $90 \times 10^6$  toneladas de nitrógeno por año, alrededor del doble de la cantidad fijada por la industria química y la mitad del total de la fijación biológica en cada año (Alexander, 1980).

#### Estructura y desarrollo de los nódulos.

La secuencia de eventos conducentes a la formación de un nódulo, sobre la raíz de una planta fijadora de nitrógeno, es larga y compleja. Mazliak (1976), Dazzo *et al.* (1979), Vincent (1980), Leigh *et al.* (1985), Okon *et al.* (1985), Noel *et al.* (1986), Döwnie *et al.* (1986), Martínez *et al.* (1987), Okon *et al.* (1987) y Gloude mans y Bisseling (1989); resumen los hechos de la forma siguiente:

1. Una joven plántula de leguminosa, desarrollándose en el suelo, libera por sus raíces ciertas sustancias que incluyen flavonas, biotina, azúcares y aminoácidos que atraen químicamente a los rizobias del suelo.

2. En respuesta a la presencia de los agentes atrayentes, las bacterias se multiplican activamente y se disponen en agrupaciones de hasta ocho filas de bacterias unas junto a otras, alrededor de los pelos absorbentes de las raíces. Las bacterias se hallan incluidas en un material mucoso denso, limitadas en su parte externa por una especie de pared (figura 2A).

3. En el siguiente paso las bacterias segregan sustancias hormonales, (posiblemente ácido indolacético y giberelinas) que inducen la curvatura de gancho de numerosos pelos absorbentes. Las células del huésped, en respuesta a la presencia bacteriana, segregan en el medio la enzima poligalacturonasa que modifica la textura de las paredes pecto-celulósicas aumentando considerablemente su plasticidad (figura 2B).

4. La infección de la planta huésped se realiza entonces por penetración, generalmente a través de la extremidad de un pelo absorbente, de un filamento infeccioso que se dirige a través del protoplasma. Las bacterias al entrar al pelo radicular, disuelven parcialmente la pared celular y posteriormente el huésped deposita material celular en el sitio de la infección formando una estructura tubular, el filamento infeccioso. Dentro de el filamento bacteriano, las

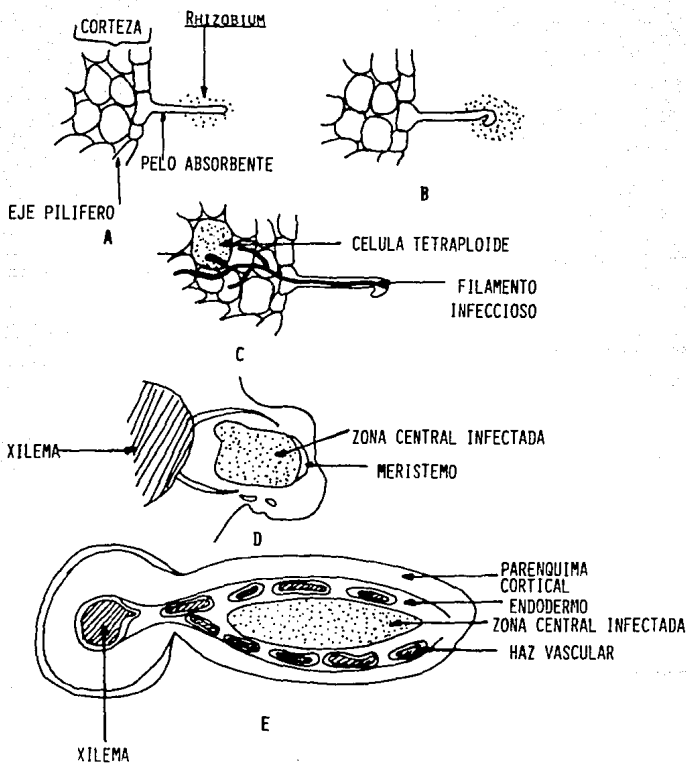


FIGURA 2. DESARROLLO DE UN NODULO SOBRE LA RAIZ PRIMARIA DE UNA LEGUMINOSA (GUISANTE). ESQUEMATICO. (MAZLIAK, 1976).

A-C INFECCION DE UN PELO ABSORBENTE. FORMACION DEL FILAMENTO INFECCIOSO CARGADO DE BACTERIOIDES.

D-E CRECIMIENTO DEL NODULO (OBSERVADO EN UN CORTE ANATOMICO TRANSVERSAL).

bacterias proliferan y se rodean de una matriz de mucopolisacáridos que se extiende y ramifica de célula a célula, a través del parénquima cortical de la raíz (figura 2C).

5. En ciertas células del huésped, generalmente tetraploides, los extremos de los filamentos bacterianos explotan y los rizobia invaden toda la célula. Las bacterias son rodeadas de una membrana derivada de la planta, la membrana peribacteroide, y se multiplican activamente sufriendo cambios morfológicos considerables: aumento de tamaño, adquisición de formas diversas (en X, en Y, en T); las divisiones celulares cesan pronto y se diferencian en bacteroides capaces de fijar el nitrógeno atmosférico, alrededor de cuarenta veces más grandes que las bacterias iniciales. La célula huésped, paralelamente, ha aumentado aproximadamente diez veces su volumen. Los bacteroides examinados al microscopio electrónico, presentan en su citoplasma una red densa de lamelas (membrana periplásmica), que contienen a los citocromos. Esta red citoplásmica no existe en los rizobia del suelo.

6. El nódulo se forma sobre la raíz de la leguminosa como resultado de la multiplicación de las células tetraploides y diploides presentes en las regiones afectadas. Generalmente se diferencia una región meristemática hacia la periferia de la raíz. El conjunto de células que se forma se halla bien alimentado por la savia de los tejidos conductores de la raíz que envían ramificaciones hacia el nódulo en

formación. A menudo el endodermo central se ramifica alrededor de los vasos secundarios que alimentan al nódulo. Las células que no son infectadas se localizan entre las células infectadas y llevan a cabo funciones de soporte como por ejemplo la asimilación del nitrógeno fijado (figura 2D).

7. Ultraestructuralmente el nódulo bien formado, contiene en el centro, una región central totalmente infectada (rodeada por una matriz), en que las células del huésped están hinchadas, repletas de bacteroides y conteniendo en solución en su citoplasma la leghemoglobina, pigmento transportador de oxígeno, que establece un medio casi anaerobio (propicio para el desarrollo de los bacteroides) y que proporciona a la región central del nódulo una coloración rosada. Centralmente, se pueden observar haces vasculares que se ramifican hacia la periferia, asimismo se encuentran en la región central células con abundantes peroxisomas y retículo endoplásmico tubular. También se pueden observar pequeños microcuerpos típicos de las plantas indiferenciadas (figura 2E).

8. El desarrollo de los nódulos en una región de la raíz inhibe la emergencia de nódulos en regiones más jóvenes de ésta, este proceso se encuentra regulado mediante un fenómeno denominado aborto de la infección, lo que facilita la distribución de los nódulos en una densidad equivalente a través del sistema radical de la planta.

9. Los nódulos viejos pueden llegar a desgajarse de la planta huésped y degenerar en el suelo.

En estudios referentes a la morfología externa de los nódulos, Dart (1975) distingue tres tipos básicos:

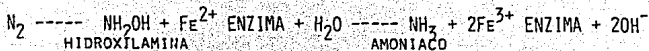
- a.- Elongado y cilíndrico con actividad meristemática apical, como los que se encuentran en el trébol.
- b.- Esférico, como en el frijol y el frijol de soya.
- c.- En forma de collar, como en Lupinus, donde los nódulos se extienden a lo largo de la raíz.

Para describir el comportamiento de los rizobia en su interacción con la planta, Vincent (1980), Downie et al (1986) describieron un código fenotípico para los eventos tempranos de infección: Koa, adhesión a la raíz; Roc, colonización de la raíz; Hab, ramificación del pelo radical; Inf, formación del filamento infeccioso y Noi, iniciación del nódulo.

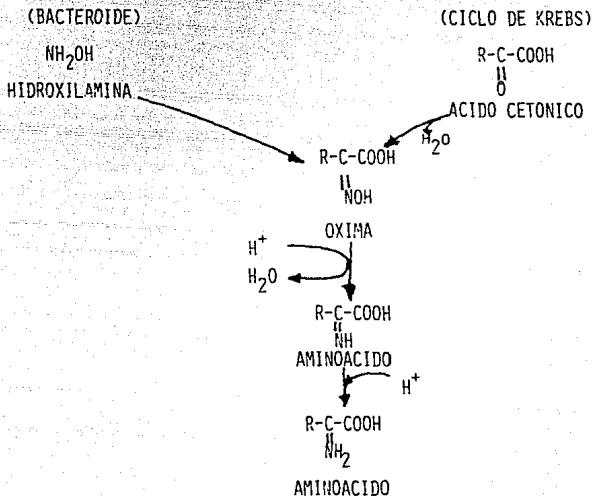
#### Mecanismo bioquímico de la fijación simbiótica del nitrógeno.

El mecanismo de la fijación simbiótica de nitrógeno es complicado y aun no se conoce íntegramente y en el que participan tanto células de la raíz como los bacteroides. Se sabe que los bacteroides rompen el triple enlace de la molécula de  $N_2$  y sintetizan un producto intermedio, la hidroxilamina, la cual se puede reducir a amoníaco en presencia de una enzima ferrosa (quizas la leghemoglobina) (figura 3a). Una de las características más importantes de la reacción, es la cantidad de energía consumida suministrada bajo la forma de ATP por medio del metabolismo de la glucosa o de otros glúcidos. Otra posibilidad es la reacción de la





### A. OXIDACION DE $\text{N}_2$ POR LOS BACTEROIDES



### B. REACCION DE LA HIDROXILAMINA CON ACIDO CETONICO.

FIGURA 3. MECANISMO DE LA FIJACION DE NITROGENO.  
(FASSBENDER Y BORNEMISZA, 1987).

hidroxilamina con ácidos cetónicos, derivados del ciclo de Krebs y la producción de aminoácidos, pasando por estados intermedios, como oxina y aminoácidos (figura 3b). Las formas finales de la síntesis de nitrógeno en la fijación son los aminoácidos, como el ácido glutámico y aspártico, formas orgánicas que participan en la formación de las proteínas vegetales (Fassbender y Bornemisza, 1987).

La reducción de nitrógeno a amoníaco está catalizada por un complejo de enzimas que, en conjunto, se denominan nitrogenasas (figura 4). El sistema nitrogenásico es un complejo de dos proteínas, una de ellas contiene molibdeno, hierro y azufre (simbolizado como Mo-Fe-proteína) y el otro componente es una flavoproteína (simbolizada como Fe-proteína). La relación que existe en el complejo es de una Mo-Fe-proteína por cada dos Fe-proteína. Se ha descubierto también que la ferredoxina es una proteína esencial para la fijación del nitrógeno ya que al ser reducida, actúa como donador de electrones al sistema nitrogenásico (Verma y Bal, 1976).

Las proteínas de la nitrogenasa se han denominado Componente I y Componente II. El Componente I tiene un peso molecular de 220,000 daltones, y está integrado por cuatro subunidades, cada una de las cuales es una cadena de aminoácidos, posee asimismo, 24 átomos de hierro y 2 átomos de molibdeno. El Componente II que tiene un peso molecular de 55,000 daltones, está formado por dos subunidades de proteína y comprende 4 átomos de hierro (Brill, 1981).

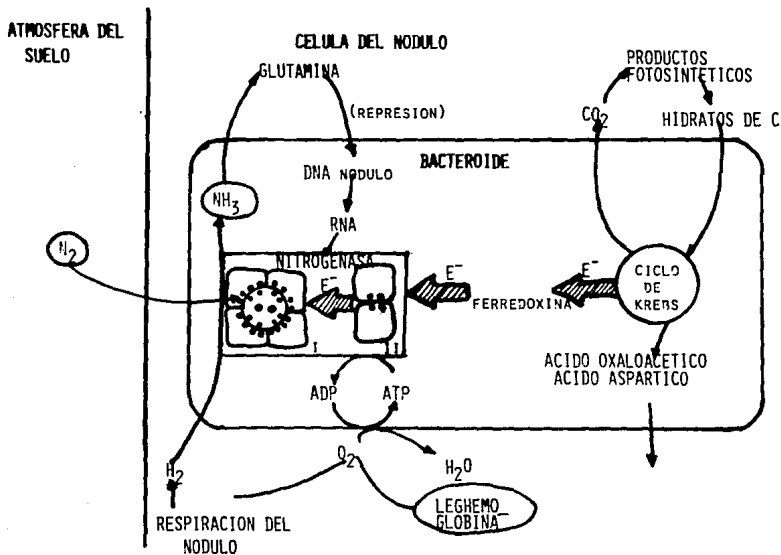
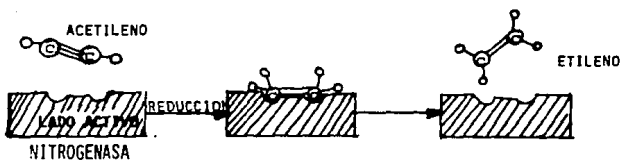


FIGURA 4. ESQUEMA DE LA FIJACION DEL NITROGENO POR EL NODULO DE UNA LEGUMINOSA. MODIFICADO DE BRILL, 1981 Y ROJAS GARCIDUEÑAS, 1984.

En una secuencia hipotética de sucesos en la fijación de nitrógeno se puede apreciar en la figura 5. La secuencia se basa, en parte, en el mecanismo supuesto para el ensayo de la reducción de acetileno, una prueba de la actividad de la nitrogenasa. En ausencia de nitrógeno, la nitrogenasa convierte el acetileno en etileno; se reduce un triple enlace a un doble enlace y se añaden dos átomos de hidrógeno. Por su tamaño y por la presencia del triple enlace, el nitrógeno molecular se parece al acetileno; de ahí que sea lógico suponer que la nitrogenasa actúe de forma similar sobre las dos moléculas. Si ello sucede así, uno de los compuestos intermedios de la fijación del nitrógeno podría ser una molécula llamada diimida. Cuando se utiliza acetileno como sustrato de la nitrogenasa, la reducción se detiene tras el primer paso, y el producto liberado es el etileno. La acción de la enzima sobre el nitrógeno es distinta; cada átomo de nitrógeno se reduce tres veces, adquiriendo tres electrones, y convirtiéndose en molécula de amoníaco (Brill, 1981).

La leghemoglobina al transportar oxígeno de la superficie del nódulo hacia los bacteroides o viceversa, mantiene una adecuada presión parcial del mismo, para ser utilizado en la fosforilación oxidativa sin dañar la función de la nitrogenasa de los bacteroides (Verma y Bal, 1976; Okon et al., 1987).

## REDUCCION DEL ACETILENO



## FIJACION DE NITROGENO

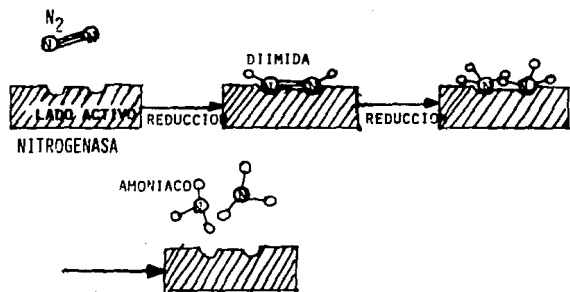


FIGURA 5. SECUENCIA HIPOTETICA DE SUCESOS EN LA FIJACION DE NITROGENO.  
(BRILL, 1981).

Factores que modifican la eficiencia de la fijación  
simbiótica del nitrógeno.

Es determinante para la formación del nódulo, el rango de efectividad, que se define como la capacidad que tiene la bacteria para reducir nitrógeno. Los factores del medio ambiente pueden influir en la efectividad, así como los medios muy ácidos o los muy alcalinos (Vincent, 1975; Alexander, 1980; Fassbender y Bornemisza, 1987 y Osbereiner, 1989) (figura 6).

Los factores del medio que afectan la fijación del nitrógeno atmosférico según Phillips et al (1976), Mazliak (1976), Dejong y Phillips (1981), Eardly et al (1985), Sheehy et al (1985) y Streeter (1986) son:

1. Relación C/N. Existe para cada planta simbiótica fijadora de nitrógeno un valor crítico de la relación C/N (masa de carbono orgánico/ masa de nitrógeno orgánico) correspondiente a un rendimiento óptimo de los sistemas de fijación del nitrógeno atmosférico. Experimentalmente, se actúa sobre la relación C/N, ya sea suministrando masivamente nitrógeno combinado al medio, o modificando la nutrición carbónica al variar la tasa de fotosíntesis. Toda desviación de la relación C/N de este valor crítico óptimo representa un descenso simultáneo en la eficiencia de formación de nódulos y de la fijación.

2. Efecto del suministro de nitrógeno combinado. El suministro de nitrógeno combinado (bajo forma de amoníaco o nitrato) a las plantas simbióticas fijadoras de nitrógeno,

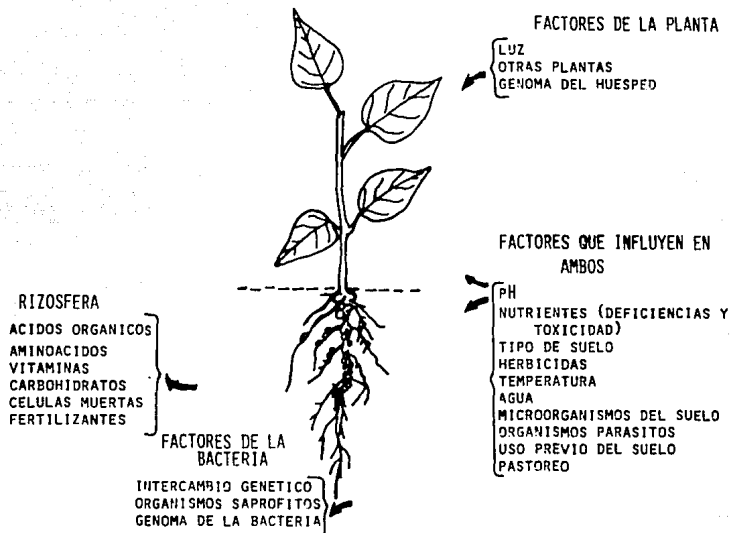


FIGURA 6. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA EFICIENCIA DE LA FIJACION SIMBIOTICA DE NITROGENO. (DOWLING Y BROUGHTON, 1986).

inhibe considerablemente la fijación. De esta forma, cuanto más nitrógeno combinado se aporta, más débil es la fijación de nitrógeno atmosférico, si bien dosis muy bajas de nitrógeno amoniacal pueden a veces revelarse estimulantes. El número de nódulos así como la eficacia bioquímica de los mismos en la fijación se disminuyen directamente en función de la cantidad de nitrógeno aportado. El efecto inhibitor de la incorporación de nitratos es todavía más marcado que el del amoníaco.

3. Efecto de la incorporación de nutrientes carbonados. Si se aumenta la intensidad de la fotosíntesis de la planta huésped (por aumento de energía lumínica suministrada o por incremento de la concentración de  $\text{CO}_2$  en la atmósfera) el efecto inhibitor del aporte del nitrógeno combinado resulta disminuido. Una fotosíntesis muy activa conduce no obstante, a una reducción de la fijación del nitrógeno atmosférico. La separación de los nódulos de la planta madre y su cultivo in vitro, representa una disminución considerable de la fijación del nitrógeno. Este efecto negativo sobre la fijación puede ser reducido mediante el suministro de glúcidos a los cultivos de nódulos aislados.

4. Efecto de la temperatura sobre la fijación del nitrógeno. Las plantas de frijol crecen bien a  $30^\circ\text{C}$  en tierra enriquecida en nitrógeno combinado, mientras que la fijación cesa si pasamos de  $20^\circ\text{C}$  como mínimo y de  $30^\circ\text{C}$  como máximo. A temperaturas superiores a  $30^\circ\text{C}$  los nódulos son todavía más numerosos, pero están anormalmente pigmentados. Las enzimas



que intervienen en este proceso, son fácilmente desnaturalizadas por las temperaturas elevadas aunque las temperaturas bajas las afectan menos.

5. Efecto del pH. Las enzimas que participan en la fijación del nitrógeno atmosférico son muy sensibles a las variaciones de pH. La mayoría de las leguminosas fijadoras de nitrógeno se desarrollan normalmente en suelos con pH de 5 a 6; fuera de estos límites, la fijación cesa mientras que las plantas pueden crecer bien a pH de 4, por ejemplo, si se hallan provistas de nitrógeno combinado (nitrato amónico). El proceso de formación de nódulos parece particularmente inhibido por los pH bajos.

6. Efecto de la iluminación. El desarrollo de las plantas fijadoras de nitrógeno está directamente controlado por la intensidad de la iluminación recibida. Las iluminaciones muy intensas originan generalmente una inhibición de la fijación, una posible causa es que el ácido  $\beta$ -indolacético, que interviene en la formación de los nódulos, es destruido por la luz.

7. Efecto de la composición iónica del suelo. Los tres iones principales que ejercen un efecto marcado sobre la fijación de nitrógeno atmosférico son: el cobalto, el molibdeno y el hierro. La planta utiliza el cobalto para la síntesis de la vitamina B<sup>12</sup> (cobalamina), que es una de las coenzimas encontradas en los nódulos y que actúa como factor de crecimiento para las bacterias simbióticas, y que también es indispensable para la síntesis de la leghemoglobina. La

carencia de molibdeno determina rápidamente la deficiencia de nitrógeno de las leguminosas: se retrasa el crecimiento y las hojas se vuelven cloróticas. En caso de deficiencia, todo el molibdeno disponible se concentra en los nódulos y los bacteroides. Finalmente, el hierro, forma parte de la composición de todos los transportadores electrónicos implicados en la fijación (citocromos, ferredoxina) y además entra en la fórmula de la leghemoglobina. En los nódulos muy jóvenes, las reservas de hierro van asociadas a una proteína, la ferritina, contenida a menudo en el interior de los plastos.

6. Efecto de la composición gaseosa de la atmósfera. Al nivel de los centros activos de las enzimas, en el interior de los nódulos, la presión parcial de nitrógeno ( $pN_2$ ) es realmente inferior a la presión parcial de dicho gas en el aire. De los experimentos realizados tanto con plantas enteras como con nódulos cultivados in vitro, resulta que la fijación óptima se consigue a presiones parciales del orden de 0.1 atmósferas para las leguminosas. El hidrógeno es un inhibidor competitivo del nitrógeno en el proceso de fijación, asimismo, inhibe considerablemente el crecimiento en medios desprovistos de nitrógeno, cuando el aire es la única fuente disponible de este elemento y no tiene efecto sobre las plantas que crecen con una fuente de nitrógeno combinado. Se ha demostrado que los nódulos en fase de fijar nitrógeno pueden desprender un poco de hidrógeno gaseoso, lo cual indica la posible existencia de una hidrogenasa en los

mismos. Las presiones parciales de oxígeno relativamente elevadas (0.5 atmósferas) favorecen la fijación de nitrógeno atmosférico por las leguminosas. No obstante, la penetración del oxígeno en el interior de los nódulos está considerablemente frenada, posiblemente por la pared que rodea a los bacteroides. Se ha visto que la respiración de los bacteroides es óptima cuando la presión parcial de oxígeno alrededor de los nódulos es de 0.9 a 1 atmósferas. El monóxido de carbono inhibe la fijación a dosis ínfimas ( $pCO = 0.0001$  atmósferas) que no son inhibitorias de la respiración ni del crecimiento con una fuente de nitrógeno combinado.

Otros factores que rigen la fijación del nitrógeno, son el tipo de leguminosa, el contenido de nitrógeno inorgánico o mineralizable en el suelo, el nivel de fósforo y potasio y los nutrientes utilizables (Alexander, 1980; Graham en Alexander, 1984).

Por otro lado, la biosíntesis de la enzima nitrogenasa está regulada por la disponibilidad de amoníaco, el cual detiene la producción de la enzima. Así, la fijación del nitrógeno tiene lugar solamente cuando el producto es requerido por la célula (Brill, 1981; Hombrecher *et al.*, 1981).

#### Parámetros fisiológicos usados para estimar el crecimiento de la planta.

El crecimiento de las plantas, como en todos los organismos consiste en un aumento irreversible de tamaño,

generalmente acompañado de un aumento en peso seco y en cantidad de protoplasma. Las variables más usadas para estimar el crecimiento vegetal son el peso seco de la planta o de órganos de la planta y el área foliar. El peso seco de la planta se expresa generalmente en gramos por área sembrada. Frecuentemente se le conoce también como materia seca. El peso seco puede resultar equívoco ya que incluye el peso de las sales absorbidas del suelo por la planta y esto no necesariamente se vincula en forma directa con la cantidad de crecimiento. Sin embargo, los errores que proceden de este origen suelen ser pequeños y no hay ninguna duda de que el peso seco constituye la más útil de las medidas de crecimiento que pueden determinarse simplemente (Ballesteros, 1983).

El área foliar es una característica que depende de factores como tamaño, número de hojas, disposición espacial de las mismas y asimismo está influenciada por factores extrínsecos tales como cantidad de luz interceptada, densidad de la siembra, fertilización, etc. El área foliar es un factor esencial en el proceso de la interceptación de la energía radiante y su medición es muy importante cuando se estudia el crecimiento foliar, la actividad fotosintética y la transpiración (Ballesteros, 1983).

Los estimadores del crecimiento vegetal fueron sintetizados por Wallace et al., (1972); de los cuales destaca la RAF (relación de área foliar), área foliar por unidad de peso seco de la planta y la razón de vástago-raíz. La RAF

indica la proporción relativa de superficie asimilatoria que contribuye al peso de la planta, el área foliar dividida entre el peso seco de las hojas. La razón de vástago-raíz es el parámetro más común para evaluar la relación entre el crecimiento de la porción aérea de la planta y el crecimiento de la porción subterránea. El rendimiento puede ser considerado como la resultante final de los procesos fisiológicos que se reflejan en la morfología de la planta. Wallace et al (1972) citan el término componentes fisiológicos del rendimiento en frijol y para ello se refieren al área foliar por unidad de peso, intercambio neto de CO<sub>2</sub> y eficiencia en la translocación de fotosíntatos.

Cuando las condiciones experimentales son tales que el nitrógeno asimilable es el principal factor limitativo del desarrollo de la planta, la simple determinación del peso de ésta es probablemente lo más adecuado. El nitrógeno total y el rendimiento de la planta están en realidad muy correlacionados aunque puede perderse cierto grado de diferenciación cuando se usa peso seco, debido a la mayor concentración de nitrógeno en el tejido de plantas con una adecuada cantidad de este elemento, que en plantas deficientes (Vincent, 1975).

Se ha comprobado que la relación entre la parte aérea de las plantas y las raíces es mayor cuando las plantas poseen un adecuado nivel de nitrógeno que cuando carecen de este elemento, la diferenciación entre los niveles de fijación basada en el peso seco pueden perfeccionarse utilizando

solamente los pesos de la parte aérea. Este es un indicio de que las raíces poseen más bajo contenido de nitrógeno que los brotes (Vincent, 1975).

En lo referente a la relación vástago-raíz, Rojas (1984) menciona que un alto contenido de nitrógeno en el suelo tiende a hacer crecer al tallo significativamente, mientras que la falta de humedad estimula el crecimiento radical.

#### Genética de Rhizobium.

Los estudios más ambiciosos para incrementar la producción de nitrógeno se basan en la modificación genética y a la fecha se han realizado considerables progresos, entre los cuales destacan (Beringer et al., 1980; Okon et al., 1987):

1. Desarrollo de técnicas que involucren la transferencia de genes y que conduzcan a un análisis genético de los cromosomas de Rhizobium.

2. Caracterizaciones físicas y genéticas de plásmidos involucrados en la simbiosis.

3. Uso de mutantes que permitan establecer los cambios que presentan durante la infección y nodulación en el proceso de la fijación simbiótica del nitrógeno.

La información disponible acerca de las funciones genéticas de los plásmidos localizados en Rhizobium es aún limitada, sin embargo, es posible dar alguna idea sobre éstas:

- A. Capacidad de nodulación. Casse et al. (1979) reportaron que al extraer el plásmido de una cepa de

Rhizobium leguminosarum, los chícharos infectados con esta cepa no presentaban nódulos. Observaciones similares fueron realizadas por Zurkowski y Lorkiewicz (1978) y Lie y Winarno (1979), al ser capaces de restaurar la capacidad de nodulación de cepas Nod- de R. leguminosarum, introduciendo el plásmido faltante.

Los genes de Rhizobium necesarios para inducir la nodulación son los llamados genes nod, los cuales intervienen en la curvatura del pelo radicular, en el crecimiento infeccioso y directa o indirectamente en la regulación de la expresión de genes. Se han identificado varios genes nod (los cuales se localizan en el plásmido Sym), a los que se denominan genes nodABCD y se ha observado que son adyacentes a genes involucrados en la función de fijar nitrógeno (nif A, fix A) en el nódulo. De los genes nodABCD, el gen nodD parece ser regulador de los otros nod ABC y de otros nod operones (Nuti et al., 1979; Quinto et al., 1982; Zimmerman et al., 1983; Martínez et al., 1985; Okon et al., 1987; Long, 1989 y Gloude-mans y Bisseling, 1989).

B. Fijación de nitrógeno. Es ahora conocido que parte del sistema de fijación de nitrógeno de las bacterias se encuentra codificado por los plásmidos, esto se sabe por los trabajos de Ruvkun y Ausubel (1980) y de Nuti et al. (1979).

En el trabajo realizado por Borthakur et al. (1985), una cepa de Rhizobium phaseoli sin el plásmido pRP2J1 retuvo su habilidad de producir exopolisacáridos. Sin embargo una región de este plásmido, al ser transferido a otras cepas de

Rhizobium, inhibió la síntesis de los exopolisacáridos. El gene responsable, denominado psi fue localizado en la región del plásmido simbiótico. Se propone como conclusión de este trabajo que la función del gene psi puede reprimir la expresión de genes en el bacteroide, así como la síntesis de exopolisacáridos y traer como consecuencia modificaciones en la fijación de nitrógeno.

C. Especificidad. Un considerable número de investigadores ha reportado el cambio de infectividad de Rhizobium por plásmidos en diferentes cultivos de leguminosas. La transferencia de derivados del plásmido pRL1J1 de R. leguminosarum a cepas de R. phaseoli y R. trifolii ha mostrado que en clones transcojugantes se confiere la habilidad de nodular chícharos en lugar de sus huéspedes normales (Johnston et al., 1978).

Sin embargo existen ciertas restricciones como en la cepa TOM de R. leguminosarum que es capaz de nodular cultivos de chícharos primitivos (Afganistán), que no pueden ser nodulados por cepas de R. leguminosarum europeas (Lie y Winarno, 1979).

D. Producción de bacteriocinas en el medio. El trabajo de Hirsch (1979), permitió especificar el papel de las bacteriocinas (producidas por los plásmidos pequeños), las cuales parecen estar relacionadas en la competencia con otras cepas de Rhizobium (Brewin et al., 1980).

La mayoría de las bacteriocinas, son un grupo de sustancias, (generalmente proteínas de alto peso molecular)



que intervienen en el proceso de competencia entre diferentes especies de bacterias (Brock et al., 1984).

E. Pared celular de polisacáridos. La superficie celular de Rhizobium ha tenido gran interés, ya que posiblemente tenga un papel primordial en las primeras etapas de reconocimiento. De los componentes de la superficie celular, los que más destacan son los carbohidratos. Estos se encuentran constituidos por los extracelulares (o exo-) polisacáridos (EPS), polisacáridos capsulares (CPS),  $\beta$ -glucanos cíclicos, y lipopolisacáridos (LPS) (Long, 1989).

Los componentes estructurales de los exopolisacáridos sintetizados por varias especies de Rhizobium se pueden dividir en polisacáridos ácidos y polisacáridos neutros. Los exopolisacáridos ácidos están constituidos por hexosas y ácidos urónicos, sin embargo estos constituyentes varían de acuerdo a la especie de Rhizobium. Los componentes neutros de los polisacáridos contienen  $\beta$ -glucanos. Aproximadamente del 5 al 10% del total de los polisacáridos secretados por las especies de Rhizobium de crecimiento rápido, están compuestas por  $\beta$ -2-glucanos. Los  $\beta$ -glucanos son compuestos cíclicos con alrededor de 20 residuos de glucosa. Asimismo existe una fuerte relación entre la síntesis de  $\beta$ -1,2-glucanos y la adhesión y la infección de Rhizobium a la planta (Ko y Gayda, 1990).

Las mutantes deficientes en componentes de la superficie celular, han sido usadas para investigar el papel de esta última en la habilidad de la bacteria para infectar y nodular

a huéspedes específicos. Se han aislado para este fin, mutantes espontáneas de R. leguminosarum con niveles reducidos de polisacáridos extracelulares. Estas mutantes usualmente no nodulan a los trijoles, y este efecto es inversamente proporcional a la cantidad de polisacáridos extracelulares formados por la mutante. Esto indica que el componente superficial es importante en el proceso de nodulación. Para caracterizar a nivel bioquímico las alteraciones en la efectividad de la nodulación de estas mutantes, se emplea el mapeo de genes. Las mutaciones obtenidas con mutágenos como el ácido nitroso, guanidina nitrosa y etil-metilsulfonatos han permitido comenzar la construcción del mapa genético de R. meliloti y R. leguminosarum (Elkan en Alexander, 1984).

Una de las características de las células silvestres de Rhizobium es que producen grandes cantidades de exopolisacáridos (EPS), los cuales dan a las colonias en agar una apariencia mucóide (Muc+). Se ha sugerido que los EPS tienen funciones de gran importancia en la simbiosis planta-Rhizobium, incluyendo la necesidad de los EPS para la adhesión a las superficies de la raíz y la determinación de huéspedes específicos. Se han aislado mutantes de Rhizobium deficientes en la síntesis de EPS y de forma no mucóide (Muc-), que forman muy pocos nodulos fijadores de nitrógeno (Sanders et al., 1978; Napoli y Albersheim, 1980; Chakravorty et al., 1982).

Prakash et al. (1980) reportaron que un derivado de

Rhizobium leguminosarum Nod-, al cual se le extrajo el plásmido mayor, tuvo una alteración de polisacáridos extracelulares, demostrada por la presencia de morfologías coloniales rugosas. Como conclusión de este trabajo, los polisacáridos extracelulares y la cápsula de la bacteria pueden participar en la hipótesis de la especificidad en la interacción Rhizobium-leguminosa basada en características químicas de la superficie celular de Rhizobium, y trae como consecuencia una gran significancia del control de los plásmidos.

El número conocido de genes de R. meliloti que afectan a los EPS se han incrementado, debido a las múltiples mutagénesis de DNA relacionado a los seis genes exo originales. La mutación en al menos ocho de estos genes (exoA, exoB, exoC, exoF, exoL, exoM, exoP, exoQ) trae consigo un fenotipo exo-, que significa que el EPS-I no se sintetiza. Los genes exo se expresan durante la nodulación (Long, 1989).

F. Producción de pigmentos. Las colonias de R. phaseoli que se encuentren en cajas de Petri con extracto de levadura y triptona o en un medio mínimo con tirosina, producen un pigmento café oscuro que puede ser melanina. Si el plásmido es retirado, automáticamente se pierde la capacidad de producción de pigmento y la habilidad para formar nódulos efectivos (Beringer et al., 1980). Esto sugiere que la producción de pigmentos se encuentra controlada por el mismo plásmido que determina la capacidad de nodulación para Phaseolus, aunque sin embargo la importancia fisiológica del

pigmento es aún desconocida.

Los genes por parte de la planta son los llamados genes nodulínicos que solo se expresan en las raíces con nódulos, no así en las no infectadas o en cualquier otro tejido de la planta. Las proteínas que codifican a estos genes son las nodulinas. En base a la etapa del desarrollo del nódulo, estos genes se han dividido en genes nodulínicos tempranos y tardíos, los genes tardíos se expresan cuando comienza la morfogénesis y la fijación de nitrógeno. Un ejemplo de estas nodulinas es la leghemoglobina. Los genes tempranos empiezan a ser expresados durante la infección y la morfogénesis del nódulo. En la figura 7 se puede apreciar una representación esquemática del papel de los genes nodulínicos en diferentes etapas del desarrollo nodular. Los genes de la planta expresados en la pre-infección (por ejemplo en la etapa antes de formar el tubo infeccioso), no pueden ser llamados genes nodulínicos en el sentido de su descripción original, ya que no están expresados en un nódulo. Sin embargo, al estar relacionada la expresión de estos genes con la formación del nódulo también se encuentran formando parte de los genes nodulínicos tempranos (Gloude-mans y Bisseling, 1989).

Se han encontrado evidencias de que proteínas de ciertas plantas, llamadas lectinas, pueden interactuar con la bacteria que se encuentra colonizando a esta planta, por lo que se sugiere que influyen en el reconocimiento bacteria-planta (Postgate, 1980).

Las lectinas son proteínas o glicoproteínas que se unen

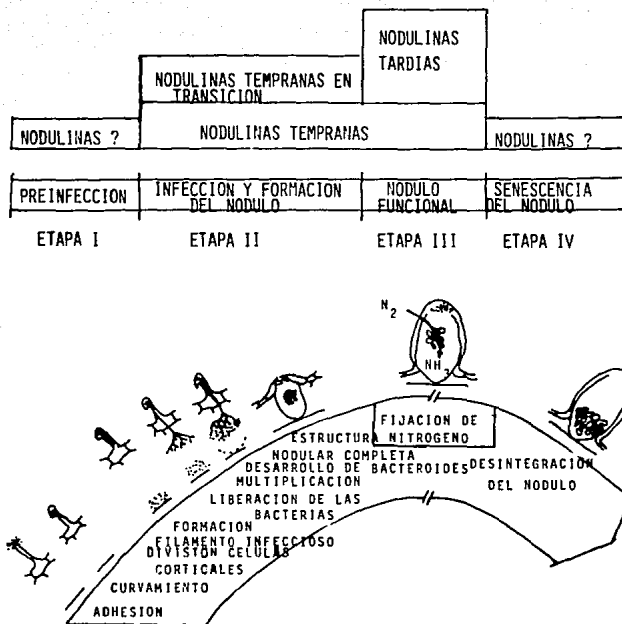


FIGURA 7. PAPEL DE LAS NODULINAS EN EL PROCESO DE INFECCION DE *RHIZOBIUM* A LAS LEGUMINOSAS. (GLOUDEMANS Y BISSELING, 1989).

a los azúcares y que aglutinan células en la simbiosis de Rhizobium con sus huéspedes específicos (Dazzo et al., 1979).

Sherwood, et al., (1984) sintetizaron in vivo la lectina del trébol llamada trifolina A, la cual es degradada en los ápices durante el desarrollo de la semilla mientras es nuevamente sintetizada por las raíces y excretada a la superficie radical para comenzar de nueva cuenta el proceso simbiótico.

#### Antecedentes.

La primera indicación de que las plantas podían fijar nitrógeno atmosférico fue obtenida por Boussingault en 1838, quien demostró que las leguminosas incrementaban el contenido de nitrógeno del suelo. En 1886 los fisiólogos alemanes H. Hellriegel y H. Wilfarth demostraron que las bacterias que habitan en los nódulos de las leguminosas eran responsables de este proceso; las plantas sin nódulos o que crecían en suelos estériles no podían fijar nitrógeno y no podían crecer en suelos deficientes en nitrógeno (Bidwell, 1979).

En 1979, Dazzo et al., propusieron la hipótesis de reconocimiento e inicio de la infección de la planta por lectinas, la cual explica la alta selectividad entre Rhizobium y la leguminosa. De acuerdo a esta teoría los sitios de iniciación de la infección en el pelo radicular de la leguminosa contienen lectinas, que reaccionan y forman un puente de unión con los carbohidratos de la superficie de Rhizobium.

A pesar de lo atractiva de esta hipótesis, aún existen cuestiones que necesitan respuesta (Alexander, 1984):

\* Los cultivos de Phaseolus vulgaris y Glycine max se han identificado como deficientes en la producción de lectinas, pero sin embargo existe la nodulación.

\* La hipótesis de reconocimiento por lectinas no ofrece una explicación para la competitividad entre cepas de Rhizobium que poseen polisacáridos externos similares.

Halliday (1984) ha sugerido que la efectividad en la habilidad de fijación de nitrógeno está condicionada a una óptima interacción entre Rhizobium y la leguminosa, por lo cual el nódulo debe de contar con bacteroides que fijen el nitrógeno activamente. El papel de los polisacáridos de Rhizobium en el proceso de nodulación ha sido objeto de gran interés.

Lamb, et al (1982) establecieron que los genes para producción de melanina y nodulación de Rhizobium phaseoli parecen estar íntimamente ligados, pero la producción de melanina no es necesaria para la inducción de nódulos fijadores en Phaseolus.

Chakravorty, et al (1982) aislaron una mutante de R. trifolii por mutagénesis con transposones (Tn5) la cual era incapaz de producir exopolisacáridos, además de formar nódulos no efectivos en la fijación de nitrógeno. En este trabajo se demostró que el transposón Tn5 era el responsable de ambos fenotipos que presentaban las mutantes y de la correlación entre la síntesis de exopolisacáridos y la

habilidad de fijar nitrógeno simbióticamente.

Arias et al (1979); Leigh et al (1985) y Geremia (1987), describieron el aislamiento de mutantes de Rhizobium meliloti incapaces de producir un polisacárido extracelular (exopolisacárido, EPS). Estas mutantes forman nódulos no efectivos, y así se establece una relación entre la capacidad de Rhizobium de producir un polisacárido y la capacidad de formar nódulos efectivos. Los EPS pueden servir de señal para la inducción de la curvatura del pelo radicular y la formación del filamento de infección.

Recientemente, para dilucidar la importancia de los EPS capsulares de Rhizobium en el fenómeno de la fijación simbiótica del nitrógeno, se han utilizado técnicas que involucran la mutagénesis con transposones y las de clonación molecular (Djordjevic et al, 1983).

La presencia en la superficie de las bacterias del género Rhizobium de exopolisacáridos capsulares y lipopolisacáridos (LPS) han sugerido la hipótesis de reconocimiento e inicio de la infección de la planta mediante lectinas. Algunos reportes presentan datos que muestran que la lectina de la planta huésped, se une a los LPS de la bacteria simbiótica (Zajac et al, 1975; Carlson et al, 1987).

Noel, et al (1986) han descrito dos mutantes de R. phaseoli, las cuales forman nódulos no efectivos que contienen filamento de infección anormales que son abortados. Se ha demostrado que las mutantes presentan alteraciones estructurales en los LPS.



Sin embargo Borthakur, et al (1986) encontraron que los exopolisacáridos no influyen en el proceso de nodulación y fijación de nitrógeno, la mutante exo- de Rhizobium phaseoli que aislaron, presentó nódulos normales fijadores de nitrógeno.

Engvild en 1987, concluye que algunas de sus mutantes obtenidas variaban en su fenotipo presentando nódulos blancos al crecerlas en un determinado ambiente y nódulos rojos al modificarlo, sin embargo la reducción de acetileno puede ser baja en ambos casos.

Otra observación de este tipo fue reportada por Ko y Gayda en 1990 al realizar pruebas de nodulación y fijación de nitrógeno positivas en mutantes exo- de Rhizobium fredii y como conclusión de su trabajo indican que ni los EPS ni los glucanos neutros son esenciales para la inducción de los nódulos determinados en esta especie de Rhizobium.

Las características de las cepas con que se trabajaron son:

1. CIAT 899 es una cepa de Rhizobium phaseoli aislado en Colombia en un suelo ácido. Puede crecer en medios de cultivo ácidos (rpH ácido) o en salinos (rpH alcalino). Es resistente a la rifampicina a 50 microgramos por mililitro (Rf<sup>r</sup>), crece en medios de cultivo Py, Ym y en medio Luria (Noel et al, 1984).

2. Cepas MSBV 01 a 07 son mutantes deficientes en la producción de exopolisacáridos obtenidas por mutagénesis con inserción de Tn5 a partir de la cepa CIAT 899 de Rhizobium

phaseoli (Nuñez, 1990).

Asimismo el frijol Canario 107, se caracteriza por tener un hábito de crecimiento de mata, posee semillas de forma reniforme y tamaño intermedio de color uniforme, totalmente café claro. Su flor es violeta y alcanza la madurez a los 107 días. Su fruto es una vaina que cuando madura es dehiscente y puede abrirse por las suturas ventral y dorsal. Las fechas de siembra son muy variables, pues siendo de cultivo de temporal, se inician cuando el período de lluvias se ha establecido (mayo, junio y julio) (Miranda, 1979).

### Justificación del proyecto.

La aplicación de microorganismos fijadores en forma de inoculantes a las leguminosas comestibles en nuestro país, ha sido muy limitada por diversos factores, con excepción de la soya en la cual se han obtenido resultados satisfactorios debido principalmente a que es un cultivo de introducción. Uno de los puntos importantes en la fabricación de inoculantes, es el de contar con cepas efectivas en la fijación de nitrógeno y específicas para nodular cada una de las variedades de leguminosas comestibles, asimismo que estas bacterias puedan adaptarse a las condiciones fisicoquímicas y ambientales del suelo o región inoculada, poseyendo a su vez competitividad para infectar al huésped cuando este sea cultivado en suelos donde se localizan o están implantadas otras cepas con grados menores para la fijación de nitrógeno.

La obtención de mutantes por tratamientos físicos, químicos o bioquímicos (utilización de transposones) y la puesta a punto de una técnica adecuada para la selección de razas idóneas habrá de permitir incrementar la eficiencia de la fijación. Al obtener variedades de leguminosas más susceptibles a la infección por Rhizobium y capaces de establecer una extensa e intensa simbiosis mutualística contribuirá a solucionar los problemas planteados por la falta de disponibilidad de proteína suficiente.

Para conocer los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo y la fisiología de la interacción Rhizobium-planta se han utilizado los métodos genéticos y de la biología

molecular (Eardly et al, 1985; Martínez et al, 1985).

Una de las estrategias más exitosa, ha sido la obtención y el análisis en el laboratorio de cepas mutantes con alteraciones en sus características necesarias para establecer la infección y la producción de nódulos efectivos (Djordjevic et al, 1985).

Sin embargo se ha observado que los conocimientos obtenidos en el estudio de la simbiosis Rhizobium-planta son específicos para cada especie, por lo que es necesario estudiar individualmente cada par bacteria-planta para su conocimiento a nivel básico y posteriormente proponer modificaciones que permitan mejorar la eficiencia de la fijación de nitrógeno.

En el estudio de las interacciones de Rhizobium-Phaseolus, no se ha alcanzado un nivel adecuado de conocimientos a comparación del alcanzado en otras especies de leguminosas, aunque ya se conocen datos sobre la organización de los genes de la nitrogenasa y la localización de éstos en el genoma bacteriano, así como algunos factores moleculares implicados en el reconocimiento de la bacteria al hospedero (Noel et al, 1984; Martínez et al, 1985; Eardly et al, 1985), se requiere de mayores estudios para llegar a una total comprensión de este proceso.

### Objetivos.

Verificar la infectividad y la efectividad de cepas mutantes deficientes en la producción de exopolisacáridos de Rhizobium phaseoli MSBV 01 a 07 en simbiosis con Phaseolus vulgaris var. Canario 107.

Para este fin planteamos los siguientes objetivos particulares:

1. Verificar la capacidad de las mutantes MSBV01 a 07 de Rhizobium phaseoli de nodular a Phaseolus vulgaris var. Canario 107, utilizando observaciones microscópicas y métodos histológicos.

2. Evaluar la capacidad de fijación de nitrógeno de las cepas MSBV 01 a 07 de Rhizobium phaseoli en Phaseolus vulgaris var. Canario 107.

3. Verificar que las bacterias inoculadas se encuentren realmente presentes en los nódulos de las raíces del frijol, y que sean las responsables de la fijación de nitrógeno.

### Estrategia.

Los pasos que se seguirán para cumplir con los objetivos propuestos son:

1. Observar los primeros pasos de la infección (adhesión, curvamiento y formación del nódulo) de las cepas mutantes en comparación con la cepa CIAT 899 utilizando unidades CP para el crecimiento de las plantas; asimismo se registrarán los días de adhesión, curvamiento, aparición de los nódulos y su distribución en la raíz. Se utilizará el método de tinción de safranina-azul de metileno para nódulos en diferentes etapas de desarrollo (de 1 a 4 semanas) con el objeto de verificar la presencia de bacteroides y seguir paso a paso los cambios morfológicos que se vayan presentando conforme se establece el nódulo.

2. Verificar la nodulación y su eficiencia en la fijación de nitrógeno, utilizando el sistema "jarra-botella" de Leonard para el crecimiento de plantas de frijol Canario 107, inoculadas con la cepa CIAT 899 y las mutantes MSBV 01 a 07, así como controles adecuados. A los 30 días se realizarán los análisis morfométricos, se verificará la nodulación y se evaluará la reducción de acetileno (para medir la actividad de la nitrogenasa) mediante cromatografía de gases.

3. Identificar a las bacterias presentes en los nódulos de frijol utilizando métodos bacteriológicos adecuados.

4. Realizar el análisis estadístico de los datos utilizando pruebas de varianza para los datos de análisis morfométricos y de reducción de acetileno.

Metodología.I. Inoculación de las semillas de Phaseolus vulgaris var.

Canario 107.

1.- Cuenta viable del inoculante. Las bacterias se pusieron a crecer en aproximadamente 10 ml de medio PY líquido (para preparar el medio PY líquido se disuelven 0.5 gramos de peptona de caseína y 0.3 gramos de extracto de levadura en 100 ml de agua destilada, al mismo tiempo se prepara un stock de cloruro de calcio 7 mM (77.69 g en 100 ml de agua destilada). Las soluciones se esterilizan a 1 kg de presión durante 15 minutos, una vez que el medio esta listo se agrega 1 ml del cloruro) durante toda la noche a 30°C en un baño de agitación (American optical modelo 406015). Al día siguiente, se midió la densidad óptica del inóculo a 620 nanómetros (10<sup>7</sup> cel/ml) en un espectrofotómetro (Spectronic 2000 Bausch & Lomb) y se igualó la concentración del inóculo utilizando medio PY líquido estéril.

2.- Inoculación. En un ambiente estéril, se tomó la suspensión bacteriana (10<sup>7</sup> cel/ml) y se colocó en el recipiente con las plantas de frijol Canario 107 y se dejó a que se embebieran por unos 10 minutos. Posteriormente se sembraron en el recipiente elegido y se agregó 1 ml de la suspensión bacteriana a la base del tallo de cada planta con el propósito de asegurar la presencia de bacterias.

## II. Pruebas de infectividad.

Para verificar la infectividad de Rhizobium (capacidad

de establecer una simbiosis efectiva) las plantas de frijol se germinaron en agrolita estéril durante 5 días, se inocularon con las cepas bacterianas (MSBV 01 a 07 y con CIAT 899) y se dejaron en la suspensión bacteriana durante una hora en la oscuridad. Posteriormente, las raíces fueron lavadas repetidamente con agua destilada estéril durante 5 minutos y se montaron en las unidades CP estériles (Almaraz, 1986) las cuales consisten de un recipiente de vidrio que en su interior contiene solución nutritiva y un papel absorbente y se encuentran selladas con papel aluminio (figura 8). Las unidades se dejan en un estante de luz fluorescente e incandescente con fotoperíodo de 12 horas oscuridad-12 horas de luz a 25°C con una humedad relativa de 75%.

Se observaron preparaciones de pelos radiculares teñidos con rosa de bengala al 1% (en solución alcohólica) al microscopio de contraste de fases (Zeiss) para observar la adhesión de acuerdo a la técnica propuesta por Bal et al (1978) y Dazzo et al (1984) a las 2, 4, 6, 12 y 24 horas de inoculación.

Asimismo mediante microscopía de contraste de fases se observó el curvamiento del pelo radicular en raíces de frijol teñido con rosa de bengala en solución alcohólica durante la primera semana después de ser inoculadas (Chakravorty et al, 1982; Zimmerman et al, 1983; Vasse y Truchet, 1984; Vandenbosch et al, 1985; Malek, 1988; Selker, 1988 y Truchet et al, 1989) y se registraron los días en que aparecieron los nódulos y su distribución en la raíz.



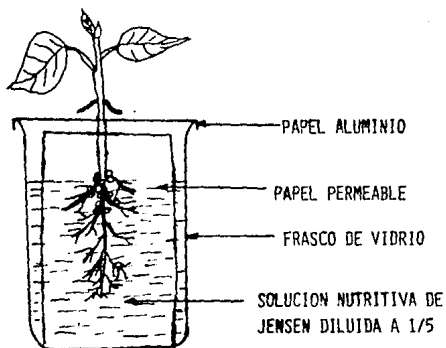


FIGURA 8. FOTOGRAFIA Y ESQUEMA DE UNA UNIDAD C<sup>o</sup>

Para la histología de los nódulos de Phaseolus vulgaris var. Canario 107, en diferentes etapas de desarrollo (de 1 a 4 semanas después de inocular) se utilizaron las unidades CP para crecer a las plantas inoculadas con las cepas bacterianas y se fueron tomando muestras de raíces a la primera semana y de los nódulos cuando ya se encontraban establecidos (de la segunda a la cuarta semana). las muestras se procesaron mediante la técnica de tinción con safranina-azul de metileno para observar la morfología histológica del nódulo y los cambios que se van presentando en su desarrollo. En esta técnica, se fija el material en FAA por 24 horas y posteriormente se lava en agua corriente durante 1 hora. El tejido se deshidrata en series de etanol (se realizan cambios de una hora en alcoholes graduales de 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 96 y absoluto), se aclara en alcohol absoluto-xilol 1:1 por 30 minutos y se transparenta en xilol de 20 a 30 minutos. El tejido es incluido en parafina (dos cambios de una hora) y se realizan cortes de 8 $\mu$  en el microtomo para parafina. Los cortes obtenidos se colocan en un baño maría de flotación a 40°C (al salir los cortes del microtomo la parte brillante se coloca hacia abajo y la opaca hacia arriba). Los cortes se recogen con portaobjetos que tengan unas gotas de gelatina al 1% sobre la superficie y se colocan en una placa de calor a baja temperatura.

Para desparafinar y teñir los cortes se siguen los siguientes pasos:

- a. Xilol: dos cambios de 5 minutos.

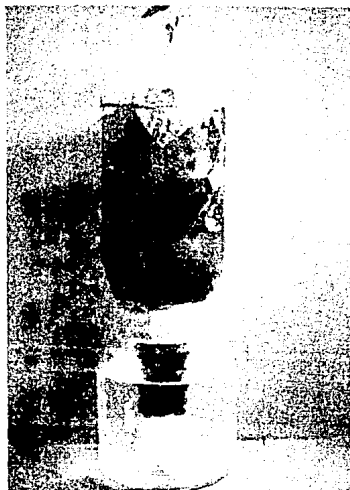
- b. Alcohol absoluto: dos cambios de 2 minutos.
- c. Alcohol de 96%: dos cambios de 2 minutos.
- d. Teñir con safranina por 15 minutos.
- e. Lavar con alcohol de 96 rápidamente.
- f. Teñir con azul de metileno por 5 minutos.
- g. Lavar con alcohol de 96 rápidamente.
- h. Alcohol absoluto por 3 minutos.
- i. Xilol- Alcohol absoluto por 2 minutos.
- j. Xilol por 2 minutos.
- k. Montar con bálsamo de Canadá.

### III. Pruebas de erectividad.

#### A. Construcción del dispositivo de "jarra-botella" de Leonard modificada.

El dispositivo consta de las siguientes partes (figura 9) (Vincent, 1975):

La mitad superior de la unidad consiste en una botella ámbar de cerveza (1 litro de capacidad) a la que se le ha quitado el fondo para obtener una terminación a nivel plano, la mitad inferior (depósito) es una jarra o frasco cuyas dimensiones permiten que la botella invertida encaje perfectamente y que el cuello de la botella llegue hasta 2-4 centímetros del fondo de la jarra. Una mecha de algodón con una capa de manta permite el ascenso capilar de la solución desde el depósito hasta la parte superior de la botella. En el cuello se coloca algodón, rodeando a la mecha, para evitar que se escape el sustrato a la solución nutritiva.



BOTELLA DESFONDADA  
INVERTIDA

MECHA

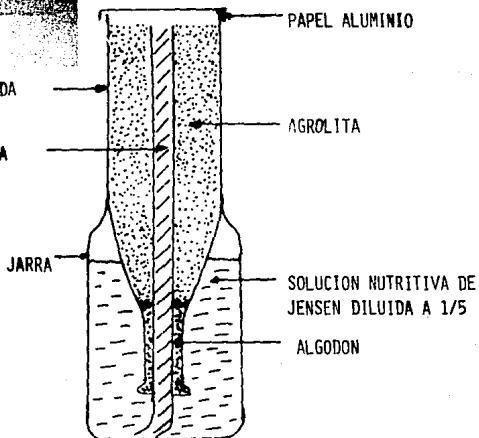


FIGURA 9. DISPOSITIVO DE "JARRA-BOTELLA" DE LEONARD (MODIFICADA).  
(VINCENT, 1975).

La forma de montar el dispositivo fue la siguiente:

1.- Se agregó agrolita a las botellas, desde el cuello hasta la parte superior. Al hacer esta operación la mecha debe mantenerse al centro.

2.- Se preparó la solución nutritiva de Jensen para plántulas (Vincent, 1975) diluida a 1/5 (1 g de  $\text{CaHPO}_4$ , 0.2 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.2 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.2 g de  $\text{NaCl}$ , 0.1666 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  y 1 ml de solución de oligoelementos se aforan a un litro con agua destilada y pH de 6.7-7. Para una solución Jensen con nitrógeno agregar 0.700 g de  $\text{KNO}_3$  por litro de solución. La solución de oligoelementos consta de 0.5 g de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0.0390 g de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.5 g de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.2 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  y 0.0861 g de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  aforados a un litro con agua destilada y pH de 6.7-7) y se humedeció el frasco desde la parte superior hasta que el líquido comenzó a fluir dentro del depósito.

3.- Se tapó la parte superior de la botella con papel aluminio y se aseguró con una liga.

4.- Las unidades completas se esterilizaron en el autoclave a 1 kg de presión durante 15 min. y se mantuvo intacta la cubierta hasta el momento de su utilización.

5.- Las semillas de frijol canario 107 se germinaron en agrolita por una semana, posteriormente las plantas se esterilizaron en hipoclorito de sodio al 10% durante 5 minutos y se lavan por cinco veces en agua destilada estéril.

6.- Se sembraron dos plantas por jarra inoculadas con bacterias, exactamente por debajo de la superficie de la

agrolita húmeda y se colocó papel aluminio a su alrededor para protegerlas de la contaminación y mantener la superficie en condiciones de humedad.

7.- Se colocaron las unidades en un estante con luz incandescente y fluorescente con un fotoperíodo de 12 horas a 25°C (día) y 18°C (noche), con una humedad relativa de 75%. Cuando las plantas estuvieron establecidas, se desechó una de ellas para que solo existiera una planta por botella.

#### B. Tratamientos.

Los sistemas de "jarra-botella" de Leonard fueron armados de acuerdo a las siguientes especificaciones:

Grupo 1. Diez sistemas con solución Jensen sin nitrógeno y las plantas sin inocular (Control).

Grupo 2. Diez sistemas con solución Jensen con nitrógeno y las plantas sin inocular (Control).

Grupo 3. Diez sistemas con solución Jensen sin nitrógeno y plantas con inóculo silvestre (cepa CIAT 899 de Rhizobium phaseoli) (Control).

Grupo 4. Setenta sistemas con solución Jensen sin nitrógeno y plantas con inóculo mutante (cepas mutantes MSBV 01 a 07).

#### C. Análisis morfométricos.

En las plántulas de 30 días de inoculadas se midieron los siguientes parámetros:

1. Peso seco de raíz, parte aérea y nódulos. La medición del peso seco se realizó por medio de la balanza analítica (Sartorius electrónica modelo 1600MP6), las plantas se

deshidrataron en estufa (Blue M Electric modelo Sw1TC) a 80°C por 48 horas.

2. Distribución, color y número de los nódulos. La distribución de los nódulos se tomó de acuerdo a los siguientes criterios:

- a). Nódulos en raíces primarias.
- b). Nódulos en raíces primarias y algunas laterales.
- c). Nódulos en raíces laterales.

3. Determinación de la razón de área foliar y razón de vástago-raíz. Para determinar el área foliar de cada planta, se dibujo en papel el contorno de las hojas y se recortaron, posteriormente se pesaron en la balanza analítica y se relacionó el peso en gramos de las hojas con el peso en gramos de 1 cm<sup>2</sup> (recortado del mismo papel). La razón de área foliar (RAF), expresada en cm<sup>2</sup>/g, es el área foliar total de la planta dividida por el peso de la planta. Para la razón de vástago-raíz se dividió el peso seco de la parte aérea entre el peso seco de la raíz.

4. Cuantificación de leghemoglobina. Se realizó en nódulos de 30 días. Se machacaron 0.5 gramos de tejido congelado con 3 ml de solución extractora de Drabkin (0.052 g de KCN, 0.198 g de K<sub>2</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, y 1 g de NaHCO<sub>3</sub>, se aforan en un litro de agua destilada) y se centrifugó a 15 000 revoluciones por minuto en una centrífuga (Eppendorf Brinkman modelo 5414), repitiéndose el proceso por 3 veces. Se aforó a 10 ml y se midieron los sobrenadantes en el espectrofotómetro (Spectronic 2000 Bausch & Lomb) a 540 nanómetros contra

solución Drabkin como blanco.

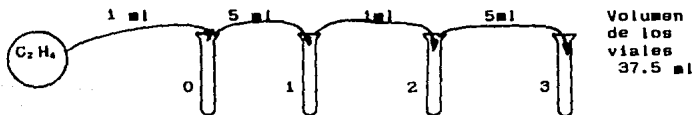
5. Identificación de los bacteroides presentes en los nódulos. Para verificar que las bacteroides presentes en los nódulos de Phaseolus vulgaris var. Canario 107, sean las cepas de Rhizobium phaseoli inoculadas y con su fenotipo original, los nódulos de 30 días se esterilizaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 10% durante 5 minutos se lavaron en cinco cambios de agua destilada estéril machacándolos en un tubo de ensayo estéril con agua destilada estéril. Se tomó una asada de la solución, se sembró en cajas Petri con medio Ym sólido (se disuelven en un litro de agua destilada 0.5 g de  $K_2HPO_4$ , 0.5 g de  $KH_2PO_4$ , 0.2 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.2 g de NaCl, 1 gramo de extracto de levadura, 15 g de agar y 10 g de manitol y se esteriliza a 1 kg de presión por 15 minutos; se agregan 0.04 g de CaCl<sub>2</sub> esterilizado aparte. Los antibióticos que se utilizan son rifampicina para CIAT y rifampicina-kanamicina para las mutantes, las cantidades son 0.25 ml de antibiótico para 250 ml de agua) y se dejó crecer a 30°C por 24 horas. Posteriormente se pican las colonias obtenidas en cajas Petri con medios Ym/sin antibiotico, Ym/rifampicina y Ym/rifampicina-kanamicina.

6. Cuantificación de la actividad de la nitrogenasa por el método de reducción del acetileno. La técnica para la evaluación de la actividad de la nitrogenasa por la reducción de acetileno se realizó conforme a las especificaciones propuestas por el departamento de microbiología de suelos del



Colegio de Postgraduados de Chapingo, Edo. Méx. bajo la supervisión del Ing. Juan José Almaraz. Las raíces de frijol canario 107 de 30 días, se colocaron en frascos de plástico de 1 litro de capacidad y se sellaron con cinta de teflón (al mismo tiempo se dejaron dos frascos sin raíces para ser utilizados como blanco), posteriormente se sacaron 100 ml de su volumen con una jeringa y se les inyectó esa misma cantidad de gas acetileno. Se dejaron incubar 2 horas a temperatura ambiente y pasado ese tiempo se extrajo 5 ml del contenido del recipiente y se inyectó a tubos vacutainer al vacío de 10 ml. Las muestras debidamente etiquetadas se trasladaron al cromatógrafo de gases (Varian Aerograph, serie 1400) y después de calibrar el aparato se le inyectó 1 ml de muestra para ser cuantificado. El procedimiento analítico para la obtención de la concentración de etileno se describe a continuación:

Para obtener los estándares de etileno se realizan las siguientes diluciones:



Volumen molar: Volumen que ocupa un mol de gas

$$1 \text{ ml} = 22414.6 \text{ ml}$$

Para determinar la concentración de etileno ( $C_2H_4$ ) de cada estándar se realizan las siguientes operaciones:

ESTANDAR 0

Si  $22414.6 \text{ ml} \text{ ----- } 1 \text{ mol}$   
 $1 \text{ ml} \text{ ----- } x$

Entonces  $x = 4.46 \times 10^{-5}$  moles. Concentración de etileno que hay en 1 ml inyectado al estándar 0.

Por lo tanto en el volumen de 37.5 ml (estándar 0) tenemos  $4.46 \times 10^{-5}$  moles.

NOTA: El estándar 0 solo se utiliza para preparar los estándares que nos van a servir.

ESTANDAR 1

Si en 37.5 ml -----  $4.46 \times 10^{-5}$  moles  
 5 ml inyectados ---- X  
 a estándar 1

Entonces  $x = 5.946 \times 10^{-6}$  moles

Por lo tanto en estándar 1 tenemos  $5.946 \times 10^{-6}$  moles, ¿que concentración hay en 0.5 ml inyectados al cromatógrafo?

Luego,  $37.5 \text{ ml} \text{ ---- } 5.946 \times 10^{-6}$  moles  
 $0.5 \text{ ml} \text{ ---- } x$

Entonces

$$x = 7.93 \times 10^{-8} \text{ moles}$$


---

ESTANDAR 2

Si en 37.5 ml ----  $5.946 \times 10^{-6}$  moles  
 1 ml inyectado ---- x  
 a estándar 2

Entonces  $x = 1.586 \times 10^{-7}$  moles, concentración que tenemos en estándar 2, ¿que concentración hay en 0.5 ml inyectado al cromatógrafo?

$37.5 \text{ ml} \text{ ---- } 1.586 \times 10^{-7}$  moles  
 $0.5 \text{ ml} \text{ ---- } x$

Entonces

$$x = 2.115 \times 10^{-7} \text{ moles}$$


---

ESTANDAR 3

Si en 37.5 ml -----  $1.586 \times 10^{-7}$  moles  
 5 ml inyectados ----- x  
 a estándar 3

Entonces  $x = 2.115 \times 10^{-8}$  moles, ¿qué concentración hay en  
 0.5 ml inyectados al cromatógrafo?

$$\begin{array}{l} 37.5 \text{ ml} \text{ ----} 2.115 \times 10^{-8} \text{ moles} \\ 0.5 \text{ ml} \text{ ----} x \end{array}$$

Entonces

$$x = 2.82 \times 10^{-10} \text{ moles}$$


---

**NOTA:** Las concentraciones obtenidas de los estándares deben corregirse por presión atmosférica y temperatura.

Para obtener el factor de corrección se parte de la Ley General de Gases:

$$\frac{P_i V_i}{T_i} = \frac{P_f V_f}{T_f}$$

donde:

P= Presión (en Newtons/m<sup>2</sup> o Pascales)

V= Volumen

T= Temperatura (en °K)

i= inicial

f= final

Esto es: el producto de la presión por el volumen de un gas ideal es directamente proporcional a su temperatura absoluta. Para nuestro caso, se trata de relacionar la

presión atmosférica, la temperatura y el volumen inyectado al cromatógrafo en condiciones normales (nivel del mar y a 45° latitud N) y aquellas registradas a las condiciones donde se realizó el análisis de los estándares.

Por lo tanto:

$$\frac{\text{Presión atmosférica normal} \times V_1}{T \text{ absoluta}} = \frac{P. \text{ atm. en el día} \times V_2}{T \text{ del día}}$$

despejando V2 tenemos:

$$\text{F.C. (Factor de corrección)} = \frac{P \text{ normal} \times 0.5 \text{ ml} \times T \text{ del día}}{T \text{ absoluta} \times P \text{ del día}}$$

donde:

$$P \text{ normal} = 760 \text{ mm Hg o } 1012.94 \text{ mbares}$$

$$T \text{ absoluta} = 273 \text{ }^\circ\text{K}$$

La concentración de los estándares de etileno deben ser multiplicados por el factor de corrección para obtener valores reales. Una vez corridos los estándares en el cromatógrafo, se mide la altura de los picos en mm.

La finalidad de los estándares es la de obtener un modelo matemático que nos permita relacionar la altura de los picos de etileno con la concentración estimada, de tal forma que después, con solo medir las alturas de los picos en las muestras problema sea posible estimar las concentraciones de etileno producido.

En general, la forma del modelo es:

$$Y = B_0 + B_1 X$$

donde:

$$Y = \text{concentración de etileno}$$

X= Altura del pico de etileno

Por lo tanto es necesario estimar  $B_0$  y  $B_1$  a través de un análisis de regresión, para lo cual es útil tabular los datos de la siguiente forma:

Std	Altura(mm) (C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> )	Atenuación (#)	Conversión	LogX	Conc. estimada	Log Y
1	153	1280	195840	5.2919	$6.34 \times 10^{-8}$	-7.1978
1	155	1280	198400	5.2975	$6.34 \times 10^{-8}$	-7.1978
1	152	1280	194560	5.2890	$6.34 \times 10^{-8}$	-7.1978
2	32	80	2560	3.4082	$8.4 \times 10^{-10}$	-9.0757
2	32	80	2480	3.3944	$8.4 \times 10^{-10}$	-9.0757
2	32	80	2520	3.4014	$8.4 \times 10^{-10}$	-9.0757
3	54	8	432	2.6355	$1.12 \times 10^{-10}$	-9.9508
3	55	8	440	2.6434	$1.12 \times 10^{-10}$	-9.9508
3	53	8	424	2.6274	$1.12 \times 10^{-10}$	-9.9508

(\*) Valores de atenuación:  $10^{-1} = 1000$   
 $10^{-10} = 100$   
 $10^{-11} = 10$   
 $10^{-12} = 1$

Una vez tabulado,  $B_0$  y  $B_1$  se calculan de la siguiente forma:

$$B_1 = \frac{\sum_{i=1}^n X_i Y_i - n \bar{X} \bar{Y}}{\sum_{i=1}^n X_i^2 - n \bar{X}^2} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i Y_i - (\sum X_i)(\sum Y_i)/n}{\sum_{i=1}^n X_i^2 - (\sum X_i)^2/n}$$

$$B_0 = Y - B_1 X$$

donde:

Y= log eje Y

X= log eje X

$B_0$ = Intercepto

$B_1$ = Pendiente

En el ejemplo de arriba:

Intercepto= -12.62270161

Pendiente= 1.027720378

Coef. Correlación= -0.999458, nos indica el grado

de relación entre las dos variables.

Una vez obtenidas las variables que nos definen la relación entre altura del pico y concentración de etileno, se procede a realizar los cálculos para estimar la concentración de etileno de la muestra problema.

Para la cuantificación del acetileno reducido, los datos de las muestras problema se tabulan de la siguiente forma:

Muestra	Acetileno $C_2H_2$			Etileno $C_2H_4$		
	Altura (mm)	Atenuación	Conversión	Altura	Atenuación	Conversión
1	58	8000	464,000	60	80	4800
2	75	8000	600,000	118	80	9440
3	65	8000	520,000	14	40	560

Teniendo los datos tabulados se definen las variables:

1. Gas control (Blanco)

$$C_2H_4 = A$$

$$C_2H_2 = B$$

$$\text{Atenuación de A} = C$$

$$\text{Atenuación de B} = D$$

2. Muestra Problema

$$C_2H_4 = A1$$

$$C_2H_2 = B1$$

$$\text{Aten. de A1} = C1$$

$$\text{Aten. de A2} = D1$$

$$3. \text{ Intercepto} = I$$

$$\text{Pendiente} = M$$

$$\text{Factor de dilución} = F.D. = 2400$$

$$(\text{Vol fco} / \text{vol inyectado})$$

Se efectúan las siguientes operaciones:

1)  $(A \times C) / (B \times D) = Z$  (esta variable es constante al igual que I, M y F.D. para cada grupo en particular de muestras)

$$2) \text{ Conversión de gas muestra: } B1 \times D1 \times Z = H$$

$$3) A1 \times C1 = H$$

$$4) \text{ Log } 10 [(A1 \times C1) - H] = T$$

5)  $T \times M + I$

6)  $\text{Antilog}(T \times M + I) = Q$

7)  $Q \times \text{F.D.} = \text{moles C H}$

8) Multiplicar por 1,000,000,000 para convertir a nanomoles

La fórmula general es:

$$Y = \text{Antilog} \left( \frac{\log_{10}((A_1 \times C_1) - (B_1 \times D_1 \times (A \times C / B \times D)) \times M + I)}{B_i} \right) \times \text{F.D.} + B_o$$

#### D. Análisis estadístico.

Se utilizó el programa Statgraphics (Statistical Graphics System) versión 1.1 de 1985, y se calculó el análisis de varianza general para las variables y la prueba de T para un diseño experimental completamente al azar para determinar la significancia estadística. Con los resultados obtenidos se elaboraron gráficas de barras y se correlacionaron mediante el uso de una gráfica poligonal (Radford *et al.*, 1974 y Arriaga, 1985).

Resultados.

## I. Pruebas de infectividad.

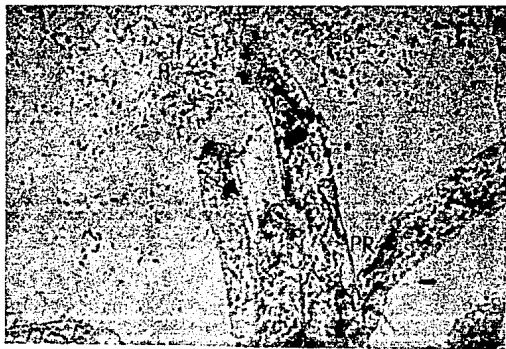
Las pruebas de infectividad permitieron conocer la capacidad de Rhizobium phaseoli (cepas MSBV01 a 07) para establecer una simbiosis efectiva con Phaseolus vulgaris var. Canario 107. Las primeras señales de que se esta llevando a cabo esta simbiosis son la adhesión de las bacterias a los pelos radiculares, el curvamiento de estos y la formación de un filamento infeccioso que se dirige al interior de la corteza de la raíz. Posteriormente, las bacterias se transforman en bacteroides y las células del huésped se modifican iniciando así una estructura denominada nódulo.

Al examinar las preparaciones de pelos radiculares teñidas con rosa de bengala al 1% en el microscopio de contraste de fases, a la segunda hora después de la inoculación, se observó un pequeño grupo de bacterias tanto en las cepas mutantes y la cepa silvestre orientadas hacia la parte apical. Fue hasta las doce horas cuando la mayoría de los pelos radiculares presentaron gran cantidad de bacterias orientadas a todo lo largo de éste, principalmente en la parte apical (figura 10).

Al tercer día después de la inoculación se observaron pelos curvados tanto con las cepas mutantes como con la cepa silvestre, no encontrándose diferencias entre ellas (figura 11). No se logró observar el filamento infeccioso en las preparaciones.

La nodulación de las cepas MSBV 01 a 07, a excepción de



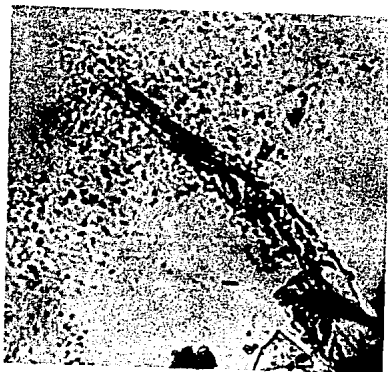


CEPA CONTROL CIAT 899



CEPAS MUTANTES MSEV 01 A 07

Figura 10. Distribución de las bacterias (B) de las cepas de Rhizobium phaseoli sobre los pelos radiculares (PR) de Phaseolus vulgaris var. Canario 107. Las plantas de 5 días fueron inoculadas y se crecieron por 12 horas en unidades CP, posteriormente se tificaron las raíces con rosa de bengala alcohólica al 1%. Fotografía al microscopio óptico (400x).



CONTROL SIN INOCULAR



CIAT 899



MSBV 01 A 07

Figura 11. Curvamiento del pelo radicular (PR) de Phaseolus vulgaris var. Canario 107 a los 3 días. Las raíces se inocularon con cepas mutantes de Rhizobium phaseoli y la cepa silvestre CIAT 899 y se tiñeron con rosa de bengala alcohólica al 1%. Microscopía óptica (400x).

la mutante 03, fue más tardía en comparación con la cepa silvestre CIAT 899. En promedio, los nódulos aparecieron a los 8 días de inoculación con CIAT 899 y MSBV 03 y cuatro días después con las demás mutantes. La topología de los nódulos formados por CIAT 899 y por las mutantes se describe a continuación. La aparición de los nódulos en CIAT y MSBV 03 fue en raíces primarias y en algunas laterales de la parte superior, en el caso de las demás mutantes aparecieron en raíces laterales, presentaron algunos nódulos en las raíces primarias (figura 12). Los nódulos fueron típicamente esféricos y rosados (figura 13), comprobando esta coloración de manera cuantitativa mediante la medición del nivel de leghemoglobina medido espectrofotométricamente en nódulos de 30 días fue similar en todos los casos a excepción de la mutante 04, la cual presentó un nivel bajo, sin embargo al realizar la prueba estadística de T y el correspondiente análisis de varianza, no existieron diferencias significativas (Tabla 1 y gráfica 1). Un resumen de las características observadas por las cepas mutantes y por la cepa silvestre al realizar los experimentos de infectividad y efectividad mencionadas en este trabajo se muestra en la tabla 2.

En cuanto a la histología de los nódulos en diferentes etapas de desarrollo ( primera, segunda, tercera y cuarta semanas), no se encontraron diferencias entre los nódulos inducidos por las mutantes y por la cepa silvestre ya que en todos los casos se encontraron bacteroides presentes en los

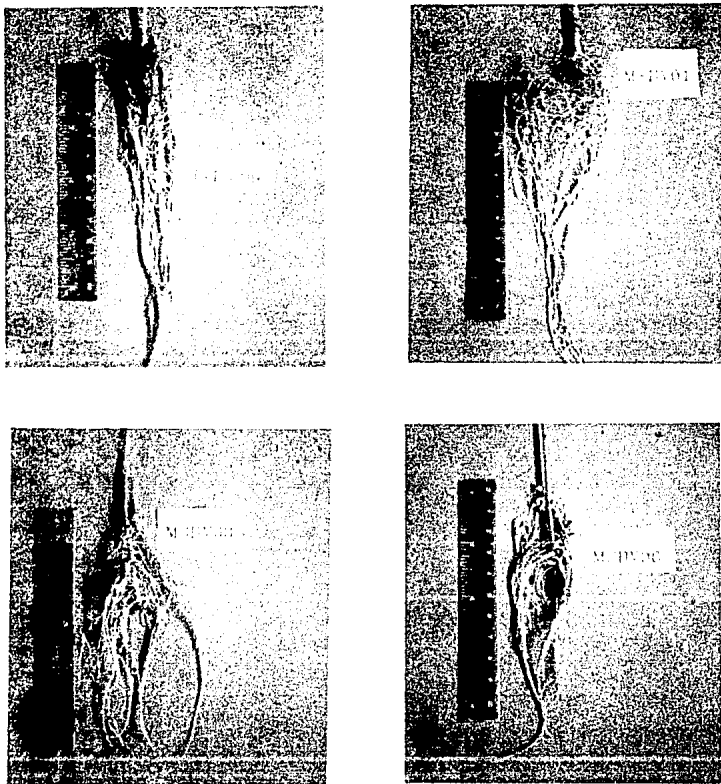


Figura 12. Distribución de los nódulos a los 30 días en raíces de Phaseolus vulgaris var. Canario 107, inducidos por cepas mutantes de Rhizobium phaseoli (MSBV 01 a 07) y por la cepa silvestre CIAT 899. Las plantas se crecieron en unidades CP con un fotoperíodo de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad, a 25°C y con 75% de humedad relativa.



CIAT 899



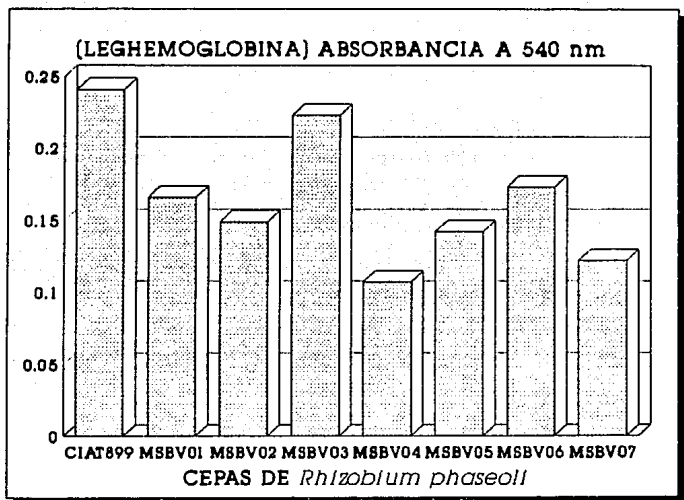
MSBV 01 A 07

Figura 13. Nódulos inducidos por Rhizobium phaseoli cepas CIAT 899 y MSBV 01 a 07 en Phaseolus vulgaris var. Canario 107. Acercamiento al microscopio estereoscópico (65x).

CEPA DE <u>R. phaseoli</u>	CONCENTRACION DE Lg Absorbancia a 540 nm
CIAT 899	0.2415
MSBV 01	0.1660
MSBV 02	0.1490
MSBV 03	0.2235
MSBV 04	0.1070
MSBV 05	0.1420
MSBV 06	0.1735
MSBV 07	0.1225

Tabla 1

Medida espectrofotométrica de la cantidad de leghemoglobina (Lg) extraída por la solución de Drabkin de los nódulos de Phaseolus vulgaris a los 30 días después de inocular con las cepas bacterianas de Rhizobium phaseoli, teniendo como control a la cepa CIAT 899. Se realizó un promedio de 3 mediciones por tratamiento. No se encontraron diferencias significativas al realizar la prueba de T ni el análisis de varianza.



Gráfica 1

Cantidad de leghemoglobina presente en nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Canario 107 inducidos por *Rhizobium phaseoli* (cepas CIAT 899 y MSBV 01 a 07). Promedio de 3 repeticiones.

CARACTERISTICAS	CEPAS BACTERIANAS MUTANTES							CONTROL
	01	02	04	05	06	07	03	CIAT
Adhesión	+	+	+	+	+	+	+	+
Curvamiento del pelo radicular	+	+	+	+	+	+	+	+
Morfología nodular: Color	Rosados							
Distribución en raíces	Laterales						Primarias	
Días en aparecer	12						8	
Número de nódulos por planta (%)	15	16	4	9	6	14	17	29
Concentración de Lg. (Absorbancia a 540nm)	.16	.15	.10	.14	.17	.12	.22	.24
Bacteroides en nódulos	+	+	+	+	+	+	+	+
Resistencia antibiotico	Rif Km						Rif	
Textura colonial en medio Ym	Muc <sup>-</sup>						Muc <sub>±</sub>	Muc <sup>+</sup>
Producción de EPS	-						±	+
Reduccion simbiotica de acetileno	+	-	+					

Tabla 2

Características asociadas a los nódulos inducidos en Phaseolus vulgaris var Canario 107 por las cepas mutantes deficientes en la producción de exopolisacáridos de Rhizobium phaseoli.

Rif= Rifampicina

Km= Kanamicina Lg= Leghemoglobina

Muc<sup>-</sup> = No mucoide

Muc<sub>±</sub> = Poco mucoide Muc<sup>+</sup> = Mucoide



cortes histológicos; la anatomía de la corteza de la raíz y la diferenciación de las células corticales fue igual para todos los casos, por lo cual el desarrollo de estos nódulos se encuentra ilustrado por los especímenes de la cepa CIAT 899; a las tres semanas después de la inoculación se empezaron a notar cambios morfológicos muy marcados como la disposición concéntrica de los tejidos nodulares y el cilindro vascular que ocupaba una posición central se comenzó a ramificar hacia la periferia rodeado de una capa de células corticales (figura 14).

La diferenciación del nódulo a los 30 días es muy notable, se observa una zona central infectada, que se diferencia en células infectadas y células no infectadas, y que se encuentra rodeada por haces vasculares que se ramifican hacia la periferia, en la zona de la corteza externa existe una capa de células que forman el esclerénquima. Todas las mutantes presentaron el mismo patrón de diferenciación histológica (figura 15).

#### 11. Pruebas de erectividad.

El propósito de estas pruebas fue determinar la capacidad de Rhizobium phaseoli de nodular a Phaseolus vulgaris var. Canario 107 y la de conocer su eficiencia de reducción del nitrógeno atmosférico.

Las plantas se crecieron durante 30 días en un estante de fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad con lámparas de luz fluorescente e incandescente con una

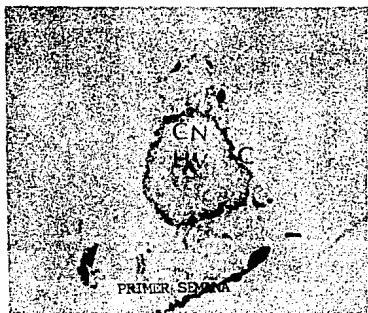
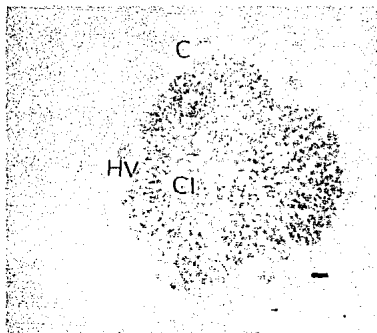


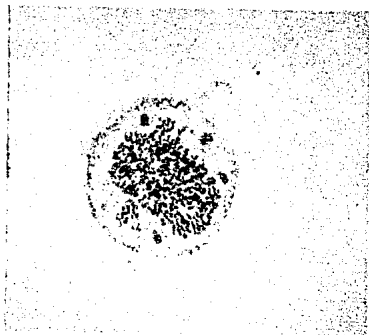
Figura 14. Cortes longitudinales de nódulos de Phaseolus vulgaris var. Canario 107 en diferentes etapas de desarrollo (1, 2 y 3 semanas) después de inocular con Rhizobium phaseoli cepas CIAT 899 y MSBV 01 a 07. Solo se muestran las fotografías de CIAT para mayor claridad, ya que no existieron diferencias histológicas entre silvestre y mutantes. Las secciones son de 8 $\mu$  teñidas con safranina-azul de metileno. Fotografías al microscopio estereoscópico (65x).

CN= Células no infectadas  
C= Corteza

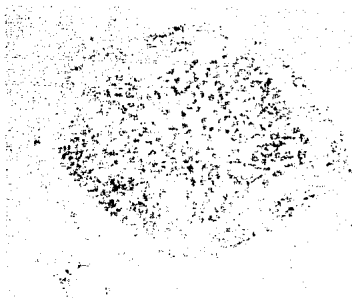
CI= Células infectadas  
IV= Haz vascular



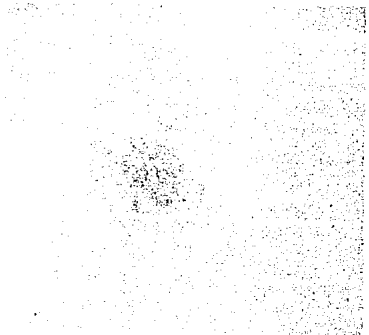
CIAT 899



MSBV 01



MSBV 03



MSBV 04

Figura 15. Anatomía de los nódulos diferenciados de Phaseolus vulgaris var. Canario 107 inoculado con Rhizobium phaseoli cepas CIAT 899 y cepas mutantes a los 30 días. Corte longitudinal de 8 $\mu$  observado al microscopio estereoscópico (65x).

C= Corteza

CI= Células infectadas

HV= Haz vascular

temperatura máxima de 25° C y de 18° C como mínima, la humedad relativa fue de 75%.

En los datos obtenidos del peso seco de los nódulos inducidos por Rhizobium phaseoli al frijol canario 107 se encontraron diferencias significativas, en las pruebas de T a un nivel de 1% al relacionar la cepa silvestre CIAT con todas las mutantes a excepción de la 07 en la que se encontraron diferencias al 5%. Sin embargo, en los parámetros de peso seco de la parte aérea y de toda la planta, así como las razones de área foliar y de vástago-raíz no existieron diferencias significativas. Estos resultados fueron corroborados por la prueba de varianza para diseños experimentales no balanceados (Tabla 3 y gráficas 2 a 6).

En el caso del número de nódulos, al presentar un coeficiente de variación mayor al 30%, fue necesario interpretar los resultados de acuerdo a un porcentaje estadístico que se incluye en la tabla 2.

Para tener un panorama más amplio de las relaciones entre todas las variables estudiadas, se elaboraron gráficas poligonales con un número de ejes igual al de las características medidas (gráfica 7). Los análisis estadísticos que mostraron diferencias significativas se encuentran indicados con un asterisco (\*). El peso seco de nódulos de CIAT mostró valores mayores y significativamente diferentes al ser comparada con las mutantes que se ubicaron más hacia el centro de la gráfica, teniendo los valores más reducidos la mutante U4 en el peso seco de nódulos. Al

TRATAMIENTO	PSTA	PSTP	PSN	V/R	RAF
S/N	0.2426	0.3282	---	2.8148	270.0568
C/N	0.2842	0.4063	---	2.2584	218.8951
CIAT 899	0.2757	0.3953	0.0190	2.5591	255.1459
MSBV 01	0.2749	0.3914	0.0062	2.8336	230.4927
MSBV 02	0.2850	0.4143	0.0053	2.2958	213.1940
MSBV 03	0.2971	0.4188	0.0060	2.5864	257.5183
MSBV 04	0.2502	0.3431	0.0030	2.9913	233.4446
MSBV 05	0.3155	0.4158	0.0040	3.2599	235.4065
MSBV 06	0.3561	0.5123	0.0045	2.5086	226.4294
MSBV 07	0.2972	0.4214	0.0049	2.4474	238.3744

Tabla 3

Datos morfométricos de las plantas de Phaseolus vulgaris var. Canario 107 infectadas con Rhizobium phaseoli CIAT 899 y con mutantes deficientes en exopolisacáridos (EPS) derivadas de ella. Los datos presentados muestran la media estadística de 2 experimentos con 5 repeticiones en cada uno. Al realizar la prueba de T se encontró diferencias en el peso seco de nódulos con un nivel de significancia del 1% al contrastar a CIAT con las mutantes 01, 02, 03, 04, 05 y 06 y al 5% en la mutante 07. Estos resultados fueron corroborados al aplicar la prueba de varianza correspondiente.

S/N= Control sin nitrógeno                      C/N= Control con nitrógeno

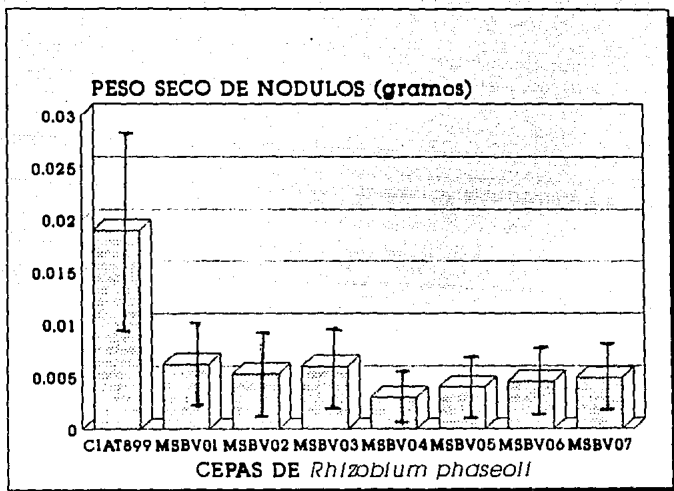
PSTA= Peso seco total aéreo (g)

PSTP= Peso seco total de la planta (g)

PSN= Peso seco de nódulos (g)

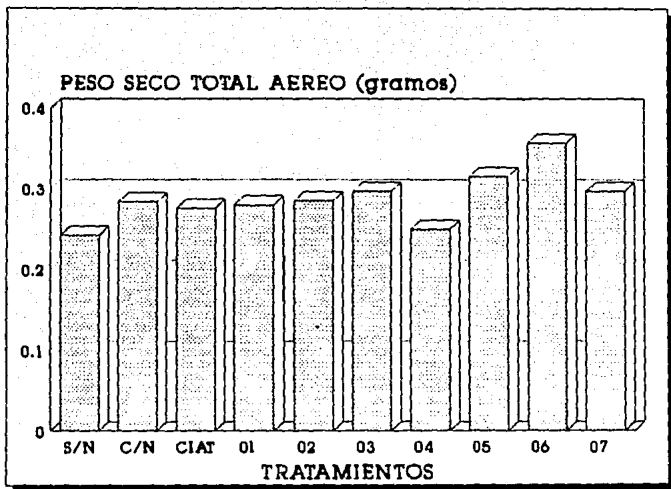
V/R= Razón de vástago-raíz

RAF= Razón de área foliar (cm<sup>2</sup>/g)



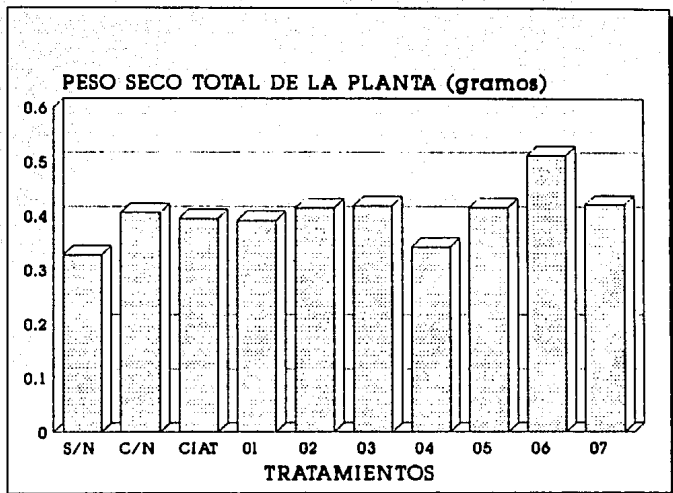
Gráfica 2

Efecto de la inoculación de mutantes de *Rhizobium phaseoli* (cepas MSBV 01 a 07) en el peso seco de los nódulos de *Phaseolus vulgaris* var. Canario 107. Promedio de 2 mediciones con 5 repeticiones en cada una.



Gráfica 3

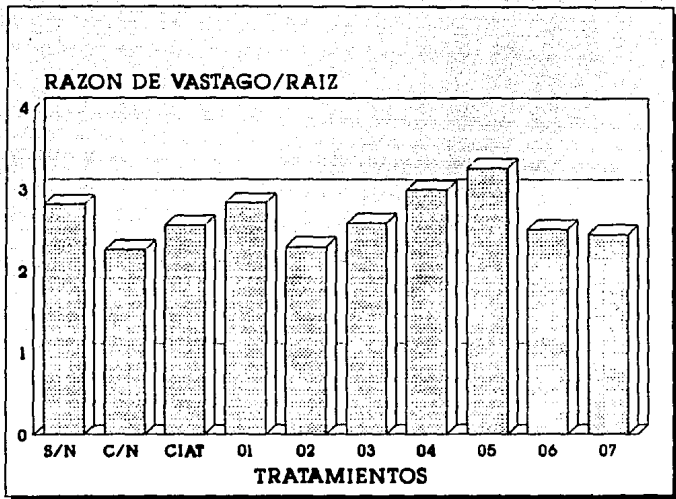
Efecto de la inoculación de mutantes de Rhizobium phaseoli (cepas MSBV 01 a 07) en el peso seco total aéreo de Phaseolus vulgaris var. Canario 107. Promedio de 2 mediciones con 5 repeticiones en cada una.



Gráfica 4

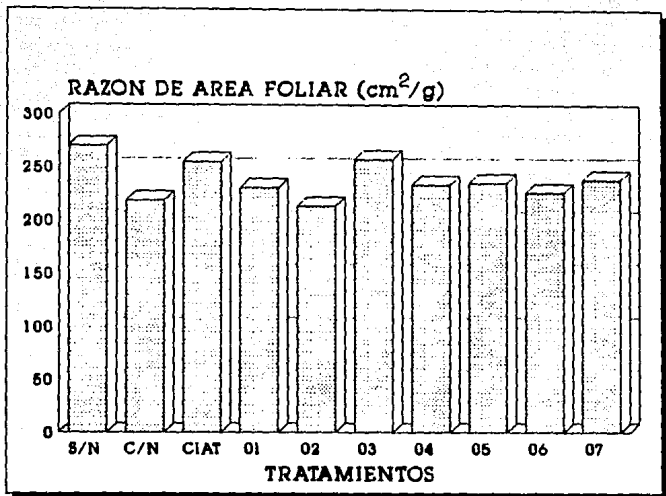
Efecto de la inoculación de mutantes de Rhizobium phaseoli (cepas MSBV 01 a 07) en el peso seco total de Phaseolus vulgaris var. Canario 107. Promedio de 2 mediciones con 5 repeticiones en cada una.





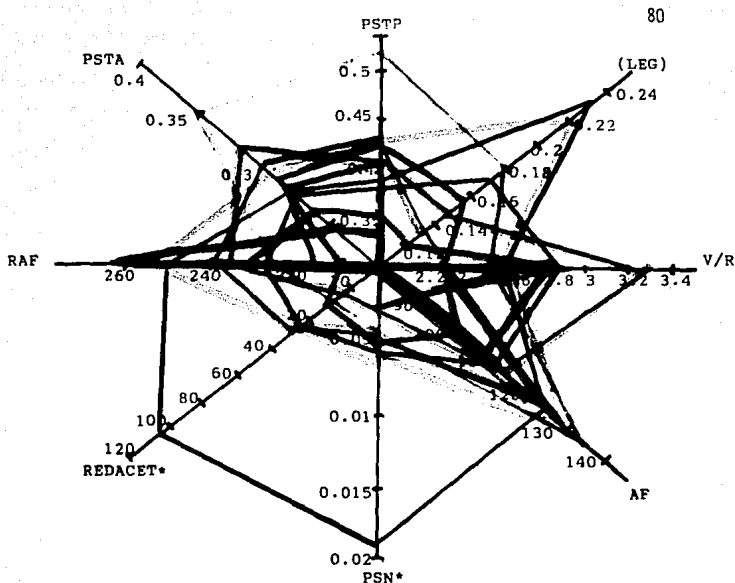
Gráfica 5

Efecto de la inoculación de mutantes de Rhizobium phaseoli (cepas MSBV 01 a 07) en la relación vástago/raíz de Phaseolus vulgaris var. Canario 107. Promedio de 2 mediciones con 5 repeticiones en cada una.



Gráfica 6

Efecto de la inoculación de mutantes de Rhizobium phaseoli (cepas MSBV 01 a 07) en la razón de área foliar de Phaseolus vulgaris var. Canario 107. Promedio de 2 mediciones con 5 repeticiones en cada una.



Gráfica 7

Efecto de la inoculación de *Rhizobium phaseoli* (cepas CIAT 899 y MSBV 01 a 07) en los parámetros morfométricos de *Phaseolus vulgaris* var. Canario 107. Promedio de 2 experimentos con 5 repeticiones en cada uno.

\*= Diferencias significativas en base al análisis estadístico

PSTA= Peso seco total aéreo (g)

PSTP= Peso seco total de la planta (g)

V/R= Razón de vástago-raíz PSN= Peso seco de nódulos (g)

RAF= Razón de área foliar (cm<sup>2</sup>/g) AF= Área foliar (cm<sup>2</sup>)

REDACET= Reducción de acetileno (nanomoles)

(LEG)= Concentración de leghemoglobina (absorbancia a 540 nm)

■ S/N= Control sin nitrógeno

■ C/N= Control con nitrógeno

■ CIAT 899= Cepa silvestre de *Rhizobium phaseoli*

Cepas mutantes de *Rhizobium phaseoli*:

■ MSBV 01

■ MSBV 02

■ MSBV 03

■ MSBV 04

■ MSBV 05

■ MSBV 06

■ MSBV 07

correlacionar el peso seco de los nódulos con la reducción de acetileno y la concentración de leghemoglobina; observamos que en el caso de la cepa silvestre CIAT los valores son más altos, lo que nos indica que existió una diferencia al ser comparados con las demás mutantes. Al ser analizados los controles sin inocular que contenían o no nitrógeno en el caso de CIAT y de las mutantes, no existieron diferencias significativas, aunque existe una tendencia hacia un incremento en los tratamientos inoculados con las cepas bacterianas, como se puede notar en los parámetros de peso seco total aéreo y en el peso seco total de la planta en donde el control sin nitrógeno presentó valores menores a comparación de los demás tratamientos. La mutante O4 que no fija nitrógeno, presenta valores muy bajos al relacionar los parámetros de peso seco, concentración de leghemoglobina, área foliar y peso seco total aéreo de las demás mutantes y de la cepa silvestre.

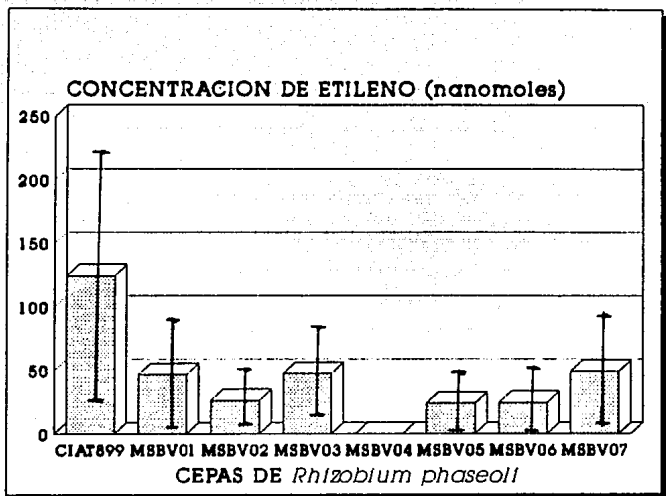
Al analizar la reducción de acetileno, todas las mutantes a excepción de la mutante O4 fueron capaces de fijar nitrógeno. En CIAT y la mutante O7 se presentaron valores mayores de etileno producido que en las demás mutantes, al realizar la prueba de T y el análisis de varianza, se encontraron diferencias significativas al contrastar CIAT con las mutantes O1 a O6 a un nivel del 1%. En el caso de la mutante O7 no se encontró diferencias significativas (Tabla 4 y gráfica 8).

Las bacterias que se inocularon fueron recuperadas y se

CEPA DE <u>R. phaseoli</u>	CONCENTRACION DE ETILENO (nanomoles)
CIAT 899	124.6035± 88.1088
MSBV01	46.8790± 33.1488
MSBV02	26.3813± 15.2308
MSBV03	47.5473± 27.4507
MSBV04	0
MSBV05	24.1700± 13.9542
MSBV06	24.9100± 17.6142
MSBV07	49.2063± 34.7945

Tabla 4

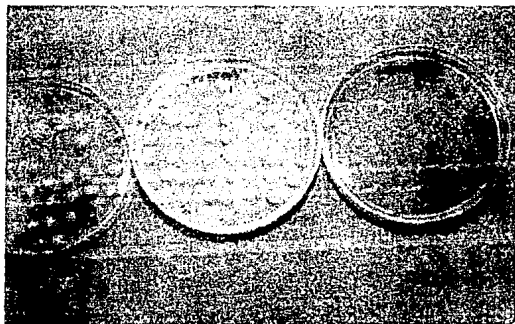
Reducción de acetileno por los nódulos formados de las mutantes (MSBV 01 a 07) y la cepa silvestre CIAT 899 de Rhizobium phaseoli a los 30 días. Promedio de 3 mediciones por tratamiento, mostrando el error estándar. Al realizar la prueba estadística de T y el análisis de varianza se encontró diferencias significativas del 1% al contrastar a CIAT con las mutantes 01 a 06.



Gráfica 8

Efecto de la inoculación de mutantes de *Rhizobium phaseoli* (cepas MSBV 01 a 07) a *Phaseolus vulgaris* var. Canario 107 en la reducción de acetileno teniendo como control a la cepa CIAT 899. Promedio de 3 mediciones por tratamiento.

probó su resistencia en medios con antibióticos. La cepa silvestre CIAT 899 creció en medio Y<sub>m</sub> y en medio Y<sub>m</sub>/Rif, no así en medio Y<sub>m</sub>/RifK<sub>m</sub>. Las cepas mutantes MSBV 01 a 07 crecieron en medio Y<sub>m</sub>, Y<sub>m</sub>/Rif y Y<sub>m</sub>/RifK<sub>m</sub>. Asimismo se comprobó la morfología mucóide (Muc+) de CIAT y la no mucóide (Muc-) de las mutantes, a excepción de la mutante 03 que presenta una morfología poco mucóide (Muc±) (figura 16). Estos estudios nos permitieron comprobar que las bacterias inoculadas son las causantes de las características obtenidas y a la vez descartar una posible contaminación por otras cepas de Rhizobium phaseoli.



Ym

YmRif

YmRifKm

CIAT 899

Figura 16. Resistencia a antibióticos (rifampicina y kanamicina) en medio Ym de las cepas de Rhizobium phaseoli inoculadas y recuperadas de los nódulos de Phaseolus vulgaris var. Canario 107.



### Discusión.

En el presente trabajo se investigó si los exopolisacáridos (EPS) de Rhizobium phaseoli son requeridos o no para llevar a cabo la fijación simbiótica de nitrógeno. Para este propósito se utilizaron mutantes de inserción deficientes en la producción de EPS (MSBV 01 a 07) que poseen al transposón  $\text{Tn5}$ , que confiere la resistencia a kanamicina y fue utilizado como mutágeno. Las mutantes fueron caracterizadas por su fenotipo  $\text{Muc}^-$  y para confirmar que este se debe a la deficiencia de EPS, se realizó la prueba de tinción con calcofluor, el cual se une al polisacárido de la pared celular bacteriana. La única mutante que presentó un fenotipo ligeramente más mucoso ( $\text{Muc}^+$ ) fue la MSBV 03, pero se podía diferenciar de la cepa silvestre CIAT 899 de morfología mucosa ( $\text{Muc}^+$ ) (Nuñez, 1990).

En lo referente a la adhesión de Rhizobium a la semilla de leguminosas, se utilizó una concentración de  $10^8$  para la inoculación de las plantas de frijol canario 107, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Dazzo et al (1984), que sugirieron que la selectividad en la primera etapa de la adhesión, dependerá del tamaño del inóculo. En los primeros minutos y hasta una hora después, con un inóculo de  $10^7$  a  $4 \times 10^8$  células por semilla, algunas bacterias se adhieren, en un rango de orientación determinado a la punta del pelo radicular.

Al realizar los estudios referentes a la formación y desarrollo del filamento infeccioso, no se pudo observar el

filamento infeccioso, debido a que la cepa silvestre CIAT 899 de la cual provienen las mutantes, presenta características que sugieren que no existe formación de filamento infeccioso y que las bacterias penetran hasta la corteza y se inicia la transformación de estas a bacteroides con los subsecuentes cambios morfológicos y de tamaño en las células del huésped, concordando con los resultados obtenidos por Martínez et al. (1985).

En nuestros experimentos el curvamiento radicular fue difícil de observar, posiblemente debido al bajo porcentaje de aparición de filamentos infecciosos. A este respecto Gloudehans y Bisseling (1989) señalaron que unas horas después de la inoculación, más del 50% de los pelos radiculares en la zona se deforman y en 5 al 20% de estos se curvan. Subsecuentemente, los filamentos infecciosos se forman en sólo el 0.1 al 1% de los pelos.

Asimismo se observó que al desarrollarse los nódulos en una región de la raíz se inhibió la emergencia de otros nódulos en las regiones más jóvenes de la raíz. Aunque según Noel et al. (1986) los filamentos infecciosos aún se forman en gran cantidad de estas regiones se lleva a cabo un fenómeno denominado aborto de la infección que permite el establecimiento y distribución en una densidad equivalente a través del sistema radical. La distribución de los nódulos observada en este trabajo, coincide ampliamente con lo reportado anteriormente. Igualmente mencionan que aunque la actividad meristemática en la corteza de la raíz y la

iniciación del filamento infeccioso y su crecimiento coinciden entre sí, deben ser tomadas como dos procesos separados. La formación del meristema y el crecimiento del nódulo puede ocurrir sin la formación del tubo infeccioso. Los genes bacterianos que permiten la división de las células corticales, incluyendo los genes nod, encontrados en los rizobia de crecimiento rápido se encuentran en los plásmidos Sym. Los genes bacterianos que incluyen la iniciación o permanencia del filamento infeccioso, son innecesarios para la inducción meristemática se han encontrado solo en los cromosomas o en plásmidos distintos del plásmido Sym.

Respecto a la morfoloía nodular, los nódulos inducidos por las mutantes de Rhizobium phaseoli (MSBV 01 a 07) y los de la cepa silvestre (CIAT 899) fueron semejantes al no mostrar diferencias a todo lo largo de su organogénesis.

#### Papel de los exopolisacáridos de Rhizobium phaseoli en el proceso de la infección.

Existe una gran controversia para especificar la importancia de los EPS en la habilidad de Rhizobium de formar nódulos fijadores de nitrógeno en las plantas hospederas. En trabajos realizados con mutantes deficientes en la síntesis de EPS se ha observado que estos son esenciales para llevar a cabo una nodulación efectiva (Sanders et al., 1978; Napoli y Albersheim, 1980; Chakravorty et al., 1982; Leigh et al., 1985; Noel et al., 1986). Sin embargo, se han reportado recientemente que un determinado número de mutantes

deficientes en EPS son capaces de formar nódulos efectivos, (Napoli y Albersheim, 1980; Sanders et al., 1981; Leigh et al., 1985; Borthakur et al., 1986; Gloudemans y Bisseling, 1989 y Ko y Gayda, 1990).

En el caso de R. leguminosarum y R. meliloti se ha encontrado que la síntesis de exopolisacáridos es esencial para la nodulación, esto es debido a que al ser probadas en lo referente a su capacidad de nodular a sus huéspedes específicos resultaban nódulos de tipo indeterminado y por lo tanto eran ineffectivos. En Rhizobium fredii y en R. phaseoli que indujeron nódulos determinados, estos fueron totalmente efectivos al ser probada su capacidad de reducción de acetileno, además de sus características de presencia de bacteroides y de coloración rosada que indica la presencia de la leghemoglobina (Sanders et al., 1981; Lamb et al., 1982; Leigh et al., 1985; Borthakur et al., 1986 y Ko y Gayda, 1990).

En 1985 Chen et al. (en Ko y Gayda, 1990), probaron la nodulación de mutantes exo inducidas por el transposón Tn5 de la cepa NGR234 de Rhizobium (la cual posee un amplio rango de huéspedes) en plantas con nódulos determinados y en las que generan nódulos indeterminados; estas mutantes deficientes en exopolisacáridos inducieron en los huéspedes determinados nódulos pequeños totalmente efectivos, pero en los indeterminados sólo pequeñas estructuras parecidas a callos en las raíces de los huéspedes indeterminados. Observaciones similares fueron realizadas por Borthakur et al. (1986), trabajando con este mismo gene encontraron que una

sola mutación exo en R. leguminosarum volvía a las bacterias inefectivas en su nodulación con chicharos, sin embargo en R. phaseoli no tenía efecto alguno en su nodulación con los frijoles y por lo tanto eran efectivos. Así como conclusión podemos decir que la dependencia de la síntesis de exopolisacáridos solo es esencial en los nódulos del tipo indeterminado.

Las mutantes utilizadas en este trabajo, indujeron nódulos efectivos (excepción de la mutante U4) lo que nos sugiere que los EPS no están interviniendo en la capacidad de Rhizobium para fijar nitrógeno, además de la falta de correlación entre la ausencia de EPS y la pérdida de la capacidad de nodulación. Sólo el caso de la mutante MSBV04 que no fue capaz de fijar nitrógeno es diferente, ya que aunque fue capaz de inducir bacteroides no formó nódulos efectivos. Esto nos hace suponer que existe atrofia parcial en los bacteroides debida posiblemente a una deficiencia en su capacidad de fijar nitrógeno o a que existió un factor que modificó la actividad de la nitrogenasa, dando como resultado un posible adelanto o un retraso en la fijación de nitrógeno en comparación con las demás cepas bacterianas y concordando con lo reportado por Engvil (1987).

La mutante U4 puede diferir de las demás mutantes en poseer una mutación pleiotrópica que afectará a los genes exo y la región de los genes nif encargados de llevar a cabo la codificación para la fijación de nitrógeno. Un caso similar ocurrió con varias mutantes de Rhizobium phaseoli citadas por

Noel et al en 1984 y Ko y Gayda en 1990; aunque para confirmar este tipo de hipótesis se requerirá de un mapeo genético en el cual se pueda establecer la ubicación de cada gene en el genoma bacteriano.

Sanders et al (1978) al realizar estudios de los componentes celulares de la pared de Rhizobium, específicamente los EPS y los lipopolisacáridos que se cree participan en la infección y nodulación de las leguminosas, encontraron características muy parecidas en su estructura ya que al ser probada su sensibilidad a un mismo bacteriófago reaccionaron de la misma manera y su composición de azúcares, determinada por cromatografía de gases fue muy similar en ambos casos. Estos autores proponen la hipótesis de que un nivel reducido de carbohidratos extracelulares se encuentra relacionado con la incapacidad de nodular a los huéspedes específicos, sin embargo sugieren mayores estudios y análisis de estos polisacáridos para confirmar su participación en la infección de eucariontes por los procariontes.

Borthakur et al (1986), mencionaron que la genética molecular de la síntesis de EPS no ha sido estudiada en detalle en ningún género de bacterias, solo en lo referente a la importancia de estos polímeros en la industria (por ejemplo la goma producida por Xanthomonas); sin embargo el interés en el papel molecular de estas moléculas en la interacción bacteria-huésped aún continua. Sería interesante determinar si los EPS de las cepas MSBV 01 a 07 fueron realmente auténticos EPS de Rhizobium phaseoli o si fue

sintetizado otro tipo de polisacárido.

Los resultados referentes al peso seco de nódulos junto con la reducción de acetileno analizados en las gráficas poligonales, nos mostró que, aunque las mutantes fueron capaces de fijar nitrógeno, el tamaño y peso de los nódulos fue mucho menor que en la cepa control (CIAT) por lo que se confirma lo expuesto por Ko y Gayda (1990) que afirman que las mutantes obtenidas, aunque fijaron nitrógeno no desarrollaron tantos nódulos como en el caso de sus cepas controles de Rhizobium fredii.

Asimismo, la cantidad de etileno producido está directamente relacionado al número de nódulos y a su tamaño, esto es a menor número y tamaño de éstos menor cantidad de etileno producido (comunicación personal del Colegio de Postgraduados de Chapingo, sección microbiología de suelos), como en el caso de la cepa CIAT, al presentar diferencias significativas en el análisis estadístico, sugiere un mayor desarrollo en el peso de los nódulos al comparar con las mutantes.

La inexistencia de diferencias en el crecimiento foliar y total de la planta y en las relaciones de vástago raíz y razón de área foliar, en el caso de los tratamientos controles y con las mutantes, puede explicarse si se relaciona con la alta eficiencia del sistema radical, aún sin nódulos, que pudo haber mantenido a un nivel adecuado los requerimientos nutricionales por lo que no se vió reflejado al ser comparados los pesos secos de cada uno. Lo anterior se

encuentra ejemplificado por los valores de área foliar, peso seco total aéreo y peso seco total de la planta de la mutante U6 en las gráficas poligonales, ya que se ubican más alejados al resto de los demás tratamientos, lo que indica un mayor desarrollo de la planta en sí, aunque al relacionarlo con la reducción de acetileno no sea consecuencia de la fijación de nitrógeno.

Es interesante mencionar que aunque existieron diferencias significativas entre la cepa control CIAT y las mutantes en lo relativo al peso seco de los nódulos, la cantidad de nitrógeno fijada no es suficiente para que exista un incremento significativo en los demás parámetros morfológicos medidos, lo cual concuerda con el análisis de las gráficas poligonales, ya que en los controles sin inocular y en los tratamientos con cepas mutantes y silvestres no se observó un incremento marcado en los valores obtenidos que se encontraron muy cercanos unos de otros.

Otros factores que pudieron haber influido a que no existiera un mayor desarrollo de las plantas, serían el tamaño del recipiente en que fueron crecidas las plantas ya que no permitieron un desarrollo adecuado propiciando un retraso en la floración. Además factores ambientales como la temperatura en la noche que pudieron ser limitantes del crecimiento; por lo que se propone el uso de macetas y de un lugar con una temperatura más cálida, así como experimentos ya no en invernaderos sino en el campo.

Por otro lado, al no existir diferencias significativas



entre las mutantes en los análisis estadísticos aplicados a los parámetros medidos, nos hace suponer que en vez de ser 7 mutantes puedan ser agrupadas en solo tres mutantes que serían la MSBV03 (debido a su morfología Mucz), la MSBV04 (por su incapacidad de reducir el acetileno) y en conjunto las mutantes restantes como una sola. Para poder comprobar esta hipótesis se requerirá de un análisis genético más profundo para determinar la organización genética de cada mutante.

### Conclusiones.

1. El requerimiento de la síntesis de exopolisacáridos no es crítica para los nódulos del tipo determinado como en Rhizobium phaseoli.

2. No se encontraron diferencias entre los nódulos inducidos por las cepas mutantes de Rhizobium phaseoli al comparárlas con la cepa control CIAT en lo referente a su infectividad.

3. Todas las mutantes, a excepción de la U4, fueron capaces de reducir el acetileno.

4. La incapacidad de la mutante MSBV U4 de reducir acetileno, nos hace sugerir que se deba a un retraso en su capacidad o a que existió mutación en los genes nif (mutación pleiotrópica).

5. Los resultados obtenidos en el análisis estadístico sugieren que en vez de tener 7 mutantes se trabajaron con sólo 3 ya que no existieron diferencias entre ellas.

6. No existieron diferencias significativas en los parámetros morfofisiológicos entre la cepa silvestre CIAT 899 y las mutantes MSBV U1 a U7 de Rhizobium phaseoli en lo referente a la infectividad y eficiencia en la fijación simbiótica de nitrógeno.

Perspectivas.

1. El estudio de cepas bacterianas eficientes en la competencia para la nodulación de las leguminosas permitirá el desarrollo de nuevas metodologías que incrementen la selección de los rizobia resistentes a los adversos factores ambientales, sin embargo, se deberá ir a la par de los programas fisiológicos, de biología molecular y alimentación propiciándose un mayor entendimiento de la fijación de nitrógeno.

2. Se requerirán técnicas que involucren experimentos de centrifugación a altas velocidades para verificar que la unión de las microfibrillas extracelulares de la bacteria al polo radicular permanece intacta.

3. Al realizar experimentos en el campo se pondrá a prueba la capacidad infectiva y efectiva de la bacteria a condiciones ambientales extremas y se podrá evaluar su desempeño con bacterias nativas del suelo, permitiendo la creación de un inóculo comercial que pueda ser utilizado para aumentar la producción de frijol a nivel nacional.

4. Se requerirán estudios de otros componentes de la cápsula bacteriana de Rhizobium phaseoli (lipopolisacáridos y/o  $\beta$ -glucanos) para determinar su papel en el proceso de infección, así como de otro tipo de estudios de la cepa CIAT 699 para determinar si se ubica como una especie aparte.

5. Realizar estudios referentes al mapa genético de las mutantes para poder diferenciarlas entre sí y comprobar la hipótesis de la mutación pleiotrópica en la mutante 04.

Bibliografía.

1. Alexander, M. 1980. Introducción a la microbiología del suelo. AGT Editor. México. 491 pp.
2. \_\_\_\_\_ 1984. Biological nitrogen fixation, ecology, technology and physiology. Plenum Press New York & London. USA. 247 pp.
3. Almaraz, S.J.J. 1988. Empleo de la técnica de raíz dividida en el estudio ecológico de la simbiosis Rhizobium phaseoli- Phaseolus vulgaris L. bajo sequía. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Chapingo, México.
4. Arias, A. et al. 1979. Phosphoglucose isomerase mutant of Rhizobium meliloti. J. Bact. 137(1):409-414.
5. Arriaga, F. A. 1985. Evaluación de la respuesta fisiológica de tres variedades de sorgo bajo el esquema riego-sequía. Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala. México. 74 pp.
6. Bal, A.B. et al. 1978. Ultrastructure of Rhizobium japonicum in relation to its attachment to root hairs. J. Bacteriol. 133(3):1393-1400.
7. Ballesteros, G. 1983. El sombreado artificial en un trijol indeterminado arbustivo; efectos morfológicos y fisiológicos. Tesis de Maestro en Ciencias. Chapingo. México. 249 pp.
8. Beringer, J. et al. 1980. The genetic analysis of Rhizobium in relation to symbiotic nitrogen fixation. Heredity. 45(2):181-186.
9. Bidwell, R.G.S. 1979. Plant physiology. Collier

Macmillan International Editions. USA. 726 pp.

10. Borthakur, D. et al. 1985. psi, a plasmid-linked Rhizobium phaseoli gene that inhibits exopolysaccharide production and which is required for symbiotic nitrogen fixation. Mol. Gen. Genet. 200:275-282.
11. \_\_\_\_\_ 1986. A mutation that blocks exopolysaccharide synthesis prevents nodulation of peas by Rhizobium leguminosarum but not of beans by R. phaseoli and is corrected by cloned DNA from Rhizobium or the phytopathogen Xanthomonas. Mol. Gen. Genet. 203:320-323.
12. Brewin, N.J. et al. 1980. Plasmid-mediated transfer of host range specificity between two strains of Rhizobium leguminosarum. J. Gen. Microbiol. 120:413-420.
13. Brill, J.W. 1981. Agricultural microbiology. Sci. Am., 199-215.
14. Brock, T.D. et al. 1984. Microbiologia. Ed. Prentice Hall Hispanoamericana, S.A. Mexico. 906 pp.
15. Carlson, R. et al. 1987. Characterization of the lipopolysaccharide from a Rhizobium phaseoli mutant that is defective in infection thread development. J. Bact. 169(11):4923-4926.
16. Casse, F. et al. 1979. Identification and characterization of large plasmids in Rhizobium meliloti using agarose gel electrophoresis. J. Gen. Microbiol. 113:229-242.
17. Chakravorty, A.K. et al. 1982. Symbiotic nitrogen fixation: molecular cloning of Rhizobium gene involved in

exopolysaccharide synthesis and effective nodulation. J. Mol. Appl. Genet. :565-596.

18. Dart, P.J. 1975. Legume root nodule initiation and development. En: The development and function of roots. J.G. Torrey and D.T. Clarkson. Academic Press. London. 467-508 pp.

19. Dazzo, F.B. and W.J. Brill. 1979. Bacterial polysaccharide which binds Rhizobium trifolii to clover root hairs. J. Bact. 137(3):1362-1373.

20. \_\_\_\_\_ et al. 1984. Specific phases of root hair attachment in the Rhizobium trifolii clover symbiosis. Appl. Environ. Microbiol. 48(6):1140-1150.

21. DeJong, T.M. and D.A. Phillips. 1981. Nitrogen stress and apparent photosynthesis in symbiotically grown Pisum sativum L. Plant Physiol. 88:309-313.

22. Devlin, K. 1982. Fisiologia vegetal. Ediciones Omega. España. 517 pp.

23. Djordjevic, M.A. et al. 1983. Sym plasmid transfer to various symbiotic mutants of Rhizobium trifolii, R. leguminosarum and R. meliloti. J. Bact. 156(3):1035-1045.

24. \_\_\_\_\_. 1985. Tn5 mutagenesis of Rhizobium trifolii host-specific nodulation genes result in mutants with altered host-range ability. Mol. Gen. Genet. 200:463-471.

25. Döbereiner, J. 1989. Biotecnologia: Avanços recentes na pesquisa em fixação biológica de nitrogênio no Brasil. Conferência proferida no Instituto de Estudos Avançados-USP. Brasil.

26. Dowling, D.N. and W.J. Broughton. 1986. Competition for nodulation of legumes. *Ann. Rev. Microbiol.* 40:131-157.
27. Downie, J.A. *et al.* 1986. Nodulation of legumes by Rhizobium: The recognized root?. *Cell.* 47:153-154.
28. Eardly, D. *et al.* 1985. Characterization of Rhizobia from ineffective alfalfa nodules: Ability to nodulate bean plants (Phaseolus vulgaris (L.) Sav). *Appl. Environment. Microbiol.* 50(6):1422-1427.
29. Engvild, K. 1987. Nodulation and nitrogen fixation mutants of pea, Pisum sativum. *Theor. Appl. Genet.* 74:711-713.
30. Fassbender H.W. y E. Bornemisza. 1987. Quimica de suelos con énfasis en suelos de America Latina. IICA. San Jose, Costa Rica. 420 pp.
31. Geremia, A.K. *et al.* 1987. A Rhizobium meliloti mutant that forms ineffective pseudonodules in alfalfa produces exopolysaccharide but fails to form  $\beta$ -(1---2) glucan. *J. Bact.* 169(2):880-884.
32. Gloudeans, T. and T. Bisseling. 1989. Plant gene expression in early stages of Rhizobium-legume symbiosis. *Plant Sci.* 65(1-2):1-14.
33. Halliday, J. 1984. Principles of Rhizobium strain selection. *En: Biological nitrogen fixation, ecology, technology and physiology*. M. Alexander. Plenum Press New York & London. USA. 247 pp.
34. Hirsch, P. K. 1979. Plasmid-determined bacteriocin production by Rhizobium leguminosarum. *J. Gen. Microbiol.*

113:219-228.

35. Hombrecher, G. et al. 1981. Linkage of genes for nitrogenase and nodulation ability on plasmids in Rhizobium leguminosarum and R. phaseoli. Mol. Gen. Genet. 182:133-136.

36. INEGI, 1986. Estadísticas históricas de México. Tomo I. 490 pp.

37. Johnston, A. et al. 1978. High frequency transfer of nodulating ability between strains and species of Rhizobium. Nature. 276:634-636.

38. Jones, S.B. and R.E. Luchsinger. 1979. Plant systematics. McGraw-Hill Book Company. USA. 368 pp.

39. Ko, Y.H and R. Gayda. 1990. Nodule formation in soybeans by exopolysaccharide mutants of Rhizobium fredii USDA 191. J. Gen. Microbiol. 136:105-113.

40. Lamb, J.W. et al. 1982. Plasmid-determined nodulation and nitrogen-fixation abilities in Rhizobium phaseoli. Mol. Gen. Genet. 186:449-452.

41. Leigh, A.J. et al. 1985. Exopolysaccharide-deficient mutants of Rhizobium meliloti that form ineffective nodules. Proc. Natl. Acad. Sci. 82:6231-6235.

42. Lie, T.A. and K. Winarno. 1979. Competition between Rhizobium strains in nodule formation, interaction between nodulating and non-nodulating strains. Plant and Soil. 51:135-142.

43. Long, S.R. 1989. Rhizobium genetics. Ann. Rev. Genet. 23:483-506.

44. Malek, W. 1988. Microscopic structure of ineffective



alfalfa nodules formed by auxotrophic mutants of Rhizobium meliloti. J. Basic. Microbiol. 28(9-10): 651-658.

45. Martínez, E. et al. 1985. Reiteration of nitrogen gene sequences and specificity of Rhizobium in nodulation and nitrogen fixation in Phaseolus vulgaris. J. Gen. Microbiol. 131:1779-1786.

46. \_\_\_\_\_ . 1987. Nitrogen-fixing nodules induced by Agrobacterium tumefaciens harboring Rhizobium phaseoli plasmids. J. Bact. 169(6):2828-2834.

47. Mazliak, P. 1976. Fisiología vegetal. Nutrición y metabolismo. Ediciones Omega. España. 350 pp.

48. Miranda, C.S. 1979. Evolución de Phaseolus vulgaris y P. coccineus. En: Contribuciones al conocimiento del frijol (Phaseolus) en México. E.M. Engleman. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México. 83-87.

49. Napoli, C. and P. Albersheim. 1980. Rhizobium leguminosarum mutants incapable of normal extracellular polysaccharide production. J. Bact. 141(2):1454-1456.

50. Noel, D. et al. 1984. Rhizobium phaseoli symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. J. Bact. 158(1):148-155.

51. \_\_\_\_\_ . 1986. Mutations in Rhizobium phaseoli that lead to arrested development of infection threads. J. Bact. 168:1392-1401.

52. Nuñez, V. 1990. Obtención y caracterización de mutantes de Rhizobium phaseoli CIAT 899 deficientes en la producción de exopolisacáridos. Tesis de Licenciatura.

Universidad Simón Bolívar. México, D.F. 45 pp.

53. Nutt, M. et al. 1979. Evidence for nitrogen fixation (nif) genes on indigenous Rhizobium plasmids. Nature. 282:533-535.

54. Okon, Y. 1965. Azospirillum as a potential inoculant for agriculture. Trends Biotechnol. 3(9):223-228.

55. \_\_\_\_\_ et al. 1987. Microbial inoculants as crop-field enhancers. CRG Crit. Rev. Biotechnol. 6(1):

56. Phillips, D.A. et al. 1978. The effect of CO enrichment on root nodule development and symbiotic nitrogen reduction in Pisum sativum L. Amer. J. Bot. 63(3):358-362.

57. Postgate, J. 1976. La fixation biologique de l'azote. La recherche. 7(68):335-347.

58. \_\_\_\_\_. 1960. Nitrogen fixation. E. Arnold Collections. London. 70 pp.

59. Prakash, K.K. et al. 1980. Detection, isolation and characterization of large plasmids in Rhizobium. Procc. of the 3rd International Symposium on Nitrogen Fixation. University Park Press. USA.

60. Quinto, C. et al. 1982. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in Rhizobium phaseoli. Nature. 299:724-726.

61. Radford, A.E. et al. 1974. Vascular plant systematics. Harper & Row Pub. USA.

62. Rojas Garcidueñas, M. 1964. Fisiología vegetal aplicada. McGraw-Hill Ed. México. 262 pp.

63. Ruvkun, G. B. and F. M. Ausubel. 1979. Interspecies

homology of nitrogenase genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77:191-195.

64. Sanders, R. et al. 1978. A Rhizobium mutant incapable of nodulation and normal polysaccharide secretion. Nature. 271:240-242.

65. \_\_\_\_\_ 1981. Lack of correlation between extracellular polysaccharide and nodulation ability of Rhizobium. Nature. 292:148-149.

66. Selker, J. M. L. 1988. Three-dimensional organization of uninfected tissue in soybean root nodules and its relation to cell specialization in the central region. Protoplasma. 147:178-190.

67. Sheehy, J.E. et al. 1985. Control of nitrogen fixation in a legume nodule: an analysis of the role of oxygen diffusion in relation to nodule structure., Ann. Bot. 55:549-562.

68. Sherwood, J. et al. 1984. Effect of nitrate supply on the in-vivo synthesis and distribution of trifoliin A, a Rhizobium trifolii-binding lectin in Trifolium repens seedling. Planta. 162:540-547.

69. Streeter, J. 1988. Effect of nitrate on acetylene reduction activity and carbohydrate composition of Phaseolus vulgaris nodules. Physiol. Plantarum. 68:294-300.

70. Truchet, G. et al. 1989. The Rhizobium-legume symbiosis. Two methods to discriminate between nodules and other root-derived structures. Protoplasma. 149:82-88.

71. Vandenbosch, K. A. et al. 1985. Nodule initiation

elicited by noninfective mutants of Rhizobium phaseoli. J. Bact. 162 (3):950-959.

72. Vasse, J.M. & G. Truchet. 1984. The Rhizobium-legume symbiosis: observation of root infection by bright-field microscopy after staining with methylene blue. Planta. 161:467-469.

73. Verma, D. and A. Bal. 1978. Intracellular site of synthesis and localization of leghemoglobin in root nodules. Proc. Natl. Acad. Sci. 78(11):3843-3047.

74. Vincent, J. 1975. Manual práctico de rizobiología. Ed. Hemisterio Sur. Argentina. 108-113.

75. \_\_\_\_\_. 1980. The genus Rhizobium. En: The Prokaryotes. Vol. 1. Springer-Verlay. USA. 818-841 pp.

76. Wallace, et al. 1972. Physiological basis for yield differences II. Variation in dry matter distribution among aerial organs for several dry beans varieties. Crop. Sci. 6:503-506.

77. Zajac, E. et al. 1975. Lipopolysaccharide as receptor for Rhizobium phage 1P. G. Gen. Microbiol. 90:365-367.

78. Zimmerman, J. et al. 1983. Molecular characterization of Tn5-induced symbiotic (Fix-) mutants of Rhizobium meliloti. J. Bact. 156(1):1025-1034.

79. Zurkowski, W. and Z. Lorkiewicz. 1978. Effective method for the isolation of non-nodulating mutants of Rhizobium trifolii. Genet. Res. 32:311-314.

Apéndice.1 Medio Jensen para plántulas (Vincent, 1975).

CaHPO <sub>4</sub>	1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2 g
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.2 g
NaCl	0.2 g
FeCl <sub>3</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0.1666 g

+Sol. oligoelementos 1 ml

Aforar a un litro con agua destilada y ajustar el pH a 6.7-7. Al utilizarse diluirse a 1/5. Para una solución Jensen con nitrógeno agregar 0.700 g de KNO<sub>3</sub> por litro de solución.

+ Solución de oligoelementos.

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.5 g
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.0390 g
MnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	0.5 g
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0.02 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0.0661 g

Aforar a un litro con agua destilada y ajustar el pH a 6.7-7.

2 Medio PY líquido.

Peptona de caseína	5 g
Extracto de levadura	3 g
Cloruro de calcio	7 mM (1 ml)
Agua destilada	1 lit

El cloruro de calcio se debe esterilizar aparte del

medio por lo que se recomienda se prepare un stock de 100 ml (77.69 g en 100 ml de agua destilada) y una vez que el medio este listo se agregue el cloruro.

■ Medio Ym

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.2 g
NaCl	0.2 g
CaCl <sub>2</sub>	0.04 g
Extracto de levadura	1 g
Agar	15 g
Manitol	10 g
Agua destilada	1 lt

Se disuelve todo a excepción del cloruro de calcio y se esteriliza. Cuando este listo se agrega el cloruro esterilizado aparte.

Para los antibióticos se utiliza rifampicina para CIAT y rifampicina-kanamicina para las mutantes. Las cantidades son 0.25 ml de antibiótico para 250 ml de agua.

■ Solución Drabkin.

0.052 g de KCN
0.198 g de K <sub>2</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>
1 g de NaHCO <sub>3</sub>

Se afora a un litro de agua destilada.

\* Técnica histológica para nódulos. (Tinción safranina-azul de metileno). Modificada de Malek, 1988.

1. Se fija el material en FAA por 24 horas.
2. Lavar con agua corriente durante 1 hora
3. Deshidratar el tejido en series de etanol: se realizan cambios de una hora en alcoholes graduales de 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 96 y absoluto.
4. Se aclara en alcohol absoluto-xilol 1:1 por 30 minutos.
5. Transparentar en xilol de 20 a 30 minutos o hasta que se empiece a transparentar.
6. Se incluye en parafina, dos cambios de una hora.
7. Se realizan cortes de 8 $\mu$  en el microtomo para parafina. Los cortes obtenidos se colocan en un baño maría de flotación a 40°C ( al salir los cortes del microtomo la parte brillante se coloca hacia abajo y la opaca hacia arriba). Los cortes se recogen con portaobjetos que tengan unas gotas de gelatina al 1% sobre la superficie y se colocan en una placa de calor a baja temperatura.
8. Para desparafinar y teñir los cortes se siguen los siguientes pasos:
  - a. Xilol: dos cambios de 5 minutos.
  - b. Alcohol absoluto: dos cambios de 2 minutos.
  - c. Alcohol de 96%: dos cambios de 2 minutos.
  - d. Teñir con safranina por 15 minutos.
  - e. Lavar con alcohol de 96 rápidamente.

- f. Teñir con azul de metileno por 5 minutos.
- g. Lavar con alcohol de 96 rápidamente.
- h. Alcohol absoluto por 3 minutos.
- i. Xilol- Alcohol absoluto por 2 minutos.
- j. Xilol por 2 minutos.
- k. Montar con bálsamo de Canadá.



Fuente de variación	gl	SC	CM	F observado	F requerido 5%      1%
Peso seco de nódulos	7	0.0027	0.0004	10.000	*3.13 * 2.95
Error	64	0.0023	0.00004		
Total	71	0.0050			

Análisis de varianza aplicado al peso seco de los nódulos de Phaseolus vulgaris var. Canario 107 inducidos por Rhizobium phaseoli (cepas CIAT 899 y MSBV 01 a 07).

Fuente de variación	gl	SC	CM	F observado	F requerido 5%      1%
Reducción acetileno	7	15 832	2 262	6.3432	*5.86 *4.89
Error	10	3 566	356.6		
Total	17	19 398			

Análisis de varianza aplicado a la reducción de acetileno en nódulos de 30 días de Phaseolus vulgaris var. Canario 107 inducidos por Rhizobium phaseoli (cepas CIAT 899 y MSBV 01 a 07).