

TD  
688

R. 12950

TD  
688

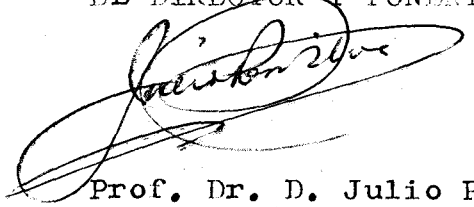
EFFECTO DE LOS EXUDADOS RADICALES DE LEGUMINOSAS  
SOBRE LA PRODUCCION DE ACIDO INDOL ACETICO POR  
RHIZOBIUM.

Trabajo presentado para optar al Grado de Doctor en  
Ciencias, Sección de Biológicas, por el Licenciado  
D. TOMAS GARCIA RODRIGUEZ.



Sevilla, marzo de 1978

EL DIRECTOR Y PONENTE



Prof. Dr. D. Julio Pérez Silva.  
Catedrático de Microbiología.



A mi hija

El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Sevilla, bajo la dirección del Prof. Dr. D. Julio Pérez Silva, al que deseo hacer constar mi agradecimiento por sus orientaciones y su constante interés y dedicación.

Asímismo, me es grato expresar mi agradecimiento a todos los compañeros del Departamento de Microbiología, y muy especialmente al Dr. D. Angel Gutiérrez Navarro por su apoyo científico y su labor crítica durante el desarrollo de este trabajo y al Dr. D. Fernando Pérez Paniagua por su colaboración técnica.

También deseo manifestar mi agradecimiento al Prof. Dr. D. Jacobo Cárdenas, del Departamento de Bioquímica de esta Facultad, por sus útiles críticas y sugerencias.

Al Prof. Dr. D. Jesús Guinea, de la Universidad de Barcelona, por su generosa donación de las estirpes utilizadas en los ensayos biológicos realizados en el presente trabajo.

Finalmente, agradezco el apoyo económico prestado por la Universidad de Sevilla y el Ministerio de Educación y Ciencia, a través del Plan de Formación del Personal Investigador, sin el cual hubiera sido imposible la realización del trabajo.

INDICE

1. INTRODUCCION.....	1
1.1. Antecedentes bibliográficos.....	2
1.1.1. La formación del nódulo y el establecimiento de la sim- biosis.....	6
1.1.2. Exudados radicales de las leguminosas.....	11
1.1.3. Producción de AIA a partir de triptófano.....	16
1.1.4. Análisis cuantitativo del AIA.....	22
1.1.5. Taxonomía del género <u>Rhi-</u> <u>zobium</u> .....	23
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	33
2.1. Material.....	34
2.1.1. Microorganismos.....	34
2.1.1.1. Microorganismos del género <u>Rhizobium</u> .....	34

2.1.1.2. Microorganismos pertene-	
cientes a otros géneros.....	35
2.1.2. Semillas vegetales.....	36
2.1.3. Sustancias químicas utilizadas.....	36
2.2. Métodos.....	37
2.2.1. Aislamiento, cultivo y mateni-	
miento de los microorganismos.....	37
2.2.1.1. Aislamiento de <u>Rhizobium</u> .....	37
2.2.1.2. Cultivo de los microor-	
ganismos.....	39
2.2.1.3. Mantenimiento de los	
microorganismos.....	39
2.2.1.3.1. Mantenimiento de	
<u>Rhizobium</u> .....	39
2.2.1.3.2. Mantenimiento de	
las otras bacterias...	40
2.2.2. Obtención de los exudados	
radicales.....	40
2.2.2.1. Preparación de las se-	
millas.....	40
2.2.2.2. Cultivo de las plántulas.....	41
2.2.2.3. Obtención y esterilización	
del exudado.....	42
2.2.3. Producción de AIA por células	
lavadas.....	44

2.2.3.1. Preparación de los cultivos.....	44
2.2.3.2. Extracción del AIA.....	45
2.2.3.3. Valoración del AIA.....	45
2.2.3.3.1. Reacción de Sal- kowski.....	46
2.2.3.3.2. Modificación de Gutiérrez Navarro....	47
2.2.4. Ensayo de la degradación del AIA por células lavadas de <u>Rhizobium</u> .....	52
2.2.5. Ensayo de la actividad AIA- Oxidasa en el exudado ra- dical.....	53
2.2.6. Investigación de NAD en el exudado radical.....	53
2.2.7. Valoración de la tiamina en el exudado radical.....	55
2.2.8. Determinación biológica de la piridoxina en el exudado radical.....	57
2.2.9. Determinación de aminoácidos en el exudado radical.....	59

3. RESULTADOS.....	60
3.1. Efecto de los exudados radicales de leguminosas sobre la producción de AIA por suspensiones de células lavadas.....	60
3.1.1. Variación del efecto a lo largo de la incubación.....	60
3.1.2. Influencia de la concentración de células sobre la producción de AIA.....	64
3.1.3. Comparación del efecto de exudados radicales de distintas leguminosas sobre diferentes bacterias.....	72
3.2. Producción, naturaleza y actividad del exudado.....	78
3.2.1. Variación de la actividad del exudado radical con la edad de la plántula.....	78
3.2.2. Estabilidad de los exudados a distintas temperaturas..	84
3.2.3. Efecto de un choque térmico sobre la actividad inhibidora del exudado radical.....	85



3.2.4.	Ensayo de la actividad AIA Oxidasa en el exudado radical de <u>Trifolium alexandrinum</u> de dos días de edad.....	90
3.2.5.	Ensayo de la degradación del AIA por células lavadas de <u>Rhizobium</u> , en presencia y en ausencia de exudados radicales.....	91
3.2.6.	Investigación de aminoácidos en los exudados radicales.....	93
3.2.7.	Producción de AIA por células lavadas de <u>Rhizobium</u> , a partir de triptófano y en presencia de otros aminoácidos.....	96
3.2.7.1.	Producción de AIA en presencia de diversos aminoácidos.....	96
3.2.7.2.	Producción de AIA en presencia de distintas concentraciones de ácido glutámico.....	97

- 3.2.7.3. Influencia de distintas concentraciones de exudado, sometido previamente a un choque térmico, sobre la producción de AIA.....99
- 3.2.8. Investigación de NAD en los exudados radicales de Trifolium alexandrinum.....102
- 3.2.9. Efecto del NAD sobre la producción de AIA por células lavadas de Rhizobium.....107
- 3.2.10. Investigación de tiamina en el exudado radical de Trifolium alexandrinum.....110
- 3.2.11. Efecto del pirofosfato de tiamina sobre la producción de AIA por células lavadas de Rhizobium.....117
- 3.2.12. Investigación de piridoxina en el exudado radical de Trifolium alexandrinum.....118
- 3.2.13. Efecto del fosfato de piridoxal sobre la producción de AIA por células lavadas de Rhizobium.....120

3.2.14. Efecto de distintas combina- ciones de NAD, pirofosfato de tiamina y fosfato de pi- ridoxal sobre la producción de AIA por células lavadas de <u>Rhizobium</u> .....	123
3.2.15. Efecto del ácido 2-cetoglu- tárico sobre la producción de AIA por células lavadas de <u>Rhizobium</u> .....	125
3.2.15.1. Influencia de la con- centración de ceto- glutarato.....	127
3.2.15.2. Efecto de la preincu- bación de las células en ácido 2-cetoglutá- rico sobre la pro- ducción de AIA.....	153
4. DISCUSION.....	167
5. CONCLUSIONES.....	189
6. BIBLIOGRAFIA.....	194

## 1. INTRODUCCION

### 1.1.- Antecedentes bibliográficos.-

No pretendemos en esta introducción recoger y comentar los numerosos trabajos que sobre la fijación del nitrógeno existen en la bibliografía. Trataremos únicamente de destacar la importancia tanto económica como científica de este proceso y luego centrar la atención en los antecedentes bibliográficos de aquellos aspectos que consideramos más directamente relacionados con el trabajo experimental que aquí presentamos, como son, de una parte, la formación del nódulo especialmente en lo que respecta a la producción de ácido indol acético (AIA) por Rhizobium, a partir de triptófano, y de otra parte, las posibles implicaciones taxonómicas del comportamiento de distintas especies de Rhizobium en esta fase de la preinfección.

La importancia de la fijación biológica del nitrógeno es manifiesta desde varios puntos de vista. Principalmente, se pueden destacar dos aspectos de gran interés:

#### a) Importancia económica del proceso.-

Esta queda resaltada por el informe de la F.A.O, recogido por Dommerges y Mangenot (15), según el cual se calcula que la tasa de fijación de nitrógeno por año en todo el mundo es del orden de  $10^8$  toneladas, atendiendo solamente al que se realiza por vía simbiótica.

b) Importancia del proceso desde un punto de vista puramente científico.-

Este puede ser abordado como estudio fisiológico, bioquímico y genético principalmente.

Según datos históricos que se recogen en la obra de Dommerges y Mangenot (15), el estudio científico del proceso se remonta al año 1838, en el cual Boussingault demostró claramente que las leguminosas fijaban nitrógeno, confirmándose después con los trabajos de Helrriegel y Wilfart, quienes demostraron en 1888 que sólo las leguminosas que portaban nódulos radicales eran capaces de fijar nitrógeno. Estos nódulos radicales de las leguminosas ya habían sido descritos previamente por Malpighi, en 1675. El mismo año de 1888, Beijerinck aisló la bacteria causante de la nodulación y a la que llamó Bacillus radicícola, hoy conocida como Rhizobium leguminosarum. Este autor también aisló en 1901 el primer fijador libre de nitrógeno, Azotobacter.

Uno de los aspectos más interesantes de la fijación biológica del nitrógeno es la simbiosis entre una bacteria perteneciente al género Rhizobium y una leguminosa.

La fijación del nitrógeno atmosférico es el resultado de la acción conjunta de estos dos elementos. La ventaja a este respecto, de la simbiosis, consiste preferentemente en que la planta aporta la energía necesaria para

poder romper el triple enlace de la molécula de nitrógeno, energía que es mucho más difícil conseguir cuando el Rhizobium vive libre en el suelo. A pesar de ello, en laboratorio, se ha conseguido, con unas condiciones microaerófilas especiales, la fijación libre de nitrógeno por parte de Rhizobium (41a,71), lo que sugiere que la acción de la planta podría ser el crear un ambiente con tensión débil de oxígeno, que protegería la nitrogenasa de la bacteria.

Como es sabido, la familia Leguminosae es una de las más numerosas de toda la Botánica: comprende unos quinientos géneros con diez mil a doce mil especies, distribuidas en tres subfamilias (Cesalpinoideae, Mimosoideae y Papilionoideae). Las especies de las dos primeras se dan preferentemente en zonas tropicales, mientras que las especies pertenecientes a la subfamilia Papilionoideae están agrupadas en su mayoría dentro de la zona templada.

Según estudios realizados por Allen y Baldwin (15), el 90% de las plantas de la subfamilia Papilionoideae examinadas presentan nódulos, mientras que el porcentaje más bajo de plantas noduladas corresponde a la subfamilia Cesalpinoideae; las especies pertenecientes a la subfamilia Mimosoideae ocupan una posición intermedia con respecto a este carácter.

El otro elemento del sistema simbiótico es Rhizobium.

Este género de bacterias aparece incluido en la octava edición del Bergey's (6), en la parte siete, familia Rhizobiaceae, juntamente con Agrobacterium. La semejanza entre estos dos géneros es muy grande y basándose en ello algunos autores (21, 22, 23, 13) proponen la inclusión de las especies de Agrobacterium dentro del género Rhizobium.

Morfológicamente hay que distinguir entre formas vegetativas y bacteroides de Rhizobium. Se llaman bacteroides a las células de Rhizobium tal como se encuentran dentro del nódulo maduro, las cuales son distintas de las formas vegetativas, es decir, de las células tal como se encuentran en la rizosfera, en el tubo de infección o en los medios de cultivo (4, 5, 12, 19, 58).

Los rizobios se describen en el citado manual de Bergey's como bacilos de 0,5 a 0,9 micras por 1,2 a 3,0 micras, que pueden presentar formas pleomórficas cuando son desfavorables las condiciones de cultivo. Contienen granulaciones intracitoplasmáticas de polibeta-hidroxibutirato, que, al microscopio de contraste de fases, aparecen como gránulos muy refringentes; son Gram negativos y móviles en cultivos jóvenes. Presentan de dos a seis flagelos peritricos, o bien, un flagelo polar o subpolar. Cuando se desarrollan en medios ricos en hidratos de carbono producen un abundante mucopolisacárido. Son microorganismos aerobios, aunque pueden desarrollarse en medios con ten-



siones débiles de oxígeno (0,01 atm).

En el Bergey's se describen las colonias de estos microorganismos como blancas e incoloras. Estas colonias cuando crecen en presencia de rojo fenol (69), o de cristal violeta (Fraile, comunicación personal) no concentran el colorante, mientras que otras colonias bacterianas presentan un intenso color rojo o violeta, según sea el colorante añadido a los medios de cultivo.

#### 1.1.1.- La formación del nódulo y el establecimiento de la simbiosis.-

El objeto de nuestro trabajo está encuadrado, en gran parte, dentro de la fisiología de la formación de los nódulos, esto es, la infección y el establecimiento definitivo de la simbiosis.

La infección de las raíces por parte de Rhizobium está regulada tanto por factores dependientes de la planta como de la bacteria.

El Rhizobium debe ser capaz de penetrar en los tejidos radicales, es decir, debe ser "infectivo" o "virulento", pero la infección y la nodulación también dependen de la planta hospedadora. Como ya veremos posteriormente, nuestro trabajo aporta datos que pueden aclarar algo de este proceso de regulación, principalmente en lo que se

refiere al control que ejerce la planta, a través de sus exudados radicales, sobre los microorganismos que se encuentran en la rizosfera, estimulando o inhibiendo actividades bioquímicas que afectan al proceso de infección.

Por otra parte, Nutman (40) ha demostrado la presencia de factores genéticos más o menos complejos que inducen una resistencia de la leguminosa a la infección por Rhizobium, o que condiciona el número o el tamaño de los nódulos que se pueden formar sobre sus raíces.

La formación del nódulo presenta varias fases que se producen sucesivamente y que determinan finalmente el establecimiento de la simbiosis entre el Rhizobium y la leguminosa.

Según Vincent (69), en la mayoría de las leguminosas se pueden distinguir cuatro fases principales de la infección y formación del nódulo: a) fase de preinfección; b) infección y génesis del nódulo; c) madurez nodular, y d) degeneración del nódulo. Estas fases se encuentran recogidas en el cuadro I.

A nuestro juicio, las fases más interesantes desde el punto de vista de la fisiología de la formación del nódulo, son la primera y la segunda. Con respecto a la segunda fase, infección y génesis del nódulo, se han realizado muchos estudios fisiológicos, citológicos y genéticos (5, 11, 45); pero nosotros hemos centrado la atención en la

Cuadro I.- Fases de la formación de un nódulo en la  
simbiosis Rhizobium-leguminosa.

FASES	EVENTOS CORRESPONDIENTES
1. Preinfección de la raíz	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Multiplicación de los <u>Rhizobium</u> específicamente en la rizosfera.</li> <li>- Deformación de los pelos absorbentes.</li> </ul>
2. Infección y génesis del nódulo.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Penetración de los <u>Rhizobium</u>, formación y progresión del tubo de infección</li> <li>- Multiplicación de las células diploides y tetraploides que forman el tejido nodular (diferenciación del nódulo).</li> </ul>
3. Madurez nodular	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Liberación de los <u>Rhizobium</u> fuera del tubo de infección y formación o persistencia de la membrana envolvente.</li> <li>- Multiplicación de los <u>Rhizobium</u> liberados.</li> <li>- Conversión a la forma bacteróide.</li> <li>- Establecimiento de la simbiosis funcional: reducción y asimilación del nitrógeno (madurez nodular en sentido estricto)</li> </ul>
4. Degeneración	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Liberación de los <u>Rhizobium</u> en el suelo.</li> </ul>

primera, fase de preinfección, porque se presta mejor al estudio de los procesos de interregulación planta-Rhizobium que establecen en último término la asociación simbiótica.

Esta primera fase de preinfección puede, a su vez, dividirse en dos etapas: multiplicación específica de los rizobios en la rizosfera de la leguminosa, y deformación de los pelos absorbentes de las raíces de la planta.

Los rizobios pueden vivir en los suelos sin la presencia de la planta hospedadora, pero su mayor o menor pervivencia depende de la existencia de su planta hospedadora habitual, ya que según se ha demostrado (40, 39), los exudados radicales de ésta estimulan su multiplicación.

Este aumento en el número de rizobios que se encuentran en la rizosfera de la leguminosa no debe confundirse con el llamado "efecto rizosfera", que afecta a otros muchos microorganismos del suelo, ya que éste consiste en una estimulación inespecífica de los microorganismos del suelo por cualquier planta que exista en sus proximidades, mientras que en el caso de Rhizobium se trata de una estimulación selectiva (39) consistente en que las distintas especies del género se afectan poco por plantas no leguminosas, mientras que son fuertemente estimuladas por plantas leguminosas y, además, una determinada estirpe de Rhizobium

es más intensamente estimulada por la planta para la cual es específica que por otras leguminosas. Hay autores (10) que ponen en duda este efecto específico de estimulación de las leguminosas sobre Rhizobium y, por supuesto, niegan la estimulación preferencial de aquellas estirpes que le son específicas. Incluso se mencionan casos de efectos negativos de leguminosas sobre los rizobios, como los descritos por Bonnier (8) acerca del efecto desfavorable de Trifolium subterraneum, Centrosema pubescens y otras leguminosas, porque difunden materias tóxicas desde el pericarpio de la semilla.

De este esquema general que hemos expuesto acerca de la estimulación del crecimiento de Rhizobium por acción de leguminosas específicas se apartan algunos casos excepcionales, como puede ser la estimulación intensa de Rhizobium trifolii por raíces de algodón (39).

Un índice de esta estimulación específica de Rhizobium por las raíces de leguminosas es el cociente R/S (número de bacterias en la rizosfera de la leguminosa partido por el número de bacterias en el suelo); para Rhizobium esta razón R/S oscila entre  $10^2$  y  $10^6$ , mientras que para otras bacterias, en la rizosfera de la misma leguminosa, este cociente está comprendido entre 10 y  $10^2$  y aún en los casos más ventajosos nunca sobrepasa el valor de  $10^3$ . Esta estimulación tiene efecto hasta una distancia de 10 a

20 mm de la raíz (39) y su mecanismo no está aún muy bien conocido, pero se cree que está en gran parte determinada por la emisión de exudados radicales por las leguminosas, que actúan selectivamente sobre los rizobios.

### 1.1.2.- Exudados radicales de las leguminosas.-

Dado que gran parte de nuestro trabajo experimental está encaminado al estudio del efecto de los exudados radicales sobre la producción de AIA por Rhizobium a partir del triptófano, creemos conveniente exponer con cierto detalle los datos que hemos recogido en la bibliografía acerca de la composición de tales exudados.

Según Rovira (55, 54), los exudados radicales son más variados y abundantes en las leguminosas que en otras plantas. Las leguminosas excretan un gran número de sustancias en la rizosfera, principalmente azúcares, aminoácidos y algunas vitaminas. Por otra parte, Rovira ha encontrado también en los exudados radicales de leguminosas nucleótidos y varios enzimas. Según Dart y Mercer (10) pueden ser integrantes de estos exudados productos de degradación de células radicales.

Rovira (56) también encontró que de seis leguminosas ensayadas, la biotina era excretada siempre y la nia-

cina y el ácido pantoténico generalmente también; pero la tiamina, que es un factor esencial para el crecimiento de Rhizobium, era excretada de forma esporádica. Además, en condiciones naturales el Rhizobium depende bastante de la excreción de tiamina por otros microorganismos existentes en la rizosfera. De tal forma que, además de la planta hospedadora, otros microorganismos presentes pueden estimular el crecimiento de Rhizobium.

Van Egeraat (68) observó que la adición de una fuente de carbono al medio aumenta considerablemente el efecto de los exudados radicales en cuanto a su estimulación sobre el crecimiento, indicando que estaban presentes una cantidad grande de compuestos nitrogenados en estos exudados, durante los primeros estados de crecimiento, mientras que hidratos de carbono asimilables se encontraban en cantidades limitantes. En este mismo trabajo se menciona que son las raíces laterales las que ejercen un efecto crucial en la estimulación de los rizobios que se encuentran en la rizosfera. Este mismo autor trabajando con exudados de Pisum sativum, encontró dos compuestos, que portan uracilo, que al parecer son intermediarios del metabolismo de los ácidos nucleicos. Van Egeraat ha comprobado asimismo la liberación de cantidades considerables de homoserina, principalmente durante la formación de la primera raíz lateral, aunque también se realiza

en fases posteriores. Un dato interesante consiste en que cuando la raíz aún no ha producido raíces laterales, sus exudados no producen efectos estimulantes sobre el crecimiento de Rhizobium; más bien, al contrario, se observa una disminución grande del número de bacterias, lo que puede indicar que en las primeras fases de desarrollo radical hay una excreción de sustancias tóxicas por la raíz principal.

Según Kaunat (28), los aminoácidos alanina, ácido aspártico y ácido glutámico se encuentran frecuentemente en los exudados radicales.

Además, otros autores (29, 39) encuentran el triptófano como componente normal de los exudados radicales. Quizás este aminoácido tenga una gran importancia en el proceso de curvatura de los pelos radicales ya que teniendo en cuenta que la planta no exuda AIA y que este se encuentra en la rizosfera, y por otra parte que la reacción de curvatura es típica de las auxinas, se puede plantear la hipótesis de que Rhizobium transforma el triptófano exudado por la planta, produciendo AIA, que provocaría la curvatura de los pelos radicales.

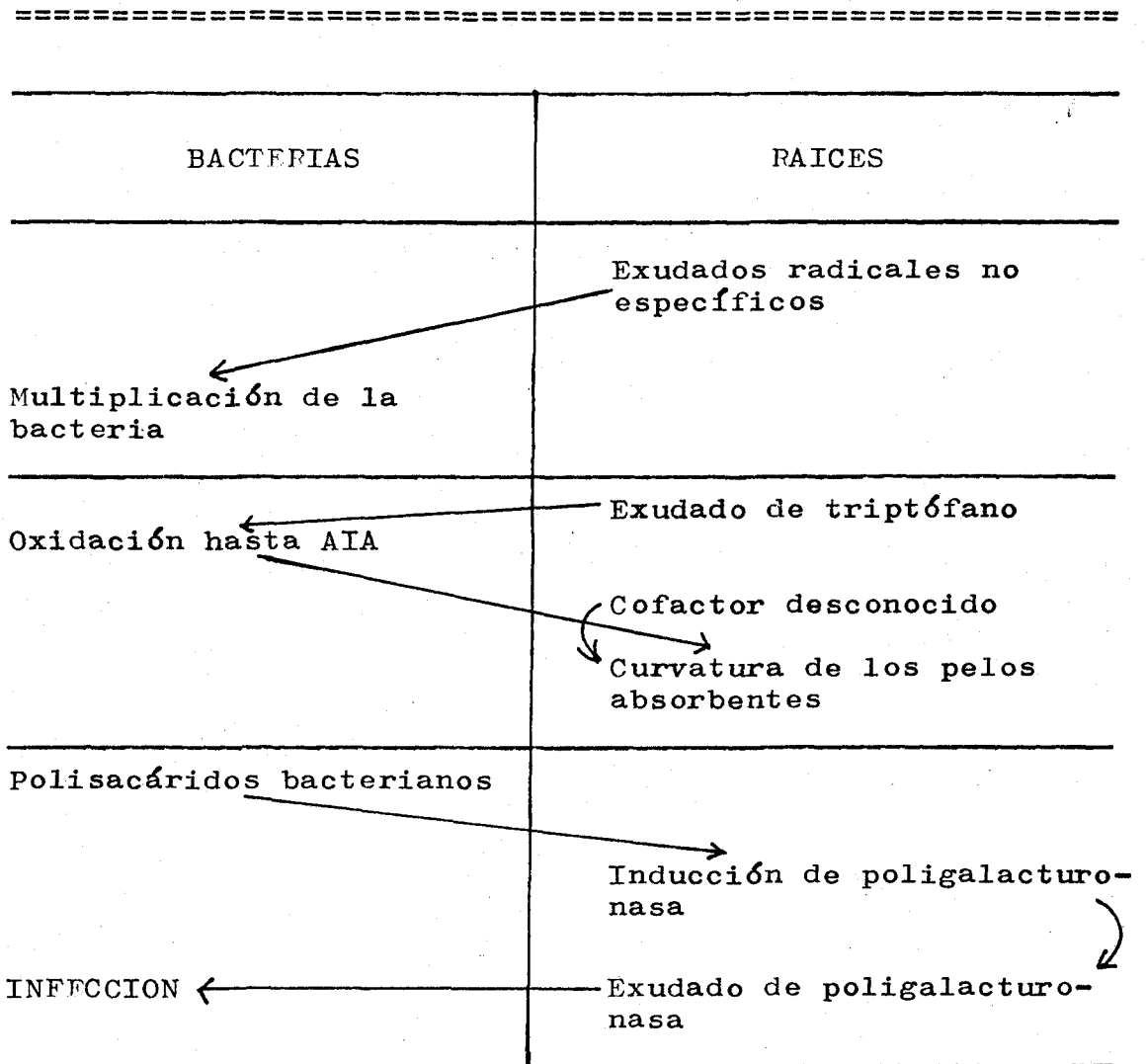
Asimismo, dado que los filtrados obtenidos de células que se desarrollan en la rizosfera provocan esta curvatura con mayor eficacia que los filtrados de células cultivadas en laboratorio (40), cabe suponer la existen-



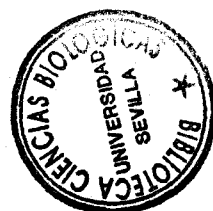
cia de algún cofactor producido por la raíz, que coadyuvaría con el efecto manifestado por el AIA.

Nutman (40), resumió todo el proceso de la preinfección con un esquema, que se representa en el cuadro II.

Cuadro II.- Esquema del mecanismo de la fase de preinfección de la raíz en el establecimiento de la simbiosis Rhizobium-leguminosa.



Recientemente, este esquema de la fase de la preinfección se ha visto modificado por nuevas aportaciones, entre las cuales podemos destacar en primer lugar las realizadas por el propio Nutman, quien en 1976 (40a) ha propuesto un nuevo esquema para la fase de la preinfección, en el cual se le atribuye al AIA una influencia sobre la densidad de los pelos radicales, su longitud, forma y ramificaciones; sin embargo, no se acepta su intervención en la curvatura de los pelos absorbentes que se lleva a cabo antes de la infección. Esta curvatura estaría provocada por diversos elementos, no muy bien identificados. Por otra parte, Olivares (41), basándose en datos experimentales ha demostrado que existe una relación entre la inducción de la poligalacturonasa de la planta por Rhizobium y la producción de AIA por éste, debido a la influencia del polisacárido capsular de Rhizobium sobre la emisión de triptófano por parte de los exudados radicales de la leguminosa.



### 1.1.3.- Producción de AIA a partir de triptófano.-

De todo el proceso de la preinfección, el paso que más nos interesa es el de la conversión oxidativa de triptófano en AIA, por Rhizobium.

La producción de AIA ha sido muy estudiada, en una gran variedad de microorganismos. En lo que se refiere a hongos, la revisión de los estudios experimentales, principalmente, corresponde a Gruen (24). Posteriormente también han aparecido varias publicaciones en las que se describe la producción de auxinas por hongos (42).

Una revisión importante en este aspecto es la de Barea y Montoya (2), quienes recopilan y comentan los datos sobre este tema y que nosotros resumimos a continuación. La producción de auxinas por bacterias ha sido muy estudiada. En 1938, Raznisina fué el primero que reveló la existencia de sustancias de naturaleza auxínica en cultivos de Azotobacter, y Bukatsch y col, los primeros que identificaron el AIA en dichos cultivos. Un estudio importante sobre la producción de AIA en cultivos de Azotobacter chroococcum fué realizado por Brown y Walker (9), quienes ponen de manifiesto tanto una síntesis como una degradación posterior del AIA producido. Estos autores también intentaron una transformación del triptófano en AIA por células lavadas de Azotobacter chroococcum, pero no lo consiguieron. También se ha puesto de manifiesto la

transformación de triptófano en AIA y ácido indol láctico (AIL) por especies de Agrobacterium y de Arthrobacter.

Según ha demostrado Kaunat (28), algunos aminoácidos inhiben la producción de AIA por bacterias, a partir del triptófano. En efecto, este autor trabajando con bacterias típicas de la rizosfera, pertenecientes a los géneros Achromobacter, Micrococcus, Microbacterium, Agrobacterium, Pseudomonas, Bacillus y Actinomyces, encontró que todas las estirpes eran capaces de formar AIA a partir del triptófano, pero que la adición de alanina, ácido aspártico y ácido glutámico, que son aminoácidos existentes en los exudados radicales, inhibía la transformación de triptófano en AIA, en casi todos los casos. Asimismo, la adición de hidrolizado de caseína inhibía completamente la transformación de dicha sustancia, en la mayoría de los microorganismos mencionados.

También se ha demostrado que las bacterias pueden degradar el AIA. Así, Libbert y Rish (34) aislaron 109 bacterias de la superficie de la parte aérea y de la raíz de plantas cultivadas por sistema hidropónico. De estas, 53 fueron capaces de transformar el triptófano en AIA y 15 de ellas podían destruir el AIA; 13 bacterias eran capaces de sintetizar y de destruir el AIA. Estas bacterias

pertenecían a los géneros: Pseudomonas, Achromobacter, Alcalígenes, Bacillus y Flavobacterium. Al parecer la degradación del AIA se lleva a cabo solamente en unas condiciones determinadas, como puede ser la ausencia de una fuente de carbono.

También se ha estudiado la producción de AIA por bacterias pertenecientes al género Rhizobium, tanto en cultivos como en suspensiones de células lavadas. Así, Kefford y col. (29) encontraron que cuando se cultivaban plantas de Trifolium subterraneum en agua destilada estéril, durante tres semanas, se detectaba la presencia de triptófano en el agua. Si se inoculaban con Rhizobium trifolii tres días después de iniciado el experimento, se encontraba AIA, lo cual demostraba que la síntesis de este compuesto era el resultado de la acción sinérgica entre los dos elementos: la leguminosa y el Rhizobium. Olivares (41), ha demostrado que la emisión de triptófano por los exudados radicales de la leguminosa está influenciada por la presencia del polisacárido de Rhizobium. Megías (36) y Gutiérrez Navarro (25), han comprobado la producción de AIA por diversas estirpes de Rhizobium cultivadas en medios que tienen triptófano. Por otra parte, Larsen y col. (33) lograron demostrar la síntesis de algunos compuestos indólicos por Acetobacter xilinum, cuando se incubaban células lavadas

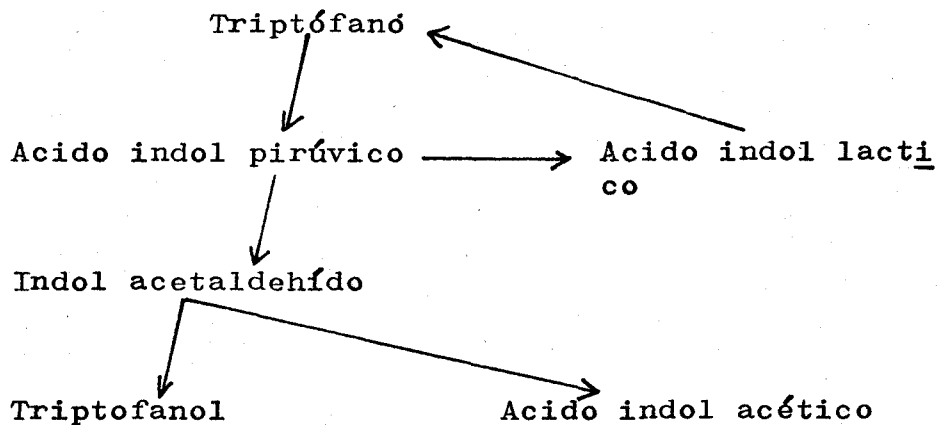
esta bacteria en una solución de triptófano, obteniéndose un consumo de éste, aproximadamente, del 5% inicial.

El autor que ha estudiado con mayor detenimiento el metabolismo del triptófano por cultivos de Rhizobium ha sido Rigaud, a juzgar por la gran cantidad de publicaciones suyas que existen sobre este tema (46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53). Por ello comentaremos a continuación los resultados más interesantes de este autor: En 1966 (51), detectó ácido indol láctico y triptofanol, en un medio de cultivo líquido de Rhizobium, sugiriendo que estos compuestos están relacionados con la biosíntesis de AIA; más tarde (50, 49) demostró la formación de aldehído indol acético por Rhizobium y puso de manifiesto que, con triptamina en el medio de cultivo, los rizobios son capaces de sintetizar triptofanol y AIA, vía aldehído indol acético. En 1970 (47), demuestra que el paso de triptófano a AIA y AIL es favorecido por agentes transaminantes, como fosfato de piridoxal y ácido 2-cetoglutarico; los resultados obtenidos con este cetoácido los explica suponiendo que favorece la desaminación del triptófano para dar ácido indol pirúvico, intermedio de la vía de síntesis del AIA. Como el AIL es un subproducto metabólico formado directamente a partir del

ácido indol pirúvico, su síntesis también se ve favorecida por la adición de este agente transaminante. Por otra parte, basándose en los datos obtenidos, formula la hipótesis de una posible ruta de biogénesis del AIA y AIL a partir del triptófano. Asimismo, (46), establece una relación entre la fase de crecimiento de Rhizobium y el contenido de AIA del medio, que continúa aumentando incluso durante la fase estacionaria de crecimiento, que comienza aproximadamente al 4º o 5º día de incubación. A los diez días de incubación en medio líquido obtiene 1,5 ug/ml de AIA. Rigaud (47) también realizó trabajos con suspensiones de células lavadas y pone de manifiesto que en estas condiciones la concentración de AIL producido es siempre superior a la de AIA y que ambas sustancias presentan un intermediario común que podría ser el ácido indol pirúvico. También estudia (46) la degradación de AIA por células lavadas de Rhizobium en tampón de pH:6,5 y encuentra que esta degradación disminuye con la edad del cultivo con el que se realiza la suspensión de células lavadas. Rigaud (53, 64), también ha estudiado la producción de AIA por bacteroides llegando a la conclusión de que estas formas rizobianas también son capaces de llevar a cabo dicha producción. En 1974 Rigaud, en colaboración con Trinchant (65), purifica la lactato des-

hidrogenasa de Rhizobium meliloti y demuestra que esta enzima cataliza la reducción del ácido indol pirúvico a ácido indol láctico en presencia de NADH, pero no detectaron el paso inverso, de indol láctico a indol pirúvico en presencia de NAD. Basándose en estos resultados completan el esquema general del metabolismo del triptófano por Rhizobium, que queda definitivamente como se observa en el cuadro III.

Cuadro III.- Ruta de biosíntesis del AIA, a partir de triptófano, por Rhizobium.



Como puede apreciarse en dicho cuadro, estos autores consideran que el paso de AIL a ácido indol pirúvico no puede realizarse. Sin embargo, cabe señalar que resultados preliminares obtenidos en nuestro laboratorio (25)



sugieren que la reacción puede cursar en ambos sentidos.

#### 1.1.4.- Análisis cuantitativo del AIA.-

A pesar de los numerosos trabajos realizados sobre la producción de AIA por microorganismos, la valoración de esta sustancia en los líquidos metabólicos tropieza con una serie de problemas técnicos, especialmente los motivados por la presencia de AIL en los líquidos metabólicos, que interfiere con los análisis basados en métodos espectrofotométricos y fluorimétricos (17, 26, 30). Los autores que han trabajado en este campo o bien han ignorado este problema y por tanto sus resultados pueden estar sujetos a errores, o bien han tratado de resolverlo empleando una separación cromatográfica previa (37, 44, 43) o una valoración biológica, basada en la actividad hormonal del AIA o por su efecto sobre el crecimiento de Saccharomyces cerevisiae (3).

Los métodos de valoración del AIA más generalmente empleados se pueden reducir a los siguientes:

- a) Determinación colorimétrica, valiéndose de la reacción de Salkowski, modificada por Pilet (67).
- b) Separación cromatográfica y determinación cuantitativa de los productos midiendo la radioactividad de las manchas (37, 43, 44).
- c) Valoración biológica, calibrando su efecto hormonal o

bien su efecto sobre el crecimiento de Saccharomyces cerevisiae (3).

d) Métodos espectrofotométricos y fluorimétricos (17, 26, 30).

Recientemente, Gutiérrez Navarro (25) ha puesto a punto un método que permite la valoración por métodos colorimétricos del AIA, en presencia de AIL y que describiremos en el capítulo dedicado a Material y Métodos.

#### 1.1.5.- Taxonomía del género Rhizobium.-

La taxonomía de Rhizobium es de las más discutidas de toda la Bacteriología; la principal causa de ello es que el criterio decisivo para la identificación de las especies es la capacidad de la bacteria para producir nódulos en un determinado grupo de leguminosas, pero la aplicación de este criterio, además de ser muy laboriosa puede conducir a grupos artificiales. En consecuencia han aparecido un gran número de trabajos sobre la taxonomía de Rhizobium que llegan a conclusiones muy diferentes, lo que ha acentuado la discusión planteada sobre el tema.

Así, Wilson, según se recoge en la obra de Dommerges y Mangenot (15), publicó en 1944 un trabajo titulado "quinientas razones para abandonar los grupos de inoculación

cruzada de las leguminosas", en el cual considera que las propiedades infectivas, por sí solas, no siempre pueden diferenciar las especies de "bacterias de los nódulos de la raíz", de una forma clara. De la misma forma se manifiestan otros autores, como Bonnier (7), Graham (22, 23), Lange (31) y Norris (38).

En 1963, Graham (21) preparó antisueros frente a 58 estirpes de bacterias aisladas de nódulos y 16 de Agrobacterium, probando su acción frente a 113 estirpes de Rhizobium, 20 estirpes de Agrobacterium y otras 20 de bacterias a las que consideraba relacionadas con ambas, llegando a la conclusión de que se pueden distinguir tres grupos serológicos entre las bacterias del género Rhizobium: (1) R. trifolii, R. leguminosarum y R. phaseoli (2) R. lupini, R. japonicum y Rhizobium spp y (3) R. meliloti. Basándose en estos resultados y en otros posteriormente publicados, este mismo autor (22, 23) propone una reorganización del género Rhizobium, que quedaría dividido en dos especies: Rhizobium meliloti y Rhizobium leguminosarum; en la primera de ellas quedarían englobadas: R. meliloti, Agrobacterium radiobacter y Agrobacterium tumefaciens, mientras que en la segunda quedarían: R. leguminosarum, R. phaseoli y R. trifolii. Las otras dos especies: R. lupini y R. japonicum y el grupo Rhizobium spp, que coincide con el llamado grupo "cow pea", se encuadrarían en un nuevo género:

Phytomyxa. Esta nueva clasificación propuesta por Graham puede resumirse en el cuadro IV, tomado de la obra de Dommerges y Mangenot (15).

Cuadro IV.- Clasificación de los Rhizobium, según Graham.

Género	Especies	Especies anteriores
<u>Rhizobium</u> (crecimiento generalmente rápido)	<u>Rh. leguminosarum</u>	<u>Rh. leguminosarum</u> <u>Rh. trifolii</u> <u>Rh. faseoli</u>
	<u>Rh. meliloti</u>	<u>Rh. meliloti</u> <u>Agrobacterium radio</u> <u>bacter</u> <u>A. tumefaciens</u>
<u>Phytomyxa</u> (crecimiento generalmente lento)	<u>Ph. japonica</u>	<u>Rh. lupini</u> <u>Rh. japonicum</u> Grupo "cow pea"

Graham (22) y Graham y Parker (23) publican en el año 1964 dos trabajos que son muy importantes desde el punto de vista de la taxonomía de Rhizobium. En el primero de

ellos se aplican las técnicas de computadoras al estudio taxonómico del género. Estudia 83 estirpes del género Rhizobium y 38 pertenecientes a Agrobacterium, Chromobacterium (que en la séptima edición del Bergey's aparecía como un tercer género de las rizobiaceas), Beijerinckia (fijador libre de nitrógeno) y Bacillus. Para determinar las afinidades entre estos microorganismos emplea el estudio de cien características, como son: necesidades de factores de crecimiento, utilización de distintas fuentes de carbono y de nitrógeno, resistencia a los antibióticos, características morfológicas, tanto de las células como de las colonias, pruebas bioquímicas e infectividad. Con este tipo de análisis numérico llega a la conclusión de que los géneros Chromobacterium, Beijerinckia y Bacillus están poco relacionados entre sí y con el resto de las bacterias que son estudiadas. Los resultados obtenidos con Rhizobium y Agrobacterium concuerdan con los obtenidos anteriormente, manteniendo la idea de crear un nuevo género, Phytomyxa. En el trabajo de Graham, este llama la atención acerca de que no todas las características estudiadas presentan el mismo valor taxonómico. Así, en el trabajo de 1964 (23) hace un estudio del valor taxonómico de las características estudiados por ellos en su trabajo y que también habían sido utilizadas por otros investigadores para caracterizar las "bacterias de los nódulos de la raíz".

Llegan a la conclusión de que mediante los test de nodulación solamente se pueden distinguir tres grupos de Rhizobium, pero que existen otras características taxonómicas, como son: necesidades de tiamina y pantotenato cálcico, crecimiento a pH 4,5 y 9,5, crecimiento a 37° C, tolerancia a una salinidad del 2% de Cl Na en los medios de cultivo, reducción de nitratos a nitritos, tamaño de las colonias y presencia de gránulos metacromáticos, que pueden ser utilizadas para la identificación de las diferentes especies.

La discusión taxonómica sigue aun después de los trabajos de Graham y, con la introducción de nuevos criterios, se agudiza la discusión acerca de este tema. Uno de los criterios empleados más recientemente se basa en el estudio de las características del ADN (13, 14, 16, 18, 27). Así, De Ley y Rasel (14), basándose en las propiedades del ADN de distintas estirpes de Rhizobium propusieron una clasificación, que fundamentalmente coincide con la de Graham. Estudiaron los contenidos de citosina y guanina de 85 estirpes de Rhizobium, así como la distribución de sus flagelos, encontrando una relación entre ambas propiedades. Con los resultados obtenidos dividen a los Rhizobium en dos grupos:

Grupo I.- En este grupo quedan comprendidos los rizobios con flagelos peritricos, con crecimiento rápido en los me-

dios de cultivo con extracto de levadura y con un contenido bajo de citosina más guanina. Estos microorganismos se encuentran repartidos en los distintos grupos de inoculación cruzada, estudiados por estos autores, dividiéndolo en dos subgrupos, a los que llaman: Rhizobium leguminosarum y Rhizobium meliloti.

Grupo II.- Microorganismos con flagelo subpolar, crecimiento lento en los medios de cultivo con extracto de levadura y alto contenido de citosina más guanina. Este grupo forma nódulos principalmente en Lupinus, Glycine, Vigna, Lotus y Wistaria y los autores lo agrupan en una sola especie: Rhizobium japonicum, que coincide con Phytomyxa japonica de Graham. Estos dos grupos están muy relacionados, debido a que los % de citosina más guanina están muy próximos y , en algunos casos solapan; además, algunos de los integrados en el grupo I presentan flagelo subpolar o polar. Según ellos, pues, sólo se pueden distinguir tres especies de Rhizobium: Rh.leguminosarum, Rh.meliloti y Rh.japonicum, estando las dos primeras más relacionadas entre sí que cualquiera de ellas con la tercera.

De Ley y col. (13), también hicieron un estudio de 45 estirpes de Agrobacterium, comparándolas con otros microorganismos que en principio consideraron relacionados con él, llegando a la conclusión de que Agrobacterium, Rhizobium leguminosarum y Rhizobium meliloti tienen un con-

tenido de citosina más guanina muy parecido. Además, basándose en los resultados de Klein y Klein que ellos recogieron (13), según los cuales es posible la transformación entre Rh.leguminosarum y Agrobacterium, lo que demuestra una gran homología entre sus ADN, De Ley y col. proponen la inclusión de Agrobacterium dentro de Rh.leguminosarum, lo que está bastante de acuerdo con la clasificación de Graham, que también incluía las especies de Agrobacterium dentro del género Rhizobium, concretamente dentro de Rh. meliloti. Basándose en consideraciones similares incluyen a Beijerinckia dentro de Rh.japonicum.

Además de estos trabajos existen otros, realizados por hibridación de ADN de diversas estirpes (27, 18), los cuales llegan a conclusiones muy concordantes con los resultados de Graham y De Ley, aunque están realizados con técnicas muy diversas.

Otros estudios lo han realizado Gostkowska (20), mediante estudios fisiológicos; Staniewski y Kowalska (61), mediante técnicas de sensibilidad a fagos; Strzelcowa (62), mediante técnicas de tipificación de microorganismos, basándose en sus antibiogramas. Todos estos trabajos mencionados apoyan fuertemente la hipótesis de Graham.

Sin embargo, no todos los autores están totalmente de acuerdo con ellas. Así, en 1966 Abdel-Chaffar y Jensen (1) encontraron cuatro estirpes de Rhizobium lupini, aisladas



de Lupinus densiflorus, que presentaban rápido crecimiento en los medios con extracto de levadura y, además, nodulaban en Lotus y Anthyllis, que no pertenecen al grupo de inoculación cruzada de Lupinus, por lo que proponen la desaparición de Rhizobium lupini como especie y que las bacterias pertenecientes a ella queden englobadas en Rhizobium leguminosarum, propuesto por Graham, mientras que algunas estirpes de Rhizobium lupini de crecimiento lento podrían quedar englobadas en Phytomyxa japonica, especie propuesta por Graham. También 'T Mannelje (63) presenta algunas conclusiones discordantes con las afirmaciones de Graham, principalmente en lo que respecta a la inclusión de varias especies de Agrobacterium dentro del género Rhizobium.

Como puede apreciarse en esta breve revisión de los principales trabajos sobre la taxonomía del género Rhizobium, a pesar del esfuerzo de los distintos autores por introducir nuevos criterios válidos, no se ha llegado a ninguna clasificación aceptable de las especies de este género. Prueba de ello es que en la octava edición del Bergey's no se establece una clasificación definitiva del género y se sigue utilizando como criterio importante el ensayo de nodulación.

Finalmente, cabe señalar que recientemente Werner y Berghäuser (70) han demostrado que es posible distinguir especies de Rhizobium atendiendo a la velocidad de captación de

distintos compuestos, como son el ácido glutámico, el ácido 2-cetoglutárico y fosfato inorgánico. Tal vez estos resultados de Werner y Berghäuser abran la posibilidad de encontrar diferencias específicas en cuanto al efecto de distintas sustancias existentes en los exudados radicales de leguminosas sobre algunas actividades bioquímicas de los rizobios.

Como resumen de los datos bibliográficos que hemos expuesto en esta introducción podemos destacar los siguientes hechos:

- 1) Aunque el estudio de la fase de preinfección ha recibido mucha atención, todavía no está del todo claro el mecanismo mediante el cual la planta regula la actividad bioquímica de los rizobios en la rizosfera, especialmente la producción de AIA, auxina que según se admite es esencial para la deformación de los pelos radicales.
- 2) Existen discrepancias en cuanto a la validez del test de nodulación como criterio taxonómico para la identificación de las distintas especies de Rhizobium.

Por ello nosotros hemos creído interesante encaminar la mayor parte del trabajo que sometemos a la consideración del tribunal, hacia el estudio del efecto de los exudados radicales de leguminosas sobre la producción de AIA por bacterias del género Rhizobium.

Como veremos en su momento los resultados de este estudio nos han permitido contribuir al esclarecimiento de los dos problemas que acabamos de destacar. En efecto, por un lado, creemos haber encontrado datos que pueden explicar la acción reguladora de la planta sobre la producción de auxina por Rhizobium, y al mismo tiempo encontrar cierto grado de especificidad en el comportamiento de los rizobios, especificidad que puede ser un punto de partida para revisar la taxonomía de este género.



## 2. MATERIAL Y METODOS

2.1.- Material.-

2.1.1.- Microorganismos.-

2.1.1.1.- Microorganismos del género Rhizobium.-

En nuestro trabajo se utilizaron las siguientes estirpes de Rhizobium, cuya designación y procedencia se indican a continuación:

<u>Estirpe</u>	<u>Procedencia</u>
<u>Rh.meliloti</u> (RS.94)	Cedida por la Dra. Schiel (Argentina).
<u>Rh.meliloti</u> (RS.96)	"
<u>Rh.meliloti</u> (RS.138)	Cedida por el Prof. Montoya (Granada).
<u>Rh.meliloti</u> (RS.168)	Cedida por el Dr. Labandera (Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas)
<u>Rh.meliloti</u> (RS.171)	"
<u>Rh.trifolii</u> (RS.55)	Aislada por nosotros de nódulos de <u>Trifolium sp.</u>
<u>Rh.trifolii</u> (RS.90)	Cedida por la Dra. Schiel (Argentina).
<u>Rh.trifolii</u> (RS.91)	"

<u>Rh. trifolii</u> (RS.169)	Cedida por el Dr. Labandera (Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas)
<u>Rh. trifolii</u> (RS.170)	"
<u>Rh. lupini</u> (RS.100)	Aislada por nosotros de nódulos de <u>Lupinus sp.</u>
<u>Rh. lupini</u> (RS.110)	"
<u>Rh. lupini</u> (RS.108)	"

#### 2.1.1.2.- Microorganismos pertenecientes a otros géneros.-

También se utilizaron otras bacterias, pertenecientes a las siguientes especies:

<u>Especie</u>	<u>Procedencia</u>
<u>Agrobacterium tumefaciens</u>	Dpto. Microbiología de la Facultad de Ciencias de Sevilla.
<u>Klebsiella aerogenes</u>	"
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	"
<u>Micrococcus flavus</u>	"
<u>Lactobacillus fermenti</u>	Cedido por el Prof. Guinea (Universidad de Barcelona).
<u>Saccharomyces carlsbergensis</u>	"

### 2.1.2.- Semillas vegetales.-

En nuestro trabajo hemos utilizado semillas de las siguientes especies vegetales, cuyo origen indicamos:

<u>Especie</u>	<u>Procedencia</u>
<u>Trifolium alexandrinum</u>	Adquiridas en el comercio.
<u>Medicago sativa</u>	"
<u>Lupinus angustifolium</u>	Recolectadas por nosotros.

### 2.1.3.- Sustancias químicas utilizadas.-

Los aminoácidos triptófano, alanina, ácido aspártico y ácido glutámico, así como el fosfato de piridoxal, el pirofosfato de tiamina, la alcohol deshidrogenasa y la ninhidrina fueron servidas por la casa SIGMA CHEMICAL Co., de St. Louis (U.S.A.).

El ácido 2-cetoglutarico utilizado procedía de la casa MERCK.

La nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) fué servida por la casa SERVA de Alemania.

## 2.2.- Métodos.-

### 2.2.1.- Aislamiento, cultivo y mantenimiento de los microorganismos.-

#### 2.2.1.1.- Aislamiento de Rhizobium.-

Para el aislamiento de los rizobios se tomaron plantas noduladas pertenecientes a las especies mencionadas en el apartado de Material, antes de la época de floración para asegurarnos que los nódulos se encontraban activos.

Se cortaron los nódulos, siendo posteriormente sometidos al siguiente tratamiento, descrito por Vincent (69):

- a) Se lavaron previamente con agua destilada estéril para eliminar los restos de suelo que pudieran llevar adheridos.
- b) Se sometieron a la acción del etanol al 95%, durante unos pocos segundos y posteriormente fueron sumergidos durante 3 ó 4 minutos en una solución acuosa de  $\text{Cl}_2\text{Hg}$  al 0,1%, acidificada con ácido clorhídrico diluído.
- c) Los nódulos así desinfectados fueron lavados varias veces con agua destilada estéril, siendo posteriormente triturados en condiciones asépticas, obteniéndose finalmente un líquido lechoso que utilizamos como inóculo.
- d) Este líquido se sembró en placas de Petri, que contenían 25 ml del medio YMA, cuya composición es la siguiente:



PO <sub>4</sub> HK <sub>2</sub> .....	0,5 g
SO <sub>4</sub> Mg.7 H <sub>2</sub> O.....	0,2 g
Cl Na.....	0,1 g
Extracto de levadura.....	0,4 g
Manitol.....	10,0 g
Agar.....	20,0 g
Agua destilada.....	1,0 Litro
pH.....	6,5-7,0.

Este medio se esterilizó en autoclave a 121° C, durante 20 minutos y, una vez enfriado a 45° C, se le añadieron 2,5 ml de cristal violeta al 5%, previamente esterilizado por filtración.

Las placas fueron incubadas a 28° C y cuando se obtuvieron colonias apreciables, se aislaron aquellas que no concentraban el colorante.

Las colonias aisladas fueron sembradas en tubos que contenían el medio YMA, al que se había añadido CO<sub>3</sub>Ca (59) hasta una concentración del 3% como agente neutralizante y para prevenir la inhibición que pudiera deberse al extracto de levadura. Una vez desarrollados en los tubos de ensayo, se extendieron nuevamente en el medio YMA con cristal violeta para comprobar su pureza. Posteriormente se comprobó su capacidad de nodulación en la correspondiente leguminosa.

### 2.2.1.2.- Cultivo de los microorganismos.-

El cultivo de los rizobios para obtener células en abundancia se realizó en medio YMA líquido preparado con 4 g de extracto de levadura y agua de grifo. Este medio se esterilizó en autoclave a 121° C, durante 20 minutos. Se inocularon matraces de 500 ml con 250 ml de este medio y se incubaron en agitador vibratorio a 28° C durante tres días, excepto para algunas estirpes de Rh.lupini, que requirieron un tiempo mayor de crecimiento. En cualquier caso, los cultivos se tomaron en el comienzo de la fase estacionaria o en la fase exponencial tardía.

El cultivo de las otras bacterias fué realizado asimismo en el medio YMA líquido, con el objeto de que estuvieran en las mismas condiciones durante sus fases de crecimiento, para poder realizar comparaciones posteriores.

### 2.2.1.3.- Mantenimiento de los microorganismos.-

#### 2.2.1.3.1.- Mantenimiento de Rhizobium.-

Las estirpes utilizadas de Rhizobium fueron mantenidas, como se describe en el proceso de aislamiento, en el medio YMA, con CO<sub>3</sub>Ca al 3%.

### 2.2.1.3.2.- Mantenimiento de las otras bacterias.-

Los cultivos de Agrobacterium tumefaciens, Klebsiella aerogenes, Pseudomonas aeruginosa y Micrococcus flavus fueron mantenidos en medios de agar común mediante siembra en picadura. Las estirpes de Lactobacillus fermenti y Saccharomyces carlsbergensis fueron mantenidas en agar-leche peptonizada también mediante siembra en picadura.

### 2.2.2.- Obtención de los exudados radicales.-

#### 2.2.2.1.- Preparación de las semillas.-

Las semillas procedentes de la recolección realizada por nosotros fueron primeramente escarificadas; a las que procedían del comercio no fué preciso realizar este tratamiento. Posteriormente fueron desinfectadas mediante el siguiente tratamiento: se lavaron previamente mediante agua del grifo, para eliminar partículas que pudieran llevar adheridas, posteriormente se sumergieron en etanol al 95% en agua, durante cinco minutos, para pasarlas seguidamente a una solución acuosa de  $\text{Cl}_2\text{Hg}$  al 0,2%, acidificada con  $\text{ClH}$  diluído, durante un tiempo de cinco minutos. Posteriormente se lavaron repetidas veces, en condiciones

asépticas, con agua destilada estéril; se extendieron en placas de Petri estériles y se secaron en la estufa a 28° C, durante 1-2 horas.

#### 2.2.2.2.- Cultivo de las plántulas.-

La semillas desinfectadas y secadas, como se explica en el apartado anterior, fueron colocadas sobre una malla de gasa, sostenida por un soporte de vidrio, en el interior de un pocillo (figura 1), de tal forma que esta malla quedara suspendida a una determinada distancia del fondo del pocillo. El conjunto formado por el pocillo, la malla unida al soporte de vidrio y una tapa superior, fué esterilizado en autoclave a 121° C durante 20 minutos.

Sobre la malla, una vez esterilizado el conjunto, se colocaron, en condiciones asépticas, un número determinado de semillas. Posteriormente se añadía al fondo del pocillo agua destilada estéril, en tal cantidad que la relación número de semillas por mililitro de agua fuera de tres, para las semillas de pequeño tamaño, como son las de Trifolium alexandrinum y Medicago sativa y de 0,5 para las semillas de mayor tamaño, como son las de Lupinus angustifolium. Esta operación se realizó de tal forma que la malla y por tanto las semillas colocadas sobre ésta no estuvieran en contacto directo con el agua del pocillo, pero

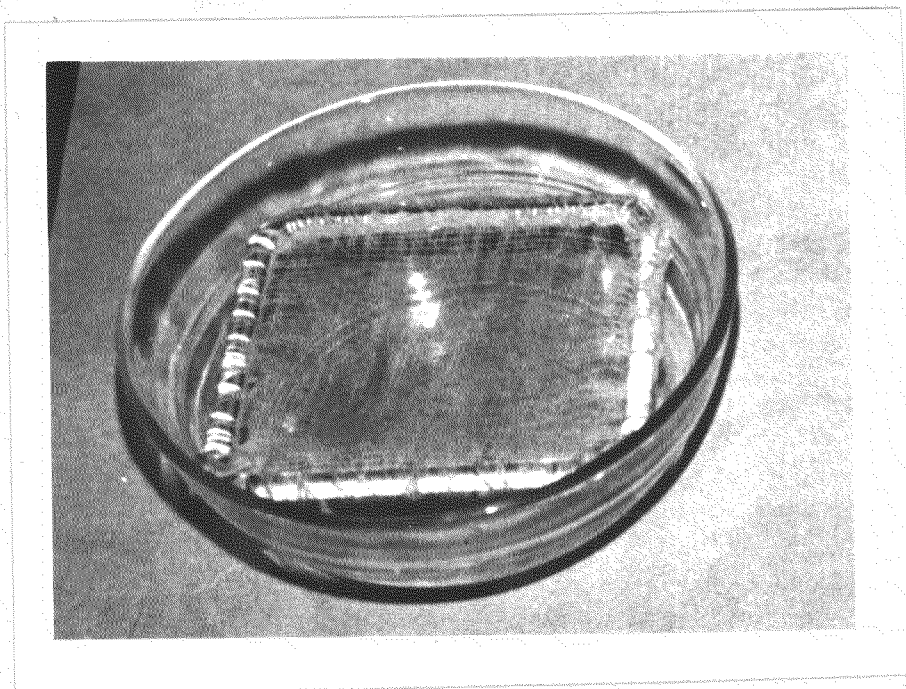
que fuera posible que la malla mantuviera un alto grado de humedad, que permitiera la germinación de las semillas.

El pocillo fué incubado a 28° C, en obscuridad, durante un espacio de dos a diez días, dependiendo del experimento, intervalo en el cual se realizaba la propia germinación de las semillas y las raicillas se introducían por los huecos de la malla, sumergiéndose en parte en el agua ( figura 2). A los dos días de su puesta en germinación se observaba que prácticamente el 100% de las raicillas nacientes estaban ya en contacto con el agua.

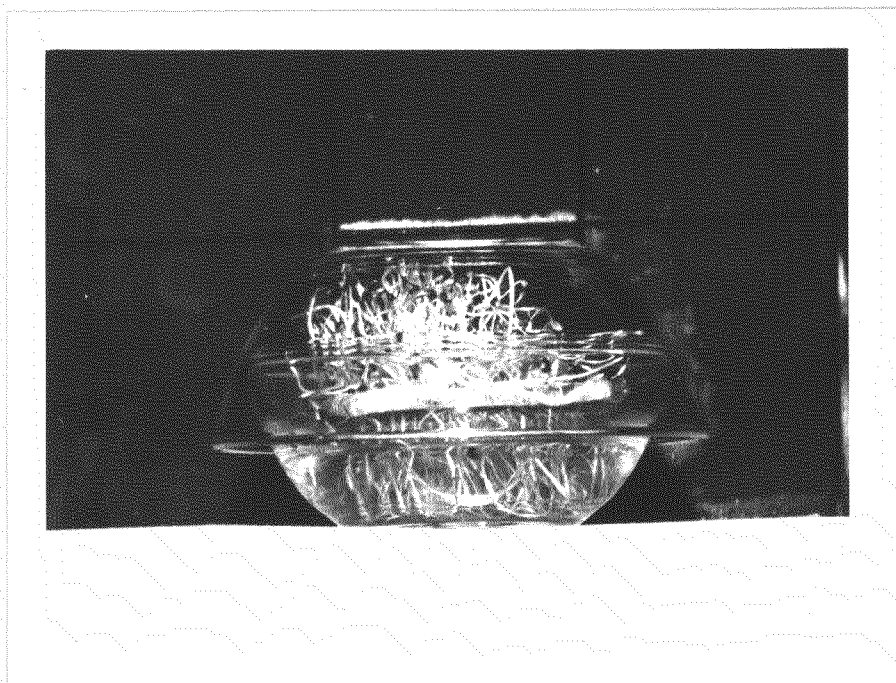
#### 2.2.2.3.- Obtención y esterilización del exudado.-

Los exudados se recogían a distintos tiempos (2, 4, 7 y 10 días) de incubación. En otros casos se cambió el agua residual, después de un cierto tiempo en contacto con las raíces, a fin de obtener exudados producidos en distintos intervalos de tiempo, para lo cual la malla juntamente con las plántulas se trasladaban a un nuevo pocillo previamente esterilizado; esta operación se realizaba en condiciones asépticas y, posteriormente, se añadía la misma cantidad de agua destilada estéril, que sería la nueva base recolectora de los exudados a partir de ese momento.

El agua que había servido para obtener los exudados se recogía y se sometía a un proceso de esterilización por filtración a vacío, a través de un filtro Sartorius con un



**Figura 1**



**Figura 2**

poro de 0,45 micras de diámetro.

### 2.2.3.- Producción de AIA por células lavadas.-

#### 2.2.3.1.- Preparación de los cultivos.-

Una vez obtenidos cultivos abundantes de Rhizobium o de las otras bacterias utilizadas en esta parte de nuestro trabajo, las células se recogían por centrifugación aséptica en una centrifuga preparativa MSE HIGH SPEED 18 a 8.000 RPM, durante diez minutos. Posteriormente, las células fueron lavadas con tampón fosfato estéril, 0,1 M (pH: 7,5) (47) y fueron resuspendidas en el mismo tampón, al que se había añadido previamente triptófano, esterilizado por filtración, hasta una concentración final de 1 mM.

En la mayoría de los experimentos se ajustó la concentración de células, de forma que tuvieran una densidad óptica de 0,5, medida a una longitud de onda de 600 nm. Como se verá más adelante esta concentración de células fue la que proporcionó mejores resultados para nuestro trabajo.

Estas suspensiones fueron incubadas a 28° C, durante 48 horas, la mayoría de las veces en un agitador rotatorio, pero en algunos casos se mantuvieron estáticas.

### 2.2.3.2.- Extracción del AIA.-

Una vez finalizado el período de incubación, se tomaron muestras de 80 ml de líquido metabólico. Las muestras obtenidas se sometieron a centrifugación a 8.000 RPM, durante 10 minutos, para eliminar las células; los líquidos metabólicos fueron sometidos al siguiente tratamiento, recomendado por Rigaud, para extraer el AIA: se recogió el sobrenadante al que, después de alcalinizar a pH: 8,2, se añadió un volumen mitad de éter etílico, y se agitó la mezcla durante cinco minutos en agitador magnético. Una vez separadas las dos fases, en un embudo de decantación, se recogió la fase acuosa y se acidificó hasta pH: 2,8. Se añadió nuevamente un volumen mitad de éter y se agitó nuevamente en agitador magnético, durante cinco minutos, transcurridos los cuales se recogió la fase etérea, que fue evaporada a 50° C durante 2-4 minutos, en un rotavapor, sin aplicar vacío. El residuo sólido se disolvió en 20 ml de alcohol etílico absoluto.

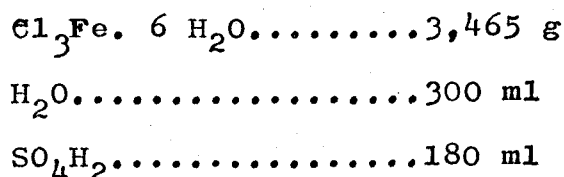
### 2.2.3.3.- Valoración del AIA.-

Las soluciones alcohólicas obtenidas fueron sometidas a un método de valoración, basado en la reacción de Salkowski, pero eliminando la interferencia del AIL en esta reacción con la técnica puesta a punto en nuestro laboratorio y descrita por Gutiérrez Navarro (25).



### 2.2.3.3.1.- Reacción de Salkowski.-

La reacción de Salkowski es un método colorimétrico para la valoración del AIA en muestras líquidas. Está basada en la reacción de dicho compuesto indólico con el cloruro férrico en medio fuertemente ácido. En efecto, el AIA da un compuesto coloreado rojo, cuyo máximo de absorción se sitúa a 530 nm, cuando reacciona con el reactivo de Salkowski, modificado por Pilet, cuya composición, descrita por Rigaud (51) es la siguiente:



Ahora bien, Ueda (67) ha indicado que en esta reacción se forman otros complejos de color amarillo pardo que interfieren con el AIA, lo que hace necesario introducir una corrección en las medidas de absorción, consistente en determinar la absorción a 480 nm y 580 nm. La media de estas absorciones, que viene dada por la expresión:  $(A_{480} + A_{580})/2$  es la atribuible a estos complejos secundarios. Así, la absorción debida al AIA es la altura del pico de absorción a 530 nm superior a esta media, que se calcula con la siguiente expresión:

$$A_{530} - \frac{A_{480} + A_{580}}{2}$$

### 2.2.3.3.2.- Modificación de Gutiérrez Navarro.-

Cuando las determinaciones de AIA se hacen siguiendo la técnica descrita por Salkowski y Pilet es necesario asegurar la pureza de las muestras, puesto que en ellas pueden coexistir con el AIA otros derivados del indol, que pueden falsear los resultados. Tal sucede en los líquidos metabólicos de Rhizobium en los que, junto con el AIA existe siempre el AIL, que, por otra parte es imposible separar de aquél con la técnica de extracción adoptada por nosotros (25). Ello ha llevado a probar métodos de separación de ambos compuestos, el más extendido de los cuales es un método cromatográfico, que tiene el inconveniente de provocar pérdidas de hasta un 20% (Rigaud, comunicación personal), que son tanto más importantes cuanto menores sean las cantidades a valorar.

A la vista de ello, Gutiérrez Navarro realizó un estudio de la influencia del AIL sobre la absorción debida al AIA, llegando a la conclusión de que el AIL siempre aumenta la absorción provocada por el AIA y que, cuando la proporción entre ambos compuestos es menor o igual que uno, es posible establecer una correlación entre la absorción de tales muestras y la concentración de AIA en ellas, ya que el aumento de la absorbancia es proporcional a la cantidad de AIL presente en la muestra.

De todo ello, deduce que es posible conocer la concentración de AIA en esas muestras, sin separar previamente esos compuestos, multiplicando la densidad óptica observada por una constante, cuyo valor es 46,16; pero para ello es necesario asegurar que la proporción entre ambos sea menor o igual que uno, es decir, que la concentración de AIL sea mayor o igual que la de AIA, Pero, como nosotros mismos hemos comprobado, en los líquidos metabólicos de Rhizobium siempre se producen menos de 50 microgramos por mililitro de AIA, de manera que asegurarse que la proporción entre ambos compuestos sea la deseada es fácil, puesto que basta añadir 50 microgramos/ml de AIL. Por otra parte, el mismo Rigaud (47) asegura que las células lavadas de Rhizobium suspendidas en tampón, producen más cantidad de AIL que de AIA, lo cual da aún más seguridad al método.

Así, la muestra reactiva queda como sigue:

muestra problema.....	1 ml
solución acuosa de AIL.....	1 ml
reactivo de Salkowski.....	3 ml

En esta mezcla reactiva modificada se ha sustituido el mililitro de agua por un mililitro de una solución acuosa de AIL, con una concentración de 50 microgramos/ml.

La concentración de AIA viene dada en microgramos/ml de la muestra inicial.

Como puede apreciarse, la determinación de la concentración de AIA en las muestras es un proceso laborioso que exige la lectura de absorción a tres longitudes de onda diferentes y luego, después de aplicar la corrección aplicada por Ueda, multiplicar por el coeficiente calculado por Gutiérrez Navarro y dividir por el factor de concentración de la muestra. Dado que al exponer los resultados el consignar todas estas cifras produciría una complejidad en las tablas correspondientes, hemos optado por omitir estas lecturas previas y reflejar únicamente el resultado final, con lo cual creemos que se consigue mayor claridad. Sin embargo y a título de ejemplo creemos conveniente exponer con detalle la realización de uno de nuestros experimentos, consignando todos los valores obtenidos y los cálculos necesarios para determinar la concentración final.

El experimento elegido como ejemplo es el correspondiente a los datos que se presentarán abreviadamente en la tabla 6 , pag. 74 y que se refieren a la influencia de los exudados radicales de Trifolium alexandrinum, Medicago sativa y Lupinus angustifolium sobre la producción de AIA por Rhizobium trifolii (RS.90). Para obtener los valores finales procedimos de la siguiente manera:

Después de haber aplicado el proceso de extracción del AIA a las muestras, se tomó el extracto alcohólico final

y se sometió a la reacción de Salkowski, para lo cual se tomó un mililitro de este extracto y se mezcló en un tubo de Spectronic con un mililitro de una solución acuosa de AIL y con tres mililitros del reactivo de Salkowski. Esta mezcla se dejó reaccionar durante una hora, a temperatura ambiente, al cabo de la cual se obtuvo el máximo de la reacción coloreada (25). Una vez transcurrido este tiempo se midieron las absorciones de esta mezcla reactiva a las longitudes de onda de 480, 530 y 580 nm; posteriormente se aplicó el factor de corrección introducido por Ueda, restándole a la absorción correspondiente a 530 nm la media de las absorciones obtenidas a 480 y 580 nm. Se obtuvo de esta manera un valor (X), el cual al multiplicarlo por la constante de Gutiérrez Navarro (25) y dividirlo por el factor de concentración obtenido en el proceso de extracción nos da la concentración de AIA presente en la muestra original.

En la tabla 1 se representan detalladamente los valores encontrados. En ésta, los valores representados por A corresponden a los valores de absorción a cada una de las tres longitudes de onda utilizadas; X corresponde a los valores de absorción después de haber aplicado la corrección de Ueda;  $\bar{X}$  corresponde a los valores medios de X y finalmente  $\bar{Y}$  representa los valores medios de concentración de AIA, obtenidos al multiplicar  $\bar{X}$  por la constante de Gu-

Tabla 1.- Detalle de las mediciones y cálculos necesarios para la obtención de los datos que se expresan en la tabla 6, (explicación en el texto).

Exudado	A <sub>480</sub>	A <sub>530</sub>	A <sub>580</sub>	X	$\bar{X}$	$\bar{Y}$	I (1)
<u>T. alexandrinum</u>	0,40	0,68	0,08	0,44			
<u>T. alexandrinum</u>	0,36	0,62	0,08	0,40	0,42	1,14	30
<u>T. alexandrinum</u>	0,28	0,60	0,08	0,42			
<u>M. sativa</u>	0,36	0,62	0,08	0,40			
<u>M. sativa</u>	0,33	0,58	0,07	0,38	0,39	1,08	34
<u>M. sativa</u>	0,30	0,58	0,06	0,40			
<u>L. angustifolium</u>	0,41	0,68	0,11	0,42			
<u>L. angustifolium</u>	0,37	0,64	0,08	0,41	0,41	1,13	31
<u>L. angustifolium</u>	0,37	0,64	0,08	0,41			
Sin exudado	0,50	0,90	0,11	0,60			
Sin exudado	0,51	0,90	0,11	0,59	0,60	1,62	-
Sin exudado	0,45	0,87	0,08	0,61			

(1) Inhibición, expresada en porcentaje de disminución de AIA con respecto al control sin exudado.

tiérrez Navarro y dividirlo por el factor de concentración, que en este caso es 17.

#### 2.2.4.- Ensayo de la degradación del AIA por células lavadas de Rhizobium.-

Se incubaron las células de Rhizobium en tampón de fosfato 0,1 M, de pH: 7,5 y en otros casos en tampón fosfato 0,02 M, pH: 6. La densidad óptica de la suspensión de células fué de 0,5, medida a una longitud de onda de 600 nm. A esta suspensión de células se añadía AIA (que había sido esterilizado previamente por filtración a través de un filtro Sartorius con un poro de 0,45 micras de diámetro), de tal forma que la concentración final fuera de 15 a 20 µg/ml en el medio de incubación. A este medio se añadía en los casos necesarios el exudado radical, que tenía una concentración final en este medio del 15% (v/v). El volumen final del medio de incubación fué de 15 ml, en matraces de 100 ml.

En todos los experimentos se mantuvieron también controles con AIA en el medio pero sin células, para determinar una posible degradación espontánea del AIA.

Las incubaciones se realizaron a 28° C, en agitación. Las muestras se tomaron con un volumen de tres mililitros; eran centrifugadas a 8.000 RPM, durante diez minutos y del

sobrenadante se tomaba un mililitro que era sometido al proceso de valoración del AIA, para lo cual se aplicaba la técnica colorimétrica de Salkowski, modificada por Gutiérrez Navarro (25).

#### 2.2.5.- Ensayo de la actividad indolacético-oxidasa en el exudado radical.-

Para comprobar si los exudados radicales tienen actividad AIA-oxidasa se procedió de la siguiente manera: se tomó exudado radical y se incubó, a una concentración del 15% (v/v), en presencia de AIA con una concentración de 20 µg/ml; esta incubación se realizó en tampón fosfato (0,02 M) de pH: 6, que según describen varios autores es el adecuado para la determinación de dicha actividad (46, 57). El volumen final del medio de incubación fué de 10 ml. Este medio se incubó a 28° C, en baño termostatzado, en agitación, durante una hora. Se tomaron muestras de 1 ml al comienzo y al final del período de incubación, sometiéndolas posteriormente a la reacción colorimétrica de Salkowski para la determinación del AIA.

#### 2.2.6.- Investigación de NAD en el exudado radical.-

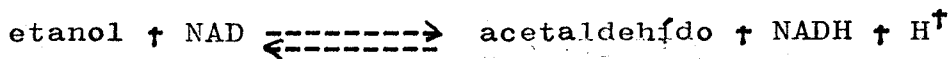
Para determinar la posible existencia de NAD incuba-



mos el exudado radical en presencia de la enzima alcohol deshidrogenasa y medimos el incremento de absorbancia, a una longitud de onda de 340 nm, correspondiente con la aparición de NADH.

Para ello, mezclamos en una cubeta exudado (15%, v/v) y el sustrato de la reacción que es el etanol (0,75%, v/v). El medio estaba tamponado con buffer de fosfato 0,1 M, pH: 7,5. El volumen final en la cubeta era de 2 ml. Una vez que se medía la absorbancia de esta mezcla a 340 nm, en un ESPECTROFOTOMETRO PYE UNICAM, frente a un blanco con las mismas sustancias componentes, se añadía la enzima, con una concentración de 0,3 mg/ml en la cubeta y se medía inmediatamente la absorbancia de la nueva mezcla reactiva, a la misma longitud de onda, frente al mismo blanco, sin enzima. El aumento que se produzca en la absorbancia a 340 nm se deberá a la aparición de NADH, como consecuencia de la oxidación del etanol, catalizada por la alcohol deshidrogenasa. El tiempo de incubación necesario es muy corto, prácticamente es una reacción instantánea, y se realizó a temperatura ambiente.

La reacción de oxidación del etanol es la siguiente:



Siendo X la concentración de NADH en el equilibrio, la cual se deduce dividiendo el incremento de absorbancia a 340 nm por el coeficiente de extinción milimolar del NADH, la constante de equilibrio de esta reacción viene dada por

la siguiente expresión, K( aparente): 
$$\frac{X^2}{(C-X)(C'-X)} \quad (1);$$

C es la concentración de NAD que existía en la muestra original, C' es la concentración de etanol existente en dicha muestra y X como ya hemos dicho anteriormente la concentración de NADH en el equilibrio. Si despejamos de esta fórmula C tenemos que 
$$C = \frac{X^2}{K(C'-X)} \quad (2);$$
 en pri-

mer lugar averiguamos el valor de K para nuestras condiciones experimentales, para lo cual pusimos cantidades conocidas de etanol y de NAD. Una vez conocida la constante de equilibrio de la reacción (K), conociendo el valor de X, que depende del incremento observado en la absorbancia cuando se incubaba el exudado en presencia de alcohol deshidrogenasa, es posible conocer, según la fórmula (2), la cantidad inicial de NAD presente en la muestra inicial examinada. De esta forma valoramos el NAD existente en los exudados radicales.

El valor de K (constante de equilibrio aparente) en nuestras condiciones experimentales es de  $1,07 \cdot 10^{-3}$ .

#### 2.2.7.- Valoración de la tiamina en el exudado radical.-

Para la determinación de la existencia de tiamina en los exudados radicales se siguió el método biológico recomendado por Wiley (72) y que consiste en medir el

crecimiento de Lactobacillus fermenti (ATCC 9338), que es un microorganismo auxótrofo para la vitamina B<sub>1</sub>.

El inóculo para dicha determinación se prepara realizando un cultivo de dicho microorganismo en leche peptonizada. Después de 16-18 horas de incubación a 37° C, las células eran centrifugadas en condiciones asépticas y se eliminaba el sobrenadante y más tarde se resuspendían en solución salina estéril, se agitaban bien y se centrifugaban de nuevo, eliminando el sobrenadante. Las células eran resuspendidas nuevamente en solución salina, de tal forma que la concentración en el inóculo final fuera muy baja.

El medio en el que se realizó el ensayo biológico era BACTO-THIAMINA ASSAY-MEDIUM, de Difco, que es un medio completo para Lactobacillus fermenti (ATCC 9338), pero sin tiamina. Este medio se esterilizaba manteniéndolo a 100° C en autoclave con vapor fluente, durante 15 minutos. A este medio se le añadía el exudado radical, el cual se ponía a una concentración final del 15%. Este medio de ensayo, con el exudado radical, se inoculaba con una fracción pequeña de la suspensión de células de Lactobacillus en solución salina, que servía como inóculo. El experimento se realizó en tubos de ensayo con un volumen final de 10 ml.

La incubación se realizaba a 37° C, durante un tiem-

po menor de 18 horas, ya que a partir de este tiempo L. fermenti es capaz de utilizar otros compuestos sustitutos de la vitamina B<sub>1</sub>. Después del período de incubación se medía la absorbancia del cultivo, a una longitud de onda de 480 nm, utilizando como blanco de esta medida el mismo medio inoculado pero sin exudado.

Para la realización de la curva de calibrado se inocularon medios de BACTO- THIAMINE ASSAY con distintas concentraciones de hidrocloreuro de tiamina y se incubaron en las mismas condiciones, durante el mismo tiempo. Como blanco para la medida de la absorbancia se tomó el medio inoculado pero sin tiamina.

#### 2.2.8.- Determinación biológica de la piridoxina en el exudado radical.-

Para investigar la existencia de los derivados de la vitamina B<sub>6</sub> en el exudado radical se empleó un método biológico consistente en observar si se produce crecimiento de Saccharomyces carlsbergensis (ATCC 9080), que es una levadura auxótrofa para la vitamina B<sub>6</sub> (72).

El inóculo para dicha determinación se preparó realizando un cultivo previo de la levadura en leche peptonizada. Después de 24 horas de incubación, a 28° C, en agitación, las células eran centrifugadas en condiciones

asépticas y se eliminaba el sobrenadante, luego se resuspendían en solución salina estéril, se agitaban bien y se centrifugaban nuevamente, eliminando el sobrenadante. Las células eran resuspendidas nuevamente en solución salina de tal forma que la concentración en el inóculo final fuera muy baja.

El medio en el que se realizaba el ensayo biológico era BACTO-PYRIDOXINE Y MEDIUM, de Difco, que es un medio completo para el desarrollo de dicha levadura, pero sin piridoxina. Este medio se esterilizaba manteniéndolo a 100° C, en autoclave, con vapor fluente, durante 10 minutos. A este medio se le añadía posteriormente el exudado radical ensayado, que quedaba al 15% del medio final. Este medio de ensayo se inoculaba con una fracción pequeña de la suspensión de células de Saccharomyces, que servía como inóculo. El experimento se realizó en tubos de ensayo con un volumen final de 10 ml. La incubación se realizaba a 28° C, en agitación, durante 24 horas. Posteriormente se medía la absorbancia del cultivo a una longitud de onda de 480 nm, utilizando como blanco de esta medida el mismo medio inoculado pero sin exudado.



2.2.9.- Determinación de aminoácidos en el exudado radical.-

Para determinar la existencia de aminoácidos en el exudado radical se aplicó un ensayo cromatográfico, para lo cual se utilizaron placas de celulosa. El solvente utilizado para esta cromatografía en capa fina fué una mezcla de butanol, ácido acético y agua (4: 1: 5, v/v/v). El tiempo de desarrollo de dicha cromatografía fué de 6-8 horas, al cabo de las cuales se revelaron las placas con una solución de ninhidrina (2 mg/ml). Las placas una vez reveladas se introdujeron en un horno a 100° C, durante 1-2 minutos.

Estas características cromatográficas se utilizaron atendiendo a las recomendaciones dadas por Smith y Feinberg (60) en su libro de técnicas cromatográficas.

### 3. RESULTADOS

### 3.- Resultados.-

#### 3.1.- Efecto de los exudados radicales de leguminosas sobre la producción de AIA por suspensiones de células lavadas.-

En experimentos preliminares comprobamos que cuando las células lavadas de Rhizobium meliloti se incuban en presencia de triptófano y de exudados radicales de Medicago sativa, la producción de AIA era menor que en los controles incubados en ausencia de estos exudados. Este hecho, del que no encontramos antecedentes bibliográficos, nos sirvió de punto de partida para plantear nuestro trabajo experimental, el cual lo podemos dividir en dos grandes apartados: 1º= averiguar si este efecto es específico para las especies de Rhizobium o para el género Rhizobium y 2º= intentar elucidar qué sustancias del exudado intervienen en este efecto. Evidentemente ello exige realizar una serie de experimentos previos encaminados a establecer las condiciones óptimas para el estudio del fenómeno.

##### 3.1.1.- Variación del efecto a lo largo de la incubación.-

Dado que en los citados experimentos preliminares observamos que el efecto inhibitor del exudado radical no era el mismo a lo largo del tiempo de incubación de las suspensiones celulares, planteamos un experimento a fin de



establecer en qué momento este efecto es máximo. Para ello, incubamos en agitación suspensiones de células lavadas de Rhizobium meliloti (RS.94), en tampón de fosfato suplementado con triptófano 1 mM, en presencia y en ausencia de exudado radical de Medicago sativa, al 15% (v/v), y se fue siguiendo la evolución de la producción de AIA a lo largo de los seis días que duró la incubación.

Los resultados de este experimento, que se exponen en la tabla 2 y se representan gráficamente en la figura 3 indican que la producción de AIA en ausencia de exudado aumenta rápidamente desde las primeras horas de incubación, alcanzándose un máximo hacia las 92 horas que se mantiene hasta las 140 horas en que interrumpimos el experimento; en cambio, en presencia de exudado el efecto inhibitor se traduce en una disminución de la velocidad de producción durante las primeras horas, pero el máximo de producción es el mismo que en ausencia de exudado, si se mantienen las células incubadas durante 140 horas; el efecto inhibitor máximo se observa a las 48 horas.

En otros experimentos realizados con células lavadas de Rhizobium trifolii y Rhizobium lupini, en presencia y en ausencia de exudados radicales de Trifolium alexandrinum y Lupinus angustifolium, respectivamente, encontramos resultados similares, si bien en el caso de Rhizobium tri-

Tabla 2.- Producción de AIA (1) por células lavadas de Rhizobium meliloti (RS.94), en presencia y en ausencia de exudados radicales de Medicago sativa.

Tiempo (2)	Producción de AIA		Inhibición (3)
	en presencia de exudado	en ausencia de exudado	
0	0,0	0,0	0
48	4,86	6,80	29
92	9,93	9,93	0
140	10,10	10,50	4

(1) Expresada en microgramos por mililitro de líquido metabólico.

(2) Expresado en horas.

(3) Expresada en porcentaje de inhibición con respecto al control sin exudado.

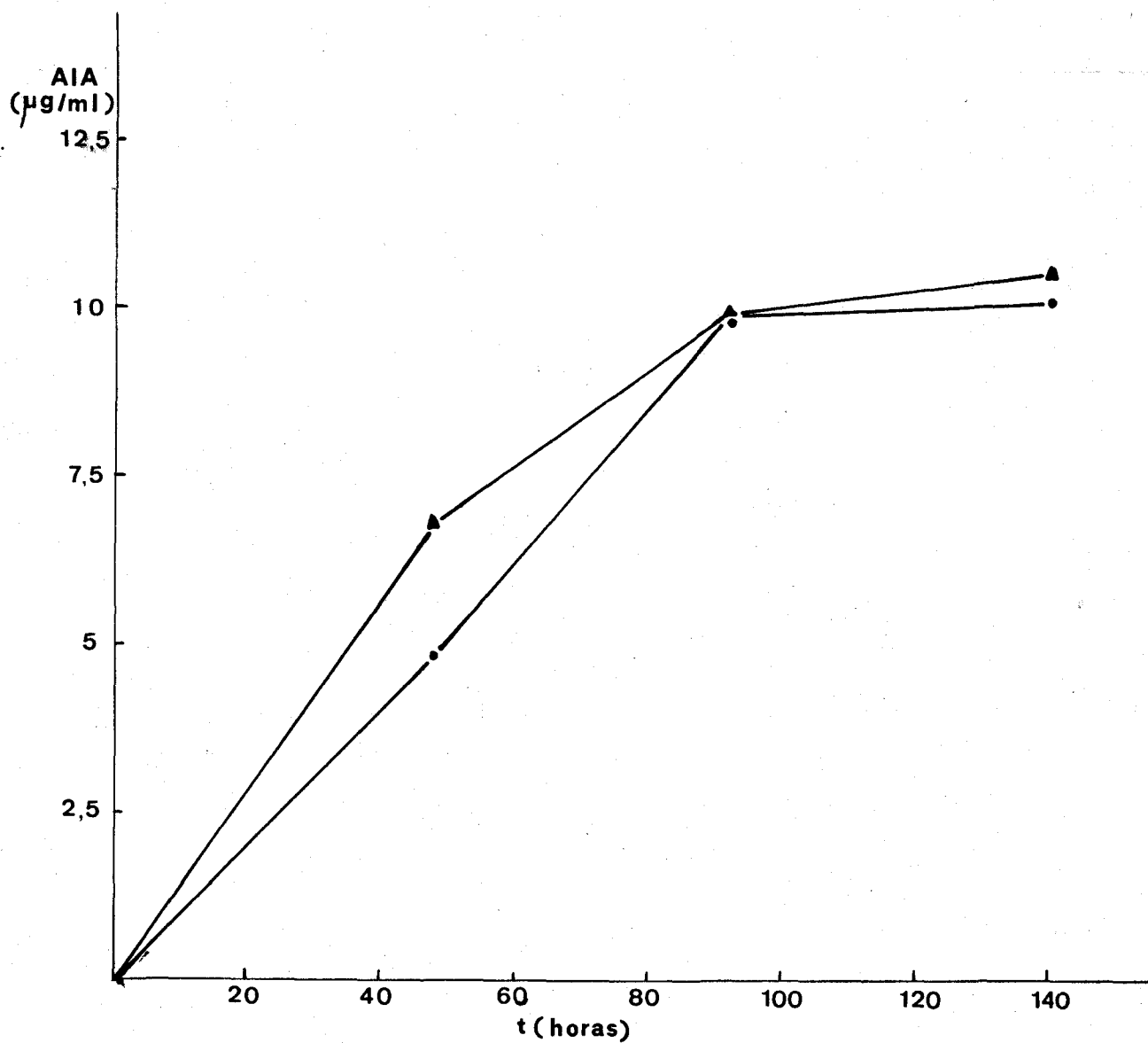


Figura 3.- Producción de AIA, a partir de triptófano, por células lavadas de Rhizobium meliloti (RS.94), en presencia (●) y en ausencia (▲) de exudados radicales de Medicago sativa.

folii, el efecto máximo se produce a las 92 horas. Los resultados de estos experimentos se exponen en las tablas 3 y 4, y se representan gráficamente en las figuras 4 y 5. En la figura 6 se puede observar la evolución del efecto inhibitor, a lo largo del tiempo de incubación, para las tres especies de Rhizobium.

### 3.1.2.- Influencia de la concentración de células sobre la producción de AIA.-

Una vez determinado el tiempo óptimo de incubación, nos pareció interesante estudiar si la concentración de células tiene alguna influencia sobre la producción de AIA y sobre el efecto inhibitor de los exudados radicales sobre tal producción.

Con este fin preparamos un experimento consistente en ensayar la producción de AIA por suspensiones de células de Rhizobium meliloti (RS.94) a tres concentraciones, 2, 1 y 0,5, determinadas por su absorción a 600 nm. Estos cultivos fueron incubados en agitación a 28° C, durante 48 horas, al cabo de las cuales se sometieron al proceso de extracción del AIA.

Los resultados que se expresan en la tabla 5 y en la figura 7, indican que en ausencia de exudado la concentración de células no influye considerablemente en la velocidad de producción de AIA y que en cambio en presen-

Tabla 3.- Producción de AIA (1), a partir de triptófano, por células lavadas de Rhizobium trifolii, en presencia y en ausencia de exudados radicales de Trifolium alexandrinum.

Tiempo (2)	Producción de AIA		Inhibición (3)
	en presencia de exudado	en ausencia de exudado	
0	0,0	0,0	0
48	0,95	1,34	30
92	1,58	2,77	43
140	2,75	2,80	2

(1) Expresada en microgramos por mililitro de líquido metabólico.

(2) Expresado en horas.

(3) Expresada en porcentaje de inhibición con respecto al control sin exudado.

Tabla 4.- Producción de AIA (1), a partir de triptófano, por células lavadas de Rhizobium lupini, en presencia y en ausencia de exudados radicales de Lupinus angustifolium.-

Tiempo (2)	Producción de AIA		Inhibición (3)
	en ausencia de exudado	en presencia de exudado	
0	0,0	0,0	0
48	2,64	1,72	35
92	3,07	3,15	-2
140	3,05	3,05	0

(1) Expresada en microgramos por mililitro de líquido metabólico.

(2) Expresado en horas.

(3) Expresada en porcentaje de inhibición con respecto al control sin exudado.

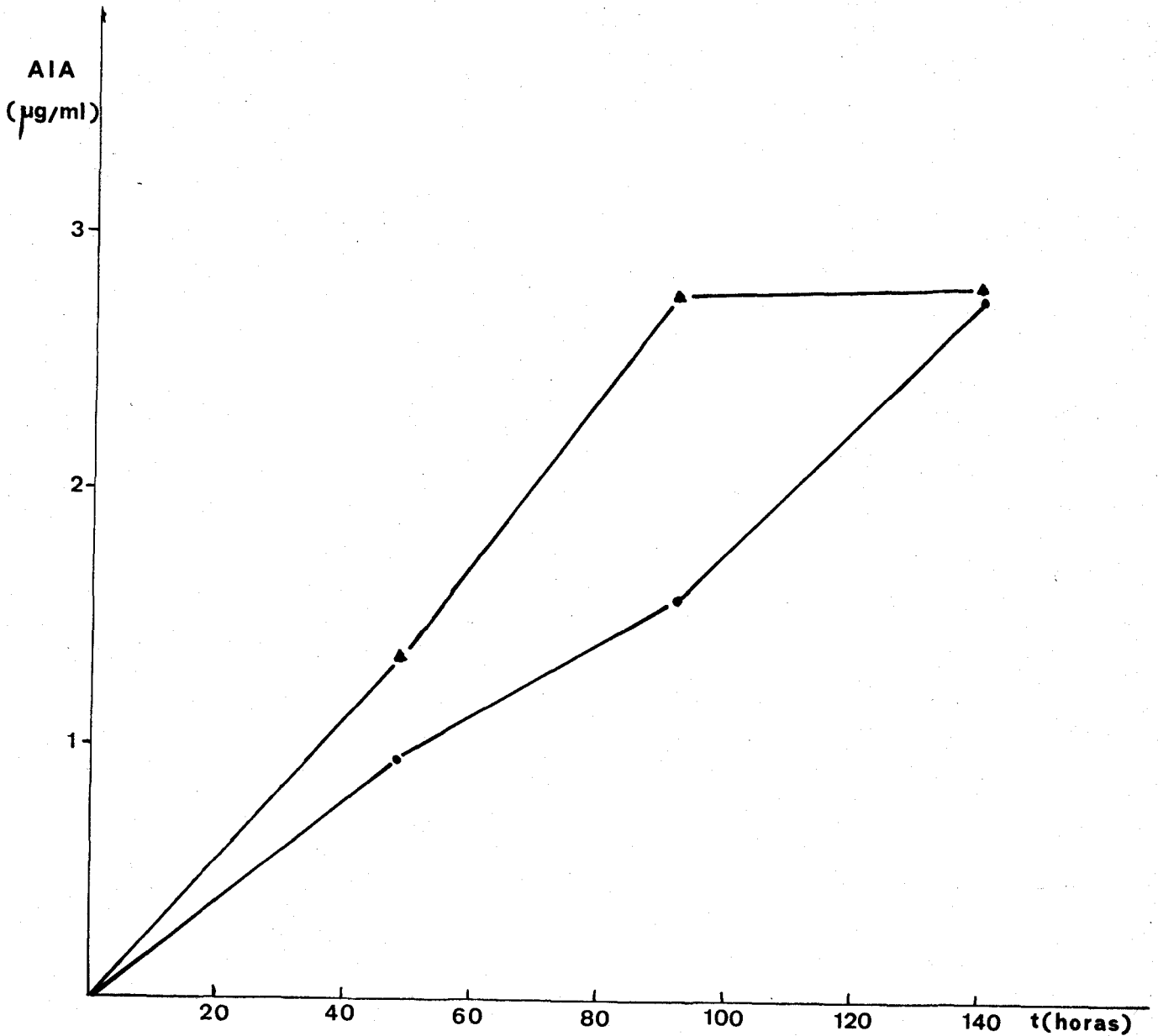


Figura 4.- Producción de AIA, a partir de triptófano, por células lavadas de Rhizobium trifolii (RS.90), incubadas en presencia (●) y en ausencia (▲) de exudados radicales de Trifolium alexandrinum.

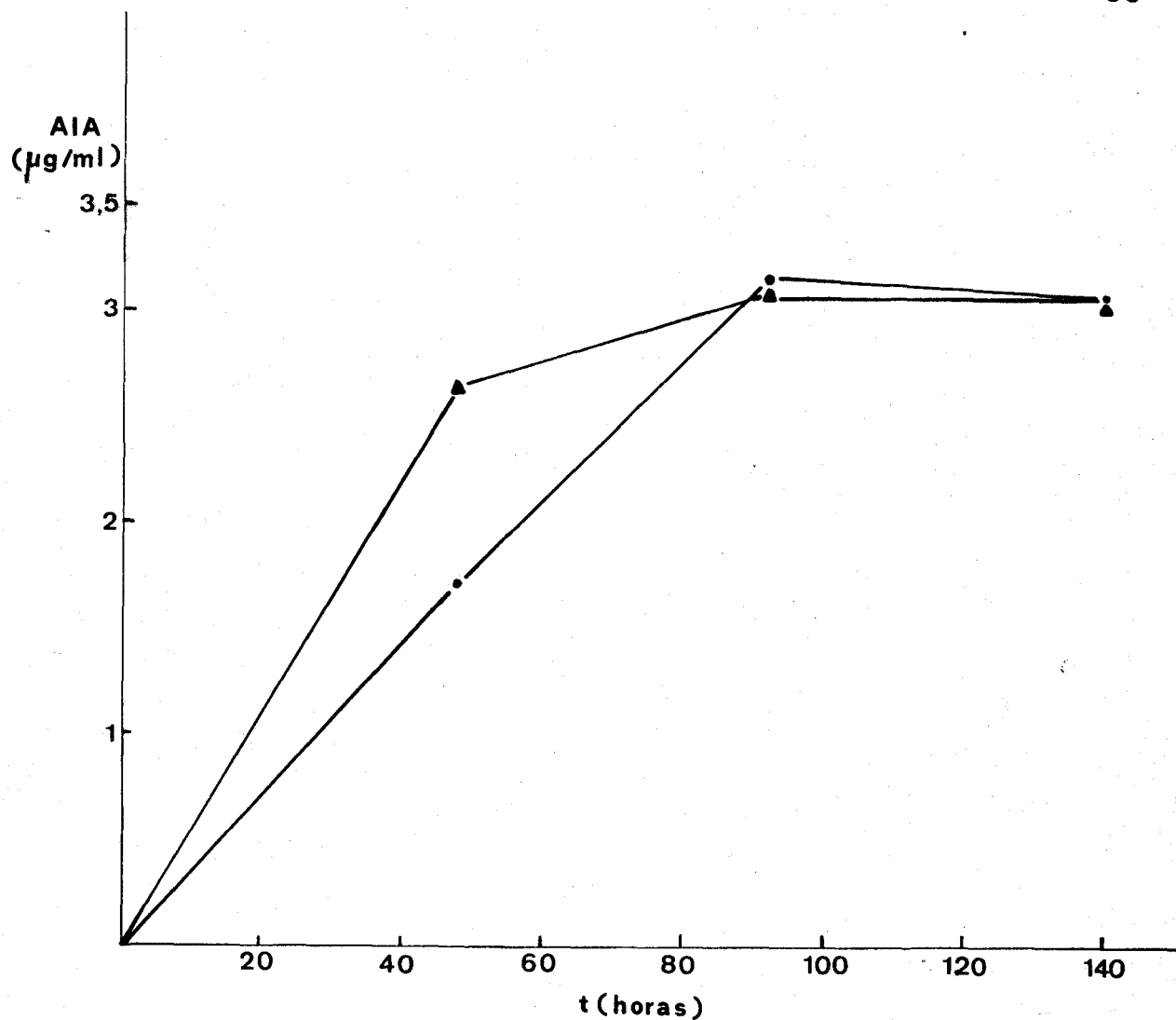


Figura 5.- Producción de AIA, a partir de triptófano, por células lavadas de Rhizobium lupini (RS.100), incubadas en presencia (•) y en ausencia (▲) de exudados radicuales de Lupinus angustifolium.



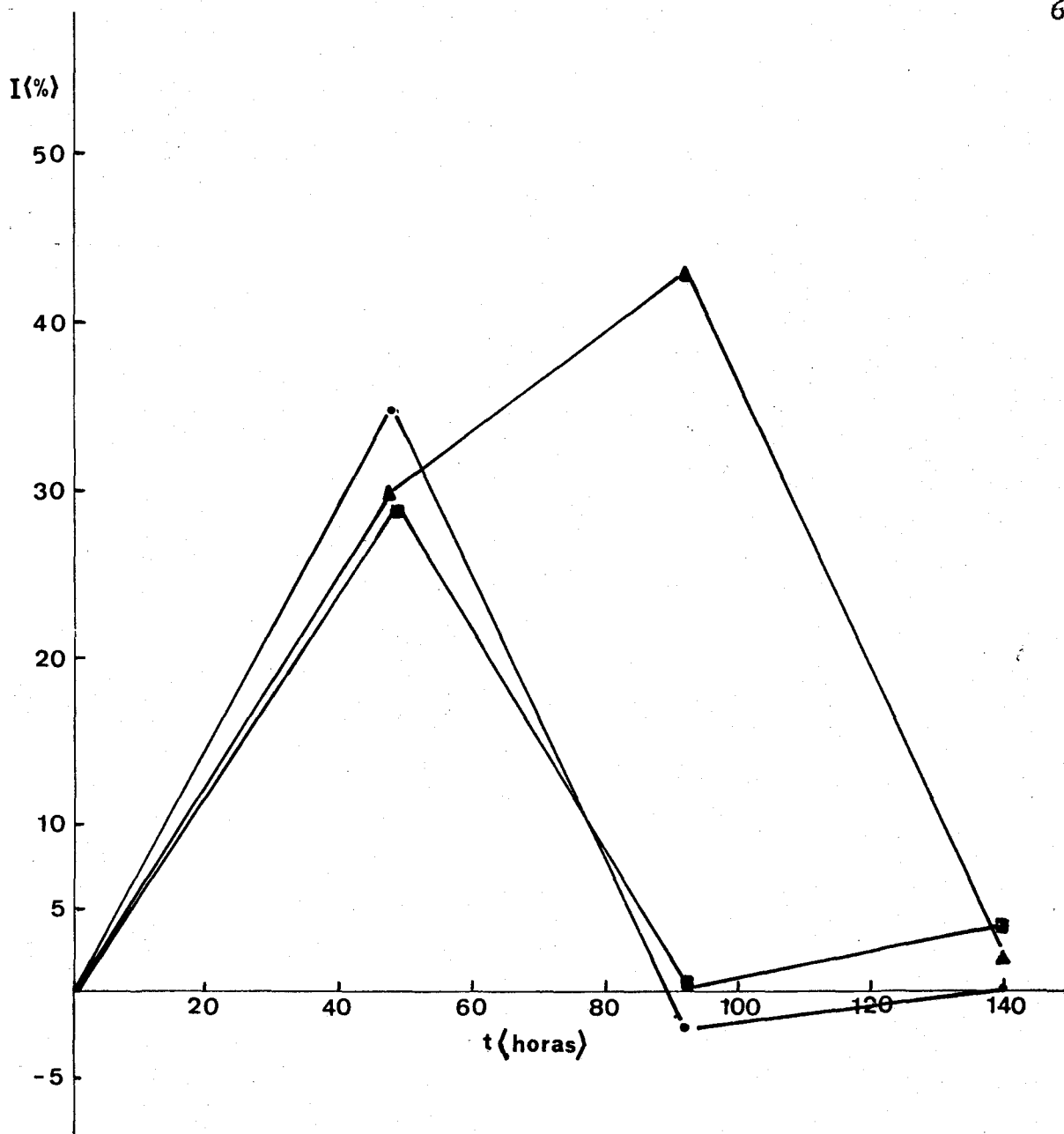


Figura 6.- Evolución del efecto inhibitor de los exudados radicales sobre la producción de AIA, a partir de triptófano, por células lavadas de Rhizobium trifolii (RS.90) (▲), Rhizobium meliloti (RS.94) (■) y Rhizobium lupini (RS.100) (•).

Tabla 5.- AIA producido, a partir de triptófano, por diferentes concentraciones de células lavadas de Rhizobium meliloti, en presencia y en ausencia de exudados radicales de Medicago sativa.

=====			
Producción de AIA (2)			
D.O (1)	sin exudado	con exudado	Inhibición (3)
-----			
0,5	6,45	2,93	55
1,0	7,81	5,48	30
2,0	6,78	5,80	15
=====			

(1) Medida a una longitud de onda de 600 nm.

(2) Expresada en microgramos por mililitro de líquido metabólico.

(3) Expresada en porcentaje de inhibición con respecto al control sin exudado.

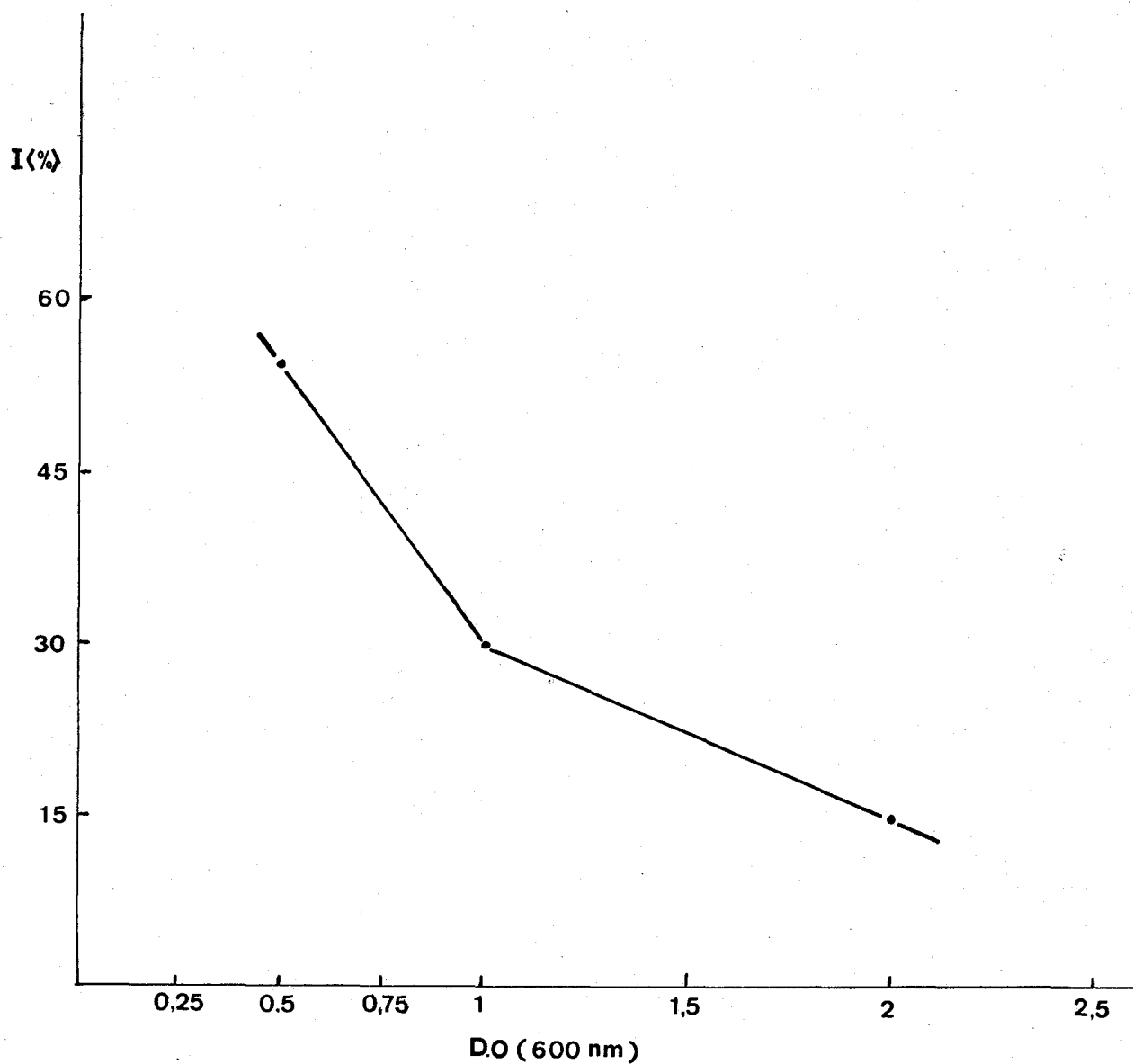


Figura 7.- Efecto inhibitor (I) de los exudados radicales de Medicago sativa sobre la producción de AIA, a partir de triptófano, por distintas concentraciones de células lavadas de Rhizobium meliloti (RS.94).

cia de exudado esta velocidad aumenta con la concentración y por tanto el efecto inhibitor es menor a medida que aumenta la concentración de células. Por ello, en experimentos sucesivos hemos considerado conveniente emplear concentraciones de 0,5 y recoger las muestras a las 48 horas de incubación.

### 3.1.3.- Comparación del efecto de exudados radicales de distintas leguminosas sobre diferentes bacterias.-

Una vez comprobado el efecto inhibitor de los exudados radicales de Medicago sativa sobre la producción de AIA por Rhizobium meliloti, creímos conveniente averiguar si este efecto se producía también sobre otras especies de Rhizobium, a fin de establecer si dicho efecto inhibitor era específico para cada sistema Rhizobium-leguminosa.

Para ello, realizamos una serie de experimentos encaminada a ensayar todas las combinaciones posibles exudado-Rhizobium, para las tres especies de Rhizobium estudiadas: Rhizobium trifolii, Rhizobium meliloti y Rhizobium lupini y los exudados radicales (recogidos a los siete días) de Trifolium alexandrinum, Medicago sativa y Lupinus angustifolium.

Los resultados de esta serie de experimentos se ex-

ponen en las tablas 6, 7 y 8 y de ellos se deduce que la acción inhibidora de los exudados radicales ensayados no presentan diferencias significativas, sino que actúan de la misma manera sobre las tres especies de Rhizobium ensayadas.

Esta falta de especificidad nos permitió continuar nuestras investigaciones empleando el sistema Rhizobium-leguminosa más apropiado para el estudio y que consistió en utilizar exudados radicales de Trifolium alexandrinum (cuyas semillas son asequeables en el comercio y de un tamaño muy apropiado para la experimentación) y Rhizobium meliloti (RS.94), que es de crecimiento bastante rápido y buena productora de AIA; por ello los experimentos que describiremos en este trabajo, en su mayoría, están realizados con este sistema.

Por otra parte, a fin de establecer si el efecto inhibidor de la producción de AIA era específico para el género Rhizobium, se ensayó la acción del exudado radical de Trifolium alexandrinum sobre la producción de AIA por células lavadas de Agrobacterium tumefaciens, Klebsiella aerogenes, Pseudomonas aeruginosa y Micrococcus flavus, cuyas capacidades productoras de AIA eran conocidas con anterioridad (25, 36).

Los resultados de este último grupo de experimentos se exponen en la tabla 9 y de ellos se deduce que el exu-

Tabla 6.- Producción de AIA (1) por células lavadas de Rhizobium trifolii (RS.90), en presencia y en ausencia de exudados radicales de distintas leguminosas.-

Leguminosa	AIA	Inhibición (2)
<u>Trifolium alexandri-</u>		
<u>num.</u>	1,14	30
<u>Medicago sativa</u>	1,08	34
<u>Lupinus angusti-</u>		
<u>folium.</u>	1,13	31
Control sin exudado	1,62	-

(1) Expresada en microgramos por mililitro de líquido metabólico.

(2) Expresada en porcentaje de inhibición con respecto al control sin exudado.

Tabla 7.- Producción de AIA (1), a partir de triptófano, por células lavadas de Rhizobium meliloti (RS.94), en presencia y en ausencia de exudados radicales de distintas leguminosas.

Leguminosa	AIA	Inhibición (2)
<u>Trifolium alexandri-</u>		
<u>num.</u>	1,97	31
<u>Medicago sativa</u>	1,98	31
<u>Lupinus angustifo-</u>		
<u>lium.</u>	1,94	32
Control sin exudado	2,85	-

(1) Expresada en microgramos por mililitro de líquido metabólico.

(2) Expresada en porcentaje de inhibición con respecto al control sin exudado.

Tabla 8.- Producción de AIA (1), a partir de triptófano, por células lavadas de Rhizobium lupini (RS.100), en presencia y en ausencia de exudados radicales de distintas leguminosas.

Leguminosa	AIA	Inhibición (2)
<u>Trifolium alexan-</u>		
<u>drinum.</u>	0,64	25
<u>Medicago sativa</u>	0,64	25
<u>Lupinus angusti-</u>		
<u>folium.</u>	0,69	19
Control sin exudado	0,85	-

(1) Expresada en microgramos por mililitro de líquido metabólico.

(2) Expresada en porcentaje de inhibición con respecto al control sin exudado.



Tabla 9.- Producción de AIA (1), a partir de triptófano, por distintas bacterias, en presencia y en ausencia de exudados radicales de Trifolium alexandrinum.

Bacteria	Producción de AIA		Acción (2)
	sin exudado	con exudado	
<u>Agrobacterium</u> <u>tumefaciens</u>	0,10	0,66	†560
<u>Klebsiella</u> <u>aerogenes</u>	10,44	13,44	†28
<u>Micrococcus</u> <u>flavus</u>	0,92	2,10	†128
<u>Pseudomonas</u> <u>aeruginosa</u>	0,173	0,605	†249
<u>Rhizobium meli-</u> <u>loti</u>	7,38	5,07	-32

(1) Expresada en microgramos por mililitro de líquido metabólico.

(2) Expresada en porcentaje de aumento o disminución de la producción de AIA, con respecto al control sin exudado.

dado no inhibe sino que favorece la producción de AIA por estas bacterias, lo cual nos indica que existe una cierta especificidad de acción del exudado radical de leguminosa sobre Rhizobium en relación con otros géneros bacterianos.

### 3.2.- Producción, naturaleza y actividad del exudado.-

#### 3.2.1.- Variación de la actividad del exudado radical con la edad de la plántula.-

Otra parte de nuestro trabajo se encaminó a dilucidar si la actividad del exudado experimentaba variaciones a lo largo del tiempo desde su aparición.

Para ello se mantuvieron la plántulas durante diez días en las condiciones de cultivo descritas y, se tomaron muestras de exudados a los dos, a los cuatro, a los siete y a los diez días de incubación, ensayando posteriormente sus actividades sobre la producción de AIA por Rhizobium meliloti.

Los resultados de estos experimentos son los que se exponen en la tabla 10 y en la figura 8. Como puede observarse en dichos resultados, la actividad inhibidora no aumenta con el tiempo, en contra de lo que cabría pensar si se tratara de un efecto de tipo acumulativo, sino que

Tabla 10.- Producción de AIA (1), a partir de triptófano, por células lavadas de Rhizobium meliloti, en presencia y en ausencia de exudados radicales de Trifolium alexandrinum de distintas edades.

Edad del exudado (3)	Producción de AIA		Inhibición (2)
	sin exudado	con exudado	
2	3,67	1,60	56
4	4,63	2,09	55
7	2,48	1,76	30
10	3,10	2,50	20

(1) Expresada en microgramos por mililitro de líquido metabólico.

(2) Expresada en porcentaje de inhibición con respecto al control sin exudado.

(3) Expresada en días.

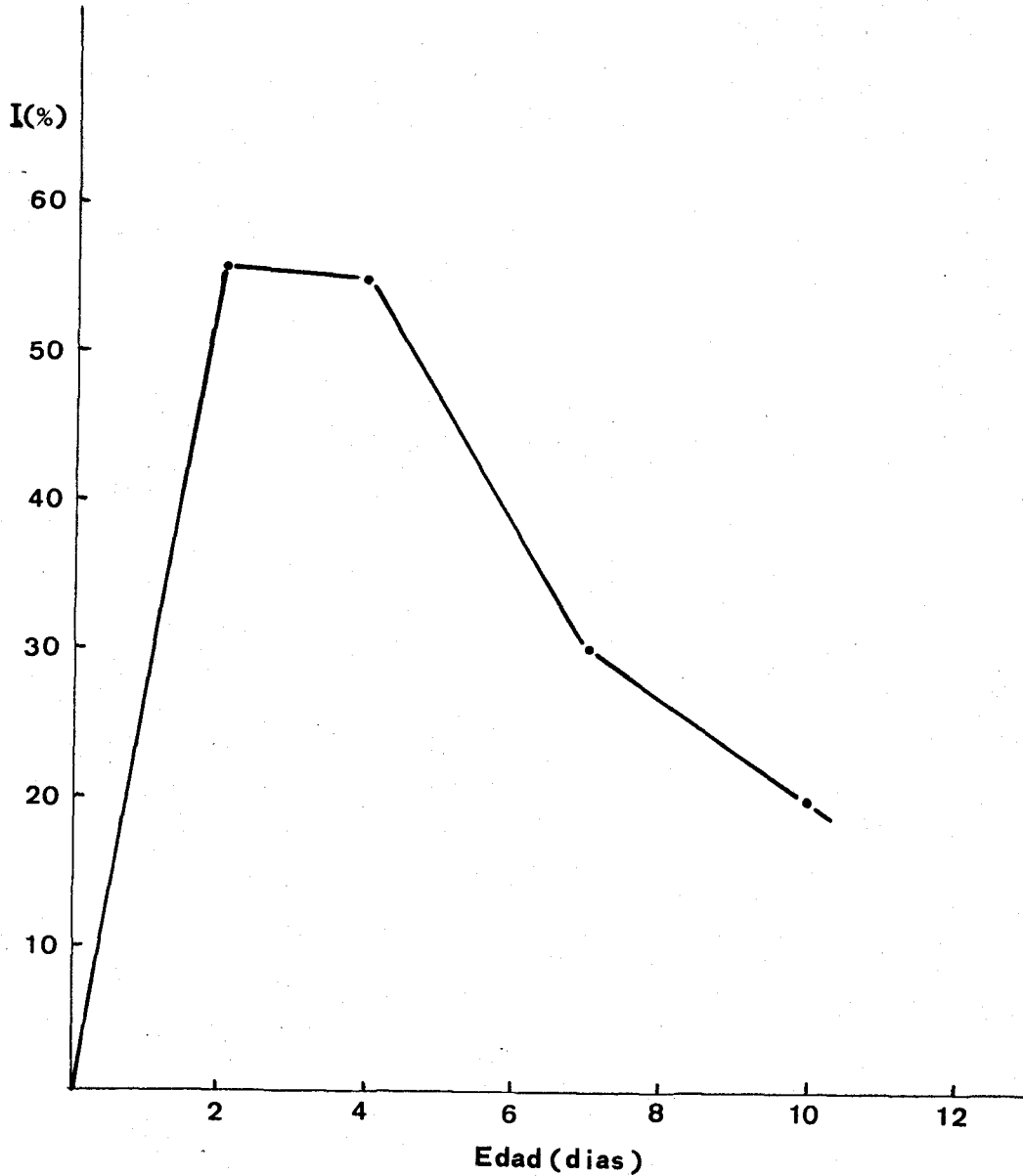


Figura 8.- Efecto inhibitor (I) de exudados radicales de Trifolium alexandrinum, recogidos a distintos tiempos (edad), sobre la producción de AIA a partir de trip-tófano, por células lavadas de Rhizobium meliloti (RS.94)

por el contrario, puede incluso observarse una disminución significativa a partir de los cuatro días de la germinación de las semillas.

Para averiguar si esta caída en la actividad inhibidora era debida a la inactivación de una sustancia producida inicialmente o a la aparición de sustancias que contrarrestan su efecto, realizamos otro experimento en el que se ensaya la actividad inhibidora de las fracciones de exudado que se van produciendo en diferentes intervalos de tiempo después de la germinación de las semillas. Para ello, se cambiaba el agua recolectora a los dos, a los cuatro y a los siete días de incubación, obteniéndose de este modo cuatro fracciones, producidas en cuatro períodos distintos del desarrollo de las plántulas, a cada una de las cuales se ensayó su acción sobre la producción de AIA.

Los resultados se exponen en la tabla 11 y se representan gráficamente en la figura 9 y de ellos se desprende que la fracción correspondiente a los dos primeros días es mucho más activa (57% de inhibición) que las recogidas en los siguientes intervalos de tiempo (23-30% de inhibición).

Si se comparan los resultados representados en las figuras 8 y 9, la explicación más simple podría ser el suponer que la inhibición del 23-30% es debida a una sustancia que se produce durante todo el tiempo de desarrollo

Tabla 11.- Producción de AIA (1), a partir de triptófano, por células lavadas de Rhizobium meliloti, en presencia y en ausencia de exudados radicales de Trifolium alexandrinum producidos en distintos períodos de desarrollo de las plántulas.

Período (2)	Producción de AIA		Inhibición (3)
	sin exudado	con exudado	
0-2	2,82	1,21	57
2-4	2,00	1,54	23
4-7	2,96	2,15	27
7-10	3,56	2,45	30

(1) Expresada en microgramos por mililitro de líquido metabólico.

(2) Expresado en días.

(3) Expresada en porcentaje de disminución de AIA con respecto al control sin exudado.



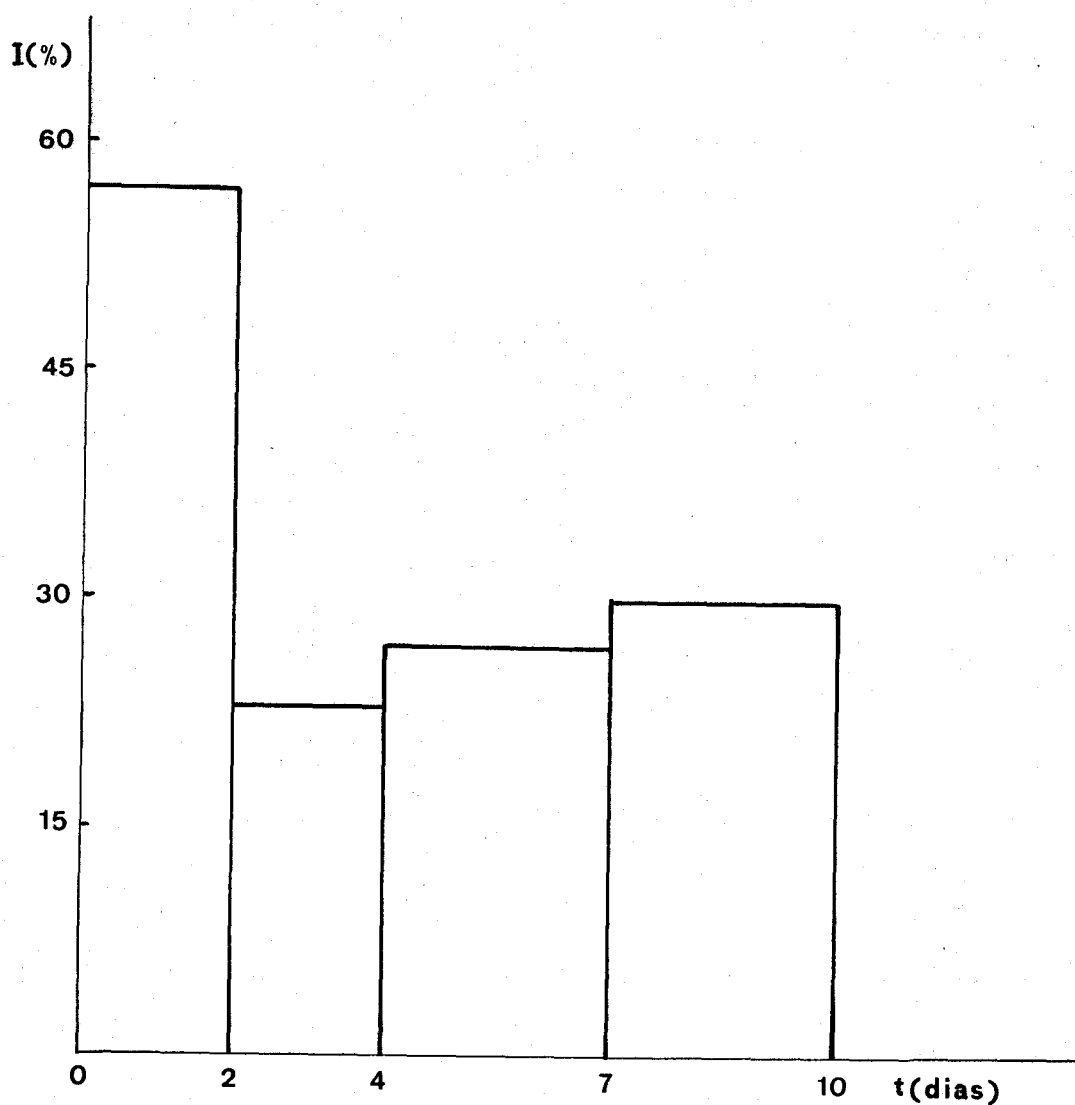


Figura 9.- Efecto inhibidor (I) de exudados radicales de Trifolium alexandrinum, producidos a distintos intervalos de tiempo, después de la germinación de las semillas, sobre la producción de AIA por células lavadas de Rhizobium meliloti (RS.94).

de la plántula, mientras que la inhibición del 57% inicial sería debida a una sustancia que sólo se produce antes de los dos primeros días y que sería inestable.

Cabría pensar en otro modelo más complejo, que postula la aparición a partir del segundo día de una sustancia que contrarresta la acción inhibidora de esta sustancia de aparición temprana.

Con objeto de averiguar cuál de estos modelos es más verosímil, realizamos los experimentos que exponemos a continuación.

### 3.2.2.- Estabilidad de los exudados a distintas temperaturas.-

Para comprobar si la caída de actividad que se produce en los exudados recogidos a partir de los cuatro días es debida a la inactivación espontánea de la sustancia responsable de la inhibición y, si dicha inactivación depende de la temperatura realizamos el siguiente experimento: una vez obtenidos los exudados por incubación de las plántulas durante dos días, se fraccionaron éstos y cada una de las muestras obtenidas fué sometida a los siguientes tratamientos térmicos:

- una muestra se ensayó inmediatamente después de recogida.
- otra fué almacenada durante nueve días a 4° C.
- una tercera fué mantenida durante idéntico período de



tiempo a 28°C.

- una cuarta fracción se mantuvo, también durante nueve días, a 37° C.

Durante ese tiempo se tomaron muestras de cada fracción a los dos, a los cinco y a los nueve días y se ensayaron sus actividades sobre la producción de AIA por Rhizobium meliloti.

Los resultados se exponen en la tabla 12 y se representan gráficamente en la figura 10. De ellos se deduce que los exudados de dos días pierden actividad y que esta pérdida es mayor a 37° C que a las otras temperaturas ensayadas. Sin embargo, esta pérdida de actividad no explica la caída que se representa en la figura 8. A pesar de ello, creímos conveniente averiguar el comportamiento del exudado después de un choque térmico más energético, para comprobar la resistencia al calor de esta fracción del exudado.

### 3.2.3.- Efecto de un choque térmico sobre la actividad inhibidora del exudado radical.

Este experimento se planteó para comprobar si un tratamiento previo a temperatura elevada provocaba alguna alteración del exudado en cuanto a su actividad sobre la producción de AIA por células lavadas de Rhizobium.

Tabla 12.- Producción de AIA (1), a partir de triptófano, por células lavadas de Rhizobium meliloti, en presencia de exudados radicales de dos días de Trifolium alexandrinum, conservados a diferentes temperaturas durante distintos tiempos.

Tiempo (2)	Temperatura	Producción de AIA		Inhibición (3)
		sin exudado	con exudado	
0	-	7,09	3,12	56
2	4° C	5,53	2,94	47
	28° C	5,53	3,34	40
	37° C	5,53	3,75	32
5	4° C	3,63	1,90	48
	28° C	3,63	2,31	37
	37° C	3,63	2,31	37
9	4° C	5,20	2,81	46
	28° C	5,20	3,23	38
	37° C	5,20	3,64	30

(1) Expresada en microgramos por mililitro de líquido metabólico.

(2) Expresado en días.

(3) Expresada en porcentaje de disminución de AIA con respecto al control sin exudado.

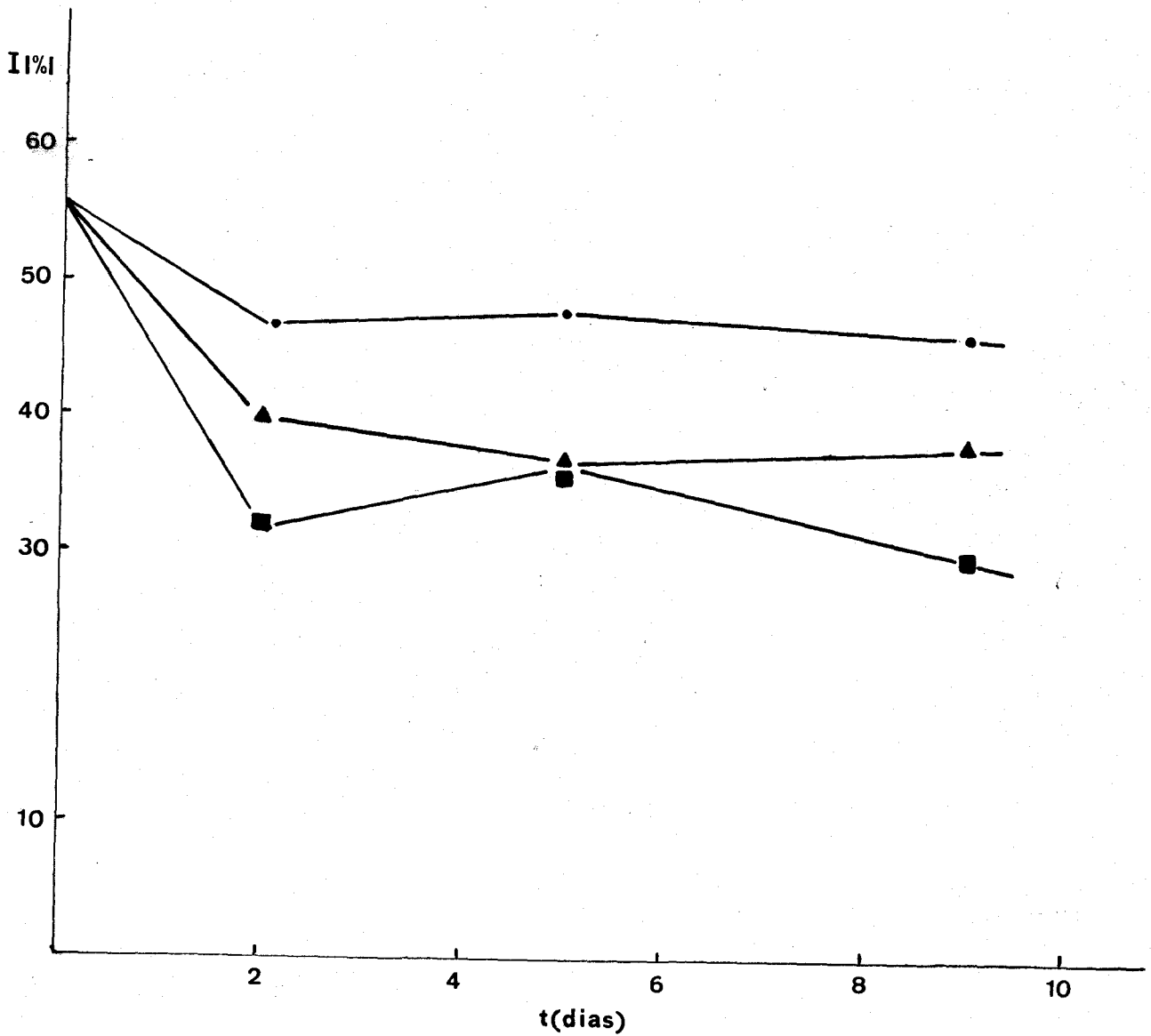


Figura 10.- Variación del efecto inhibitor (I) de los exudados radicales de dos días, durante su conservación a distintas temperaturas.

- (●) Exudados conservados a 4° C
- (▲) Exudados conservados a 28° C
- (■) Exudados conservados a 37° C

Con este fin, se sometieron exudados radicales de Trifolium alexandrinum, recogidos a los dos y a los siete días de iniciada la germinación, a una temperatura de 60° C, durante treinta minutos, al cabo de los cuales se incubaron en presencia de células lavadas de Rhizobium meliloti (RS.94), durante 48 horas, a 28° C, en agitación. También se pusieron controles sin exudado y otros con exudado sin tratar a dicha temperatura.

Los resultados de este grupo de experimentos se exponen en las tablas 13 y 14 y pueden explicarse postulando que en los exudados radicales de dos días hay dos tipos de sustancias inhibitoras, unas termolábiles, responsables del 57% de inhibición y otras termoestables que mantienen el nivel de inhibición en un 30%. Asimismo, en el exudado de siete días deben de existir además de las sustancias inhibitoras termoestables antes citadas, otro tipo de sustancias termosensibles que deben tener una acción potenciadora sobre la producción de AIA, ya que el choque térmico produce un aumento de la inhibición de un 28% a un 60%.

A fin de encontrar apoyo a las hipótesis que hemos formulado en páginas anteriores para explicar el efecto de los exudados radicales, iniciamos una serie de experimentos encaminados a demostrar la presencia en el exudado de sustancias que pudieran corresponder a las postuladas.

Tabla 13.- Producción de AIA por células lavadas de Rhizobium meliloti (RS.94), en presencia de exudado radical de Trifolium alexandrinum de dos días de edad, sometido previamente a 60° C, durante 30 minutos.

Exudado	Producción de AIA ( $\mu\text{g/ml}$ )	Inhibición (1)
Sin tratar	2,45	53
Tratado a 60° C	3,64	30
Control sin exudado	5,20	-

(1) Expresada en porcentaje de disminución de AIA con respecto al control sin exudado.

Tabla 14.- Producción de AIA por células lavadas de Rhizobium meliloti (RS.94), en presencia de exudado radical de Trifolium alexandrinum de siete días de edad, sometido previamente a 60° C, durante 30 minutos.

Exudado	Producción de AIA ( $\mu\text{g/ml}$ )	Inhibición (1)
Sin tratar	3,24	28
Tratado a 60° C	1,80	60
Control sin exudado	4,50	-

(1) Expresada en porcentaje de disminución de AIA con respecto al control sin exudado.

Estos experimentos constan de dos partes:

1º.- Demostración de la presencia de una determinada sustancia en el exudado.

2º.- Comprobación de que esta sustancia afecta a la producción de AIA por células lavadas de Rhizobium.

De esta manera investigamos la presencia de:

a) enzimas que pudieran degradar el AIA producido; b) aminoácidos y distintos cofactores, como son el NAD, tiamina y piridoxina, que pudieran intervenir en la oxidación del triptófano a AIA.

3.2.4.- Ensayo de la actividad indolacético oxidasa en el exudado radical de Trifolium alexandrinum, de dos días de edad.-

Como se ha expuesto en experimentos anteriores, habíamos observado que los exudados radicales tempranos eran los más activos en cuanto a su capacidad de inhibición de la producción de AIA por Rhizobium. Por otra parte, también se había comprobado la existencia de algunas sustancias termosensibles en estos exudados de los primeros días, que eran responsables de parte de esa inhibición. Por todo ello, pensamos que era necesario comprobar si ese aumento de la actividad inhibidora de los exudados radicales tempranos en relación a otros más tardíos, se debía a la existencia de actividad AIA oxidasa en dichos

exudados nacientes, que provocaría la destrucción enzimática del AIA producido y no una disminución de su producción.

Con este fin y, como ya se ha descrito en el apartado de Métodos, se ensayó la actividad AIA oxidasa del exudado radical de Trifolium alexandrinum, de dos días. También se ensayó dicha actividad para los mismos exudados radicales pero calentados previamente a 80° C, durante 5 minutos, así como la de un control sin exudado.

Los resultados se expresan en la tabla 15 y de ellos se desprende que el exudado radical de dos días de edad no presenta actividad AIA oxidasa, por lo cual el aumento de la actividad inhibidora de estos exudados no se debe a un aumento de la degradación del AIA producido, por parte de los exudados radicales.

### 3.2.5.- Ensayo de la degradación del AIA por células lavadas de Rhizobium, en presencia y en ausencia de exudados radicales.-

Cabe aún la posibilidad de que la disminución de la cantidad de AIA sea debida a un aumento de la degradación de esta sustancia por la acción de una posible AIA oxidasa existente en las células de Rhizobium, que sería estimulada por algunas sustancias termolábiles existentes en los exudados radicales recogidos en los primeros días.

Tabla 15.- Disminución de la concentración de AIA en presencia de exudados radicales de Trifolium alexandrinum de dos días de edad, sometidos previamente a un choque térmico y sin tratamiento previo.

Exudado	Concentración de AIA (1)		Disminución de AIA (2)
	t=0	t= 1 hora	
Control sin exudado	20,3	21,04	-3,65
Sin calentar	20,35	20,54	-0,93
Calentado	20,30	20,95	-3,20

(1) Expresada en microgramos por mililitro del medio de incubación.

(2) Expresada en porcentaje de disminución de la concentración de AIA después de una hora de incubación.



A fin de comprobar esta posibilidad realizamos el siguiente experimento:

Se incubaron células de Rhizobium meliloti en tampón fosfato 0,1 M de pH: 7,5, en presencia y en ausencia de exudados radicales de Trifolium alexandrinum de 2 y 7 días de edad, con AIA en el medio de incubación, a una concentración final de 17 µg/ml. Las incubaciones se realizaron a 28° C, en agitación y se tomaron muestras periódicas, cada una de las cuales fue sometida al proceso de valoración del AIA, con la técnica colorimétrica de Salkowski.

Los resultados se exponen en la tabla 16 y de ellos se puede deducir que no existe degradación del AIA en ausencia de exudados radicales y que, cuando el exudado radical se encuentra presente en el medio de incubación, solamente para los exudados radicales de dos días de edad y a las 48 horas de incubación se observa una disminución (10%) en la cantidad de AIA inicial.

### 3.2.6.- Investigación de aminoácidos en los exudados radicales.-

Varios aminoácidos han sido descritos (29, 28, 39) como integrantes de los exudados radicales de leguminosas; por otra parte, se ha demostrado que algunos de ellos influyen en la producción de AIA por Rhizobium. Por todo ello consideramos interesante realizar un análisis de estos

Tabla 16.- Degradación del AIA por células lavadas de Rhizobium meliloti incubadas durante 48 horas en presencia y en ausencia de exudados radicales de Trifolium alexandrinum.-

Exudado	Concentración de AIA (1)		Degradación (2)
	t=0	t= 48 horas	
-	16,84	16,98	-0,83
2 días	16,47	14,77	10,32
7 días	16,43	16,34	0,55

(1) Expresada en microgramos por mililitro de líquido metabólico.

(2) Expresada en porcentaje de disminución de la concentración de AIA en las 48 horas de incubación.



exudados para confirmar la existencia de dichos aminoácidos, principalmente la de aquellos que habían sido descritos como agentes inhibidores de la producción de AIA por diversas bacterias (28).

Para ello realizamos un análisis cromatográfico en capa fina, sobre una placa de celulosa, según la técnica descrita en el apartado de Métodos.

De esta manera identificamos la presencia de ácido glutámico, ácido aspártico, alanina y triptófano en los exudados radicales de Trifolium alexandrinum de dos, cuatro, siete y diez días de edad. También aparecieron una serie de manchas que no pudimos identificar. El aminoácido más abundante en todos los casos, determinado por la intensidad de la mancha era el ácido glutámico, lo cual estaba de acuerdo con lo encontrado en la bibliografía (28).

Para la realización de estos análisis, previamente se habían concentrado las muestras 12,5 veces, al haber sido liofilizadas y después el residuo sólido resuspendido en un volumen menor de líquido.

### 3.2.7.- Producción de AIA por células lavadas de Rhizobium a partir de triptófano y en presencia de otros aminoácidos.-

Para comprobar si los aminoácidos más abundantes en el exudado (ácido aspártico, ácido glutámico y alanina) tienen efecto sobre la producción de AIA por células lavadas de Rhizobium, los ensayamos separadamente, añadiéndolos a suspensiones de estas células.

#### 3.2.7.1.- Producción de AIA en presencia de diversos aminoácidos.-

Para la realización de este experimento se utilizaron tres aminoácidos: alanina, ácido aspártico y ácido glutámico, que habían sido previamente descritos como inhibidores de la producción de AIA, sobre algunos géneros de bacterias presentes en el suelo (28). Esta acción no se había probado en relación a Rhizobium y, por ello, nos pareció interesante estudiar la influencia de estos aminoácidos sobre la producción de AIA por células lavadas de Rhizobium.

Para este tipo de ensayos las condiciones generales fueron semejantes a las descritas anteriormente. Al medio base de incubación, formado por tampón fosfato (pH: 7,5) y triptófano 1 mM, juntamente con las células de Rhizobium

meliloti (RS.94), a una densidad óptica final de 0,5, medida a una longitud de onda de 600 nm, se le añadió el aminoácido correspondiente, previamente esterilizado por filtración en una solución del mismo tampón. La concentración de aminoácido utilizada fué de 1mM. Las incubaciones fueron realizadas a 28° C, en agitación, durante 48 horas, al cabo de las cuales se sometieron los líquidos metabólicos al proceso de extracción y de valoración del AIA.

Los resultados obtenidos se exponen en la tabla 17, y de ellos se deduce que los tres aminoácidos presentan un efecto inhibitor semejante al observado previamente con los exudados radicales recogidos a los siete días de incubación.

### 3.2.7.2.- Producción de AIA en presencia de distintas concentraciones de ácido glutámico.-

Dado que el aminoácido que mostró una mayor actividad fue el ácido glutámico, realizamos otro experimento para averiguar si su efecto depende de la concentración, para lo cual se ensayó la acción de distintas concentraciones de ácido glutámico: 0,05 mM, 0,1 mM, 1 mM, 5 mM y 10 mM, sobre la producción de AIA por dicha especie de Rhizobium.

Para ello se pusieron células lavadas de la estirpe

Tabla 17.- Producción de AIA (1), a partir de triptófano, por células lavadas de Rhizobium meliloti (RS.94) incubadas en agitación, en presencia de distintos aminoácidos.

Aminoácido (1 mM)	AIA	Inhibición (2)
Alanina	3,19	31
Acido aspártico	3,49	25
Acido glutámico	3,00	35
Control sin aminoácido	4,61	-

(1) Expresada en microgramos por mililitro de líquido metabólico.

(2) Expresada en porcentaje de disminución de la concentración de AIA, con respecto al control sin aminoácido.

RS.94, en las condiciones anteriormente descritas, en presencia de dichas concentraciones de ácido glutámico, el cual había sido previamente esterilizado por filtración.

Los resultados de este experimento se exponen en la tabla 18 y se representan gráficamente en la figura 11. De ellos se puede deducir que a medida que aumenta la concentración de aminoácido, aumenta el porcentaje de inhibición, sin que exista un nivel de saturación, al menos, comprendido entre 0 y 10 mM de dicho aminoácido.

### 3.2.7.3.- Influencia de distintas concentraciones de exudado, sometido previamente a un choque térmico, sobre la producción de AIA.-

Dado que el aminoácido que mayor efecto produce es el ácido glutámico y que el efecto inhibitor de esta sustancia varía con su concentración, tratamos de averiguar si existe correlación entre estos efectos y los de distintas concentraciones de exudado, al que sometemos previamente a 60° C, durante 30 minutos, a fin de eliminar posibles sustancias inhibitoras termolábiles.

Para ello se incubaron células de Rhizobium meliloti (RS.94), en presencia de exudados radicales de Trifolium alexandrinum, a unas concentraciones de 0,1, 1, 5 y 15% (v/v), en las condiciones descritas, durante 48 horas,

Tabla 18.- Producción de AIA por células lavadas de Rhizobium meliloti (RS.94), en presencia de triptófano y de distintas concentraciones de ácido glutámico.

Concentración de ácido glutámico (1)	Producción de AIA (2)	Inhibición (3)
0,00	4,61	-
0,05	4,38	5
0,10	4,03	13
1,00	3,69	20
5,00	2,01	57
10,00	1,12	76

(1) Expresada en unidades de milimolaridad.

(2) Expresada en microgramos por mililitro de líquido metabólico.

(3) Expresada en porcentaje de disminución de la concentración de AIA, con respecto al control sin ácido glutámico.



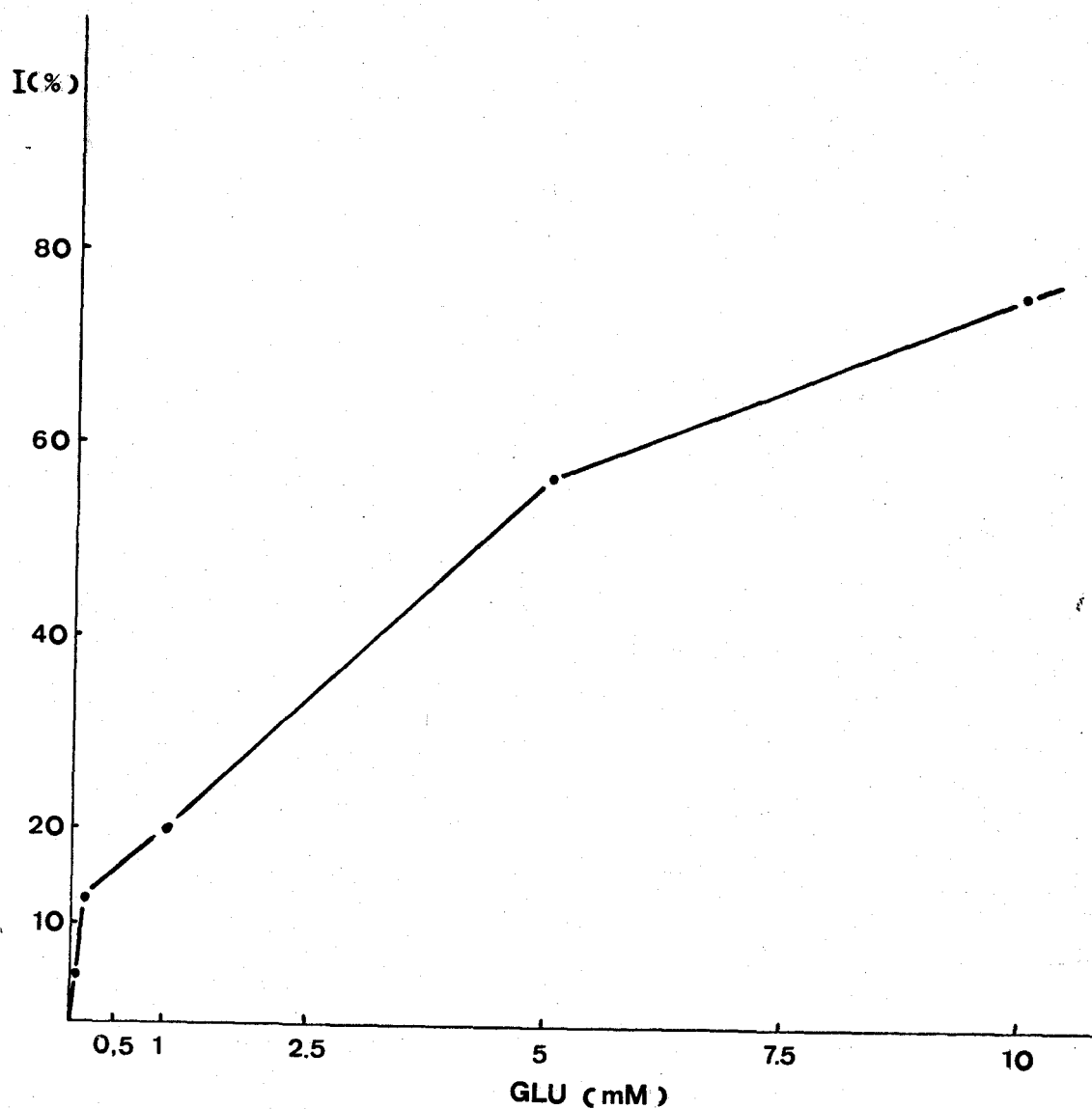


Figura 11.- Efecto inhibitor (I) de distintas concentraciones de ácido glutámico sobre la producción de AIA, a partir de triptófano, por células lavadas de Rhizobium meliloti (RS.94).

a 28° C, en agitación. Se ensayaron exudados de dos y de siete días de edad. Al cabo de este tiempo se sometieron los cultivos al proceso de extracción y valoración del AIA.

Los resultados se exponen en las tablas 19 y 20 y se representan gráficamente en las figuras 12 y 13 y de ellos se puede deducir que la acción inhibidora del exudado radical varía con la concentración de éste, de una forma comparable a la observada en el experimento anterior, lo que hace suponer que el efecto inhibidor del exudado puede ser debido en gran parte al ácido glutámico.

### 3.2.8.- Investigación de NAD en los exudados radicales de *Trifolium alexandrinum*.-

Dado que en la oxidación del triptófano a ácido indol acético se ha descrito un paso que es el de indolacetaldéhidó a AIA, en el que pudiera intervenir como cofactor el NAD, nos pareció interesante investigar la presencia de este cofactor en los exudados. Para ello, determinamos la formación de NADH en presencia de etanol y alcohol deshidrogenasa. Incubamos, de la forma que se describe en el apartado de métodos, exudados radicales de *Trifolium alexandrinum* de 2, 4, 7 y 10 días, en presencia de dicha enzima, así como exudados radicales del mismo tipo, pero calentados previamente a 60° C, durante 30 mi-

Tabla 19.- Producción de AIA (1), a partir de triptófano, por células lavadas de Rhizobium meliloti (RS.94), en presencia de distintas concentraciones de exudado radical de Trifolium alexandrinum, de dos días de edad.

Concentración de exudado (1)	Producción de AIA (2)	Inhibición (3)
0,0	5,20	-
0,1	5,12	0,01
1,0	4,63	11
5,0	3,90	25
15,0	3,64	30

(1) Expresada como porcentaje (v/v) del medio de incubación.

(2) Expresada en microgramos por mililitro de líquido metabólico.

(3) Expresada en porcentaje de disminución de la concentración de AIA con respecto al control sin exudado.

Tabla 20.- Producción de AIA (1), a partir de triptófano, por células lavadas de Rhizobium meliloti (RS.94), en presencia de distintas concentraciones de exudado radical de Trifolium alexandrinum, de siete días de edad.

Concentración de exudado (1)	Producción de AIA (2)	Inhibición (3)
0,0	4,50	-
0,1	4,47	0,7
1,0	4,06	10,0
5,0	2,48	45
15,0	1,80	60

(1) Expresada en porcentaje (v/v) del medio de incubación.

(2) Expresada en microgramos por mililitro de líquido metabólico.

(3) Expresada en porcentaje de disminución de la concentración de AIA, con respecto al control sin exudado.

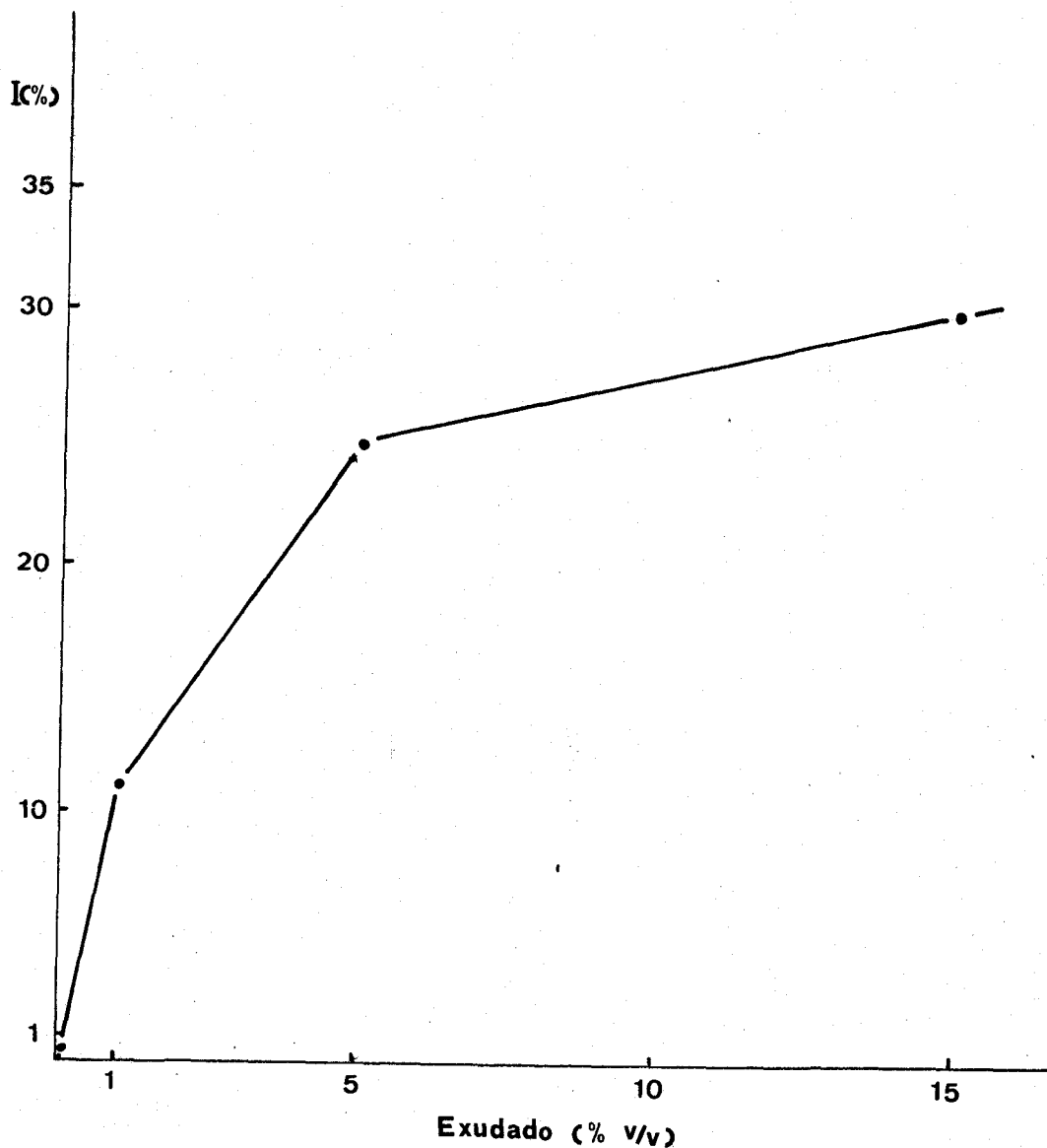


Figura 12.- Efecto inhibitor (I) de distintas concentraciones de exudados radicales de dos días, de Trifolium alexandrinum, sometidos previamente a 60° C durante 30 minutos, sobre la producción de AIA a partir de triptófano, por células lavadas de Rhizobium meliloti (RS.94).

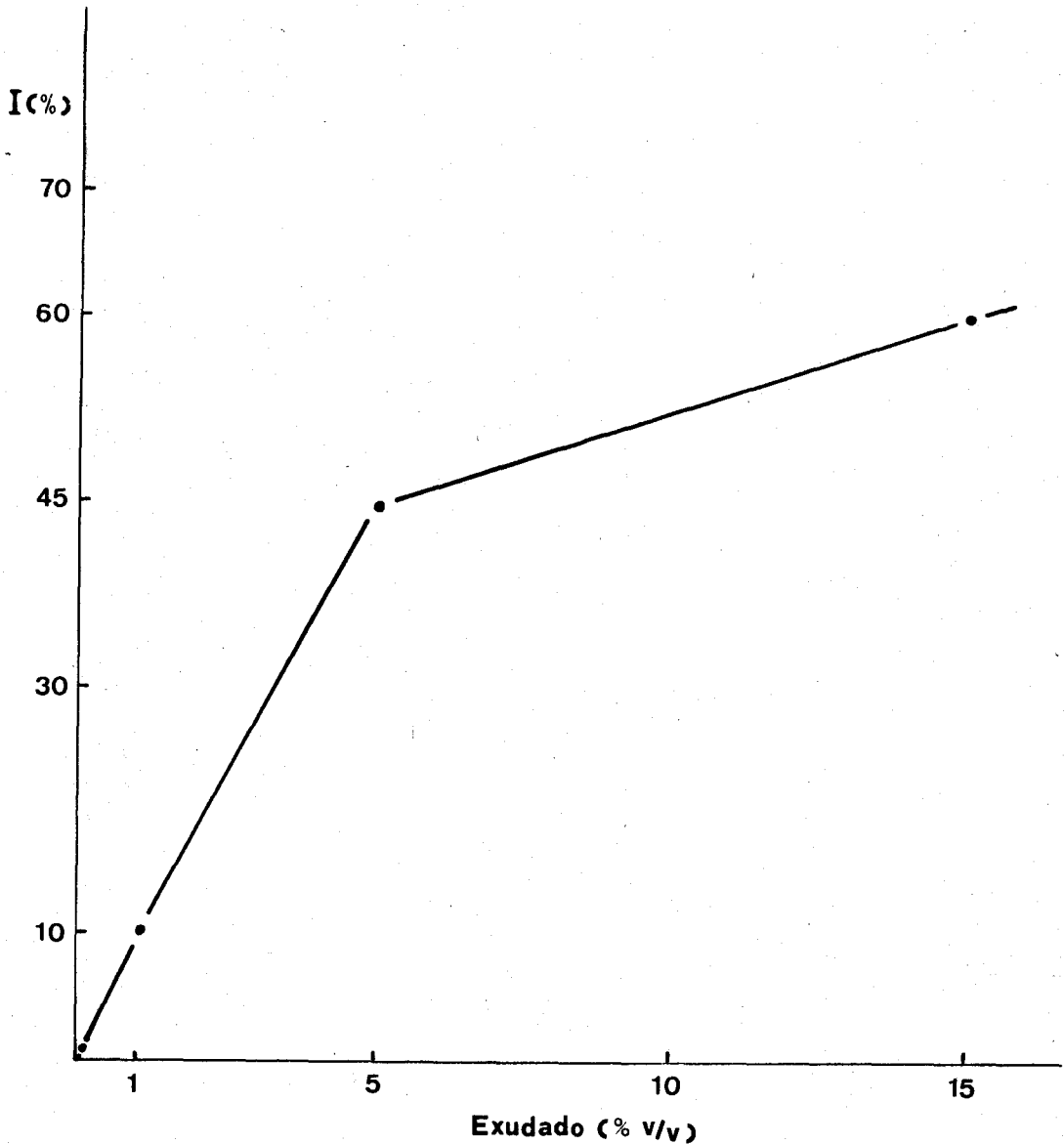


Figura 13.- Efecto inhibitor (I) de distintas concentraciones de exudados radicales de siete días, de Trifolium alexandrinum, sometido previamente a 60° C durante 30 minutos, sobre la producción de AIA a partir de triptófano, por células lavadas de Rhizobium meliloti (RS.94).

nutos. De la misma forma pusimos controles con NAD puro, calentado y sin calentar, en presencia de la enzima para asegurarnos que la reacción se daba normalmente y relacionar estos resultados con los del exudado radical.

Los resultados se exponen en la tabla 21 y se representan gráficamente en la figura 14 y de ellos se deduce que en el exudado radical de dos días no existe NAD; sin embargo, en los exudados radicales producidos a partir de los cuatro días de incubación de las semillas se observa la presencia de NAD, debido a que se da un aumento en la absorbancia a 340 nm cuando los incubamos en presencia de la enzima. Como se observa en estos datos, la aparición de NAD en el exudado se realiza entre los dos y los cuatro días y después aumenta hasta el séptimo día, donde se puede considerar que se estabiliza la producción; por otra parte, en ninguna de las muestras estudiadas se observa una disminución de la concentración de NAD, cuando se calienta previamente el exudado.

### 3.2.9.- Efecto del NAD sobre la producción de AIA por células lavadas de Rhizobium.-

Una vez demostrada la presencia de NAD en el exudado radical, ensayamos la acción del NAD sobre la producción de AIA por células lavadas de Rhizobium meliloti. Con este fin, incubamos células lavadas de la estirpe RS.94 de

Tabla 21.- Contenido en NAD de los exudados radicales de Trifolium alexandrinum de dos, cuatro, siete y diez días de edad.

t (días)	Incremento de absorbancia (340 nm)	Concentración molar de NAD.
Exudado normal		
0	0	0
2	0	0
4	0,009	$9,62 \cdot 10^{-6}$
7	0,013	$1,39 \cdot 10^{-5}$
10	0,012	$1,29 \cdot 10^{-5}$
Exudado calentado		
0	0	0
2	0	0
4	0,009	$9,62 \cdot 10^{-6}$
7	0,013	$1,39 \cdot 10^{-5}$
10	0,012	$1,29 \cdot 10^{-5}$



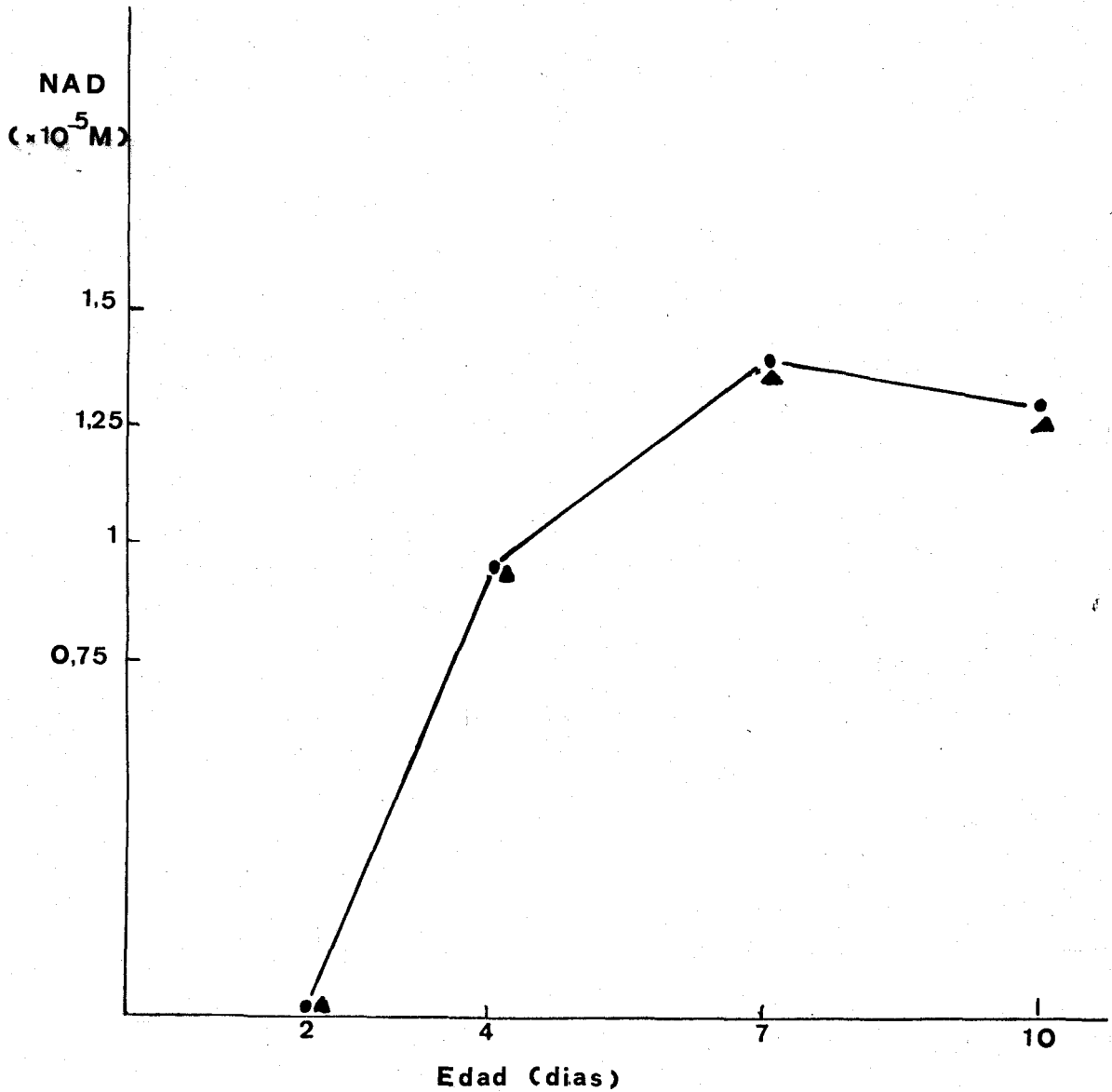


Figura 14.- Contenido en NAD de los exudados radicales de Trifolium alexandrinum, recogidos a distintos tiempos (edad), antes (•) y después (▲) de ser sometidos a un tratamiento térmico de 60° C, durante 30 minutos.

dicha especie rizobiana en presencia de triptófano y en presencia y en ausencia de NAD, con una concentración de este último de 0,1 mM. Este experimento se realizó en tampón fosfato 0,1 M, pH: 7,5 y la incubación fué a 28° C, en agitación, durante 48 horas, al cabo de las cuales se sometieron los líquidos metabólicos a los procesos de extracción y de valoración del AIA, según los métodos descritos anteriormente. También se realizó un ensayo similar pero calentando el NAD a 60° C, durante 30 minutos, en las mismas condiciones de pH en las que se encuentran los exudados radicales de siete días, que es aproximadamente de 6,5, como hemos comprobado repetidamente. También se puso un control sin células, con triptófano y con NAD.

Los resultados se expresan en la tabla 22 y de ellos se deduce que el NAD aumenta la producción de AIA por células lavadas de Rhizobium meliloti (22% en nuestras condiciones experimentales) y que este efecto se ve algo disminuido (hasta un 15%) cuando el NAD es previamente calentado a 60° C durante 30 minutos.

### 3.2.10.- Investigación de tiamina en el exudado radical de Trifolium alexandrinum.

Otra de las sustancias que según se ha demostrado, interviene en la producción de AIA a partir del triptó-

Tabla 22.- Producción de AIA por células lavadas de Rhizobium meliloti en presencia y en ausencia de NAD.-

NAD (0,1 mM)	Producción de AIA (1)	Activación (2)
Control sin NAD	1,90	-
Normal	2,32	22,10
Calentado	2,20	15,70
Control sin células	0,00	-

(1) Expresada en microgramos por mililitro de líquido metabólico.

(2) Expresada en porcentaje de aumento de la producción de AIA con respecto al control sin NAD.



fano es el pirofosfato de tiamina; por ello, nos pareció interesante comprobar si en los exudados radicales se encontraba presente la vitamina B<sub>1</sub> o alguno de sus derivados, ya que podría ser uno de los factores de regulación que presenta la planta sobre la producción de AIA por los rizobios presentes en la rizosfera.

Con este fin, se realizó un ensayo biológico, utilizando Lactobacillus fermenti (ATCC 9338), que es un auxótrofo para la vitamina B<sub>1</sub>. Se ensayaron exudados radicales de Trifolium alexandrinum de 2, 4, 7 y 10 días de edad y también se ensayaron exudados del mismo tipo, pero calentados previamente a 60° C, durante 30 minutos. Este ensayo se realizó en los medios descritos y de la forma expuesta en el apartado de métodos, llevándose también un experimento paralelo con distintas concentraciones de hidrócloruro de tiamina, para la realización de una curva de calibrado (tabla 23 y figura 15). Para la realización de esta curva se pusieron tubos con 0,0; 0,0005; 0,001; 0,0015; 0,002; 0,003; 0,004 y 0,005 microgramos de tiamina por mililitro de medio. Los resultados se exponen en la tabla 24 y se representan gráficamente en la figura 16 y de ellos se puede deducir que existe tiamina en los exudados radicales de dos días, en una concentración que como mínimo es de 0,013 microgramos de tiamina por mililitro de exudado,

Tabla 23.- Crecimiento de Lactobacillus fermenti (ATCC 9338), expresada por su absorbancia a 480 nm, cuando es cultivado en presencia de distintas concentraciones de hidrocloreuro de tiamina.

=====

Concentración de tiamina (ng/ml)	Absorbancia (480 nm)
0,00	0,000
0,50	0,057
1,00	0,105
1,50	0,132
2,00	0,180
3,00	0,202
4,00	0,225
5,00	0,225

=====

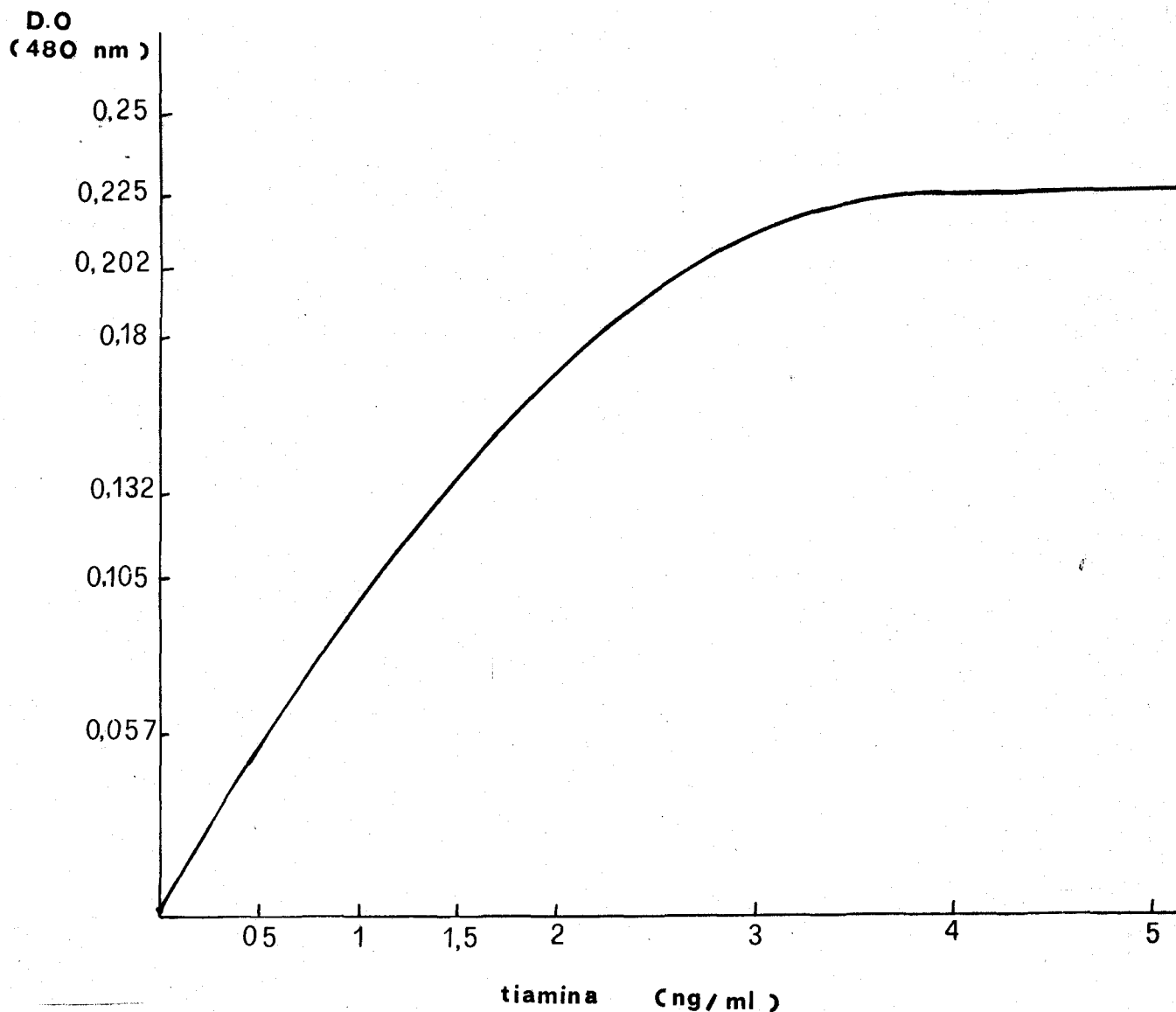


Figura 15.- Curva standard de crecimiento de Lactobacillus fermenti (ATCC 9338) para distintas concentraciones de hidrocloreuro de tiamina.

Tabla 24.- Concentraciones de tiamina en exudados radicales de Trifolium alexandrinum recogidos a diferentes tiempos, atendiendo al crecimiento de Lactobacillus fermenti (ATCC 9338).

Edad del exudado (días)	Absorbancia del cultivo (480 nm)	Concentración de tiamina (ng/ml) (1)
2	0,220	58,33
2 calentado	0,210	50,50
4	0,000	0,00
4 calentado	0,000	0,00
7	0,060	9,33
7 calentado	0,022	3,33
10	0,000	0,00
10 calentado	0,000	0,00

(1) Después de aplicar el factor de dilución al haber añadido 0,3 ml de exudado a un volumen final de medio de 5 ml.

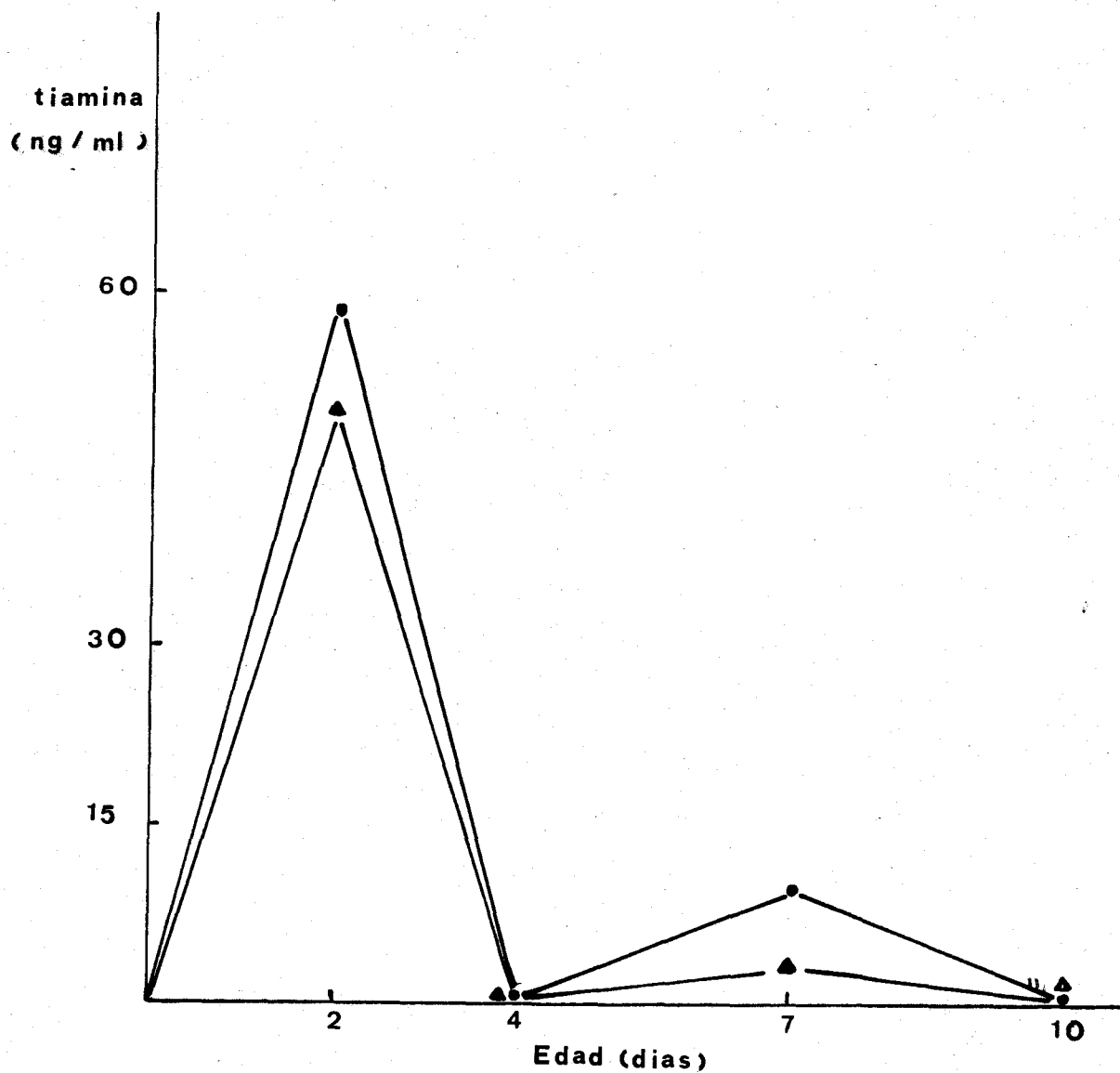


Figura 16.- Contenido en tiamina de los exudados radiculares de Trifolium alexandrinum, recogidos a distintos tiempos (edad), antes (•) y después (▲) de ser sometidos a un tratamiento térmico de 60° C, durante 30 minutos.



mientras que en el resto de los exudados ensayados solamente se observa en los de siete días, a una concentración de 0,0016 microgramos por mililitro. Por otra parte en los exudados de siete días calentados previamente se observa una disminución de la concentración de tiamina.

### 3.2.11.- Efecto del pirofosfato de tiamina sobre la producción de AIA por células lavadas de Rhizobium.-

Una vez demostrada la existencia de tiamina en los exudados radicales, ensayamos la acción del pirofosfato de tiamina sobre la producción de AIA por células lavadas de Rhizobium meliloti. Con este fin incubamos células lavadas de la estirpe RS.94 de dicha especie rizobiana en presencia de triptófano y en presencia y en ausencia de pirofosfato de tiamina, con una concentración de este último de 0,1 mM. Este experimento se realizó en tampón fosfato, 0,1 M, de pH: 7,5 y, la incubación se realizó a 28° C, en agitación, durante 48 horas, al cabo de las cuales se sometieron los líquidos metabólicos a los procesos de extracción y de valoración del AIA. También se realizó un ensayo similar pero calentando previamente el pirofosfato de tiamina a 60° C, durante 30 minutos, al mismo pH con que se encuentra el exudado radical de siete días, antes de ensayar su acción sobre la producción de AIA.

Los resultados se expresan en la tabla 25 y de ellos se puede deducir que el pirofosfato de tiamina aumenta la producción de AIA por células lavadas de Rhizobium meliloti (22%, aprox.) y que cuando es calentado previamente también manifiesta una acción activadora, aunque algo menor (15%, aprox.).

### 3.2.12.- Investigación de piridoxina en el exudado radical de Trifolium alexandrinum.

Como ya hemos señalado en los antecedentes bibliográficos, Rigaud (47) demostró que el piridoxal fosfato aumenta la producción de AIA por células lavadas de Rhizobium.

Ello nos indujo a comprobar la existencia de vitamina B<sub>6</sub> en el exudado radical, ya que esta sustancia podría intervenir en la regulación de la producción de AIA por Rhizobium.

Con este fin se realizó un ensayo biológico, utilizando a Saccharomyces carlsbergensis (ATCC 9080), que es una levadura auxótrofa para la vitamina B<sub>6</sub>. Se ensayaron exudados de Trifolium alexandrinum de 2, 4, 7 y 10 días de edad y también otros calentados previamente a 60° C, durante 30 minutos. Estos ensayos se realizaron en los medios descritos y de la forma expuesta en el apartado de métodos. También se pusieron controles con distintas con-

Tabla 25.- Producción de AIA por células lavadas de Rhizobium meliloti, en presencia y en ausencia de pirofosfato de tiamina.

Pirofosfato de tiamina	Producción de AIA (1)	Activación (2)
Control sin tiamina	1,90	-
Normal	2,33	22,6
Calentada	2,19	15,2

(1) Expresada en microgramos / mililitro de líquido metabólico.

(2) Expresada en porcentaje de aumento de la concentración de AIA con respecto al control sin tiamina.

centraciones de fosfato de piridoxal: 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 y 1 microgramos por mililitro de medio. Los resultados se exponen en la tabla 26 y en la figura 16a; de ellos se puede deducir que existen sustancias relacionadas con la vitamina B<sub>6</sub> en todos los exudados radicales ensayados, siendo los recogidos a los dos días los que presentan una mayor concentración. Por otra parte, se observa que los exudados radicales calentados previamente muestran un efecto similar sobre el crecimiento de la levadura.

### 3.2.13.- Efecto del fosfato de piridoxal sobre la producción de AIA por células lavadas de Rhizobium.-

Una vez comprobada la existencia de la vitamina B<sub>6</sub> en el exudado radical, ensayamos la acción del fosfato de piridoxal sobre la producción de AIA por células lavadas de Rhizobium meliloti. Con este fin incubamos células lavadas de la estirpe RS.94 de dicha especie rizobiana en presencia de triptófano y en presencia y en ausencia de fosfato de piridoxal, estando este último a una concentración de 0,1 mM. Este experimento se realizó en tampón de fosfato 0,1 M, de pH: 7,5 y, la incubación se realizó a 28° C, en agitación, durante 48 horas, al cabo de las cuales se sometieron los líquidos metabólicos a los procesos de extracción y valoración del AIA. También se realizó un ensayo similar, pero calentando previamente el

Tabla 26.- Crecimiento de Saccharomyces carlsbergensis (ATCC 9080), expresado en absorbancia a 480 nm, en presencia de exudados radicales de Trifolium alexandrinum recogidos a distintos tiempos.

=====

Edad del exudado (días)	Absorbancia del cultivo (480 nm)
----------------------------	-------------------------------------

---

2	0,15
2 (calentado)	0,15
4	0,08
4 (calentado)	0,10
7	0,075
7 (calentado)	0,06
10	0,075
10 (calentado)	0,07

=====

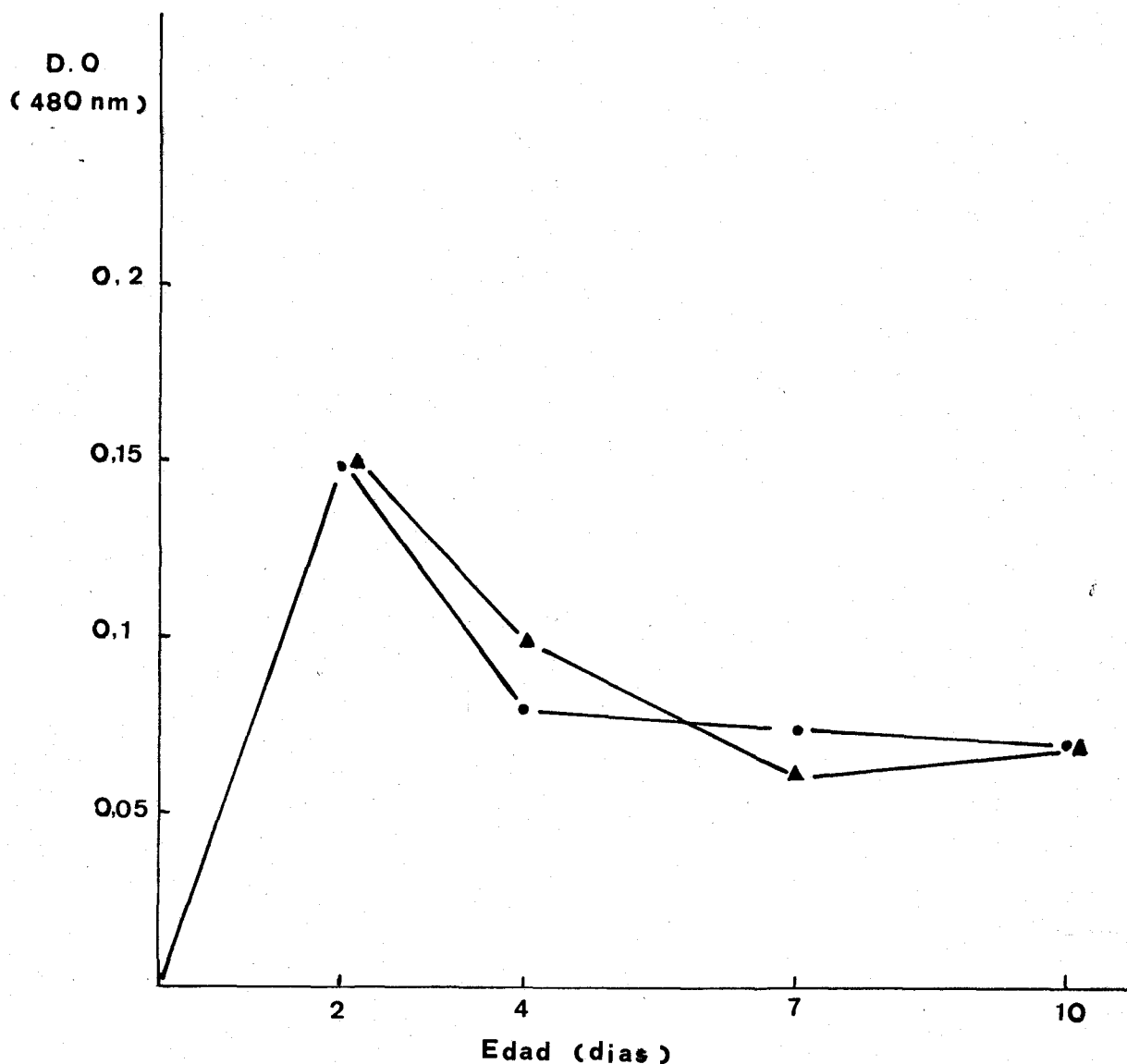


Figura 16a.- Efecto de exudados radicales de Trifolium alexandrinum, recogidos a distintos tiempos (edad), antes (●) y después (▲) de ser sometidos a un tratamiento térmico de 60° C, durante 30 minutos, sobre el crecimiento de Saccharomyces carlsbergensis (ATCC 9080), cultivado en un medio carente de piridoxina.

fosfato de piridoxal a 60° C durante 30 minutos, con el mismo pH que presentan los exudados radicáles de siete días.

Los resultados se exponen en la tabla 27 y de ellos se deduce que el fosfato de piridoxal aumenta la producción de AIA por células lavadas de Rhizobium meliloti; asimismo, el piridoxal fosfato que había sido previamente calentado muestra un efecto similar.

### 3.2.14.- Efecto de distintas combinaciones de NAD, pirofosfato de tiamina y fosfato de piridoxal sobre la producción de AIA por células lavadas de Rhizobium.-

Una vez comprobado que el NAD, el pirofosfato de tiamina y el fosfato de piridoxal manifiestan un efecto activador sobre la producción de AIA, cuando se incuban células lavadas de Rhizobium meliloti, en presencia de alguno de estos compuestos, ensayamos los efectos que manifiestan distintas combinaciones de los mismos sobre dicha producción.

Con este fin incubamos células lavadas de Rhizobium meliloti (RS.94), en presencia de triptófano y en presencia y en ausencia de las siguientes combinaciones de estos compuestos: a) NAD † piridoxal fosfato; b) NAD † pirofosfato de tiamina; c) piridoxal fosfato † pirofosfato de tiamina y d) NAD† piridoxal fosfato † pirofosfato de

Tabla 27.- Producción de AIA por células lavadas de Rhizobium meliloti, en presencia y en ausencia de fosfato de piridoxal.

Fosfato de piridoxal	Producción de AIA (1)	Activación (2)
-	1,90	-
Normal	2,58	35,7
Calentado	2,58	35,7

(1) Expresada en microgramos por mililitro de líquido metabólico.

(2) Expresada en porcentaje de aumento de la concentración de AIA, con respecto al control sin piridoxal.



tiamina. Las concentraciones de estos compuestos fueron de 0,1 mM, en todos los casos. También se pusieron controles con triptófano, pero sin estas sustancias. Las incubaciones se realizaron en todos los casos en tampón fosfato 0,1 M, pH: 7,5, a 28° C, en agitación, durante 48 horas, al cabo de las cuales se sometieron los líquidos metabólicos a los procesos de extracción y de valoración del AIA.

Los resultados se exponen en la tabla 28 y de ellos se puede deducir que solamente cuando están juntos el NAD y el pirofosfato de tiamina, pero sin piridoxal fosfato se observa un aumento de la producción de AIA, aunque este aumento es menor de lo que cabría esperar si se sumaran los efectos individuales de cada uno de ellos e, incluso es menor que el efecto correspondiente a cada uno de ellos; en el resto de las combinaciones, en las cuales siempre está presente el piridoxal fosfato, no se observa aumento de la producción de AIA, e incluso cuando se encuentran juntos los tres se observa una disminución de la producción de AIA del orden del 32 %.

### 3.2.15.- Efecto del ácido 2-cetoglutarico sobre la producción de AIA por células lavadas de Rhizobium.-

Aunque no hemos investigado la presencia de ácido 2-cetoglutarico en los exudados radicales ni tampoco he-

Tabla 28.- Producción de AIA por células lavadas de Rhizobium meliloti, en presencia y en ausencia de distintas combinaciones de NAD (N), pirofosfato de tiamina (T) y fosfato de piridoxal (P).

Coenzimas	Producción de AIA (1)	Activación (2)
N y T	2,22	16,8
N y P	1,31	-31,0
P y T	1,84	-3,1
N, P y T	1,29	-32,1
-	1,90	-

(1) Expresada en microgramos por mililitro de líquido metabólico.

(2) Expresada en porcentaje de aumento de la concentración de AIA con respecto al control sin coenzimas.

mos encontrado datos en la bibliografía indicativos de su existencia, teniendo en cuenta que Rigaud (47) ha demostrado que dicha sustancia estimula la producción de AIA a partir de triptófano, por células lavadas de Rhizobium, creímos interesante confirmar estos resultados con objeto de relacionarlos con los recientes trabajos de Werner y Berghäuser (70), quienes han encontrado diferencias específicas entre distintos rizobios en cuanto a la captación de cetoglutarato. Por ello, nosotros ensayamos el comportamiento de distintas especies de Rhizobium, en cuanto a la influencia del cetoglutarato sobre la producción de AIA, a partir de triptófano.

### 3.2.15.1.- Influencia de la concentración de cetoglutarato.-

El primer problema que se nos planteó fué el de determinar qué concentración de cetoglutarato nos permitía apreciar las mayores diferencias de comportamiento en las especies de Rhizobium ensayadas por nosotros.

A este fin planteamos un experimento consistente en observar el efecto de este compuesto, a varias concentraciones, sobre la producción de AIA por Rhizobium trifolii, Rhizobium meliloti y Rhizobium lupini, en agitación y en cultivo estático.

El primer ensayo, cuyos resultados se exponen en las

tablas 29 a 34 y se representan gráficamente en las figuras 17 a 22, se hizo utilizando una estirpe de cada una de las especies mencionadas y cinco concentraciones distintas de ácido 2-cetoglutarico: 0,01 mM, 0,1 mM, 1 mM, 5 mM y 10 mM. Los medios fueron incubados a 28° C, durante 48 horas, en agitación y en forma estática, al cabo de las cuales los líquidos metabólicos se sometieron a los procesos de extracción y de valoración del AIA. El ácido 2-cetoglutarico era esterilizado por filtración antes de su inclusión en el medio de incubación.

Como se deduce de estos resultados, las concentraciones que actúan de manera más generalizada y más acusada son 0,1 mM, 1 mM y 10 mM y, por ello, hicimos un ensayo posterior utilizando estas concentraciones y otras estirpes de las mismas especies rizobianas. Los resultados se exponen en las tablas 35 a 40 y se representan gráficamente en las figuras 23 a 28. De ellos se desprende que la concentración de ácido 2-cetoglutarico que da una mayor discriminación es 1 mM y, por ello, es la que hemos elegido para ulteriores experimentos.

Una vez determinada la concentración óptima para nuestro trabajo, ensayamos el efecto de este cetoácido, a la concentración de 1 mM, sobre la producción de AIA por cinco estirpes de Rh.trifolii, cinco estirpes de Rh.meliloti y cinco estirpes de Rh.lupini, existiendo estirpes de dis-

Tabla 29.- Producción de AIA, a partir de triptófano, por células lavadas de Rhizobium trifolii (RS.90), incubadas en agitación, en presencia de distintas concentraciones de ácido 2-cetoglutarico.

Cetoglutarato (mM)	Producción de AIA (1)	Efecto (2)
0,00	1,52	1,00
0,01	0,93	0,61
0,10	1,73	1,14
1,00	2,90	1,90
5,00	2,95	1,94
10,00	2,90	1,90

(1) Expresada en microgramos por mililitro de líquido metabólico.

(2) Expresado en tanto por uno de producción de AIA con respecto al control sin cetoglutarato.

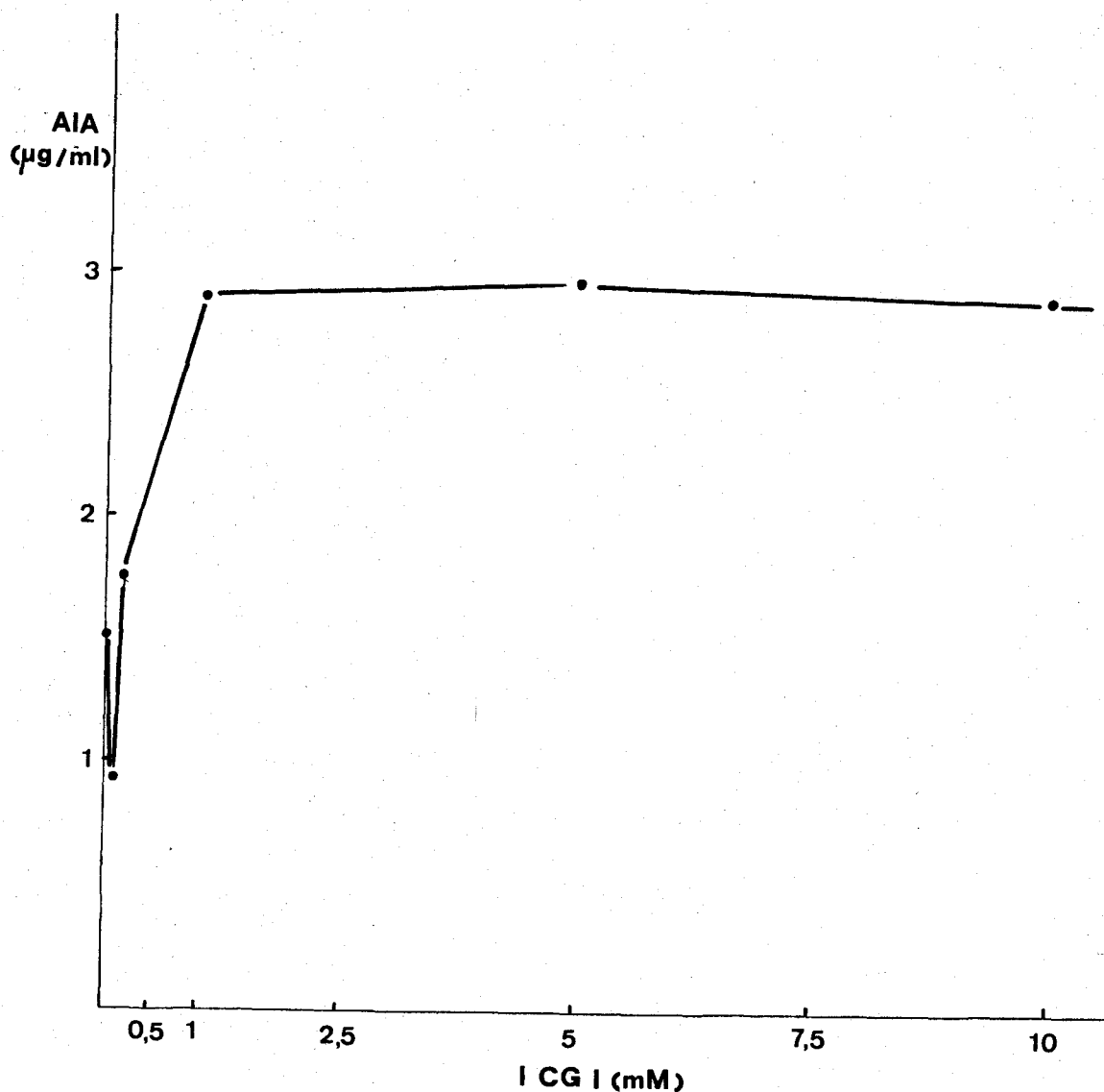


Figura 17.- Producción de AIA por células lavadas de Rhizobium trifolii (RS.90), incubadas en agitación, en presencia de distintas concentraciones de ácido 2-cetoglutarico.

Tabla 30.- Producción de AIA (1), a partir de triptófano, por células lavadas de Rhizobium trifolii (RS.90), incubadas en forma estática, en presencia de distintas concentraciones de ácido 2-cetoglutarico.

Cetoglutarato (mM)	Producción de AIA	Efecto (2)
0,00	0,080	1,00
0,01	0,109	1,36
0,10	0,280	3,50
1,00	0,590	7,37
5,00	1,240	15,50
10,00	1,410	17,62

(1) Expresada en microgramos por mililitro de líquido metabólico.

(2) Expresado en tanto por uno de producción de AIA con respecto al control sin cetoglutarato.

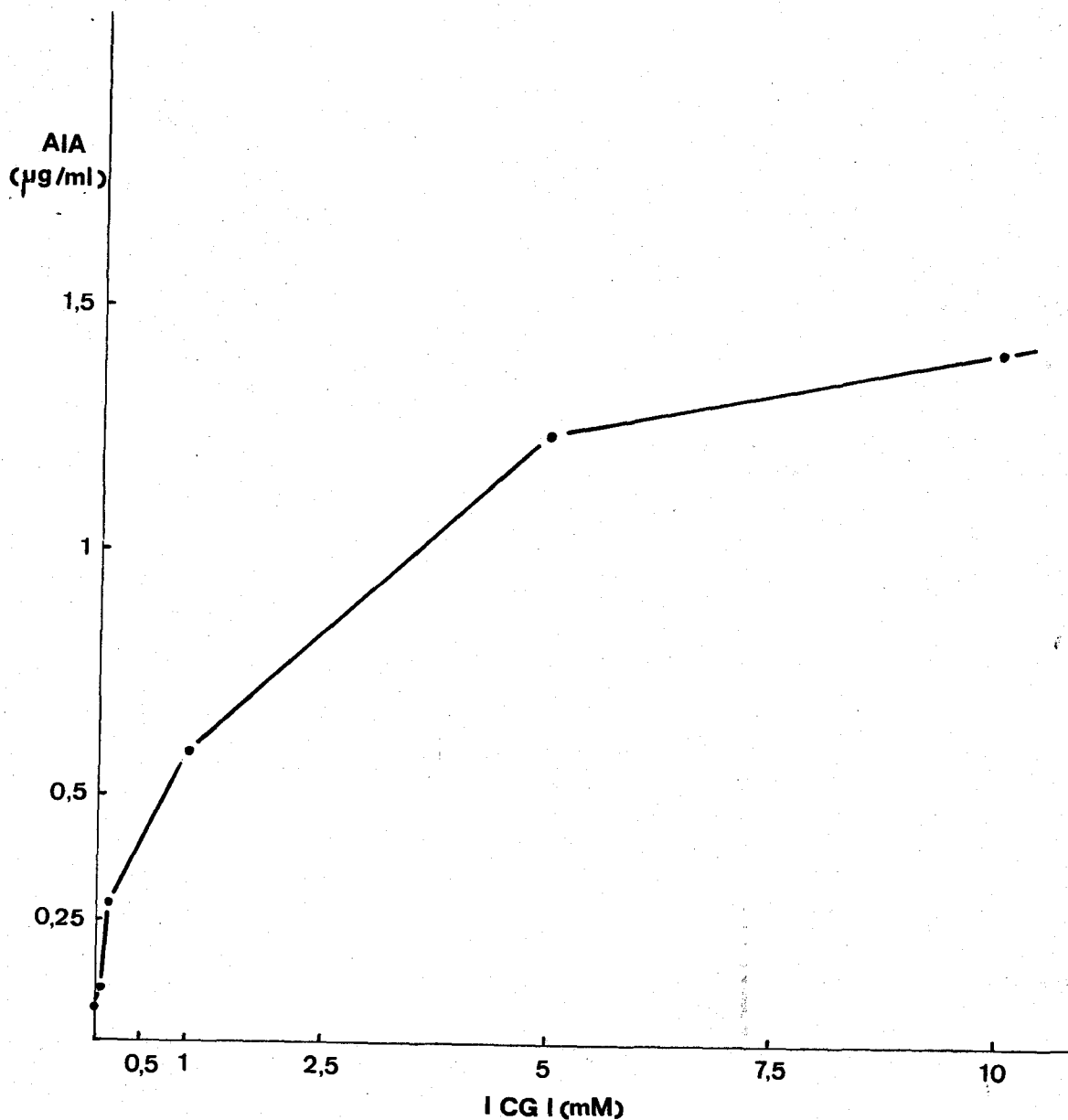


Figura 18.- Producción de AIA, a partir de triptófano, por células lavadas de Rhizobium trifolii (RS. 90), incubadas en forma estacionaria, en presencia de distintas concentraciones de ácido 2-cetoglutárico.



Tabla 31.- Producción de AIA (1), a partir de triptófano, por células lavadas de Rhizobium meliloti (RS. 94), incubadas en agitación, en presencia de distintas concentraciones de ácido 2-cetoglutarico.

Cetoglutarato (mM)	Producción de AIA	Efecto (2)
0,00	4,00	1,00
0,01	4,28	1,07
0,10	4,11	1,02
1,00	4,24	1,06
5,00	3,18	0,79
10,00	1,38	0,34

(1) Expresada en microgramos por mililitro de líquido metabólico.

(2) Expresado en tanto por uno de producción con respecto al control sin cetoglutarato.

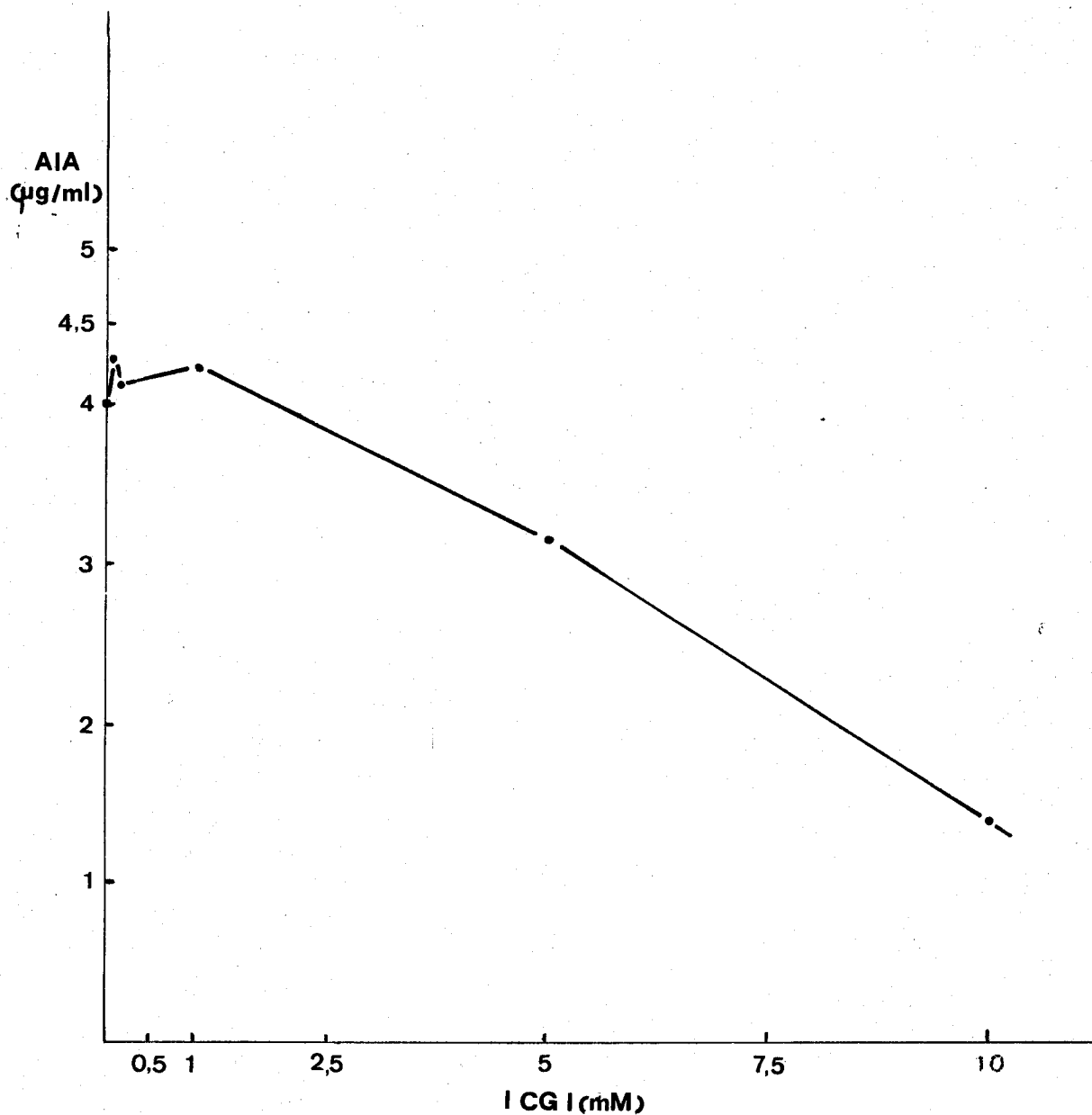


Figura 19.- Producción de AIA, a partir de triptófano, por células lavadas de Rhizobium meliloti (RS.94), incubadas en agitación, en presencia de distintas concentraciones de ácido 2-cetoglutárico.



Tabla 32.- Producción de AIA (1), a partir del triptófano, por células lavadas de Rhizobium meliloti (RS.94), incubadas en forma estática, en presencia de distintas concentraciones de ácido 2-cetoglutárico.

Cetoglutarato (mM)	Producción de AIA	Efecto (2)
0,00	3,31	1,00
0,01	3,02	0,91
0,10	3,65	1,10
1,00	4,53	1,36
5,00	3,58	1,08
10,00	3,36	1,01

(1) Expresada en microgramos por mililitro de líquido metabólico.

(2) Expresado en tanto por uno de producción de AIA con respecto al control sin cetoglutarato.

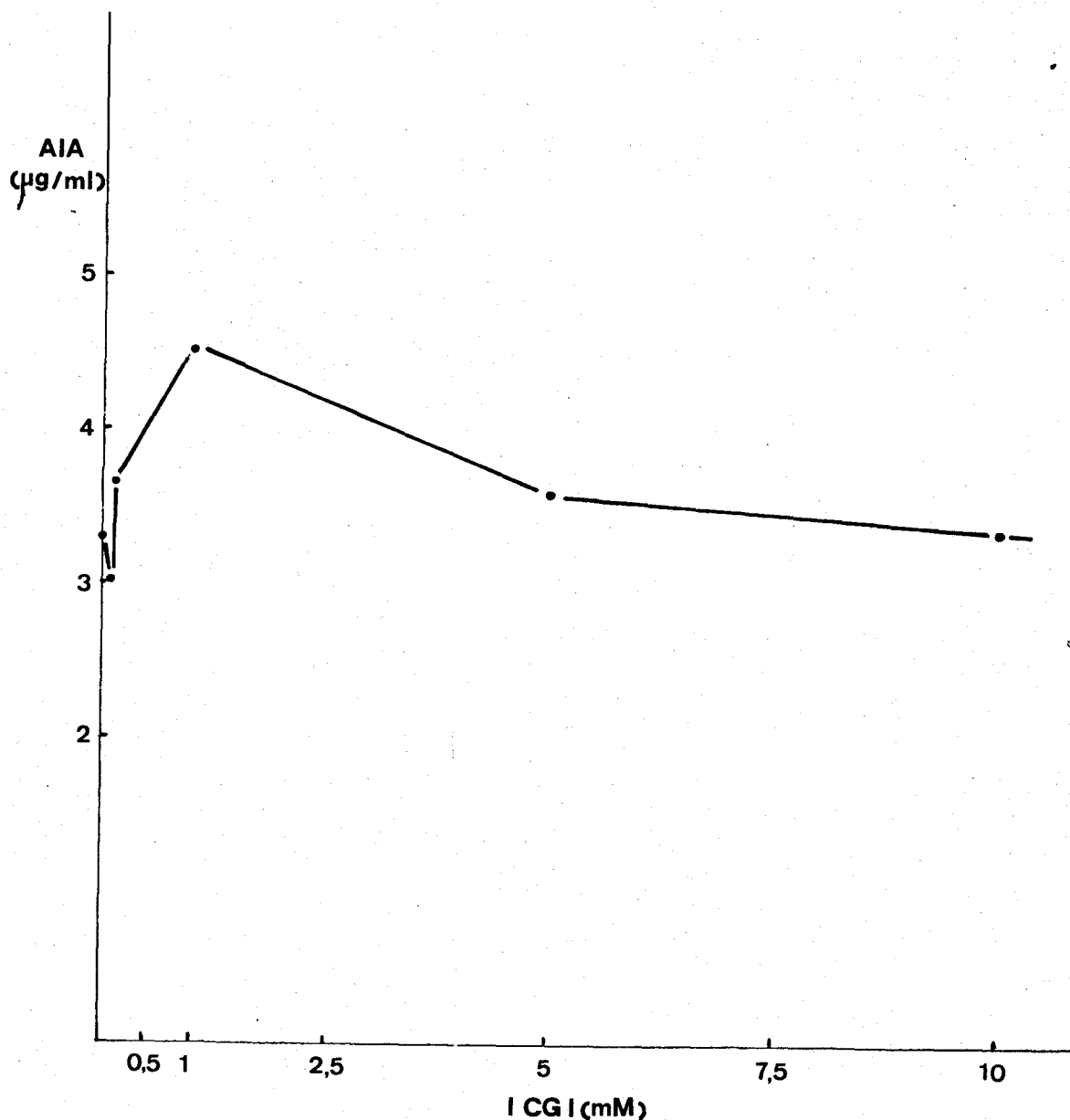


Figura 20.- Producción de AIA, a partir de triptófano, por células lavadas de Rhizobium meliloti (RS.94), incubadas en forma estacionaria, en presencia de distintas concentraciones de ácido 2-cetoglutárico.

Tabla 33.- Producción de AIA (1), a partir de triptófano, por células lavadas de Rhizobium lupini (RS.100), incubadas en agitación, en presencia de distintas concentraciones de ácido 2-cetoglutarico.

Cetoglutarato (mM)	Producción de AIA	Efecto (2)
0,00	0,95	1,00
0,01	0,69	0,72
0,10	0,60	0,63
1,00	0,55	0,57
5,00	0,52	0,54
10,00	0,50	0,52

(1) Expresada en microgramos por mililitro de líquido metabólico.

(2) Expresado en tanto por uno de producción de AIA, con respecto al control sin cetoglutarato.

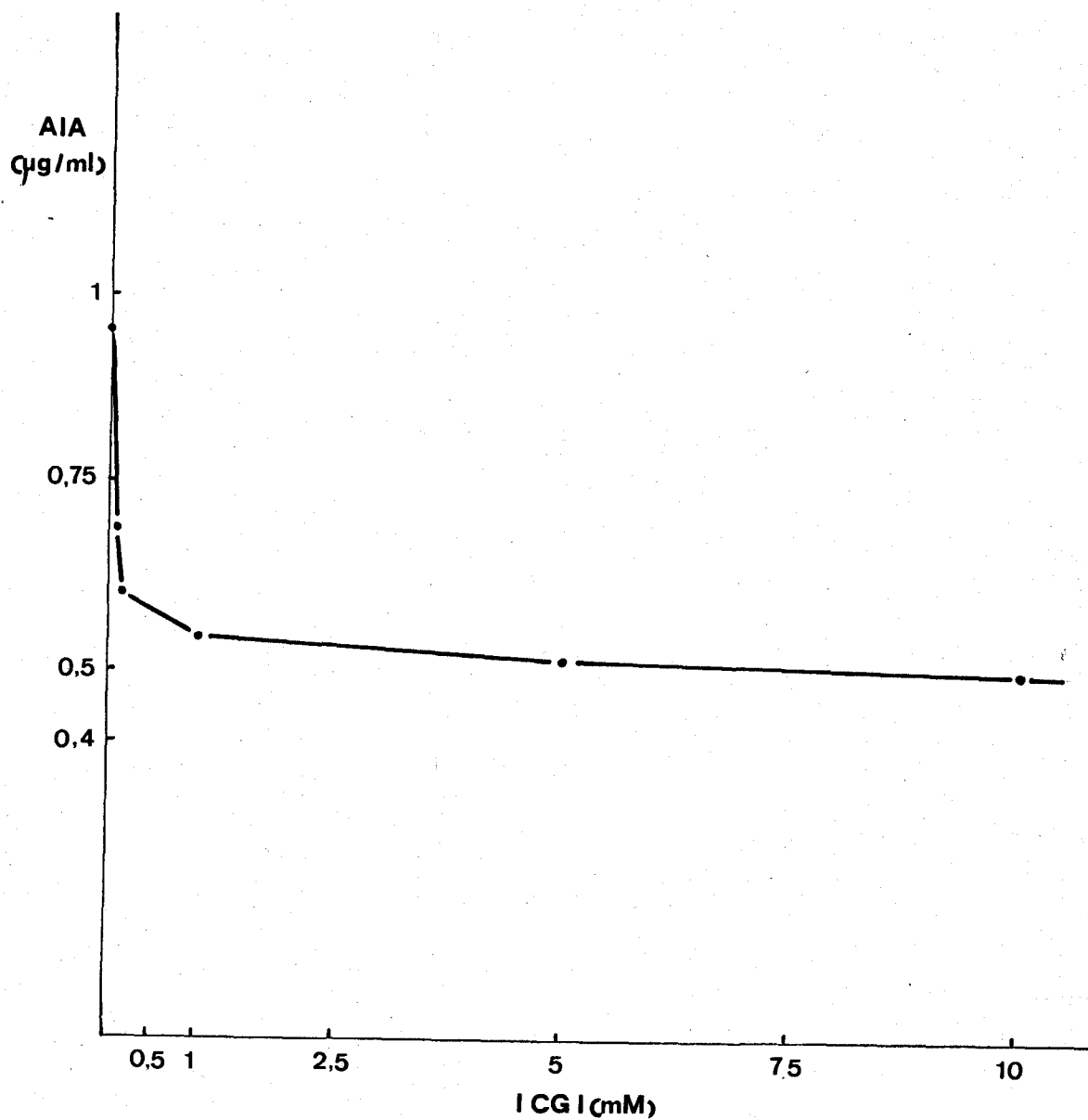


Figura 21.- Producción de AIA, a partir de triptófano, por células lavadas de Rhizobium lupini (RS.100), incubadas en agitación, en presencia de distintas concentraciones de ácido 2-cetoglutarico.

Tabla 34.- Producción de AIA (1), a partir de triptófano, por células lavadas de Rhizobium lupini (RS.100), incubadas en forma estática, en presencia de distintas concentraciones de cetoglutarato.

Cetoglutarato (mM)	Producción de AIA	Efecto (2)
0,00	0,75	1,00
0,01	0,93	1,24
0,10	3,33	4,44
1,00	9,08	12,10
5,00	10,46	13,94
10,00	11,35	15,13

(1) Expresada en microgramos por mililitro de líquido metabólico.

(2) Expresado en tanto por uno de producción con respecto al control sin cetoglutarato.

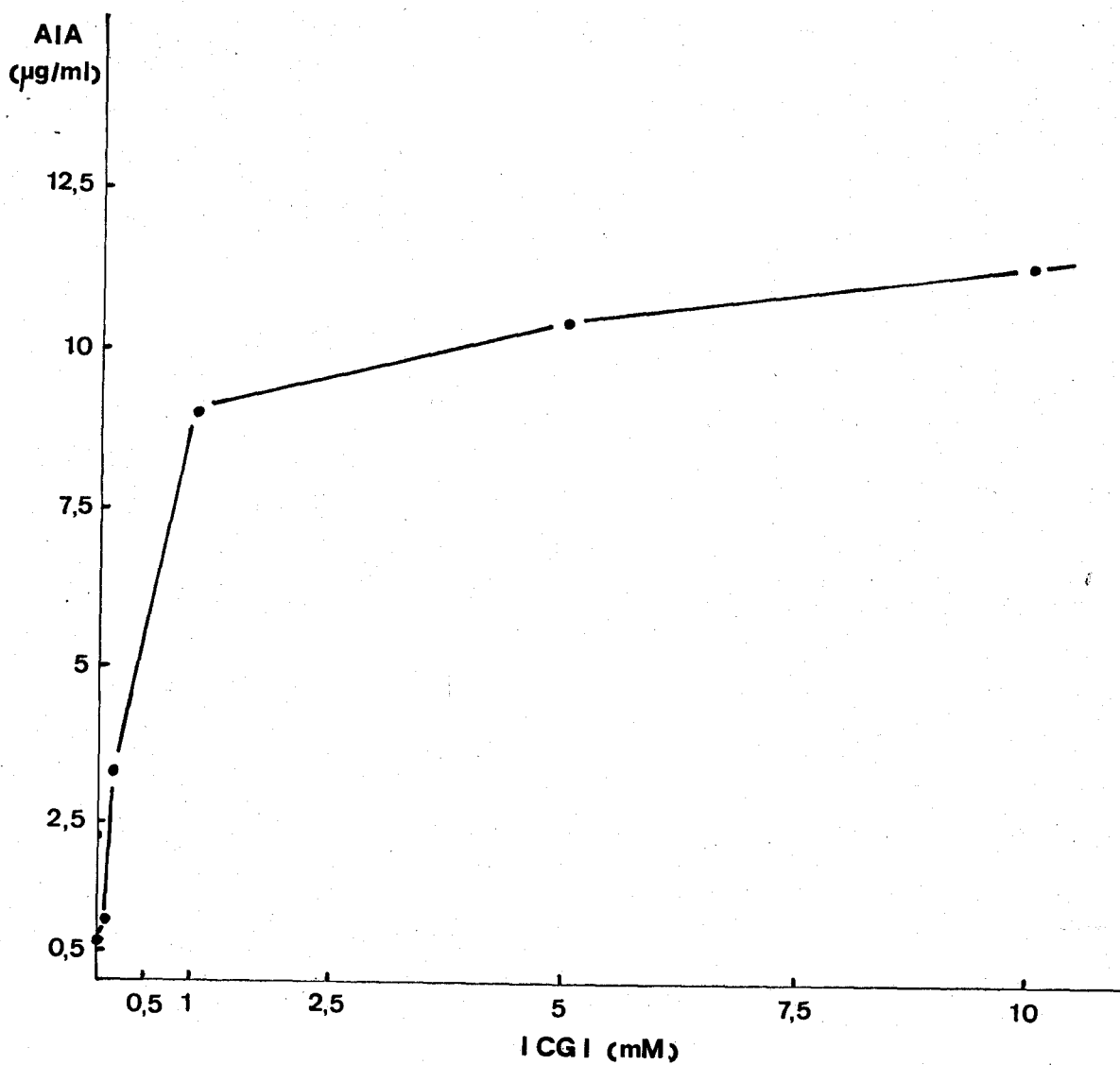


Figura 22.- Producción de AIA, a partir de triptófano, por células lavadas de Rhizobium lupini (RS.100), incubadas en forma estacionaria, en presencia de distintas concentraciones de ácido 2-cetoglutarico.



Tabla 35.- Producción de AIA (1), a partir de triptófano, por células lavadas de Rhizobium trifolii (RS.91), incubadas en agitación, en presencia de distintas concentraciones de ácido 2-cetoglutarico.

Cetoglutarato (mM)	Producción de AIA	Efecto (2)
0,00	3,75	1,00
0,10	4,38	1,17
1,00	6,60	1,76
10,00	8,36	2,22

(1) Expresada en microgramos por mililitro de líquido metabólico.

(2) Expresado en tanto por uno de producción de AIA, con respecto al control sin cetoglutarato.

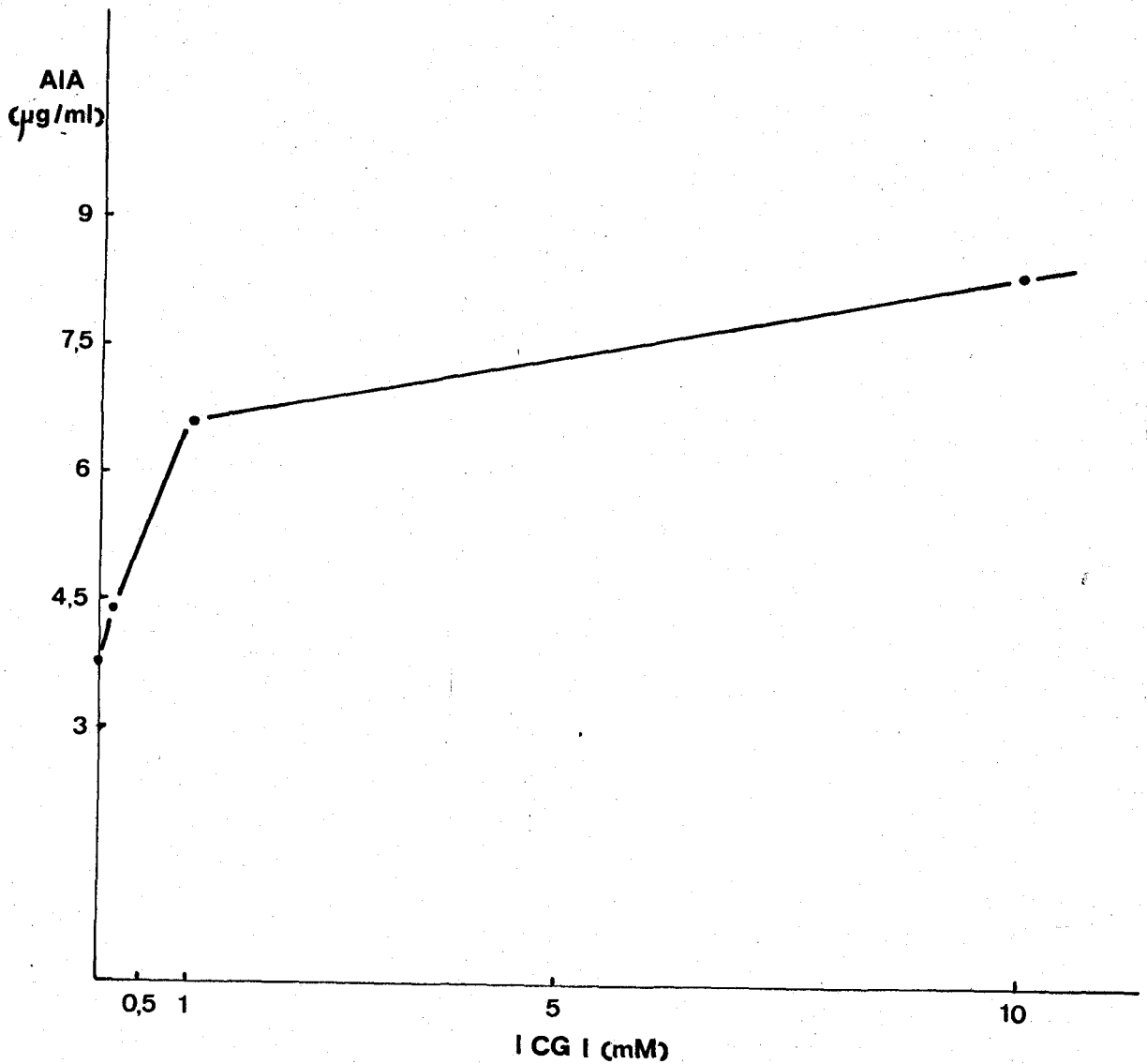


Figura 23.- Producción de AIA, a partir de triptófano, por células lavadas de Rhizobium trifolii (RS.91), incubadas en agitación, en presencia de distintas concentraciones de ácido 2-cetoglutárico.

Tabla 36.- Producción de AIA (1), a partir de triptófano, por células lavadas de Rhizobium trifolii (RS.91), incubadas en forma estática, en presencia de distintas concentraciones de cetoglutarato.

Cetoglutarato (mM)	Producción de AIA	Efecto (2)
0,00	3,11	1,00
0,10	4,67	1,49
1,00	5,45	1,75
10,00	6,46	2,07

(1) Expresada en microgramos por mililitro de líquido metabólico.

(2) Expresado en tanto por uno de producción de AIA, con respecto al control sin cetoglutarato.

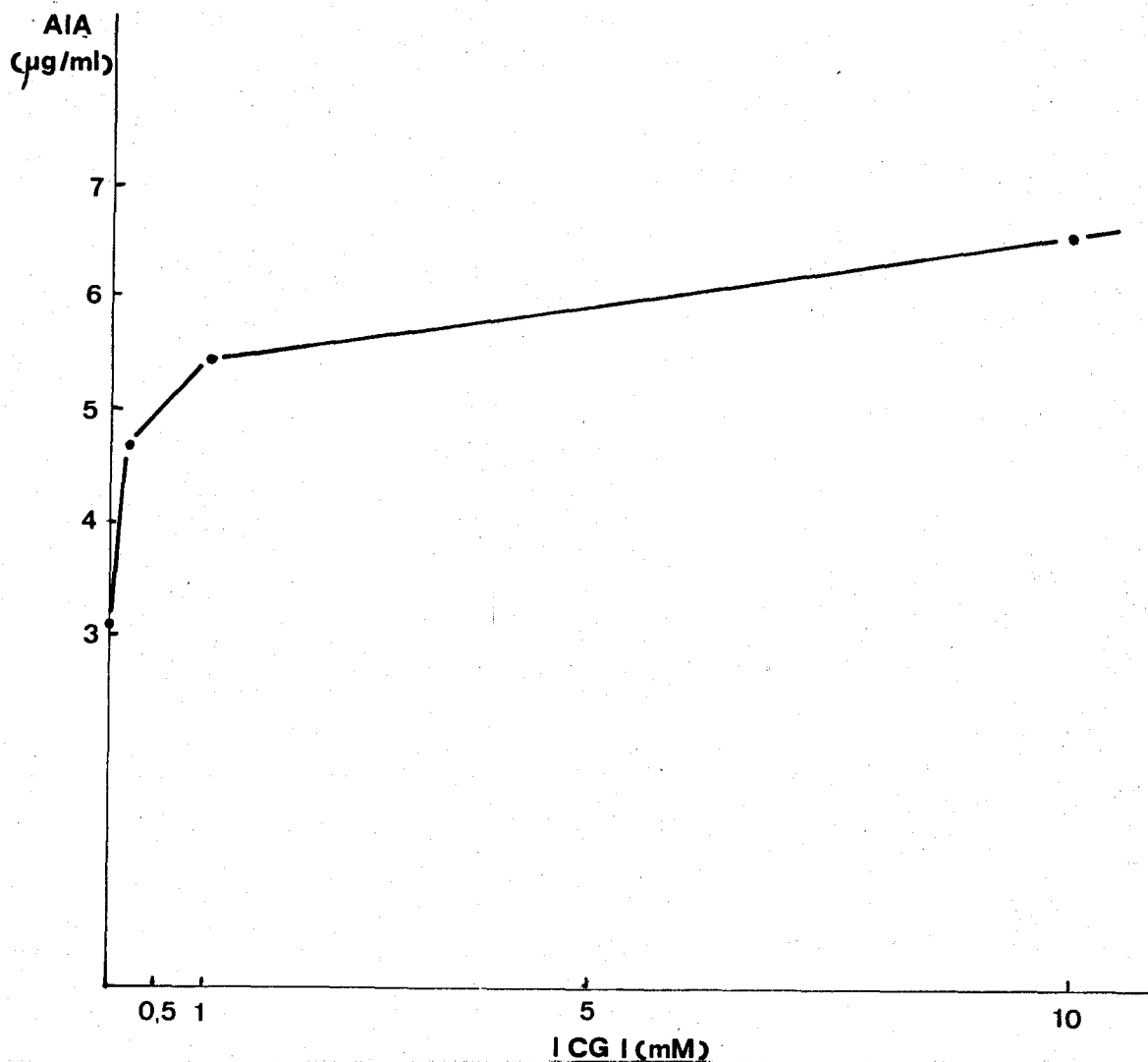


Figura 24.- Producción de AIA, a partir de triptófano, por células lavadas de Rhizobium trifolii (RS.91), incubadas en forma estacionaria, en presencia de distintas concentraciones de ácido 2-cetoglutarico.

Tabla 37.- Producción de AIA (1), a partir de triptófano, por células lavadas de Rhizobium meliloti (RS.96), incubadas en agitación, en presencia de distintas concentraciones de cetoglutarato.

Cetoglutarato (mM)	Producción de AIA	Efecto (2)
0,00	3,92	1,00
0,10	4,21	1,07
1,00	4,04	1,03
10,00	2,53	0,64

(1) Expresada en microgramos por mililitro de líquido metabólico.

(2) Expresado en tanto por uno de producción de AIA, con respecto al control sin cetoglutarato.

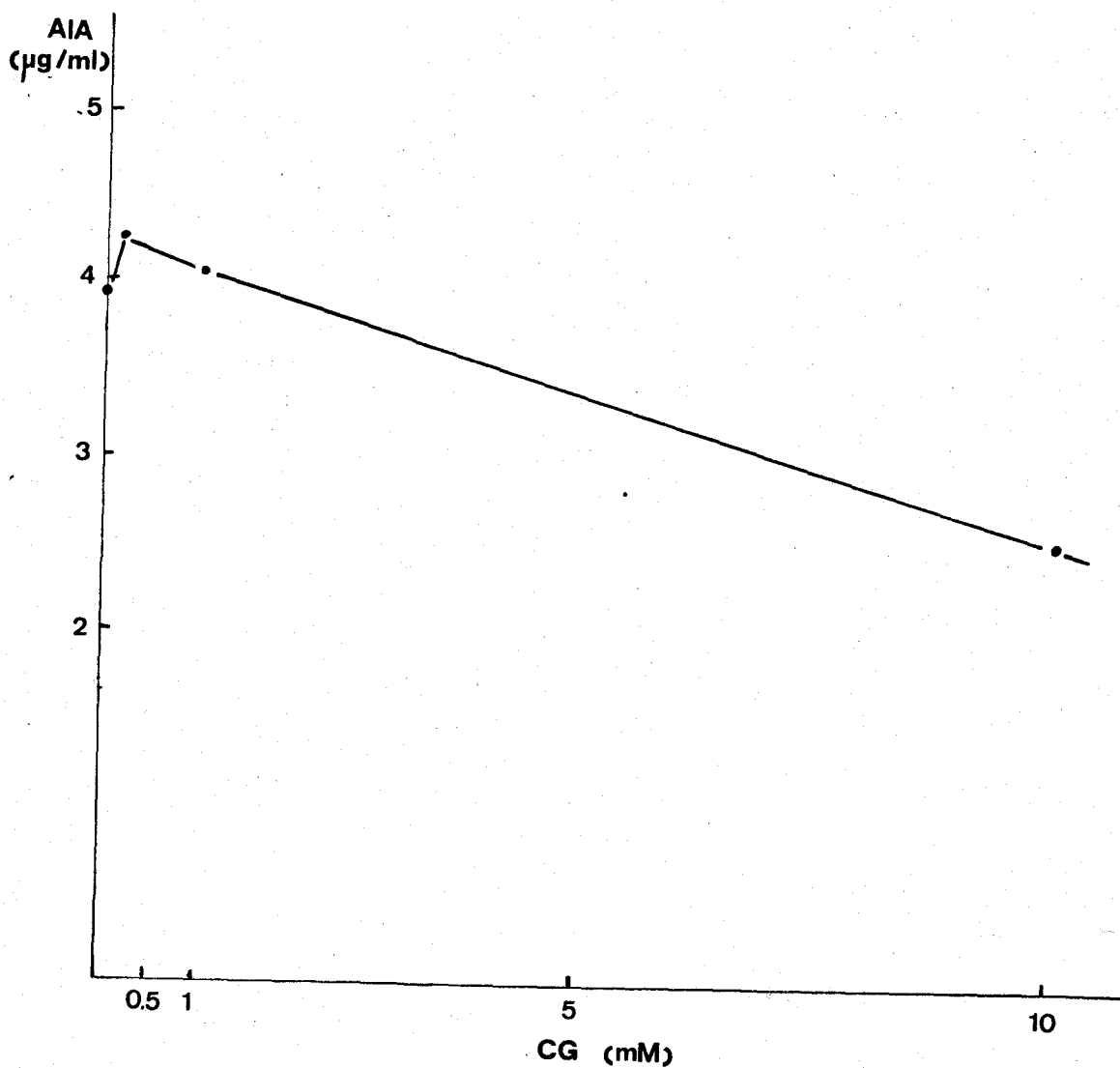


Figura 25.- Producción de AIA, a partir de triptófano, por células lavadas de Rhizobium meliloti (RS.96), incubadas en agitación, en presencia de distintas concentraciones de ácido 2-cetoglutárico.

Tabla 38.- Producción de AIA (1), a partir de triptófano, por células lavadas de Rhizobium meliloti (RS.96), incubadas en forma estática, en presencia de distintas concentraciones de ácido 2-cetoglutarico.

Cetoglutarato (mM)	Producción de AIA	Efecto (2)
0,00	3,35	1,00
0,10	4,32	1,28
1,00	5,07	1,51
10,00	3,35	1,00

(1) Expresada en microgramos por mililitro de líquido metabólico.

(2) Expresado en tanto por uno de producción de AIA, con respecto al control sin cetoglutarato.

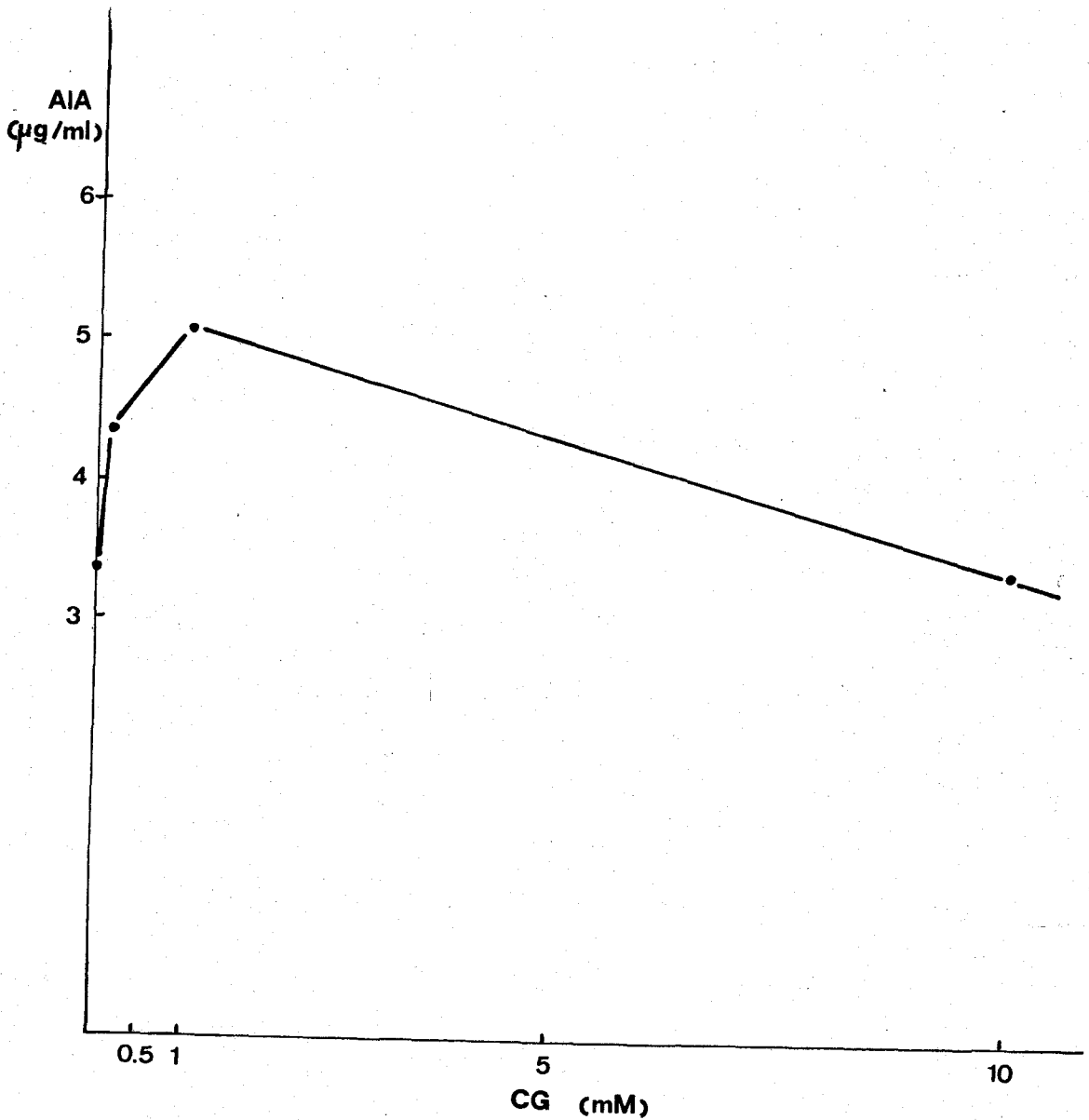


Figura 26.- Producción de AIA, a partir de triptófano, por células lavadas de Rhizobium meliloti (RS.96), incubadas en forma estacionaria, en presencia de distintas concentraciones de ácido 2-cetoglutarico.



Tabla 39.- Producción de AIA (1), a partir de triptófano, por células lavadas de Rhizobium lupini (RS.110), incubadas en agitación, en presencia de distintas concentraciones de ácido 2-cetoglutarico.

Cetoglutarato (mM)	Producción de AIA	Efecto (2)
0,00	0,40	1,00
0,10	0,40	1,00
1,00	0,46	1,15
10,00	0,57	1,42

(1) Expresada en microgramos por mililitro de líquido metabólico.

(2) Expresado en tanto por uno de producción de AIA, con respecto al control sin cetoglutarato.

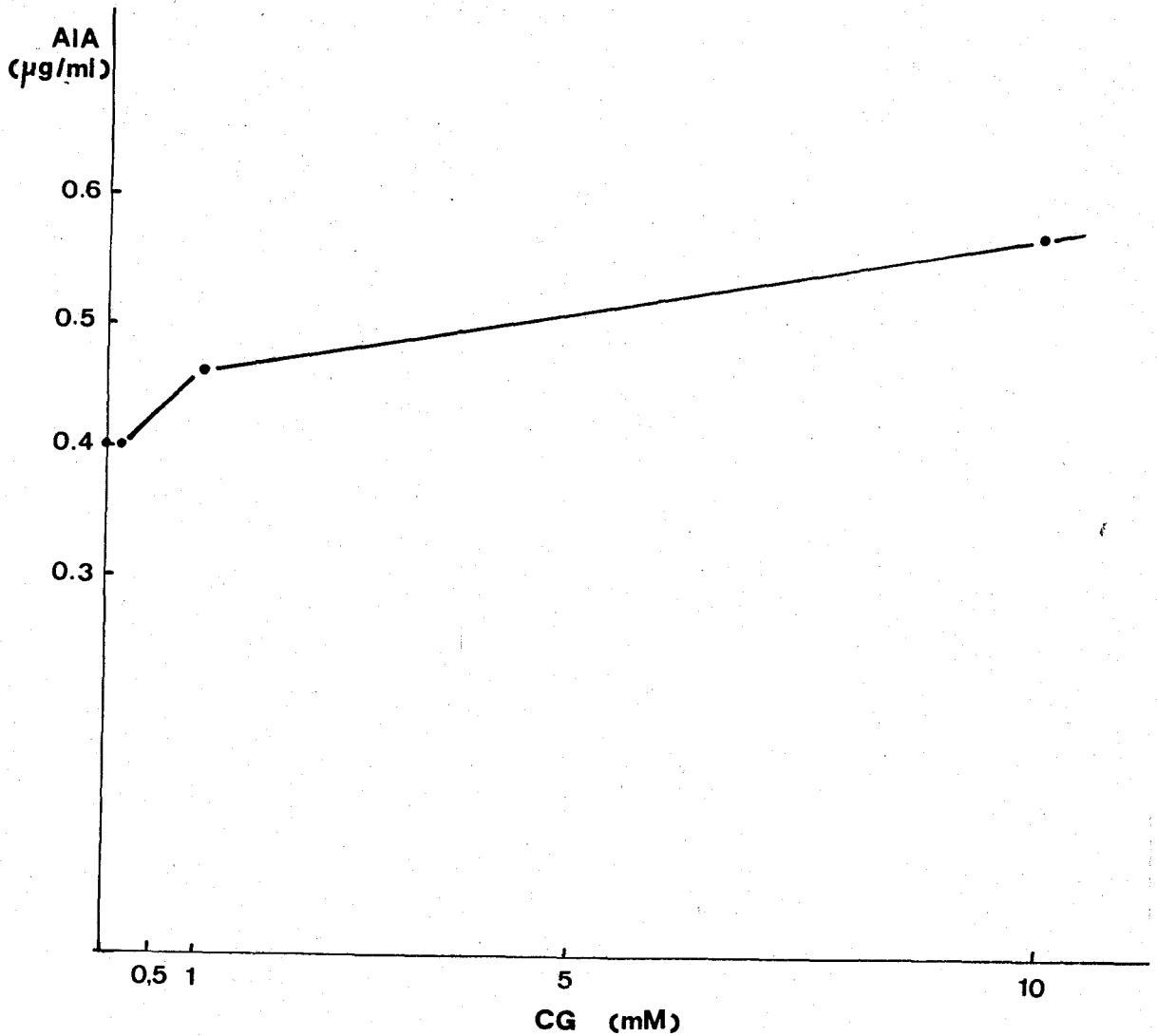


Figura 27.- Producción de AIA, a partir de triptófano, por células lavadas de Rhizobium lupini (RS.110), incubadas en agitación, en presencia de distintas concentraciones de ácido 2-cetoglutárico.

Tabla 40.- Producción de AIA (1), a partir de triptófano, por células lavadas de Rhizobium lupini (RS.110), incubadas en forma estática, en presencia de distintas concentraciones de ácido 2-cetoglutarico.

Cetoglutarato (mM)	Producción de AIA	Efecto (2)
0,00	0,46	1,00
0,10	1,25	2,71
1,00	5,59	12,15
10,00	9,00	19,56

(1) Expresada en microgramos por mililitro de líquido metabólico.

(2) Expresado en tanto por uno de producción de AIA, con respecto al control sin cetoglutarato.

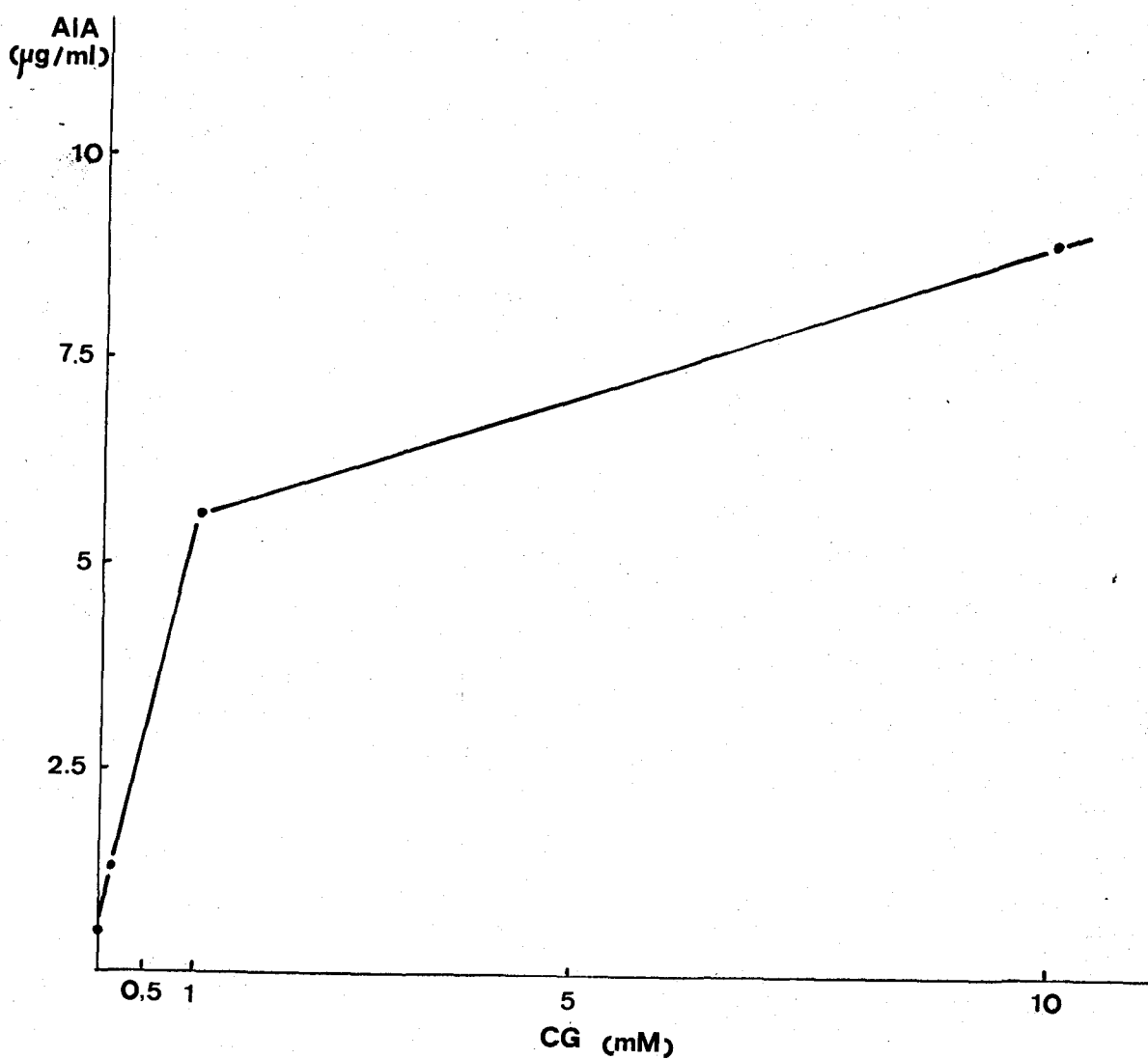


Figura 28.- Producción de AIA, a partir de triptófano, por células lavadas de Rhizobium lupini (RS.110), incubadas en forma estacionaria, en presencia de distintas concentraciones de ácido 2-cetoglutarico.

tintas procedencias en cada uno de los grupos. Estos experimentos se realizaron incubando las suspensiones de células estáticamente y en agitación.

Los resultados se exponen en las tablas 41 a 49, en las que se agrupan los datos de forma que se observen lo más claramente posible las diferencias de comportamiento entre las tres especies y se favorezca un posterior tratamiento estadístico, el cual estará incluido dentro de la discusión del presente trabajo.

### 3.2.15.2.- Efecto de la preincubación de las células en ácido 2-cetoglutarico, sobre la producción de AIA.-

Este tipo de experimentos estaba encaminado a conseguir unas diferencias mayores de comportamiento entre las distintas especies de Rhizobium ensayadas.

Con este objetivo se sometieron a preincubación células de Rhizobium lupini y de Rhizobium meliloti. Las preincubaciones de las células se realizaron en agitación y a 28° C, en una solución 1 mM de ácido 2-cetoglutarico en el mismo tampón. Por otra parte, otra muestra de células fué sometida a preincubación en tampón, carente de cetoglutarato. Transcurridos 30 minutos o 3 horas de preincubación, las células fueron lavadas dos veces en tampón fosfato y luego resuspendidas en una solución de triptófano en el tampón, hasta que al-

Tabla 41.- Producción de AIA a partir de triptófano, por células lavadas de cinco estirpes de Rhizobium trifolii, incubadas en forma estacionaria, en presencia y en ausencia de cetoglutarato (1 mM).

Estirpe	Producción de AIA(1)		Efecto (2)
	-cetoglutarato	+cetoglutarato	
RS.90	1,48	4,06	2,74
RS.91	3,11	5,45	1,75
RS.55	3,98	5,79	1,60
RS.169	2,59	6,46	2,40
RS.170	0,95	5,36	5,50

(1) Expresada en microgramos por mililitro de líquido metabólico.

(2) Expresado en tanto por uno de producción con respecto al control sin cetoglutarato.



Tabla 42.- Producción de AIA (1), a partir de triptófano, por células lavadas de cinco estirpes de Rhizobium trifolii, incubadas en agitación, en presencia y en ausencia de cetoglutarato (1 mM).

Estirpe	Producción de AIA		Efecto (2)
	-cetoglutarato	↑cetoglutarato	
RS.90	1,70	5,66	3,32
RS.91	3,75	6,60	1,83
RS.55	0,52	1,61	3,09
RS.169	1,90	4,41	2,32
RS.170	0,52	4,38	8,40

(1) Expresada en microgramos por mililitro de líquido metabólico.

(2) Expresado en tanto por uno de producción de AIA, con respecto al control sin cetoglutarato.

Tabla 43.- Producción de AIA (1), a partir de triptófano, por células lavadas de cinco estirpes de Rhizobium meliloti, incubadas en forma estacionaria, en presencia y en ausencia de ácido 2-cetoglutarico (1 mM).

Estirpe	Producción de AIA		Efecto (2)
	-cetoglutarato	+cetoglutarato	
RS. 94	3,31	4,53	1,36
RS. 96	3,35	5,07	1,51
RS. 138	5,30	5,94	1,12
RS. 168	1,77	2,39	1,35
RS. 171	1,84	2,50	1,35

(1) Expresada en microgramos por mililitro de líquido metabólico.

(2) Expresado en tanto por uno de producción de AIA, con respecto al control sin cetoglutarato.



Tabla 44.- Producción de AIA (1), a partir de triptófano, por células lavadas de cinco estirpes de Rhizobium meliloti, incubadas en agitación, en presencia y en ausencia de cetoglutarato (1 mM).

Estirpe	Producción de AIA		Efecto (2)
	-cetoglutarato	†cetoglutarato	
RS.94	4,00	4,24	1,06
RS.96	3,92	4,04	1,03
RS.138	3,34	3,14	0,94
RS.168	0,89	0,97	1,09
RS.171	0,63	0,75	1,19

(1) Expresada en microgramos por mililitro de líquido metabólico.

(2) Expresado en tanto por uno de producción de AIA, con respecto al control sin cetoglutarato.

Tabla 45.- Producción de AIA (1), a partir del triptófano, por células lavadas de tres estirpes de Rhizobium lupini, incubadas en forma estacionaria, en presencia y en ausencia de cetoglutarato (1 mM).

Estirpe	Producción de AIA		Efecto (2)
	-cetoglutarato	↑cetoglutarato	
RS.100	0,75	9,08	12,11
RS.110	0,46	5,59	12,15
RS.108	0,63	3,77	5,99

(1) Expresada en microgramos por mililitro de líquido metabólico.

(2) Expresado en tanto por uno de producción de AIA, con respecto al control sin cetoglutarato.

Tabla 46.- Producción de AIA (1), a partir de triptófano, por células lavadas de tres estirpes de Rhizobium lupini, incubadas en agitación, en presencia y en ausencia de cetoglutarato (1 mM).

Estirpe	Producción de AIA		Efecto (2)
	-cetoglutarato	+cetoglutarato	
RS.100	0,95	0,55	0,58
RS:110	0,40	0,46	1,15
RS.108	0,63	3,63	5,76

(1) Expresada en microgramos por mililitro de líquido metabólico.

(2) Expresado en tanto por uno de producción de AIA, con respecto al control sin cetoglutarato.

Tabla 47.- Indices Ag/Est de cinco estirpes de Rhizobium trifolii frente al ácido 2-cetoglutárico. (1 mM).

Estirpe	Ag/Est (1)
RS.90	1,21
RS.91	1,046
RS.55	1,931
RS.169	0,967
RS.170	1,527

(1) Expresado como el cociente entre los tanto por uno en agitación y estacionario, de producción de AIA en relación a los respectivos controles sin cetoglutarato.

Tabla 48.- Indices AG/EST de cinco estirpes de Rhizobium meliloti frente al ácido 2-cetoglutarico (1 mM).

Estirpe	AG/EST (1)
RS.94	0,779
RS.96	0,682
RS.138	0,839
RS.168	0,807
RS.171	0,881

(1) Expresado como el cociente entre los tantos por uno, en agitación y estacionario, de la producción de AIA en relación a los respectivos controles sin cetoglutarato.

Tabla 49.- Indices Ag/Est de tres estirpes de Rhizobium lupini frente al ácido 2-cetoglutárico (1 mM).

Estirpe	Ag/Est (1)
RS.100	0,048
RS.110	0,095
RS.108	0,962

(1) Expresado como el cociente entre los tantos por uno, en agitación y estacionario, de la producción de AIA en relación a los respectivos controles sin cetoglutarato.

canzaban una densidad óptica de 0,5 medida a una longitud de onda de 600 nm. Los cultivos se incubaron a 28° C, durante 48 horas, en agitación y en forma estacionaria.

Los resultados obtenidos se exponen en las tablas 50, 51 y 52 y de ellas se puede deducir que la preincubación no es un buen método para estudiar la influencia de este cetoácido sobre la producción de AIA por Rhizobium. Solamente para Rhizobium meliloti se observó algún efecto significativo, pero en cualquier caso no difería mucho del obtenido para las mismas células que no habían sido sometidas al proceso de preincubación.

Tabla 50.- Producción de AIA (1) por células lavadas de Rhizobium lupini (RS.100), incubadas previamente en ácido 2-cetoglutarico o en tampón, durante 30 minutos.

Incubación	Preincubación	AIA	Efecto (2)
Estacionaria	Tampón	1,88	1,02
Estacionaria	Cetoglutarato	1,90	
Agitación	Tampón	1,76	1,15
Agitación	Cetoglutarato	2,03	

(1) Expresada en microgramos por mililitro de líquido metabólico.

(2) Expresado en tanto por uno de producción de las células preincubadas en cetoglutarato en relación a las células preincubadas en tampón.



Tabla 51.- Producción de AIA (1), a partir de triptófano, por células lavadas de Rhizobium lupini (RS.100), incubadas previamente en ácido 2-cetoglutárico o en tampón durante tres horas.

Incubación	Preincubación	AIA	Efecto (2)
Estacionaria	Tampón	0,87	1,09
Estacionaria	Cetoglutarato	0,95	
Agitación	Tampón	0,53	1,03
Agitación	Cetoglutarato	0,55	

(1) Expresada en microgramos por mililitro de líquido metabólico.

(2) Expresado en tanto por uno de producción de las células preincubadas en cetoglutarato en relación a las células preincubadas en tampón.

Tabla 52.- Producción de AIA (1), a partir de triptófano, por células lavadas de Rhizobium meliloti (RS.94), incubadas previamente en ácido 2-cetoglutarico o en tampón durante 3 horas.

Incubación	Preincubación	AIA	Efecto (2),
Estacionaria	Tampón	3,78	1,53
Estacionaria	Cetoglutarato	5,77	
Agitación	Tampón	3,81	1,13
Agitación	Cetoglutarato	4,33	

(1) Expresada en microgramos por mililitro de líquido metabólico.

(2) Expresado en tanto por uno de producción de AIA de las células preincubadas en cetoglutarato en relación con la de las células preincubadas en tampón.

#### 4. DISCUSSION

#### 4. Discusión.-

Como ya se ha expuesto en los antecedentes bibliográficos, uno de los aspectos más interesantes del estudio de la asociación simbiótica Rhizobium-leguminosa es la fase de preinfección, en la cual se han de dar una serie de eventos, antes de que el rizobio pueda penetrar en los tejidos radicales de la planta hospedadora.

Según Kefford (29), en la rizosfera existe AIA, el cual desempeña un papel importante en el proceso de la preinfección, especialmente en lo que se refiere a la curvatura de los pelos radicales. Esta hormona vegetal no es excretada por la planta (29), sino que es producida por los rizobios a partir del triptófano excretado por las raíces. En efecto, diversos autores y especialmente Rigaud (46, 48 y 53) han demostrado la formación de dicho compuesto indólico, tanto en cultivos de Rhizobium como en suspensiones de células lavadas.

Como es sabido, las auxinas pueden provocar efectos muy diversos según su concentración, de tal forma que un efecto estimulador puede pasar a ser inhibidor con solo variar la concentración de la auxina. Por tanto, cabe suponer que la producción de AIA por Rhizobium debe estar sujeta a algún tipo de regulación, posiblemente por parte de la planta, a través de sus exudados radicales. Esta suposición fue la que motivó nuestro trabajo experimental, encaminado principalmente a demostrar en los exu-

dados radicales la presencia de sustancias que puedan mediar en este efecto regulador.

Dado que nuestra línea principal de trabajo iba a consistir en ensayar el efecto de exudados radicales sobre la producción de AIA por Rhizobium, a partir de triptófano, nos pareció que para poder valorar de un modo más exacto los posibles efectos, era más conveniente trabajar con suspensiones de células lavadas que con cultivos celulares.

Ya en experimentos preliminares comprobamos que los exudados de Trifolium alexandrinum, Medicago sativa y Lupinus angustifolium tenían un efecto inhibitor sobre la producción de AIA por células lavadas de Rhizobium trifolii, Rhizobium meliloti y Rhizobium lupini, respectivamente. Posteriormente, pensando que pudiera existir una especificidad de acción de los exudados, realizamos unos experimentos que se exponen en el apartado de resultados y se encuentran contenidos en las tablas (6, 7 y 8); de ellos sacamos como conclusión que, al menos en nuestras condiciones experimentales, no existen unas diferencias significativas entre los exudados específicos y no específicos en relación a una especie determinada de Rhizobium, pero parece ser específico para el género Rhizobium, ya que estos mismos exudados estimulan la producción de AIA por células lavadas de Agrobacterium tu-

mefaciens, Klebsiella aerógenes, Pseudomonas aeruginosa y Micrococcus flavus. Por supuesto, habría que ensayar más bacterias para poder generalizar esta conclusión.

La inespecificidad del efecto dentro del género Rhizobium nos permitió elegir para experimentos ulteriores el sistema Rhizobium-leguminosa más favorable para nuestro estudio y que consistía en Rhizobium meliloti (RS.94), que es de crecimiento rápido y buena productora de AIA, y Trifolium alexandrinum, cuyas semillas son de tamaño muy apropiado, fáciles de obtener y con un porcentaje de germinación de más del 90%.

Algunas de las condiciones de incubación utilizadas por nosotros fueron tomadas de la bibliografía, tal es el caso del pH, siendo el de 7,5 el escogido, según recomienda Rigaud (47); temperatura de 28° C y agitación, factores que también son considerados por Rigaud (47) como óptimos para estudiar la producción de AIA con suspensiones de células lavadas de Rhizobium, y otras, después de los correspondientes tanteos, fueron fijadas por nosotros, como la concentración de células y el tiempo de incubación.

Teniendo en cuenta que los resultados de nuestros experimentos se basan principalmente en la comparación de las cantidades de AIA producido por las células lavadas bajo diferentes condiciones, consideramos muy impor-

tante la elección del método de valoración de esta sustancia así como el análisis de las cifras obtenidas, en orden a discernir si las posibles diferencias son significativas o no. La valoración del AIA existente en los líquidos metabólicos, una vez que había sido extraído con éter etílico, según recomienda Rigaud, se realizó aplicando la técnica puesta a punto en nuestro laboratorio por Gutiérrez Navarro (25) y que soslaya eficazmente la interferencia del AIL con el AIA en la reacción colorimétrica de Salkowski. Ello supone una gran ventaja, ya que al no exigir la separación cromatográfica del AIA y el AIL disminuye considerablemente los errores debidos a las pérdidas, que de otro modo pueden alcanzar el 20 o 25% (Rigaud, comunicación personal).

Los primeros experimentos se realizaron por triplicado y algunos por cuadruplicado. A pesar de ello, el trabajo era laborioso debido al gran volumen de suspensión de células que se necesita incubar (100 ml). Por ello, en algunos casos, los experimentos planteados no se podían llevar a cabo, al ser necesario un número muy elevado de matraces y existir en muchos casos limitaciones insalvables en nuestro laboratorio. En consecuencia, pensamos en la posibilidad de realizar los experimentos por duplicado, para lo cual hicimos un estudio estadístico de los datos obtenidos hasta ese momento, en orden a determinar el in-

tervalo de confianza para los porcentajes de inhibición o activación de la producción de AIA que tendríamos a partir de ese momento y por extensión en los experimentos anteriores, si realizabamos los experimentos por duplicado. De esta forma se obtuvieron 54 datos, que correspondían a porcentajes de diferencias (con respecto al número menor) entre las medias de todas las parejas de matraces que habían sido preparados e incubados en condiciones idénticas. Así, se obtuvieron 54 valores porcentuales, que se encuentran agrupados en la tabla 53 y que se representan gráficamente mediante un histograma de frecuencias en la figura 29. El valor medio de estos errores es 1,65%. Como se observa en los datos expuestos en dicha tabla, de los 54 casos observados no hay ningún valor que sobrepase el 10% y solamente dos valores sobrepasan el 5%, de lo cual podemos deducir que para la discusión de los datos expuestos en este trabajo, se pueden considerar como diferencias significativas los valores de activación o inhibición que sobrepasen el 10% con respecto a los controles, con un coeficiente de seguridad del 99%, mientras que aquellos valores que sobrepasen el 5%, pero no el 10%, se pueden considerar como significativos pero con un coeficiente de seguridad del 95%.



Tabla 53.- Frecuencias de los valores obtenidos para los porcentajes de diferencias entre las medias de parejas de matraces que habían sido incubados en idénticas condiciones.-

f	% de diferencia
10	0,0
6	0,2
1	0,4
1	0,7
2	0,8
1	0,9
2	1,2
3	1,3
4	1,4
5	1,6
4	1,8
3	1,9
2	2,4
3	2,6
2	3,0
3	4,8
1	8,7
1	9,7

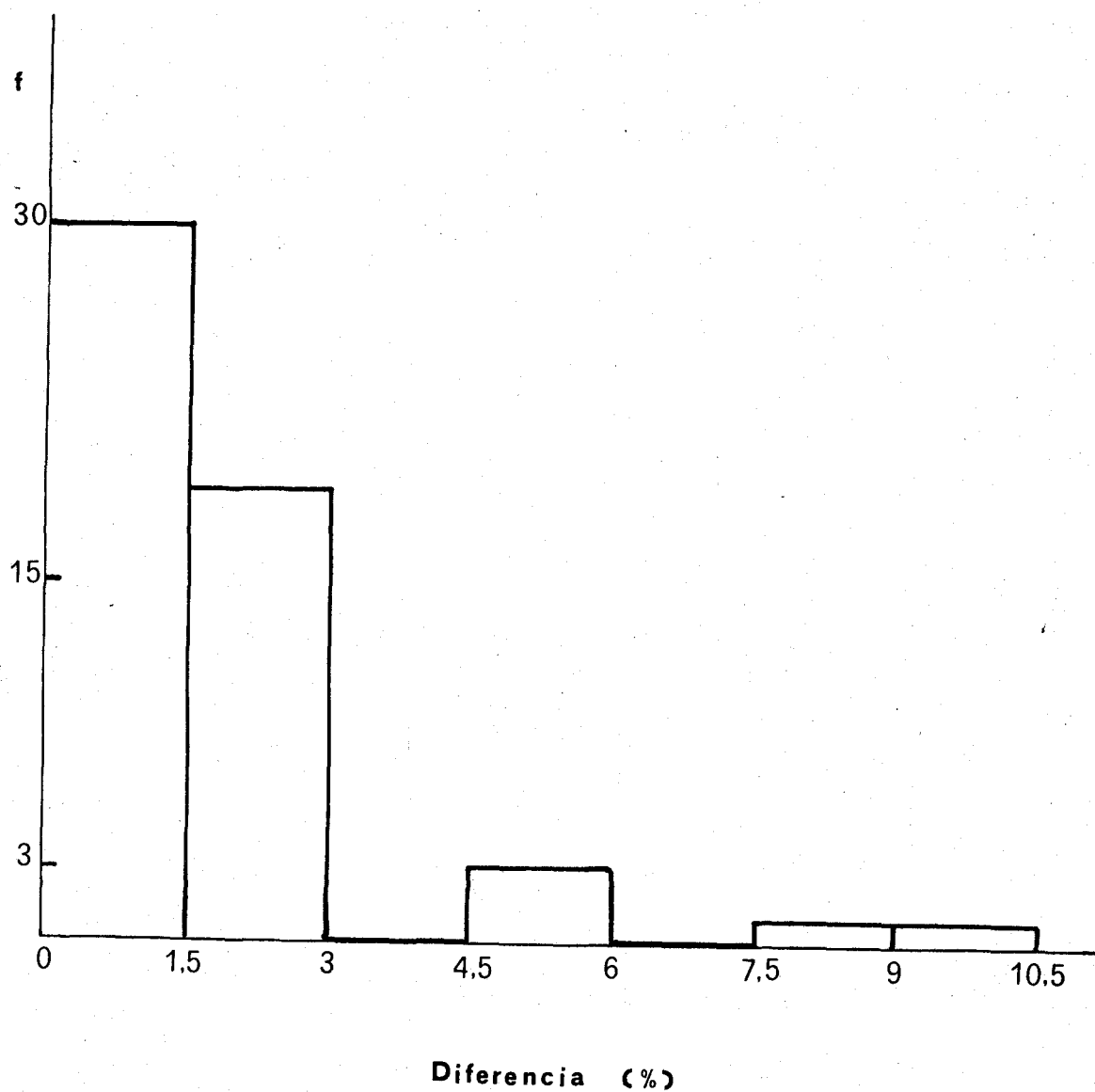


Figura 29.- Histograma de frecuencias de los porcentajes de variación entre las producciones medias de AIA correspondientes a parejas de matraces, incubados en idénticas condiciones.

Entrando en la discusión de los resultados obtenidos caben destacar los siguientes hechos:

Según hemos comprobado repetidamente a lo largo de nuestro trabajo experimental, existe un efecto de los exudados radicales de leguminosas sobre la producción de AIA por células lavadas de Rhizobium. El efecto global que manifiestan dichos exudados es negativo, es decir, que se traduce en una disminución de la velocidad de producción de AIA, como se observa en las figuras 3, 4 y 5 y no de la cantidad final que se obtiene si se mantienen las células incubadas durante un tiempo prolongado, que en nuestros experimentos preliminares fue de 140 horas.

Por otra parte, también se ha puesto de manifiesto que el efecto inhibitor que provoca el exudado radical depende de la concentración de células sobre las que actúa; esto puede indicar que dicho efecto se produce sobre estructuras o actividades celulares y no sobre los productos metabólicos; de tal forma que como se observa en la tabla 5, cuando la relación cantidad de exudado/nº de células es mayor el efecto es más pronunciado. Estos resultados encuentran también apoyo en los obtenidos cuando se ensayan distintas concentraciones de exudado, manteniendo fija la concentración de células, como se observa en las tablas 19 y 20 y se representan gráficamente en las

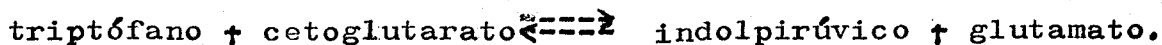
figuras 12 y 13; en ellos se aprecia claramente que al aumentar la concentración de exudado o lo que es lo mismo, al aumentar la relación exudado/nº de células, el efecto sobre la producción de AIA es más pronunciado.

Si se observa la figura 8, se aprecia que el efecto inhibitor de los exudados recogidos a los dos y cuatro días (55%) es considerablemente mayor que el de los recogidos a los siete y diez días (30%). La explicación más sencilla de estos resultados sería postular la existencia de AIA oxidasa en el exudado inicial, que destruyera parte del AIA producido, pero no hemos podido confirmar esta idea, como se demuestra en los experimentos cuyos resultados se representan en la tabla 15; en ellos se observa, que cuando se incuban exudados radicales a pH:6, que según hemos encontrado en la bibliografía (57) es el óptimo para dicha degradación, y en presencia de una concentración conocida de AIA, no se observa una disminución de dicho compuesto indólico. Otra posibilidad consistía en que en los exudados radicales tempranos existieran sustancias que activaran la degradación del AIA producido por parte de las células de Rhizobium, es decir que la actividad AIA oxidasa no estuviera en los exudados sino en las propias células rizobianas y que en dichos exudados existieran cofactores que activaran dicho enzima, por lo

que se observaría una mayor disminución de la producción de AIA, que en este caso no consistiría en una disminución de la producción de AIA, sino en un aumento de la degradación del AIA producido. Sin embargo, de los experimentos, cuyos resultados se exponen en la tabla 16 se deduce que no existe una disminución significativa de la concentración inicial de AIA; las muestras se tomaron a las 24 horas y a las 48 horas de incubación y solamente para las muestras recogidas a las 48 horas se observó una disminución del 10%, que puede considerarse como significativa, pero con un coeficiente de seguridad del 95%, por lo que no se puede asegurar categóricamente que exista tal degradación. Por otra parte, de los resultados representados en la figura 9 se deduce que en todas las fases de desarrollo de la plántula se da un efecto inhibitor sobre la producción de AIA, lo cual sugiere que la acción reguladora del exudado radical debe verificarse a través de varias sustancias, unas que son activadoras y otras que son inhibidoras de la producción de AIA.

Las sustancias que presentan una acción inhibitora sobre la producción de AIA y que hemos encontrado en los exudados radicales de distintos tiempos de incubación son aminoácidos, principalmente ácido glutámico, alanina y ácido aspártico, comprobándose posteriormente sus acciones inhibitoras sobre la producción de AIA por Rhizobium (ta-

bla 17). De estos aminoácidos el más activo en cuanto a su capacidad de inhibición de la producción de AIA es el ácido glutámico, que por otra parte es uno de los más abundantes en los exudados radicales. El papel fisiológico que pueden ejercer estos aminoácidos puede ser la de competir con el triptófano, aunque en el caso del ácido glutámico puede ser debido a su participación en la reacción de transaminación mediante la cual se realiza la conversión de triptófano a ácido indol pirúvico, por medio del cetoglutarato, que se transforma a su vez en ácido glutámico, de acuerdo con la siguiente reacción=



Esta reacción es el primer paso de la ruta de biogénesis del AIA a partir del triptófano (66); al aumentar la concentración de ácido glutámico, que es uno de los productos de esta reacción, se podría desplazar ésta hacia la izquierda y por tanto provocaría una disminución de la producción de AIA.

Ahora bien, aunque el efecto global del exudado es negativo, no solamente existen sustancias inhibidoras de la producción de AIA sino que también existen sustancias activadoras, como queda de manifiesto en los resultados expuestos en la tabla 14, donde se observa que cuando se someten los exudados radicales de siete días a un choque térmico, su actividad inhibidora sobre la producción de

ATA aumenta, lo cual solamente puede indicar que en dichos exudados existen sustancias que favorecen la producción de ATA y que algunas de ellas desaparecen o disminuyen cuando se someten los exudados a un choque térmico y que pueden explicar también la disminución que se observa en el efecto inhibitor de los exudados recogidos a partir de los cuatro días.

Posteriormente encontramos en los exudados radicales NAD, tiamina y piridoxina, sustancias que actúan como cofactores de distintos enzimas y que pueden intervenir en la ruta de formación de ATA a partir de triptófano. Estos compuestos presentan un efecto activador sobre la producción de ATA por Rhizobium (tablas 22, 25 y 27).

La concentración de NAD en los exudados radicales aumenta con el tiempo, pero la piridoxina y la tiamina se encuentran mucho más concentradas en los exudados tempranos y sus concentraciones disminuyen en los exudados recogidos después de los dos días de incubación de las semillas.

El efecto activador manifestado por el piridoxal fosfato ya fue mencionado en un trabajo de Rigaud (47) y también por Lantican (32) en plantas, y puede deberse a su actuación como coenzima de la triptófano transaminasa (66), que cataliza el paso de triptófano a ácido indol pirúvico, siendo ésta la primera reacción que se lleva a cabo

en la ruta de biogénesis del AIA.

Por otra parte, el efecto de la tiamina pirofosfato sobre la producción de AIA por Rhizobium puede deberse a su participación como coenzima de la indolpirúvico descarboxilasa, enzima que cataliza el paso de ácido indolpirúvico a indolacetaldehído (35), que es un paso intermedio de la ruta de biogénesis del AIA a partir de triptófano.

El efecto que presenta el NAD sobre la producción de AIA por Rhizobium y del que no hemos encontrado antecedentes bibliográficos puede ser explicado por su posible actuación como coenzima de una deshidrogenasa (48), que realice la conversión de indolacetaldehído a AIA, último paso de dicha ruta metabólica.

El efecto estimulador que presentan estos coenzimas sobre la producción de AIA por Rhizobium sólo se manifiesta claramente cuando se introducen separadamente en el medio de incubación; por el contrario, según se muestra en los resultados expuestos en la tabla 28, cuando se incluyen los tres juntos en el mismo medio de incubación se observa un efecto claramente inhibitor sobre la producción de AIA. Asimismo, cuando el piridoxal fosfato está presente junto con el NAD o la tiamina pirofosfato, tampoco se observa un efecto activante e, incluso, cuando se encuentran juntos el piridoxal fosfato y el NAD se observa un



efecto inhibitor significativo, semejante al que se manifiesta cuando se encuentran los tres juntos en el mismo medio de incubación. Este efecto puede deberse a que se favorezca la ulterior degradación del AIA producido por dichas células.

Por otra parte, este comportamiento diferente que presentan estas coenzimas cuando se encuentran juntos y cuando se encuentran separados, puede explicar el diferente efecto inhibitor de los exudados radicales recogidos a distintos tiempos. Así, el mayor efecto inhibitor que manifiestan los exudados radicales de menos de cuatro días, puede ser debido, al menos en parte, a la coexistencia de estos tres coenzimas durante este tiempo en dichos exudados. Además, cabe pensar que durante los dos primeros días se formen también otras sustancias inhibitoras, quizás de naturaleza fenólica, ya que durante los dos primeros días sólo se encuentran presentes el piridoxal fosfato y la tiamina pirofosfato. Asimismo, a partir de los cuatro días se observa una disminución de la actividad inhibitora de los exudados, que puede explicarse por la desaparición gradual del piridoxal fosfato y de la tiamina pirofosfato y por el aumento de la concentración de NAD en dichos exudados, lo cual se traduce en un aumento de la producción de AIA por Rhizobium.

También, en los resultados expuestos en la tabla 13 se observa que cuando se somete el exudado radical de dos días a un choque térmico, se produce una disminución de su actividad inhibidora sobre la producción de AIA; este fenómeno, como ya dijimos anteriormente, no lo hemos podido explicar, ya que no hemos encontrado cuáles son esas sustancias termolábiles de naturaleza inhibidora, aunque es de suponer que sea algún compuesto fenólico que se produzca durante la fase de germinación. También se observó una alteración del exudado de siete días (tabla 14), cuando se calentaba previamente, pero en este caso se provocaba un aumento de su actividad inhibidora, lo cual nos hizo pensar en un principio en la posibilidad de que en estos exudados tardíos existiera algún compuesto activante de la producción de AIA y que al someter el exudado a un choque térmico desaparecía, dejando manifestar claramente el efecto inhibidor de otras sustancias termoestables inhibidoras, como pueden ser los aminoácidos. Posteriormente, observamos que la tiamina pirofosfato (tabla 24) era de naturaleza termolábil, principalmente cuando su concentración era baja (nanogramos por mililitro), como se observa en los datos expuestos en dicha tabla. En este caso, cuando los exudados de siete días se sometían a un choque térmico perdían tiamina pirofosfato y se podía de alguna manera alterar la relación existente entre los coenzimas y .

verse aumentada la acción inhibidora. A pesar de ello, cabe la posibilidad de que este fenómeno sea debido a otra sustancia activadora que no hemos identificado.

Por otra parte, se realizaron una serie de experimentos para ensayar la acción del ácido 2-cetoglutárico sobre la producción de AIA por Rhizobium; este cetoácido podría ser un integrante de los exudados radicales, si bien no hemos podido investigar su presencia ni hemos encontrado referencias en la bibliografía acerca de su existencia en los exudados. A pesar de ello, Rigaud (47) comprobó que este compuesto presenta una actividad estimuladora sobre la producción de AIA por Rhizobium. Esta influencia se debe a su intervención en la desaminación del triptófano para dar ácido indol pirúvico, que como ya hemos dicho anteriormente es el primer paso de la ruta de síntesis del AIA a partir del triptófano. Nosotros, teniendo en cuenta los trabajos de Rigaud y los de Werner y Berghäuser (70), pensamos en la posibilidad de que el cetoglutarato, que podría encontrarse en el exudado radical, pudiera ser un agente regulador de la producción de AIA por Rhizobium, al ser captado con distinta intensidad por las diferentes especies de Rhizobium y provocar, por tanto, acciones distintas sobre la producción global de AIA por dichas bacterias en la rizosfera.



En los resultados obtenidos por nosotros se observa que el ácido cetoglutárico aumenta la producción de AIA por Rhizobium, excepto en algunos casos cuando se realiza la incubación en agitación, en los que para algunas concentraciones de cetoglutarato se observa una disminución de la producción de AIA (figuras 19, 21, 25). Cuando la incubación de las células se realizaba en forma estacionaria, en todos los casos se observa, o bien aumento de la producción de AIA por las células incubadas en presencia de ácido 2-cetoglutárico o, en algunos casos, principalmente para estirpes pertenecientes a Rhizobium meliloti (figuras 20 y 26), una falta de acción de esta sustancia sobre la producción de AIA, lo cual puede indicar que quizás Rhizobium meliloti sea, de las tres especies ensayadas, la que presenta una menor capacidad de captación de este cetoácido. También se observó que estas variaciones provocadas por el cetoglutarato sobre la producción de AIA no eran las mismas para las tres especies ensayadas, Rhizobium meliloti, Rhizobium trifolii y Rhizobium lupini. Tratando de generalizar estos resultados probamos la influencia del ácido 2-cetoglutárico sobre la producción de AIA por varias estirpes de cada una de las tres especies mencionadas; estos resultados se realizaron de forma estacionaria y también en agitación.

Los datos que se obtuvieron se agrupan en las tablas 47, 48 y 49, en las cuales se toma como índice la relación existente entre los efectos provocados por el cetoglutarato en agitación y en forma estacionaria sobre la producción de AIA por cada una de las estirpes ensayadas; estos efectos se expresan como una relación de porcentajes de producción con respecto a los controles, entre las suspensiones incubadas en agitación y las estacionarias, cuando se incuban las células lavadas de una estirpe determinada en presencia y en ausencia de una concentración 1 mM de ácido 2-cetoglutárico. Estos índices Ag/Est se agrupan para las tres especies obteniéndose de esta forma tres poblaciones de datos, correspondientes a cada una de las especies ensayadas.

Un estudio comparativo de las medias de estas poblaciones aplicando la  $t$  de student permite averiguar si existen diferencias significativas entre estas tres especies en cuanto a la producción de AIA en presencia de ácido 2-cetoglutárico. Así, en la tabla 54 se expresan los valores de las varianzas y de las medias para las tres poblaciones de índices Ag/Est representadas en las tablas 47, 48 y 49. Si comparamos las medias de Rhizobium trifolii y Rhizobium meliloti encontramos que el valor de  $t$  es 2,989, el cual es superior al límite de  $T$  para 8 grados de libertad ( $T_8 = 2,31$ ); ello indica que se puede considerar, con un coeficiente de seguridad del 95%, que existen diferencias sig-

Tabla 54.- Valores de las varianzas y de las medias para cada conjunto de índices Ag/Est en cada una de las tres especies= Rhizobium meliloti, Rhizobium trifolii y Rhizobium lupini.

Especie	Varianza	Media
<u>Rh. trifolii</u>	0,1253	1,336
<u>Rh. meliloti</u>	0,0044	0,7976
<u>Rh. lupini</u>	0,00055	0,0715

nificativas entre Rhizobium trifolii y Rhizobium meliloti en cuanto al valor de dicho índice Ag/Est, o sea, en cuanto a la relación entre los porcentajes de producción de AIA con respecto a los controles sin cetoglutarato, cuando se incuban en agitación y estacionarias células lavadas en presencia y en ausencia de dicho cetoácido.

En cuanto a Rhizobium lupini, de las tres estirpes ensayadas una de ellas presentaba un comportamiento semejante a Rhizobium trifolii, con un índice Ag/Est= 0,962, lo cual concuerda con lo indicado por Abdel-Ghaffar (1) y que expusimos en los antecedentes bibliográficos, referente a que determinadas estirpes de Rhizobium lupini deberían ser incluidas en la especie Rhizobium leguminosarum de Graham, donde también quedarían incluidas todas las estirpes de Rhizobium trifolii. Por ello a la hora de hacer las comparaciones entre las medias de Rh. meliloti o Rh. trifolii con respecto a Rh. lupini, solamente consideramos las otras dos estirpes de esta última, que presentan un comportamiento diferente. Así, al comparar Rhizobium trifolii y Rhizobium lupini nos da una  $t=4,266$ , que es sensiblemente mayor que el valor límite de T para cinco grados de libertad ( $T_5=4,03$  para el 99% de coeficiente de seguridad y  $T_5=2,57$  para el 95% de coeficiente de seguridad). Por tanto, existen diferencias significativas entre los índices Ag/Est de Rhizobium trifolii y Rhizobium lupini, incluso con un coeficiente de seguridad del 99%.

Al comparar los índices Ag/Est de Rhizobium meliloti y Rhizobium lupini aparece una  $t=12,64$ , la cual también es muy superior a los valores de T para cinco grados de libertad, por lo cual se puede concluir que existen diferencias significativas entre Rhizobium meliloti y Rhizobium lupini, con un coeficiente de seguridad del 99%.

A pesar de que en el efecto global de los exudados radiculares de distintas leguminosas, no encontramos diferencias específicas entre las distintas especies de Rhizobium ensayadas, los resultados que acabamos de discutir sobre la acción del ácido 2-cetoglutarico son ciertamente prometedoras en cuanto a la posibilidad de encontrar nuevos criterios taxonómicos que permitan la identificación de las especies de Rhizobium, sin recurrir a las pruebas de nodulación cruzada.

Finalmente, los resultados referentes a los efectos de distintas sustancias existentes en los exudados radiculares, sobre la producción de AIA por Rhizobium, demuestran la existencia de interacciones leguminosa-Rhizobium que apoyan la idea de que la planta puede regular la concentración de AIA existente en la rizosfera. Asimismo, estos resultados abren la posibilidad de emprender nuevas investigaciones a nivel molecular de los mecanismos bioquímicos y genéticos de la preinfección.



## 5. CONCLUSIONES

1.- Los exudados radicales de leguminosas tienen un efecto inhibitor sobre la producción de AIA, a partir de triptófano, por Rhizobium. Este efecto se traduce en una disminución de la velocidad de producción de dicha auxina.

2.- Los exudados radicales de Trifolium alexandrinum tienen un efecto estimulador sobre la producción de AIA por células lavadas de Agrobacterium tumefaciens, Klebsiella aerogenes, Pseudomonas aeruginosa y Micrococcus flavus.

3.- El efecto inhibitor de los exudados radicales recogidos durante los cuatro primeros días de incubación es considerablemente mayor que el de los recogidos entre los cuatro y diez días de incubación.

4.- Los exudados radicales de Trifolium alexandrinum no presentan actividad AIA oxidasa que pueda explicar la disminución del AIA producido a partir de triptófano por células lavadas de Rhizobium, incubadas en presencia de dichos exudados.

5.- Las células lavadas de Rhizobium meliloti (RS.94) no degradan el AIA. Sin embargo, cuando estas mismas células

se incuban en presencia de exudados radicales de dos días, se observa una degradación del AIA, lo que indica que en estos exudados existen sustancias que activan la degradación del AIA por Rhizobium.

6.- En los exudados radicales de Trifolium alexandrinum de dos, cuatro, siete y diez días de edad, existen ácido glutámico, ácido aspártico y alanina, los cuales presentan actividad inhibidora sobre la producción de AIA por células lavadas de Rhizobium meliloti, siendo el ácido glutámico el que presenta un efecto más pronunciado.

7.- En los exudados radicales de Trifolium alexandrinum de dos días no se detecta NAD, mientras que en los producidos a partir de los cuatro días existe NAD.

8.- El NAD presenta una acción estimuladora sobre la producción de AIA por células lavadas de Rhizobium meliloti.

9.- En los exudados radicales de Trifolium alexandrinum, principalmente en los de producción más temprana, existe tiamina.

10.- El pirofosfato de tiamina presenta una actividad estimuladora sobre la producción de AIA por células lavadas de Rhizobium meliloti.

11.- En los exudados radicales de Trifolium alexandrinum, principalmente en los que se producen en los primeros días de incubación, existe piridoxina.

12.- El fosfato de piridoxal presenta una actividad estimuladora sobre la producción de AIA por células lavadas de Rhizobium meliloti.

13.- Cuando el fosfato de piridoxal, el NAD y el pirofosfato de tiamina se encuentran juntos en el mismo medio de incubación provocan una disminución de la cantidad de AIA producida por las células lavadas de Rhizobium meliloti.

14.- El ácido 2-cetoglutarico estimula la producción de AIA por células lavadas de Rhizobium meliloti, Rhizobium trifolii y Rhizobium lupini, cuando las incubaciones se realizan en forma estacionaria.

15.- Cuando las incubaciones se realizan en agitación, el efecto sobre la producción de AIA, manifestado por el cetoglutarato, puede ser positivo o negativo, dependiendo de su concentración y de la estirpe de Rhizobium.

16.- La relación existente entre los efectos provocados en agitación y en forma estacionaria, por el ácido 2-ceto-

glutárico sobre la producción de AIA es diferente para las tres especies de Rhizobium ensayadas, representantes de los tres grupos taxonómicos propuestos por Graham.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- (1) ABDEL-GHAFFAR, A.S. and H.L. JENSEN: The Rhizobia of Lupinus densiflorus Benth., with some remarks on the clasification of root nodule bacteria. Arch. Mikrobiol., 54, 393 - 405 (1.966)
- (2) BAREA, J.M. y E. MONTOYA: Producción de hormonas vegetales por microorganismos. Anales Edaf. Agrobiol., 11-12, 1075 - 1096 (1.975)
- (3) BAREA, J.M., E. NAVARRO, A. PALOMARES and E. MONTOYA: A rapid microbiological assay method for auxins, gibberellic acid and kinetin using yeast. J. Appl. Bact., 37, 171 - 174 (1.973)
- (4) BERGERSEN, F.J.: The cytology of bacteroids from root nodules of subterranean clover (Trifolium subterraneum, L.). J. Gen. Microbiol., 13, 411 - 419 (1.955)
- (5) BERGERSEN, F.J. and M.J. BRIGGS: Studies on the bacterial component of Soybean root nodules: Cytology and organization in the host tissue. J. Gen. Microbiol., 19, 482 -490 (1.958)
- (6) BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY. 8th. Edition. The Willians and Wilkins Company. Baltimore. (1.974)
- (7) BONNIER, C.: Clasificación et spécificité de l'hôte dans le genre Rhizobium. Proc. 6th. Int. Congr. Microbiol., 6, 325 (1.953)

- (8) BONNIER, C.: Anatomie comparée des nodosités a Rhizobium et des tumeurs d'aspects nodulaire bactériologiquement steriles des racines de Medicago Sativa. Bull. Inst. Agron. Stat. Gembloux, 22, 167, (1.954)
- (9) BROWN, WALKER, N.: Indolyl -3- acetic acid formation by Azotobacter chroococcum. P. Soil, 32, 250 -253 (1.970)
- (10) DART, P.J. and F.V. MERCER: The legume rhizosphere. Arch. Mikrobiol., 47, 344 - 378 (1.964)
- (11) DART, P.J. and F.V. MERCER: Fine structure changes in the development of the nodules of Trifolium subterraneum, L. and Medicago tribuloides, Desr. Arch. Mikrobiol., 49, 209 - 235 (1.964)
- (12) DART, P.J. and F.V. MERCER: Development of the bacteroid in the root nodule of barrel medic (Medicago tribuloides, Desr.) and subterraneum clover (Trifolium subterraneum, L.) Arch. Mikrobiol., 46, 382 (1.963)
- (13) DE LEY, J., M. BERNAERTS, A. RASSEL and J. GUIMOT: Approach to an improved taxonomy of the genus Agrobacterium. J. Gen. Microbiol., 43, 7 - 17 (1966)
- (14) DE LEY, J. and A. RASSEL: DNA Base composition, flagellation and taxonomy of the genus Rhizobium. J. Gen. Microbiol., 41, 85 - 91 (1.965)



- (15) DOMMERGES, Y. et F. MANGENOT: Ecologie microbienne du sol. 595 - 634. Masson et cie. Editeurs. Paris. (1.970)
- (16) ELKAN, G.H.: Biochemical and genetical aspects of the taxonomy of Rhizobium japonicum. Plant Soil, special vol., 25 - 104 (1.971)
- (17) FLETCHER, R.A. and S. ZALIK: Quantitative spectrophotometric determination of Indolyl-3-acetic acid. Nature, 199, 903 - 904 (1.963)
- (18) GIBBINS, A.M. and K.F. GREGORY: Relatedness among Rhizobium and Agrobacterium species determined by three methods of nucleic acid hybridization. J. Bacteriol., 111, 129 - 141 (1.972)
- (19) GOLEBIOSWKA, J. and H. SYNIEWSKA: Studies on the development cycle of Rhizobium lupini in root nodule. Acta Microbiol. Pol., 11, 313 - 318 (1.962)
- (20) GOSTKOWSKA, K.: Effect of amino acids on symbiotical activity of Rhizobium. Acta Microbiol. Pol., 12, 158 - 162 (1.963)
- (21) GRAHAM, P.H.: Antigenic Affinities of the root-nodule bacteria of legumes. Antonie van Leeuwenhoek, 29, 281 - 291 (1.963)
- (22) GRAHAM, P.H.: The application of computer techniques to the taxonomy of the root-nodule bacteria of legumes. J. Gen. Microbiol., 35, 511 - 517 (1964)

- (23) GRAHAM, P.H. and C.A. PARKER: Diagnostic features in the characterisation of the root-nodule bacteria of legumes. *Plant Soil.*, 20, 383 - 395 (1.964)
- (24) GRUEN, H.E.: Auxins and fungi. *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 10, 405 - 440 (1.959)
- (25) GUTIERREZ NAVARRO, A.M.: Tesis doctoral. Universidad de Sevilla, (1.976)
- (26) HAARD, F.N., G. CHISM and N. NAGLE: A fluorimetric method for the kinetic assay of indole-3-acetic acid oxidase. *Anal. Biochem.*, 69, 627 (1.975)
- (27) HEBERLEIN, G.T., J. DE LEY and R. TIJTGAT: Deoxyribonucleic acid homology and taxonomy of Agrobacterium, Rhizobium and Chromobacterium. *J. Bacteriol.*, 94, 116 - 124 (1.967)
- (28) KAUNAT, H.: Bildung von indol-derivaten durch rhizosphärenspezifische Bakterien und Aktinomyceten. *Zentralblatt für bakteriologiem parasitenkunde, infectionskrankheiten.* 123, 501 - 515 (1.969)
- (29) KEFFORD, N.P., J. BROCKWELL and J.A. ZWAR: The symbiotic synthesis of auxin legume and nodule bacteria and its role in nodule development. *Aust. J. Biol. Sci.*, 43, 456 - 467 (1.960)
- (30) KNFGT, F, and J. BRUINSMA: A rapid, sensitive and accurate determination of indolyl-3-acetic acid. *Phytochemistry*, 12, 753 - 756 (1.973)

- (31) LANGE, R.T.: Nodule bacteria associated with the indigenous leguminosae of South-Western Australia. *J. Gen. Microbiol.*, 26, 351 - 359 (1.961)
- (32) LANTICAN, B.P. and R.M. MUIR: Isolation and properties of the enzyme system forming indoleacetic acid. *Plant Physiol.*, 42, 1158 -1160 (1.967)
- (33) LARSEN, P.: On the biogenesis of some indole compounds in Acetobacter xylinum. *Physiol. Plantarum*, 15, 552 - 565 (1.962)
- (34) LIBBERT, E. and H. RISCH: Interaction between plants and epiphytic bacteria regarding their auxin content. V. Isolation and identification of the AIA producing and destroying bacteria from pea plants. *Physiol. Plant*, 22, 51 - 58 (1.969)
- (35) LIBBERT, E. and R. SCHRODER: The role of indoleacetaldehyde in AIA production from tryptophan by plants and by their epiphytic bacteria. *Biologia Plantarum*, 12, 369 - 377 (1.970)
- (36) MEGIAS GUIJO, M : Tesina de licenciatura. Universidad de Sevilla, (1.975)
- (37) MOORE, T.C. and SHANER: Biosynthesis of indoleacetic acid from tryptophan-C<sup>14</sup> in cell-free extracts of pea shoot tips. *Plant Physiol.*, 42, 1.787 - 1.796 (1.967)
- (38) NORRIS, D.O.: Acid Production by Rhizobium: a unifying concept. *Plant Soil*, XXII, 143 - 166 (1.965)

- (39) NUTMAN, P.S.: The relation between nodule bacteria and the legume host in rhizosphere and in the process of infection. Ecology of Soil-Borne Plant Pathogens (K.F. Baker and W.C. Snyder, Ed.) University of California Berkeley. 1.965
- (40) NUTMAN, P.S.: Relation between root-hair infection by Rhizobium and nodulation in Trifolium and Vicia. Proc. Roy. Soc. London B, 156, 122 - 137 (1.962)
- (40 a) NUTMAN, P.S.: Study frameworks for symbiotic Nitrogen fixation. II. Int. Symp. Nitrogen Fixation, Salamanca (1.976)
- (41) OLIVARES, J.: Algunos aspectos de la asociación Rhizobium -leguminosa: especificidad e infectividad. Aspectos actuales de las relaciones huésped-parásito e intermicrobianas. Simposio de la Soc. Española de Microbiología (1.976)
- (41 a) PAGAN, J.D., CHILD, W.R. SCOWCROFT, and A.H. GIBSON: Nitrogen Fixation by Rhizobium cultured on a defined medium. Nature, 256, 406 - 407 (1.975)
- (42) PERLEY, J.E. and B.B. STOVE: On the ability of Taphrina deformans to produce indoleacetic acid from tryptophan by way of tryptamine. Plant Physiol, 41, 234 - 237 (1.966)

- (43) POWEL; L.E.: Solvent system for silica gel column chromatography of indole derivates. *Nature*, 200, 79 (1.963)
- (44) POWELL, L.E.: Separation of plant growth regulating substances on silica gel columns. *Plant Physiol.*, 35, 256 - 261 (1.960)
- (45) RAGGIO, M. and N. RAGGIO: Root nodules. *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 13, 109 - 128 (1.962)
- (46) RIGAUD, J.: Croissance, teneur en auxine et catabolisme auxinique chez Rhizobium. *Arch. Mikrob.* 66, 29 - 33 (1.969)
- (47) RIGAUD, J.: L'acide indolyl-3-lactique et son métabolisme chez Rhizobium. *Arch. Mikrobiol.*, 72, 297 - 307 (1.970)
- (48) RIGAUD, J.: La biosynthèse de l'acide indolyl-3-acétique en liaison avec le métabolisme du tryptophol et de l'indolyl-3-acetaldehyde chez Rhizobium, *Physiol. Plant.*, 23, 176 - 178 (1.970)
- (49) RIGAUD, J.: Sur le métabolisme de la tryptamine par Rhizobium. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 267, 2.216 - 2.219 (1.968)
- (50) RIGAUD, J.: Mise en évidence de l'indolyl-3-acetaldehyde lors du métabolisme du tryptophane par Rhizobium. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 265, 1.654 - 1.656 (1.967)
- (51) RIGAUD, J.: Synthèse d'acid indolyl-3-lactique et de tryptophol par Rhizobium cultivé en présence de tryptophane. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 262, 100 - 102 (1966)

- (52) RIGAUD, J.: Sur la présence d'indolyl-3-aldehyde et d'acide indolyl-3-carboxilique dans les milieux de culture de Rhizobium. C.R. Acad. Sci. Paris, 261, 784 (1.965)
- (53) RIGAUD, J. and A. PUPPO: Indole-3-acetic acid catabolism by soybean bacteroids. J. Gen. Microbiol., 88, 223 - 228 (1.975)
- (54) ROVIRA, A.D.: Plant root excretions in relation to the Rhizosphere effect. I. The nature of the root exudates from oats and peas. Plant Soil, 7, 178 - 194, (1.955)
- (55) ROVIRA, A.D.: Plant root exudates in relation to the rhizosphere microflora. Soils. Fertilizers, 25, 167 - 172 (1.962)
- (56) ROVIRA, A.D., and W.R. STERN: The rhizosphere bacteria in grass clover associations. Australian. J. Agr. Res. 12, 1108 - 18 (1.961)
- (57) SARMIENTO, R.: Tesis doctoral. Universidad de Sevilla (1.973)
- (58) SENEZ, J.: Microbiologie Générale. Masson et cie. Editeurs Paris. (1.968)
- (59) SHERWOOD, M.T.: Inhibition of Rhizobium trifolii by yeast extracts or glycine is prevented by calcium. J. Gen. Microbiol., 71, 207 - 220 (1.972)

- (60) SMITH, and J.G. FEINBERG: Paper and thin layer chromatography and electrophoresis. Shandon Scientific Company LTD. London (1.965)
- (61) STANIEWSKI, R. and W. KOWALSKA: Typing of Rhizobium meliloti mutants by means of phages. Acta Microbiol. Pol., 6, 183 (1.965)
- (62) STRZELCOWA, A.: The use of the technique of van Schreiven for the taxonomy of Rhizobium strains. Acta Microbiol. Pol., 17, 263 - 268 (1. 968)
- (63) 'T MANNETJE, L.: A re-examination of the taxonomy of the genus Rhizobium and related genera using numerical analysis. Antonie van Leeuwenhoek, 33, 477 - 491 (1.967)
- (64) TRINCANT, J.C. and J. RIGAUD: Sur la synthèse des acides indolyl-3-lactique et indolyl-3-acétique par des bactéroïdes extraits de nodules de Phaseolus vulgaris L. et ses relations avec la fixation d'azote atmosphérique. C.R. Acad. Sc. Paris, t. 284 (24 janvier 1.977)
- (65) TRINCANT, J.C. and J. RIGAUD: Lactate dehydrogenase from Rhizobium. Purification and rôle in indole metabolism. Phisiol. Plant., 32, 394 - 399 (1.974)
- (66) TRUELSEN, T.A.: Indole-3-pyruvic acid as an intermediate in the conversion of tryptophan to indole-3-acetic acid I. Some characteristics of tryptophan

- transaminase from Bean seedlings. *Physiol. Plant.* 26, 289 - 295 (1.972)
- (67) UEDA, M. and R.S. BANDURSKI: A quantitative estimation of alkali-labile indole-3-acetic acid compounds in dormant and germinating maize kernels. *Plant. Physiol.*, 44, 1175 - 1181 (1.969)
- (68) VAN EGERAAT, A.W.S.M.: Pea root exudates and their effect upon root-nodule bacteria. Abridged summary of thesis. *Rhizobium Newsletter*, 18, 2 (1.973)
- (69) VINCENT, J.M.: A Manual for the practical study of root-nodule bacteria. IBP Handbook num. 15. Blackwell Scientific Publications. Oxford.(1970)
- (70) WERNER, D. and BERGHAUSER: Discrimination of Rhizobium japonicum, Rh. lupini, Rh. trifolii, Rh. luguminosarum and of bacteroids by uptake of 2-ketoglutaric acid, glutamic acid and phosphate. *Arch. Microbiol.* 107, 257 - 262 (1.976)
- (71) WERNER, D., J. WILCOCKSON and B. KALKOWSKI: Nitrogen fixing activity in Rhizobium japonicum separated from plant cell cultures. *Z. Naturforsch.*, 30c, 687 - 688 (1.975)
- (72) WILEY J.: Methods of vitamin Assay. Interscience Publishers (1.966)