

## CATEDRA DE MICROBIOLOGIA I Y II

Prof. Vicente Callao Fabregat

### **Algunos aspectos de la simbiosis leguminosa-Rhizobium y aplicación al estudio de la misma de los anticuerpos fluorescentes\***

Resumen de la Tesis Doctoral presentada por el

Ldo. José Olivares Pascual

Realizada bajo la dirección del

Prof. Vicente Callao Fabregat

Uno de los temas más sugestivos dentro del marco de la Microbiología aplicada a la Agricultura, lo constituye el estudio de la simbiosis Rhizobium-leguminosa.

De todos es conocido el gran incremento que ha tomado en estos últimos años la inoculación de semillas de leguminosas con Rhizobium, debido a la repercusión económica que esta práctica lleva consigo cuando es correctamente aplicada. Este mayor rendimiento de los cultivos de leguminosas provocado por la inoculación de sus semillas, se explica por el hecho, conocido de antiguo, de que la planta y el microorganismo son capaces de formar una asociación en la que la primera suministra a la bacteria los hidratos de carbono, sales minerales y factores de

\* Este trabajo se ha realizado con la ayuda de una Beca para Estudios en España de la Fundación Juan March, 1961.

crecimiento necesarios para su desarrollo, mientras que ésta proporciona a la planta nitrógeno en forma orgánica conseguido mediante la fijación del nitrógeno atmosférico. Tanto el mecanismo de fijación de este elemento por la bacteria como las relaciones bioquímicas entre ésta y la planta han sido profusamente estudiadas y el estado actual de los conocimientos sobre el tema está perfectamente recogido en algunas recientes revisiones, entre las que se pueden destacar las de Allen y Allen, 1950 y 1958.

Ahora bien, independientemente del mecanismo bioquímico por el que se lleva a cabo la simbiosis, existen una serie de factores y circunstancias mucho menos estudiadas, que condicionan este estado de vida. Todos estos factores constituyen lo que podríamos llamar susceptibilidad, aptencia o resistencia de una planta de leguminosas para vivir en simbiosis con una determinada raza de *Rhizobium*.

Hemos querido buscar en este trabajo la causa de la limitación que existe a que una planta sea abundantemente nodulada por una raza infectante y activa de *Rhizobium*. Pensamos que pudiera formarse un estado de resistencia del tipo de la inmunidad adquirida de los animales, con las salvedades necesarias. Para esta investigación se ha aplicado la técnica de los anticuerpos fluorescentes, que nos permite diferenciar las razas antigénicamente distintas de la misma especie bacteriana, utilizada en nuestras experiencias.

A la vez, se ha intentado extender el empleo de esta técnica inmunofluorescente al estudio de la infección de la raíz de las leguminosas por las bacterias mencionadas, con vistas a su posible aplicación a la investigación de distintas enfermedades vegetales.

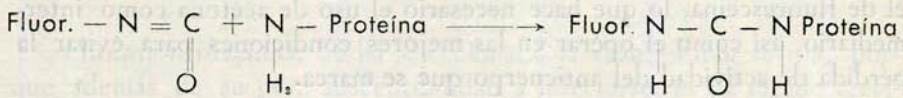
El gran interés que tiene en Agricultura obtener razas de diversas especies vegetales resistentes a determinadas infecciones, nos ha llevado a acometer este estudio, sobre todo con vistas a intentar conseguir una nodulación masiva de las leguminosas y por tanto el máximo número de puntos de fijación del nitrógeno atmosférico, que redundará tanto en beneficio de la planta en sí, como para futuras cosechas en el caso tan común de los cultivos alternados.

Para observar las bacterias en el interior de los nódulos de las raíces de las leguminosas, hemos creído interesante el empleo de la técnica de los anticuerpos fluorescentes, por la que, no sólo percibimos claramente los gérmenes en el interior de las células radicales, sino que podemos diferenciar varias razas antigénicamente distintas de un mismo *Rhizobium*.

Desde que Metschnikoff en 1897 estudió la fijación de la toxina tetánica en tejidos de pollo utilizando su toxicidad como indicador, hasta llegar a los métodos que emplean anticuerpos fluorescentes, derivados de las investigaciones de Albert Coons (Coons y col. 1942), se han realizado numerosos intentos para localizar antígenos.

La técnica utilizada se basa en conjugar un colorante fluorescente a un anticuerpo, de tal forma que uniéndose al antígeno comunique fluorescencia al complejo que se hace entonces visible a la luz ultravioleta.

Coons y sus colaboradores emplearon en el procedimiento original un isocianato derivado de la fluoresceína, que se obtenía cuando se hacía reaccionar una aminofluoresceína con el fosgeno. El grupo isocianico reacciona con los restos amino libres de la proteína según vemos en el esquema:



Posteriormente Riggs y sus colaboradores (1958) prepararon y utilizaron el isotiocianato de fluoresceína en lugar del isocianato, pues cuenta con ventajas tales como su conservación y el usar en su preparación el tiofosgeno en vez del fosgeno, apareciendo así el resto: Fluor — N = C = S.

Marshall y col. (1958) estudian comparativamente ambos preparados y observan que cuando se emplea el colorante en forma de isotiocianato, se necesitan concentraciones más bajas para dar una tinción más intensa que con el isocianato.

Los dos colorantes más usados hoy día son la fluoresceína y la rodamina B 200. El primero presenta una fluorescencia verde amarillenta con un máximo en 550 milimicras, y el segundo, naranja rojizo con un máximo en 640.

La intensidad de la fluorescencia de ambas es similar, no obstante, cada una tiene sus ventajas e inconvenientes. El ojo humano es más sensible al color verde manzana que al rojo naranja. Pero la autofluorescencia natural roja es en los tejidos animales más frecuente que la verde, al contrario de lo que sucede en los vegetales. Puede ser interesante emplear ambos a un mismo tiempo cuando intentamos localizar simultáneamente dos antígenos en un único tejido.

El método ha sufrido desde sus comienzos numerosas modificaciones y hay sobre él abundantes trabajos publicados. Ya, el mismo Coons (Coons y Kaplan, 1950), perfeccionan el procedimiento al determinar las condiciones óptimas de conjugación de la fluoresceína a la proteína que lleven consigo la máxima sensibilidad para la tinción.

Antes de emplear el isotiocianato de fluoresceína cristalizado, se utilizaba disuelto en disolventes orgánicos (dioxan y acetona) lo que originaba una fácil alterabilidad del producto y una probable desnaturalización de la proteína en presencia de tales sustancias orgánicas, si no se opera en las debidas condiciones. Goldman y Carver (1957), resolvieron en parte el problema dejando secar la solución del colorante en papel de filtro. Marshall, Eveland y Smith (1958) observaron que los preparados sin la adición de disolventes orgánicos tienen una mayor actividad. No obstante este inconveniente no se puede evitar cuando se emplea isotiocianato de rodamina ya que no es tan soluble en agua como el de fluoresceína, lo que hace necesario el uso de acetona como intermediario, así como el operar en las mejores condiciones para evitar la pérdida de actividad del anticuerpo que se marca.

La conjugación con un fluorocromo puede cambiar la solubilidad, la estabilidad, el tamaño, la forma y la carga de la molécula de proteína. Estas alteraciones no son importantes ya que no son muchas las moléculas de colorante que se unen a una de proteína, de tal forma que el peso molecular apenas si varía del uno al dos por ciento. En nuestras experiencias hemos observado que si bien no hay alteración en la capacidad de conjugación del antígeno con el anticuerpo, sí hay una disminución clara de la avidez.

El procedimiento original de Coons consistía en una tinción directa, esto es, aplicar las soluciones de anticuerpo marcado a las preparaciones que contienen el antígeno.

La tinción inmunofluorescente indirecta está basada en tratar primero la preparación del antígeno con el anticuerpo específico no marcado. El complejo antígeno anticuerpo se hace visible cuando se trata con un anticuerpo fluorescente a la gamma globulina específica.

Meller y Coons (1954), fueron los primeros que descubrieron este último procedimiento. Presenta la ventaja de utilizar la misma globulina marcada, siempre que en la reacción se empleen gamma globulinas específicas de los diferentes antígenos, obtenidas de la misma especie animal. Esto es, basta sólo con marcar una gamma globulina de cabrito anti-gamma globulina de conejo para usar esta tinción cuando operemos

con anticuerpos obtenidos en este animal. Es posible obtener así una mayor sensibilidad que con la tinción directa pues a la misma cantidad de antígeno corresponde mucha mayor proporción de anticuerpo marcado.

Goldwasser y Shepard (1958) describen un procedimiento de tinción basado en el marcado del complemento, y Klein y Burckholder (1959) creen que es bastante más sensible que ninguno.

Nosotros, como indicaremos en la parte correspondiente a material y métodos, hemos utilizado anticuerpos marcados anti-*Rhizobium leguminosarum* obtenidos en conejo, y antigamma globulina de conejo obtenida en cabrito. Como fluorocromos, el isotiocianato de fluoresceína (ITF) e isotiocianato de rodamina (ITR).

#### MATERIAL Y METODOS

*Plantas utilizadas:* Se ha seleccionado la veza, *Vicia sativa*, porque además de su gran susceptibilidad a infectarse, es de rápido crecimiento y de semilla pequeña, característica ésta muy importante para el cultivo que haremos de la planta.

Este se lleva a cabo partiendo de semillas estériles para no introducir contaminantes en las soluciones hidropónicas. Su esterilización se realiza por inmersión en alcohol de 96°, dos o tres minutos, pasados los cuales se llevan a una solución al 35 por mil, durante una hora, de clorohipoclorito cálcico. Tres lavados con agua estéril son suficientes para eliminar los restos de cloro.

Una vez terminada esta operación, las semillas tratadas, se llevan por separado, tomándolas con un asa «ad hoc», a tubos de ensayo estériles provistos de una tira de papel de filtro y con unos centímetros cúbicos de agua en su fondo. Sobre una gradilla disponemos tales tubos inclinados, con objeto de que las semillas depositadas en la parte superior de los mismos no rueden a la inferior y caigan en el agua, sino que permanezcan sobre el papel impregnado en ella.

La gradilla preparada se lleva a 20°, temperatura óptima de germinación de la veza. A las 72 horas se habrán desarrollado las plantulas de unos dos centímetros de longitud.

*Preparación de las plantas.* Las plantas germinadas se colocan entre porta y cubre (Fahraeus, 1957). Sobre el porta ponemos unas gotas de solución nutritiva con agar al 0,4 por ciento. Sobre esta capa

se deposita la plantula y encima el cubre. Esta preparación se lleva a tubos anchos, 35 mm. x 20 cm. con la ayuda de pinzas estériles, que contienen 25 cc de la solución nutritiva que empleó Fahrzeus originalmente, algo modificada.

Solución nutritiva:  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ , 0,1 g;  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K.H}_2\text{O}$ , 0,1 g;  $\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,15 g;  $\text{SO}_4\text{Mg}$ , 0,74 g; Citrato de hierro, 0,005 g;  $\text{SO}_4\text{Mn}$ , 0,007 g;  $\text{SO}_4\text{Zn}$ , 0,0025 g;  $\text{BO}_3\text{H}_3$ , 0,0015 g; IK, 0,0007 g;  $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0,0004 g;  $\text{MoO}_4\text{Na}_2$ , 0,00002 g; Agua 1000 cc. Se esteriliza a  $120^\circ$  durante veinte minutos, una vez repartidos.

Cuando todos los tubos están listos se llevan a un dispositivo de iluminación y a temperatura de  $26^\circ - 28^\circ$  para las diez y seis horas de luz y  $20^\circ - 23^\circ$  para las ocho de oscuridad (Bonnier y Sironval, 1956; Mes, 1959; Joffert y Saubert, 1961).

*Bacterias. Cultivo e inoculación.* Hemos utilizado dos razas de *Rhizobium leguminosarum* aisladas de nódulos de raíces de habas. Tales razas eran antigénicamente distintas al no dar reacción de aglutinación cruzada.

Aquella cuyo anticuerpo obtenido en conejo hemos marcado, fue aislada en abril de 1961 y conservada en el laboratorio por pases mensuales en los medios de Ashby o 79 de Allen (Allen, 1957).

Los gérmenes provenían de nódulos aparentemente activos, y se aislaron por el procedimiento original. La mayoría de los autores esterilizan la superficie nodular con solución de cloruro mercúrico al 1 por mil, tres a seis minutos, y alcohol de  $95^\circ$  varios minutos. Nosotros utilizamos el hipoclorito cálcico, —solución al 10 por ciento—, por media hora en lugar del cloruro mercúrico y suprimimos el alcohol. Así hemos conseguido mejores resultados. El jugo de estos nódulos tratados, es diseminado sobre los medios anteriormente mencionados pero adicionados de cristal violeta al 1:80.000 para prevenir el desarrollo de contaminantes gram positivos, y poder diferenciar el *Agrobacterium radiobacter*, que da lugar a colonias no uniformemente teñidas en violeta como las de *Rhizobium*, sino claras y con un punto central intensamente coloreado.

Una vez que las plantas han sido preparadas, se agregan a la solución nutritiva varias gotas de una suspensión gruesa de *Rb. leguminosarum* procedentes de un cultivo reciente. A los cinco días de la inoculación, se observan en las raíces unos puntos brillantes, como si fueran pequeñas burbujas, —parece ser que estos lugares no son mojados por

el líquido—. Uno o dos días más tarde, se aprecian claramente ya las tumoraciones o nódulos en estos mismos lugares.

Podemos hacer un diagnóstico precoz de infectividad siguiendo a Fahraeus (1957), por la observación de estas raíces bajo el microscopio con dispositivo de contraste de fase, apreciándose ya a las 48 horas el típico filamento de infección.

### *Tinción inmunofluorescente.*

I. Preparación de los anticuerpos fluorescentes. a) Obtención de antisueros.

Los sueros anti han sido obtenidos de la manera usual. Para los anti-*Rb. leguminosarum* se ha usado el conejo y para los anti-gamma globulina de conejo, el cabrito. Los sueros aglutinantes preparados fueron valorados por el método standard de titulación de anticuerpos y dieron un límite de 1:75.000. Para los sueros precipitantes se siguió la técnica de los tubos capilares y la de precipitación en gel (Darcy, 1960). Resultó un valor de precipitinas óptimo para la dilución 1/8 del antígeno frente al anticuerpo diluido a la mitad, y un tiempo de 12 minutos.

b) Purificación de la gamma globulina.

Se precipitó con sulfato amónico a semisaturación y dializó frente a solución salina tamponada a pH 7,5 hasta total eliminación del ion amonio. Una vez purificada fue determinada su concentración por mikrokjedahl. Esta nunca debe ser inferior al 1 por 100.

c) Marcado de la proteína con los colorantes fluorescentes.

Hemos operado de la manera que en forma resumida vamos a exponer: A un volumen de solución de gamma globulina enfriada a 0° y tamponada a pH 9,4 con buffer carbonato bicarbonato 0,5 M, se le añade lentamente a la vez que se agita la cantidad requerida de ITF cristalizado a la solución en acetona muy fría del ITR.

Se mantiene la agitación en frío por 12 - 18 horas. Pasado este tiempo se procede a eliminar el resto de colorante, que daría lugar a tinciones inespecíficas.

Tanto este tiempo de reacción como la proporción de colorante por mg de proteína que es necesario emplear para la buena marcha del proceso, han sido motivo de numerosos trabajos, entre ellos el de Griffin y col. 1961.

Nosotros también hemos hecho algunas pruebas para determinar en nuestro caso particular, la óptima proporción. En las primeras experiencias usamos la 1:20, esto es 0,05 mg de ITF por mg de proteína, pero ocurría, al parecer, que se conjugaban demasiados grupos amino de la gamma globulina, originándose una alta inespecificidad imposible de eliminar completamente.

Después de varias pruebas llegamos a la conclusión de que 1:75 o 1:100 son buenas concentraciones para obtener tinciones específicas, si se tiene en cuenta que debido a la baja concentración del colorante han de emplearse siempre soluciones de alto título de anticuerpos, por lo menos 1:50.000.

Es muy importante separar el resto de fluorocromo no combinado y eliminar al máximo los grupos proteínicos no específicos, pero marcados. Hemos ensayado casi todos los procedimientos posibles, desde la diálisis prolongada por 6 a 8 días —hasta que el dializado no presenta fluorescencia a la lámpara de Wood—, hasta la filtración por Sephadex, pasando por la precipitación con sulfato amónico a semisaturación, etc.

De todos ellos el procedimiento de elección debe ser la filtración a través de una columna de Sephadex G-25, —un dextrano modificado—, siguiendo a George y Walton, 1961.

En todos estos procesos es lógico que haya una pérdida, en algunos casos considerable, de proteína que queda absorbida por los distintos materiales. Es necesario por tanto concentrar las soluciones tratadas, con vistas a emplear siempre preparados de alto título de anticuerpos. Para ello se ha modificado el sistema empleado por Kohn (1959) habiendo ideado nosotros un dispositivo mucho más sencillo aunque basado en el mismo fenómeno. Consiste en un tubo ancho que contiene la solución proteínica a concentrar, en la cual se introduce el extremo cerrado por un papel de celofán de un segundo tubo, algo más estrecho, donde va suficiente cantidad de polivinil pirrolidona en polvo. En tres a cuatro horas es posible elevar el título de anticuerpos de una solución de 1:10.000 a 1:75.000. La operación se realiza en nevera.

También se puede concentrar la proteína por la adición de Sephadex G-25 a la solución (Flodin y col. 1960). Los sueros marcados se conservan por un período de años, adicionados de sustancias antisépticas, tales como mertiolato al 1:10.000, y a 0°-5° sin que pierdan considerablemente su actividad.



## II. Tinción inmunofluorescente.

No vamos a entrar en detalles que ya conocemos, acerca de en qué consisten estos métodos de tinción. Aunque el que más aplicación tiene sin duda, es el indirecto, comenzaremos por reseñar escuetamente el directo, más elemental.

El frotis o corte de tejido a teñir se cubre con unas gotas de la solución de anticuerpo y se lleva a una cámara húmeda por 20 minutos a temperatura ambiente. A 37° la tinción es más rápida.

Pasado este tiempo se dan tres lavados sucesivos en solución salina pH 7,8, cada uno de ellos de diez minutos, se seca sin frotar con papel de filtro y se conserva en nevera hasta su observación.

Las extensiones bacterianas han de ser previamente fijadas, bien por calor suave o por fijadores químicos: alcohol metílico, acetona, vapores de ácido ósmico, etc.

Los cortes de tejido son obtenidos por los procedimientos usuales: inclusión previa en parafina o congelación. Se han usado los dos con vistas a estudiar la influencia que cada uno podía tener en la posterior tinción con anticuerpos marcados.

La tinción indirecta en esencia es lo mismo que la anteriormente expuesta, pero podemos considerarla doble ya que hay un primer tratamiento con anticuerpo obtenido en conejo, sin conjugar, y un segundo, con gamma globulina marcada anti-gamma globulina de conejo. Este anticuerpo marcado ha sido obtenido en distinta especie animal que el primero. Nosotros hemos usado el cabrito. De esta manera con una sola proteína marcada, podemos teñir todos los antígenos posibles, con tal que sus anticuerpos específicos hayan sido obtenidos en el animal cuya anti-gamma globulina hemos marcado.

## III. Observación.

Para la observación hemos utilizado un microscopio Leitz, Dialux, provisto de equipo de fluorescencia con mechero de vapor de mercurio Philips CS 150. Como filtro sensibilizador el UG 1 2,5 mm y como filtro barrera el OG 1 2,5 mm.

Las bacterias aparecen claramente teñidas en verde amarillento o naranja según se haya marcado el anticuerpo con ITF o ITR, destacando sobre fondo negro. Para obtener buenas fotografías es necesario operar con color empleando películas para luz de día de alta sensibili-

dad. Nosotros hemos utilizado «Super Ansochrome», y aunque hemos probado otras clases, incluso para blanco y negro hipersensible no se consiguen aceptables resultados.

#### EXPERIENCIAS Y RESULTADOS EXPERIMENTALES

Dos han sido los principales tipos de experiencias que se han llevado a cabo. Uno para estudiar el empleo de los anticuerpos fluorescentes aplicados a la infección de las leguminosas por *Rhizobium*, y otro, consistente en inoculaciones en diversas condiciones de diferentes razas antigénicamente distintas en *Rh. leguminosarum* a plantas de veza, con el fin de conocer los límites de la nodulación de sus raíces.

Con las del primer tipo, intentamos ver las posibilidades de aplicación de la técnica de los anticuerpos fluorescentes al estudio de las enfermedades vegetales y a otros aspectos de la fitobiología lo mismo que se ha extendido su empleo en la investigación animal. Hemos tomado como tipo la infección ya mencionada, de las leguminosas por *Rhizobium* por ser mucho más asequible y más interesante para nosotros.

Se han realizado cortes de las raíces de las plantas inoculadas en distintos estadios de infección que fueron teñidos con anticuerpos marcados anti-*Rb. leguminosarum*.

Respecto al estudio del mecanismo de infección, este método choca con inconvenientes que se derivan de la intensa autofluorescencia natural de ciertas células de los tejidos vegetales, especialmente los pelos radicales, donde intentábamos estudiar el filamento de infección que sigue a la penetración de la bacteria en la célula. Las bacterias son perfectamente visibles en el interior de las células radicales, sobre todo si los anticuerpos se han marcado con ITR pues su color naranja contrasta con el verde de la autofluorescencia.

Muy interesantes son también el otro tipo de experiencias basadas en la inoculación de leguminosas con distintas razas de *Rhizobium* (*Rb. leguminosarum*) antigénicamente diferentes. Hemos llevado a cabo inoculaciones simultáneas y sucesivas de plantas de veza con dos razas de *Rh. leguminosarum*. Las inoculaciones simultáneas se realizaron según la pauta siguiente:

Lote núm.	Raza A	Raza B
1	0,5 cc	—
2	0,4 »	0,1 cc
3	0,3 »	0,2 »
4	0,2 »	0,3 »
5	0,1 »	0,4 »
6	—	0,5 »

Se empleó una suspensión de 20.000 millones de gérmenes por cc.

Los resultados medios en número de nódulos por planta fueron:

Lote núm	1	2	3	4	5	6
núm. de nódulos	6	10	5	6	6	9

Aunque pudiera parecer el volumen de 0,1 cc demasiado pequeño para conseguir una buena nodulación, no ocurre así ya que lleva suficientes células, pues estas se disponen siempre en las zonas del medio que rodean la raíz.

De los resultados de estas experiencias deducimos que la inoculación de semillas con más de una estirpe bacteriana de la misma especie de *Rhizobium*, no da lugar a una mayor nodulación en las plantas originadas, pues en los lotes intermedios podemos observar el mismo o más bajo número de tumoraciones. No hemos determinado el nitrógeno por peso seco por no considerarlo necesario, pero el aspecto de frondosidad de las plantas en los distintos lotes era semejante.

Con objeto de estudiar la relación que existe entre el número de nódulos de cada clase con el número de bacterias en el inóculo, es posible emplear la técnica de los anticuerpos fluorescentes, ya que únicamente con ella podemos conocer fácilmente dicha relación, así como investigar, si interesara, la problemática existencia de más de una raza bacteriana dentro de un mismo nódulo.

Para estudiar la posibilidad de que se diera en las leguminosas esa resistencia a la infección posterior de que ya hemos hablado, se han realizado unas experiencias complementarias de las anteriores.

Las inoculaciones de raíces de leguminosas con *Rhizobium* de esta segunda serie de ensayos, no han sido simultáneas sino sucesivas, es

decir, se ha dejado actuar primero una raza, que después ha sido eliminada en lo posible y sustituida por otra.

Las plantas mantenidas en contacto con la raza A 15 días, —0,4 cc de una suspensión de 20.000 millones de bacterias por cc por planta—, son lavadas abundantemente con agua esteril. Cuando se han contado los nodulos y después de divididas en dos lotes, son reinoculadas con la misma A las de un lote y con la raza B las del otro. Transcurridos otros 15 días, contamos de nuevo las tumoraciones para establecer las posibles diferencias.

Uno de los resultados medios obtenidos es presentado en la tabla siguiente:

Inoculación											
Raza A						Raza B					
6	3	1	3	10	—	—	7	10	4	8	5
6	4	5	3	11	1	—	11	13	4	10	5
Raza A			Raza B			Raza A			Raza B		

#### Reinoculación

Como podemos apreciar por esta muestra, lo mismo que por todas las llevadas a cabo, no se encuentran diferencias apreciables en los datos obtenidos en estas experiencias, pues la reinoculación no origina un aumento de nodulos en las plantas ni siquiera cuando se emplea una raza distinta a la primera, lo que demuestra que los límites de la nodulación no dependen de la antigeneidad de la raza empleada. Por tanto, es independiente de cualquier estado inmunitario que pudiera formarse.

#### DISCUSION

Con la aplicación de la técnica de los anticuerpos fluorescentes al estudio de la infección de las leguminosas por *Rhizobium*, hemos querido obtener una serie de conclusiones para llevarlas, incluso a otros campos de la Patología vegetal. Nuestro interés era demostrar que la técnica de los anticuerpos fluorescentes podía representar un papel tan importante en el estudio de los mecanismos y fenómenos de las plantas, como lo tiene en distintos aspectos de aplicación animal.

Nos ha parecido mucho más fácil ensayar esta técnica en una infección vegetal, tal como la de las leguminosas por *Rhizobium*, para después poder aplicar los resultados a otras enfermedades, bacterianas o principalmente básicas.

Teniendo en cuenta que las células vegetales presentan una característica autofluorescencia natural de color verde amarillento, el empleo de anticuerpos marcados con isotiocianato de fluoresceína, para teñir las bacterias en el interior de los tejidos de las plantas, queda limitado a aquellas células que presentan poca fluorescencia. Para mejores resultados podemos utilizar los anticuerpos conjugados con ITR, especialmente si intentamos teñir bacterias o virus que se encuentren en pequeña cantidad, pues su fluorescencia roja naranja contrasta con la natural verde. No obstante, el método puede fallar si las células presentan una intensa autofluorescencia.

Después de los resultados obtenidos, creemos que esta técnica puede ser un importante auxiliar en la investigación de numerosos e interesantes aspectos de biología vegetal.

Con respecto a las alteraciones que los anticuerpos pudieran sufrir con la operación del marcado, de las que hemos dado cuenta en la parte general de esta exposición, debemos decir que disentimos con un grupo de autores que opinan que tal operación lleva consigo una pérdida en la actividad del anticuerpo. Nosotros, realizadas reacciones de aglutinación y precipitación con los sueros marcados obtenidos, hemos visto que no ocurre una baja sensible en el título de anticuerpos, aunque debemos señalar que en la reacción de precipitación entre suero de conejo y anti-gamma globulina de conejo, la avidéz, tiempo que tarda en aparecer el precipitado en la zona de equivalencia, disminuye cuando se opera con anticuerpo marcado a unos treinta minutos en lugar de doce.

De las experiencias de inoculación simultánea y sucesiva de leguminosas con razas antigénicamente distintas de *Rhizobium*, se han obtenido interesantes resultados, alguno de los cuales son una confirmación de suposiciones ya existentes.

No se puede escoger la infección de *Rhizobium* a leguminosas como modelo para estudiar la resistencia de las plantas enfermas a una infección posterior por el mismo agente, pues existen alteraciones de las dos partes que intervienen en la simbiosis que influyen determinando la extensión de la infección.

Hemos llegado a la conclusión con estos experimentos, que apoyan

con sólida base las ideas de algunos autores, de que en la relación planta bacteria, la nodulación de la primera no depende *únicamente* de la capacidad infectiva de la raza de *Rhizobium*, sino de las posibilidades o susceptibilidad de la planta para nodular.

En todas las pruebas llevadas a cabo variando la concentración de bacterias en la solución nutritiva, o ensayando inoculaciones simultáneas o sucesivas con la misma o distintas razas bacterianas de igual capacidad infectiva (aparente), no hemos conseguido forzar el número de nódulos formados en las raíces.

Diversos autores sugieren la existencia de un límite impuesto por la planta a la infección y al número de nódulos producidos. Si la infección está ya de por sí restringida a unos pocos pelos absorbentes, del 4 al 5 por ciento, el número de nódulos formados es todavía más pequeño, del 1 al 1,5 por ciento de los pelos infectados.

P. S. Nutman (1948) opina que existe sobre la raíz un número limitado de lugares donde pueden originarse los nódulos y que pudieran corresponder a los puntos de iniciación de las raíces laterales.

A nosotros no nos ha sido posible forzar la existencia del límite de nodulación. Comprobamos sin embargo estadísticamente la opinión de Nutman de que los nódulos tienden a originarse en los puntos destinados a raíces laterales, aunque estudiando la nodulación precoz por cortes de raíz se ha observado el hecho curioso de que la primera señal de la formación de una raíz lateral es la aparición de una ramificación en el sistema conductor de dicha raíz, mientras que la formación del nódulo comienza por una división rápida de las células corticales próximas al periciclo. Después del cuarto o quinto día es cuando aparecerán las ramificaciones vasculares del tumor.

En la tabla siguiente pueden apreciarse las diferencias existentes en el número de raíces laterales entre plantas inculadas y no inoculadas. Han sido realizadas varias experiencias pues el número de plantas de cada una está limitado por la capacidad del sistema de iluminación utilizado

## Número de raíces laterales

Experiencia A		Experiencia B	
No inoc.	Inoc.	No inoc.	Inoc.
16	8	25	12
11	7	24	14
17	8	14	16
13	5	25	12
16	8	20	14

Efectuados los cálculos estadísticos obtenemos en todos los ensayos una probabilidad menor de 0,001 de que las diferencias observadas se deban al azar. Aisladamente hemos encontrado plantas inoculadas que no presentan nódulos, si bien el número de sus raíces laterales es muy considerable, y otras, que apoyan la tesis, no forman ni estas ni aquellas.

Hemos visto que la nodulación esta relacionada con el número de raíces laterales, y que la inoculación de distintas razas de bacterias y en condiciones variables no modifica el número de nódulos de las plantas, por lo que este estudio presenta grandes posibilidades de aplicación a la agricultura pues nos ha abierto el camino para una posterior dedicación a la investigación de las causas de tal comportamiento.

Es evidente que puede haber influencias ambientales, reserva nutritiva de la semilla, etc. pero así como se han obtenido variedades de especies vegetales resistentes a un determinado tipo de enfermedad, es posible que pudieran encontrarse leguminosas que fueran susceptibles al máximo a la infección por *Rhizobium*, y en este caso habríamos dado un gran paso hacia la obtención de grandes rendimientos en las cosechas, pues juntos a la práctica de la inoculación artificial de semillas con razas bacterianas activas, estaría la selección de tales semillas procedentes de variedades de líneas puras de alta capacidad de nodulación y por tanto de puntos de fijación del nitrógeno atmosférico.

## Resumen

Hemos aplicado la técnica de los anticuerpos fluorescentes al estudio de la infección de las leguminosas por *Rhizobium*, con vistas a la extensión de su empleo a otros campos de la biología vegetal. Nosotros hemos observado las bacterias teñidas con anticuerpos, en el interior de los nódulos en distintas etapas de formación.

Mediante inoculaciones simultáneas y sucesivas de razas antigénicamente distintas de *Rhizobium* a leguminosas, se ha intentado estudiar los límites que existen a la nodulación masiva de las raíces de estas plantas.

## Résumé

Nous avons appliqué la technique des anticorps fluorescents à l'étude de l'infection des plantes légumineuses par *Rhizobium*, à fin de rechercher l'application de cette méthode à autres parties de la biologie végétal. Nous avons observé les bactéries à l'aide de ce procédure dans les nodules en différents étapes de leurs development.

Au moyen de inoculations simultanées et sucesives de races antigeniquement différents de *Rhizobium* aux plantes légumineuses, on a prétendu étudier les limites qui s'opposent au nodulation en grand quantité de les racines de ceux plantes.

## Summary

We have applied the antibody fluorescent method to the study of the infection of leguminous plants by *Rhizobium*. We wanted to investigate the application of this technique to other parts of the plant biology. It has been possible to observe the bacteria inside nodules in different stages of their development by this procedure.

By simultaneous and successive inoculations of antigenivly different *Rhizobium* strains, we have tried to study the limits that exist in the roots of these plants to achieve a great nodulation.



## BIBLIOGRAFIA

1. — ALLEN, O. N., 1957. *Experiments in soil Bacteriology*. Burgess Publishing Co., Minneapolis, Minn. 177 pp.
2. — ALLEN, E. K. and ALLEN, O. N., 1950. *Biochemical and symbiotic properties of the Rhizobia*. Bact. Reviews, 14, 273-330.
3. — ALLEN, E. K. and ALLEN, O. N., 1958. *Biological aspects of symbiotic nitrogen fixation*. Handbuch der Pflanzenphysiologie. Springer Verlag. Berlin, Göttingen, Heidelberg.
4. — BONNIER, C. and SIRONVAL, C., 1956. *Influence of daylength on nodule formation in soja hispida by a specific Rhizobium strain*. Nature, 177, 93-94.
5. — COONS, A. H., CREECH, H. J., JONES, E. M. and BERLINER, E., 1942. *The demonstration of pneumococcal antigens in tissues by the use of fluorescent antibody*. J. Immunol. 45, 157-170.
6. — COONS, A. H. and KAPLAN, M. H., 1950. *Localization of antigen in tissue cells II. Improvement in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody*. J. Exp. Med. 91, 1-14.
7. — DARCY, D. A., 1960. *A quantitative application of the agar-diffusion plate: the estimation of specific proteins in serum*. Immunology, 3, 325-335.
8. — FAHRAEUS, G., 1957. *The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique*. J. gen. Microbiol., 16, 374-381.
9. — FLODIN, P., GELOITTE, B. and PORATH, J., 1960. *A method for concentrating solutes of high molecular weight*. Nature, 188, 493-494.
10. — GEORGE, W. and WALTON, K. W., 1961. *Purification and concentration of dye-proteins conjugates by gel filtration*. Nature, 192, 1188-1189.
11. — GOLDMAN, M. and CARVER, R. K., 1957. *Preserving fluorescein isocyanate simplified preparation of fluorescent antibody*. Science, 126, 839-840.
12. — GOLDWASSER, R. A. and SHEPARD, C. C., *Staining of complement and modifications of fluorescent antibody procedure*. J. Immunol. 80, 122.
13. — GRIFFIN, C. W. CARSKI, T. R. and WARNER, G. S., 1961. *Labeling procedures employing crystalline fluorescein isothiocyanate*. J. Bact. 882, 534-537.
14. — JOFFERT, H., WEYER, F. and SAUBERT, S., 1961. *The role of root temperature in symbiotic nitrogen fixation*. South African J. Sci., 57, 278-280.
15. — KLEIN, P. and BUKHOLDER, P., 1959. *Die Darstellung von fixierten Komplement mit markierten Antikomplement*. Schweiz. Z. Pathol. und Bacteriol., 22, 279-731.

- 16.—KOHN, J. 1959. *A simple method for the concentration of fluids containing protein.* Nature, 183, 1055.
- 17.—MARSHALL, J. D., EVELAND, W. C. and SMITH, C. W., 1958. *Superiority of fluorescein isothiocyanate for fluorescent-antibody technique, with a modification of its application.* Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 98, 898-900.
- 18.—MES, M. G., 1959. *Influence of temperature on the symbiotic nitrogen fixation of legumes.* Nature, 184, 2032.
- 19.—NUTMAN, P. S., 1948. *Physiological studies on nodule formation. I. The relation between nodulation and lateral root formation in red clover.* Ann. Bot., N. S. 12, 81-96.
- 20.—RIGGS, J. L., SEIWALD, R. J., BURKHALTER, J. H., DEWNS, C. M. and METCALF, T. G. 1958. *Isothiocyanate compounds as fluorescent labeling agents for immune serum.* The Am. J. of Path., 34, 1081.
- 21.—WELLER, T. H. and COONS, A. H., 1954. *Fluorescent antibody studies with agents of varicella and herpes zoster propagated in vitro.* Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 86, 789-794.