



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

EFFECTO DE LA RADIACION ULTRAVIOLETA
SOBRE LA INFECTIVIDAD Y EFECTIVIDAD
EN ALGUNAS CEPAS DE Rhizobium trifolii

T E S I S

Que para obtener el título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

p r e s e n t a :

MARIO IGNACIO GARCIA SALAZAR



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CLAS TESIS 1978
ADD M.S. ~~197~~ 193 1186
COTIZACION _____
PAGOS _____



J u r a d o a s i g n a d o :

PRESIDENTE: Dr. Carlos del Rfo Estrada

V O C A L : M. en C. Alfredo Echegaray Alemán

SECRETARIO: M. en C. Sergio Palacios Mayorga

1er. SUPLENTE: Jorge Soto Soria

2do. SUPLENTE: Biserka Sveshtarova P.

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Bioquímica Clínica y Patología,
M é x i c o , D . F .

NOMBRE COMPLETO DEL SUSTENTANTE:

MARIO IGNACIO GARCIA SALAZAR

NOMBRE COMPLETO DEL ASESOR DEL TEMA:

SERGIO PALACIOS MAYORGA

AGRADECIMIENTOS :

Al M. en C. Sergio Palacios Mayorga
Por su extraordinaria disposición y
contribución para el desarrollo del
tema.

A la H. Comisión Dictaminadora:
Dr. Carlos del Río Estrada
M. en C. Alfredo Echegaray Alemán
M. en C. Sergio Palacios Mayorga
Prof. Jorge Soto Soria
Profa. Biserka Sveshtarova P.
Por su valiosa colaboración.

Al Dr. Mario García Sánchez
Por haberme permitido desarrollar
el presente trabajo en las instala-
ciones del Laboratorio de Bio-
química Clínica y Patología.

A la Dra. Celia Dubovoy Rudoy
Por sus valiosas orientaciones

A la Biól. Teresa Toca Porraz
Por su asesoramiento en la
parte estadística del tema.

A mis padres

A mis maestros

C O N T E N I D O

	Pág.
I.- INTRODUCCION	1
II.- REVISION DE LITERATURA	4
1. Panorama general sobre la obtención de mu- tantes	4
2. Agentes mutagénicos	6
a) Valor de los mutágenos	6
b) Tipos de agentes mutágenos	6
c) Acción de los agentes mutágenos	7
d) Luz ultravioleta como agente mutágeno .	7
e) Alteración del ácido nucléico por radia- ciones	10
f) Efecto letal de la luz ultravioleta ...	10
g) Inactivación funcional de los genes ...	11
h) Mutagénesis por radiación ultravioleta.	11
i) Agentes mutagénicos en relación con bac- terias del género RHIZOBIUM	12
j) Luz ultravioleta como mutágeno en RHIZO- BIUM	12
3. Mutagénesis específicamente en RHIZOBIUM ..	13
a) Efecto de algunas mutaciones en propie- dades simbióticas de RHIZOBIUM	13
b) Mejoramiento de la efectividad en algu- nas características de RHIZOBIUM	16
c) Mutagénesis y efecto en las propiedades simbióticas, inducidas por radiación ul- travioleta	17
III. MATERIALES Y METODOS	19
1. Cepas	19
2. Selección	20

	Pág.
3. Curvas de crecimiento	22
4. Irradiación	24
5. Estimación de los cambios inducidos por el efecto de irradiación en las cepas seleccionadas	25
6. Pruebas de invernadero	26
7. Análisis estadístico	29
IV. RESULTADOS Y DISCUSION	32
V. CONCLUSIONES	61
VI. RESUMEN	64
VII. BIBLIOGRAFIA	66

I. INTRODUCCION

El aire atmosférico contiene normalmente 75.5% de nitrógeno en peso, o sea 78.065% en volumen. A pesar de esto, - el nitrógeno en forma asimilable es escaso en la naturaleza, particularmente en los campos de cultivo, en donde esta deficiencia se tiene que suplir con la adición de dosis altas de fertilizantes nitrogenados.

En los organismos este elemento se encuentra en pequeña proporción en células y tejidos. Resulta sorprendente e -- irónico que cualquier tipo de organismo tenga poco nitrógeno siendo tan abundante en la atmósfera. La razón es simple, la mayoría de los organismos carecen de enzimas capaces de - incorporar el nitrógeno atmosférico a cualquier tipo de molécula, ya que sólo utilizan el nitrógeno combinado en forma - de sales nitrogenadas o como aminoácidos y proteínas.

En la naturaleza la fijación de nitrógeno es una facultad reservada a ciertas bacterias y algas azul-verdes. Dentro de las bacterias se les encuentra en el suelo, tanto de vida libre como en relación simbiótica con algunas plantas. De estas últimas resulta particularmente importante el géne-

ro Rhizobium que vive simbióticamente con plantas de la familia de las leguminosas. En esta simbiosis la cantidad de nitrógeno que la bacteria incorpora, tanto a la planta como al suelo, llega a ser de considerable importancia.

Dada la importancia que social y económicamente representa el utilizar la fijación de nitrógeno, se buscan constantemente nuevas formas de obtener nitrógeno. Un frenesí de actividad investigadora durante los últimos años está empezando a desenmarañar las complejidades de los procesos de fijación de este elemento indispensable.

A este respecto, el camino queda abierto a interesantes prospectos, dentro de los que se pueden mencionar los citados por Skinner (1976).

- Desarrollo de métodos para uso más eficaz del nitrógeno.
- Incrementar la cantidad de nitrógeno fijado por los sistemas enzimáticos de los microorganismos conocidos.
- Desarrollo de mejores y quizá nuevas relaciones simbióticas entre plantas y microorganismos.
- Obtención de microorganismos mutantes que sirvan al gún día como fábricas biológicas de amoníaco, usando desperdicios orgánicos o la luz del sol como --- fuente de energía.
- Introducir genéticamente la capacidad de fijar nitrógeno dentro de las plantas.

Es por esto que el objetivo del presente trabajo es -- tratar de obtener cambios genéticos favorables en algunas cepas del género Rhizobium inducidas por radiación ultravioleta; como son cambios en la INFECTIVIDAD, o sea, la habilidad de formar nódulos en plantas huéspedes y de la EFFECTIVIDAD, o sea, la capacidad de incorporar cantidades considerables de nitrógeno a la planta huésped y al suelo.

II. REVISION DE LITERATURA

1. PANORAMA GENERAL SOBRE LA OBTENCION DE MUTANTES

En la actualidad, el material más incitante para los estudios genéticos lo constituyen: las levaduras, los mohos, - las bacterias y los virus, especialmente bacterianos o fagos. Su investigación genética data de hace unos 25 años. Ya -- que su pequeño tamaño se consideraba como una enorme desventaja. Actualmente la mutación de un gen solamente puede -- ser reconocida si trae consigo un cambio fenotípico observable; tales cambios pueden describirse en términos gruesos de morfología macroscópica o fisiología. Watson (1974).

La brecha esencial en el empleo de bacterias como material genético se abrió en 1944 con el conocimiento de que podían lograrse mutaciones alterando la capacidad de las bacterias para sintetizar metabolitos esenciales. El uso de este subterfugio condujo rápidamente (con ayuda de los mutágenos) al aislamiento de un gran número de mutaciones genéticas diferentes que afectan la síntesis de moléculas específicas. Estos tipos de mutación habían sido ya descritos -en 1941 en NEUROSPORA, planta inferior haploide (un moho). Den

tro de este tipo de mutaciones se han hecho estudios con cepas del género Rhizobium para comparar la relación entre requerimientos nutricionales y propiedades simbióticas. Dénarié, Truchet & Bergeron (1976).

Otro tipo de mutación importante implica la resistencia de las bacterias a compuestos tóxicos como los antibióticos; de la misma manera, pueden ocurrir mutaciones que hagan las células resistentes a la replicación de los virus - (Watson 1974). Este tipo de mutaciones ha sido también estudiadas por varios autores asociándolos con las propiedades simbióticas de los Rhizobia. Dénarié, Truchet & Bergeron (1976), o usándolos como marcadores en la estimación de la virulencia en cepas de Rhizobia. Imshenetzki, Pariiskaya & Erraiz López (1970).

Durante los últimos diez años se han realizado diversos tipos de mutaciones inducidas en cepas de Rhizobia, --- aparte de los anteriormente citados, la mayoría de los cuales asocian dicho tipo de mutación con las propiedades simbióticas de estas bacterias; entre estos trabajos destacan los que se han enfocado al estudio de los siguientes aspectos:

- Restauración de la actividad.
- Ultraestructura de los nódulos inefectivos.
- Cinética de formación de nódulos.
- Especificidad y competencia.

- Mutantes con funciones tardías en simbiosis.
- Mejoramiento de la efectividad (Nutman 1976).

2. AGENTES MUTAGENICOS

a) Valor de los mutágenos.- La mayoría de los genes mutantes estudiados por los primeros genetistas mendelianos surgían espontáneamente. Hoy existe un incremento en la utilización de mutaciones específicamente inducidas por --- agentes externos, tales como las radiaciones ionizantes, la luz ultravioleta y ciertas sustancias químicas específicas. Estos agentes, denominados en forma colectiva mutágenos, incrementan grandemente la rapidez con que los genetistas pueden aislar mutantes genéticas. Por muchos años, los más - poderosos mutágenos conocidos fueron las diferentes formas de radiación. Ahora se usan con mayor frecuencia los mutágenos químicos, puesto que producen una proporción mucho mayor de genes mutados.

Los mutágenos actúan completamente en forma indiscriminada. Ningún mutágeno conocido actualmente aumenta la proprobabilidad de mutación para un gen dado sin aumentar a su -- vez dicha probabilidad para todos los demás, Watson (1974).

b) Tipos de agentes mutágenos.- En general se observan o describen dos grandes grupos de agentes mutágenos:

- QUIMICOS
- RADIACIONES

Químicos.- Los mutágenos químicos se clasifican en varios grupos según sus acciones: a) Análogos de las bases, b) Hidroxilamina, c) ácido nitroso, d) Agentes alquilantes, e) Derivados de acridina. Se conocen además, otros agentes menos importantes entre los que se incluyen la Nitrosoguanidina (NTG), Mn o el Formaldehído, etc.

Radiaciones.- Las mutaciones pueden inducirse también mediante la energía radiante (luz ultravioleta, rayos gamma, rayos X, etc.), que puede ser absorbida por las bases y ocasionar un cambio estructural en la molécula, Davis (1976).

c) Acción de los agentes mutágenos (acción mutágena vs. acción letal).- La mayoría de los agentes mutágenos pueden matar a los microorganismos debido a que originan mutaciones letales o introducen alteraciones en el ácido nucleico que - transforman su replicación. Ejemplo.- Formando dímeros de timina o uniones cruzadas entre las cadenas, producidas especialmente por agentes alquilantes bifuncionales, tales como mostazas nitrogenadas o mitomicina. El ácido nitroso parece causar la deaminación mutagénica de citosina y adenina, - si bien la deaminación de guanina es letal por no poder leer se el producto resultante, Watson (1974).

d) Luz ultravioleta como agente mutágeno.- Para poder conocer el efecto causado por las radiaciones de luz ultra-violeta, es necesario conocer en primer lugar sus características generales.

Existen ciertas radiaciones que atraviesan la atmósfera de la tierra y son los rayos cósmicos y los ultravioletas. Poseen una gran energía y un extraordinario poder de penetración. Dichas radiaciones están constituidas por electrones y protones que se mueven a una velocidad tremenda y que se originan en las violentas reacciones atómicas del Helio y del Hidrógeno, Stephen-Miall (1943).

Denominamos luz ultravioleta a la radiación que tiene lugar más allá de la zona violeta del espectro luminoso, denominado también electromagnético, con una longitud de onda entre 4000 a 1000 Å (2-3600 Å promedio). Tienen una energía mucho mayor que la de las radiaciones visibles y determina efectos de inducción muy intensos en las reacciones fotoquímicas, pero en cambio, posee un poder de penetración mucho menor, porque dicho poder disminuye con la longitud de onda. Hogg, Bickel, Nicholson y Wik (1970).

Los rayos ultravioleta caen dentro de la clasificación de radiaciones electromagnéticas (Bacq y Alexander 1955). Dichos autores clasifican a las radiaciones en dos grandes grupos:

1.- PARTICULAS

- | | |
|--------------|---|
| | a) ligeras (electrones, electrones positivos, rayos Beta, rayos Beta - positivos) |
| A) con carga | b) pesadas (protones, neutrones, rayos de diferentes iones, rayos alfa) |

- B) sin carga neutrones rápidos
 neutrones térmicos
- C) partículas subatómicas bariones, leptones, neutrinos, muones, etc.

2.- RADIACIONES ELECTROMAGNETICAS

- Ondas de radio
- microondas
- rayos infrarrojos
- luz visible
- rayos ultravioleta
- rayos X
- rayos gamma
- rayos cósmicos

Estas radiaciones electromagnéticas se caracterizan por su energía de acuerdo al flujo de fotones con energía.

Esto se calcula de la manera siguiente (a velocidad constante)

$$E = \frac{h \cdot c}{\text{long. de onda}}$$

donde:

$$c = 2.9979 \times 10^{10} \text{ cm/seg}$$

$$h = 6.62 \times 10^{-27} \text{ ergios/seg (constante de Planck)}$$

(Ichikawa 1975).

e) Alteración del ácido nucléico por radiaciones.- La luz ultravioleta de longitud de onda de aproximadamente --- 3600 Å y las radiaciones ionizantes tales como los rayos X, son instrumentos útiles para producir mutaciones. La energía de los rayos ultravioleta no provoca ionización y es absorbida por moléculas o por algunas fracciones de éstas, dependiendo de su estructura molecular.

Las bases contenidas en los nucleótidos de ADN absorben bien la energía de los rayos ultravioleta con longitud de onda de 2-3600 Å, (Davis 1976).

f) Efecto letal de la luz ultravioleta.- Se reconoce como su efecto químico más importante, ya que la irradiación ultravioleta provoca la hidratación de las pirimidinas en el enlace 4:5. Este cambio en el ADN da lugar a la formación de dímeros entre radicales de timina adyacentes, lo cual ocurre generalmente en la misma cadena y, en ocasiones, en radicales situados en cadenas distintas. En el ARN se forman dímeros de uracilo; dichos dímeros bloquean la replicación del ácido nucléico al no haber bases normales que -- puedan aparearse con ellos, además, cuando la dimerización produce uniones cruzadas entre cadenas distintas, éstas no pueden desenrollarse y separarse para la replicación (Da--vis, 1976).

Ahora bien, no todos los dímeros formados durante la - irradiación son letales, ya que los dímeros pueden eliminar

se mediante dos mecanismos presentes en muchos tipos de células: fotorreactivación y reactivación en la oscuridad, Davis (1976).

g) Inactivación funcional de los genes.- Las alteraciones provocadas en un gen mediante la luz ultravioleta impiden su transcripción (proceso que implica apareamiento de bases por medio de la cual la información genética contenida en el ADN, se utiliza para ordenar una secuencia complementaria de bases en una cadena de ARN). En una misma molécula de ADN se pueden encontrar ciertos genes alterados - no funcionantes, junto a otros en estado normal, Lehninger, (1972).

h) Mutagenesis por radiación ultravioleta.- La luz ultravioleta induce mutaciones puntiformes. Cerca de la mitad de las cuales pueden presentar una reversión mediante análogos de las bases y por tanto pertenecen al grupo de mutaciones denominadas transiciones. En estas mutaciones las alteraciones de la luz ultravioleta se ciñen, al parecer, sobre los pares Guanina - Citosina y, por tanto, consisten en transiciones Guanina - Citosina a Adenina - Timina, la otra mitad son susceptibles de reversión por la acridina por lo cual pertenecen al grupo de mutaciones denominadas alteraciones en la disposición para la lectura, o sea, consisten en la adición o delección de un nucleótico. No está aún aclarado el mecanismo íntimo de la mutagénesis por acción de los rayos ultravioleta pero, según parece, se halla implicada la

formación de dímeros de timina, puesto que una fracción de - las mutaciones es fotorreactivable. La luz ultravioleta no produce deleciones. Lehninger (1972).

i) Agentes mutagénicos en relación con bacterias del género Rhizobium.- Diversos agentes mutagénicos han sido - utilizados en trabajos con Rhizobium. Mutantes obtenidas a partir de la acción selectiva de bacteriófagos y estreptomina. Gupta & Kleczkowska (1962) y la Nitroso guanidina --- (NTG), Schwinghamer (1970). Se ha probado la sensibilidad de cepas de Rhizobium a la acción de agentes mutagénicos como la nitroso metil urea (NMU) y la radiación ultravioleta, Pariiskaya & Titareva (1969). Entre otros agentes mutagénicos utilizados en trabajos con Rhizobium se pueden citar: -- NMU, HNO_3 , etilenimina, Imshenetskii, Pariiskaya & E. Lopez (1970).

j) Luz ultravioleta como mutágeno en Rhizobium.- Gupta y Kleckowska (1962), obtienen mutantes de Rhizobium trifolii por exposición a la luz ultravioleta. Pariiskaya y Titareva (1969), prueban la sensibilidad de Rhizobium meliloti a la acción letal de la radiación ultravioleta. Imshenetskii, Pariiskaya y E. Lopez (1970), prueban, junto a otros agentes mutagénicos, a la radiación ultravioleta en la obtención de - cepas de Rhizobium con incremento de actividad. Lorkiewicz y colaboradores (1971), citado por Nutman (1976), selecciona mutantes de Rhizobium trifolii usando radiación ultravioleta. -

Russel & Jones (1973) prueban el efecto de la radiación ultravioleta en algunas características fisiológicas de ciertas cepas de Rhizobium trifolii.

3.- MUTAGENESIS ESPECIFICAMENTE EN RHIZOBIUM

Durante los últimos 15 años, se han realizado trabajos en diversas partes del mundo enfocados a la obtención de cepas de Rhizobium con cambios espontáneos o inducidos utilizando agentes mutagénicos. En la mayoría de los trabajos se comparan dichos cambios con las propiedades simbióticas de estas bacterias, y algunos han sido enfocados definitivamente al intento de obtener cepas con cambios genéticos favorables en infectividad y efectividad, con el propósito de incrementar la cantidad de nitrógeno que la bacteria incorpora a la planta huésped y al suelo.

a) Efecto de algunas mutaciones en propiedades simbióticas de Rhizobium. Gupta & Kleczkowska (1962), obtienen --mutantes por acción selectiva de bacteriófagos y estreptomina; de las mutantes, aquéllas que fueron resistentes a la estreptomina no resistieron la acción de los fagos y, aquéllas que resultaron fago-resistentes eran sensibles a la estreptomina, sin embargo, de las cepas bajo prueba más del 90% siguieron siendo efectivas. Kleczkowska (1950) citado por Nutman (1976) encuentra que más del 50% de mutantes fago-resistentes mostraron modificación en sus propiedades simbió

ticas; diferenciando tres mecanismos de resistencia a fagos: a) absorción de fagos en la superficie bacteriana, b) penetración del ácido nucléico del fago, y c) no-replicación. - Los primeros mecanismos (a y b) implican la participación de la pared celular de la bacteria. Schwinghamer (1964, - 1967) realiza estudios que asocian la resistencia a los antibióticos con las propiedades simbióticas de mutantes espontáneas de Rhizobium leguminosarum, Rhizobium meliloti, y Rhizobium trifolii. El autor reconoce tres grupos de acuerdo a la modificación presentada en las propiedades simbióticas: Grupo I, donde la mayoría de las mutantes conservan su efectividad, comprende resistentes a: estreptomina, cloranfenicol, espiramicina; Grupo II con pérdida del 50% de efectividad, comprende resistentes a: novobiocina, vacuomicina y penicilina; Grupo III donde la mayoría son totalmente inefectivos comprende resistentes a: neomicina y viomicina. Según el modo de acción de estos antibióticos se agrupan en: Grupo I inhibidores de la síntesis de proteínas, Grupo II inhibidores de la pared y membrana celular y Grupo III inhibidores de la síntesis de proteínas.

Usando nitroso guanidina (NTG), se obtuvo una cepa de Rhizobium leguminosarum con un requerimiento de crecimiento de adenina y timina, la cual fue inefectiva en una variedad de chícharo y no-nodulante en otra, todos los prototróficos revertidos fueron nuevamente efectivos, Schwinghamer (1967). Damery y Alexander (1969).- Obtienen mutantes de Rhizobium

trifolii y Rhizobium leguminosarum resistentes a Kanamicina las cuales produjeron nódulos inefectivos, al comparar diferencias fisiológicas que las cepas mutadas presentaron con respecto a las cepas originales encuentran: mayor inefectividad, cambios en producción de vitamina B₁₂, excreción de ác. pantoténico, niacina y aminoácidos.

Cepas inefectivas seleccionadas produjeron más polisacárido que sus cepas originales. Imshenetskii, Pariiskaya y E. López (1970), intentan obtener mutantes auxótrofas y resistentes a antibióticos, así como modificadas en su actividad simbiótica, utilizando para ello diferentes agentes como: nitrosometilurea (NMU), HNO₃ y etilenimina. De 20 mutantes espontáneas de Rhizobium meliloti estreptomycin resistentes todas fueron activas, mientras que con los demás agentes les fue imposible la obtención de mutantes auxótrofas. Por lo anterior proponen que la resistencia al antibiótico puede ser usada como marcador y factor de diferenciación entre cepas cultivadas y cepas silvestres. Otros autores como Johnston y Beringer (1975), utilizan marcadores genéticos para la identificación de cepas de Rhizobium en nódulos de raíz de chícharos.

Pankhurst, Schwinghamer & Bergersen (1972) estudiaron la ultraestructura así como la actividad de reducción del acetileno en nódulos de raíz, formados por mutantes de Rhizobium trifolii con un requerimiento de riboflavina. Una gran proporción de bacterias en las células huésped no desarrollaron

en bacteroides y la reducción de acetileno fue baja. Al -
adicionar riboflavina se indujo la transformación de bacte-
rias a bacteroides restaurándose la actividad de fijación
de nitrógeno.

b) Mejoramiento de la efectividad en algunas caracte-
rísticas de Rhizobium.- De los trabajos realizados con mu-
tantes de Rhizobium algunos citan mejoramiento en sus propie-
dades simbióticas así como en otras características. Entre
los autores que han obtenido cepas con incremento en su acti-
vidad citaremos los siguientes: Imshenetskii, Pariiskaya y -
E. López (1970), quienes trabajando con Rhizobium meliloti y
diferentes agentes mutagénicos con resistencia a antibióti-
cos, obtuvieron 4 cepas con mayor actividad que la cepa ori-
ginal. Scherrer & Dénarié (1971), aislaron 3 cepas proto-
tróficas revertidas de Rhizobium meliloti auxótrofas para --
adenina y uracilo, las cuales fueron significativamente más
efectivas que las cepas silvestres. Maier, citado por Brill
(1977), aisló una cepa mutante de Rhizobium japonicum con
mayor capacidad de fijación de nitrógeno, al realizar prue-
bas en un suelo de la Universidad de Hawaii libre de otras -
especies de Rhizobium. Mediante estos experimentos prelimi-
nares obtiene una gran producción para la mutante; sin embar-
go, el problema de competencia por bacterias autóctonas per-
manece constante. Beringer, Johnston y Wells (1977), afs-
lan mutantes inefectivas de Rhizobium leguminosarum con una
frecuencia de cerca del 3% de mutación con respecto a sus ce

pas nativas efectivas. Dos mutantes fueron sensibles a temperatura; ellas fueron inefectivas a 26°C pero resultaron -- ser efectivas a 13°C.

c) Mutagénesis y efecto en las propiedades simbióticas inducidas por radiación ultravioleta.- Gupta & Kleczkowska (1962), trabajando con mutantes resistentes a fagos y a estreptomycin, y mutantes inducidas por radiación ultravioleta encontraron que después de la irradiación las cepas no resistieron a ninguno de estos agentes, sin embargo, más del 90% siguieron siendo efectivas. Esto muestra que la radiación ultravioleta no es un método eficiente para obtener mutantes en los caracteres bajo prueba, quedando por comprobar su efecto para incrementar las propiedades simbióticas de -- los Rhizobium. Pariiskaya & Titareva (1969), prueban la sensibilidad de Rhizobium meliloti a la acción de la luz ultravioleta observando que a bajas dosis células de R. meliloti en fase exponencial de crecimiento, son más sensibles a la acción letal de la radiación ultravioleta y que células en fase lag o en fase estacionaria son más resistentes. La dosis letal (LD₉₀) de radiación ultravioleta para R. meliloti fue de 900 a 1100 ergios/mm².

Imshenetskii, Pariiskaya y E. Lopez (1970).- Prueban -- junto con otros agentes mutagénicos a la radiación ultravioleta para intentar obtener mutantes auxótrofas resistentes a antibióticos, resultándoles imposible la obtención de mutantes auxótrofas por este método. Lorkiewikz, et al (1971) -

citado por Nutman (1976), usando radiaciones ultravioleta en Rhizobium trifolii, seleccionaron 18 mutantes auxótrofas entre las que se encontraron tanto virulentas como avirulentas. Estudios posteriores en prototróficos revertidos dieron resultados inesperados, ya que todas permanecieron de una u otra manera con defectos en su virulencia, --- siendo la mayoría avirulentas. Russel & Jones (1973), --- pureban el efecto de la radiación ultravioleta en algunas características fisiológicas de Rhizobium trifolii; encontrando modificaciones en: producción de acidez, tiempo de generación, producción de polisacárido y efectos simbióticos. Se encontró una correlación significativa entre las cepas efectivas y su producción de acidez en medio de agar, sin embargo, no fue así en cultivos líquidos. No se encontró ninguna otra relación entre alguna propiedad fisiológica probada y características simbióticas. No obstante, en este trabajo se describe la obtención de una cepa con incremento en sus propiedades simbióticas.

III.- MATERIALES Y METODOS

1. CEPAS.- Para el presente trabajo se utilizaron cepas nativas de Rhizobium trifolii aisladas de trébol blanco en praderas naturales del Valle de México. Mier (1977).

a) Aislamiento.- Se llevó a cabo a partir de nódulos seleccionados de raíces infectadas de trébol blanco, de --- acuerdo a la edad y lozanía de los nódulos, el aislamiento de las cepas fue realizado de acuerdo a la técnica descrita por Vincent (1975).

b) Comprobación.- Hecha directamente mediante pruebas de infección usando como huéspedes plántulas de trébol rojo y trébol ladino, verificando su capacidad infectiva y efectiva bajo condiciones bacteriológicamente controladas. Se usaron plántulas con edad de 24 horas, sembradas e inoculadas - en tubos de cultivo con medio de agar de Jensen, Vincent --- (1975). El total de cepas probadas fue de 7 y la prueba se realizó bajo condiciones de invernadero, Mier (1977).

c) Caracterización.- Se realizó evaluando la infectividad en base a número de nódulos y tamaño que presentaron -

las plantas después de 30 días de haber sido inoculadas y - desarrolladas bajo condiciones de invernadero.

2. SELECCION.- Una vez comprobadas las cepas como pertenecientes al género Rhizobium, se seleccionaron cinco cepas en base a su capacidad infectiva y efectiva en tipos diferentes de huésped (variedades distintas de trébol), procediendo de la manera siguiente:

PRUEBA DE INFECTIVIDAD Y EFECTIVIDAD

a) Preparación de la semilla.- Se seleccionaron semillas de tres variedades de trébol: Trifolium alexandrinum -- (trébol Berseem), Trifolium pratense (trébol rojo), Trifolium repens (trébol ladino). La selección se realizó en -- base a tamaño y color de las mismas. Se humedecieron con alcohol etílico al 95% y se esterilizaron superficialmente con bicloruro de mercurio ($HgCl_2$) al 0.2% (acidificado con 5ml/lit de ácido clorhídrico (HCL) concentrado) durante tres minutos. Posteriormente, se lavaron vigorosamente 4 veces con agua destilada estéril y se pusieron a germinar sobre papel filtro y algodón estériles en cajas de petri, humedeciendo con agua -- destilada estéril, la incubación fue a 28°C, invirtiendo las cajas para obtener plántulas con raicillas derechas y uniformes.

b) Inoculación de las plántulas.- Para inocular las raicillas de las plántulas se usaron cultivos de Rhizobium de 4

días, crecidos en medio de agar levadura manitol con rojo - congo como indicador (Vincent 1975). La inoculación se llevó a cabo poniendo en contacto la raicilla de las plántulas con el cultivo bacteriano bajo condiciones asépticas.

c) Siembra.- Las plántulas inoculadas se colocaron cuidadosamente en contacto con el medio de agar para plántulas a manera de no deteriorar la raíz; el medio usado fue el de Jensen (1940), citado por Vincent (1975). Una vez -- realizada la siembra, se recubrió la parte inferior del tubo de cultivo con papel de aluminio para proteger las raíces de la luz.

d) Disposición.- Para cada cepa prueba de R. trifolij se usaron 28 tubos de 16 por 150 mm., conteniendo cada uno 8 ml de medio de Jensen sólido, lo que significó un total de 4 tubos para cada cepa y variedad de trébol. En cada tubo se colocaron un total de 4 plántulas lo que representó un total de 16 plántulas inoculadas por cepa y tipo de trébol. Se sembraron además testigos negativos, o sea, plántulas sin inocular tratadas en iguales condiciones que las antes descritas para las plántulas inoculadas.

e) Iluminación y temperatura.- Todas las pruebas se llevaron a cabo bajo condiciones de invernadero.

f) Tiempo de prueba.- Esta prueba se hizo por duplicado durante 30 días a partir de la fecha de inoculación de las plántulas.

g) Evaluación de resultados.- Para ver el grado de infectividad se estimó el número de nódulos promedio por -- planta, y para evaluar la efectividad se usaron como paráme tros: el tamaño, peso húmedo y peso seco de las plantas al término de la prueba comparando, posteriormente, contra los mismos parámetros, con los testigos negativos para calcular el porciento de incremento en cada una de estas caracterís- ticas.

3. CURVAS DE CRECIMIENTO.- Tomando como base que las cé lulas Rhizobium son más resistentes a la acción letal de la radiación ultravioleta en su fase lag o en su fase estacio- naria de crecimiento, Pariiskaya & Titareva (1969), se rea- lizaron pruebas para determinar las curvas de crecimiento - de las cepas seleccionadas anteriormente de la siguiente ma- nera:

a) Inóculo.- Se preparó a partir de cepas crecidas - en medio de agar levadura-manitol con rojo congo como indi- cador; la edad de los cultivos fue de 4 días, de estos cul- tivos se hizo una suspensión agregando solución Ringer esté ril al cultivo, agitando para lograr una suspensión bacte- riana homogénea.

b) Estimación del inóculo.- La densidad del inóculo se estimó midiendo la turbidez de las suspensiones bacterianas con un colorímetro Klett-Summerson modelo 800-3 usando filtro azul. Las suspensiones se igualaron en su densidad utilizano

do la solución Ringer estéril y ajustándolas a una misma lectura del colorímetro.

c) Medio.- El medio fue caldo de levadura-manitol.

d) Condiciones de crecimiento.- Para el desarrollo de las cepas se usaron frascos de 60 ml. de capacidad conteniendo cada uno 20 ml de caldo de levadura e inoculados con 0.5ml de las suspensiones previamente preparadas, todo bajo condiciones de esterilidad, la temperatura de incubación fue de 28°C y con una agitación de 107 rpm.

e) Estimación del crecimiento.- Se realizó en base a la turbidez, para lo cual se usó un colorímetro Klett-Sumner son modelo 800-3 con filtro azul. Las lecturas se hicieron cada 12 horas durante un período de 5 días; para llevar a cabo las lecturas se usó directamente el caldo inoculado sin diluciones y homogenizado por agitación mecánica y ultrasónica, se usó un aparato de ultrasonido NARDA modelo G-201 y -- 90 kcs de frecuencia con lo que se logró desbaratar los agregados formados en el caldo de cultivo.

f) Cuenta.- Se llevó a cabo usando el método de las diluciones y recuento de Rhizobium viables en cajas de Petri Vincent (1975). Las diluciones utilizadas para cada caso fueron de 0 a 10^{-10} , usando para las diluciones solución de Ringer estéril y para la siembra el medio de agar levadura-manitol con rojo congo como indicador, incubando a 28°C . Los volúmenes utilizados por placa fueron de 1.0 ml de inó-

culo para 12 ml de medio. El tiempo de incubación fue de 4 días, al término del cual se llevaron a cabo los conteos.

4. IRRADIACION.- Del cultivo líquido de cada una de las cepas en caldo de levadura manitol en fase estacionaria (4 días de agitación a 28°C) se tomó 1 ml. y se adicionó a 9ml de solución de Ringer estéril, obteniéndose una dilución -- 1:10 (5.7×10^8 cel/ml); se colocaron en cajas de petri estériles y la suspensión se sometió a la acción de la radiación ultravioleta; para lo cual se usó una lámpara cuya intensidad de irradiación es de 19 ergios/seg/mm², a una distancia de 30 cm. Los tiempos de exposición fueron de 10, 20 y 30 segundos, correspondiendo éstos a una intensidad de 190, 380 y 570 ergios. Inmediatamente después de la irradiación se sembró por estría cada una de las cepas en placas de agar levadura manitol con rojo congo. Esta siembra se realizó en un cuarto oscuro auxiliándose con una lámpara de luz roja para el desarrollo de la manipulación, con el propósito de evitar una fotorreactivación. Las cajas fueron envueltas totalmente con papel de aluminio y se incubaron a 28°C durante 24 horas. Pasadas las 24 horas de incubación se quitó la envoltura de papel de aluminio y se incubó nuevamente durante un período de 72 horas más.

a) Aislamiento y selección.- De las colonias desarrolladas después de la irradiación se escogieron aquéllas que presentaban características morfológicas definidas y que no

presentaban zonas de lisis. El aislamiento se llevó a cabo resemebrando dichas colonias en placas de agar levadura--manitol con rojo congo y se procedió a probarlas una vez lograda la purificación de los cultivos.

5. ESTIMACION DE LOS CAMBIOS INDUCIDOS POR EL EFECTO DE - IRRADIACION EN LAS CEPAS SELECCIONADAS.

a) Características microscópicas.- Tomadas en base a la comparación con las cepas respectivas antes de ser irradiadas, las características bajo estudio fueron: forma, tamaño, tinción de gránulos metacromáticos y tinción de Gram.

b) Características macroscópicas.- Las características comparadas fueron: forma de las colonias, abundancia de crecimiento, formación de goma, color de las colonias y consistencia.

c) Cambios en fases de crecimiento.- La observación se realizó haciendo curvas de crecimiento de la misma forma que la descrita en (3), y comparando, mediante gráficas de estas curvas, las fases de crecimiento de las cepas irradiadas contra las de sus cepas nativas sin irradiar.

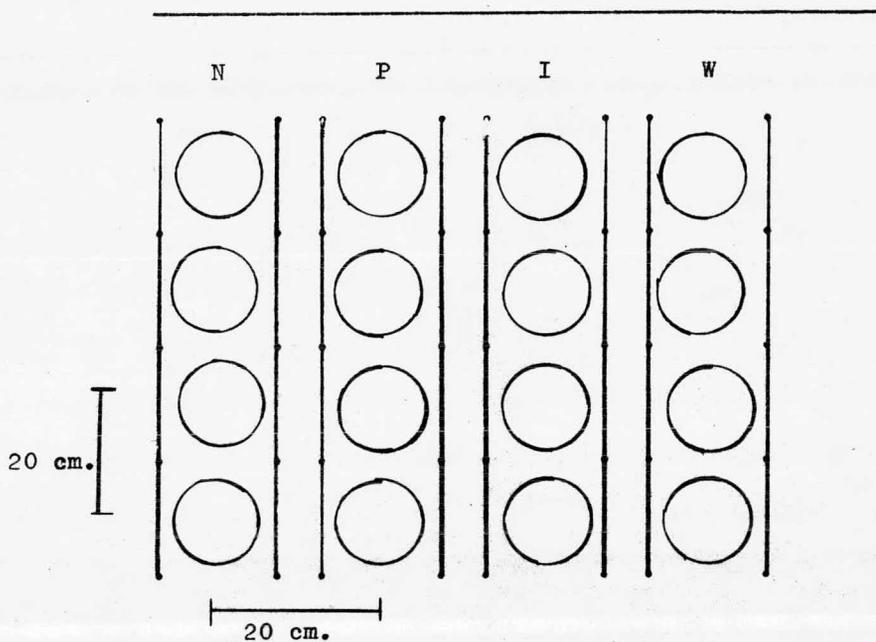
d) Cambios en infectividad y efectividad.- Para estimar estos cambios se hicieron pruebas directas de infección de plántulas en tubos de cultivo con medio de Jensen-agar Vincent (1975), bajo condiciones de invernadero de la misma forma que la descrita en (2).

e) Selección.- Una vez probada la infectividad y efectividad de las cepas irradiadas para cada variedad de trébol se seleccionaron aquéllas que tuvieron el mayor incremento -- en estas propiedades.

7. PRUEBAS DE INVERNADERO.- Se realizaron únicamente para las cepas seleccionadas después de la irradiación, así como para sus respectivas cepas nativas no irradiadas; en ambos casos, los resultados de esta prueba fueron comparados con los obtenidos con testigos de plántulas sin inocular (sin fuente de nitrógeno en el medio o testigos negativos y con fuente de nitrógeno en el medio en forma de KNO_3 o testigos positivos). Las pruebas se llevaron a cabo usando como dispositivo la "Jarra Botella" de Leonard, Vincent (1975), la solución nutritiva usada para las plántulas fue el medio de Jensen. El número de semillas para cada jarra fue de 50 a 40, realizándose después un aclaramiento o selección al azar de las plántulas germinadas, dejando 30 plantas por jarra. El tiempo de prueba fue de 40 días.

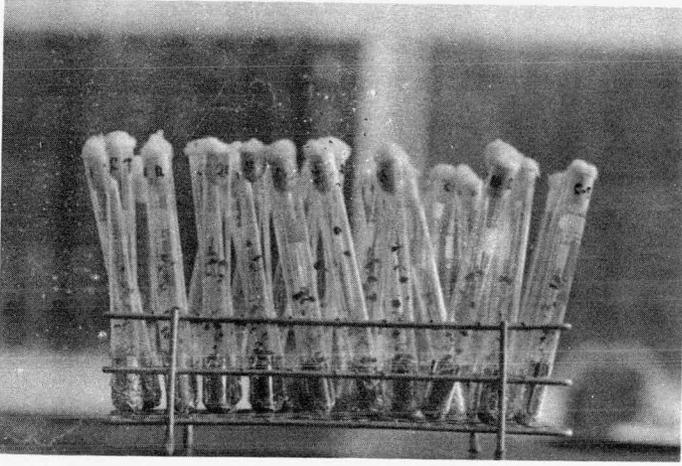
El diseño de esta prueba se ilustra en la figura 6.1 -- donde los tratamientos de inoculaciones se disponen en hileras para minimizar las contaminaciones cruzadas.

Al final de la prueba la estimación de las características de infectividad y efectividad de las cepas irradiadas con respecto a las no irradiadas y a los testigos positivos y negativos, se llevó a cabo en la misma forma que la descrita en (2-g).

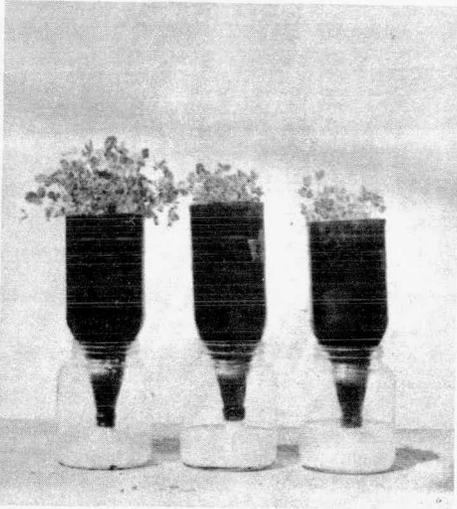


- N = Franja de jarras sin inóculo y sin fuente de Nitrógeno en el medio (testigo negativo)
- P = Franja de jarras sin inóculo y con fuente de Nitrógeno (KNO_3) en el medio (testigo positivo)
- I = Franja de jarras con inóculo de cepas irradiadas y sin fuente de Nitrógeno en el medio
- W = Franja de jarras con inóculo de cepas nativas sin irradiar y sin fuente de Nitrógeno en el medio

Fig. 6.1.- Diseño del ensayo simplificado de invernadero para investigar respuesta a la inoculación.



A



B

Dispositivos utilizados para la evaluación de la nodulación y la fijación de nitrógeno.

A.- tubos de cultivo (pruebas de laboratorio)

B.- "jarras botella" de Leonard (pruebas de invernadero)

7. ANALISIS ESTADISTICO.- Basado en ensayos de significación mediante la distribución t de "STUDENT", para las pruebas de invernadero con intervalos de confianza de 95 y 99%.

Los estadísticos estudiados fueron: Peso húmedo de las plantas, Peso seco, Tamaño y Número de nódulos. Con un nivel de significación de 0.01 y 0.05, o sea, que los estadísticos bajo estudio serán significativos para valores de $t \geq 1.66$ para un intervalo de confianza del 95%, y $t \geq 2.36$ para un intervalo de confianza del 99% como se muestra en la tabla 7.1.

El análisis se llevó a cabo con una minicomputadora Olivetti-602 con un programa (#3) para obtener la prueba de "t" en muestras no pareadas.

Las fórmulas empleadas para este ensayo fueron las siguientes:

a) Media Aritmética (\bar{X})

$$\bar{X} = \frac{\sum X}{n}$$

donde: n = número total de individuos o población

X = suma total de datos.

b) Varianza (S)

$$S = \sqrt{\frac{\sum X^2}{n-1} - \bar{X}^2}$$

donde: n = número total de individuos

\bar{X} = media aritmética

X = suma total de datos

c) Desviación Típica (S^2)

$$S^2 = \sqrt{\frac{(X - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

donde: X = suma total de datos

\bar{X} = media aritmética

n = número total de individuos

d) Error Estándar (EE)

$$EE = \frac{S}{\sqrt{n}}$$

donde: S = Varianza

n = número total de individuos

e) Distribución t de "STUDENT" (t)

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{EE_1^2 + EE_2^2}}$$

donde: \bar{X}_1 = media aritmética 1

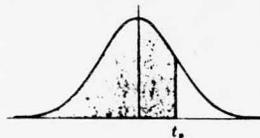
\bar{X}_2 = media aritmética 2

EE_1 = error estándar 1

EE_2 = error estándar 2

La población total para la prueba de "t" fue de 100 individuos.

**PERCENTILES (t_p)
DE LA
DISTRIBUCION t DE STUDENT
CON v GRADOS DE LIBERTAD
(AREA SOMBRADA = p)**



v	$t_{0.995}$	$t_{0.99}$	$t_{0.975}$	$t_{0.95}$	$t_{0.90}$	$t_{0.80}$	$t_{0.75}$	$t_{0.70}$	$t_{0.60}$	$t_{0.55}$
1	63.66	31.82	12.71	6.31	3.08	1.376	1.000	0.727	0.325	0.158
2	9.92	6.96	4.30	2.92	1.89	1.061	0.816	0.617	0.289	0.142
3	5.84	4.54	3.18	2.35	1.64	0.978	0.765	0.584	0.277	0.137
4	4.60	3.75	2.78	2.13	1.53	0.941	0.741	0.569	0.271	0.134
5	4.03	3.36	2.57	2.02	1.48	0.920	0.727	0.559	0.267	0.132
6	3.71	3.14	2.45	1.94	1.44	0.906	0.718	0.553	0.265	0.131
7	3.50	3.00	2.36	1.90	1.42	0.896	0.711	0.549	0.263	0.130
8	3.36	2.90	2.31	1.86	1.40	0.889	0.706	0.546	0.262	0.130
9	3.25	2.82	2.26	1.83	1.38	0.883	0.703	0.543	0.261	0.129
10	3.17	2.76	2.23	1.81	1.37	0.879	0.700	0.542	0.260	0.129
11	3.11	2.72	2.20	1.80	1.36	0.876	0.697	0.540	0.260	0.129
12	3.06	2.68	2.18	1.78	1.36	0.873	0.695	0.539	0.259	0.128
13	3.01	2.65	2.16	1.77	1.35	0.870	0.694	0.538	0.259	0.128
14	2.98	2.62	2.14	1.76	1.34	0.868	0.692	0.537	0.258	0.128
15	2.95	2.60	2.13	1.75	1.34	0.866	0.691	0.536	0.258	0.128
16	2.92	2.58	2.12	1.75	1.34	0.865	0.690	0.535	0.258	0.128
17	2.90	2.57	2.11	1.74	1.33	0.863	0.689	0.534	0.257	0.128
18	2.88	2.55	2.10	1.73	1.33	0.862	0.688	0.534	0.257	0.127
19	2.86	2.54	2.09	1.73	1.33	0.861	0.688	0.533	0.257	0.127
20	2.84	2.53	2.09	1.72	1.32	0.860	0.687	0.533	0.257	0.127
21	2.83	2.52	2.08	1.72	1.32	0.859	0.686	0.532	0.257	0.127
22	2.82	2.51	2.07	1.72	1.32	0.858	0.686	0.532	0.256	0.127
23	2.81	2.50	2.07	1.71	1.32	0.858	0.685	0.532	0.256	0.127
24	2.80	2.49	2.06	1.71	1.32	0.857	0.685	0.531	0.256	0.127
25	2.79	2.48	2.06	1.71	1.32	0.856	0.684	0.531	0.256	0.127
26	2.78	2.48	2.06	1.71	1.32	0.856	0.684	0.531	0.256	0.127
27	2.77	2.47	2.05	1.70	1.31	0.855	0.684	0.531	0.256	0.127
28	2.76	2.47	2.05	1.70	1.31	0.855	0.683	0.530	0.256	0.127
29	2.76	2.46	2.04	1.70	1.31	0.854	0.683	0.530	0.256	0.127
30	2.75	2.46	2.04	1.70	1.31	0.854	0.683	0.530	0.256	0.127
40	2.70	2.42	2.02	1.68	1.30	0.851	0.681	0.529	0.255	0.126
60	2.66	2.39	2.00	1.67	1.30	0.848	0.679	0.527	0.254	0.126
120	2.62	2.36	1.98	1.66	1.29	0.845	0.677	0.526	0.254	0.126
∞	2.58	2.33	1.96	1.645	1.28	0.842	0.674	0.524	0.253	0.126

Procedencia: R. A. Fisher y F. Yates, *Statistical Tables for Biological, Agricultural and Medical Research* (5.ª edición), Tabla III, Oliver and Boyd Ltd., Edimburgo, con permiso de los autores y editores.

IV.- RESULTADOS Y DISCUSION

Mediante el método de comprobación en base a infectividad y efectividad en pruebas de laboratorio, se puede apreciar (Cuadro # 1) que las cepas 2, 8 y 9 resultaron ser las más infectivas para trébol rojo y ladino, mientras que la cepa # 4 fue la de menor infectividad junto con la # 3. La mayor efectividad para trébol rojo fue mostrada por las cepas 1 y 9, y para trébol ladino la cepa 9 resultó ser la más efectiva; las cepas 3, 5 y 8 mostraron una efectividad media para ambos tipos de trébol, finalmente, las cepas 2 y 4 resultaron ser poco efectivas para las dos variedades de trébol probadas.

Una segunda selección (Cuadro # 2) nos permite corroborar las características de infectividad y efectividad de las cepas probadas; por los resultados observamos que las cepas 1, 3, 5 y 9, mostraron ser infectivas para las tres variedades de trébol probadas; la cepa 8 fue infectiva únicamente para trébol Berseem y las cepas 2 y 4 resultaron no ser infectivas para ninguno de los tres tipos de trébol. Con respecto a la efectividad (capacidad de fijación de ni-

trógeno) evaluada por: tamaño de la plántula, número de hojas, peso seco y peso húmedo de las mismas, las cepas 1, 3, 5, 8 y 9 mostraron de una manera general, haber producido un incremento en las plantas, mientras que las cepas 2 y 4 no mostraron haber producido beneficio alguno, por lo que fueron descartadas del material para el presente trabajo.

En el Cuadro # 3, se presentan los datos del porciento de incremento en tamaño, peso seco y peso húmedo, de las plántulas inoculadas con las cepas 1, 3, 5, 8 y 9.

En las figuras 1, 2 y 3, se muestran las curvas de crecimiento de las cepas seleccionadas. Se puede apreciar que bajo las condiciones de pureza, todas las cepas alcanzaron su fase estacionaria de crecimiento en un intervalo de tiempo entre 96 y 120 horas después de iniciada la prueba, lo cual permitió uniformizar el período de tiempo o edad de los cultivos para llevar a cabo la irradiación, debido a que es en esta fase de crecimiento donde las células de Rhizobium son más resistentes a la acción letal de la radiación ultravioleta, Pariiskaya & Titareva (1969).

Características Microscópicas.- El efecto sobre algunas características morfológicas y tintoriales se muestran en el Cuadro # 4, donde apreciamos que las cinco cepas sometidas a tres tiempos de irradiación, equivalentes a una intensidad de 190, 380 y 570 ergios/seg/mm², conservaron la misma forma, tamaño y características tintoriales. Se pue-

de considerar que no hubo cambios aparentes en las cepas -- irradiadas con respecto a las cepas nativas no irradiadas - en lo que a características microscópicas estudiadas se refiere.

Características de cultivo.- En el Cuadro # 5 se reporta el efecto de irradiación en algunas características - de cultivo de las cepas, después de 96 horas de incubación, encontrándose los siguientes resultados: la forma de las colonias, de manera general, no sufrió un cambio aparente; -- por lo que al desarrollo de las mismas se refiere, en algunos de los casos fue menor en las irradiadas que en las cepas nativas sin irradiar; con las cepas 3 y 8 se observó -- que a una mayor intensidad de irradiación correspondió un - menor desarrollo, mientras que para las demás cepas no se - apreció, aparentemente, una correlación entre la intensidad de irradiación y el desarrollo de las colonias. En ninguno de los casos se presentó un mayor desarrollo en las cepas - irradiadas, con respecto a las cepas nativas no irradiadas. Al apreciar el color de las colonias se notó un mayor efecto de irradiación en esta característica, ya que la mayoría de las cepas después de la irradiación desarrollaron, en el medio de agar levadura-manitol con rojo congo, colonias con una mayor capacidad para absorber el indicador, las tonalidades que adoptaron las cepas después de la irradiación, -- fueron del rosa a un color rojizo, a excepción de la cepa - # 1, la cual a una intensidad de irradiación de 570 ergs. -

desarrolló colonias de color blanco en este medio, así como la cepa # 9 que a una intensidad de irradiación de 380 ergs. desarrolló colonias amarillentas y la cepa # 8 que a 570 -- ergios de irradiación dió colonias incoloras. Estos resul^utados nos llevan a pensar que en algunas cepas, a cierta in^utensidad de irradiación se pueden presentar cambios en la - membrana. No se observó una correlación entre la intensi^udad de irradiación y los cambios en la coloración de las co^ulonias. Finalmente, se observó que, de manera general, la producción de goma fue menor en todas las cepas después de haber sido irradiadas.

Infectividad y Efectividad.- La estimación de los cam^ubios inducidos por el efecto de irradiación en la infectivi^udad y efectividad de las cepas, en pruebas de laboratorio, - aparecen en los cuadros 6, 7 y 8; podemos observar (Cuadro # 6) que para una irradiación de 10 segundos (190 ergs), la in^ufectividad de las cepas a excepción de la # 9, presentó de - manera general cambios negativos, este efecto se manifestó - por la falta de nodulación, la cual resultó más evidente en el trébol berseem con las cepas 1, 3 y 5; en segundo lugar, en el trébol rojo con las cepas 3 y 8, y, por último, en el trébol ladino únicamente con la cepa 8. En la infectividad de la cepa # 9 no se apreció, aparentemente, un efecto negati^uvo no obstante, aún con esta cepa, el efecto de radiación continua siendo más negativo en el trébol Berseem, si compara^umos el valor promedio de este último de 0.5, contra el de

2.0 reportado tanto en trébol rojo como ladino (Cuadro # 6). Por otra parte, la efectividad parece no afectarse a esta intensidad de irradiación. En la mayoría de los casos la presencia de nódulos corresponde a un incremento en el desarrollo de las plántulas (Cuadro # 6). Mediante el incremento en peso seco, el máximo de efectividad se puede apreciar con las cepas 5 y 1, en trébol ladino, en primero y segundo lugar respectivamente; en tercer lugar, con la cepa 9 en trébol rojo y, por último, con las cepas 3 y 9 en trébol ladino cuarto y quinto lugar respectivamente.

Para un tiempo de irradiación de 20 segundos (380 ergs) podemos apreciar (Cuadro # 7): Ausencia de nodulación con las cepas 1 y 9 en trébol rojo, las cepas 5 y 8 en trébol ladino y, por último, las cepas 8 y 9 en trébol Berseem. Sólo con la cepa 5 en trébol rojo, la nodulación resultó inefectiva en base a la falta de incremento en peso seco de las plántulas (Cuadro # 7). En este mismo Cuadro se aprecia que las cepas 1 y 9 en trébol ladino, dieron el máximo rendimiento en peso seco, lo que indica un considerable aumento en su efectividad, con respecto a los resultados obtenidos con una intensidad de irradiación de 190 ergios. La cepa 3 en trébol rojo y berseem, mejoró aparentemente tanto en su infectividad como en la efectividad con esta dosis de radiación, en comparación a lo obtenido con 190 ergios, esto mismo se puede observar con la cepa 5 en trébol berseem.

Resulta evidente que la radiación, a una intensidad de 570 ergios, (Cuadro # 8) disminuyó tanto la infectividad como la efectividad de las cepas. A excepción de la cepa 3 en un trébol ladino, todas las cepas mostraron una disminución en su capacidad de nodulación, por otra parte, la capacidad para fijar el nitrógeno, en base a incremento en peso seco, se vió notablemente disminuida en la mayoría de las cepas.

Pruebas de Invernadero.- De las pruebas anteriores se seleccionaron tres cepas para ser utilizadas en las pruebas de invernadero. Esta selección se realizó tomando en cuenta el incremento, tanto en infectividad como en la efectividad, que experimentaron las cepas en cada una de las dosis de radiación probadas y en las tres variedades de trébol bajo estudio. De acuerdo a este criterio resultaron seleccionadas las siguientes cepas: para trébol ladino la cepa # 9 - irradiada durante 20 segundos (380 ergios), para trébol rojo la misma cepa # 9 irradiada durante 10 segundos (190 ergios) y por último, para trébol berseen la cepa # 5 con 20 segundos de irradiación (380 ergios).

Las figuras 4 y 5 muestran los cambios inducidos por el efecto de irradiación en las diferentes fases de crecimiento de las cepas seleccionadas, con respecto a sus cepas nativas sin irradiar. Se observa que en el caso de la cepa # 9 a un tiempo de irradiación de 10 segundos, la fase de adapta--

ción (lag) y la fase logarítmica (log) no presentan cambios notables, mientras que para una irradiación de 20 segundos se puede apreciar que la fase de adaptación al medio es mayor que para la cepa nativa, y que al alcanzarse la fase estacionaria la turbidez del medio indica un menor desarrollo con respecto a la cepa nativa no irradiada.

Los cambios inducidos en la cepa # 5, irradiada durante 20 segundos, se muestran en la figura # 5. Se observa que las fases de adaptación y logarítmica no sufrieron cambios significativos. En todos los casos tanto las cepas nativas como las irradiadas, alcanzaron su fase estacionaria de crecimiento a las 96 horas.

Análisis Estadísticos.- En los cuadros 9 al 14 se reportan los resultados obtenidos en infectividad (capacidad de nodulación) y efectividad (fijación de nitrógeno), que se hicieron en base al incremento en número de nódulos tamaño, peso húmedo y peso seco, en comparación con los experimentos testigo (sin inoculante) con y sin fertilizante nitrogenado, es decir, testigos positivo y negativo respectivamente.

La cepa # 9 irradiada 20 segundos, usada como inóculo en trébol ladino, mostró haber mejorado a la planta en las características bajo prueba, en mayor grado que con empleo de fertilizante nitrogenado (testigo positivo) y usando la misma cepa nativa sin irradiar como inóculo (Cuadro # 9).

Podemos observar (Cuadro # 10) que los valores obtenidos para la distribución t de Student muestran ser altamente significativos, con un intervalo de confianza del 99%, - exceptuando en el tamaño entre la planta inoculada con la cepa irradiada y el tamaño de la misma usando fertilizante nitrogenado, ya que se obtiene un valor de 1.89 que no es significativo a un intervalo de confianza del 99% pero que resulta ser significativo a un intervalo del 95% (ver Tabla 7.1).

En el trébol rojo inoculado con la cepa # 9, irradiada 10 segundos (Cuadro # 11) observamos que el efecto presentado en la planta es menor en las características bajo prueba que el presentado en las pruebas con fertilizante nitrogenado y con la cepa # 9 nativa sin irradiar; a pesar de esto, las plantas mostraron ser beneficiadas al ser comparadas -- con los testigos negativos, lo que indica que las propiedades simbióticas de la cepa irradiada no se perdieron por el efecto de irradiación.

La significación en las pruebas de invernadero (Cuadro # 12) que la cepa irradiada presentó con respecto al testigo negativo, corrobora que dicha cepa conservó sus características simbióticas, aunque en menor grado que su cepa nativa sin irradiar.

La cepa # 5 irradiada 20 segundos, utilizada como inóculo para trébol berseem, presenta un incremento en sus ca--

racterísticas simbióticas de infectividad y efectividad con respecto a su cepa nativa sin irradiar (Cuadro # 13), siendo superada únicamente con el uso de fertilizante nitrogenado (testigo positivo).

La significación en la distribución t de Student, con un intervalo de confianza del 99% fue sumamente notable al comparar la cepa # 5, irradiada 20 segundos, con respecto a su cepa nativa y al testigo negativo (Cuadro # 14).

Comprobación en tubos de cultivo de cepas nativas de Rhizobium trifolii, en base a las propiedades de INFECTIVIDAD y EFECTIVIDAD

Cepa	tipo de trébol	Infectividad	Efectividad
1	Rojo	++	+++
	Ladino	++	++
2	Rojo	++	+
	Ladino	+++	+
3	Rojo	+	++
	Ladino	+	++
4	Rojo	+	+
	Ladino	+	+
5	Rojo	++	++
	Ladino	++	++
8	Rojo	+++	++
	Ladino	+++	++
9	Rojo	+++	+++
	Ladino	+++	+++

indicaciones: + escaso
 ++ regular
 +++ abundante

Pruebas de infectividad y efectividad en tubos -
de cultivo, de las cepas nativas de Rhizobium trifolii.

cepa	tipo trébol	tamaño plántula (cm)	número de nódulos (prom)	número de hojas (prom)	peso húmedo (mg)	peso seco (mg)
T (-)	Ladino	4.825	0.0	5.875	8.125	4.00
	Rojo	7.060	0.0	9.000	25.142	11.00
	Berseem	7.275	0.0	11.250	53.750	34.00
1	Ladino	5.380	2.0	6.625	11.750	9.00
	Rojo	8.500	1.7	10.000	37.200	20.00
	Berseem	8.680	2.0	10.370	67.200	37.00
2	Ladino	4.387	0.0	5.375	8.870	7.00
	Rojo	7.150	0.0	9.500	25.500	19.00
	Berseem	7.180	0.0	11.000	55.500	38.00
3	Ladino	5.110	4.3	6.125	11.870	5.00
	Rojo	8.750	2.4	9.250	31.600	25.00
	Berseem	7.620	1.8	11.370	61.000	58.00
4	Ladino	5.050	0.0	5.280	9.420	4.00
	Rojo	8.370	0.0	9.750	31.100	35.00
	Berseem	7.500	0.0	11.120	56.200	56.00
5	Ladino	6.280	2.0	6.850	14.140	8.00
	Rojo	8.680	1.5	9.500	36.800	25.00
	Berseem	8.500	1.8	10.870	55.500	40.00
8	Ladino	5.375	0.0	5.875	11.250	7.00
	Rojo	8.375	0.0	11.125	36.000	30.00
	Berseem	8.250	1.7	11.500	57.000	38.00
9	Ladino	5.560	1.6	6.000	12.120	9.00
	Rojo	8.310	1.6	10.620	37.900	36.00
	Berseem	8.500	2.7	10.750	57.000	42.00

Indicaciones: T (-) testigo negativo (plántulas sin inocular)

Porcentaje de incremento en tamaño, peso húmedo y peso seco de las plántulas de trébol inoculadas-en comparación a testigos sin inocular.

espa	trébol	incremento en tamaño	incremento en peso húmedo	incremento en peso seco
	Ladino	11.50	44.61	125.00
	Rojo	20.39	47.95	81.80
	Berseem	19.31	25.02	8.80
	Ladino	5.90	46.09	25.00
	Rojo	23.90	25.68	72.72
	Berseem	4.74	13.48	70.58
	Ladino	30.15	74.03	100.00
	Rojo	22.90	46.36	27.27
	Berseem	16.80	3.25	17.60
	Ladino	11.39	38.46	75.00
	Rojo	18.62	43.18	72.72
	Berseem	13.40	6.04	11.76
	Ladino	15.23	49.16	125.00
	Rojo	17.70	50.74	27.27
	Berseem	16.80	6.04	23.52

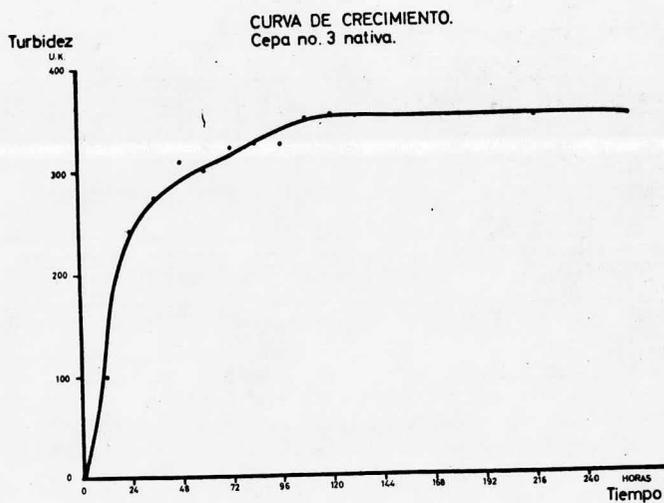
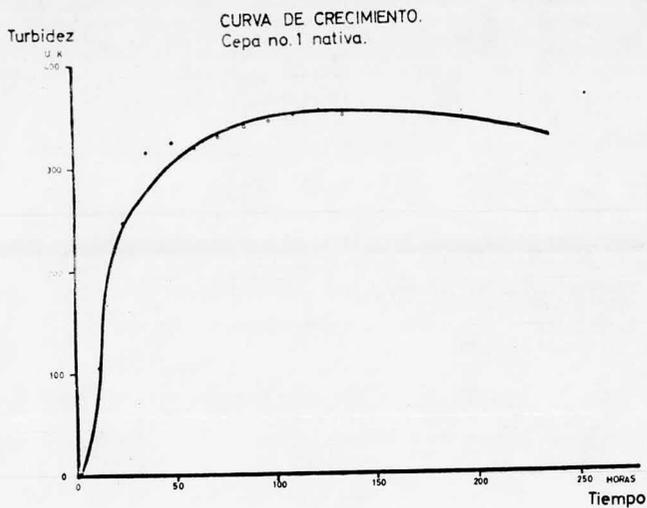


Fig. 1.- Determinación de la fase estacionaria de cepas nativas de Rhizobium trifolii en caldo de levadura-manitol.

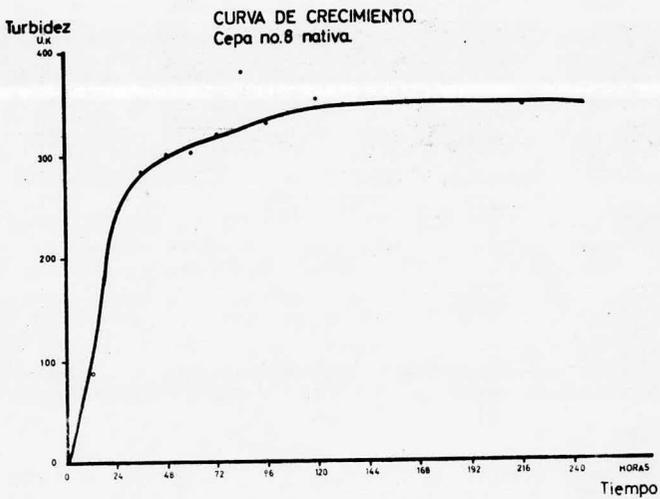
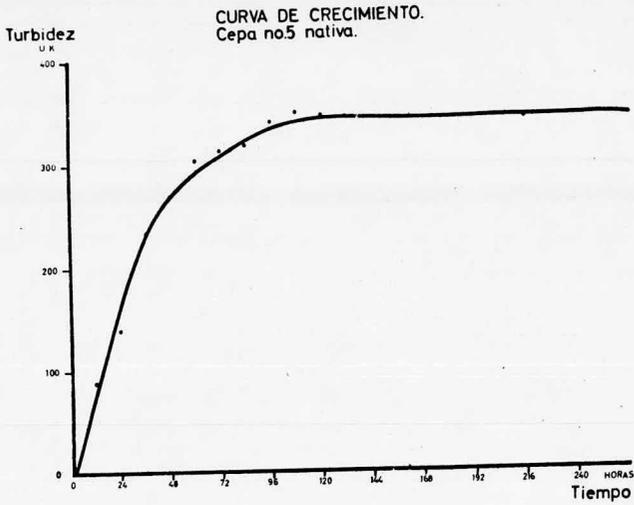


Fig. 2 .- Determinación de la fase estacionaria de cepas nativas de Rhizobium trifolii en caldo de levadura-manitol

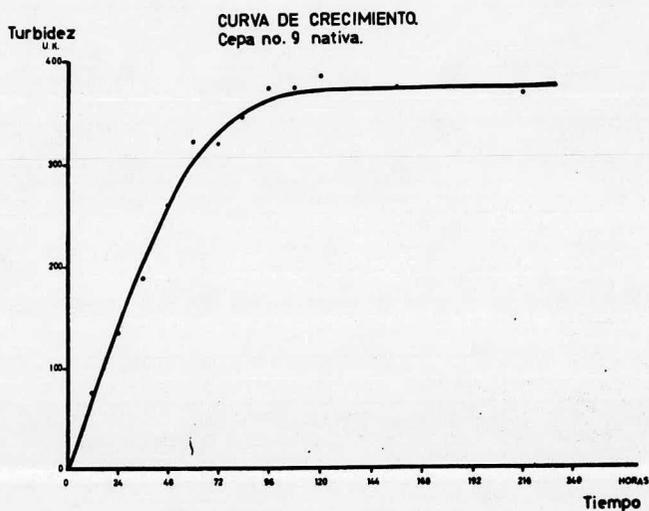


Fig. 3 .- Determinación de la fase estacionaria de cepas nativas de Rhizobium trifolii en caldo de levadura-manitol.

Estimación del efecto de irradiación en algunas características morfológicas y tintoriales.

Cepa	intensidad de irradiación (ergios)	Forma	tinción de Gram	tamaño (micras)	tinción de gránulos metacromáticos
1	0	bacilo	-	3	+
1	190	bacilo	-	2-3	+
1	380	bacilo	-	3	+
1	570	bacilo	-	3	+
3	0	bacilo	-	2	+
3	190	bacilo	-	2	+
3	380	bacilo	-	2-3	+
3	570	bacilo	-	2-3	+
5	0	bacilo	-	3	+
5	190	bacilo	-	3	+
5	380	bacilo	-	2-3	+
5	570	bacilo	-	3	+
8	0	bacilo	-	3	+
8	190	bacilo	-	3	+
8	380	bacilo	-	2-3	+
8	570	bacilo	-	2-3	+
9	0	bacilo	-	3	+
9	190	bacilo	-	2-3	+
9	380	bacilo	-	2	+
9	570	bacilo	-	2-3	+

indicaciones: (-) negativo
(+) positiva

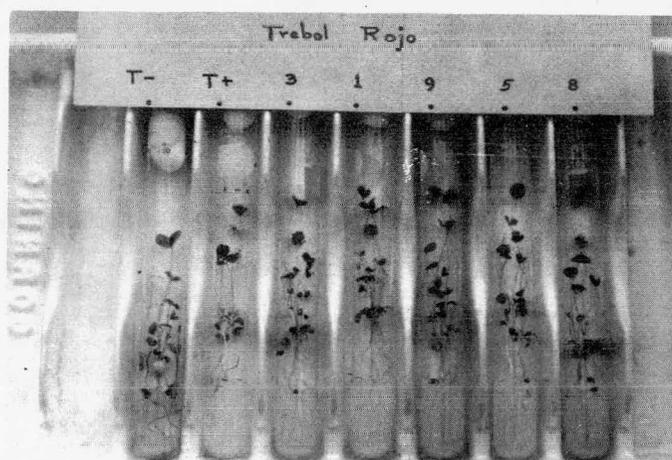
Estimación del efecto de irradiación en algunas características de cultivo de las cepas

Desarrollo en agar levadura-manitol con rojo-congo a 28°C y 96 horas de incubación.

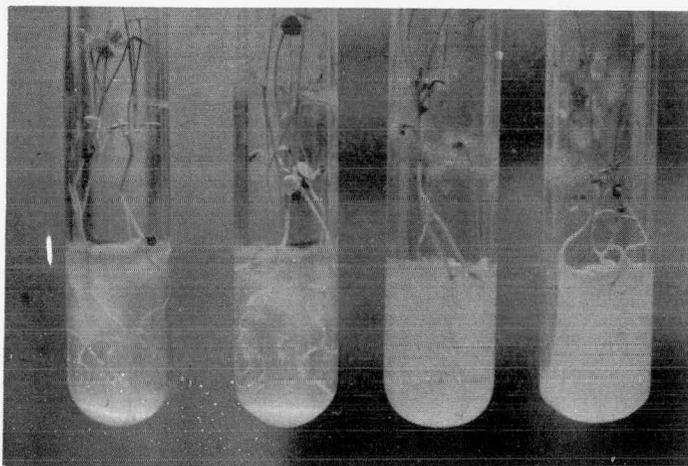
Cepa	intensidad de irradiación (ergios)	Forma colonial	Desarrollo	Color	Producción de goma
1	0	lisa	++++	incolora	++++
1	190	-	+++	rojiza	++
1	380	-	+++	rosada	++
1	570	-	+++	blanca	++
3	0	lisa	++++	incolora	++++
3	190	-	+++	rojiza	+
3	380	-	++	rosada	+
3	570	-	++	rojiza	+
5	0	lisa	+++	blanca	++++
5	190	-	++	rosada	+
5	380	-	+++	rojiza	+
5	570	-	+++	rojiza	+
8	0	lisa	+++	blanca	++++
8	190	-	+++	rojiza	+
8	380	-	+	rojiza	+
8	570	-	+	incolora	+
9	0	lisa	+++	blanca	++++
9	190	-	+++	rosada	+
9	380	-	++++	amarillenta	++
9	570	-	++	rojiza	++

indicaciones: + escaso
 ++ regular
 +++ abundante
 ++++ muy abundante

- ningún cambio aparente



A



B

Diferente respuesta de la plántula debida a
nodulación efectiva.

A.- Efectividad (capacidad de fijar nitrógeno)

B.- Inefectividad (capacidad de nodulación)

Estimación del efecto de la irradiación ultravioleta en la INFECTIVIDAD y EFECTIVIDAD de cepas de Rhizobium trifolii, en tubos de cultivo con un tiempo de irradiación de 10 seg. y una intensidad de 190 ergios.

No. Cepa	Trébol	Tamaño de la planta (cm)	No. de nódulos (promedio)	No. de hojas (promedio)	peso húmedo promedio (mg)	peso seco promedio (mg)	incremento en tamaño (%)	incremento en peso húmedo (%)	incremento en peso seco (%)
T (-)	Ladino	4.0	0.0	4.00	6.50	3.3	-	-	-
T (-)	Rojo	6.0	0.0	6.75	30.00	21.0	-	-	-
T (-)	Berseeem	7.0	0.0	6.50	40.00	26.0	-	-	-
1*	Ladino	5.5	1.5	5.00	12.00	5.7	37.50	72.30	72.72
1	Rojo	6.5	0.7	5.75	33.00	22.8	8.33	10.00	8.57
1	Berseeem	7.0	0.0	7.00	42.00	27.0	0.00	5.00	3.80
3	Ladino	5.0	0.5	6.00	10.00	5.1	25.00	53.84	54.54
3	Rojo	6.0	0.0	5.75	28.90	19.3	0.00	0.00	0.00
3	Berseeem	6.0	0.0	7.00	41.00	24.9	0.00	2.50	0.00
5	Ladino	6.0	1.0	6.00	12.20	6.0	50.00	87.69	81.81
5	Rojo	7.5	1.2	7.00	35.00	24.8	25.00	16.60	18.09
5	Berseeem	7.0	0.0	7.00	42.00	26.0	0.00	5.00	0.00
8	Ladino	3.7	0.0	5.00	6.30	3.2	0.00	0.00	0.00
8	Rojo	7.5	0.0	6.00	34.00	24.3	25.00	13.30	15.71
8	Berseeem	7.2	0.2	6.00	39.00	23.0	2.85	0.00	0.00
9	Ladino	5.0	2.0	5.75	10.90	5.0	25.00	67.69	52.12
9	Rojo	9.5	2.0	6.00	43.00	33.2	58.33	43.30	58.09
9	Berseeem	7.0	0.5	8.25	39.80	26.2	0.00	0.00	0.76

Indicaciones: T (-) plántulas sin inoculante
 Promedios en base a 20 plántulas por cepa y variedad de trébol.

Estimación del efecto de la irradiación ultravioleta en la INFECTIVIDAD y EFECTIVIDAD de cepas de Rhizobium trifolii, en tubos de cultivo con un tiempo de irradiación de 20 seg. y una intensidad de 380 ergios.

No. Cepa	Trébol	tamaño de la planta (cm)	No. de nódulos (promedio)	No. de hojas (promedio)	peso húmedo promedio (mg)	peso seco promedio (mg)	incremento en tamaño (%)	incremento en peso húmedo (%)	incremento en peso seco (%)
T (-)	Ladino	4.0	0.0	4.00	6.50	3.30	-	-	-
T (-)	Rojo	6.0	0.0	6.75	30.00	21.00	-	-	-
T (-)	Berseem	7.0	0.0	6.50	40.00	26.00	-	-	-
1	Ladino	6.5	1.7	6.00	12.40	6.33	62.50	90.70	91.80
1	Rojo	7.0	0.0	6.25	34.00	23.80	16.60	13.30	13.30
1	Berseem	6.8	0.5	6.00	48.30	32.30	0.00	20.75	24.23
3	Ladino	6.0	1.0	3.50	11.80	5.70	50.00	81.53	72.72
3	Rojo	9.0	1.0	7.00	38.00	27.60	50.00	26.66	31.42
3	Berseem	7.0	0.5	5.75	48.30	39.70	0.00	20.75	52.69
5	Ladino	3.3	0.0	4.50	6.00	3.20	0.00	0.00	0.00
5	Rojo	6.5	0.7	6.75	28.00	20.00	8.33	0.00	0.00
5	Berseem	7.2	2.0	6.50	51.30	37.90	2.85	28.25	45.76
8	Ladino	3.7	0.0	3.50	5.90	3.10	0.00	0.00	0.00
8	Rojo	7.0	2.5	6.25	34.30	22.90	16.60	14.33	9.04
8	Berseem	6.7	0.0	7.00	48.00	32.80	0.00	20.00	26.15
9	Ladino	6.0	2.0	5.25	13.00	6.57	50.00	100.00	99.09
9	Rojo	6.5	0.0	5.25	25.30	18.40	8.33	0.00	0.00
9	Berseem	7.1	0.0	4.00	39.50	25.90	0.00	0.00	0.00

Indicaciones: T (-) plántulas sin inoculante

Promedios en base a 20 plántulas por cepa y variedad de trébol.

Estimación del efecto de la irradiación ultravioleta en la INFECTIVIDAD y EFECTIVIDAD de cepas de Rhizobium trifolii, en tubos de cultivo con un tiempo de irradiación de 30 seg. y una intensidad de 570 ergios.

No. Cepa	Trébol	tamaño de la planta (cm)	No. de nódulos (promedio)	No. de hojas (promedio)	peso húmedo promedio (mg)	peso seco promedio (mg)	incremento en tamaño (%)	incremento en peso húmedo (%)	incremento en peso seco (%)
T (-)	Ladino	4.0	0.0	4.00	6.50	3.30	-	-	-
T (-)	Rojo	6.0	0.0	6.75	30.00	21.00	-	-	-
T (-)	Berseem	7.0	0.0	6.50	40.00	26.00	-	-	-
1	Ladino	3.6	0.5	3.00	6.50	3.40	0.00	0.00	3.03
1	Rojo	6.0	0.0	6.50	29.30	18.90	0.00	0.00	0.00
1	Berseem	7.5	0.7	5.50	51.10	36.30	7.14	27.75	39.61
3	Ladino	6.0	1.0	6.00	12.30	5.00	50.00	89.20	51.51
3	Rojo	6.5	0.0	5.75	31.30	20.90	8.30	4.30	0.00
3	Berseem	6.5	0.0	6.00	39.40	25.80	0.00	0.00	0.00
5	Ladino	4.0	0.0	5.75	8.30	3.85	0.00	27.69	16.66
5	Rojo	6.2	0.0	7.50	30.70	20.30	3.30	2.33	0.00
5	Berseem	7.0	0.0	6.25	38.90	22.70	0.00	0.00	0.00
8	Ladino	4.5	0.0	4.75	9.20	4.85	12.50	53.30	46.96
8	Rojo	6.5	0.5	8.00	30.90	21.30	8.33	3.00	1.42
8	Berseem	7.2	0.5	4.50	40.00	24.90	2.85	0.00	0.00
9	Ladino	4.0	0.0	5.50	8.00	4.20	0.00	23.00	27.27
9	Rojo	6.3	0.0	6.75	29.90	20.10	5.00	0.00	0.00
9	Berseem	7.2	0.0	6.00	38.90	23.00	2.85	0.00	0.00

Indicaciones: T (-) plántulas sin inoculante
promedios en base a 20 plántulas por cepa y
variedad de trébol

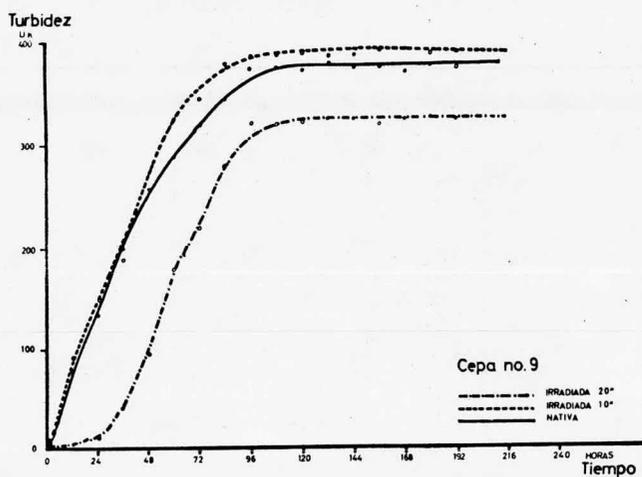


Fig. 4

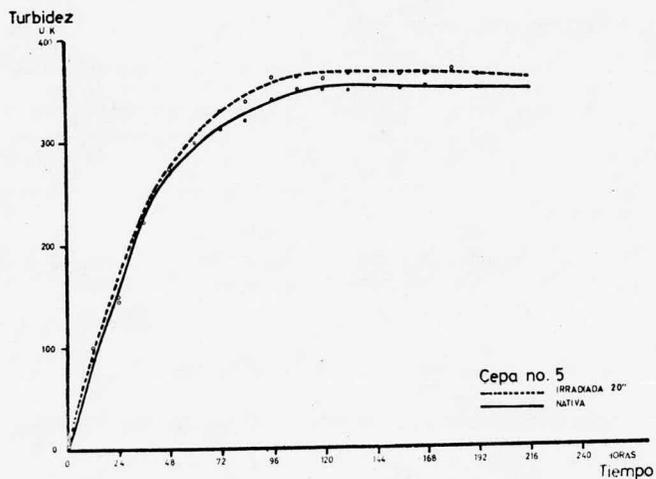


Fig. 5

Curvas de crecimiento obtenidas a partir de cepas irradiadas en comparación a las obtenidas con sus cepas nativas.

Datos estadísticos para ensayos de significación en pruebas de invernadero para trébol Ladino inoculado con la cepa # 9 de Rhizobium trifolii nativa e irradiada.

Ladino T (-)				
	PESO SECO (mg)	PESO HUMEDO (mg)	TAMAÑO (cm)	No. NODULOS
\bar{X}	4.43	28.55	4.55	0.0
S	0.03	8.51	0.06	-
S ²	0.17	2.91	0.24	-
EE	0.01	0.29	0.02	-

Ladino T (+)				
	PESO SECO (mg)	PESO HUMEDO (mg)	TAMAÑO (cm)	No. NODULOS
\bar{X}	16.19	138.65	8.73	0.0
S	0.05	151.92	1.74	-
S ²	0.22	2.32	1.31	-
EE	0.02	1.23	0.13	-

Ladino inoculado con cepa # 9 nativa				
	PESO SECO (mg)	PESO HUMEDO (mg)	TAMAÑO (cm)	No. NODULOS
\bar{X}	14.06	91.59	8.05	3.26
S	0.05	55.37	0.19	3.30
S ²	0.22	7.44	0.43	1.81
EE	0.02	0.74	0.04	0.18

Ladino inoculado con cepa # 9 irradiada 20 segundos				
	PESO SECO (mg)	PESO HUMEDO (mg)	TAMAÑO (cm)	No. NODULOS
\bar{X}	17.77	150.03	9.04	6.39
S	0.09	246.97	1.06	7.12
S ²	0.30	15.71	1.02	2.66
EE	0.03	1.57	0.10	0.26

Indicaciones: \bar{X} = Media Aritmética S² = Desviación Estandar
 S = Varianza EE = Error Estandar

Población = 100 plantas

Percentiles (t) de la Distribución t de Student con intervalos de confianza de P_{95} y 99% , obtenidos en pruebas de invernadero para trébol Ladino inoculado con la cepa # 9 de Rhizobium trifolii nativa e irradiada

	Peso Húmedo	Peso Seco	Tamaño	# Nódulos
Ladino C-9-20" VS Ladino T (+)	5.70	43.88	1.89	-
Ladino C-9-20" VS Ladino T (-)	77.36	422.15	44.06	-
Ladino C-9-20" VS Ladino C-9-N	33.67	103.05	9.19	15.02
Ladino T (+) VS Ladino C-9-N	32.78	75.53	5.00	-
Ladino T (+) VS Ladino T (-)	87.12	527.35	31.78	-
Ladino C-9-N VS Ladino T (-)	78.32	431.83	78.29	-

Indicaciones: C-9-20" Cepa # 9 irradiada 20 segundos
 C-9-N Cepa # 9 Nativa
 T (+) Testigo positivo (con fuente de Nitrógeno)
 T (-) Testigo negativo (sin fuente de Nitrógeno)
 Población = 100 plantas

Datos estadísticos para ensayos de significación en pruebas de invernadero para trébol Rojo inoculado con la cepa # 9 de Rhizobium trifolii nativa e irradiada

Rojo T (-)				
	PESO SECO (mg)	PESO HUMEDO (mg)	TAMAÑO (cm)	No. NODULOS
\bar{X}	24.11	151.74	8.94	0.0
S	1.59	165.22	0.37	-
S ²	1.26	12.85	0.60	-
EE	0.12	1.28	0.06	-

Rojo T (+)				
	PESO SECO (mg)	PESO HUMEDO (mg)	TAMAÑO (cm)	No. NODULOS
\bar{X}	42.80	344.30	14.83	0.0
S	2.34	1220.73	0.43	-
S ²	1.52	34.93	0.65	-
EE	0.15	3.49	0.06	-

Rojo inoculado con cepa # 9 nativa				
	PESO SECO (mg)	PESO HUMEDO (mg)	TAMAÑO (cm)	No. NODULOS
\bar{X}	39.15	241.54	10.01	4.14
S	2.04	9.62	0.04	1.51
S ²	1.42	3.10	0.20	1.22
EE	0.14	0.31	0.02	0.12

Rojo inoculado con cepa # 9 irradiada 10 segundos				
	PESO SECO (mg)	PESO HUMEDO (mg)	TAMAÑO (cm)	No. NODULOS
\bar{X}	26.73	153.87	9.70	1.14
S	3.35	3.77	0.04	0.46
S ²	1.83	1.94	0.20	0.67
EE	0.18	0.19	0.02	0.06

Indicaciones: \bar{X} = Media Aritmética
S = Varianza

S² = Desviación Estandar
EE = Error Estandar

Población = 100 plantas

CUADRO # 12

Percentiles (t) de la Distribución t de Student con intervalos de confianza de 95 y 99%, obtenidos en pruebas de invernadero para trébol Rojo inoculado con la cepa # 9 de Rhizobium trifolii nativa e irradiada.

	Peso Húmedo	Peso Seco	Tamaño	# Nódulos
Rojo C-9-10" VS Rojo T (-)	1.64	12.11	12.02	-
Rojo C-9-10" VS Rojo C-9-N	-241.18	54.47	-10.99	-22.37
Rojo T (+) VS Rojo C-9-10"	54.48	68.58	81.17	-
Rojo T (+) VS Rojo C-9-N	29.32	17.79	76.26	-
Rojo T (+) VS Rojo T (-)	51.80	97.34	69.45	-
Rojo C-9-N VS Rojo T (-)	68.18	81.60	16.93	-

Indicaciones: C-9-10" Cepa # 9 irradiada 10 segundos
 C-9-N Cepa # 9 Nativa
 T (+) Testigo positivo (con fuente de Nitrógeno)
 T (-) Testigo negativo (sin fuente de Nitrógeno)

Población = 100 plantas

Nota.- Los valores negativos indican que la significación en la comparación de una prueba con otra, es inversa.

Datos estadísticos para ensayos de significación en pruebas de invernadero para trébol Berseem inoculado con la cepa # 5 de Rhizobium trifolii nativa e irradiada

Berseem T (-)				
	PESO SECO (mg)	PESO HUMEDO (mg)	TAMAÑO (cm)	No. NODULOS
\bar{X}	18.09	98.13	7.64	0.0
S	2.16	32.63	2.46	-
S ²	1.46	5.71	1.56	-
EE	0.46	0.57	0.15	-

Berseem T (+)				
	PESO SECO (mg)	PESO HUMEDO (mg)	TAMAÑO (cm)	No. NODULOS
\bar{X}	70.78	633.18	16.99	0.0
S	1.36	388.51	0.73	-
S ²	1.16	19.71	0.85	-
EE	0.11	1.97	0.08	-

Berseem inoculado con cepa # 5 nativa				
	PESO SECO (mg)	PESO HUMEDO (mg)	TAMAÑO (cm)	No. NODULOS
\bar{X}	28.94	242.48	10.00	4.44
S	3.79	226.17	0.80	3.17
S ²	1.94	15.03	0.89	1.78
EE	0.19	1.50	0.08	0.17

Berseem inoculado con cepa # 5 irradiada 20 segundos				
	PESO SECO (mg)	PESO HUMEDO (mg)	TAMAÑO (cm)	No. NODULOS
\bar{X}	70.29	399.43	13.39	9.49
S	0.09	150.73	0.51	8.99
S ²	0.30	12.27	0.71	2.99
EE	0.03	1.22	0.07	0.29

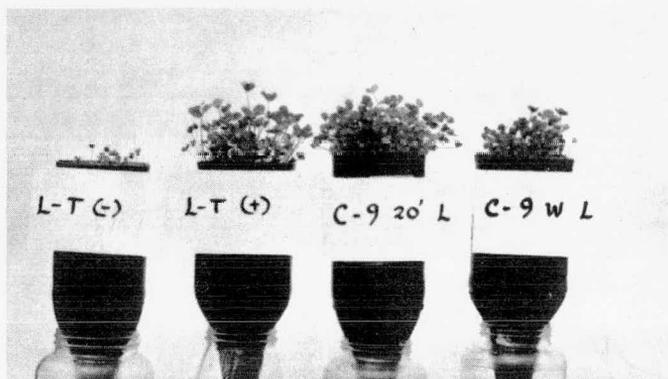
Indicaciones: \bar{X} = Media Aritmética S² = Desviación Estandar
S = Varianza EE = Error Estandar

Población = 100 plantas

Percentiles (t) de la Distribución t de Student con intervalos de confianza de P^{95} y 99%, obtenidos en pruebas de invernadero para trébol Berseem inoculado con la cepa # 5 de Rhizobium trifolii nativa e irradiada

	Peso Húmedo	Peso Seco	Tamaño	# Módulos
Berseem C-5-20" VS Berseem T (-)	223.76	113.25	34.74	-
Berseem C-5-20" VS Berseem C-5-N	81.17	215.03	31.89	15.02
Berseem T (+) VS Berseem C-5-20"	100.88	4.29	33.86	-
Berseem T (+) VS Berseem C-5-N	157.79	190.61	61.80	-
Berseem T (+) VS Berseem T (-)	260.89	111.41	55.00	-
Berseem C-5-N VS Berseem T (-)	89.96	21.80	13.88	-

Indicaciones: C-5-20" Cepa # 5 irradiada 20 segundos
 C-5-N Cepa # 5 Nativa
 T (+) Testigo positivo (con fuente de Nitrógeno)
 T (-) Testigo negativo (sin fuente de Nitrógeno)



Diferenciación obtenida con el conjunto de "jarra-botella" de Leonard. Plantas de trébol ladino. Tratamientos de izquierda a derecha: testigo sin -inocular, testigo con nitrato, cepa irradiada, cepa nativa sin irradiar.

V.- CONCLUSIONES

Las características microscópicas de las cepas de Rhizobium trifolii estudiadas, tanto tintoriales como morfológicas no sufrieron modificación aparente por el efecto de la radiación ultravioleta en un intervalo de 190 a 570 ergios de intensidad.

En este mismo intervalo de intensidad, las propiedades culturales de Rhizobium trifolii fueron notablemente modificadas, ya que en todos los casos estudiados se presentó una menor producción de goma en las cepas irradiadas con respecto a las cepas nativas sin irradiar. En la mayoría de los casos hubo cambios en la coloración de las colonias desarrolladas en medio de agar levadura-manitol con rojo congo, lo que indica un efecto de irradiación en esta característica, al obtenerse cepas con una mayor capacidad para absorber el indicador. No se observó una relación aparente entre estos cambios y los producidos en las propiedades de infectividad y efectividad de las cepas irradiadas.

Las fases de crecimiento en las cepas seleccionadas después de la irradiación, no sufrieron cambios significativos -

en comparación a las cepas nativas sin irradiar.

Se pudo apreciar una notable correlación entre la infectividad de las cepas después de ser sometidas al efecto de radiación ultravioleta y el tiempo de exposición a dicha radiación. Ya que a medida que el tiempo de radiación fue mayor, la pérdida de infectividad de las cepas aumentó, llegando, en algunos casos, a perderse totalmente como en las cepas 5 y 9 que, a una intensidad de irradiación de 570 ergios (30 segundos de exposición), se tornaron totalmente avirulentas para las tres variedades de trébol probadas (ladino, rojo y berseem).

Dentro del intervalo de irradiación ultravioleta utilizado en este trabajo (190 a 570 ergios de intensidad), la efectividad de las cepas resultó ser la propiedad menos afectada. A una intensidad de 190 ergios (10 segundos), la efectividad parece no afectarse, pues en la mayoría de los casos la presencia de nódulos correspondió a un incremento en el desarrollo de las plántulas. Para una intensidad de 380 ergios (20 segundos), las cepas 1 y 9 en trébol ladino, dieron su máximo rendimiento en peso seco. Y, finalmente, a una intensidad de irradiación de 570 ergios (30 segundos), la efectividad de las cepas resultó disminuida de manera general.

De lo anterior podemos concluir que la radiación ultravioleta a un intervalo de intensidad de 190 a 570 ergios pro

voca cambios en las propiedades simbióticas de Rhizobium trifolii, tanto de orden negativo (disminución de la infectividad), como de orden positivo (incremento de la efectividad).

La significación obtenida en las pruebas de invernadero, evaluada mediante análisis estadístico, permitió apreciar que, las cepas 9 para trébol ladino y 5 para trébol berseem, a una intensidad de irradiación de 380 ergios (20 segundos) en ~~ambos~~ casos, superaron en efectividad e infectividad a sus cepas nativas sin irradiar. Esto demuestra -- que en base a los análisis estadísticos realizados, la radiación ultravioleta puede ser un agente mutagénico útil en la obtención de cepas de Rhizobium trifolii mejoradas, es decir, altamente infectivas y efectivas, que tiendan a mejorar los beneficios de la simbiosis de esta bacteria con las plantas leguminosas.

VI.- RESUMEN

En este trabajo se trató de estimar el efecto de la radiación ultravioleta en la infectividad y efectividad de algunas cepas de Rhizobium trifolii, nativas, aisladas en el Valle de México.

Se obtuvieron en primer lugar cultivos puros, mediante su comprobación y caracterización en base a sus propiedades simbióticas en tres variedades de trébol: ladino, rojo y berseem.

De las cepas sometidas al efecto de radiación ultravioleta se estudiaron los cambios producidos en sus características microscópicas y coloniales, así como su velocidad de crecimiento, nodulación y fijación de nitrógeno.

Para la estimación de los cambios producidos por el efecto de radiación en la infectividad y efectividad, se realizaron pruebas de laboratorio en tubos de cultivo bajo condiciones asépticas.

Finalmente, de las mutantes obtenidas se evaluaron aquellas que, en cada una de las variedades de trébol probadas, tuvieron el grado más alto en infectividad (nodulación) y e-

fectividad para fijar el nitrógeno atmosférico, en comparación con las propiedades simbióticas de las cepas nativas - originales; dicha evaluación se llevó a cabo en pruebas de invernadero y condiciones de semiesterilidad.

Los resultados obtenidos en estas pruebas indican que, a un intervalo de intensidad de irradiación de 190 a 570 ergios, la infectividad de las cepas de Rhizobium trifolii se ve afectada aparentemente en forma negativa (disminución en capacidad de nodulación) y que la efectividad (fijación de nitrógeno) de las mismas, puede sufrir incremento por el -- efecto de irradiación.

De acuerdo a los resultados estadísticos obtenidos en el presente estudio, se puede concluir que la radiación ultravioleta como agente mutagénico, resulta útil para la obtención - de cepas de Rhizobium trifolii con incremento en sus caracte - rísticas simbióticas de infectividad y efectividad, que tienden a aumentar los beneficios de la simbiosis formada por estas bacterias con plantas leguminosas.

VII.- B I B L I O G R A F I A

- Bacq, Z.M. y A. Alexander. (1955). Fundamentals of radiobiology. Butterwort, London. 389 p.
- Beringer, J.E., Johnston, A.W.B. and Wells, B. (1977). The isolation of conditional ineffective mutants of Rhizobium leguminosarum. J. Gen Microbiology, 98, 339-343.
- Brill, W.J. (1977). Biological nitrogen fixation. Scientific American. 236 (3), 68-81.
- Damery, J.T. & Alexander, M. (1969). Physiological differences between effective and ineffective strains of Rhizobium. Soil Science, 108 (3), 209-216.
- Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H.N. Ginsberg, H.S. y Wood, W.B. (1976). Tratado de Microbiologfa. Barcelona, España. Ed. Salvat. 1478 p.
- Dénarié, J., Truchet, G. & Bergeron, B. (1976). Effects of some mutations on symbiotic properties of Rhizobium. Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants. Cambridge University, Great Britain. pp. 47--61.

- Dixon, W.J. y Massey, F.J. Jr. (1966). Introducción al Análisis Estadístico. Madrid, España. Ed. del Castillo. 489 p.
- Goldstein, A. (1969). Biostatistics, an introductory text. Collier-Macmillan Canada, Ltd., Toronto, Ontario. 272 p.
- Gupta, B.M. & Kleczkowska, J. (1962). A study of some mutations in a strain of Rhizobium trifolii. J. Gen Microbiology. 27, 473-476.
- Hogg, J.C., Bickel, Ch. L., Nicholson, M. y Wik, H.V. (1970). Química, un enfoque moderno. México. Ed. Reverté. 561 p.
- Ichikawa, S. (1975). Apuntes de Mutagénesis. Chapingo, México. Colegio de Postgraduados. E.N.A. 67 p.
- Imshenetskii, A.A., Pariiskaya, A.N. and Erraiz Lopez, L. -- (1970). Experimental production of mutants of Rhizobium meliloti with increased activity. - Microbiology 39, 294-297.
- Johnston, A.W.B. and Beringer, J.E. (1975). Identification of the Rhizobium strains in pea root nodules - using genetic markers. J. Gen. Microbiology, 4, 343-350.
- Kleczkowska, J. (1950). A study of phage-resistant mutants of Rhizobium trifolii. J. Gen. Microbiology, 4, 298-310.

- Lehninger, A.L. (1972). Bioquímica, las bases moleculares de la estructura y función celular. Barcelona España. Ed. Omega. 887 p.
- Lorkiewiks, Z., Zurkowski, W., Kowalczyk, E. & Górskamelke, A. (1971). Mutagenesis and conjugation in Rhizobium trifolii. Acta Microbiológica Polónica, Ser. A. 3,101-7.
- Mier, H.L.B. (1977). Efecto de un herbicida derivado de Atrazina, en la microflora del suelo y en la fijación de nitrógeno por Rhizobium trifolii. Tesis, Biólogo, UNAM.
- Murray, R., Spiegel, Ph. D. (1961). Estadística, teoría y -- problemas de México, Ed. Mc Graw-Hill, Serie de compendios Schaum. 357 p.
- Nutman, P.S. (1976). Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants. International Biological Programs. Great Britain. Cambridge University press. 584 p.
- Pankhurst, C.E., Schwinghamer, E.A. & Bergersen, F.J. (1972). The structure and acetylene-reducing activity of root nodules formed by a riboflavin-requiring mutant of Rhizobium trifolii. J. Gen. - Microbiology, 70, 161-177.
- Pariiskaya, A.N. & Titareva, LM.. (1969). Sensitivity of Rhizobium meliloti to ultraviolet light and nitrosomethylurea. Mikrobiologiya, 38 (2), 313-315.
- Russel, P.E. & Gareth, J.D. (1973). The effect of ultraviolet light on the symbiotic effectiveness and some --



Impresiones Lupita

MEDICINA No. 25
FRACC. COPILCO UNIVERSIDAD
CIUDAD UNIVERSITARIA, D. F.
TEL. 548-49-79