VOLUMEN 24. 1971 JULIO - SEPTIEMBRE. NUMERO 3

Microbiología Española

Revista
del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología
y de la Sociedad Española de Microbiología

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

Director: Prof. Lorenzo Vilas, Director del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología.

Vicedirector: Dr. David Vázquez, Presidente de la Sociedad Española de Microbiología.

Vocales: Dr. Antonio Portolés, Dr. Miguel Rubio, Dr. Fernando Ruiz-Falcó, Dr. Gonzalo Sierra y Prof. Julio R. Villanueva.

Secretario: Dr. Luis Sánchez, Jefe del Servicio de Difusión y Publicaciones, del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología.

Toda la correspondencia para MICROBIOLOGÍA ESPAÑOLA debe dirigirse a

MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA

Calle de Joaquín Costa, 32 MADRID-6 (España)

Suscripción (4 números): España, 240 PTA; extranjero, 340 PTA

Número: España, 70 PTA; extranjero, 100 PTA

RECOMENDACIONES A LOS AUTORES

"Microbiología Española" publicará fundamentalmente trabajos y notas de investigación, dentro del campo de la Microbiología, y también trabajos doctrinales que se estimen de interés especial. Textos, en español o inglés.

Sólo se admitirán trabajos inéditos que no estén pendientes de publicación en cualquiera otra revista. Los que aparezcan en "Microbiología Española" podrán ser reproducidos, siempre que se indique su origen.

Los trabajos, por duplicado, deberán estar escritos a máquina, en papel de tamaño holandesa, por una sola cara, a doble espacio y márgenes de 2 cm a cada lado como mínimo. Los dibujos, con tinta china y en papel vegetal; las cifras, letras y leyendas, a lápiz. Para orientación de los autores, las dimensiones de la caja son $18 \times 11{,}5$ cm.

En la cabecera de la primera página se harán constar: Centro en que se ha realizado el trabajo, título (conciso), nombre del autor (o inicial) en letras minúsculas y apellido, en mayúsculas. Al pie de la página deberá figurar la dirección postal del autor.

En líneas generales, los trabajos de investigación constarán de: Introducción, Material y Métodos, Resultados, Discusión, Conclusiones, Resumen en la otra lengua y Bibliografía. Las notas y trabajos doctrinales se redactarán con arreglo a su naturaleza.

Las unidades de medida serán las correspondientes al Sistema Métrico Decimal. Cuando se adopten abreviaturas no corrientes deberán advertirse en el texto. En cuanto a los símbolos, se utilizarán las Normas UNE, del Instituto Nacional de Racionalización y Normalización.

Los métodos conocidos se indicarán tan sólo mediante las citas bibliográficas correspondientes. Los datos se presentarán en forma de cuadro o de figura; cuadros y figuras, independientemente, estarán numerados y citados en el texto.

El resumen en la otra lengua, de un máximo de doscientas palabras, deberá contener el título del trabajo, un breve esquema del mismo y las conclusiones (abreviadas, en su caso).

La bibliografía se reducirá a la que esté directamente relacionada con el tema tratado. Las citas, numeradas y alfabetizadas, se ajustarán al siguiente orden:
Revistas: apellido del autor, inicial del nombre, año, título del trabajo, nombre abreviado de la revista (según Chemical Abstracts), número del tomo o volumen y páginas inicial y final.
Libros: apellido del autor e inicial del nombre [en su caso, del recopilador ("editor")], año, título de la obra, tomo o volumen, capítulo (en su caso), página, editorial y población.

Los autores recibirán pruebas que deberán devolver en el plazo máximo de diez día para los residentes en España, y en el de veinte, para el extranjero. Transcurridos dichos plazos sin devolución de pruebas, se retirará el trabajo del turno de publicación, y a los seis meses de la fecha de envío se anulará. Las modificaciones hechas por el autor que excedan del 2 % del texto serán abonadas por él.

Cada autor tendrá derecho a treinta separatas gratuitas; si deseara más, deberá indicarlo por escrito cuando devuelva las pruebas corregidas. Las separatas adicionales serán facturadas a precio de coste.

La responsabilidad de los conceptos escritos corresponde a los autores.

Los trabajos se enviarán al Secretario de "Microbiología Española", Joaquín Costa, 32, Madrid-6. La aceptación de los mismos corresponde al Consejo Rector de la Revista.

INDICE

Página

Algunas virosis de *Dianthus caryophyllus* cultivados en España y los virus que las producen, por *Serafina Castro, R. Moreno* y *M. Rubio-Huertos* 135

Metabolismo oxidante en *Polystictus versicolor,* por *M.ª del Carmen Fernández-Puentes* y *D. Rodríguez* 159

Aislamiento del *Vibrio parahaemolyticus* en España, por *M. Rodríguez-Rebollo, K. Tamura, H. Hechelmann* y *L. Leistner.* 171

Hidrogenación y deshidroxilación del ácido cafeico por varias especies de bacterias, por *E. Sternfeld, M. G. Pérez-Silva* y *D. Rodríguez* 177

Ultraestructura de hojas de *Chenopodium quinoa* Wild infectadas con el virus Entrenudo corto infeccioso de la vid, por *A. Peña-Iglesias* y *M. Rubio-Huertos* 183

Investigaciones en la microflora de la rizosfera. I. Sucesión de la microflora en las diferentes zonas de la raíz de *Oryza sativa* L., por *V. B. Srivastava* y *R. R. Mishra* 193

III Congreso Nacional de Microbiología 207

Junta Directiva de la Sociedad 207

V Congreso Latinoamericano de Microbiología 208

CONTENTS

Page

An study of some carnation virus diseases in Spain, by *Serafina Castro, R. Moreno* and *M. Rubio-Huertos* 135

Oxidative metabolism in *Polystictus versicolor,* by *M.ª del Carmen Fernández-Puentes* and *D. Rodríguez* 159

Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* in Spain, by *M. Rodríguez-Rebollo, K. Tamura, H. Hechelmann* and *L. Leistner* 171

Hydrogenation and dehydroxylation of caffeic acid by some bacteria species, by *E. Sternfeld, M. G. Pérez-Silva* and *D. Rodríguez* 177

Ultrastructure of *Chenopodium quinoa* plants infected with Grapevine fanleaf virus, by *A. Peña-Iglesias* and *M. Rubio-Huertos* 183

Investigations into rhizosphere microflora. I. Succession of microflora on root regions of *Oryza sativa* L., by *V. B. Srivastava* and *R. R. Mishra* 193

III National Congress of Microbiology 207

Directive Board of the Society 207

V Latinamerican Congress of Microbiology 208

INSTITUTO «JAIME FERRAN,» DE MICROBIOLOGIA (C S I C)
DEPARTAMENTO DE VIROLOGIA
SECCION DE VIRUS VEGETALES

ALGUNAS VIROSIS DE *DIANTHUS CARYOPHYLLUS* CULTIVADOS EN ESPAÑA Y LOS VIRUS QUE LAS PRODUCEN

por

SERAFINA CASTRO, R. MORENO y M. RUBIO-HUERTOS

INTRODUCCION

El cultivo de claveles en grandes plantaciones agrícolas, necesarias para satisfacer la fuerte demanda de consumo, tanto para el mercado interior como para la exportación, junto con la gran incidencia de enfermedades producidas por virus que presentan los claveles, debido principalmente a su cultivo por esquejes, hace necesario, cada vez más, el control de estas enfermedades que pueden producir pérdidas importantes.

Un conocimiento previo de los diferentes tipos de virus que atacan a los claveles se hace, por tanto, imprescindible, tanto más que hasta ahora en España no se ha realizado ningún trabajo de este tipo.

En general, hasta el presente, debido a varias circunstancias, el estudio sistemático de las virosis del clavel ha sido muy confuso, por ejemplo: duplicidad de denominaciones en los diferentes países para las mismas enfermedades, sintomatología poco clara de éstas, presencia de varios virus al mismo tiempo en estas virosis, etc.

El presente trabajo es una contribución al mejor conocimiento de algunos de estos aspectos, realizado con virus encontrados en España.

MATERIAL Y METODOS

Se tomaron 13 muestras de plantas procedentes de cultivos de distintas partes de España que presentaban en diferentes síntomas de virosis, desde el variegado de la flor, mosaico y veteado en las hojas, a plantas con síntomas muy leves, como ligera decoloración de los pétalos y hojas sin síntomas

apreciables. Con estas muestras se siguió un estudio sistemático que consistió en lo siguiente:

1) Estudio citológico con el microscopio normal en tinciones rápidas con floxina al 0,5 % en agua, sin fijación previa (16), para observar la posible presencia de inclusiones intracelulares.

2) Estudio por microscopía electrónica de la savia bruta empleando el método dip combinado con ácido fosfotúngstico en tinción negativa, para obtener una idea previa sobre la forma y el tamaño de las partículas de los virus existentes en la muestra.

3) Seguidamente se hicieron inoculaciones con savia de las muestras, empleando celita y carborundo como abrasivo, a las siguientes plantas de ensayo: *Dianthus barbatus, D. chinensis, D. caryophyllus, D. maritimus; Gypsophila paniculata; Lychis dioica; Nicotiana glutinosa, N. tabacum* var. White burley, *N. clevelandii; Lycopersicum sculentum; Capsicum annuum; Petunia hybrida; Brassica chinensis; Vicia faba; Vigna sinensis; Phaseolus vulgaris; Chenopodium amaranticolor, Ch. quinoa; Atriplex hortensis; Espinacia oleracea; Tetragonia cristaloseta; Cucumis sativus; Tropeolum majus; Antirrhinum majus; Gomphrena globosa; Celosia plumaria, C. cristata; Amaranthus caudatus; Zinnia elegans; Tajetes erecta.*

4) Se fijaron en 2 % de tetraóxido de osmio, en tampón de acetato de veronal, pequeños trozos de hojas y de pétalo de las muestras directamente, o bien de las plantas inoculadas que presentaban síntomas claros y, en la mayor parte de los casos, de ambas; se deshidrataron estos trozos de tejido e incluyeron en durcupán para el estudio de la ultraestructura de las hojas infectadas, distribución de partículas de virus en las células, etcétera, por microscopía electrónica.

5) En algunos casos que nos parecieron de mayor interés se hizo una purificación de los virus que infectaban la muestra, una vez multiplicada en el huésped apropiado, por el método del butanol-cloroformo (22) o bien con tetracloruro de carbono (5).

RESULTADOS

Muestra 1

Flores rojas con los bordes decolorados, sin síntomas en las hojas.

Dio los siguientes síntomas en las plantas de ensayo inoculadas: *Dianthus barbatus,* anillos y mosaico; *Nicotiana tabacum* var. White burley, mosaico ligero; en cortes se vio que se había aislado el virus

alargado. tipo Y, de la patata; *Nicotiana glutinosa, Brassica chinensis* y *Vicia faba* no dieron síntomas ni adquirieron la infección.

Citología. Inclusiones de tipo amorfo granular y amorfas refringentes, tipo virus Mosaico de la coliflor (Mc).

Tinción negativa. Tanto usando el método dip como después de haber realizado una purificación del virus por el método de éter-tetracloruro de carbono, se encontraron partículas alargadas de unas 700-750 × 18 mμ.

Cortes ultrafinos. Muestra una noble infección con partículas alargadas y ultrainclusiones en roseta del tipo virus Y de la patata, y otras partículas isométricas de 42-45 mμ de diámetro formando inclusiones tipo virus Mosaico de la coliflor.

Se observaron cristales en los núcleos semejantes a los encontrados en plantas sanas.

En el citoplasma se observan grupos o masas de túbulos parecidos a los encontrados en los cuerpos X del virus Mosaico del tabaco *(figura 3).*

Muestra 2

Flores blancas con veteado rojo, hojas sin síntomas apreciables.

Síntomas en las siguientes plantas de ensayo: *Dianthus barbatus,* mosaico; *Nicotiana tabacum,* mosaico; por cortes ultrafinos de *N. tabacum,* rosetas.

Citología. No tiene inclusiones intracelulares.

Tinción negativa. Tanto el método dip como tras purificación por butanol-cloroformo da un virus isométrico de 27 mμ de diámetro aproximadamente, y un virus alargado de 700-750 × 18 mμ.

Cortes ultrafinos. Solamente se observan rosetas correspondientes a un virus tipo Y de la patata. El virus isométrico de 26 mμ no se observa y, sin embargo, aparece otro isométrico, muy pequeño, 19 mμ, asociado con una sustancia densa a los electrones. Aparecen cristales en los núcleos, igual que en plantas sanas.

Muestra 3

Flores rojo-oscuro con vetas blancas, en las hojas se observa un mosaico suave.

Síntomas en plantas en ensayo: *Dianthus barbatus,* mosaico; *Nicotiana tabacum* y *Brassica chinensis,* sin síntomas.

Citología. Inclusiones amorfas granulares.

Tinción negativa. Se observa por el método dip un virus alargado de unas 700-750 mμ.

Cortes ultrafinos. Se observa un virus de partículas alargadas formando paquetes del tipo Latente y dos virus isométricos, uno correspondiente a inclusiones tipo Mosaico de la coliflor, de unas 42-47 mμ de diámetro, y otro mucho más pequeño, de unas 19 mμ de diámetro, asociado a la parte externa de unas masas oscuras *(figuras 11-12);* ambos virus isométricos se encuentran juntos en las mismas células y a veces también con el anisométrico.

Muestra 4

Flores amarillas con puntas y vetas rojas, hojas con mosaico suave.

Síntomas en plantas de ensayo: *Chenopodium amaranticolor,* lesiones necróticas y mosaico.

Citología. Se observan inclusiones cristalinas hexagonales que se disuelven en agua al poco tiempo.

Tinción negativa. Por el método dip y tras purificación por butanol-cloroformo se observa en ambos casos un virus esférico de aproximadamente 27 mμ.

Cortes ultrafinos. Se observa claramente un virus esférico correspondiente al de la tinción negativa. Hay una gran modificación en las mitocondrias y a veces el virus se encuentra pegado a su membrana externa, tanto en *Dianthus caryophyllus* como en *Chenopodium amaranticolor.*

Muestra 5

Flores blancas con vetas rojas, hojas sin síntomas.

Citología. Inclusiones amorfas y cristalinas.

Tinción negativa. Por el método dip, partículas alargadas poco abundantes, no se realizaron cortes ultrafinos de esta muestra.

Muestra 6

Flores salmón con vetas rojas, hojas sin síntomas.

Síntomas en plantas de ensayo: solamente dio mosaico en *Dianthus barbatus;* sin síntomas las demás plantas ensayadas, *Chenopodium amaranticolor, Nicotiana tabacum,* etc.

Citología. Inclusiones amorfas granulares.

Tinción negativa. Del purificado por éter-tetracloruro de carbono y del método dip, en ambas se observaron partículas alargadas, de unas 700-750 × 18 mμ.

Cortes ultrafinos. Virus alargados formando ultrainclusiones en forma de roseta.

Muestra 7

Flores blancas con veteado rojo, hojas sin síntomas.

Citología. Inclusiones amorfas granulares.

Tinción negativa. Del purificado por los dos métodos butanol-cloroformo y éter-tetracloruro de carbono y por el método dip, partículas alargadas.

Cortes ultrafinos. Partículas de virus formando paquetes y bandas densas.

Muestra 8

Flores blancas con veteado rojo brillante, hojas sin síntomas.

Citología. Inclusiones amorfas granulares e inclusiones amorfas refringentes, tipo Mosaico de la coliflor.

Tinción negativa. Partículas esféricas de unas 26 mμ de diámetro en virus purificado por el método del éter-tetracloruro de carbono. Muchas de las partículas, a gran aumento, mostraban una masa polar más densa a los electrones *(figura 7).* En tinción directa de la savia se vieron también algunas partículas alargadas muy escasas junto con las isométricas.

Cortes ultrafinos. Sólo se observan partículas isométricas de unas 40-45 mμ en el citoplasma y en inclusiones tipo Mosaico de la coliflor. No se pudo observar ni partículas alargadas ni las obtenidas por purificación.

Muestra 9

Flores blancas con veteado rojo, hojas sin síntomas.

Plantas de ensayo: no dio síntomas en ninguna.

Citología. Inclusiones amorfas y del tipo Mosaico de la coliflor.

Tinción negativa. Partículas alargadas por el método dip y en el virus purificado.

Cortes ultrafinos. Se observan inclusiones del tipo Mosaico de la coliflor, con partículas isométricas de 42-47 mμ.

Muestra 10

Flores blancas con vetas rojas, hojas sin síntomas.

Citología. Inclusiones amorfas.

Tinción negativa. Por el método dip y por purificación, partículas isométricas de unas 25-26 mμ.

Cortes ultrafinos. Los cuerpos X granulares están formados por gotas de grasa y partículas esféricas que es posible que sean virus, pero es difícil de distinguir de ribosomas.

Muestra 11

Flores blancas con vetas rojas, hojas sin síntomas.

Plantas de ensayo. Dio síntomas en *Chenopodium amaranticolor; Atriplex hortensis,* mosaico y moteado, y *Dianthus caryophyllus,* moteado en las hojas; no dio síntomas en las demás plantas inoculadas.

Citología. Inclusiones tipo virus Mosaico de la coliflor.

Tinción negativa. Por el método dip se observaron partículas isométricas de unas 26 mμ de diámetro; en purificación con butanol-cloroformo se observaron dos tipos de partículas isométricas, unas de 26 mμ, muy abundantes, y otras, de 19-20 mμ.

Cortes ultrafinos. Se observaron inclusiones del tipo Mosaico de la coliflor con partículas grandes, 40-45 mμ. Las partículas isométricas de 26 y 19 mμ, obtenidas por purificación, no se pudieron observar en los cortes.

Muestra 12

Flores color salmón, hojas sin síntomas.

Citología. No tiene inclusiones intracelulares.

Tinción negativa. Partículas alargadas (método dip).

Cortes ultrafinos. Virus alargado formando bandas densas. Virus esférico posible a lo largo de las membranas.

Muestra 13

Flores rojas. Las hojas presentan mosaico. Con necrosis alargadas.

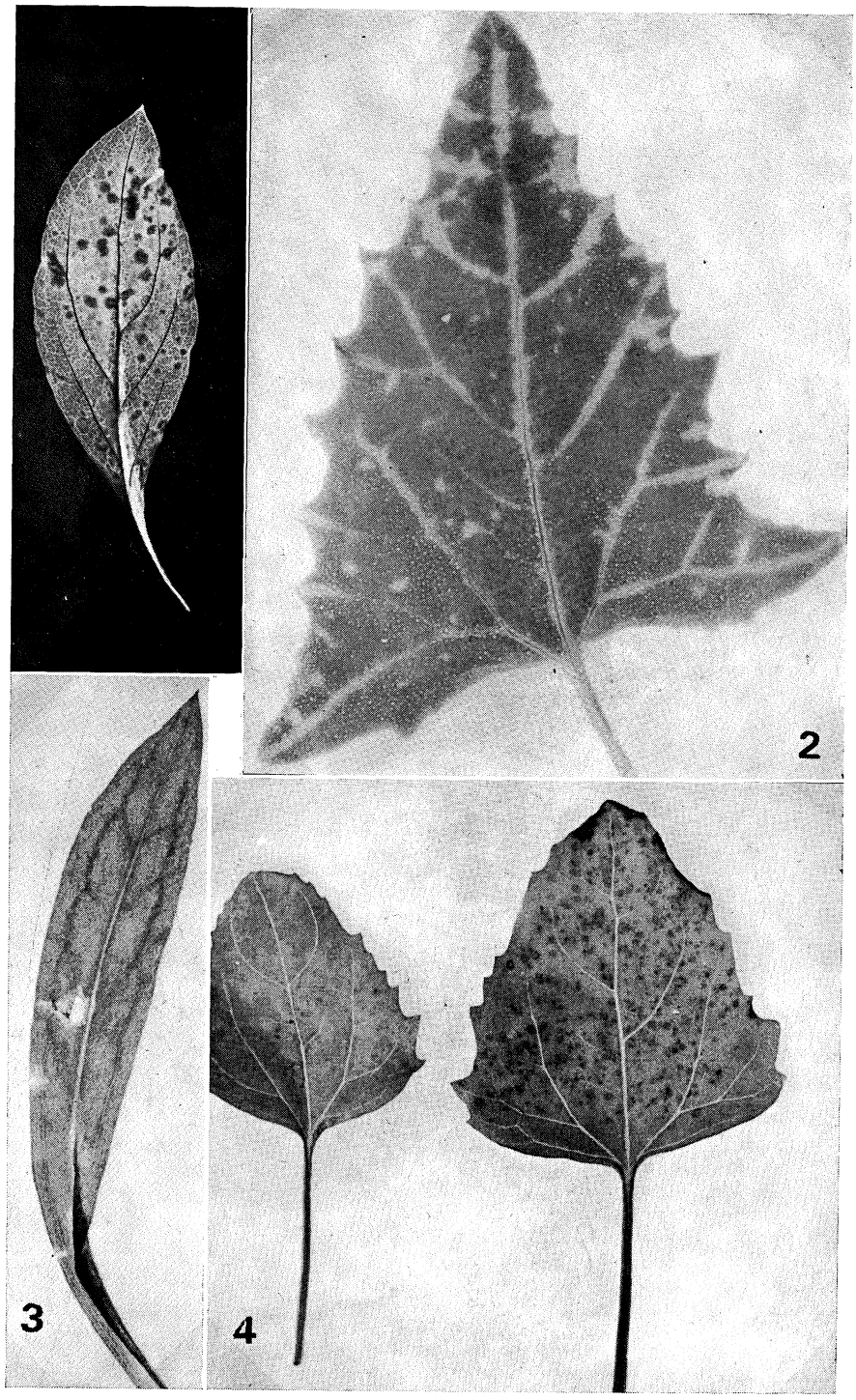


Figura 1. Hoja de Lychnis dioica, *mostrando manchas necróticas en forma de anillo, infectada con la muestra 13. Figura 2.* Atriplex hortensis, *infectada con muestra 11, mostrando manchas cloróticas. Figura 3.* Dianthus chinensis *con mosaico, infectada con la muestra 13. Figura 4. Hojas de* Chenopodium amaranticolor, *la de la derecha con lesiones necróticas, y la de la izquierda, sana. Infectada con la muestra 4*

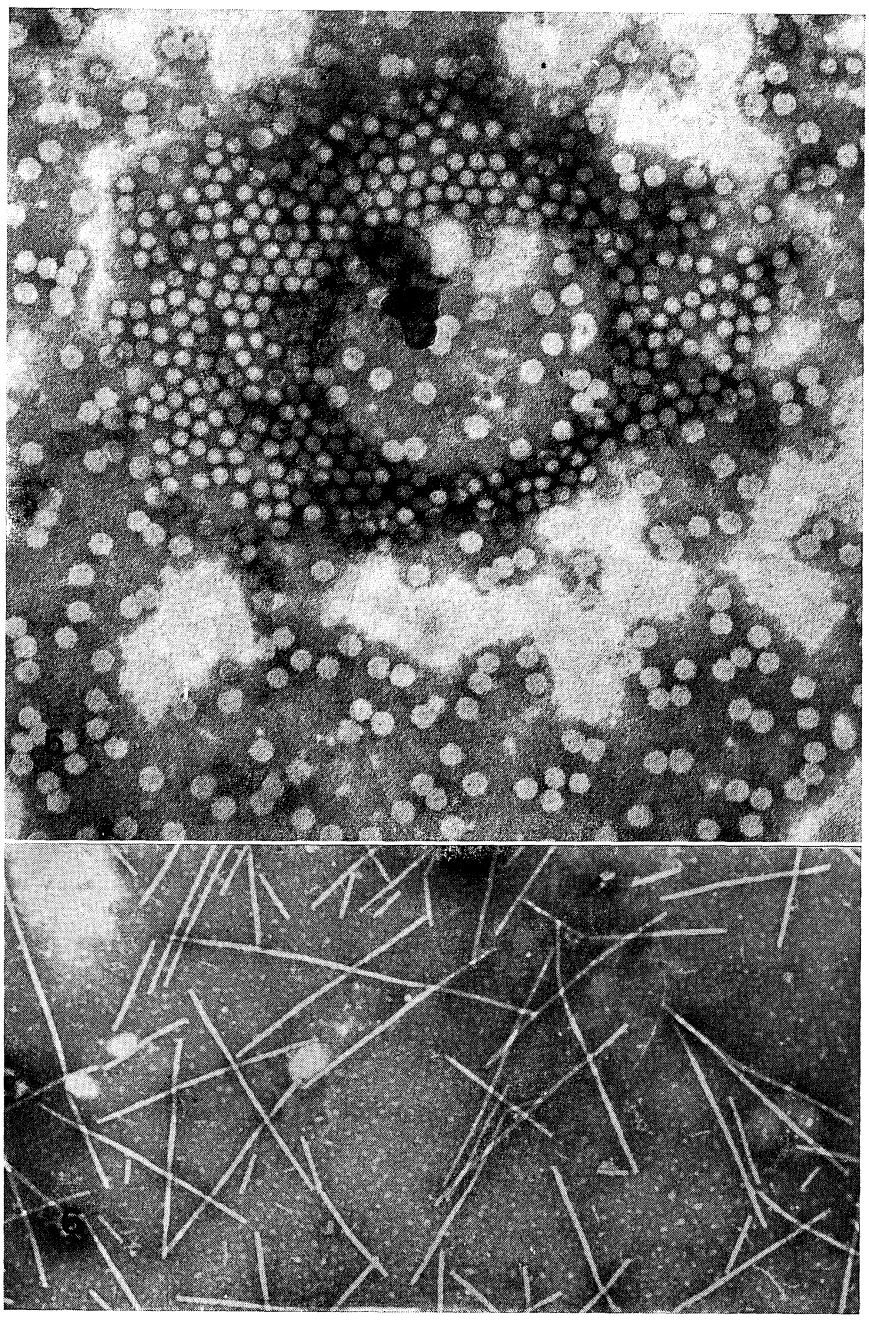
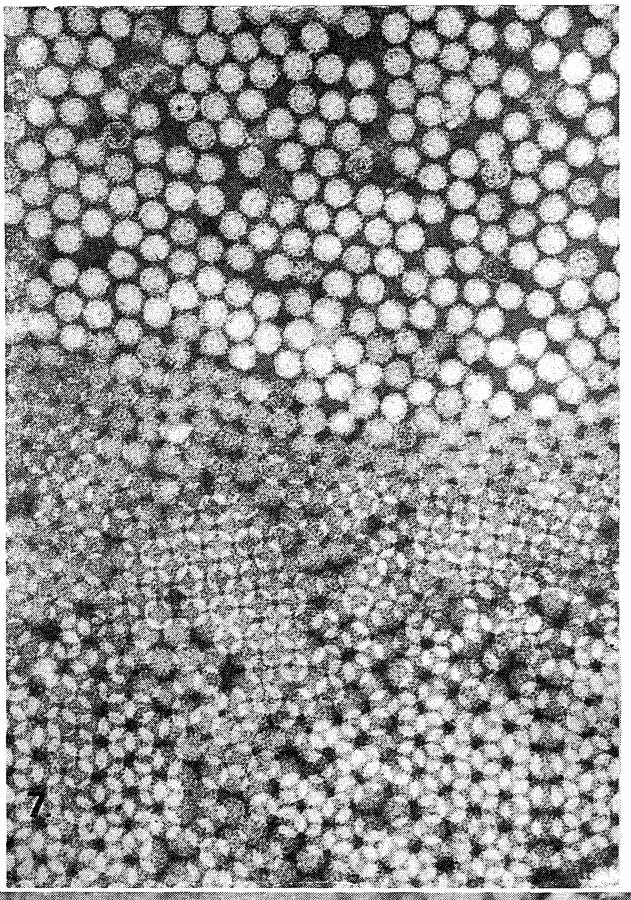


Figura 5. Tinción negativa directamente de la savia de la muestra 11, en la que se pueden ver dos tipos distintos de virus isométricos, uno mayor que el otro. × 92.000. Figura 6. Tinción negativa de la savia de la muestra 6, presentando un virus anisométrico. × 48.000



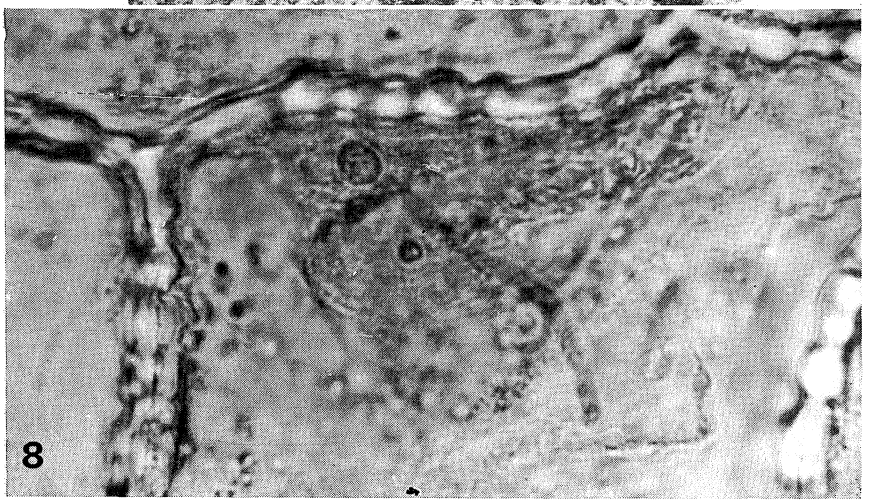


Figura 7. Tinción negativa de un purificado de la muestra 4, de un virus isométrico. × *12.800. Figura 8. Inclusiones amorfas granulares y de tipo* Brassica *3, en hoja de* Dianthus caryophyllus, *al microscopio óptico*

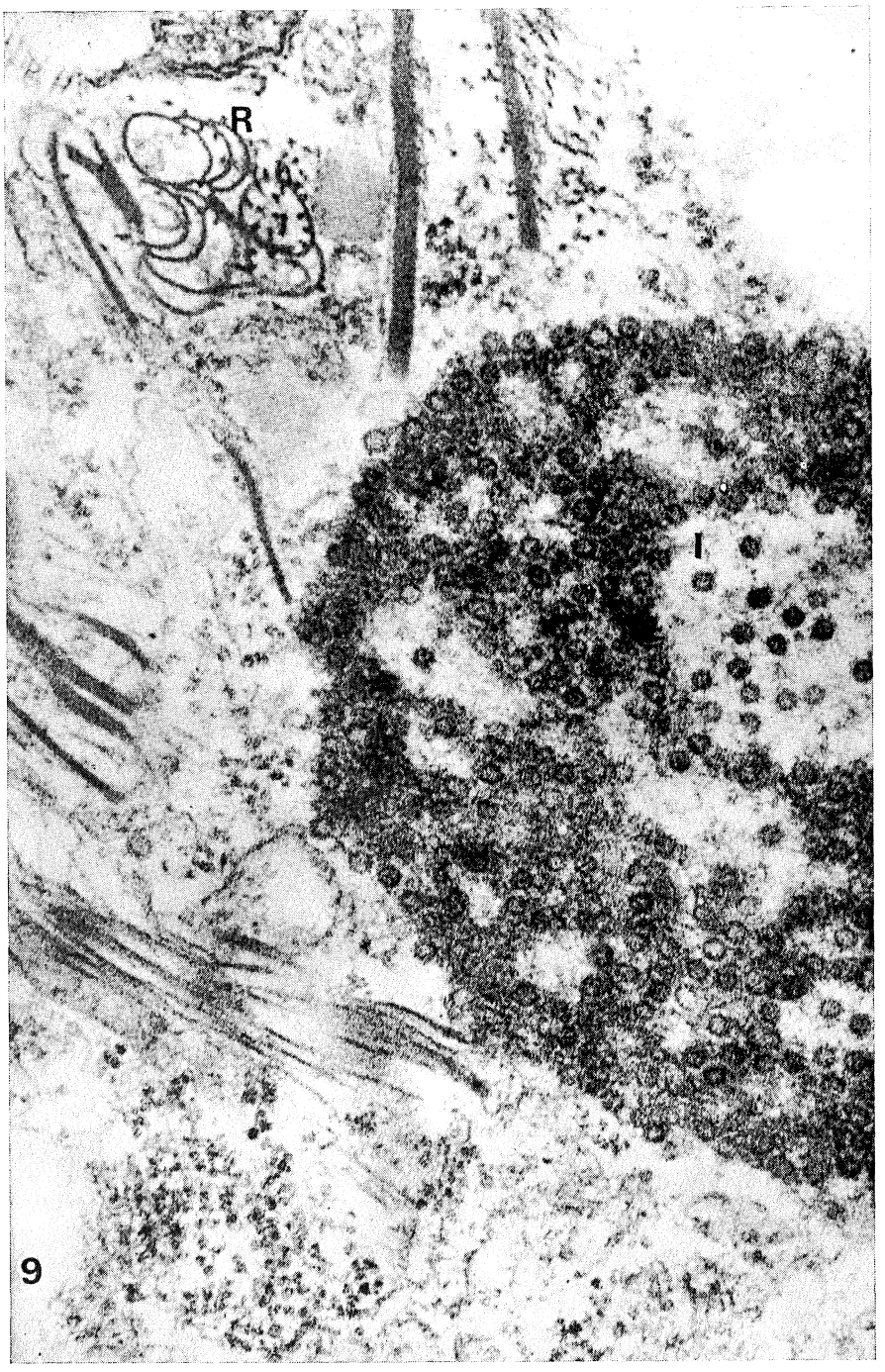


Figura 9. Cortes ultrafinos de citoplasma de la muestra 1 mostrando dos virus, uno, anisométrico, en forma de roseta (R), y el otro, isométrico (I). × 100.000

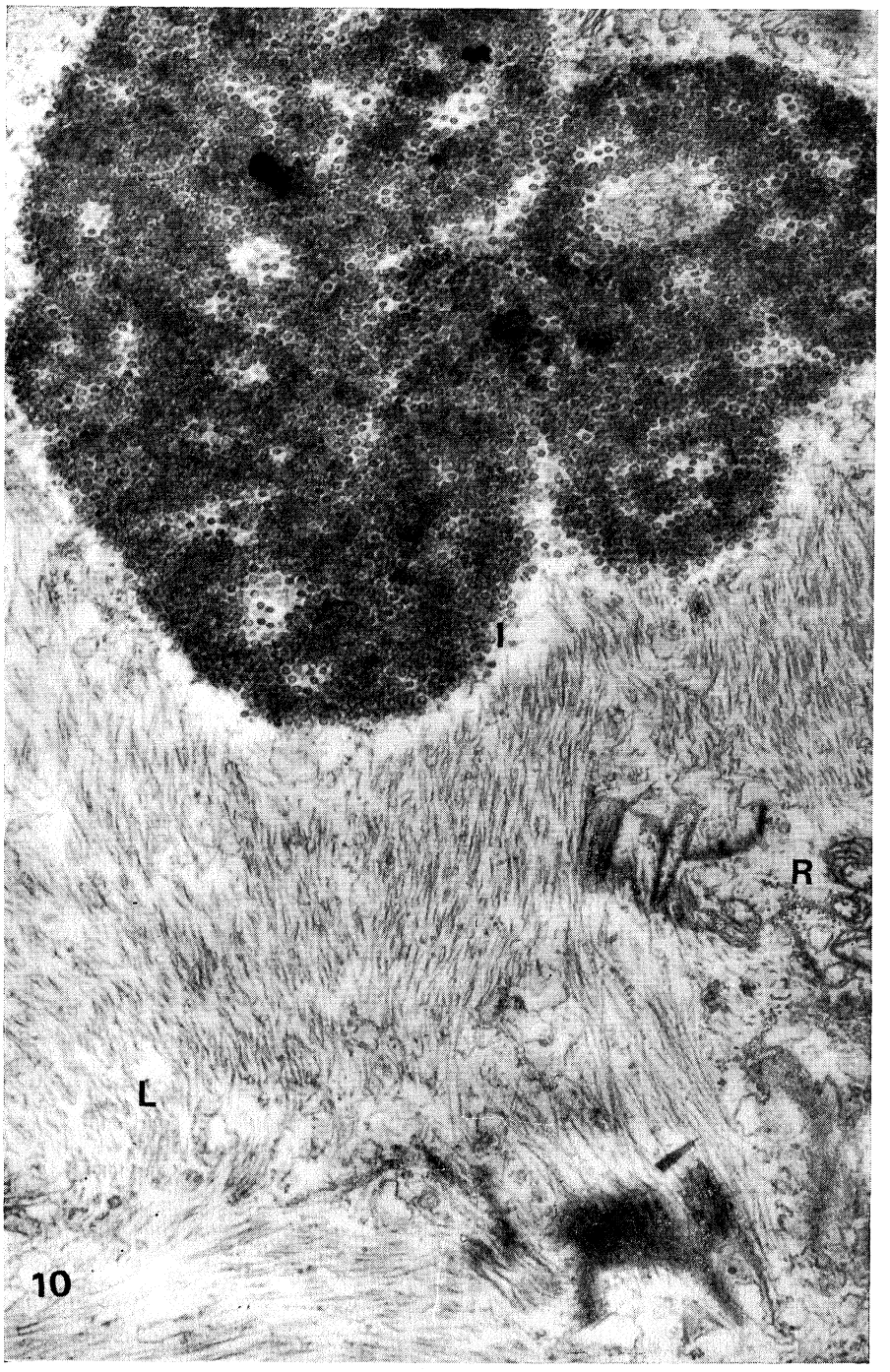


Figura 10. Sección ultrafina de la muestra 13 infectada por tres virus mostrando una inclusión del virus isométrico (I) y de dos anisométricos, el latente (L) y el otro en forma de roseta (R). × 40.366

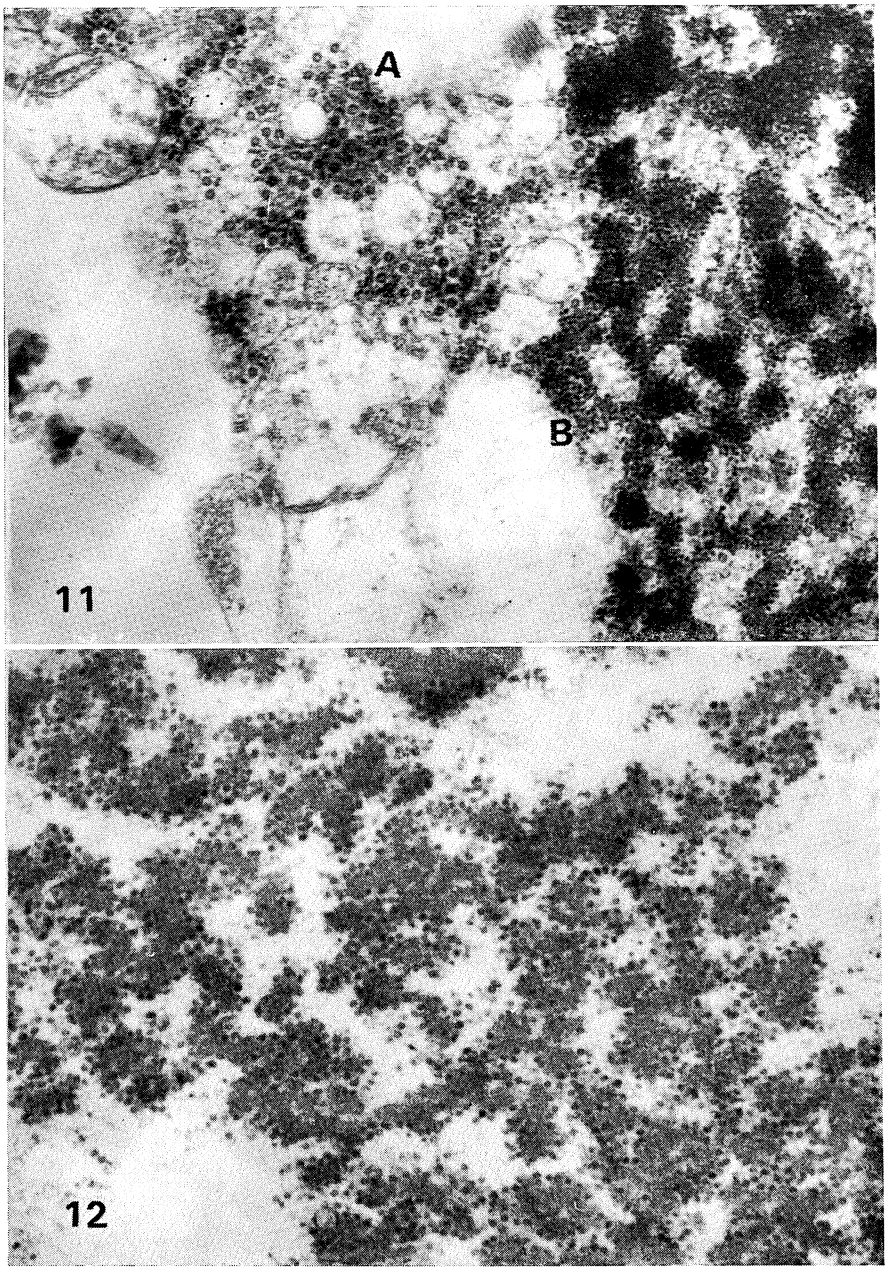


Figura 11. Parte del citoplasma celular de la muestra 3, en la que pueden apreciarse dos virus isométricos, A y B. × 33.600. Figura 12. Sección ultrafina de citoplasma de la muestra 3 mostrando el más pequeño de los virus isométricos asociados a una sustancia densa a los electrones. × 50.000

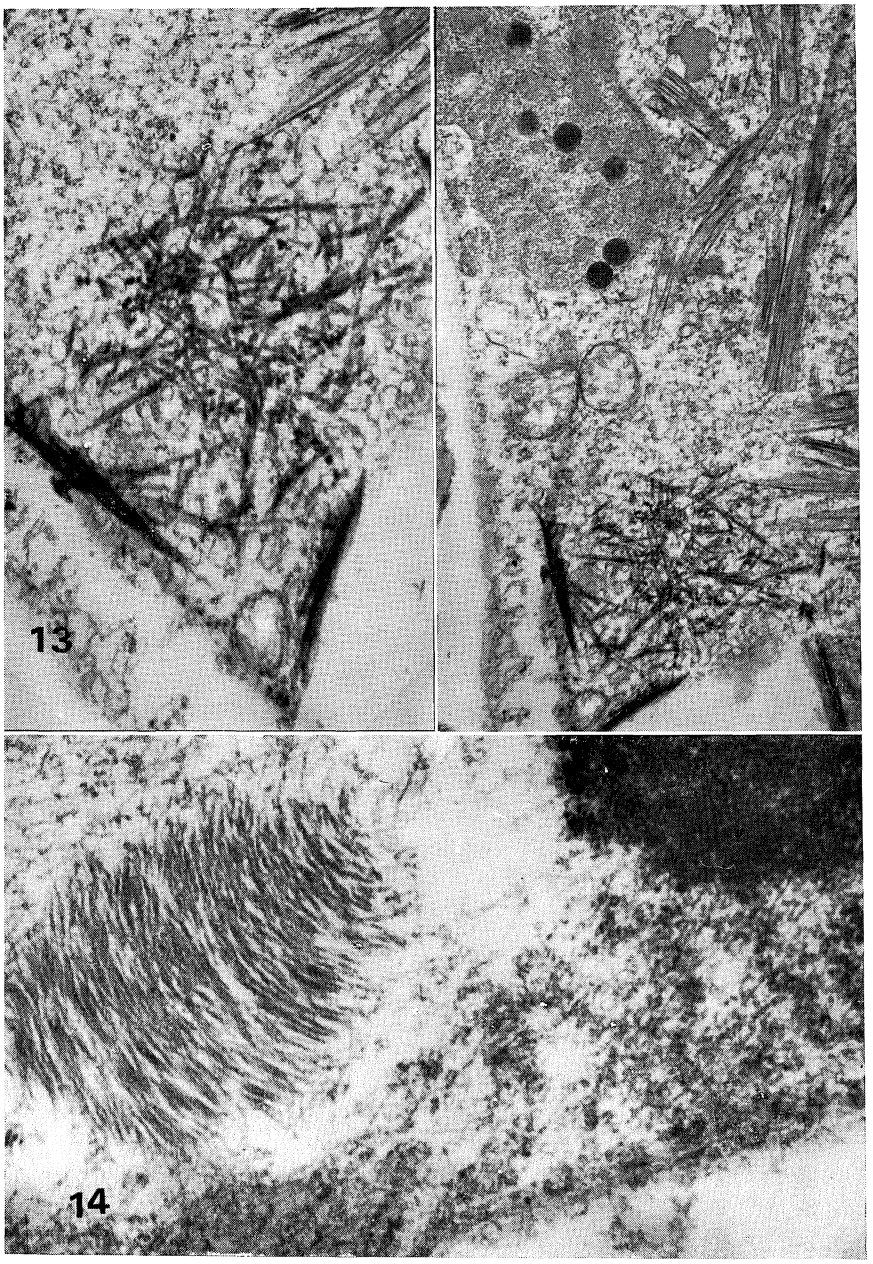


Figura 13. Citoplasma celular de la muestra 1 con virus anisométrico y túbulos parecidos a los de los cuerpos X del virus Mosaico del tabaco. × 23.200. Figura 14. Corte ultrafino de la muestra 13 mostrando el núcleo donde se aprecia el virus latente cerca del nucléolo. × 46.000

Cuadro 1. Sintomatología en plantas de ensayo

Muestras	Plantas de ensayo						
	D. barbatus	*D. chinensis*	*D caryophyllus*	*L. dioica*	*N. tabacum*	*Ch. amaranticolor*	*A. hortensis*
1	A y M	—	—	—	M	—	—
2	M	—	—	—	M	—	—
3	M	—	—	—	—	—	—
4	—	—	—	—	—	L_n y M	—
5	—	—	—	—	—	—	—
6	M	—	—	—	—	—	—
7	—	—	—	—	—	—	—
8	—	—	—	—	—	—	—
9	—	—	—	—	—	—	—
10	—	—	—	—	—	—	—
11	—	—	M_o	—	—	L_l	M y M_o
12	—	—	—	—	—	—	—
13	—	M	—	M, A y M_o	M	M	—

M = mosaico. M_o = moteado. L_l = lesiones locales. L_n = lesiones necróticas. A = anillos. — = negativo.

No dieron síntomas las siguientes plantas de ensayo inoculadas con las diferentes muestras:

Dianthus maritimus
Gysophila paniculata
Nicotiana glutinosa
N. clevelandii
Lycopersicum sculentum
Capsicum annuum
Petunia hybrida
Brassica chinensis
Vicia faba
Vigna sinensis
Phaseolus vulgaris
Chenopodium quinoa
Espinacea oleracea
Tetragonia cristaloseta
Cucumis sativus
Tropeolun majus
Antirrhinum majus
Gomphrena globosa
Celosia plumaria
C. cristata
Amaranthus caudatus
Zinnia elegans
Tajetes erecta

Cuadro 2. Virus encontrados

Muestras	Tinción negativa	Cortes ultrafinos
1	Anisométrico de 700-750×18 mμ	Anisométrico del tipo Y. Isométrico de 42-45 mμ, tipo Mc
2	Isométrico de 27 mμ y anisométrico de 700-750×18 mμ	Anisométrico del tipo Y. Isométrico de 19 mμ
3	Anisométrico de 700-750×18 mμ	Anisométrico del tipo latente y dos isométricos de 19 y 42-45 mμ del tipo Mc
4	Isométrico de 27 mμ	Isométrico de 27 mμ
5	Anisométrico	
6	Anisométrico de 700-750×18 mμ	Anisométrico del tipo Y
7	Anisométrico	Anisométrico
8	Isométrico de 26 mμ y anisométrico	Isométrico de 40-45 mμ del tipo Mc
9	Anisométrico	Isométrico de 40-45 mμ del tipo Mc
10	Isométrico de 25-26 mμ	Posiblemente isométrico
11	Isométrico de dos tamaños, 19 y 26 mμ	Isométrico de 40-45 mμ del tipo Mc
12	Anisométrico	Anisométrico
13	Anisométrico de 700-750 mμ	Isométrico del tipo Mc y dos anisométricos, uno del tipo latente y otro del grupo Y

Plantas de ensayo. *Dianthus maritimus, Gomphrena globosa,* sin síntomas; *Tropeolum majus,* sin síntomas; *Atriplex hortensis,* sin síntomas; *Chenopodium amaranticolor,* mosaico; *Lychnis dioica,* mosaico moteado; *Nicotiana tabacum,* mosaico; *D. chinensis,* mosaico.

Citología. Inclusiones granulares grandes y otras pequeñas refringentes del tipo Mosaico de la coliflor.

Tinción negativa. Por el método dip y tras purificación a partir de *Dianthus chinensis* inoculado con la muestra original, con butanol-cloroformo y tetracloruro de carbono, partículas alargadas de 700-750 mμ.

Cortes ultrafinos. Se observaron un virus esférico, formando inclusiones tipo Mosaico de la coliflor y dos tipos de distribución diferente en virus alargados: uno, tipo latente, y otro, Y de la patata.

DISCUSION

Uno de los autores (18) fue el primero que estudió las inclusiones intracelulares de cuatro virus del clavel, el Moteado de las venas del clavel y el Moteado del clavel, aislados y caracterizados en Holanda, y el virus Mosaico del clavel y otro virus aislado en España que producía inclusiones cristalinas en el núcleo y en el citoplasma. En este trabajo se encontró que el virus Moteado del clavel tenía dos clases diferentes de inclusiones intracelulares, por lo que se indicaba que posiblemente se encontrasen juntos dos virus, aunque por sintomatología y serología se habían caracterizado como uno solo. En el presente trabajo hemos visto por microscopía electrónica que, efectivamente, en gran parte de las muestras estudiadas existían dos virus juntos y a veces tres, uno de ellos, sobre todo, que produce inclusiones del tipo *Brassica* 3, difícil de extraer de la célula y, por tanto, difícil de detectar serológicamente. Esta comprobación, por otras técnicas, de la existencia de infecciones en el clavel producidas por varios virus a un mismo tiempo, nos dan una idea de la importancia que tiene el conocimiento de las inclusiones intracelulares para el estudio sistemático de las virosis.

En las muestras estudiadas hemos encontrado, en las muestras 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 13, inclusiones amorfas granulares; en las muestras 1, 8, 9, 11 y 13, inclusiones amorfas tipo *Brassica* 3; en las muestras 1, 8, 9 y 13, ambos tipos de inclusiones en las mismas células, y en las muestras 2 y 12 no hemos encontrado inclusiones.

El virus Grabado en anillo del clavel parece ser el que forma las inclusiones de tipo *Brassica* 3, y las inclusiones amorfas son producidas por el virus Latente del clavel y también por un virus del tipo Y de la patata; ambos tipos de inclusiones parecen idénticas al microscopio de luz, aunque aparecen claramente distintas, en cortes ultrafinos, al microscopio electrónico. En algunos casos hemos encontrado inclusiones formadas por ambos virus *(figuras 7-8* y *10).*

Sintomatología

Los síntomas de las diferentes virosis en *Dianthus caryophyllus* son muy parecidos (excepto en el caso del virus Latente, en el que no existen síntomas apreciables), y dependen de la variedad del clavel, del tiempo de infección e incluso de factores ambientales, como la luz y la tempera-

tura, por lo que empleando solamente la sintomatología, no es posible ni siquiera acercarse a un diagnóstico. Las inoculaciones en plantas de ensayo tienden a resolver este problema; en el presente trabajo no hemos encontrado prácticamente verdaderas plantas específicas que den síntomas típicos y claros sólo para un determinado virus. Solamente en el caso del virus que produce ultrainclusiones del tipo virus Y de la patata y que podría ser el virus Moteado de las venas del clavel, encontramos que daba síntomas de mosaico ligero en *Nicotiana tabacum* var. White burley, lo que le diferencia del citado virus, y puede servir como planta específica para este virus y al mismo tiempo de planta filtro para su aislamiento.

Microscopía electrónica

La combinación de diversos métodos de microscopía electrónica que hemos usado para este trabajo nos ha permitido encontrar o confirmar infecciones mixtas, que por otros métodos hubieran sido muy difíciles de comprobar.

El emplear el método rápido dip, de Brandes (3), combinado con la tinción negativa nos ha revelado partículas de virus difícilmente observables en cortes ultrafinos y, por el contrario, por este método, incluso aplicado a una purificación corriente de virus, no es posible observar las partículas isométricas correspondientes al virus Grabado en anillo del clavel, que son fácilmente observables en cortes ultrafinos. Las partículas bacilares o anisométricas observadas por este método de tinción negativa tenían diferentes longitudes, yendo desde 500 a 800 mμ, con una mayor abundancia de partículas de longitudes comprendidas entre 650 y 750 mμ, por lo que es muy difícil empleando este método solamente el poder distinguir entre virus con partículas comprendidas en esas longitudes.

Cortes ultrafinos

a) Virus anisométricos

En la tinción negativa hemos visto que se observaba solamente un tipo de partículas flexuosas y de unas 650-750 × 18 mμ; sin embargo, por medio de cortes ultrafinos podemos observar dos tipos muy claros de distribución de estas partículas que nos pudieron ayudar a su distinción y clasificación, mostrando que se trata de dos virus diferentes, aunque de

partículas de tamaño muy parecido, imposibles de distinguir por tinción negativa en una mezcla de ambas; uno de los virus se distribuye en el citoplasma formando masas de partículas bien definidas, a veces distribuidas entre los orgánulos citoplásmicos, y otras, en bolsas del mismo aspecto que las formadas por el virus X de la patata y el virus Latente de la *Passiflora.*

En este tipo de infección, los elementos normales del citoplasma aparecen casi sin degeneración. En un sólo caso de este tipo de infección, muestra 13, hemos encontrado partículas de virus dentro de algunos núcleos formando bolsas en el nucleoplasma, sin membrana envolvente y no asociadas con el nucleolo *(figura 14).*

El segundo tipo de virus forma ultrainclusiones típicas del tipo de virus del grupo Y de la patata; estas inclusiones están formadas por hojas finas de proteína, enrolladas formando rosetas y han sido descritas con detalle por medio de cortes seriados, primeramente, por Rubio-Huertos y López-Abella (20), y más tarde por Edwardson y colaboradores (7); en este tipo de infección se observó la degeneración de algunos elementos celulares, como plastidios y cloroplastos.

El único virus del clavel que se conoce que forma este tipo de ultrainclusiones es el virus Moteado de las venas del clavel, descrito por Kassanis (12) y Weintraub y Ragetli (24); pruebas serológicas, realizadas amablemente por el Dr. Stone, en Inglaterra, con muestras enviadas por nosotros, prueban que se trata de dicho virus, en una estirpe nueva. Actualmente hemos aislado este virus en *Lychnis dioica* y un estudio a fondo del mismo constituirá el objeto de otro trabajo.

b) Virus isométricos

Por cortes ultrafinos se ha podido observar que las inclusiones de tipo ovoide refringentes son parecidas a las inducidas por el virus *Brassica* 3 (16-11) y el virus de la *Dhalia* (14), y en ellas se encuentran partículas de virus isométricos de 40-45 mμ que no hemos podido detectar en tinción negativa. Este virus se ha encontrado casi siempre acompañando a la infección por otros virus, generalmente de tipo anisométrico, correspondiente a los descritos en el apartado a), es decir, del tipo X o del Y de la patata. Este virus corresponde muy probablemente al Grabado en anillo del clavel, descrito por Hollings y Stone (8).

También en cortes ultrafinos se han observado además partículas de

virus isométricas, de 26-28 mμ, formando masas en algunas células; estas partículas, observadas también por tinción negativa directa y tras purificación, corresponden al virus Moteado del clavel, según las descripciones de Hollings y Stone (9).

Partículas isométricas menores no han podido ser observadas dado su parecido en tamaño con los ribosomas; sin embargo, aparecen masas de partículas isométricas pequeñas, acompañadas de una sustancia opaca a los electrones, que no rodean ni envuelven las partículas víricas, sino que están asociadas a dicha sustancia por su parte externa o se encuentran en el citoplasma cerca de ella. Dichas partículas víricas es posible que correspondan a las observadas por tinción negativa en una purificación de la muestra 11, que medían 19-21 mμ, aunque éstas parecen de mayor tamaño; virus con partículas de este tipo no han sido nunca descritos infectando claveles y sus dimensiones parecen corresponder a ciertos virus satélites (13), por lo que un estudio más completo de este virus puede ser de gran interés. De todas formas, en la medida de las partículas influye mucho si se realiza en preparaciones en tinción negativa o en cortes ultrafinos, por lo que partículas iguales pueden variar bastante. En cortes ultrafinos, las posibilidades de hacer medidas más precisas son casi nulas, por ello los datos que damos son aproximados, pero las diferencias de tamaños en una misma preparación sí se pueden apreciar fácilmente, con lo que las medidas nos pueden dar una idea de los tamaños relativos.

En una de las muestras estudiadas, muestra 1, hemos encontrado un caso interesante y es que en cortes ultrafinos aparecen, junto con ultraestructuras del tipo virus Y de la patata, unos filamentos que se tiñen bien con osmio y son parecidos a los observados dentro de los cuerpos X inducidos por el virus Mosaico del tabaco y que no se conocían en otro virus (21) hasta que también encontró algo parecido Vela (23) en una virosis de *Calendula officinalis*.

RESUMEN

Se han estudiado 13 muestras de claveles *(Dianthus caryophyllus)* recogidas de cultivos en diferentes lugares de España y que presentaban síntomas de virosis. La mayoría de las muestras (9) presentaban inclusiones intracelulares de tipo amorfo y, en cuatro de ellas, dos clases de inclusiones amorfas al mismo tiempo, unas, amorfas granulares o filamen-

tosas y otras del tipo Mosaico de la coliflor o virus 1 de *Dhalia (figura 8).*

Las muestras se inocularon a diferentes plantas testigo y los virus se multiplicaron en las más idóneas, y se purificaron por el método butanol-cloroformo o de tetracloruro de carbono.

El estudio por microscopía electrónica se realizó por tinción negativa directa de la savia o del virus purificado y por cortes ultrafinos. Los dos métodos combinados nos han permitido observar partículas de virus que hubiera sido imposible detectar utilizando uno solo de ellos.

Se han podido identificar con esta mezcla de métodos y en sintomatología en plantas de ensayo los virus Moteado del clavel y Grabado en anillo del clavel, ambos con partículas isométricas de unas 29 mμ y 42 mμ, respectivamente; también se ha encontrado un virus isométrico mucho más pequeño, que en cortes ultrafinos se encuentra asociado a una sustancia opaca a los electrones, pero sin estar rodeados por ella *(figuras 11-12):* es posible que se trate de un virus nuevo.

Por tinción negativa se ha visto que en la mayoría de las muestras aparecían partículas de virus alargadas, de unas 600 a 800 mμ × 18 mμ que por cortes ultrafinos hemos visto correspondían a dos virus diferentes, uno el Latente del clavel, y el segundo, que forma ultrainclusiones del tipo virus Y de la patata y se ha identificado como el virus Moteado de las venas del clavel, nueva estirpe, virus que hemos aislado en *Lychnis dioica* y será objeto de un estudio más extenso.

SUMMARY

An study of some carnation virus diseases in Spain

Thirteen samples of carnation plants showing virus symptoms were collected from cultivars in different regions of Spain.

Nine samples had intracellular amorphous inclusions; in four of them two kind of amorphous inclusions bodies were present in the same cells, one amorphous granular and the other compact of the same type of those induced by cauliflower mosaic virus. Two of the samples had no inclusions.

The samples were inoculated to a series of test plants and the viruses were grown in the most adequate hosts and purified by the butanol-chloroform or carbon tetrachlorure methods.

Negative staining for electron microscopy of the samples by the dip method or after purification and ultrathin sections of the samples and the plants infected with them were made. The two methods combined made possible the observation of virus particles in mixed infections which by only one of the methods would have been difficult or impossible to detect. All the samples, except two, were infected by more than one virus, some times three different viruses were present in the same samples.

We have been able to identify by the size and shape of the virions combined with their especific distribution in the cells of their hosts and their symptomatology and host range the following viruses: Carnation etched ring virus which was present in mixed infections with most of the other viruses described below. Carnation mottle virus in four samples and Carnation latent virus alone in one sample and mixed in two samples.

One virus found in mixed infections with Carnation etched ring and Carnation latent was not identified; it has small, about 19 mμ isometric particles, and it is associated in the host cells with a dark substance *(figures 11-12)*. Other virus has elongated particles of about 650-750 mμ $\times$ 18 mμ and forms in the infected cells ultrainclusions (pinswheels, etc.) characteristics of the potato virus Y group and has been isolated on *Lychnis dioica* plants. This virus is the Carnation vein mottle new strain.

BIBLIOGRAFIA

1. BAGNALL, R. H.; WETTER, C., y LARSON, R. H. 1959. Differential host serological relationships of potato virus M, potato virus S, and Carnation latent virus. Phytopathology, 49, 435.
2. BOS, L., y RUBIO-HUERTOS, M. 1969. Light and electron microscopy oy cytoplasmic and unusual nuclear inclusion bodies evoked by a virus from necrotic peas. Virology, 37, 377.
3. BRANDES, J. 1957. Eine electronenmikroskopische Schenellmethode zum Nachweis faden und stäbchenförmiger Viren, insbesondere in Kartoffeldunkelkeimen. Nachrinchtenbl. Deut. Pflanzenschutzdienstes, 9, 151.
4. BRANDES, J., y WETTER, C. 1963. Untersuchungen über Eigenschaften und verwandtschaftsbeziehungen des latenten *Passiflora*-virus (*Passiflora* latent virus). Phytopathol. Z., 49, 61.
5. BRANDES, J.; WETTER, C.; BAGNAL, R. H., y LARSON, R. H. 1959. Size and shape of the particles of potato virus S, potato virus M, and Carnation latent virus. Phytopathology, 49, 443.
6. EDWARDSON, S. R. 1969. Cylindrical inclusions in the cytoplasms of leaf cells infected with tobacco etch virus. Science, 153, 883.

7. EDWARDSON, S. R.; PURCIFULL, D. E., y CHRIATIE, R. G. 1968. Structure of cytoplasmic inclusions in plants infected with rod-shaped viruses. Virology, 34, 250.
8. HOLLINGS, M., y STONE, O. M. 1961. Carnation etched ring a preliminary report on an undescribed disease. Rep. Glasshouse Crops Res. Inst., 94.
9. HOLLINGS, M., y STONE, O. M. 1964. Investigation of Carnation viruses. Carnation mottle. Ann. Appl. Biol., 53, 103.
10. HOLLINGS, M., y STONE, O. M. 1965. Investigation of Carnation viruses. Ann. Apl. Biol., 56, 73.
11. KASSANIS, B. 1954. A virus latent in Carnation and potato plans. Nature, 173, 1097.
12. KASSANIS, B. 1955. Some properties of four viruses isolated from Carnation plants. Ann. Appl. Biol., 43, 103.
13. KASSANIS, B. 1956. Serological relationships between Potato paracrinkle virus, Potato virus S and Carnation latent virus. J. Gen. Microbiol., 15, 620.
14. ROBB, S. M. 1963. A method for the detection of *Dahlia* mosaic virus in *Dahlia*. Ann. Appl. Biol., 52, 145.
15. ROBB, S. M. 1964. Location structure and cytochemical staining reactions of the inclusion bodies found in *Dahlia* variabiles infected with *Dahlia* mosaic virus. Virology, 23, 141.
16. RUBIO-HUERTOS, M. 1950. Estudio sobre inclusiones intracelulares producidas por virus en las plantas. Microbiol. Españ., 3, 207.
17. RUBIO-HUERTOS, M. 1956. Origin and composition of cell inclusions associated with certain Tobacco and Crucifer viruses. Phytopathology, 46, 10.
18. RUBIO-HUERTOS, M. 1959. Inclusiones intracelulares producidas por diferentes virus del clavel *(Dianthus caryophyllus)*. Microbiol. Españ., 12, 331.
19. RUBIO-HUERTOS, M.; CASTRO, S.; MORENO, R., y LÓPEZ-ABELLA, D. 1968. Ultraestructura de células de *Dianthus caryophyllus* infectadas por dos virus al mismo tiempo. Microbiol. Españ., 21, 1.
20. RUBIO-HUERTOS, M., y LÓPEZ-ABELLA, D. 1966. Ultraestructura de células de pimiento infectadas con un virus y su localización en las mismas. Microbiol. Españ., 19, 77.
21. SHALLA, T. 1964. Assembly and aggregation of Tobacco mosaic virus in tomato leaffets. J. Cell. Biol., 21, 253.
22. STEERE, R. L. 1959. The purification of plant viruses. Advan. Virus Res., 6, 1.
23. VELA, A. 1970. Ultraestructura de hojas de *Calendula officinalis* infectadas por un virus anisométrico. Microbiol. Españ., 47, 60.
24. WEINTRAUB, M., y RAGETLI, H. W. J. 1970. Distribution of virus like particles in leaf cells of *Dianthus barbatus* infected with Carnation vein mottle virus. Virology, 40, 868.

INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA (C S I C)
DEPARTAMENTO DE PROTOZOOLOGIA
SECCION DE ECOLOGIA

METABOLISMO OXIDANTE EN *POLYSTICTUS VERSICOLOR*

por

M.ª DEL CARMEN FERNANDEZ - PUENTES y D. RODRIGUEZ

INTRODUCCION

Los trabajos de investigación llevados a cabo con *Polystictus versicolor* y otros basidiomicetos causantes de la podredumbre blanca de algunos árboles, se han orientado, en su mayor parte, hacia el estudio del sistema enzimático polifenoloxidasa (lacasa). Según indica Lindeberg (7), la importancia de esos sistemas enzimáticos radica en que desempeñan un gran papel en la descomposición de residuos vegetales. El mismo autor (6) afirma que es muy posible que la descomposición de la lignina por basidiomicetos esté relacionada con la proporción de lacasa que los hongos sinteticen.

Por lo que respecta a la nutrición, Robbins (9) encuentra que de 310 estirpes de basidiomicetos ensayadas, 190 crecen pobremente en un medio basal de asparagina, glucosa y sales minerales. Las 120 estirpes restantes sólo se desarrollan si se adiciona al medio extractos de tomate, madera, corcho, etc. Robbins (10) indica que estos extractos aportan al medio sales minerales, sustancias carbonadas y nitrogenadas, además de factores de crecimiento.

Blumenthal (2) señala que los hongos, en general, suelen almacenar en sus células gran cantidad de sustancias de reserva, lo cual hace difícil

el estudio del metabolismo de un determinado substrato exógeno. Ello quizá sea la causa de la escasa información que se tiene hoy día sobre metabolismo de hongos basidiomicetos. Por tanto, hemos considerado interesante realizar un estudio del metabolismo oxidante de algunos hidratos de carbono y aminoácidos. Para ello hubimos de encontrar, en primer lugar, un medio de cultivo semisintético en el que el hongo pudiera desarrollarse bien para someter luego el micelio a un tratamiento adecuado para disminuir la respiración endógena.

MATERIAL Y METODOS

Organismo

El hongo *Polystictus versicolor* utilizado en este trabajo procede del Commonwealth Mycological Institute, con el número 79.126.

Medios de conservación

Se utilizaron dos medios: agar-malta y el denominado GAE, compuesto de glucosa, asparagina y extracto de levadura, en las proporciones respectivas de 1, 0,1 y 0,5 %, junto con 2 % de agar. Estos medios se distribuyen en tubos y se esterilizan por calor.

Medios de cultivo

Se utilizaron los siguientes medios:
Medio I) Glucosa, 2 %; $SO_4(NH_4)_2$, 0,3 %; PO_4H_2K, 0,1 %; ClK, 0,05 %; $SO_4Mg.7H_2O$, 0,05 %, y extracto de levadura, 0,5 %. El pH se ajustó a 6. Se distribuye en matraces de 300 ml, con 50 ml de medio cada uno y se esteriliza a vapor fluente durante 30 minutos, en 3 días consecutivos. También se ensayaron otros medios en los que se modificó la concentración de extracto de levadura y los valores de pH. Asimismo, se probó este medio sin glucosa y, en otros casos, sin extracto de levadura.

Medio II) Se diferencia del I en que la fuente nitrogenada empleada es un aminoácido, a concentración de 0,3 %.

Inoculación

Se realiza con trocitos de micelio de igual tamaño, que se sacan, en condiciones asépticas, de cultivos de agar-malta o de GAE.

Preparación de micelio lavado

Después del período de incubación (10 días a 25 °C, en cultivo estacionario), se retira el líquido metabólico de cada matraz en condiciones asépticas, el micelio se lava varias veces con agua destilada estéril y se suspende en una solución estéril de la siguiente composición: $SO_4(NH_4)_2$, 0,5 %; PO_4H_2K, 0,1 %, y $SO_4Mg.7H_2O$, 0,5 %, y se mantiene durante 24 horas a 25 °C, en agitación, con el fin de disminuir la elevada respiración endógena del hongo. Después de separar el micelio por filtración, se lava varias veces con agua destilada, se suspende en solución reguladora de fosfatos 0,1 M a pH = 6 y se homogeneiza en un turmix. La concentración de la suspensión se calcula determinando el peso seco de volúmenes conocidos.

Análisis de glucosa

La glucosa presente en los líquidos metabólicos se determinó mediante la técnica de Stiles (11).

Técnicas manométricas

La determinación del oxígeno consumido y del anhídrido carbónico desprendido se hizo siguiendo las técnicas descritas por Umbreit y Burris (13).

RESULTADOS

Desarrollo del Polystictus versicolor *en el medio I*

Para este fin se inocularon 75 matraces que se incubaron 10 días, a 25 °C, en cultivo estacionario.

Las muestras retiradas antes de la inoculación para analizar la glucosa inicial dieron 2,1 g %.

Los resultados encontrados se exponen en el *cuadro 1* y se refieren a un promedio de 5 matraces.

Cuadro 1. Micelio y glucosa residual obtenidos al crecer P. versicolor *en el medio I, a diferentes valores de pH y concentraciones de extracto de levadura*

Extracto de levadura %	pH	Glucosa %	Micelio mg
0,01	5	1,8	68
0,01	6	1,7	58
0,01	7	1,8	89
0,05	5	1,5	103
0,05	6	1,6	90
0,05	7	1,6	74
0,10	5	1,8	129
0,10	6	1,3	135
0,10	7	1,8	113
0,30	5	1,3	239
0,30	6	1,0	232
0,30	7	1,3	196
0,50	5	0,64	289
0,50	6	0,23	349
0,50	7	0,70	301

Se inocularon también 15 matraces con el mismo medio, pero sin extracto de levadura, y otros 25 sin glucosa y cantidades variables de extracto de levadura. Los respectivos resultados encontrados se exponen en los *cuadros 2-3*.

Desarrollo del Polystictus versicolor *en el medio II*

Se probaron diferentes aminoácidos como única fuente de nitrógeno. Para este fin se preparaban 15 matraces que se inoculaban con *Polystictus versicolor* y luego se incubaban durante 10 días, a 25 °C. En el *cuadro 4* se exponen los resultados encontrados cuando la fuente nitrogenada era ácido glutámico.

Cuadro 2. Miligramos de micelio y porcentaje de glucosa residual después de incubar el hongo en el medio I, sin extracto de levadura, durante 10 días, a 25 °C

pH	Glucosa %	Micelio mg
5	1,7	46
6	1,7	50
7	1,8	56

Cuadro 3. Miligramos de micelio obtenidos al crecer P. versicolor *en el medio I, sin glucosa, a pH = 6 y con distintas cantidades de extracto de levadura*

Extracto de levadura %	Micelio mg
0,01	
0,05	
0,10	
0,30	12
0,50	18

Cuadro 4. Miligramos de micelio obtenidos al crecer P. versicolor *en el medio II, con ácido glutámico como fuente nitrogenada*

pH	Glucosa %	Micelio mg
5	1,8	79
6	1,6	42
7	1,9	42

Actividad del micelio lavado frente a diversos substratos

Se prepararon suspensiones de micelio lavado y se pusieron frente a glucosa, fructosa, manosa y 1,4-gluconolactona. El consumo de oxígeno se midió en el respirómetro de Warburg. Para este experimento se emplearon 4 μmol de cada uno de los substratos y 2,3 ml de suspensión de micelio en cada vasija (10 mg de peso seco). La fase gaseosa era aire y la temperatura, de 25 °C. Los resultados encontrados se exponen en el *cuadro 5*.

Cuadro 5. Microlitros de oxígeno consumidos por una suspensión de micelio lavado de P. versicolor *frente a 4μmol de substrato*

Substrato	Horas				
	1	2	3	4	5
Glucosa	66	101	126	165	202
Fructosa	39	76	105	144	186
Manosa	36	60	95	134	148
1,4 gluconolactona	39	66	102	145	186
Testigo, sin substrato	22	44	65	90	110

Cociente respiratorio del micelio lavado

Con el fin de conocer la naturaleza del substrato endógeno, se determinó el consumo de oxígeno y el desprendimiento de anhídrido carbónico, antes y después del tratamiento dado al micelio para disminuir las reservas celulares.

Para este experimento se emplearon 2,5 ml de suspensión de micelio lavado (10,3 mg de peso seco) en cada vasija.

Los resultados encontrados se exponen en el *cuadro 6*.

Influencia del substrato externo sobre la respiración endógena

Para este experimento se empleó una suspensión de micelio en solución reguladora de fosfatos 0,1M, a pH = 5, previamente tratada para disminuir su contenido en reservas celulares, y se puso frente a 1, 2, 5 y

Cuadro 6. Cociente respiratorio del micelio lavado de P. versicolor, *durante tres horas de incubación, a 25 °C*

Hora	Oxígeno µl		Anh. carbónico µl		C. respiratorio	
	A	B	A	B	A	B
1.ª	83	24	91	32	1,09	1,33
2.ª	157	41	160	38	1,01	0,95
3.ª	240	64	235	59	0,98	0,92

A, micelio no tratado. B, micelio tratado.

10 µmol de glucosa, prolongando en cada caso la incubación hasta que no se observaba incremento en el consumo de oxígeno. Los resultados encontrados se exponen en el *cuadro 7*, en el que se indica: a) los valores (microlitros) teóricos del consumo de oxígeno para cada una de las diferentes concentraciones de glucosa; b) consumo de oxígeno debido a la respiración endógena; c) consumo de oxígeno observado frente a cada una de las distintas concentraciones de glucosa; d) expresión porcentual de los valores observados con respecto a los teóricos correspondientes; e) diferencia entre los valores observados en presencia y ausencia de glucosa, y f) expresión porcentual de estas diferencias con respecto a los valores teóricos.

Cuadro 7. Porcentaje de glucosa oxidada por una suspensión de micelio lavado de P. versicolor, *frente a diferentes concentraciones de substrato*

Glucosa µmol	Oxígeno teórico µl	Oxígeno endógeno µl	Oxígeno observado µl	Porcentaje del teórico	Oxígeno observado menos endógeno µl	Porcentaje del teórico
1	134	25	38	29	13	9,0
2	268	43	66	24	23	8,9
5	670	50	109	16	69	8,8
10	1.340	70	181	13	111	8,2

Influencia de algunos inhibidores

En este experimento se utilizaron cianuro potásico, arsenito sódico, malonato sódico y fluoruro sódico, los cuales se pusieron en contacto con la suspensión de micelio durante una hora antes de añadir la glucosa.

En el *cuadro 8* se exponen los microlitros de oxígeno consumidos por la suspensión de micelio (10 mg de peso seco) en presencia de los distintos inhibidores, a la concentración final que se indica.

Cuadro 8. Microlitros de oxígeno consumidos por una suspensión de micelio de P. versicolor, *frente a 4 μmol de glucosa y en presencia de diferentes inhibidores*

Inhibidor	Oxígeno μl		
	1.ª hora	2.ª hora	3.ª hora
CNNa 10^{-4} M	58	82	94
FNa 10^{-2} M	70	109	124
Malonato 10^{-2} M	55	63	68
Arsenito 10^{-4} M	58	77	86
Substrato, sin inhibidor	73	104	123
Testigo, sin substrato ni inhibidor	15	36	53

Actividad del micelio lavado, frente a diversos aminoácidos

Operando igual que en experimentos anteriores, se ensayó la capacidad del micelio para oxidar distintos aminoácidos. En cada vasija se pusieron 2,3 ml de suspensión (8,6 mg de peso seco) junto con 0,1 ml de solución de sulfato magnésico (1 μmol) y en el brazo lateral 0,4 ml (4 μmol) de cada uno de los substratos. En el *cuadro 9* se exponen los microlitros de oxígeno consumidos durante 2 horas, a 25 °C. Se incluye, además, una vasija conteniendo glucosa, así como otra testigo, sin substrato.

Cuadro 9. Microlitros de oxígeno consumidos por una suspensión de micelio lavado (8,6 mg de peso seco) de P. versicolor, *frente a 4 µmol de los distintos aminoácidos*

Substrato	Oxígeno µl	
	1.ª hora	2.ª hora
Acido glutámico	35	65
Acido aspártico	43	95
Alanina	52	108
Arginina	33	75
Asparagina	36	84
Fenilalanina	47	101
Histidina	19	42
Prolina	27	43
Tirosina	31	65
Triptófano	21	39
Glucosa	64	96
Testigo, sin substrato	17	36

DISCUSION

El hongo *Polystictus versicolor* se desarrolla pobremente en un medio sintético a base de sales minerales y glucosa como única fuente de carbono *(cuadro 2)*. El extracto de levadura, a la concentración de 0,5 %, no es utilizado por el hongo como un verdadero substrato, ya que en estas condiciones el crecimiento es prácticamente nulo *(cuadro 3)*. Sin embargo, el crecimiento es abundante cuando al medio de sales minerales y glucosa se adiciona 0,5 % de extracto de levadura *(cuadro 1)*, lo cual sugiere que éste aporta factores de crecimiento que estimulan el desarrollo del hongo.

Cuando se añade al medio un aminoácido como fuente nitrogenada, el desarrollo es escaso *(cuadro 4)* si se compara con el conseguido en presencia de una sal amónica *(cuadro 1)*. Con nitrato como única fuente de nitrógeno, el crecimiento es prácticamente nulo.

El micelio lavado de *Polystictus versicolor* presenta una elevada respiración endógena; sin embargo, ésta puede disminuirse *(cuadro 6),* mediante la técnica de Dorrel y Knight (4), que consiste en someter la suspensión de micelio a una agitación intensa durante 24 horas, a 25 °C. Este tratamiento aplicado al *P. versicolor* hace disminuir, aproximadamente en un 25 %, el consumo de oxígeno y el desprendimiento de anhídrido carbónico. Los valores próximos a la unidad encontrados para el cociente respiratorio sugieren la posibilidad de que el, o los, substrato/s internos sean hidratos de carbono.

La presencia de substrato externo no parece ejercer influencia sobre la marcha de la respiración endógena, ya que según el criterio propuesto por Barker (1) y aplicado posteriormente por Stout y Koffler (12) al estudio del metabolismo oxidante de la glucosa por *Penicillium chrysogenum,* un substrato externo no influye en la respiración endógena si el porcentaje que se oxida del mismo (previa sustración de los valores correspondientes a la respiración endógena) se mantiene constante, y esto es lo que nosotros encontramos empleando glucosa como substrato externo *(cuadro 7).*

Las suspensiones de micelio lavado de *Polystictus versicolor* son capaces de oxidar glucosa y gluconolactona, entre otros substratos *(cuadro 5).* La oxidación de glucosa es parcialmente inhibida por malonato, arsenito y cianuro a las concentraciones respectivas de 10^{-2}M, 10^{-4}M y 10^{-4}M. Estos resultados son análogos a los encontrados por Ramachandran y Gottlieb (8) con suspensiones de *Caldariomyces fumago,* y por ello estos autores admiten la posibilidad de que la oxidación de glucosa se realice principalmente siguiendo el ciclo de las pentosas. La insensibilidad de las células al fluoruro la achacan a la fuente nitrogenada inorgánica del medio de cultivo, ya que Goldman y Blumenthal (5) han comprobado que las células de *Bacillus subtilis* son insensibles al fluoruro si han sido cultivadas en un medio con nitrógeno inorgánico, a pesar de que en este caso la oxidación de glucosa se lleva a cabo siguiendo la ruta glucolítica de Embden Meyerhof y, por tanto, sin que se observe inhibición de la enolasa.

Es de destacar la inhibición causada por el cianuro, ya que ello sugiere la participación de citocromos, lo cual está de acuerdo con los trabajos de Boulter y Burges (3), quienes observan que, a pesar de producir el *Polystictus versicolor* mucha lacasa, la citocromo-oxidasa es la que realmente actúa como oxidasa terminal en la cadena respiratoria.

RESUMEN

Se describe un medio semisintético para el cultivo del hongo fitopatógeno *Polystictus versicolor.*

La glucosa añadida como substrato externo a suspensiones de micelio lavado de *Polystictus versicolor* no modifica la marcha de la respiración endógena.

La elevada respiración endógena que presenta el *Polystictus versicolor* puede disminuirse sometiendo las suspensiones del micelio a una prolongada aireación. En el micelio sometido a este tratamiento es posible observar la oxidación de substratos como glucosa, gluconolactona, fructosa, manosa y diversos aminoácidos.

SUMMARY

Oxidative metabolism in Polystitus versicolor

A semisynthetic medium for the white rot fungus *Polystictus versicolor* is described.

Glucose added to washed micelium suspensions of *Polystictus versicolor* does not suppress or accelerate the endogenous respiration.

The high endogenous respiration of *Polystictus versicolor* can be reduced by prolonged aeration.

The addition of glucose, gluconolactone, fructose, mannose and several amino acids to starved mycelium suspensions increases the rate of respiration.

BIBLIOGRAFIA

1. BARKER, H. A. 1936. The oxidation metabolism of the colourlees alga *Prototheca zopfii.* J. Cell. Comp. Physiol., 8, 231.
2. BLUMENTHAL, H. J. 1963. Endogenous metabolism of filamentous fungi. Ann. N. Y. Acad. Sci., 102, 688.
3. BOULTER, D., y BURGES, A. 1955. Oxidases of *Polystictus versicolor.* Experientia, 11, 188.
4. DORREL, W. W., y KNIGHT, S. G. 1947. Microrespiration studies with fungi. J. Bacteriol., 54, 16.
5. GOLLMAN, M., y BLUMENTHAL, H. J. 1963. Pathways of glucose catabolism in *Bacillus subtilis.* J. Bacteriol., 86, 303.

6. LINDEBERG, G. 1946. On the decomposition of lignin and cellulose in litter caused by soil inhibiting hymenomicetes. Ark. Bot. 33 A, n.º 10.
7. LINDEBERG, G. 1948. On the occurrence of polyphenol oxidases in soil inhabiting basidiomycetes. Physiol. Plant., 1, 196.
8. RAMACHANDRAN, S., y GOTTLIEB, D. 1960. Pathways of glucose catabolism in *Caldariomyces fumago*. Biochim. Biophys. Acta, 69, 74.
9. ROBBINS, W. J. 1950. A survey of growth requirements of some basidiomycetes. Mycologia, 42, 470.
10. ROBBINS, W. J. 1958. Wood tomato and malt extract and growth of some basidiomycetes. Mycologia, 50, 745.
11. STILES, H. R.; PETERSON, W. H., y FRED, E. B. 1926. A rapid method for the determination of sugar in bacterial cultures. J. Bacteriol., 12, 428.
12. STOUT, H. A., y KOFFLER, H. 1951. Biochemistry of filamentous fungi. I. Oxidative metabolism of glucose by *Penicillium chrysogenum*. J. Bacteriol., 62, 253.
13. UMBREIT, W. W.; BURRIS, R. H., y STAUFFER, J. F. 1957. Manometric Techniques. Burgess Publishing Co.

INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA (C S I C)
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA GENERAL

INSTITUT FUR BAKTERIOLOGIE UND HISTOLOGIE DER
BUNDESANSTALT FUR FLEISCHFORSCHUNG. KULMBACH

AISLAMIENTO DEL *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* EN ESPAÑA

por

M. RODRIGUEZ-REBOLLO, K. TAMURA, H. HECHELMANN y L. LEISTNER

INTRODUCCION

El *Vibrio parahaemolyticus* es una bacteria, transmitida por los alimentos, que causa gastroenteritis aguda en las personas. En el Japón se atribuye a esta bacteria el 60-75 % de las infecciones alimentarias de etiología conocida (16 y 21). Esta especie bacteriana se observa especialmente en pescados marinos, crustáceos, moluscos, algas, etc., y causa infección en las personas, si estos alimentos se consumen crudos.

El *Vibrio parahaemolyticus* fue descrito por primera vez en 1951 por Fujino y colaboradores (9) y se ha investigado minuciosamente en el Japón durante los años siguientes (7-8). En el último decenio este *Vibrio* se ha aislado en varios lugares de Asia, concretamente: República Popular China (5, 15, 26 y 30), Hong-Kong, Formosa, Singapur (1 y 28), Filipinas (22 y 28), Hawai (29), Corea (6), Ceilán (23 y 25) e India (23). En 1967 se publicó la primera observación segura de *V. parahaemolyticus* en las costas norteamericanas del Pacífico (3 y 14). La existencia en las costas atlánticas de Estados Unidos de Norteamérica de microorganismos que serológicamente se asemejan al *V. parahaemolyticus,* se ha publicado en 1968 (27). En el año siguiente fue observado también en esas costas (13). En enero de 1967 y por primera vez en Europa, el *V. parahaemo-*

lyticus se pudo aislar por el Instituto de Bacteriología e Histología del Centro Federal de Investigaciones Cárnicas, de Kulmbach, a partir de pescados procedentes de mercados del Mar Báltico (18 y 20).

Por el mismo Instituto se da a conocer en 1968 la primera observación de esta bacteria en pescados del Mar del Norte (11), así como en 1969, la primera identificación del *Vibrio parahaemolyticus* en pescados marinos de las aguas costeras italianas, es decir, de los mares Adriático y Tirreno (2 y 10).

El presente trabajo tiene por objeto señalar el primer aislamiento del *Vibrio parahaemolyticus* en España.

MATERIAL Y METODOS

Durante los meses de septiembre y octubre de 1969 se tomaron en el Mercado de Pescados de Madrid, 268 mejillones *(Mytilus edulis* L.) y se investigó en ellos la existencia del *Vibrio,* conforme a los métodos ya descritos (18 y 20).

Mediante la utilización de agar de Wagatsuma (Nissui), al cual se le adicionaba 5 % de sangre humana del grupo 0, se ha analizado la capacidad hemolítica de las estirpes del *Vibrio parahaemolyticus,* aisladas de mejillones (20).

RESULTADOS Y DISCUSION

En dos (o, 7 %) de los mejillones investigados fue observado el *Vibrio parahaemolyticus.* Al propio tiempo se pudo comprobar en 117 (44 %) de las muestras, la existencia de *V. alginolyticus,* bacteria cercana a la primera, que frecuentemente se examina como "especie indicadora" de este agente causante de infecciones alimentarias.

Las estirpes del *Vibrio parahaemolyticus,* aisladas de ambas muestras de mejillones, se clasificaron como pertenecientes a los serotipos K-20 y K-46. Presentaban las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas típicas de la especie en cuestión. Sólo se estima digno de señalar que el serotipo K-20 no mostraba a 37 °C tan buen crecimiento como a 22 °C. Se comportaron como "no hemolíticas", es decir, "kanagawa-negativas".

Con pocas excepciones, las numerosas infecciones alimentarias observadas en el Japón son causadas hasta ahora por estirpes del *Vibrio parahaemolyticus* hemolíticas o "kanagawa-positivas", aunque también en las aguas costeras japonesas, como en los pescados, mejillones, crustáceos, etcétera, capturados en el interior, existen estirpes de la mencionada especie no hemolíticas ("kanagawa-negativas") en una gran proporción (12, 17 y 24).

La significación de este *Vibrio* como agente causal de infecciones alimentarias en Europa, no resulta todavía segura. En 1.822 muestras de heces de enfermos, que se han investigado en la República Federal de Alemania desde 1967 a 1969, no se pudo observar *Vibrio parahaemolyticus* (2 y 19).

En la aparición de las infecciones alimentarias causadas por el *Vibrio parahaemolyticus,* juegan seguramente un papel significativo los hábitos culinarios, en especial el consumo en crudo de pescado marinos y mariscos.

Los mejillones, de los cuales ha sido aislado en Alemania (2 y 4) y en España la especie bacteriana *Vibrio parahaemolyticus,* se consumen, por lo general, cocidos.

RESUMEN

Se señala el primer aislamiento del *Vibrio parahaemolyticus* en España. Este microorganismo se ha identificado en dos mejillones *(Mytilus edulis* L.), recogidos en el Mercado de Pescados de Madrid.

Las estirpes del *Vibrio parahaemolyticus* pertenecían serológicamente a los tipos K-20 y K-46 y eran "kanagawa-negativas" (no hemolíticas).

SUMMARY

Isolation of Vibrio parahaemolyticus *in Spain*

The first isolation of *Vibrio parahaemolyticus* in Spain is reported. This organism has been recovered from two mussels *(Mytilus edulis* L.) obtained at fish markets in Madrid. The serotypes K-20 and K-46 were present, both strains proved to be "Kanagawa-negative".

BIBLIOGRAFIA

1. AOKI, Y.; HSU, S. T., y CHUN, D. 1967. Endemic Dis. Bull. Nagasaki Univ., 8, 191 (en japonés).
2. ASAKAWA, Y.; HECHELMANN, H., y LEISTNER, L. 1970. Fleischwirtschaft, 50, 682.
3. BAROSS, J., y LISTON, L. 1968. Nature, 217, 1263.
4. BAUMGART, J. 1968. Comunicación personal.
5. CHANG, H. C.; HSIEH, C. U., y CHIANG, C. Y. 1962. Zhonghua Yixue Zashi, 48, 534. Ref.: 1963. Sci. Abstr. China Med., 2, 18.
6. CHUN, D.; CHUNG, J. K.; LEE, J. K.; SHIN, D. H., y MOON, S. K. 1967. Korean Mod. Med., 6, 105.
7. FUJINO, T., y FUKUMI, H. (ed.). 1966. *Vibrio parahaemolyticus.* I. Naya, Tokio (en japonés).
8. FUJINO, T., y FUKUMI, H. (ed.). 1967. *Vibrio parahaemolyticus.* II. Naya, Tokio (en japonés).
9. FUJINO, T.; OKUNO, Y.; NAKADA, D.; AOYAMA, A.; FUKAI, K.; MUKAI, T., y UEHO, T. 1951. J. Jap. Ass. Inf. Dis., 25, 11 (en japonés).
10. HECHELMANN, H.; ASAKAWA, Y., y LEISTNER, L. 1969. Jahresber. Bundesans. Fleichforsch.
11. HECHELMANN, H.; PRIEBE, K.; LEISTNER, L., y NAGANISHI, H. 1968. Jahresber. Bundesanst. Fleischfors., G 43.
12. KATO, T.; OBARA, M.; ICHINOHE, H.; NAGASHIMA, K., y YAMAI, S. 1966. Mod. Med., 12, 17 (en japonés).
13. KRANTZ, G. E.; COLWELL, R. R., y LOVELACE, E. 1969. Science, 164, 1286.
14. LISTON, J.; CHAN, J., y BAROSS, J. 1967. Res. Fish. School Fish. Univ. Wash. Seattle, 240, 51.
15. MA, T. H.; WU, J. I.; CHIANG, W. L.; PAU, P. M., y CHANG, H. C. 1962. Zhonghua Yixue Zazhi, 48, 617. Ref.: 1963. Sci. Abstr. China Med., 2, 18.
16. Ministerio de Sanidad. 1960-1968. Memorias anuales (en japonés).
17. MIYAMOTO, Y.; KATO, T.; OBARA, Y.; AKIYAMA, S.; TAKIZAWA, K., y YAMAI, S. 1969. J. Bacteriol., 100, 1147.
18. NAGANISHI, H.; LEISTNER, L., y BAUMGART, J. 1967. Arch. Lebensmittelhyg., 18, 201.
19. NAGANISHI, H.; LEISTNER, L., y HECHELMANN, H. 1969. Fleischwirtschaft, 49, 1501.
20. NAGANISHI, H.; LEISTNER, L.; HECHELMANN, H., y BAUMGART, J. 1968. Arch. Lebensmittelhyg., 19, 49.
21. SAKAZAKI, R. 1965. *Vibrio parahaemolyticus.* Isolation and identification. Nihon Eiyo Kagaku Co., Tokyo.
22. SAKAZAKI, R.; GÓMEZ, C. Z., y SEBALD, M. 1967. Jap. J. Med. Sci. Biol., 20, 265.
23. SAKAZAKI, R., y TAMURA, K. 1969. Comunicación personal.
24. SAKAZAKI, R.; TAMURA, K.; KATO, T.; OBARA, Y.; YAMAI, S., y HOBO, K. 1968. Jap. J. Med. Sci. Biol., 21, 325.
25. TAKAHIRA, Y. 1965. Endemic. Dis. Bull. Nagasaki Univ., 247 (en japonés).

26. WANG, H., y LEE, E. S. 1964. Acta Microbiol. Sinica, 10, 128 (en chino).
27. WARD, B. Q. 1968. Appl. Microbiol., 16, 543.
28. YASUNAGA, N. 1964. Endemic Dis. Bull. Nagasaki Univ., 6, 201 (en japonés).
29. YASUNAGA, N. 1965. Endemic Dis. Bull. Nagasaki Univ., 7, 272 (en japonés).
30. YEH, T. C.; YOU, H. K.; LIU, H. Y.; TSAI, H. C.; TSÜ, H., y LIU, L. 1962. Zhonghua Yixue Zahzi, 48, 534. Ref.: 1962. Sci. Abstr. China Med., 4, 17.

INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA (C S I C)
DEPARTAMENTO DE PROTOZOOLOGIA
SECCION DE ECOLOGIA

HIDROGENACION Y DESHIDROXILACION DEL ACIDO CAFEICO POR VARIAS ESPECIES DE BACTERIAS

por

E. STERNFELD, M. G. PEREZ - SILVA y D. RODRIGUEZ

INTRODUCCION

En 1963, Booth y Williams (1), estudiando la deshidroxilación de compuestos difenólicos en animales de experimentación atribuyen este proceso a la actividad metabólica de microorganismos de la flora intestinal.

Nosotros, en 1966, comunicamos el aislamiento, a partir de heces frescas de rata, de una estirpe de *Pseudomonas,* con capacidad para llevar a cabo *in vitro* la deshidroxilación del ácido cafeico (3), y en 1967 (2) comprobamos que la capacidad para deshidroxilar el ácido cafeico no es exclusiva de microorganismos de la flora intestinal.

En el presente trabajo se estudia la acción de otras especies de bacterias sobre el ácido cafeico y se identifican algunos de los productos resultantes.

MATERIAL Y METODOS

a) Microorganismos

Hemos utilizado los siguientes microorganismos: *Achromobacter butyri, Bacillus sp., Sarcina lutea* y *Spirillum sp.* (procedentes de la colec-

ción de la Sección de Protozoología, del Instituto "Jaime Ferrán", de Microbiología); *Azotobacter chroococcum* y *A. vinelandii* (procedentes de la Sección de Fijación libre de Nitrógeno, del I. "J. F." M.); *Bacillus brevis, B. subtilis* G-1, *Bacillus subtilis* B-2 y *Streptococcus fecalis* (procedentes de la Sección de Anaerobios, del I. "J. F." M.), y *Micrococcus flavus, Proteus vulgaris* y *Escherichia coli* (procedentes de la colección del I. "J. F." M.).

b) Preparación de células lavadas

A partir de cultivos en agar común, incubados durante veinticuatro horas, a 27 °C, se siembra cada una de las bacterias en matraces de 1 l de capacidad, conteniendo 500 ml de caldo común. Se incube a 27 °C, durante cuarenta y ocho horas, en cultivo estacionario y luego se separan las células por centrifugación. Se lavan dos veces con amortiguador de fosfatos 0,1 M, pH = 7 y finalmente se suspende en dicho amortiguador, de modo que la concentración final de células sea aproximadamente de 15 mg de peso seco/ml.

c) Incubación de células lavadas, en presencia del substrato

Las distintas suspensiones de células lavadas se incuban a 37 °C, en presencia de ácido cafeico, a la concentración final de 0,04 %. A intervalos de veinticuatro horas, se toman muestras, de las que se separan las células por centrifugación y, en el sobrenadante, se analizan los compuestos fenólicos formados.

d) Análisis de compuestos fenólicos

Para analizar los compuestos fenólicos, las muestras se acidifican y se extraen con éter sulfúrico; los extractos etéreos se llevan a sequedad y el residuo se disuelve en un pequeño volumen de acetona (2 ó 3 ml); de aquí se toman muestras de 0,05 a 0,1 ml para su análisis cromatográfico, siguiendo las técnicas descritas por Smith (4).

RESULTADOS Y DISCUSION

Se prepararon suspensiones de células lavadas de cada una de las bacterias y se incubaron en presencia de ácido cafeico. En muestras retiradas para su análisis a las veinticuatro, cuarenta y ocho y setenta y dos horas

de incubación, no se observó la presencia de ningún compuesto monofenólico. La mayoría de las bacterias daban lugar a la formación del ácido 3-4-dihidroxifenilpropionico *(cuadro 1)* y la desaparición parcial del substrato.

Cuadro 1. Formación de 3-4-dihidroxigenilpropionico al incubar suspensiones de células lavadas (15 mg/ml) en presencia de ácido cafeico (0,04 %)

Microorganismos	Formación de 3-4-hidroxifenil-propiónico
1. *Achromobacter butyri*	+
2. *Azotobacter chroococcum*	+
3. *A. vinelandii*	+
4. *Bacillus sp.*	+
5. *B. brevis*	+
6. *B. subtilis* G-1	—
7. *B. subtilis* B-2	—
8. *Escherichia coli*	+
9. *Micrococcus flavus*	+
10. *Proteus vulgaris*	—
11. *Sarcina lutea*	+
12. *Streptococcus fecalis*	—
13. *Spirillum sp.*	+

Se observó, además, que *Bacillus* G-1, *B. subtilis* B-2, *Streptococcus fecalis* y *Proteus vulgaris* consumen totalmente el substrato.

Sin embargo, cuando estos microorganismos se incuban en presencia del substrato y de 1 ml de una suspensión diluida de heces de rata, tiene lugar una deshidroxilación del ácido cafeico con formación del ácido m-hidroxifenilpropionico. Nosotros consideramos que en las heces de rata existe una sustancia que encauza el proceso de la deshidroxilación *(cuadro 2)*.

Cuadro 2. Formación de m-hidroxifenilpropionico al incubar suspensiones de células lavadas (15 mg/ml) en presencia de ácido cafeico (0,04 %) y 1 ml de una suspensión diluida de heces de rata

Microorganismos	Formación de m-hidroxifenil-propiónico
1. *Achromobacter butyri*	—
2. *Azotobacter chroococcum*	+
3. *A. vinelandii*	+
4. *Bacillus sp.*	+
5. *B. brevis*	—
6. *B. subtilis* G-1	—
7. *B. subtilis* B-2	—
8. *Escherichia coli*	+
9. *Micrococcus flavus*	—
10. *Proteus vulgaris*	+
11. *Sarcina lutea*	+
12. *Streptococcus fecalis*	—
13. *Spirillum sp.*	—

Estos resultados *(cuadros 1-2)* sugieren que en el proceso de la deshidroxilación intervienen algún o algunos factores presentes en las suspensiones de rata. Es necesario hacer observar que la suspensión diluida de heces de rata, incubada en presencia de ácido cafeico, no da lugar a ninguna reacción de deshidroxilación.

RESUMEN

Suspensiones de células lavadas de diferentes bacterias incubadas en presencia de ácido cafeico transforman a éste en 3-4-dihidroxifenil-propiónico. Si la incubación se realiza en presencia de una pequeña cantidad de una suspensión muy diluida de heces de rata, el ácido cafeico es parcialmente transformado en m-hidroxifenilpropionico.

SUMMARY

Hydrogenation and dehydroxylation of caffeic acid by some bacteria species

We have observed that washed cells suspensions of several species of bacteria have the ability to hydrogenate caffeic acid yielding 3,4-dihydroxyphenylpropionic acid. If a little amount of a very diluted faecal suspension is added caffeic acid is partially degradated yielding m-hydroxyphenylpropionic acid.

BIBLIOGRAFIA

1. BOOTH, A. N., y WILLIAMS, R. T. 1963. Dehydroxylation of caffeic acid by rat and rabbit caecal contests and sheep rumen liquor. Nature, 198, 684.
2. PÉREZ-SILVA, M. G., y RODRÍGUEZ, D. 1967. Deshidroxilación del ácido cafeico por varias especies de *Pseudomonas*. Bol. Real Soc. Españ. Hist. Nat., Sec. Biol., 65, 401.
2. PÉREZ-SILVA, M. G.; RODRÍGUEZ, D., y PÉREZ-SILVA, J. 1966. Dehydroxylation of caffeic acid by a bacterium isolated from rat faeces. Nature, 212, 303.
4. SMITH, I. 1960. Chromatographic and Electrophoretic Techniques. Intersciences Publishers, Inc., Nueva York.

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES AGRONOMICAS

INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA (C S I C)

ULTRAESTRUCTURA DE HOJAS DE *CHENOPODIUM QUINOA* WILD INFECTADAS CON EL VIRUS ENTRENUDO CORTO INFECCIOSO DE LA VID

por

A. PEÑA - IGLESIAS y M. RUBIO - HUERTOS

El virus Entrenudo corto infeccioso de la vid se encuentra distribuido en casi todas las regiones del mundo donde se cultiva esta planta.

Es transmisible por nemátodos, habiéndose identificado como vectores el *Xiphinema index* Thorne y Allen (6) y el *X. italie* (2). También se transmite por inoculación mecánica a plantas herbáceas y está relacionado serológicamente con el virus del mosaico del *Arabis*. Sus viriones son isométricos, de 25-30 mμ (1).

Los virus empleados en este trabajo proceden de muestras de plantas presentando fuertes síntomas de dicha virosis, recogidas de vides y parrales en Jerez de la Frontera y Almería. Se tomaron hojas y raíces de esquejes, procedentes de los mismos lugares, forzados a brotar, en cámara con nebulación y calor de fondo. De estas muestras se hicieron transmisiones inoculando con savia a plantas de *Chenopodium quinoa* Wild estabilizada con 2,5 % de nicotina básica pura. Se hicieron posteriormente transmisiones sucesivas de *Ch. quinoa* a *Ch. quinoa.*

El virus se purificó, a partir de plantas de *Chenopodium quinoa* infec-

tadas, por clarificación con butanol-cloroformo (12), seguidas de precipitación con polietilenglicol (13) y ultracentrifugación (5).

Los virus fueron identificados serológicamente como estirpes del Entrenudo al reaccionar positivamente con el antisuero específico de este virus (*) *(figura 1)*.

Se hizo tinción negativa para microscopía electrónica del purificado, encontrándose partículas isométricas, de unas 25 a 28 mμ *(figura 2)*. Cortes ultrafinos de pequeños trozos de hoja de *Chenopodium quinoa* infectada, obtenidos según métodos descritos en trabajos anteriores (10), fueron observados al microscopio electrónico Siemens Elmiskop I, del Servicio de Microscopía Electrónica del Centro de Investigaciones Biológicas, de Madrid.

Las partículas isométricas del virus o viriones pudieron ser identificadas dentro del citoplasma de las células infectadas formando agrupaciones en rosario y, generalmente, rodeadas por una fina membrana en forma de túbulo *(figuras 3-4)*. A veces se encuentran juntos una serie de túbulos, todos ellos conteniendo una hilera de partículas. También hemos podido observar el paso a través de los plasmodesmos de partículas sueltas *(figura 5)* o de un túbulo con el rosario de partículas en su interior *(figura 6)*. El virus no aparece dentro de los cloroplastos, aunque existe destrucción de éstos, ni tampoco en el núcleo, pero en algún núcleo, en el nucleoplasma, aparecen unas formaciones tubulares con rosarios de partículas vacías, o sea, que no se tiñen como los viriones normales *(figura 7)*.

Formaciones de viriones isométricos atravesando los plasmodesmos han sido descritas por diversos autores (3-4 y 7-8) para otros virus. En el caso del mosaico de la dalia (8) incluso se modificaban los plasmodesmos. Formaciones tubulares con viriones en su interior, muy parecidas a las encontradas por nosotros, han sido descritas por Roberts y Harrison en hojas infectadas con el virus Latente anillado de la fresa (9).

También se han descrito viriones enclaustrados en formas tubulares (12), pero estos virus eran de formas más complicadas, con membranas externas, por lo que este virus no parece pertenecer al grupo del virus Enanismo rudo del maíz.

Esta es la primera vez que se describe la apariencia intracelular del virus Entrenudo de la vid.

(*) Amablemente cedido por el Dr. A. Vuittenez, de la Estación de Patología Vegetal (C.N.R.A.), de Colmar (Francia), a quien expresamos nuestra gratitud.

SUMMARY

Ultrastructure of Chenopodium quinoa *plants infected with Grapevine fanleaf virus*

Chenopodium quinoa plants were infected by mechanical inoculation with Grapevine fanleaf virus from *Vitis vinifera* plants collected in Almería and Jerez de la Frontera. Purification of the virus was made using the butanol-chloroform method and precipitation with polyethylen-glycol. Serological test using antiserum of the virus type kindly supplied by Dr. Vuittenez gave positive reaction *(figure 1)*. Negative staining of the purified virus showed isometric virions of 25-28 mμ *(figure 2)*.

Ultrathin sections of pieces of infected *Chenopodium quinoa* leaves prefixed in glutaraldehyde and fixed in osmium tetroxide and embebed in durcupan showed under the electron microscope rows of isometric particles in the cytoplasm of the infected cells. These particles were generally surrounded by a membrane forming tubules *(figures 3-4)* some of these tubules containing the virions were located within plasmodesmata *(figures 5-6)*

Tubular inclusions were found in the nucleoplasm of nuclei of some cells *(figure 7)*.

BIBLIOGRAFIA

1. CADMAN, C. H.; DIAS, H. F., y HARRISON, B. O. 1960. Sap-transmissible viruses associated with diseases of grapevines in Europa and North America. Nature, London, 187, 577-79.
2. COHN, E.; TANNE, E., y NITZANY, F. E. 1970. *Xiphinema italie,* a new vector of grapevine fanleaf virus. Phytopathology, 60, 181-82.
3. DAVISON, E. M. 1969. Call to cell movement of tobacco ringspot virus. Virology, 37, 694-96.
4. DEZOETEN, G. A., y GAARD, G. 1969. Possibilities for inter and intracellular translocation of some icosahedral plant viruses. J. Cell Biol., 40, 814-23.
5. FERREIRA, A. A., y SEQUEIRA, O. A. 1970. Preliminary studies on an undescribed grapevine virus. IV^{e} Congr. Groupe Int. Etudes Virus Viroses Vigne, Colmar, pendiente de publicación.
6. HEWITT, W. B.; RASKI, D. J., y GOHEEN, A. G. 1958. Nematode vector of soilborne fanleaf virus of grapevines. Phytopathology, 48, 586-95.
7. KITAJIMA, E. W., y LAURITIS, J. A. 1969. Plant virions in plasmodesmata. Virology, 37, 681-85.

8. LAWSON, R., y HEARON, S. 1970. Subcellular localization of chrysanthemum a espermy virus in tobacco and chrysanthemum leaf tissue. Virology, 41, 30-37.
9. ROBERTS, L. M., y HARRISON, B. D. 1970. Inclusion bodies and tubular structures in *Chenopodium amaranticolor* plants infected with Strawberry latent rigspot virus. J. Gen. Virol., 7, 47-54.
10. RUBIO-HUERTOS, M. 1968. Further studies on ultrastructure of plants infected with Petunia ringspot virus. Protoplasma, 65, 465-76.
11. STEERE, R. L. 1956. Purification and properties of tobacco ringspot virus. Phytopathology, 46, 60-69.
12. VIDANO, C. 1970. Phases of maize rough dwarf virus multiplication in the vector *Laodelphax stratellus* Fallén. Virology, 41, 218-32.
13. VUITTENEZ, A., y KUSZALA, L. 1968. Études sur l'extraction du virus du court-noué a partir des tissus de vigne. Études de Virology. Ann. Épiphyt., 19, n.º hors-série, 197-217.

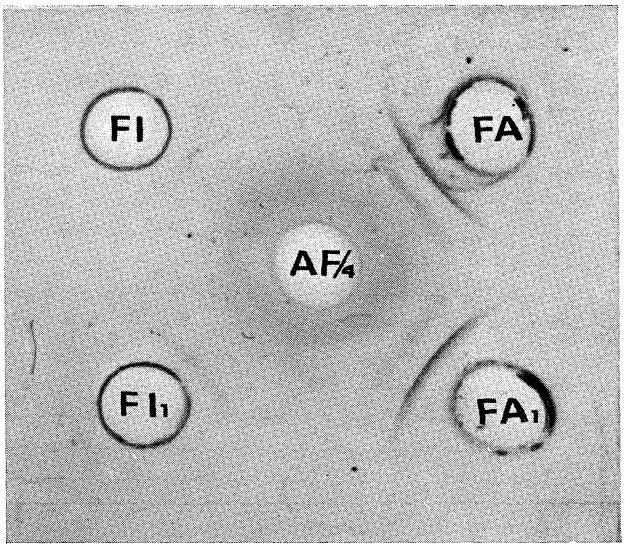


Figura 1. Reacción serológica de doble difusión en medio de agar: en agujeros laterales, de los antígenos FA y FA_1 (suspensiones de virus purificadas procedentes de parrales de Almería con "degenero") y FI y FI_1 (suspensiones de virus purificadas procedentes de cepas "carrasqueñas" y "canarias" de Jerez de la Frontera). En el centro, $AF/_4$, antisuero del virus del Entrenudo corto infeccioso de la vid, con título de 1/256, diluido a 1/4. Obsérvense las líneas de precipitación virus-antisuero, próximas a agujeros laterales. Las próximas al central son debidas a proteínas no víricas

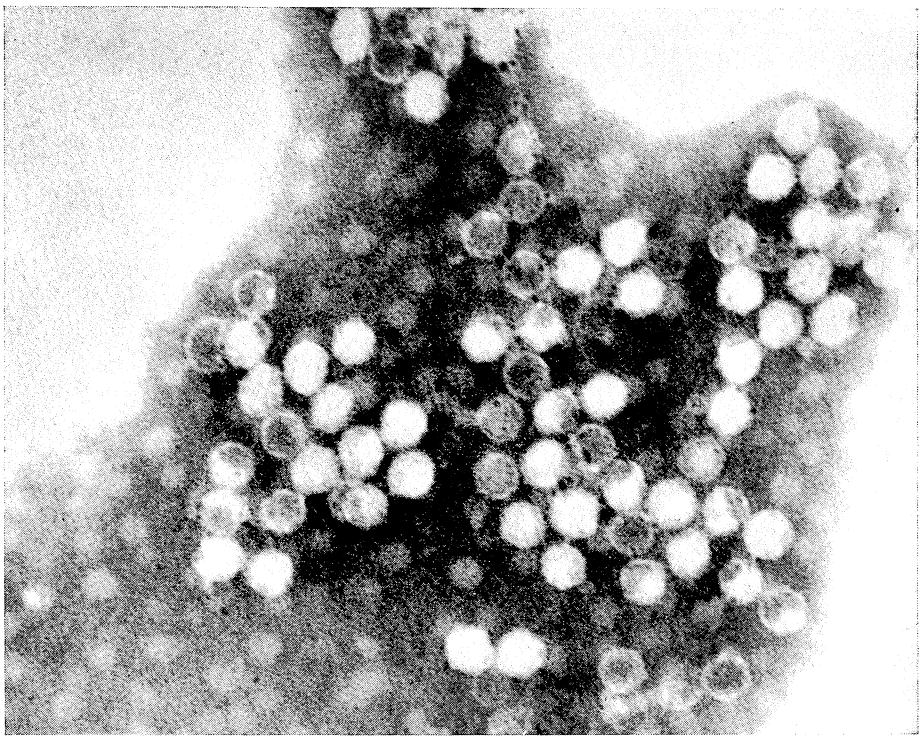


Figura 2. Tinción negativa del virus purificado. × 320.000

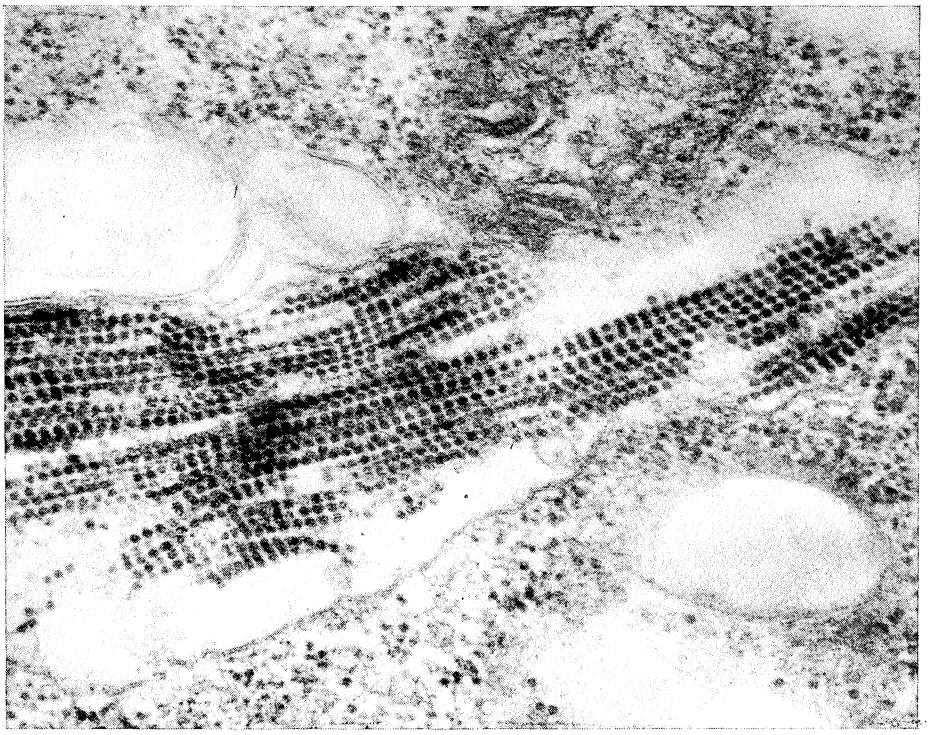


Figura 3. Túbulos paralelos con partículas en su interior, en el citoplasma de una célula infectada. × 88.000

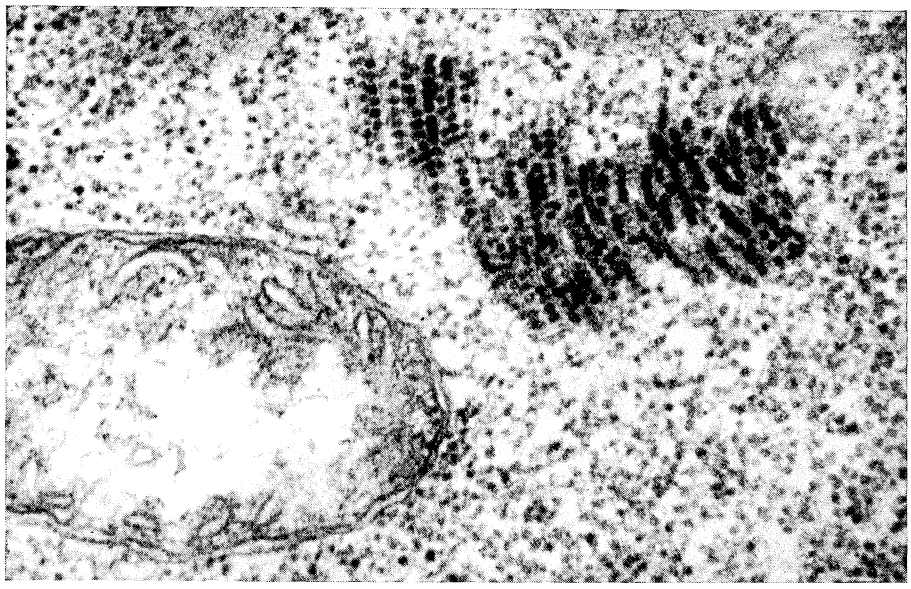


Figura 4. Igual que el anterior, en la parte inferior izquierda, una mitocondria. × 88.000

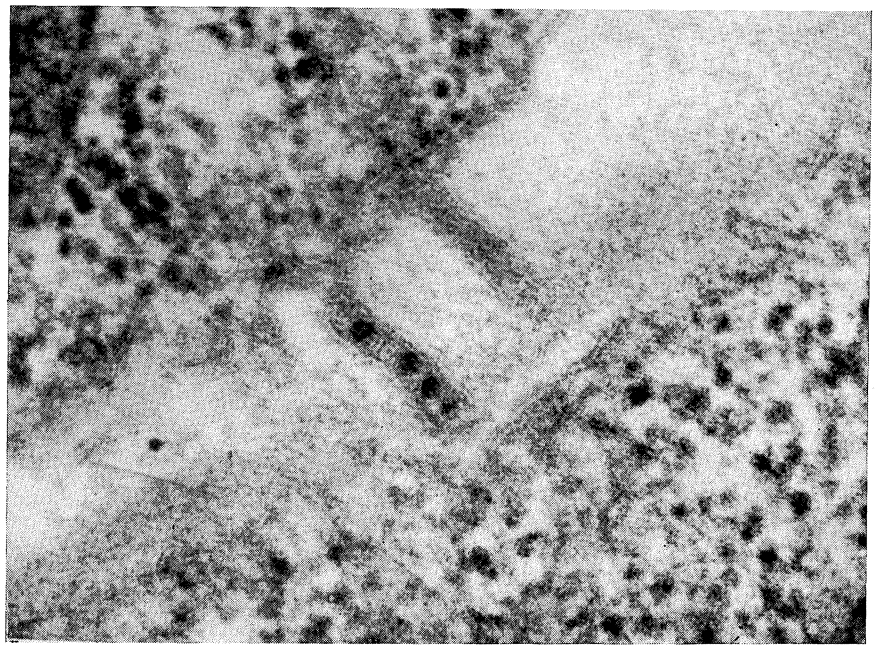


Figura 5. Plasmodesmo mostrando un túbulo con cuatro viriones que parecen pasar a través del plasmodesmo. × 200.000

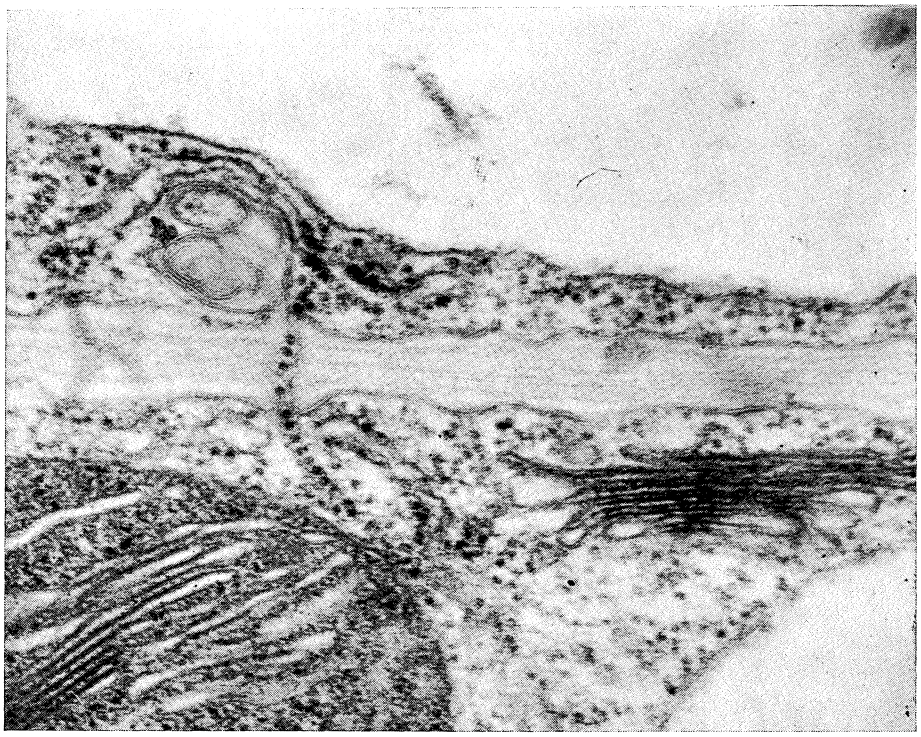


Figura 6. Igual que el anterior, un túbulo mayor pasando de célula a célula. × 92.000

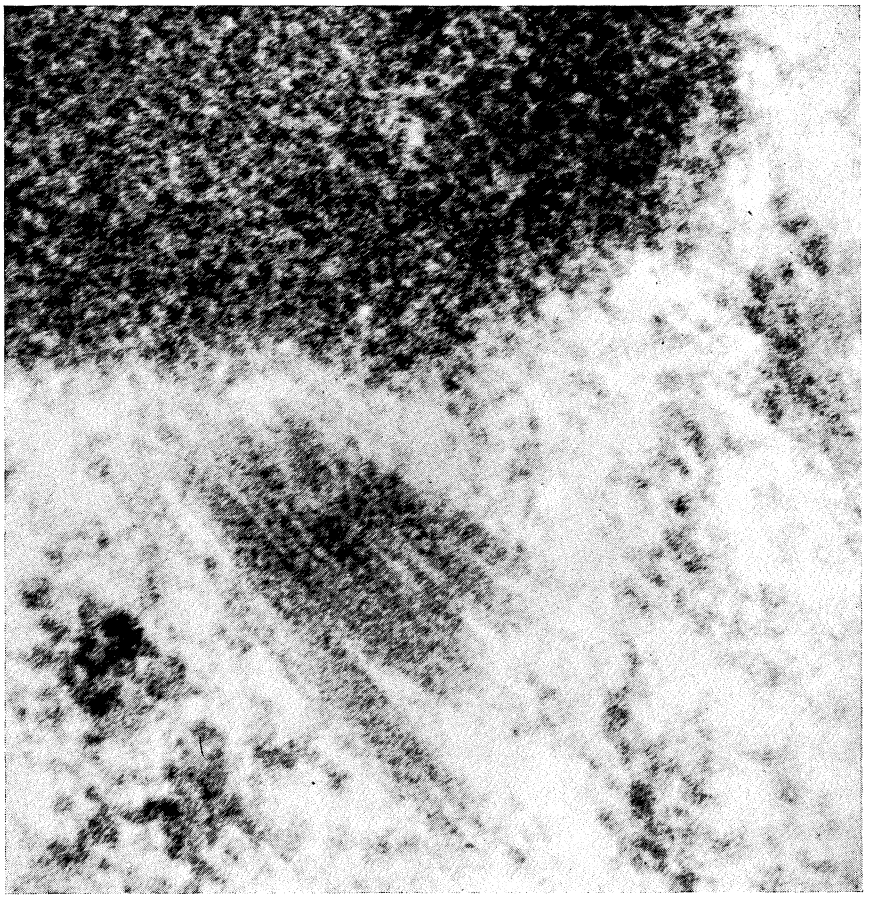


Figura 7. Túbulos con partículas en apariencia vacías en el nucleoplasma; la zona oscura de la derecha es el nucléolo del mismo núcleo. × *138.000*

UNIVERSITY OF GORAKHPUR U. P. (INDIA)
DEPARTMENT OF BOTANY

INVESTIGATIONS INTO RHIZOSPHERE MICROFLORA

I. Succession of microflora on root regions of *Oryza sativa* L.

by

V. B. SRIVASTAVA and R. R. MISHRA

INTRODUCTION

The rhizosphere study is considered particularly important to understand the behaviour of parasitic, saprophytic or symbiotic micro-organisms which are associated with roots. The rhizosphere microorganisms are mainly responsible for the decomposition of root tissue. Considerable attention has been paid in this sphere by various workers (3, 5, 10 and 16-17). Succession of fungi on ageing root of different plants has been reported earlier (1, 12, 18 and 20). The object of the present study is to investigate the succession of microflora (fungi and bacteria) colonizing the root of *Oryza sativa* L. from soil (non-rhizosphere) to rhizoplane through rhizosphere at different stages of the plant growth.

MATERIALS AND METHODS

The plants for experimentation were obtained from a paddy field situated in low lying area of Village Gopalpur about 2 km south of the University Campus. The area is surrounded on the three sides by a big

perennial lake, known as Ramgarh lake and on the fourth side lies national high ways road. Sampling was done at regular intervals when the plants were 30, 50, 70, 90, 110, 130, 150, 180, 210 and 255 days old i.e. from seedling to descomposition stages. For the study of rhizosphere microflora (fungi and bacteria), the complete root system was taken out carefully with a sterilized spatula in a sterilized flask. The root system was tapped gently to remove the extra attached soil and was cut with a sterilized scissors into two parts: the upper near the shoot base with compact root system was designated as crown region and the remaining lower portion as the distal one. The two root regions were wrist shaken for 20 minutes in separate 500 ml flasks containing 200 ml of sterilized distilled water to get a homogeneous rhizosphere soil suspension. 1 ml of this soil suspension was inoculated en 100 mm Petri plates containing nutrient media. The media used for the isolation were modified Martin's medium (22) for fungi and meat extract agar for bacteria.

The rhizosphere suspension left out after inoculation was evaporated separately at 105 °C in hot air oven for 24 hours, cooled to room temperature and finally weighed to determine the dry weight of the soil. Rhizosphere micro-population per gram of dry soil was calculated by estimating the soil present in 1 ml of the suspension.

Corresponding non-rhizosphere soil samples, a few centimetres apart from the root, were also collected at each sampling time from a depth in the soil corresponding to the root zone. From 10 g of the soil suspension of 1 : 100 and 1 : 1000 dilutions was prepared in sterilized distilled water. The suspension was used for the assessment of the mycoflora using modified Martin's medium. Fungi per gram dry soil was calculated by multiplying the average colonies per plate by actual dilution factor and taking the moisture content into consideration.

For the study of rhizoplane, the crown and distal roots were removed from the flasks and washed for 15 times with sterilized distilled water to remove the soil particles. These roots were then teased aseptically in sterilized Petri-plates with the help of sterilized needles and knife to remove the cortical (extra stelar portion) and stelar portions. 2 mm bits of the teased-root-fragments were transferred to nutrient plates (5 pieces per plate) containing Dox + yeast extract medium. Quantitative estimation of rhizoplane was made by considering the average colonies per plate.

Separate seterilized 1 ml pipettes were used for inoculation and plates were slowly shaken to disperse the soil suspension uniformely. 10 replic-

ates were kept for each set. Plates were incubated for 5-6 days for fungi and 2 days for bacteria at 25° ± 1 °C after which the microflora was recorded. Only quantitative data was collected for rhizosphere bacteria and the study chiefly consisted of microfungi.

Moisture content and organic matter was estimated by the method suggested by Piper (14) and pH was determined by electric pH-meter.

RESULTS

Present findings are indicated in the *tables 1-3* and *figures 1-2*.

a) Microflora of non-rhizosphere region

67 fungal species were isolated from this region. The number of species was lowest in the beginning and increased continuously up to 90th day of plant growth. The number decreased thereafter but with an increase in the end when the maximum number i. e. 36 was obtained. The fungal population per gram dry soil also exhibited the similar trend, the highest peak, however, was recorded on 90th day with a slight increase in the end *(figure 1)*.

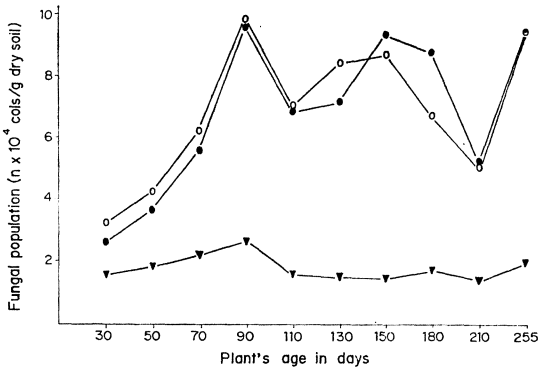


Figure 1. Fungal population in nonrhizosphere (▼ — ▼), crown rhizosphere (○ — ○) and distal rhizosphere (● — ●) of O. sativa

Except *Aspergillus terreus* which was dominant almost throughout the course of investigation other dominant species varied at different sampling periods. *A. fumigatus, A. flavus; Trichoderma viride; Penicillium humi-*

Table 1. Fungal distribution in different root regions of Oryza sativa

Fungal species	N.-r.	C. r.	D. r.	C. r. c.	C. r. s.	D. c.	D. s.
Absidia spinosa	+	+	—	—	—	—	—
Gongronella butleri	+	—	—	—	—	—	—
Rhizopus arrhizus	+	—	+	—	—	—	—
R. nigricans	+	+	+	+	+	+	+
Mucor hiemalis	+	+	+	+	—	+	—
M. luteus	+	+	+	+	+	+	—
Choanephora cucurbitarum	—	—	+	—	—	—	—
Cunninghamella bertholletiae	+	+	+	—	—	—	—
C. echinulata	+	+	+	+	—	—	—
Syncephalastrum racemosum	—	—	—	+	+	—	+
Phycomycetous sterile colonies	+	—	—	—	—	—	—
Chaetomium apiculatum	+	+	—	—	—	—	—
C. biapiculatum	—	—	—	+	—	—	—
C. globosum	+	+	—	—	+	—	—
C. herbasum	+	—	+	—	—	—	—
Thielavia terricola	+	+	+	—	—	—	—
Neocosmospora vasinfecta	+	—	—	—	—	—	—
Aspergillus nidulans	+	+	+	+	+	+	+
Penicillium spiculisporum	+	+	—	+	—	—	—
Phoma hibernica	+	+	—	—	—	—	—
Monilia geophila	—	+	—	—	—	—	—
Trichoderma viride	+	+	+	—	+	+	+
Aspergillus aculeatus	+	+	—	—	—	—	—
A. candidus	+	+	+	—	—	—	—
A. ustus	+	—	—	—	—	—	—
A. flavipes	+	+	+	—	—	—	—
A. flavus	+	+	+	+	+	+	+
A. fumigatus	+	+	+	+	—	+	+
A. japonicus	—	+	—	—	—	—	—
A. lanosus	+	+	+	—	—	—	—
A. niger	+	+	+	+	—	+	—
A. ochraceus	+	+	+	—	—	—	—
A. phoenicis	+	—	—	—	—	—	—
A. sulphureus	—	—	+	—	—	—	—
A. sydowi	+	—	+	+	—	+	—
A. tamarii	+	+	+	+	—	—	—
A. terreus	+	+	+	—	—	—	—
A. terricola	+	—	—	—	—	—	—
A. versicolor	+	—	—	—	—	—	—
Penicillium digitatum	+	+	+	—	—	—	—
P. humicola	+	+	+	+	—	—	—
P. nigricans	+	+	+	+	+	+	+

Table 1 (continued)

Fungal species	N.-r.	C. r.	D. r.	C. r. c.	C. r. s.	D. c.	D. s.
P. notatum	+	+	+	—	—	—	—
P. oxalicum	+	+	+	—	—	—	—
P. terrestre	+	+	+	—	—	+	—
Penicillium sp.	+	+	+	+	—	—	—
Cylindrophora sp.	—	+	—	—	+	—	—
Acrostalagmus sp.	—	—	—	+	—	—	—
Paecilomyces fusisporus	+	+	+	—	—	—	—
Pa. varioti	+	+	+	—	—	—	—
Torula sp.	+	+	+	—	—	—	—
Stachybotrys alternans	+	+	—	—	—	—	—
Nigrospora sphaerica	+	+	—	—	—	—	—
Scolecobasidium terreum	+	+	—	—	—	—	—
Humicola grisea	+	+	+	—	+	—	—
Cladosporium ephiphyllum	+	+	+	—	+	—	—
C. herbarum	+	+	+	—	+	+	+
Curvularia geniculata	+	+	+	—	—	—	+
Cu. lunata	+	+	+	+	+	+	+
Cu. pallescens	+	+	—	—	—	—	—
Cu. tetramera	+	+	+	+	—	—	—
Helminthosporium oryzae	+	—	—	—	—	+	+
H. sativum	+	+	+	+	+	+	+
Helminthosporium sp.	+	+	+	+	+	+	+
Alternaria humicola	+	+	+	—	—	—	—
A. tenuis	+	+	+	+	—	+	+
Fusarium avenaceum	+	+	+	+	+	+	+
F. chlamydosporum	+	+	+	—	—	—	—
F. nivale	+	+	+	+	+	+	+
F. oxysporum	+	+	+	+	+	+	+
Myrothecium roridum	+	+	—	—	—	—	+
Epicoccum nigrum	+	+	—	—	—	—	—
Rhizoctonia solani	—	—	—	+	—	+	—
Black sterile colonies	+	+	+	+	+	+	+
White sterile colonies	+	+	+	+	+	+	+
Yellow sterile colonies	+	—	—	—	—	—	—

N.-r. = Non-rhizosphere. C. r. = Crown rhizosphere. D. r. = Distal rhizosphere. C. r. c. = Cortical rhizoplane of crown region. C. r. s. = Stelar rhizoplane of crown region. D. c. = Cortical rhizoplane of distal region. D. s. =Stelar rhizoplane of distal region.

cola; Cladosporium herbarum; and *Alternaria tenuis* were other codominants on 70th, 90th, 110th, 150th and 255th days respectively. Fungal species restricted to this region were *Gongronella butleri,* Phycomycetous sterile colonies, *Neocosmospora vasinfecta, A. phoenicis, A. terricola, A. ustus, A. versicolor* and yellow septate sterile colonies *(table 1).*

The moisture content of the soil varied between 9.02-40.30 %. The variation in pH and organic content was between 7.50-7.85 % and 2.71-3.50 % respectively *(table 2).*

Table 2. Physico-chemical characters of soil (average of three replicates)

Plants age in days	Moisture content %		pH	Organic matter %
	Crown	Distal		
30	18.40	30.4	7.70	2.71
50	24.90	36.7	7.85	2.73
70	25.00	37.9	7.50	2.75
90	26.25	40.3	7.60	2.69
110	15.15	28.5	7.60	3.24
130	13.20	20.3	7.75	3.30
150	12.61	18.6	7.80	3.50
180	10.48	16.2	7.65	3.48
210	9.02	12.3	7.55	3.50
255	6.33	9.6	7.50	3.40

b) Microflora of rhizosphere region

58 and 48 fungal species were cultured from the rhizosphere of crown and distal regions respectively. In both the regions the number was lowest in the beginning and increased continuously. The number, however, decreased on 210th day. On 255th day when the differentiation between crown and distal regions was not possible because of the highly decomposed and fragile nature of the roots, the number abruptly increased *(table 3).* The fungal population (per gram dry soil) was the minimum in the beginning.

Three maxima on 90th, 150th and 255th days were observed in both regions when the plant was in flowering, harvesting and decomposing stages respectively. The population was higher in the crown region up

to 130th day and thereafter distal region was supported by higher fungal population *(figure 1)*. The dominant species in rhizosphere of crown region were *Aspergillus niger, A. terreus; Mucor luteus, M. hiemalis* and *Fusarium nivale; F. nivale, F. oxysporum, Trichoderma viride* and *Cladosporium herbarum* in preflowering, flowering and later stages respectively. In preflowering stage *Aspergillus niger* and *A. terreus* were dominant in the distal rhizosphere also. Later on, however, the dominant species differed and *Cl. herbarum, Rhizopus nigricans* and *F. avenaceum* were isolated as dominant from distal region. *Cl. herbarum* and *Mucor* spp. were dominant in rhizosphere region in the end when crown and distal regions became undistinguishable.

The fungal species restricted to rhizosphere region were *Choanephora cucurbitarum, Aspergillus sulphureus, A. japonicus* and *Monilia geophila,* the forme two to crown region and the latter two to distal one.

Table 3. Fungal species and av. cols./pl. in different root regions

Plants age in days	N.-r. (*)	C. r.	D. r.	C. r. c.	C. r. s.	D. c.	D. s.
30	20	13	10	5(3)	2(1)	4(3)	2(1)
50	24	20	19	6(2)	4(1)	7(4)	6(2)
70	24	19	28	4(4)	3(2)	5(2)	4(2)
90	29	17	16	4(3)	5(2)	8(4)	6(4)
110	28	24	23	9(4)	6(3)	9(3)	7(4)
130	26	25	22	7(3)	4(2)	5(4)	5(4)
150	26	26	19	6(4)	5(3)	9(6)	5(3)
180	25	22	22	5(5)	6(4)	3(7)	3(4)
210	21	8	13	4(6)	4(5)	4(6)	3(7)
255	36	29		12(8)			

(*) See table 1.
Digits in brackets stand for average colonies per plate.

Bacterial population per gram dry soil varied nearly on the same pattern as fungal population. In the end, however, there was no increase

in the distal region and the peak was not so remarkable as that of fungi *(figure 2).*

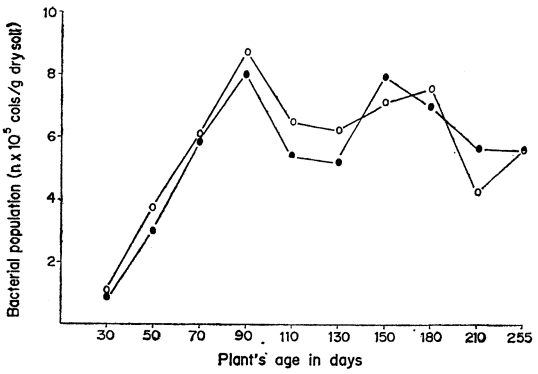


Figure 2. Bacterial population in crown (○ — ○) *and distal* (● — ●) *rhizosphere of* O. sativa

c) Microflora of rhizoplane region

The number of species in cortical and stelar regions of crown and distal rhizosphere was generally low in the beginning and in the end. The number was generally higher on 110th day. No regular sequence was observed in the average number of colonies obtained from the different regions. However, number was mostly higher in the later stages, after the harvest of the plants. 28 and 20 species respectively were cultured from cortical and stelar regions of crown rhizoplane and 23 and 20 respectively from cortical and stelar portion of the rhizoplane of distal region *(table 2).* The dominant species in cortical region of crown and distal portions were nearly alike. The dominant species were *Syncephalastrum racemosum, Rhizopus nigricans, Aspergillus flavus, Fusarium nivale* in the pre-flowering stage *Helminthosporium* sp., *Mucor luteus, M. hiemalis, R. nigricans, F. oxysporum* during flowering and *R. nigricans, F. avenaceum* later on.

The dominant species in stelar portion of crown and distal regions were *Curvularia lunata,* white sterile colonies in pre-flowering; *Arpergillus flavus, Trichoderma viride, Helminthosporium oryzae* in flowering; and *Cu. lunata, Fusarium oxysporum, Rhizoctonia solani,* black sterile colonies in later stages. *F. oxysporum* and black sterile colonies were most frequent in the rhizoplane region at the last sampling period when the different

regions of the rhizoplane were not distinguishable. *Syncephalastrum racemosum, Chaetomium biapiculatum, Acrostalagamous* sp. and *Rh. solani* were restricted to rhizoplane region.

Besides a number of species restricted to one or other regions, *Rhizopus nigricans, Aspergillus nidulans, A. flavus, Penicillium nigricans, Curvularia lunata, Helminthosporium racemosum, Helminthosporium* sp., *Fusarium avenacevm, F. nivale, F. oxysporum,* black sterile colonies and white sterile colonies were obtained from all the regions i. e. non-rhizosphere, rhizosphere and rhizoplane *(table 1).*

DISCUSSION

Amongst 67 forms isolated during the course of investigation 67, 63 and 38 were obtained from non-rhizosphere, rhizosphere and rhizoplane regions. Decrease in the number of species from non-rhizosphere to rhizosphere to rhizoplane has been observed in earlier studies also (4, 6, 9-10 and 17). The number of species was higher in the rhizosphere of crown region and in the rhizoplane the number was higher in the cortical portion of both crown and distal regions.

The fungal population per gram dry soil was invariably higher in the rhizosphere region. The non-rhizosphere region being provided with diverse type of plant and animal remains harbour various types of fungal species. Due to root exudation the rhizosphere region is comparatively richer and specifiic in nutritional level. In this region only selected forms best suited to this micro-environment are encouraged to grow and multiply luxuriously and this accounted to the higher rhizosphere population. Higher population in the crown region in the earlier stages may be accounted due to the presence of diverse types of roots in this region. In addition to the root leakage, the older roots of this region provide sloughed off dead tissue for the colonization of the microbes and hence various types of microbes in large quantity find abode there. Later on when the plant ages and major portion of the root of the crown portion is old, the root leakage is very meager (authors' unpublished observation). While the roots of distal region with comparatively younger root portion secreted more substances to support higher population in post-flowering stages. In addition to root system, the soil condition may also be responsible for variation in microbial population in the crown and distal regions

at different stages. The moisture content in the distal region was considerably higher in the earlier stages which also affected the population adversely. Poor aeration and accumulation of toxic substances are mainly responsible for decrease in microorganisms in lower horizons of water-logged places (7). After flowering period, however, the condition was more conducive in distal region which supported higher population. The upper soil layer with crown region was provided with low moisture content which adversely affected the microflora in this region. The soil microflora in tropical countries is primarily affected by varying degree of soil humidity in different seasons of the year (8). Naim (11) also reported a higher fungal count in distal region than crown one in plants growing in Libyan desert. It was due to low moisture content in upper layer of soil containing the crown portion of root system.

In the rhizoplane region the specificity in nutritional status is further advanced and the forms specific to this region were obtained. The number of fungal species is, therefore, further decreased in this region. In the cortical region, which is in the immediate contact with the soil, the population is higher and this decreases in the stelar region where only a few selected species could establish themselves. In the earlier stages when the root was healthy the forms were limited in number and they increased as the plant ages and the root became older. In older roots when the desomposition starts, the fungal forms responsible to this process grow and multiply there.

Besides a number of casual forms which are associated with one or other region, some of the dominant forms exhibited a clear association with the different micro-environments. *Aspergillus terreus* and *Trichoderma viride,* dominant forms of non-rhizosphere regions, were not isolated from rhizoplane region. Similarly *Cladosporium* sp. one of the dominant forms of non-hrizosphere soil exhibited decreasing tendency from non-rhizosphere to rhizosphere region and was absent in rhizoplane. *Rhizopus nigricans, Mucor luteus, M. hiemalis, Penicillium nigricans, Alternaria tenuis, Helminthosporium* sp., *Fusarium avenaceum, F. nivale* and black sterile colonies present with low percentage in non-rhizosphere region established themselves with considerably higher frequency in rhizoplane region. Earlier workers (13, 15 and 20-21) reported that *Fusarium* has a high degree of competitive saprophytic ability. According to Taylor and Parkinson (19) sterile dark fungi were isolated as initial stele colonizers.

In the end when the root was descomposed to a great extent and differentiation between crown and distal and cortical and stelar regions was not possible *Curvularia lunata, Alternaria tenuis, Fusarium avenaceum, F. oxysporum* and black sterile colonies were dominantly associated with the rhizoplane regions and their frequency in non-rhizosphere and rhizosphere regions was very low. These species were primarily responsible for the final decomposition of the plant materials. The preponderance of these forms may also be accounted due to their wide ecological amplitude which accounted to their successful survival in unfavourable summer months when the themperature of the soil was very high and the moisture content was considerably low. pH and organic matter of the soil affect the microflora of rhizosphere and rhizoplane regions to a lesser degree. Non-rhizosphere microflora, however, is affected by organic matter of the soil (2, 4 and 9).

There exists a clear succession of the fungal species from non-rhizosphere region to rhizoplane through rhizosphere. Amongst the various forms with diverse nutritional requirements present in the non-rhizosphere region a few are preferred by the plants for colonization on their root surface and finally more specific ones are allowed to penetrate the root tissue for decomposition. The screening of the forms from non-rhizosphere to rhizoplane is controlled by various macro and micro-factors, the chief amongst them being, soil and plant. A minor variation in the physico-chemical nature of the soil affects the population appreciably. The nature, age, root exudation and type of plant tissue are responsible for variation in the microorganisms from plant to plant.

SUMMARY

Rhizosphere and rhizoplane microflora of *Oryza sativa* Linn. has been studied from seedling to decomposing stages. There was a decrease in the number of fungal species from non-rhizosphere to rhizoplane. Higher microflora was recorded from crown region of rhizosphere and least from rhizoplane. Quantitatively the population in rhizosphere was higher than non-rhizosphere but qualitatively the trend was a reverse. Crown region of the rhizosphere harboured more micro-population (fungi and bacteria) up-to 130th day after which the population was higher in distal region. Root condition and moisture content of the soil were the possible cause of this variation. Maximum micro-population in the rhizosphere and non-

rhizosphere was recorded on 90th day (flowering) followed by 150th and 255th day. The fungal species dominant and specific in different regions were also recorded. *Curvularia lunata, Alternaria tenuis, Fusarium avenaceum, F. oxysporum* and black sterile colonies were dominantly associated with rhizoplane region.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are thankful to Professor K. S. Bhargava, Head of the Botany Department, University of Gorakhpur, Gorakhpur, India, for providing laboratory facilities.

RESUMEN

Investigaciones en la microflora de la rizosfera. I. Sucesión de la microflora en las diferentes zonas de la raíz de Oryza sativa *L.*

Se ha estudiado la microflora de la rizosfera y la rizoplana de *Oryza sativa* Linn., desde la plantación hasta la destrucción de los tejidos. Se observó que disminuía el número de especies de hongos, de la no rizosfera a la rizoplana y se encontró la máxima cantidad de microflora en la zona superior de la rizosfera, y la mínima, en la rizoplana. Cuantitativamente, era más elevada la población en la rizosfera que en la no rizosfera, pero había mayor número de especies en la no rizosfera. La parte superior de la rizosfera contenía la mayor cifra de micropoblación (hongos y bacterias) hasta los ciento treinta días; después, la población máxima se encontraba en la región distal. Las condiciones de la raíz y el contenido de humedad del suelo pudieran ser la causa de esta variación. La micropoblación máxima en la rizosfera y no rizosfera se encontró a los noventa días (floración), seguida de la correspondiente a los ciento cincuenta y doscientos cincuenta y cinco días. Se registraron también las especies de hongos dominantes y específicas en las diferentes zonas. En la rizoplana se encontraron predominantemente *Curvularia lunata, Alternaria tenuis, Fusarium avenaceum, F. oxysporum* y colonias estériles negras.

BIBLIOGRAPHY

1. Das, A. C. 1963. Ecology of soil fungi of rice field. I. Succession of fungi on rice roots. Trans. Brit. Mycol. Soc., 46, 431-43.

2. GADGIL, P. D. 1965. Distribution of fungi in living roots of certain Gramineae and the effect of root decomposition and soil structure. Plant Soil, 22, 239-59.
3. GARETT, S. D. 1956. Biology of Root Infecting Fungi. Cambridge Univ. Press., 239.
4. GUJARATI, S. 1965. Investigation into rhizosphere microflora of certain crop plants. Ph. D. thesis, B. H. U., Varanasi, India.
5. HILTNER, L. 1904. Über neure Erfahrungen und probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderer Beruckstschigung der Girundungung under Brache. Arbdtsch. Landw. Ges., 98, 59-78.
6. KATZNELSON, H.; LOCHHEAD, A. G., and TIMONIN, M. I. 1948. Soil microorganisms and the rhizosphere. Bot. Rev., 14, 543-87.
7. MISHRA, R. R. 1964. Seasonal variation in fungal flora of grasslands of Varanasi. Ph. D. thesis, B. H. U., Varanasi, India.
8. MISHRA, R. R. 1966. Studies on ecological factors governing the distribution of soil mycoflora. Proc. Nat. Acad. Sci. India, 36, 205-22.
9. MISHRA, R. R., and SRIVASTAVA, V. B. 1969. Rhizosphere fungal flora of certain legumes. Ann. Inst. Pasteur, 117, 717-23.
10. MISHRA, R. R., and SRIVASTAVA, V. B. 1970. Variation in the rhizosphere microflora of certain crops. Proc. Nat. Acad. Sci. India, XL, B, 195-202.
11. NAIM, M. S. 1965. Development of rhizosphere and rhizoplane microflora of *Aristida coerulescens* in the Lybian desert. Arch. Mikrobiol., 50, 321-25.
12. PARKINSON, D., and PEARSON, R. 1967. Studies on fungi in the root regions. VII. Competitive ability of sterile dark fungi. Plant Soil, 27, 120-30.
13. PETERSON, E. A. 1958. Observations on fungi associated with plant roots. Can. J. Microbiol., 4, 257-65.
14. PIPER, C. S. 1944. Soil and Plant Analysis, 368. The University of Adelaide, Adelaide.
15. RAO, A. S. 1959. A comparative saprophytic ability in twelve root infecting fungi by an agar plate method. Trans. Brit. Mycol. Soc., 42, 97-111.
16. RIVIERE, J. 1959. Contribution a l'etude de la rhizosphere du blé. Ph. D. thesis, University of Paris.
17. ROVIRA, A. D. 1965. Interaction between plant roof and soil microorganisms. Ann. Rev. Microbiol., 19, 241-66.
18. SRIVASTAVA, V. B. 1969. Investigations into rhizosphere microflora of certain crop plants. Ph. D. thesis, University of Gorakhpur, India.
19. STARKEY, R. L. 1938. Some influence of the development of higher plants upon microorganisms in the soil. VI. Microscopic examination of the rhizosphere. Soil Sci., 45, 207-49.
20. TAYLOR, G. S., and PARKINSON, D. 1965. Studies on fungi in the root region. IV. Fungi associated with the roots of *Phaseolus vulgaris* L. Plant Soil, 22, 1-20.
21. WASTIE, R. L. 1961. Factors affecting competitive saprophytic colonization on the agar plates by various root infecting fungi. Trans. Brit. Mycol. Soc., 44, 145-59.
22. PAPAVIZAS, G. C., and DAVEY, C. B. 1959. Evaluation of various media and antimicrobial agents for isolation of soil fungi. Soil Sci., 88, 112-17.

III CONGRESO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA

Bajo la Presidencia de Honor de Su Excelencia el Jefe del Estado y la efectiva del Prof. A. Pumarola, tuvo lugar este Congreso, en Barcelona, conforme estaba previsto, durante los días 3 al 5 del pasado mes de junio. El Prof R. Sohier, de la Facultad Mixta de Medicina y Farmacia, de Lyon, pronunció una conferencia sobre "La mononucleosis infecciosa y sus relaciones con el virus de Epstein-Barr", y el Prof. J. Ingraham, de la Universidad de California, Davis, otra acerca de "Mutantes sensibles al frío y temperatura mínima de crecimiento de las bacterias". Asimismo, se celebraron dos simposios: Enseñanza de la Microbiología, y Genética Bacteriana.

Las comunicaciones presentadas, más de ciento cincuenta, cuyos resúmenes han sido recogidos en una publicación editada por el Congreso, se distribuyeron en las secciones siguientes: Acción de los Agentes Físicos y Químicos sobre Microorganismos, Antibióticos, Ecología Microbiana, Estructura y Fisiología Microbianas, Genética Microbiana, Inmunología, Microbiología Aplicada, Microbiología Médica, Taxonomía Microbiana, y Virología.

JUNTA DIRECTIVA DE LA SOCIEDAD

El día 5 de junio, inmediatamente antes de la Sesión de clausura del Congreso anterior, se celebró Asamblea General de la Sociedad Española de Microbiología en la que se efectuó la elección para la renovación parcial reglamentaria de la Junta Directiva, que quedó constituida de la siguiente forma:

Presidente: Dr. David Vázquez Martínez
Vicepresidente: Prof. Agustín Pumarola Busquets
Secretario: Dr. Julio Pérez Silva

III CONGRESO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA

Bajo la Presidencia de Honor de Su Excelencia el Jefe del Estado y la efectiva del Prof. A. Pumarola, tuvo lugar este Congreso, en Barcelona, conforme estaba previsto, durante los días 3 al 5 del pasado mes de junio. El Prof R. Sohier, de la Facultad Mixta de Medicina y Farmacia, de Lyon, pronunció una conferencia sobre "La mononucleosis infecciosa y sus relaciones con el virus de Epstein-Barr", y el Prof. J. Ingraham, de la Universidad de California, Davis, otra acerca de "Mutantes sensibles al frío y temperatura mínima de crecimiento de las bacterias". Asimismo, se celebraron dos simposios: Enseñanza de la Microbiología, y Genética Bacteriana.

Las comunicaciones presentadas, más de ciento cincuenta, cuyos resúmenes han sido recogidos en una publicación editada por el Congreso, se distribuyeron en las secciones siguientes: Acción de los Agentes Físicos y Químicos sobre Microorganismos, Antibióticos, Ecología Microbiana, Estructura y Fisiología Microbianas, Genética Microbiana, Inmunología, Microbiología Aplicada, Microbiología Médica, Taxonomía Microbiana, y Virología.

JUNTA DIRECTIVA DE LA SOCIEDAD

El día 5 de junio, inmediatamente antes de la Sesión de clausura del Congreso anterior, se celebró Asamblea General de la Sociedad Española de Microbiología en la que se efectuó la elección para la renovación parcial reglamentaria de la Junta Directiva, que quedó constituida de la siguiente forma:

Presidente: Dr. David Vázquez Martínez
Vicepresidente: Prof. Agustín Pumarola Busquets
Secretario: Dr. Julio Pérez Silva

Tesorero: Dr. Domingo Rodríguez Sánchez
Bibliotecario: Dr. Emilio Ronda Laín.
Vocal: Dr. Fernando Baquero Mochales.
Vocal: Prof. Vicente Callao Fabregat.
Vocal: Dr. Andrés Chordi Corbo
Vocal: Dr. José Manuel Gómez Jiménez de Cisneros
Vocal: Dr. Baldomero Iñigo Leal
Vocal: Dr. Jorge Francisco López Tello
Vocal: Dr. Antonio Portolés Alonso
Vocal: Prof. Julio Rodríguez Villanueva

V CONGRESO LATINOAMERICANO DE MICROBIOLOGIA

Este Congreso, patrocinado por la Asociación Latinoamericana de Microbiología y la Sociedad Uruguaya de Microbiología, se celebrará en Punta del Este (Uruguay), del 5 al 11 del próximo mes de diciembre.

El Presidente del Comité Ejecutivo es el Dr. Juan C. Bacigalupi. Oficinas del Congreso: Instituto de Higiene, Avenida Dr. Alfredo Navarro, 3051, Montevideo (Uruguay).

Tesorero: Dr. Domingo Rodríguez Sánchez
Bibliotecario: Dr. Emilio Ronda Laín.
Vocal: Dr. Fernando Baquero Mochales.
Vocal: Prof. Vicente Callao Fabregat.
Vocal: Dr. Andrés Chordi Corbo
Vocal: Dr. José Manuel Gómez Jiménez de Cisneros
Vocal: Dr. Baldomero Iñigo Leal
Vocal: Dr. Jorge Francisco López Tello
Vocal: Dr. Antonio Portolés Alonso
Vocal: Prof. Julio Rodríguez Villanueva

V CONGRESO LATINOAMERICANO DE MICROBIOLOGIA

Este Congreso, patrocinado por la Asociación Latinoamericana de Microbiología y la Sociedad Uruguaya de Microbiología, se celebrará en Punta del Este (Uruguay), del 5 al 11 del próximo mes de diciembre.

El Presidente del Comité Ejecutivo es el Dr. Juan C. Bacigalupi. Oficinas del Congreso: Instituto de Higiene, Avenida Dr. Alfredo Navarro, 3051, Montevideo (Uruguay).

Depósito legal: M. 702 - 1968

ARTES GRÁF. REYES - Jerónima Llorente, 15. Madrid