

MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACION
INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES AGRARIAS

**REACCIONES DE LA PLANTA A DETERMINADOS FACTORES QUE
CONTRIBUYEN A LA INICIACION DE LA SIMBIOSIS *RHIZOBIUM*-
LEGUMINOSA**

**M. FERNANDEZ PASCUAL
E. CABEZAS DE HERRERA**
Instituto "Jaime Ferrán" de Microbiología, C.S.I.C. *

Anales del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias
Serie: Agrícola

Vol. 28. Núm. Extr. 1985

Separata núm. 15

REACCIONES DE LA PLANTA A DETERMINADOS FACTORES QUE CONTRIBUYEN A LA INICIACION DE LA SIMBIOSIS *RHIZOBIUM*-LEGUMINOSA

M. FERNANDEZ PASCUAL

E. CABEZAS DE HERRERA

Instituto "Jaime Ferrán" de Microbiología, C.S.I.C. *

RESUMEN

Se han estudiado las deformaciones producidas en los pelos radiculares de alfalfa, por acción de AIA, triptófano, suspensiones de cultivo fresco de una cepa de *Rhizobium* específica, y de otra inespecífica, y de los exopolisacáridos procedentes de estas cepas de *Rhizobium*, así como la producción de auxinas y enzimas pécticas por dichos *Rhizobium*.

Al microscopio óptico se ha observado que cada una de estas sustancias, por sí mismas, producen deformación de los pelos radiculares, pero las producidas por los exopolisacáridos, procedentes de la cepa de *Rhizobium* específica, son las que más se asemejan a las que produce la suspensión bacteriana de esta misma cepa.

En cortes ultrafinos de los pelos radiculares deformados por la cepa de *Rhizobium* específica, se observaron al microscopio electrónico las invaginaciones producidas en la pared celular de la raíz al aproximarse la bacteria, aumentando la invaginación hasta la total inclusión de la bacteria y posterior formación del canal de infección.

INTRODUCCION

Los factores responsables del reconocimiento en la interacción *Rhizobium*-leguminosa, es un tema en constante revisión por la complejidad de los resultados obtenidos.

Recientemente han aparecido una serie de revisiones (BAUER, 1977, 1980; BROUGHTON, 1978; DAZZO, 1980; NAPOLI *et al.*, 1980; SOLHEIM, PAXTON, 1981; BHUVENESWARI, 1980; DAZZO y HUBBELL, 1981; CARLSON, 1981).

Fuera de los estudios realizados con trébol y soja, se conoce poco de los mecanismos de reconocimiento en otros sistemas, aunque las primeras hipótesis implicando a las lecti-

Recibido: 26-4-85.

* Joaquín Costa, 32. 28006 Madrid.

nas en él, tuvieron como base estudios realizados en el sistema *Rhizobium phaseoli* - *Phaseolus vulgaris* (HAMBLIN, KENT, 1973).

Dado que la vía normal de entrada de la bacteria en la planta tiene lugar a través de la epidermis de los pelos radiculares, en el éxito o fracaso de la misma tendrán influencia cada uno de los factores físicos, químicos o biológicos que permitan o impidan la colonización del sistema radicular.

Teniendo en cuenta las teorías que sobre este tema se han expuesto y los resultados obtenidos, en este trabajo nos proponemos estudiar los cambios morfológicos, físicos y químicos que se producen en los pelos radiculares de *Medicago sativa* cuando la cepa específica de *Rhizobium* interactúa con ella, comparándolos con los que producen cada uno de los factores a los que se atribuyen estas acciones.

MATERIAL Y METODOS

Bacterias

Cepa 467 de *R. lupini* y 284 de *R. leguminosarum* procedentes de la colección del Dr. FRAILE, Instituto "Jaime Ferrán", Madrid, y cepa 402 de *R. meliloti* que nos ha sido cedida por el Dr. OLIVARES, Estación Experimental del Zaidín, Granada.

Los cultivos bacterianos se conservan sobre medio 79 sólido a 4°C (FRED, BALDWIN, 1928).

Para la producción de auxinas, las bacterias fueron cultivadas en agitación a 28°C en medio WRIGHT (1925) al que le fue añadido triptófano. Después de 4 días de cultivo se separan las bacterias por centrifugación y en el líquido metabólico se determina el contenido en auxinas por el método de GORDON, WEBER (1951).

Para conocer la producción de enzimas pécticas, se cultivan los rizobios en medio SMITH (1958), y a las 48 horas de cultivo en agitación a 28°C, se separan las bacterias por centrifugación y el líquido metabólico se concentra (100/1) con polietilenglicol 4000-5 p.100 (p/v). Las enzimas pécticas se precipitan con ácido tánico al 1 p.100, se centrifugan y lavan tres veces con acetona, en frío, valorándolas por el método de DINGLE *et al.*, (1953).

Plantas

Semillas de *Lupinus albus*, var. "Multolupa"; *Vicia faba*, var. "Zulueta" y *Medicago sativa*, var. "Tierra de Campos", proceden del Servicio de Semillas Selectas, Madrid.

Las semillas se esterilizan superficialmente manteniéndolas 10 minutos en HgCl₂ 1 p.100 (p/v), lavando varias veces con agua destilada estéril. Se ponen a germinar en oscuridad sobre medio 79 en placas Petri. A los 2 ó 7 días, dependiendo del tipo de semillas, cuando las radículas han alcanzado una longitud de 1 a 5 cm, se transfieren en condiciones estériles a tubos que contienen solución nutritiva libre de nitrógeno (OLIVARES *et al.*, 1980) a la que se añaden las siguientes sustancias o suspensiones bacterianas: Acido indol acético (AIA) desde 10⁻⁷ a 1 mg/ml. Triptófano desde 0,5 a 1 mg/ml. Exopolisacáridos (EPS) procedentes de cepas específicas e inespecíficas. 10⁻² y 10⁻¹ mg/ml. Suspensiones bacterianas de las cepas específica e inespecífica.

Después de un determinado tiempo de cultivo se recogen los exudados radiculares donde se determina la presencia de auxinas (GORDON, WEBER, 1951), y enzimas pécticas (DINGLE *et al.*, 1953).

En las radículas cultivadas en cada uno de los medios indicados se estudian los tipos de deformaciones producidas directamente por medio del microscopio óptico, en secciones ultrafinas teñidas con tinción negativa por medio del microscopio electrónico de transmisión, y siguiendo la técnica de KATSUMOTO *et al.*, (1981) con el microscopio electrónico de barrido.

RESULTADOS Y DISCUSION

En el Cuadro 1 se expresan las auxinas producidas por las tres cepas de rizobios cultivadas en presencia de triptófano, y la Fig. 1 muestra la presencia de ácido indol acético y dos manchas intermedias que podrían corresponder a los ácidos indol láctico e indol propiónico, ambos productos intermedios en la síntesis de AIA.

CUADRO 1
PRODUCCION DE AUXINAS POR LA BACTERIA

Cepas	mg IAA/l
<i>R. lupini</i> - 467	9,0
<i>R. leguminosarum</i> - 284	5,6
<i>R. meliloti</i> - 402	5,3

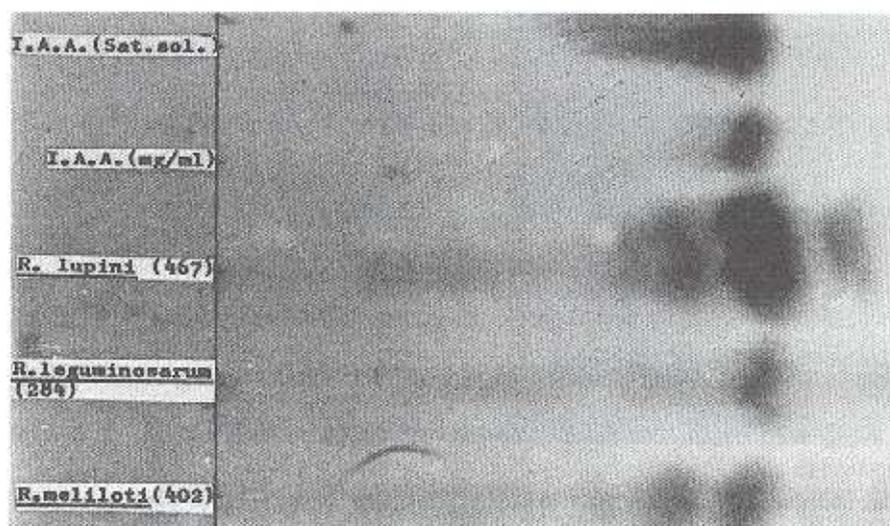


Fig. 1. Cromatografía de papel de los exudados bacterianos de las cepas de *Rhizobium* cultivadas en presencia de triptófano.

Las cepas 467 de *R. lupini*, 402 de *R. meliloti* y 284 de *R. leguminosarum* no sintetizan apenas enzimas pécticas cuando se cultivan en un medio con glucosa o manitol como única fuente de carbono, pero cuando las radículas de alfalfa se sumergen durante 3 días en una suspensión de rizobios 10^9 cell/ml procedentes de un cultivo reciente, en los exudados radiculares se encontraron enzimas pécticas en apreciable cantidad, (Cuadro 2) siendo la asociación *Vicia faba-R. leguminosarum* la que produjo mayor cantidad de enzimas.

CUADRO 2
CONTENIDO DE ENZIMAS PECTICAS EN LA ASOCIACION RHIZOBIUM-
LEGUMINOSA

Plantas	Halo - mm	
	Control	Inoculadas
<i>Lupinus albus</i> , L	22	26
<i>Vicia faba</i> , L	14	30
<i>Medicago sativa</i> , L	18	20

Estos resultados indican que las cepas de rizobios pueden ser incapaces de sintetizar *in vitro* esta clase de enzimas, pero pueden inducir a la producción de las mismas en la asociación bacteria-planta. Resultados que apoyan la hipótesis LJUNGGREN, FAHRAEUS (1961) de que las enzimas pécticas intervienen en la iniciación de la infección reblandeciendo la pared de la célula vegetal, lo que facilita la entrada del parásito. SOLHEIM, RAA (1973), presentaron evidencia en contra de que la pectinasa es la base de inducción específica en la asociación *Rhizobium*-leguminosa, pero detectaron una sustancia deformante en un medio de raíces de trébol inoculado con *Rhizobium trifolii*, con un efecto más potente que el producido por el filtrado del cultivo de *Rhizobium* crecido en medio sintético.

Una característica común de los rizobios es la abundante producción de exopolisacáridos, JANSON *et al.* (1977), VINCENT (1977) y NAPOLI, ALBERSHEIM (1980), encontraron una correlación entre la disminución de producción de polisacáridos extracelulares y la reducción de la efectividad.

Efectos morfológicos sobre las raíces aéreas

La Fig. 2-A muestra los pelos radiculares de una plántula crecida en agua destilada, como testigo.

Las radículas en contacto con AIA 1 mg/ml, fueron totalmente quemadas, pero con concentraciones menores, 10^{-3} y 10^{-5} mg/ml, se aprecia curvatura en los ápices (Fig. 2-B). Este efecto es característico de esta sustancia, ya que como se sabe toma parte en la deformación plástica de la pared de la célula vegetal.

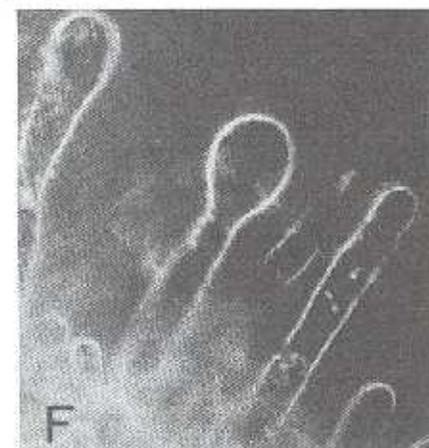
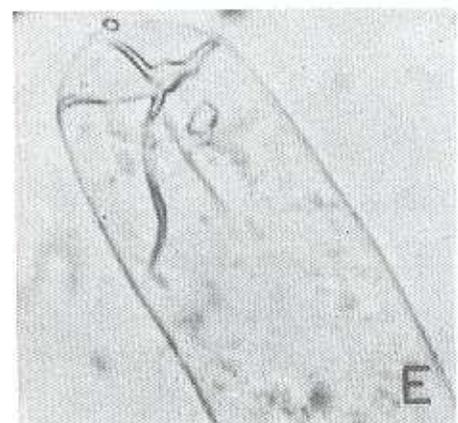
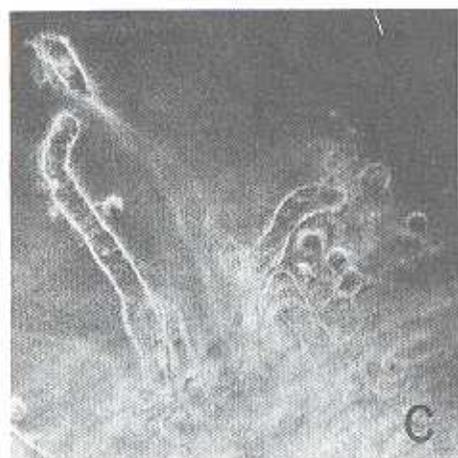
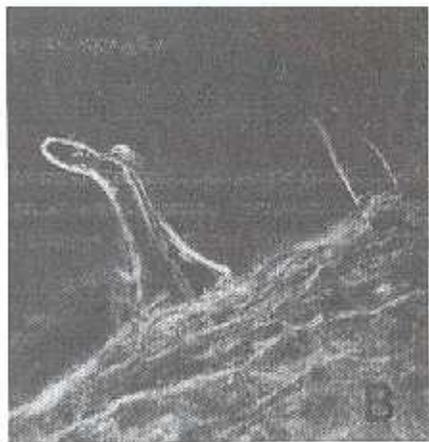


Fig. 2. Radículas de alfalfa: A. cultivadas en agua como control. B. pelos radiculares curvados por efecto del AIA. C. curvados por efecto del triptófano. D. curvados por efecto de los exopolisacáridos de la cepa de *Rhizobium* inespecífica. E y F. curvaturas producidas por la cepa de *Rhizobium* específica ($\times 1.000$).

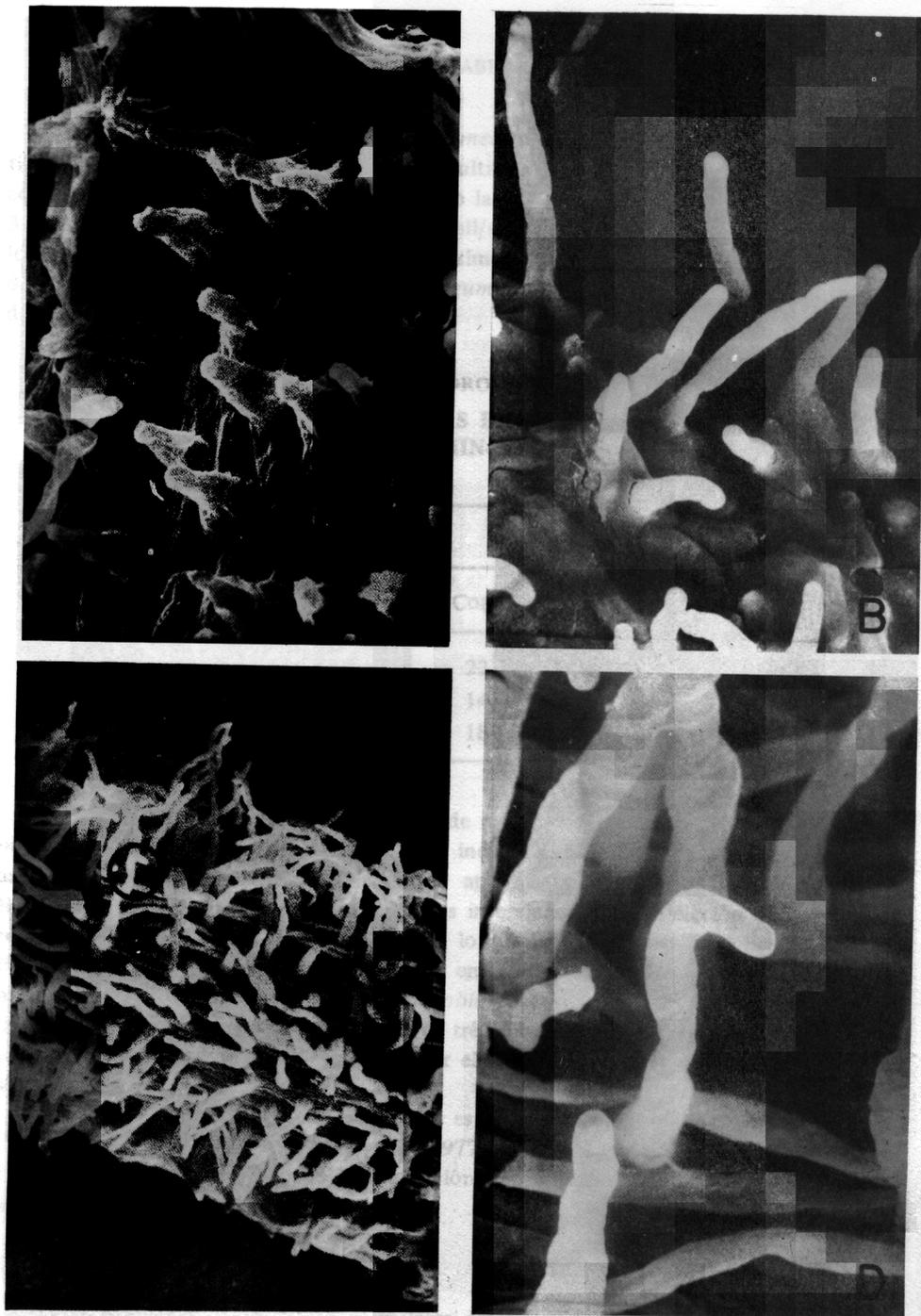


Fig. 3. Radículas de alfalfa observadas al microscopio electrónico de barrido en las que se observa: A. iniciación de la formación de los pelos radiculares (x 6.000). B. pelos radiculares sin inocular (x 4.000). C. aspecto general de una radícula inoculada con la cepa de *Rhizobium* específica (x 100). D. detalle de un pelo radicular (x 6.000).



Fig. 4-A y B. Secciones ultrafinas de radículas de alfalfa inoculadas con la cepa de *Rhizobium* específica en las que se observa la bacteria aproximándose a los pelos radiculares (x 40.000).

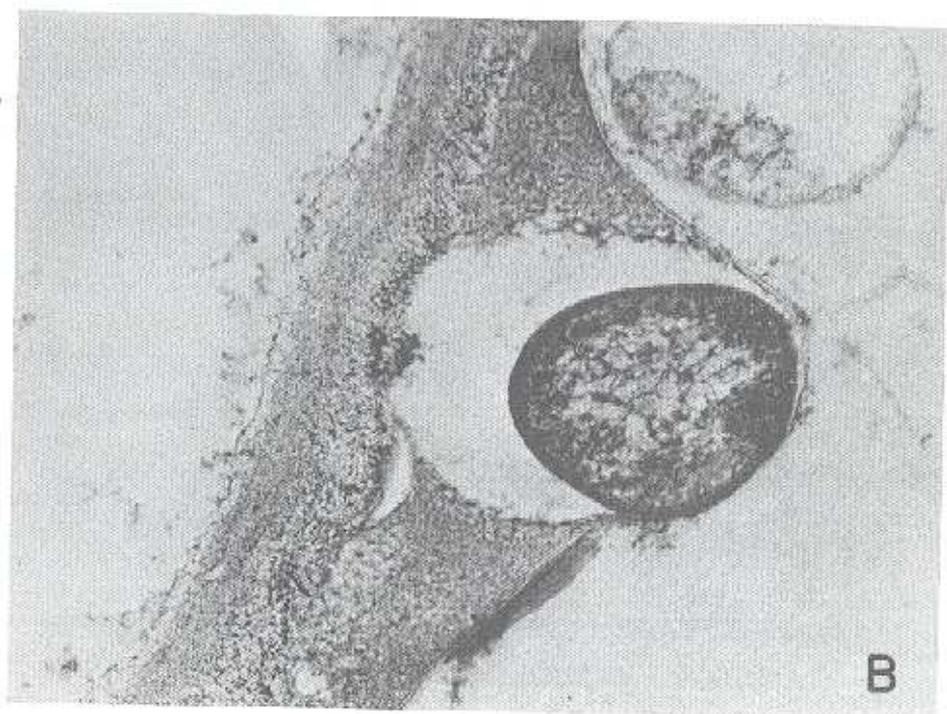
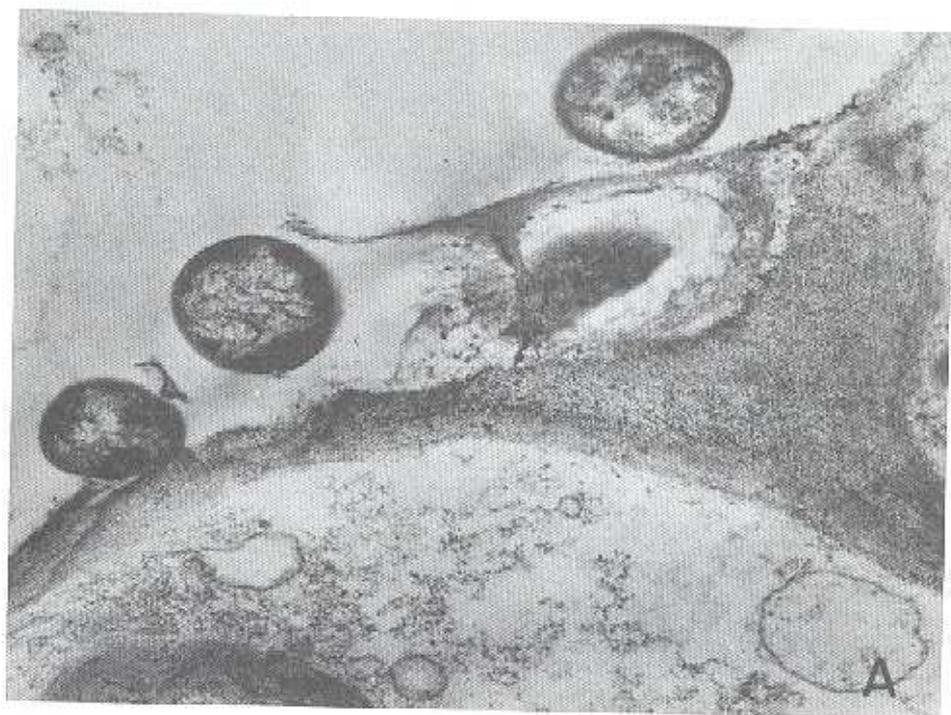


Fig. 5-A y B. Proceso de inclusión de la bacteria por la invaginación de la pared de la célula vegetal ($\times 80.000$).



Fig. 6: Bacterias en el interior del canal de infección (x 30.000).

La Fig. 2-C muestra la deformación de las raíces aéreas sumergidas en soluciones de triptófano de 0,5 y 1 mg/ml.

Los exopolisacáridos (EPS) en concentraciones de 10^{-2} y 10^{-1} mg/ml producen las curvaturas que se observan en la Fig. 2-D.

Las deformaciones más características y las que se producen en mayor proporción fueron observadas cuando las radículas eran cultivadas en presencia de rizobios (10^9 cell/ml). Además de la curvatura, el ápice muestra una forma globosa y en su interior se observan filamentos que podrían ser el inicio de la formación del canal de infección, (Fig. 2-E-F).

También se han observado las deformaciones de los pelos radiculares con el microscopio electrónico de barrido. En las Figs. 3-A-B-C y D se observa la iniciación de la formación de los pelos radiculares y su posterior deformación, a diferencia de los pelos radiculares testigos cultivados en agua.

De las raíces aéreas deformadas por acción de la cepa de *Rhizobium* específica (10^9 cell/ml) se hicieron cortes ultrafinos y se observaron al microscopio electrónico después de tinción negativa.

En las Figs. 4, 5 y 6 se pueden ver las bacterias aproximándose a las raíces de la planta, en las que se produce una invaginación que termina absorbiendo la bacteria y posterior formación del canal de infección.

SUMMARY

Plant responses to some factors conditioning the nodule initiation in the *Rhizobium*-legume symbiosis.

The production of auxins, pectic enzymes and exopolysaccharides of two strains of *Rhizobium* and its effects on the root hairs of its specific and inspecific plants had been studied.

Under light and scanning electron microscopes it has been observed that every one of these substances produce different kinds of deformation on the root hairs, but EPS proceeding from the specific strain of *Rhizobium* produce similar deformation as those produced by the same bacterial suspension.

In ultrafine sections from the root hairs cultivated in the presence of a specific strain the process of union and posterior inclusion of the bacteria in the root of the plant was observed under an electronic microscope.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- BAUER W.D., 1977. The initiation of infection in soybean by *Rhizobium*. *Basic Life Sci.*, 9, 283-297.
- BAUER W.D., 1980. In *Nitrogen Fixation* (W.E. Newton and W.H. Orme-Johnson eds.), Vol. II, pp. 205-214, Univ. Park-Press, Baltimore, Maryland.
- BHUVANESWARI T.E., 1980. *Econ. Bot.*, 35, 204-223.
- BROUGHTON W.J., 1978. A Review control of Specificity in legume-*Rhizobium* Association. *J. App. Bact.*, 45, 165-194.
- CARLSON R.W., 1981. In *Ecology of Nitrogen Fixation*, (W.J. Broughton eds.), Vol II, Oxford Univ. Press, London and New York.
- DAZZO F.B., 1980. In *Adsorption of Microorganisms to Surfaces*, (G. Britton and K.C. Marshall eds.), pp. 253-316. Wiley, New York.
- DAZZO F.B., HUBBELL D.H., 1981. In *Ecology of Nitrogen Fixation*, (W.J. Broughton eds.), Vol. II, Oxford Univ. Press. London and New York.
- DINGLE J., REID W.W., SOLOMONS G.L., 1953. The enzymatic degradation of pectin and other polysaccharides. *J. Food Agric.* 41, 149-155.
- FRED E.B., BALDWIN S.A., 1928. *Laboratory manual of general Microbiology*. Mc Grow-Hill Book Co. New York.
- GORDON S.A., WEBER R.P., 1951. Colorimetric stimation of indoleacetic acid. *Pl. Physiol.* 26, 192-195.
- HAMBLIN J., KENT S.P., 1973. Possible Role of Phytohemagglutinin in *Phaseolus vulgaris* L. *Nature Lond.* 245, 297-301.
- JANSSON P.E., KENNEL L., LINDBERG B., LJUNGGREN H., IONNGREN J., RUDEN V., SVENSSON S., 1977. Demostration of an octasaccharyde repeating unit in the extracellular polysaccharide of *Rhizobium meliloti* by sequential degradation. *J. Am. Chem. Soc.* 99, 3812-3815.

- KATSUMOTO T., NAGURO T., IINO A., TAKAGI A., 1981. The effect of Tannic Acid on the Preservation of Tissue Culture Cells for Scanning Electron Microscopy. *J. Electron Microsc.* 30, 177-182.
- LJUNGGREN H., FAHRAEUS G., 1961. The role of poligalacturonase in root hair invasion bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 26, 521-528.
- NAPOLI C., ALBERSHEIM P., 1980. *Rhizobium leguminosarum* Mutants Incapable of Normal Extracellular Polysaccharides Production. *J. Bact.* 141, 1454-1456.
- NAPOLI C., 1980. In *Nitrogen Fixation*. (W.W. Newton and W.H. Orme-Johnson eds.), Vol. II, pp 189-203. Univ. Park Press Baltimore, Maryland.
- OLIVARES J., CASADESUS J., BEDMAR E.J., 1980. Method for Testing Degree of Infectivity of *Rhizobium meliloti* strains. *App. Environ. Microbiol.* 39, 967-970.
- SMITH W.K., 1958. A survey of the production of pectic enzymes by plant pathogenic and other bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 18, 33-41.
- SOLHEIM B., PAXTON J., 1981. In *Plant Disease Control: Resistance and susceptibility*. Wiley (Interscience), New York.
- SOLHEIM B., RAA J., 1973. Characterization of the Substances Causing Deformation of Root Hairs *Trifolium repens* when Inoculated with *Rhizobium trifolii*. *J. Gen. Microbiol.* 77, 241-247.
- VINCENT J.M., 1977. In *Nitrogen Fixation*. Vol. II (W.W. Newton and W.H. Orme-Johnson eds.), pp. 103-129. Univ. Park Press, Baltimore.
- WRIGHT W.H., 1925. The nodule bacteria of soybeans. 1. Bacteriology of strains. *Soil Sci.* 20, 95-129.

I. N. I. A.

Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias
José Abascal, 56. Tel. 442 31 99
28003 Madrid (España)