

# ESTUDIOS SOBRE LAS SUSTANCIAS CON ACTIVIDAD CITOQUININA DE LOS NODULOS RADICALES FIJADORES DE NITROGENO DE *ALNUS GLUTINOSA* (L.) GAERTN.

F. BERMÚDEZ DE CASTRO  
C. RODRÍGUEZ-BARRUECO

## SUMMARY

Cytokinin activity was detected in substances isolated from the nitrogen-fixing root-nodules of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. The material with that activity showed a single absorption peak at 280 nm. as measured spectrophotometrically. The method employed included organic extraction with ethyl acetate of crushed nodule material and the use of paper chromatography. Chromatogram eluates of the purple UV-light absorbing spots showed to hold the capacity to promote growth of soybean callus and to increase weight of excised radish cotyledons. The role of this substance on induction of root-nodules in plants is discussed although. The symbiotic partner responsible for its production in the nodule tissue is not known. The actual impossibility to get pure cultures of the microsymbiont handicaps at this stage any investigation in that direction.

## RESUMEN

Se ha detectado actividad citoquinina en sustancias aisladas de los nódulos radicales fijadores de nitrógeno atmosférico de *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. La sustancia que muestra dicha actividad presenta un máximo de absorción único a 280 nm. El método empleado consiste en dos extracciones consecutivas con acetato de etilo y agua acidulada a partir de material nodular triturado y posterior purificación por cromatografía. Los eluidos de las zonas del cromatograma que mostraron fuerte absorción a la luz UV tienen capacidad para promover el crecimiento de callos de soja e incrementar el peso de cotiledones de rábano. Se discute el papel que estas sustancias pueden tener en la génesis nodular. La falta de cultivos puros del microorganismo simbiote impide conocer cuál es el organismo productor de las sustancias detectadas y constituye un serio obstáculo en esta línea de investigación.

## INTRODUCCIÓN

El aliso (*Alnus glutinosa*(L.) Gaertn.) es un árbol que forma en la zona Oeste de España la ripisilva de algunos tramos de los cursos de agua y

bosquetes en zonas húmedas. Tiene gran importancia en la dinámica del ecosistema ya que enriquece el suelo en el que vive gracias a su poder fijador de nitrógeno atmosférico. Esta función se realiza en los nódulos radicales, formados por simbiosis entre la planta superior y *Frankia alni*, microorganismo endofítico del orden *Actinomycetales* (BERMÚDEZ DE CASTRO, MIGUEL y RODRÍGUEZ-BARRUECO, 1976).

Se calcula que un árbol puede fijar anualmente 0,5 Kg. de nitrógeno. Como valores medios para masas arbóreas se citan 200 Kg. de nitrógeno por Ha. y año, llegando en algún caso a 1.000 Kg. anuales por Ha. en una aliseda de 5 años (PIZELLE, 1972). Esta incidencia positiva en la fertilidad de los suelos se manifiesta por una mayor productividad de tal manera que las gramíneas pratenses asociadas a plantaciones de aliso crecen mejor y proporcionan un pasto de alto contenido proteico muy apto para la alimentación del ganado.

Por consiguiente es de gran importancia en una región con las características del Oeste español promover el estudio de ésta y otras plantas fijadoras de nitrógeno para conseguir mejorar los suelos, lograr buenos pastizales y potenciar la agricultura mediante cultivos simultáneos de especies no fijadoras y especies fijadoras de nitrógeno atmosférico. Además, la particularidad de fijar nitrógeno atmosférico hace que estas plantas sean pioneras del ecosistema, colonizando terrenos pobres y favoreciendo, de esta manera, la génesis de suelos aptos para la silvicultura. Por otra parte, el nitrógeno fijado en el suelo, al ser arrastrado por las aguas, llega a los ríos y embalses donde favorece el crecimiento del fitoplancton, aumentando así la riqueza piscícola. Al mismo tiempo, evita la eutroficación por medio de un mecanismo autorregulador de la cantidad de nitrógeno fijado.

Como parte de un trabajo más extenso, que abarca diversos aspectos de la fijación de nitrógeno en el Oeste español se ha estudiado la presencia de citoquininas en los nódulos radicales del aliso.

En un estudio previo se ha encontrado que tanto kinetina (6-furfuril-aminopurina) como 2IP (2-isopentenil-aminopurina), citoquininas sintética y natural, respectivamente, pueden inducir pseudonódulos radicales en plantas de aliso crecidas en un medio libre del endofito microbiano (RODRÍGUEZ-BARRUECO y BERMÚDEZ DE CASTRO, 1973). Por otra parte, se conoce que las citoquininas desempeñan un papel importante en los procesos de nodulación en leguminosas, pero no se ha podido comprobar si estas citoquininas endógenas son producidas por la planta superior o por el simbiote microbiano.

Los nódulos radicales del aliso presentan formas coraloides unidas a

la raíz parental. Estos nódulos están formados por un tejido en división activa, por lo que es muy probable la existencia de sustancias con actividad citoquinina a concentraciones altas. Se ha seguido un método de extracción y purificación común en la bibliografía para extraer citoquininas de tejidos vegetales que se expone en la Sección siguiente.

## MÉTODOS

Se recogieron nódulos de aliso en árboles que forman setos ribereños a orillas del río Tormes (provincia de Salamanca). Fueron llevados al laboratorio en bolsas de plástico y, una vez limpios, se repartieron en fracciones homogéneas de 5 g. para ser triturados en un mortero con arena y acetato de etilo (MERCK) el mismo día de la recolección. El extracto se filtró al vacío y al filtrado se le añadieron porciones de agua destilada, ajustada a pH 3,0 con ClH, y se agitó bien la mezcla. Posteriormente se decantó la fase acuosa en un embudo de llave, se descartó la fase orgánica y la fase acuosa se trató varias veces con éter dietílico hasta que la fracción etérea salió incolora. La fase acuosa se congeló y se guardó en frigorífico hasta el momento de purificarla por cromatografía.

### *Purificación por cromatografía de papel*

El extracto nodular fue descongelado a temperatura ambiente y concentrado al vacío en un rotavapor Büchi para remover los restos de éter dietílico y obtener un volumen lo suficientemente pequeño para proceder a la cromatografía. Luego se procedió a correr dos cromatografías ascendentes en papel Whatman 3MM en oscuridad, durante 3 1/2 horas en la fase orgánica de una mezcla de acetato de etilo, ácido fórmico, agua (60:5:35) (PHILLIPS y TORREY, 1972).

Ambas cromatografías fueron reveladas a la luz UV de 254 nm. bajo lámpara Desaga. En el cromatograma preparatorio se observaron dos zonas de color púrpura con valores de Rf 0,7 y 0,9 respectivamente, que fueron eluidas en ClH 0,1 N y vueltos a cromatografiar. En la segunda cromatografía se observó una mancha solamente con Rf 0,9 que fue eluida, como en el caso anterior en ClH 0,1 N toda la noche a 35° C (MILLER, 1963).

El eluido fue ajustado a pH 6,0 y ensayada su capacidad para promover el crecimiento del callo de soja y el incremento de peso de cotiledones de rábano.

La absorción de los eluidos de las fracciones cromatografiadas de los

extractos nodulares y de soluciones comerciales de BAP (6-bencil-aminopurina), 2IP (ambas de Sigma) y kinetina (de Calbiochem) fue determinada en un espectrofotómetro Beckman DB-GT.

#### *Bioensayo del callo de soja*

Se utilizaron en este bioensayo eluidos de la fracción de extractos nodulares cromatografiada y otra fracción de la fase acuosa no purificada por cromatografía y diluida con agua destilada hasta obtener una D.O. 280 nm. = 0,5. El pH de ambas fracciones se ajustó a 6,0 con NaOH diluido. Se añadieron 0,75 ml. de la fracción cromatografiada a 6 tubos de ensayo (3 × 19 cm.) que contenían 30 ml. del medio nutritivo básico (MILLER, 1963). A otros cinco tubos se les añadió igual cantidad del extracto crudo, otros cuatro se mantuvieron como controles sin adicionar sustancia activa y un segundo control se estableció añadiendo 75 ml. de una solución de kinetina (20 µg/ml.).

El callo de soja (*Glycine max*, var. «Acme»), suministrado por el Dr. A. Varga del Departamento de Fisiología Vegetal de la Universidad Agrícola de Wageningen, Holanda, se mantuvo creciendo a 27° C en la oscuridad hasta el momento del bioensayo. Este se realizó según el método de Miller (1963) usando porciones de 6 mg. de peso fresco, que se cultivaron, en las condiciones indicadas, durante tres semanas, al cabo de las cuales se procedió a pesarlos.

#### *Bioensayo de cotiledón de rábano*

Las semillas de rábano (*Raphanus sativus*, var. «Red forcing», Suttons Seed, Reading, U.K.) fueron esterilizadas superficialmente con hipoclorito sódico y después de cinco lavados con agua estéril fueron puestas a germinar sobre papel de filtro humedecido con agua esterilizada en una bandeja de plástico. La bandeja se introdujo en una bolsa de plástico para conservar el grado necesario de humedad y favorecer la germinación uniforme. Durante 35 horas se mantuvieron en oscuridad a 25° C al cabo de las cuales se cortaron los cotiledones pequeños de las plántulas que habían alcanzado un desarrollo semejante. El hipocotilo fue removido completamente y descartado. En grupos de seis fueron colocados en placas Petri de 6 cm. de diámetro con la parte interna en contacto con discos de papel Whatman n.º 1 humedecidos con 3 ml. de los eluidos de la cromatografía anteriormente descrita. Como controles se pusieron una solución de 2IP (50 µg/ml.) y agua destilada.

Para eliminar el crecimiento bacteriano se añadieron a cada placa 250 U.I./ml. de penicilina. Se pusieron 5 placas por tratamiento dentro

de una bandeja blanca con papel de filtro humedecido con agua, que se cubrió con un plástico transparente sujeto con cinta adhesiva de forma que se mantuviese tenso y así la iluminación fuese uniforme y la humedad permaneciera a saturación. De esta forma fueron mantenidas bajo luz fluorescente de 540 luxes a temperatura de 22-24° C. Los cotiledones fueron secados y pesados a los 3 y 5 días de incubación.

## RESULTADOS

Los eluidos de la primera y segunda cromatografía del extracto nodular mostraron un solo máximo de absorción a 280 nm. En la fig. 1 aparecen

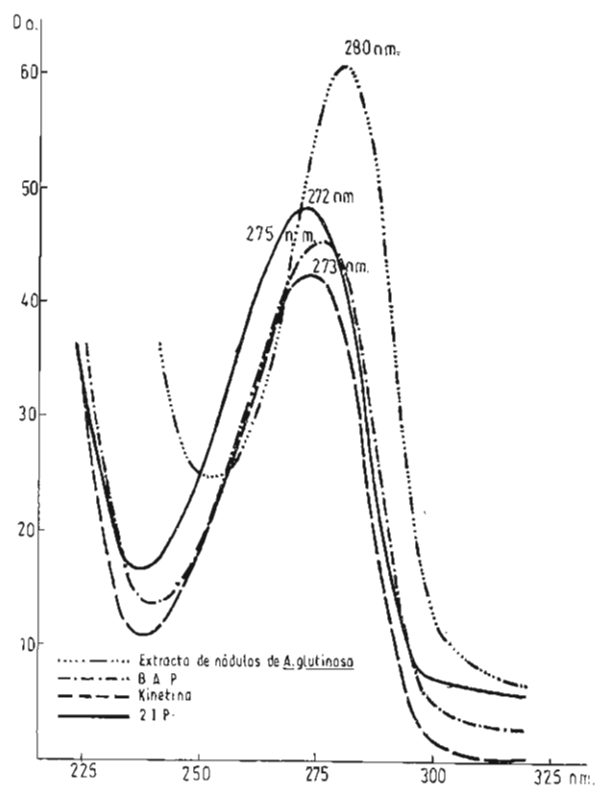


FIG. 1. Curvas de absorción del eluido de una fracción cromatografiada de un extracto nodular de aliso (— · — · —) y soluciones de BAP (— · — · —), 2IP (— — —) y kinetina (— — —).

los espectros de absorción para dichos eluidos y para soluciones de 2IP, BAP y kinetina.

TABLA I

INDUCCION DEL CRECIMIENTO DE CALLOS DE SOJA POR SUSTANCIAS PRESENTES EN LOS NODULOS RADICALES DEL ALISO. DURACION DEL BIOENSAYO: 3 SEMANAS

MEDIO DE CULTIVO	N.º DE TUBOS	PESO FRESCO MEDIO DE LOS CALLOS, g.
(1) Medio básico más fracción cromatografiada	6	0,2178
(2) Medio básico más fracción no cromatografiada	5	0,2536
(3) Medio básico más kinetina (20 µg/ml.)	2	0,8745
(4) Medio básico solamente	4	0,0640

Las diferencias entre (1) y (4) son significativas,  $0,95 < p < 0,99$

Las diferencias entre (2) y (4) son muy significativas,  $p > 0,99$

TABLA II

INGREMENTO DEL PESO (mg.) DE LOS COTILEDONES DE RABANO ESCINDIDOS A LOS 3 Y 5 DIAS DE CONTACTO CON UNA SOLUCION DE 2IP (50 µg/ml.), ELUIDO DE LA CROMATOGRAFIA DE UN EXTRACTO DE NODULOS RADICALES DE ALISO Y AGUA DESTILADA

## TIEMPO DE EXPOSICION

	TRES DIAS			CINCO DIAS		
	2IP	EXTRACTO NODULAR	AGUA DESTILADA	2IP	EXTRACTO NODULAR	AGUA DESTILADA
	13,5	10,2	5,9	26,8	25,4	6,9
	21,3	12,5	5,8	29,6	28,9	8,4
	15,5	12,3	5,8	22,1	23,5	9,0
	15,6	12,9	4,8	20,9	26,6	8,2
	18,4	12,9	6,5	26,4	24,3	9,7
Media:	16,8	12,1	5,8	25,1	25,7	8,4

NOTA: — Tratamiento estadístico, en el texto.

— Peso medio inicial de los cotiledones: 5,4 mg.

### *Bioensayo del callo de soja*

La fracción de los extractos nodulares cromatografiados y la fase acuosa cruda provocaron un crecimiento sustancial en los callos de soja (Tabla I). El tamaño de estos callos es inferior al de los callos tratados con kinetina. La actividad de la fase acuosa no cromatografiada es ligeramente superior a la actividad de la misma fase después de ser purificada por cromatografía. El medio básico, por sí mismo, no produce crecimiento en el callo. La Fig. 2 muestra los callos de soja al finalizar el bioensayo.

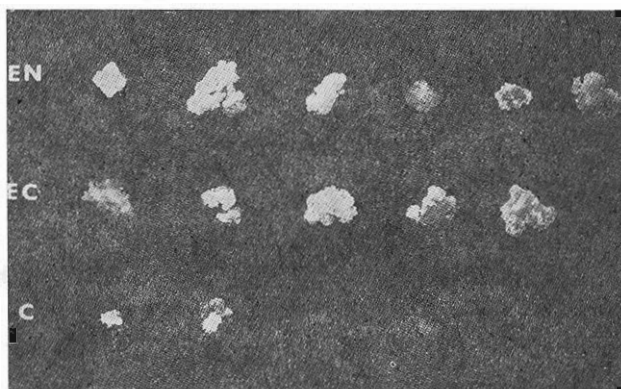


FIG. 2. Aspecto de los callos de soja a las tres semanas de contacto con una fracción del extracto de nódulos de aliso cromatografiada (EN) y no cromatografiada (EC). C: control sin sustancias activas ( $\times 3/4$ )

### *Bioensayo de cotiledones de rábano*

En la tabla 2 se aprecia que, tanto 2IP (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .) como la fracción cromatografiada del extracto nodular inducen crecimiento apreciable en los cotiledones de rábano. El incremento sobre control ha sido, respectivamente, 2,9 y 2 veces después de 3 días de exposición a la luz. A los 5 días de exposición, el incremento es del mismo orden para los cotiledones en contacto con 2IP, pero es superior a 3 veces sobre control para los cotiledones en contacto con el extracto nodular.

Los resultados han sido tratados estadísticamente por la «F» de Snedecor y la «t» de Student. Las diferencias establecidas al cabo de 3 días para el incremento de peso en los cotiledones son muy significativas entre cada tratamiento. Sin embargo, a los 5 días, no hay diferencia significativa entre la fracción nodular y el 2IP, pero es altamente significativa esta

diferencia entre ambos tratamientos y el control. La fig. 3 muestra los cotiledones después de 5 días de contacto con las soluciones ensayadas.

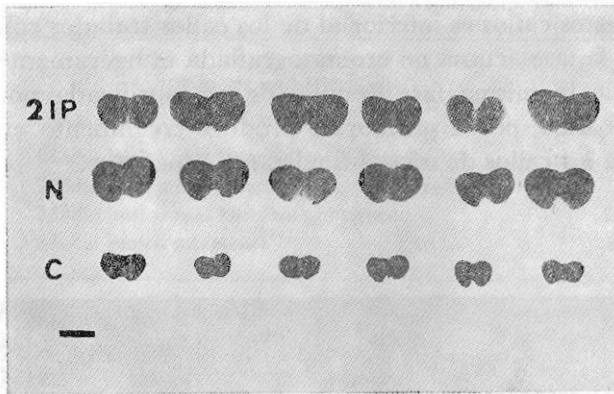


FIG. 3. Cotiledones de rábano escindidos y puestos en contacto durante 5 días con una solución de 2IP (50  $\mu\text{g/ml.}$ ) y una fracción cromatografiada del extracto nodular (N), C: control de agua destilada (Barra, 7 mm.)

#### DISCUSIÓN

Los resultados indican claramente que, en los nódulos radicales del aliso, hay actividad citoquinina sustancial y que dicha actividad puede ser atribuida a una sustancia que absorbe en la región UV con un máximo de 280 nm. Dicha sustancia no cambia de espectro de absorción al esterilizarla en autoclave y su máximo coincide con los observados para las citoquininas naturales y sintéticas.

Como el proceso empleado implica solamente una extracción parcial (HEMBERG y WESTLIN, 1973) no se pueden hacer estimaciones cuantitativas de la sustancia detectada, pero teniendo en cuenta que la mayor parte de las citoquininas quedan retenidas en la fase de acetato de etilo, podemos afirmar que en los nódulos de aliso se encuentran estas sustancias en concentraciones muy altas, ya que la fase acuosa ácida obtenida después de la extracción orgánica, a partir de 5 g. de material nodular hubo de ser diluida 20 veces con agua destilada para que su densidad óptica no sobrepasara en fondo de escala del espectrofotómetro.

La excepción apuntada por Hemberg (1974) de que la zeatina y sus ribósidos permanecen en la fase acuosa, después de la extracción con acetato de etilo, parece indicar que las sustancias activas detectadas son de naturaleza similar a esta citoquinina.

El proceso de purificación por cromatografía no parece afectar al desarrollo del callo de soja, ya que ambas fracciones, la cruda y la puri-



ficada, producen resultados análogos en este bioensayo. Sin embargo, la segunda cromatografía muestra que la mayor parte de la sustancia activa queda separada a un Rf de 0,9, por lo que esta purificación cromatográfica puede servir como un paso previo en estudios encaminados a la identificación de la sustancia separada.

El ligero color pardo que presentaban los callos de soja después de las tres semanas de contacto con los extractos nodulares y el crecimiento menor con respecto a los callos tratados con kinetina, indican la presencia de alguna sustancia tóxica que inhibe parcialmente el desarrollo del callo y que se debe eliminar mediante nuevas purificaciones, cuando se quiera repetir este bioensayo. Sin embargo esas posibles sustancias tóxicas no interfieren en el resultado del bioensayo de cotiledones de rábano.

Hasta qué punto la sustancia con actividad citoquinina detectada en el material nodular por el método empleado es responsable del desarrollo nodular en las raíces del aliso, no se puede conocer con los resultados de este trabajo, pero tenemos una primera evidencia en este sentido con los resultados positivos en la inducción de pseudonódulos radicales por aplicación de citoquininas exógenas en el medio de cultivo (RODRÍGUEZ-BARRUECO y BERMÚDEZ DE CASTRO, 1973).

La acción de las citoquininas en la génesis nodular de leguminosas ha sido estudiada varias veces. Así, Puppo, Rigaud y Barthe (1974) han detectado actividad citoquinina en nódulos de *Phaseolus* y hay evidencia de que *Rhizobium*, el simbiote de estas plantas, produce citoquininas *in vitro* (PHILLIPS y TORREY, 1972). Por otra parte Libbenga, van Iren, Bogers y Schraag-Lamers (1973) proponen su hipótesis del gradiente interno de factores de crecimiento para explicar el desarrollo de los nódulos de *Pisum sativum*. Los resultados de este trabajo sugieren, como se dijo antes, que un proceso similar puede acontecer en los nódulos de las plantas no-leguminosas fijadoras de nitrógeno atmosférico.

La falta de cultivos puros del microorganismo simbiote del aliso impide, por el momento, estudiar la fisiología de esta simbiosis y, por lo tanto, dilucidar quién es el organismo productor de las sustancias con actividad citoquinina detectadas.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores dan las gracias a A. Docobo por el tratamiento estadístico de los resultados y a M. A. Sánchez por la ayuda técnica prestada.

## BIBLIOGRAFIA

1. BERMÚDEZ DE CASTRO, F., MIGUEL, C. and RODRÍGUEZ-BARRUECO, C., 1976: *A study of the capacity of soils to induce nodules in Alnus glutinosa (L.) Gaertn. and Myrica gale L. with special reference to the specificity of the endophytes.* Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 127A, 307-315.
2. HEMBERG, T., 1974: *Partitioning of cytokinins between ethylacetate and acid water phases.* Physiol. Plant., 32, 191-192.
3. HEMBERG, T. and WESTLIN, P. E., 1973: *The quantitative yield in purification of cytokinins. Model-experiments with kinetin, 6-furfuryl-amino-purine.* Physiol. Plant., 28, 228-231.
4. LETHAM, D. S., 1971: *Regulators of cell division in plant tissues. XII. A cytokinin bioassay using excised radish cotyledons.* Physiol. Plant., 25, 391-396.
5. LIBBENGA, K. R., VAN IREN, F., BOGERS, R. J. and SCHRAAG-LAMERS, M. F., 1973: *The role of hormones and gradients in the initiation of cortex proliferation and nodule formation in Pisum sativum L.* Planta, 114, 29-39.
6. MILLER, C. O., 1963: *Kinetin and kinetin-like compounds.* In *Modern Methods of Plant Analysis.* Vol. 6. Ed. by H. F. Linkens and M. V. Tracey. Springer-Verlag, Berlin. 194-202.
7. PHILLIPS, D. A. and TORREY, J. G., 1972: *Studies on cytokinin production by Rhizobium.* Plant Physiol., 49, 11-15.
8. PIZELLE, G., 1972: *Les Angiospermes non-légumineuses fixatrices symbiotiques d'azote présentes dans la Flore française.* Bull. de l'E.N.S.A.I.A., Nancy, 14, 177-191.
9. PUPPO, A., RIGAUD, J. et BARTHE, P., 1974: *Sur la présence de cytokinines dans les nodules de Phaseolus vulgaris L.* C. R. Acad. Sc. Paris, 279, 2.029-2.032.
10. RODRÍGUEZ-BARRUECO, C. and BERMÚDEZ DE CASTRO, F., 1973: *Cytokinin-induced pseudonodules on Alnus glutinosa.* Physiol. Plant., 29, 277-280.