QUIMIOTAXIS DE Bradyrhizobium japonicum ICA 8001 HACIA ÁCIDOS ORGÁNICOS Y EXUDADOS DE SEMILLAS DE SOYA

María C. Nápoles, A. Gutiérrez y M. Varela

ABSTRACT. The chemotactic response of *Bradyrhizobium japonicum* ICA 8001 towards sodium malonate, succinic acid and seed exudates from William'82 cv. was studied in some investigations aimed at elucidating the biochemical signals existing at the early stages of *B. japonicum*-soybean interaction. Just soybean exudate resulted to be a strong bacterial chemoatractive, which decreased when dilution increased. Organic acids showed weak effects with its microsimbiont interaction.

Key words: chemotaxis, *Bradyrhizobium japonicum*, seed, soybean

RESUMEN. En investigaciones para elucidar las señales bioquímicas existentes en los estadios iniciales de la interacción *B. japonicum*-soya, se estudió la respuesta quimiotáctica de la cepa *Bradyrhizobium japonicum* ICA 8001 hacia malonato de sodio, ácido succínico y exudados de semillas var. William'82. Solamente el exudado de soya resultó un fuerte quimioatrayente para la bacteria, efecto que disminuyó con el aumento de su dilución. Los ácidos orgánicos mostraron efectos débiles en su interacción con este microsimbionte.

Palabras clave: quimiotaxis, *Bradyrhizobium japonicum*, semilla, soya

1039

INTRODUCCIÓN

B. japonicum es una bacteria Gram negativa que forma una relación simbiótica con la soya infectando el sistema radical a través de un complejo intercambio de señales moleculares que culminan con la formación de nódulos radiculares (Spaink, 1994; Schultze *et al.*, 1994 y Sharon Long, 1996). Las evidencias procedentes de *Rhizobium* spp. sugieren que la motilidad y la quimiotaxis pueden estar involucradas en los estados iniciales de la interacción (Michiels y Vanderleyden, 1994), permitiendo a la bacteria diseminarse a través del suelo, localizar los primordios nodulares e infectar los nódulos con mayor eficiencia. En particular la motilidad es un factor importante en la competencia entre cepas de *Bradyrhizobium* para la nodulación.

La quimiotaxis en la solución de suelo es el fenómeno mediante el cual un grupo de microorganismos pueden ser atraídos o repelidos hacia la rizosfera o el sistema radical de los vegetales (María C. Nápoles y Ana C. Velazco, 1993) y dada su importancia en el reconocimiento de ambas especies, diversos autores se han dedicado al estudio de este fenómeno (Metting, 1993; Dibut, 1996 y Ana N. Hernández, 1996).

Los exudados de las plantas presentan una compleja y diversa composición química, básicamente centrada en compuestos de bajo peso molecular (Prikryl y Vancura, 1980). Los exudados de la semilla y raíces de la soya incluyen varios metabolitos secundarios, aminoácidos, ácidos orgánicos y azúcares (Barbour, Hattermann and Stacey, 1991), dentro de los cuales los ácidos orgánicos (succinato, malonato y malato) son los que poseen un mayor efecto quimioatrayente sobre *B. japonicum*.

El hecho de que *B. japonicum* posea un flagelo subpolar (Kape, Parniske y Werner, 1991) y responda quimiotácticamente a gradientes de ciertos compuestos químicos exudados por la raíz de soya (Barbour, Hattermann y Stacey, 1991), constituyen para él ventajas ecológicas sobre otros microorganismos de la rizosfera.

En este trabajo se estudió el efecto quimiotáctico de dos ácidos orgánicos: el ácido succínico y el malonato de sodio y de un extracto etanólico de exudados de semilla de soya var. William'82, sobre la cepa *B. japonicum* ICA 8001.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepa y condiciones de crecimiento. Se utilizó la cepa *B. japonicum* ICA 8001, cultivada en medio manitol-extracto de levadura según Vincent (1970), a 28°C y sin agitación durante 48 h.

Preparación de los agentes quimiotácticos. El ácido succínico (Merck) y el malonato de sodio (BDH) se disolvieron en buffer HEPES (ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1 piperazinil] etanosulfónico) a una concentración de 10 mM, ph 7.0. Se esterilizaron por autoclave a 121°C, 15 minutos.

Para obtener el exudado de semillas se embebieron 100 semillas de soya var. William'82 en 100 mL de etanol al 50 %, durante 18 horas en agitación. Se concentró 10 veces la fracción soluble mediante rotoevaporación y se esterilizó por filtración a través de filtros de 0.2 μm.

María C. Nápoles y A. Gutiérrez, Investigadores Agregados del departamento de Fisiología y Bioquímica; M. Varela, Investigador Agregado del departamento de Matemática Aplicada, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.

Ensayo de quimiotaxis. El cultivo de bacterias con una concentración de $2.2x10^8$ UFC.mL^{-1} (unidades formadoras de colonias) se colectó y lavó en buffer HEPES 10 mM mediante centrifugaciones sucesivas a 3 000 rpm durante 5 min a 27°C, con el objetivo de eliminar todo resto de medio de cultivo. Finalmente se resuspendieron las células en el buffer hasta una concentración de $1.5x10^9$ UFC.mL^{-1} y esta suspensión se utilizó en el ensayo de quimiotaxis, para lo cual cinco capilares de 25 μL previamente cargados con cada uno de los quimiotrayentes y con el buffer como control se introdujeron en la suspensión de células, incubándose durante 1 hora a 28°C. Posteriormente se enjuagaron y secaron externamente, determinándose el número de UFC.mL^{-1} contenidas dentro de cada capilar mediante conteo de totales en cámara de Neubauer. En algunos casos fue necesario diluir en el buffer.

La respuesta quimiotáctica se determinó dividiendo el número de UFC contenidas en los capilares cargados en los agentes quimiotácticos entre el número de UFC contenidas en los capilares cargados con el buffer control, según Barbour, Hattermann y Stacey (1991).

Los resultados de la quimiotaxis se procesaron mediante un análisis de varianza completamente aleatorizado con pruebas de Duncan al 5%.

Estudio de diferentes diluciones del exudado de semillas sobre la quimiotaxis. El concentrado obtenido a partir del exudado de semillas se diluyó 10, 100 y 1000 veces en buffer HEPES para determinar el efecto de las diferentes concentraciones sobre la atracción de las bacterias.

Para corroborar los resultados obtenidos en el ensayo con el método de conteo en cámara, se realizó otro con iguales características pero determinando el número de células contenidas dentro del capilar, mediante conteo de viables en placas Petri con medio manitol-extracto de levadura-agar. Se realizó un bifactorial teniendo en cuenta los factores método de medición-compuesto a probar, con prueba de Duncan al 5 %.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del efecto quimiotáctico ejercido por los diferentes compuestos se muestra en la Tabla I.

El exudado de semillas ejerció un fuerte efecto quimioatrayente sobre la bacteria, lo que coincide con trabajos anteriores realizados con otras cepas de *B. japonicum* y otras variedades de soya (Kape, Parniske and Werner, 1991), difiriendo significativamente con el efecto ejercido por los ácidos orgánicos.

El hecho de que los exudados contengan un amplio rango de compuestos orgánicos (Curl y Truelove, 1986) justifica su alto efecto atrayente sobre este microorganismo de nutrición quimioorganotrófica.

La Figura 1 muestra el efecto de diferentes diluciones del exudado de semillas sobre el número de bacterias atraídas. La respuesta quimiotáctica de la bacteria aumentó proporcionalmente con el incremento de la concentración del exudado, encontrándose la mayor atracción con la menor dilución ensayada.

Tabla I. Efecto quimiotáctico de diferentes compuestos sobre la cepa B. japonicum ICA 8001

Compuesto	Respuesta quimiotáctica
Malonato de sodio	1.2 b
Ácido succínico	2.3 b
Exudado de semillas	12.3 a
ES $\bar{x}$	1.07
$p<0.001$	

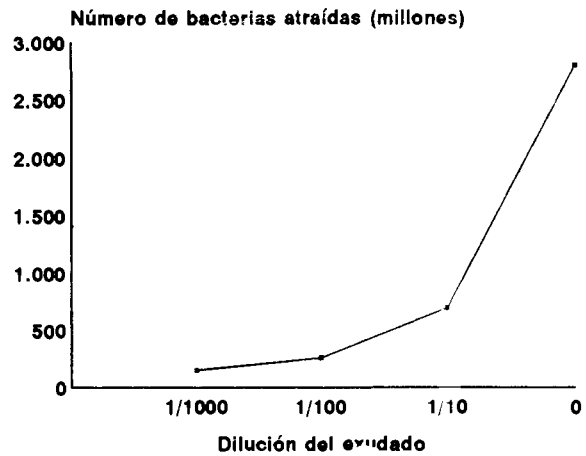


Figura 1. Efecto de diferentes diluciones del exudado de semillas sobre la quimiotaxis de B. japonicum

A pesar de que otros autores han encontrado un potente efecto quimioatrayente del ácido succínico y el malonato sobre *B. japonicum*, nuestros resultados muestran un efecto comparativamente débil con la cepa utilizada. Aunque no hubo diferencias significativas entre el efecto del malonato y el ácido succínico, este último mostró como tendencia un poder de atracción ligeramente superior, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Barbour, Hattermann y Stacey (1991).

En la Figura 2 se comparan los resultados obtenidos mediante el conteo de UFC.mL^{-1} totales en cámara de Neubauer y conteo de viables en placas.

Para ambas determinaciones el número de bacterias retenidas dentro de cada capilar osciló entre 10^8 y 10^9 UFC.mL^{-1}, alcanzando valores de 10^{10} UFC totales en los capilares cargados con el exudado de las semillas.

El análisis bifactorial mostró que no existe interacción entre los factores estudiados, siendo la respuesta quimiotáctica obtenida por los diferentes compuestos, independiente del método de conteo utilizado. Sí hubo diferencias entre los valores obtenidos para un mismo compuesto entre los dos métodos de conteo, lo cual es lógico.

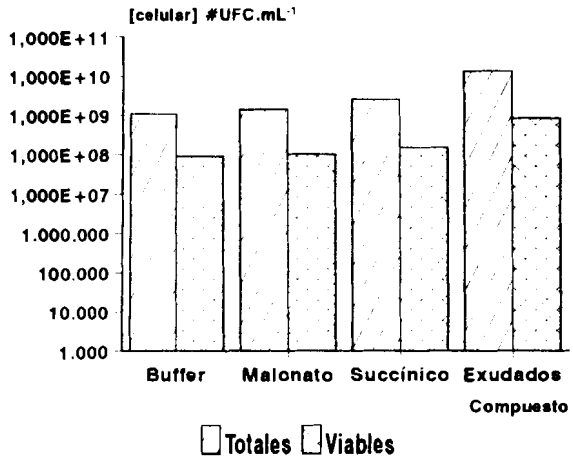


Figura 2. Determinación del número de bacterias atraídas por cada compuesto mediante conteo de totales y viables

La proporcionalidad entre ambos métodos valida la utilización del método de conteo en cámara en el estudio de este fenómeno, que es mucho más rápido y sencillo que el de conteo en placas, además del ahorro en medio de cultivo que ello significa.

En ambos experimentos resultó considerable la variación en el número de bacterias por capilar para un mismo atrayente.

REFERENCIAS

Barbour, W., D. Hattermann y G. Stacey. Chemotaxis of Bradyrhizobium japonicum to soybean exudates. Applied and Environmental Microbiology 57(9):2635-2639, 1991.

Curl, E. A. Root exudates. /E. A. Curl, B. Truelove.- Berlin : Springer-Verlag, 1986.- 92 p.

Dibut, B. Obtención de un bioestimulador del crecimiento y el rendimiento vegetal para el beneficio de la cebolla (Allium cepa L.). Tesis de grado (Dr. en Ciencias Agrícolas); INCA,1996.

Hernández, Ana N. Estudio de rizobacterias para la biofertilización del cultivo del maíz. /Ana N. Hernández.- (Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas); INCA, 1996.

Kape, R., M. Parsniske y D. Werner. Chemotaxis and nod gene activity of bradyrhizobium japonicum in response to hydroxycinnamic acids and isoflavonoids. Applied and Enviromental Microbiology 57(1):316-319, 1991.

Long, Sharon. Rhizobium symbiosis: Nod factors in perspective. The Plant Cell 8:1885-1898, 1996.

Metting, F. B. Soil microbial ecology. Application in agricultural and environmental management. / F. B. Metting.- New York : Marcel Dekker, 1993.- 450 p.

Michiels, J. y J. Vanderleyden. Molecular basis of the establishment and functioning of a N2-fixing root nodule. World Journal of Microbiology and Biotecnology 10, 612-630, 1994.

Nápoles, María C. y Ana C. Velazco. Quimiotaxis planta-bacteria. INCA. Boletín 15, 1993.

Prikryl, Z. y V. Vancura. Root exudates of plants. VI. Wheat root exudation as dependent on growth, concentration gradient of exudates and the presence of bacteria. Plant and Soil 57, 69-83, 1980.

Schultzer, M. /et al./. Cell and molecular biology of Rhizobium-plant interactions. International Review of cytology 156:1-75, 1994.

Spaink, H. P. The Molecular basis of the host specificity of Rhizobium bacteria. Ant. van Leeuwenhoek 65:81-98, 1994.

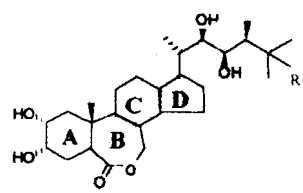
Vincent, J. M. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. /J. M. Vincent.- Oxford : Blackwell Scientific Publications, 1970.

Recibido: 26 de enero de 1998
Aceptado: 6 de abril de 1998

INCA

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

LOS BRASINOESTEROIDES
Y
SU ACTIVIDAD BIOLÓGICA



Folleto en venta en nuestro centro por $ 5.00

Miriam Núñez Vázquez

Octubre, 1996