

COMUNICACIÓN

Exudados radicales de alfalfa (*Medicago sativa* L.) en condiciones de estrés salino. Expresión de genes *nod* en *Rhizobium*

Andrés, J.A., N.S. Correa y S.B. Rosas

RESUMEN

El estrés salino puede interferir con la transcripción de los genes de nodulación (*nod*) en *Rhizobium* al modificar la composición de exudados radicales o la respuesta de rizobia.

Exudados de raíces de alfalfa (*Medicago sativa* L.) crecidas en NaCl 0,5 % fueron colectados durante 6 días y analizados por TLC. La inducción de la transcripción de los genes *nod* de rizobia se realizó mediante el empleo de un vector de expresión con la fusión *nod-lacZ*.

Los resultados indican que los perfiles de exudados de las plantas tratadas difieren en tiempo con los controles, y que este retardo inducido por la concentración salina no afecta la capacidad inductora de los genes *nod*.

Palabras clave: Alfalfa, exudados radicales, estrés salino, *Rhizobium*, genes *nod*, inducción.

Andrés, J.A., N.S. Correa y S.B. Rosas, 1995. Root exudates of alfalfa (*Medicago sativa* L.) under salt stress conditions. Expresión of *nod* genes in *Rhizobium*. Agriscientia XII : 87-91.

SUMMARY

A stress condition such as salinity may interfere with the transcription of nodulation (*nod*) genes in *Rhizobium* by modifying the composition of root exudates or the response of rhizobia.

Root exudates of alfalfa (*Medicago sativa* L.) grown in 0,5 % NaCl were taken during 6 days and analysed by TLC. The induction of transcription of rhizobia *nod* genes was performed using an expression vector with the fusion *nod-lacZ*.

Results indicate that exudate patterns of treated plants differ from the controls in time, and that this delay induced by salt concentration does not affect the induction capacity of *nod* genes.

Keywords: Alfalfa, root exudates, saline stress, *Rhizobium*, *nod* genes, induction

J.A. Andrés, N.S. Correa y S.B. Rosas. *Orientación Fisiología Vegetal. Departamento de Ciencias Naturales. Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Río Cuarto. Enlace Rutas 8 y 36 Km. 601. CP 5800, Río Cuarto, Córdoba, Argentina.*

En estados iniciales de la simbiosis leguminosa-(Brady)*Rhizobium*, compuestos flavonoides presentes en los exudados de semillas y raíces de leguminosas, desencadenan la expresión de una serie de genes (denominados *nod* y *nodI*) que portan los rizobios en sus plásmidos *Sym* (género *Rhizobium*) o a nivel cromosomal (género *Bradyrhizobium*), dando lugar al comienzo del proceso de nodulación. Dentro de los genes *nod* se encuentra el gen *nodD*, de naturaleza constitutiva y los *nod A, B, C, I, J* (comunes), altamente conservados en la mayoría de los rizobios y funcionalmente intercambiables.

Los compuestos responsables de la inducción de los genes *nod* son flavonas, flavononas, isoflavonoides y chalconas derivados del metabolismo de fenilpropanoides (Peters *et al.*, 1986; Kosslak *et al.*, 1987). Las antocianinas también han sido reportadas como inductores (Hungria *et al.*, 1991).

Los compuestos flavonoides liberados por leguminosas pueden afectar la nodulación de raíces por:

- promoción del movimiento de los rizobios hacia la planta (quimiotaxis) (Caetano-Anollés *et al.*, 1988; Phillips y Tsai, 1992)
- inducción de la transcripción de genes de nodulación bacterianos (Redmond *et al.*, 1986; Peters y Long, 1988; Maxwell *et al.*, 1989; Hartwig *et al.*, 1989, 1990; Maxwell y Phillips, 1990)
- modulando la tasa de crecimiento de microorganismos rizosféricos (Hartwig *et al.* 1991; Phillips y Tsai, 1992).

Cualquier perturbación ejercida en el medio ambiente rizosférico va a incidir en mayor o en menor medida sobre esta asociación.

Entre los parámetros que afectan la fisiología de los rizobios y su interacción con la planta huésped se pueden citar condiciones de estrés hídrico (Al-Rashidi *et al.*, 1982), salinidad (Mohammad *et al.*, 1991), pH (Aurag y Sasson, 1992; Howieson *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1993) temperaturas extremas (Michiels *et al.*, 1994) y agroquímicos (Graham *et al.*, 1980; Rennie y Dubetz, 1984; Martensson, 1992; Marenco *et al.*, 1993; Revellin *et al.*, 1993; Yueh y Hensley, 1993).

En el presente trabajo presentamos resultados preliminares sobre el perfil de exudados tipo fenilpropanoides de alfalfa, en condiciones de estrés salino y la capacidad de los mismos de inducir o no la transcripción de los genes *nod* comunes.

Aproximadamente 400 semillas de alfalfa (*Medicago sativa*, variedad pampeana) fueron escarificadas con ácido sulfúrico concentrado durante 15 minutos, superficialmente esterilizadas con etanol 70 % durante 3 minutos y lavadas 10 veces con agua

destilada estéril. Se cultivaron en condiciones de hidroponía en 500 ml de medio Jensen (CIAT, 1988) diluido 10 veces (Zaat *et al.*, 1987, 1988). Este medio fue suplementado con NaCl 0,5 % como condición de estrés salino.

La experiencia se llevó a cabo en cámaras de cultivo programadas 16 hs. luz y 28° C - 8 hs. oscuridad y 16° C respectivamente, con intensidad lumínica 220 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{seg}^{-1}$.

A las 4 hs y luego cada 24 hs, durante 6 días se retiraron 30 ml del medio en forma estéril.

Las muestras de exudados fueron procesadas por separado, concentradas por evaporación al vacío y re-extraídas con 1 ml de etanol 95 % para ser cromatografiadas en capa delgada.

50 μl de los extractos se sembraron en placas de sílicagel 60 F-254 DC Alufolien (Merck), en bandas de 15 mm con espacio de 10 mm entre dos muestras. Como controles se sembraron 5 μl de soluciones de naringin y naringenina (1 mg/ml en etanol). Como sistema de solvente se utilizó isopropanol-amoníaco-agua 80:5:15. Las placas se revelaron con luz UV a 254 y 350 nm.

Se cuenta con una serie de cepas isogénicas de *Rhizobium* (donadas por los Dres. S.A.J. Zaat y R.J.H. Okker, Department of Plant Molecular Biology, University of Leiden, Holanda) derivadas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* cuyo plásmido *Sym* ha sido curado, conteniendo además un plásmido Inc P con genes *nodD* de diferente origen y un plásmido Inc Q con el promotor *nod A, B, C, I, J* clonado antes del gen estructural *lacZ* de *Escherichia coli*. (Tabla 1).

Estas cepas constituyen una herramienta genética que permitirá demostrar si ciertos tipos de exudados son capaces de activar o inhibir la transcripción de los genes *nod* comunes midiendo actividad β -galactosidasa. Se cultivan como cepas de *Rhizobium* a 28° C en medio extracto de levadura-manitol (Vincent, J., 1975) suplementado con los antibióticos tetraciclina 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, estreptomycin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y cloramfenicol 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para el mantenimiento de los plásmidos.

Tabla 1. Cepas isogénicas empleadas en el bioensayo de inducción de genes *nod*.

Designación	Fondo	Fuente de <i>nod D</i>
RBL 5280	<i>R. leg. bv. trifolii</i>	<i>R. leg. bv. viciae</i>
RBL 5283	<i>R. leg. bv. trifolii</i>	<i>R. leg. bv. trifolii</i>
RBL 5284	<i>R. leg. bv. trifolii</i>	<i>R. meliloti</i>

Los exudados se utilizaron sin purificar y ajustándose el pH a 7 con NaOH inmediatamente antes del experimento. 500 µl de exudado se combinaron con 500 µl del cultivo bacteriano (DO_{600 nm} 0,1-0,3) y se incubaron a 28° C durante 3 hs y 24 hs (tiempo de inducción) (Howieson *et al.*, 1992).

La determinación de actividad β-galactosidasa se realizó esencialmente como describió Miller, 1972.

Paralelamente se realizó un experimento en que se probó la capacidad inductora del flavonoide naringenina, a fin de establecer una comparación con un compuesto flavonoide purificado y cuya presencia ha sido indicada en exudados radicales de leguminosas con actividad inductora e inhibidora para la transcripción de genes *nod* de *Rhizobium/Bradyrhizobium* según la especie (Peters y Long, 1988; Zaat *et al.*, 1988)

En la cromatografía en capa delgada de componentes de exudados se obtuvo a las 4 hs un patrón de bandas con Rf 0,04, 0,13, 0,17, 0,24, 0,26 y 0,4 para los exudados controles. (Figura 1)

A las 24 hs se mantuvo este patrón y se agregó una banda con Rf 0,47. A las 48 hs el patrón estaba constituido por las bandas de Rf 0,04, 0,13, 0,17, 0,24, 0,26 y 0,47 agregándoseles 2 bandas con Rf 0,55 y 0,62 respectivamente, conformando el perfil definitivo.

La banda con Rf 0,26 predominó desde las 4 hs a las 96 hs, a partir de allí declinó en su emisión de fluorescencia, en tanto que la banda de Rf 0,55 predominó exclusivamente entre las 48 hs y las 96 hs. En el tratamiento de estrés salino (NaCl 0,5 %), a partir de las 4 hs se manifestó el patrón que corresponde a las 24 hs del control, observándose a las

24 hs del tratamiento el patrón completo (Rf 0,04, 0,13, 0,17, 0,24, 0,26, 0,4, 0,47, 0,55 y 0,62).

En la condición de estrés salino también se pudo observar que la banda de Rf 0,26 se mantuvo constante en su emisión de fluorescencia desde las 4 a las 144 hs en tanto que la de Rf 0,55 aumentó la emisión entre las 96 y 144 hs. Naringenina y naringin presentaron valores de Rf 0,61 y 0,17 respectivamente.

En los ensayos con exudados de alfalfa sometida al tratamiento de NaCl 0,5 % se observó una reducción en el sistema radical del 40 % siendo casi nulo el desarrollo en el tratamiento de NaCl 1 %, impidiendo la obtención de exudados (Andrés, 1994)

En el bioensayo de inducción de genes *nod* los resultados obtenidos con exudados de alfalfa colectados a las 72 hs y con un tiempo de incubación de 3 hs a 28° C (Figura 2) muestran una capacidad inductora con actividad β-galactosidasa superior a 23000 U en las cepas RBL 5280 y RBL 5284, y superior a 27000 U en la cepa RBL 5283.

En los controles sin exudado se obtuvieron entre 3000 U y 4500 U (nivel basal de actividad β-galactosidasa para esas cepas).

Cuando el tiempo de inducción se extendió de 3 a 24 hs se obtuvieron similares resultados y la capacidad inductora de exudados colectados a diferentes horas (4, 24 y 96 hs) prácticamente no difieren de lo observado a las 72 hs. (Datos no mostrados).

En el experimento en que se ensayó la capacidad inductora del flavonoide naringenina (Figura 3), se logró una buena inducción en las cepas RBL 5280 y RBL 5283, en tanto que en RBL 5284 no hubo diferencia apreciable entre control sin naringenina y cepa en contacto con el flavonoide.

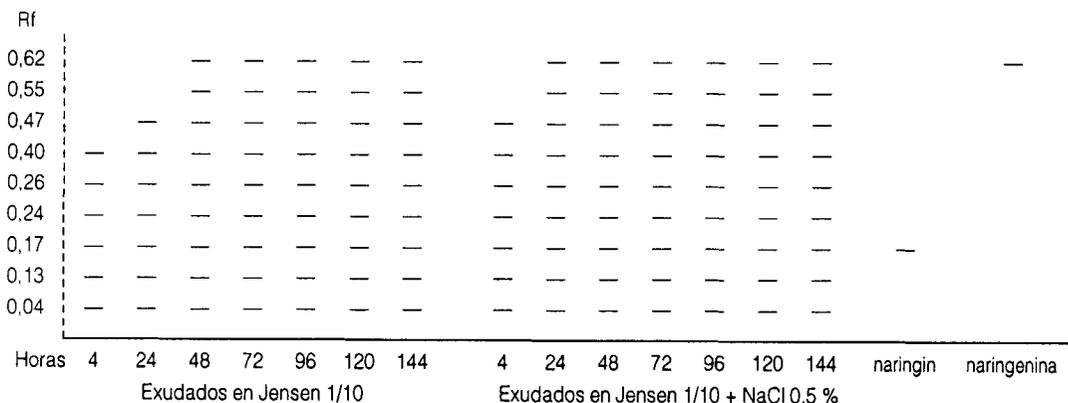


Figura 1. Análisis en cromatografía en capa delgada de componentes de exudados de alfalfa obtenidos en diferentes tiempos en situaciones control y estrés salino.

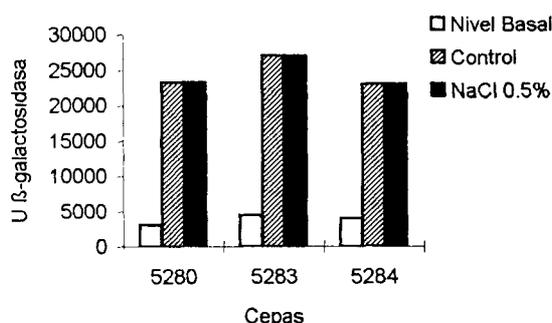


Figura 2. Bioensayo de inducción de genes *nod* por exudados de alfalfa de 72 hs en medio Jensen 1/10 (Control) y en medio Jensen 1/10 + 0,5 % NaCl (Estrés Salino).

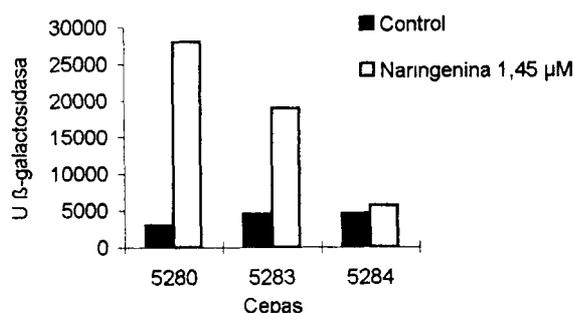


Figura 3. Bioensayo de inducción de genes *nod* por el flavonoide naringenina

Se probaron distintas concentraciones de Naringenina (0,2 μg, 1 μg, 2 μg y 6 μg) para 0,5 ml de cultivo bacteriano, y en los 4 casos se obtienen resultados similares, por lo cual se infiere que la menor concentración empleada es suficiente para una buena inducción.

Cuando se ensayó la capacidad inductora de los exudados de plántulas de alfalfa sometidas a estrés salino no se apreciaron modificaciones significativas respecto al control, lo que indica que la salinidad no afectaría los flavonoides comprometidos en la inducción de genes *nod* en la concentración ensayada.

El flavonoide luteolin es mencionado comúnmente como el inductor de genes *nod* en *Rhizobium meliloti* (Peters *et al.*, 1986), no obstante se han detectado otros inductores para la misma cepa, como chrysoeriol (Hartwig *et al.*, 1990), que junto con luteolin es secretado por semillas germinando, y 4',7-dihydroxiflavona, 4',7-dihydroxiflavanona y 4,4'-dihydroxi-2'-metoxichalcona (Maxwell *et al.*, 1989) liberados por raíces de alfalfa.

En nuestras investigaciones, la cepa RBL 5284, que porta el gen *nodD* de *Rhizobium meliloti* presentó inducción con los distintos exudados pero no en presencia de naringenina, lo que coincide con lo citado por la bibliografía (Peters y Long, 1988).

Por su parte, la cepa RBL 5280, que porta el *nodD* de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* presenta una alta inducción por naringenina, flavonoide éste que ha sido reportado como uno de los principales inductores para *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (Zaat *et al.*, 1987).

Bajo condiciones de estrés, tal como acidez, se ha reportado interferencia en la transcripción de genes de nodulación en *Rhizobium* spp. por modificación en la producción de exudados (Howieson *et al.*, 1992)

De los presentes ensayos podemos concluir que en el tratamiento con NaCl 0,5 % las modificaciones observadas a nivel de exudados radicales (flavonoides) no alteran la capacidad de inducción de los genes *nod* en *Rhizobium*, no siendo responsables de la ausencia o retardo de la nodulación bajo estrés salino.

Ello no impide que puedan modificarse los metabolitos Nod, productos de dichos genes involucrados en la interacción planta-microorganismo.

Se están llevando a cabo análisis de TLC y HPLC con flavonoides controles con el fin de establecer la composición de los exudados y determinar específicamente el papel de distintos componentes sobre la transcripción de los genes *nod* comunes.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Consejo de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Provincia de Córdoba (CONICOR), el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Río Cuarto (SECYT-UNRC).

BIBLIOGRAFÍA

- Al-Rashidi R.K., T.E. Loynachan and L.R. Frederick, 1982. Desiccation tolerance of four strains of *Rhizobium japonicum*. Soil. Biol. Biochem. 14, 489-493.
- Andrés, J.A., 1994. Informe Final Beca Formación 2 Nivel del Consejo de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Provincia de Córdoba (CONICOR).

- Aurag, J. and A. Sasson, 1992. Tolerance of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* to acidity and drought. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 8, 532-533.
- Chen, H., A. E. Richardson and B.G. Rolfe, 1993. Studies of the physiological and genetic basis of acid tolerance in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1798-1804.
- CIAT, 1988. Manual de Métodos de Evaluación, Selección y Manejo FBN. Proyecto Especial CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Cap. 9, pp. 5. Colombia
- Caetano-Anollés, G., D. K. Christ-Estes and W.D. Bauer, 1988. Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* to the plant flavone luteolin requires functional nodulation genes. *J. Bacteriol.* 170, 3164-3169
- Graham, P.H., G. Ocampo, L.D. Ruiz and A. Duque, 1980. Survival of *Rhizobium phaseoli* in contact with chemical seed protectants. *Agronomy Journal* 72, 625-627.
- Hartwig, U.A., C.A. Maxwell, C.M. Joseph and D.A. Phillips, 1989. Interaction among flavonoid *nod* gene inducers released from alfalfa seeds and roots. *Plant Physiol.* 91, 1138-1142
- Hartwig, U.A., C.A. Maxwell, C.M. Joseph and D.A. Phillips, 1990. Chrysoeriol and Luteolin released from Alfalfa seeds induce *nod* genes in *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol.* 92, 116-122.
- Hartwig, U.A., C.M. Joseph and D.A. Phillips, 1991. Flavonoids released naturally from alfalfa seeds enhance growth rate of *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol.* 95, 797-803.
- Howieson, J.G., A.D. Robson and L.K. Abbott, 1992. Acid-tolerant species of *Medicago* produce root exudates at low pH which induce the expression of nodulation genes in *Rhizobium meliloti*. *Aust. J. Plant Physiol.* 19, 287-296
- Hungria, M.A., C.M. Joseph and D.A. Phillips, 1991. Anthocyanidins and Flavonols, Major *nod* Gene Inducers from a Black-Seeded Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Physiol.* 97, 751-758.
- Kosslak, R.M., R. Bookland, J. Barkei, H.E. Paaren and E.R. Appelbaum, 1987. Induction of *Bradyrhizobium japonicum* common *nod* genes by isoflavones from *Glycine max*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 7428-7432.
- Marenco, R.A., N. Fernandes Lopes and P.K. Mosquim, 1993. Nodulation and nitrogen fixation in soybeans treated with herbicides. *R. Bras. Fisiol. Veg.* 5, 121-126.
- Martensson, A.M., 1992. Effects of agrochemicals and heavy metals on fast-growing Rhizobia and their symbiosis with small-seeded legumes. *Soil Biol. Biochem.* 24, 435-445
- Maxwell, C.A., U.A. Hartwig, C.M. Joseph and D.A. Phillips, 1989. A chalcone and two related flavonoids released from Alfalfa roots induce *nod* genes of *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol.* 91, 842-847.
- Maxwell, C.A. and D.A. Phillips, 1990. Concurrent synthesis and release of *nod*-gene-inducing flavonoids from Alfalfa roots. *Plant Physiol.* 93, 1552-1558
- Michiels, J., C. Verreth and J. Vanderleyden, 1994. Effects of temperature stress on bean nodulating *Rhizobium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1206-1212.
- Miller, J., 1972. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory. Press: Cold Spring Harbor, N.Y. pp. 352-355.
- Mohammad, R.M., M. Akhavan-Kharazian, W.F. Campbell and M.D. Rumbaugh, 1991. Identification of salt and drought tolerant *Rhizobium meliloti* L. strains. *Plant and Soil* 134, 271-276.
- Peters, N.K., J.W. Frost and S.R. Long, 1986. A Plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Science* 233, 977-980.
- Peters, N.K. and S.R. Long, 1988. Alfalfa roots exudates and compounds with promote or inhibit induction of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Plant Physiol.* 88, 396-400.
- Phillips, D.A. and S.M. Tsai, 1992. Flavonoids as plant signals to rhizosphere microbes. *Mycorrhiza* 1, 55-58
- Redmond, J.W., M. Batley, M.A. Djordjevic, R.W. Innes, P.L. Kuempel and B.G. Rolfe, 1986. Flavones induces expression of nodulation genes in *Rhizobium*. *Nature* 323, 632-634.
- Rennie, R.J. and S. Dubetz, 1984. Effect of fungicides and herbicides on nodulation and N₂ fixation in soybean fields lacking indigenous *Rhizobium japonicum*. *Agronomy Journal* 76, 451-454.
- Revellin, C., P. Leterme and G. Catroux, 1993. Effect of some fungicide seed treatments on the survival of *Bradyrhizobium japonicum* and on the nodulation and yield of soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Biol. Fertil. Soil* 16, 211-214
- Vincent, J.M., 1975. Manual Práctico de Rhizobiología. Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina. Cap. 1, pp. 4-5.
- Yueh, L.Y. and D.L. Hensley, 1993. Pesticide effect on acetylene reduction and nodulation by soybean and lima bean. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 118, 73-76.
- Zaat, S.A.J., Wijffelman, C.A., Spaink, H.P., Van Brussel, A.A.N., Okker, R.J. and Lugtenberg, B.J.J., 1987. Induction of the *nodA* promoter of *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1J1 by plant flavonones and flavones. *Journal of Bacteriology* 169, 198-204
- Zaat, S.A.J., Wijffelman, C.A., Mulders, I.H.M., Van Brussel, A.A.N. and Lugtenberg, B.J.J., 1988. Root exudates of various host plants of *Rhizobium leguminosarum* contain different sets of inducers of *Rhizobium* nodulation genes. *Plant Physiol* 86, 1298-1303