

Efecto de lipopolisacáridos de *Azospirillum brasilense* Sp245 sobre el crecimiento de plántulas de pepino

Celia Morales Ascencio, Elda Castro Mercado, Ernesto García Pineda

Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, UMSNH

Resumen

En este trabajo se analizó el efecto de los lipopolisacáridos (LPS) de *Azospirillum brasilense* Sp245 sobre el crecimiento, el contenido de fenoles totales y la actividad de la enzima peroxidasa (POD) *in situ* en plántulas de pepino (*Cucumis sativus*), crecidas en invernadero. Los LPS fueron asperjados foliarmente en dos concentraciones (10 y 100 µg/ml) cada semana durante 2 meses, después de 5 días de germinación. Los parámetros se evaluaron en plántulas de 3 meses de edad. Ambas concentraciones incrementaron la longitud total de las plántulas en relación a los controles no tratados, pero sólo la concentración de 10 µg/ml incrementó de manera importante (42% sobre el control) el peso fresco total. El contenido de fenoles totales se incrementó notablemente en la hoja con ambas concentraciones de LPS, 69% y 80% sobre el control con las concentraciones de 10 y 100 µg/ml, respectivamente. Sólo la concentración de 100 µg/ml estimuló la actividad *in situ* de la POD. Los resultados sugieren que los LPS tienen la capacidad de estimular respuestas asociadas con el crecimiento y la defensa en plántulas de pepino.

Palabras clave. *Azospirillum brasilense*, pepino, rizobacteria, fenoles, peroxidasa

Abstract

Effect of *Azospirillum brasilense* lipopolysaccharides on the cucumber plant growth.

The effect of *Azospirillum brasilense* Sp245 lipopolysaccharides (LPS) on plant growth, total phenols content, and *in situ* peroxidase (POD) anzyme activity on cucumber seedlings (*Cucumis sativus*) was analyzed in this work. Five days after germination, LPS (10 y 100 µg/ml) were sprayed in the foliage every week during 2 months. Parameters were evaluated in plants of 3 months old. Both concentrations of LPS increased total length of the plants related to untreated controls, however only the concentration of 10 µg/ml notably increased total fresh weight (42% over the control). Total phenols content was highly increased in leaf with both LPS concentrations (69% and 80% to 10 and 100 µg/ml, respectively). Only the LPS concentration of 100 µg/ml stimulated the *in situ* POD activity. The results suggest that the LPS have the hability to stimulate responses associated with growth and defense in cucumber seedlings.

Keywords: *Azospirillum brasilense*, cucumber, rhizobacteria, phenols, peroxidase

Introducción

Las bacterias que se asocian a las raíces de las plantas se conocen como rizobacterias. Una de las respuestas estimuladas por las rizobacterias es el incremento en la actividad de las enzimas peroxidasas (POD). Las POD son oxidoreductasas que usan peróxido de hidrógeno (H₂O₂) como un aceptor de electrones tomándolos de varios donadores, para reducirlo a agua (Penel y Dunand 2009). Estas enzimas son codificadas por múltiples genes, se localizan principalmente en la pared celular, el apoplasto y en las vacuolas; además de estar involucradas en la lignificación de la pared celular (Deepak et al. 2007; Passardi et al. 2004). Uno de los sustratos utilizados por las POD son los fenoles. Químicamente, los compuestos fenólicos son sustancias que poseen un anillo aromático, con uno o más grupos hidroxilo. Poseen actividad antioxidante por lo que protegen a las células contra el daño oxidativo (Scalbert et al. 2005).

El género *Azospirillum* es un grupo de rizobacterias de los más estudiados. Su inoculación en las plantas estimula el crecimiento del sistema radical, además de inducir resistencia a agentes patógenos y proveer de elementos necesarios como el nitrógeno. Esta bacteria produce fitohormonas que estimulan el crecimiento

vegetal, lo que permite un desarrollo más económico y saludable de los cultivos (Parra y Cuevas, 2002). Pertenecen a un grupo de bacterias conocidas como Gram negativas y a la subclase α -proteobacteria, que alberga un gran número de bacterias simbiotes asociadas a plantas. Se han aislado de la rizósfera de gramíneas, particularmente de cultivos de importancia económica como el maíz, el trigo y el arroz y desde climas tropicales hasta templados (Patriquin et al. 1983). El mecanismo para promover el crecimiento se ha atribuido a su capacidad de producir y excretar fitohormonas como las auxinas, citocinas y giberelinas (Spaepen et al. 2011), que son muy importantes para el desarrollo de la planta.

Las bacterias del género *Azospirillum* tienen una membrana externa constituida por lipopolisacáridos (LPS), los cuales son los componentes mayoritarios. Por la localización de estas moléculas, la membrana externa, son importantes mediadores de las interacciones entre las bacterias con su medio ambiente y otros organismos, entre ellos las plantas (Matora et al. 2001). También intervienen en la interacción entre las plantas y las bacterias simbiotes o patógenas. En *Rhizobium*, los LPS son esenciales para que las bacterias colonicen la raíz de las leguminosas, y en *Agrobacterium* son factores de virulencia que intervienen en la adhesión a las raíces de la planta hospedera (Ormeño, 2005). Los LPS son moléculas complejas que se dividen estructuralmente en tres dominios: lípido A, núcleo oligosacárido (NO) y antígeno O. El lípido A está constituido de un disacárido al que están unidos ácidos grasos, los cuales anclan la molécula a la membrana externa. El NO está formado por una cadena corta de monosacáridos unida al lípido A. Finalmente, el antígeno O es un polisacárido constituido por unidades de monosacáridos u oligosacáridos repetidos, de naturaleza variable y unido al NO. Es el dominio más distal del LPS (Ormeño, 2005).

Los LPS se han asociado con la virulencia de muchos patógenos Gram negativos como moléculas clave intermediarias en las asociaciones huésped-microbio (Munford 2008). En plantas, estimulan la respuesta inmune (Erbs y Newman, 2012). LPS de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal estimulan a las plantas a responder más rápido y más fuerte a subsecuentes infecciones con microorganismos patógenos. La composición del antígeno O de los LPS varía entre las diferentes cepas de una misma especie y, por lo tanto, también entre diferentes especies (Munford 2008). Mientras que las respuestas de defensa de las plantas a LPS de bacterias fitopatógenas se han caracterizado con detalle (Erbs y Newman, 2003), existe poca información en relación a los efectos de LPS de bacterias benéficas sobre las plantas. Uno de estos pocos estudios reporta que plantas de

trigo asperjadas con LPS de *A. brasilense* incrementaron la longitud de la hoja y el número de espigas (Chávez-Herrera et al. 2018). Sin embargo, se desconoce si su efecto sobre el crecimiento y la respuesta de defensa es general en plantas.

Considerando lo anterior, en este trabajo se investigó el efecto de los LPS de *A. brasilense* sobre plantas de pepino crecidas en invernadero.

Materiales y métodos

La cepa de *Azospirillum brasilense* Sp245 fue proporcionada por la Dra. Gladys Alexandre, del Departamento de Bioquímica y Biología Celular Molecular de la Universidad de Tennessee, USA. Las semillas de pepino se obtuvieron comercialmente.

La cepa de *A. brasilense* Sp245 se mantuvo en cajas Petri conteniendo medio LB sólido. Se incubaron por 24 h a 37°C, pasado el tiempo se mantuvo en refrigeración a 4°C hasta su siguiente resiembra.

Extracción de lipopolisacáridos

La extracción de lipopolisacáridos se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por Renukadevi et al. (2012). Un cultivo de bacterias de 24 h de crecimiento se centrifugó durante 10 min a 3,200 rpm, para obtener el paquete celular. La muestra se resuspendió por agitación en un vortex en 5 ml de agua destilada estéril y 5 ml de fenol equilibrado con Tris-HCl 10 mM pH 8. La muestra se incubó a 65°C durante 25 min en agitación constante y posteriormente se incubó a 4°C durante 24 h. La muestra se centrifugó a 4,300 rpm durante 10 min. Se recuperó la fase acuosa que contienen los LPS (fase superior) y se dializó con agua destilada durante 3 días, cambiando el agua cada 24 h. La muestra dializada se precipitó con acetato de sodio 0.15 M y etanol al 96%, en una proporción de 1:4. Se dejó en reposo durante 24 h, a una temperatura de -20°C. Finalmente, se centrifugó durante 20 min a 4,300 rpm y se eliminó el sobrenadante, y el tubo con la muestra se secó a temperatura ambiente. Los LPS se resuspendieron en 500 µl de agua destilada, y se almacenaron a 4°C.

Desinfección y germinación de semillas de pepino

Las semillas se lavaron con 1% de dodecil sulfato de sodio (SDS) durante 3 min y se lavaron 3 veces con agua destilada estéril. Después se desinfectaron con 1% de cloro durante 5 min y se lavaron 3 veces con agua destilada estéril.

Se germinaron en cajas Petri que contenían algodón y papel filtro estériles, y humedecidos previamente con 10 ml de agua destilada estéril. Las cajas se incubaron en oscuridad a 28°C, durante 4 días.

Tratamiento de las plántulas con LPS

Plántulas de 4 días de germinación se sumergieron, cubriendo sólo la raíz, en una solución con diferentes concentraciones de LPS (10 y 100 µg/ml), o con 10⁶ UFC/ml de *A. brasilense*, y se incubaron durante 24 h. Después se pasaron a macetas conteniendo aprox. 1 kilo de tierra preparada (1 porción de Peat Moss Turba y 1 porción de tierra de invernadero) y esterilizada en autoclave a 121°C, durante 15 min. Se colocaron 10 plantas por maceta, con 5 macetas para cada tratamiento. Las macetas se mantuvieron en invernadero a un rango de temperatura de 29°C – 32°C, y se regaron a capacidad de campo cada tercer día. Las plántulas se asperjaron una vez a la semana con 10 ml de LPS, o con 10 ml de agua destilada para los controles. Se utilizaron dos concentraciones de LPS, 10 y 100 µg/ml. El experimento fue finalizado a los 3 meses de crecimiento y se midieron parámetros de crecimiento como longitud total, peso fresco total, peso fresco de la raíz y peso fresco del follaje.

Cuantificación de fenoles totales

Los fenoles totales fueron cuantificados de acuerdo al procedimiento reportado por Abdel-Aal y Rabalski (2008) 0.5 g de tejido se pulverizaron con nitrógeno líquido y se agregó 1 ml de metanol al 50% en agua. Las muestras se mantuvieron en agitación durante 1 h, a temperatura ambiente. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 min y se separó el sobrenadante para cuantificar los fenoles. Para la cuantificación se tomaron 250 µl del sobrenadante y se mezclaron con 250 µl del reactivo de Folin-Ciocalteu más 500 µl de carbonato de sodio (Na₂CO₃) al 20 %. Se agitó en vortex, y se incubó en oscuridad durante 30 min. Las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm durante 5 min y se leyó la absorbencia a 725 nm (Beckman DU 530 Spectrophotometer).

Detección de peroxidasa por *tissue printing*

El procedimiento se aplicó de acuerdo a Avdiushko et al. (1993). Se desprendió una hoja de la planta y se pasó ligeramente por una lija. Se colocó por la parte lijada sobre una membrana de nitrocelulosa y encima de la hoja se colocó un peso de 1 kg durante 10 min. La membrana se incubó durante 10 min en un buffer de fosfato de sodio 10 mM, pH 6.0. La actividad de peroxidasa se detectó incubando de nuevo

la membrana en buffer de fosfato conteniendo 0.6 g por ml de 2,6-diclorofenol indofenol más 0.1 M de peróxido de hidrógeno.

Análisis estadístico

Los resultados experimentales se reportaron como media $\pm$ DE. A los datos se les realizó un ANDEVA y la prueba de comparación de medias de Tukey para muestras independientes ($p \leq 0.05$).

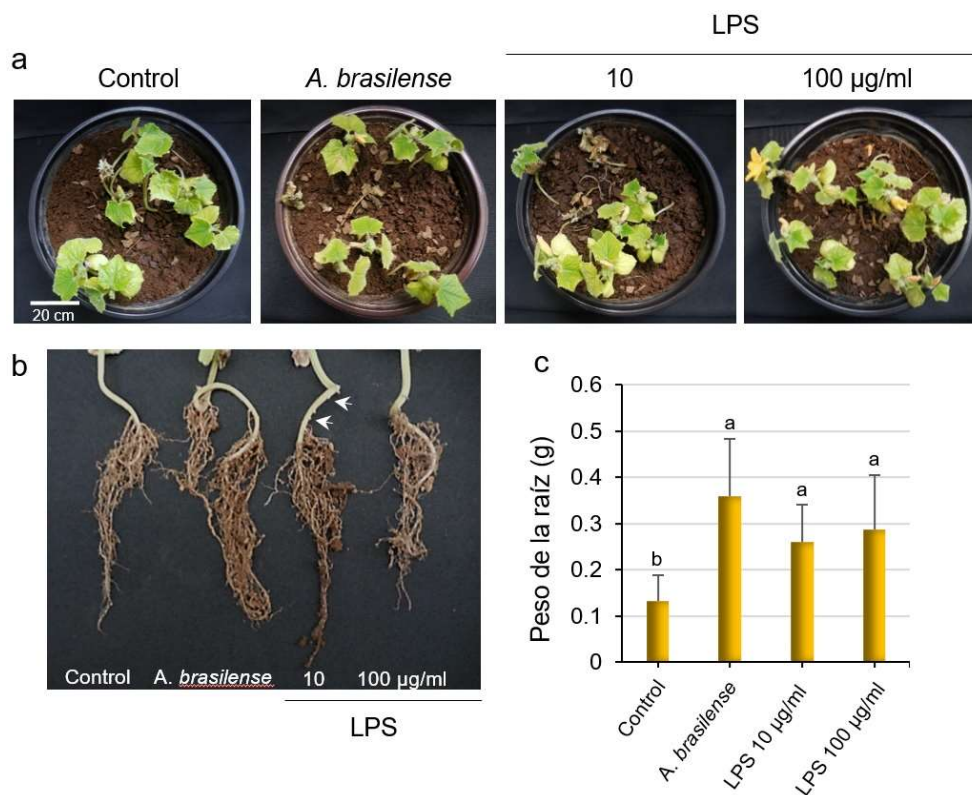


Figura 1. (a) Aspecto del follaje de plántulas de pepino tratadas con *A. brasilense* Sp245, y diferentes concentraciones de LPS. Se muestran plantas de 3 meses de edad. Efecto sobre el crecimiento (b), y sobre el peso (c) la raíz. Las flechas indican los primordios de raíces laterales. Las letras sobre las barras indican diferencias significativas entre los tratamientos.

Resultados

Las plántulas control y las tratadas mostraron una apariencia similar en crecimiento foliar, pero las plantas tratadas con la rizobacteria y las tratadas con los LPS tuvieron una ligera disminución en la coloración verde de las hojas, en relación con el control (Fig. 1a) y se observó una estimulación en la formación de primordios de raíces laterales, principalmente en las plantas tratadas con los LPS (Fig. 1b). El crecimiento en peso de la raíz fue mayor en los tratamientos (171%, 96% y 117% para la rizobacteria, 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$ de LPS, respectivamente) (Fig. 1c).

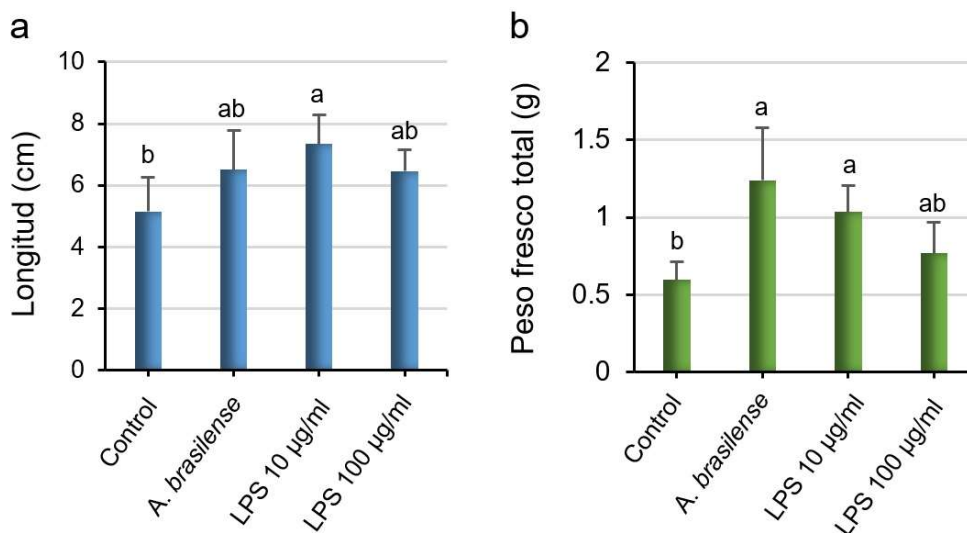


Figura 2. Efecto de los tratamientos sobre la longitud (a), y el peso fresco total (b) de plántulas de pepino. Los resultados son reportados como la media $\pm$ DE. N = 15. Las letras sobre las barras indican diferencias significativas entre los tratamientos.

Todos los tratamientos estimularon la longitud total de las plántulas (26%, 42%, y 25% para la rizobacteria, 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$ de LPS, respectivamente) (Fig. 2a) con una mayor estimulación (42%) observada para el tratamiento de LPS a la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$. No obstante, el peso total fue mayor en el tratamiento con la rizobacteria. El peso total de las plantas disminuyó con el incremento en la concentración de LPS aplicada (Fig. 2b). En adición, se observó un incremento en el peso del follaje con todos los tratamientos (80%, 77% y 43% para la rizobacteria, 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$ de LPS, respectivamente) (Fig. 3).

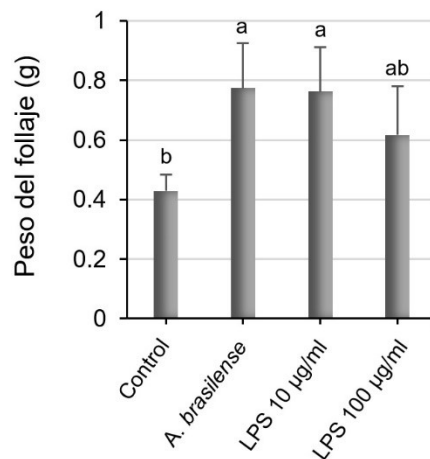


Figura 3. Efecto de los tratamientos sobre el peso del follaje de plántulas de pepino. Los resultados son reportados como la media $\pm$ DE. N = 15. Las letras sobre las barras indican diferencias significativas entre los tratamientos.

El análisis de fenoles totales mostró un incremento notable en las hojas de las plántulas (103%, 69% y 80% para la rizobacteria, 10 y 100 µg/ml de LPS, respectivamente) (Fig. 4a). En la raíz la cantidad de fenoles de los diferentes tratamientos mostró valores similares al control (Fig. 4b).

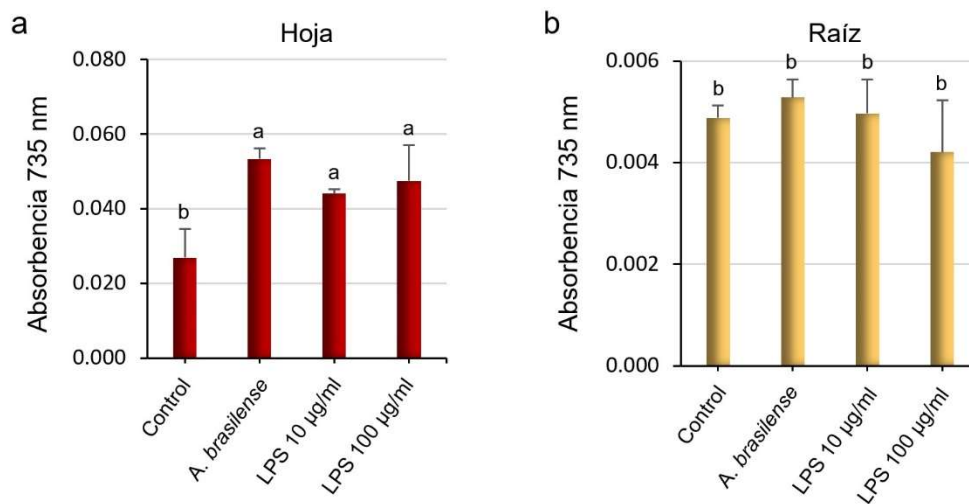


Figura 4. Contenido de fenoles totales en hoja (a) y en raíz (b) de plántulas de pepino en respuesta a los diferentes tratamientos. Los resultados son reportados como la media $\pm$ DE. N = 15. Las letras sobre las barras indican diferencias significativas entre los tratamientos.

Efecto de lipopolisacáridos de Azospirillum brasilense Sp245 sobre el crecimiento de plántulas de pepino

El análisis *in situ* de la peroxidasa en las hojas mostró que su actividad se incrementó sólo con el tratamiento de 100 µg/ml de LPS, y se localizó de forma específica en la nervadura de la hoja (Fig. 5).

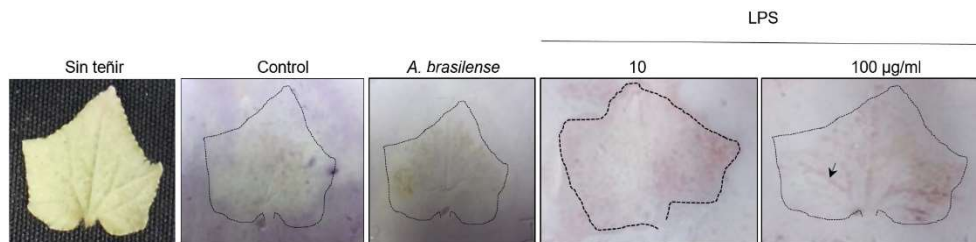


Figura 5. Localización por *tissue printing* de la actividad de POD en hojas de plántulas de pepino. La flecha indica la presencia de POD.

Finalmente, el número de plantas que sobrevivieron hasta el término del experimento (3 meses) fue mayor en los tratamientos con las dos concentraciones de LPS (99% y 80% para 10 y 100 µg/ml de LPS, en relación al control no tratado, respectivamente) (Fig. 6).

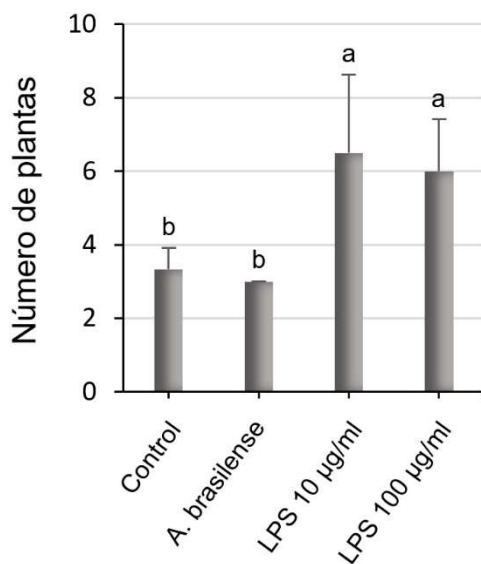


Figura 6. Efecto de los diferentes tratamiento sobre la sobrevivencia de las plántulas. Los resultados son reportados como la media±DE. N = 15. Las letras sobre las barras indican diferencias significativas entre los tratamientos.

Discusión

Los LPS derivados de bacterias fitopatógenas han sido ampliamente estudiados como moléculas estimuladoras de las respuestas de defensa (Erbs y Newman 2003). La estructura de los LPS es diferente entre cepas y especies diferentes, y por lo tanto entre bacterias patógenas y benéficas. Actualmente se desconocen las respuestas estimuladas por bacterias benéficas en las plantas. Recientemente se ha puesto atención en el papel que pudieran tener sobre la estimulación del crecimiento vegetal. Por ejemplo, en estudios *in vitro* (Vallejo-Ochoa et al. 2018) y en invernadero (Chávez-Herrera et al. 2018) aplicando LPS de *A. brasilense* Sp245 se observó que estos estimulan el crecimiento de plantas de trigo. Estos estudios y los resultados observados en este trabajo sugieren que los LPS pueden tener un papel importante durante la estimulación del crecimiento vegetal inducido por esta rizobacteria. Los resultados de este estudio también sugieren que su capacidad para modificar el crecimiento vegetal parece que no es específico sobre la planta de trigo, porque se observaron efectos similares en plantas de pepino.

Los efectos observados sobre la producción de fenoles totales sugieren que los LPS también tienen la capacidad de estimular reacciones relacionadas con la defensa, porque son ampliamente conocidas las propiedades antimicrobianas de estos metabolitos (Vermerris y Nicholson, 2008). El incremento en la actividad de la peroxidasa también pudiera estar relacionado con la estimulación de las respuestas de defensa, si bien existen varias isoenzimas en las plantas, y algunas de ellas están relacionadas con el crecimiento y el desarrollo (Francoz et al. 2015). En conclusión, los estudios utilizando los LPS de bacterias benéficas como moléculas reguladoras del crecimiento vegetal abren un nuevo campo de estudio en el área de la estimulación del crecimiento vegetal.

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado con el apoyo otorgado por la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH.

Literatura citada

- Abdel-Aal, E.M., I. Rabalski. 2008. Bioactive compounds and their antioxidant capacity in selected primitive and modern wheat species. *Open Agricul. J.* 2:7-14
- Avdiushko, S.A., X. S. Ye., J. Kuc. 1993. Detection of several enzymatic activities in leaf prints of cucumber plants. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 42:441-454
- Chávez-Herrera, E., A.A. Hernández-Esquivel., E. Castro-Mercado., E. García-Pineda. 2018. Effect of *Azospirillum brasilense* Sp245 lipopolysaccharides on wheat plant development *J. Plant Growth Reg.* 37:859-866
- Deepak, S., S. Shailasree., N. Sujeeth., R.K. Kini., S.H. Shetty., A. Mithofer. 2007. Purification and characterization of proline / hydroxyproline-rich glycoprotein from pearl millet coleoptiles infected with downy mildew pathogen *Sclerospora graminicola*. *Phytochemistry.* 68:298-305
- Erbs, G., M.A. Newman. 2003. The role of lipopolysaccharide in induction of plant defence responses. *Mol. Plant Pathol.* 4:421-425
- Erbs, G., M.A. Newman. 2012. The role of lipopolysaccharide and peptidoglycan, two glycosylated bacterial microbe-associated molecular patterns (MAMPs). In plant innate immunity. *Mol. Plant Pathol.* 13:95-104
- Francoz, E., P. Ranocha., H. Nguyen-Kim., E. Jamet., V. Burlat, C. Dunand. 2015. Roles of cell wall peroxidases in plant development. *Phytochemistry.* 112:15-21
- Matora, L.Y., O.B. Serebrennikova., S.Y. Shchyogolev. 2001. Structural effects of the *Azospirillum* lipopolysaccharides in cell suspensions. *Biomacromolecules.* 2:402-406
- Munford, R.S. 2008. Sensing Gram-negative bacterial lipopolysaccharides: a human disease determinant? *Infect. Immun.* 76:454-465
- Ormeño-Orrillo, E. 2005. Lipopolisacáridos de Rhizobiaceae: estructura y biosíntesis. *Revista Latinoamericana de Microbiología.* 47:165 - 175.
- Parra, Y., F. Cuevas. 2002. Potencialidades de *Azospirillum* como inoculante para la agricultura. *Cultivos Tropicales.* 23:31-41
- Passardi, F., D. Longet., C. Penel., C. Dunand. 2004. The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants. *Phytochemistry.* 65:1879-1893

- Patriquin, D.G., J. Döbereiner., D.K. Jain. 1983. Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. Can. J. Microbiol. 29: 900-915
- Penel, C., C. Dunand. 2009. Signaling via plant peroxidases. F. Baluška and S. Mancuso (eds.), Signaling in Plants, Signaling and Communication in Plants. DOI: 10.1007/978-3-540-89228-1_8, Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Renukadevi, K.P., J. Angayarkanni., G. Karunakaran. 2012. Extraction and characterization of lipopolysaccharide from *Serratia rubidaea* and its cytotoxicity on lung cancer cell line-nci-h69. Acta Tech. Corviniensis. 2:97-101
- Scalbert, A., C. Manach., C. Morand. 2005. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. Crit. Rev. Food Sci. Nut. 45:297-306
- Spaepen, S., J. Vanderleyden. 2011. Auxin and Plant-Microbe Interactions. Cold Spring Harb Perspect Biol. 3(4): a001438.
- Vallejo-Ochoa, J., M. López-Marmolejo, A.A. Hernández-Esquivel., M. Méndez – Gómez., L.N. Suárez-Soria, E. Castro-Mercado., E. García-Pineda. 2018. Early plant growth and biochemical responses induced by *Azospirillum brasilense* Sp245 lipopolysaccharides in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings are attenuated by procyanidin B2. Protoplasma. 255:685-694
- Vermerris, W., R. Nicholson. 2008. Preformed antimicrobial and insecticidal metabolites. In phenolic compound biochemistry. Chap. 6, pp 709. Springer Science.