

# Asociación simbiótica entre *Atriplex aff. cordobensis* Gand et Stukert (Cariofilales) y *Frankia* sp. (Actinomycetales)

Caucas V.D. y Oliva L. del V.

## RESUMEN

Entre los microorganismos diazótrofos simbiotes en plantas no-leguminosas se cita el género *Frankia* (Actinomycetales).

*A. aff. cordobensis* (Cariofilales) es un arbusto forrajero que habita suelos de elevada alcalinidad (pH: 8,5-9).

En el presente trabajo se propuso probar la asociación simbiótica *Atriplex-Frankia*, verificar la presencia de Actinomycetes en suelos áridos y lograr el aislamiento del endófito en medio artificial QMOD.

La simbiosis *Atriplex-Frankia* fue demostrada, además las plantas que crecían en su suelo natural nodularon regularmente; esto demuestra que el género *Frankia* habita los suelos estudiados de regiones áridas.

Las cepas aisladas crecieron en medio complejo QMOD y mostraron las características morfológicas típicas de Actinomycetes.

## SUMMARY

Among the symbiont diazotroph microorganisms in non-leguminous plants, the genus *Frankia* (Actinomycetales) is mentioned.

*A. aff. cordobensis* (Cariofilales) is a forage shrub which grows in soils with high alkalinity (pH: 8,5-9).

In this paper we intend to prove the *Atriplex-Frankia* symbiotic relationship, to verify the presence of Actinomycetes in arid soils and to isolate the endophyte in an artificial QMOD medium.

The *Atriplex-Frankia* symbiosis has been really proved. Besides, the plants growing in their native soil modulated regularly. This fact shows that, undoubtedly, the genus *Frankia* inhabits the studied soils of arid regions.

The strains isolated from *A. aff. cordobensis* grew in the complex QMOD medium and showed the typical morphological characteristics of Actinomycetes.

V.D. Caucas y L. del V. Oliva. *Microbiología Agrícola, Dep. Rec. Naturales, Fac. Cs. Agropecuarias, UNC.*

## INTRODUCCION

La fijación biológica de nitrógeno es un proceso conocido en procariotes: algas verde-azules y bacterias. Existen microorganismos fijadores de nitrógeno de vida libre y otros asociados simbióticamente con plantas Angiospermas (Lechevalier 1986). Entre los microorganismos simbiotes se cita el género *Frankia* com-

prendido en el orden Actinomycetales, capaz de infectar raíces de plantas no-leguminosas e inducir la formación de nódulos, dentro de los cuales *Frankia* sp. fija nitrógeno atmosférico (Vanderbosh, 1985; Becking, 1970). Mediante la acción de la nitrogenasa el nitrógeno fijado es reducido a compuestos asimilables por la planta hospedante. Dicha asociación es conocida con el nombre de "actinorriza" (Lechevalier, 1986;

Backer, 1987).

La formación de nódulos radicales depende de la presencia de *Frankia sp.* en el suelo, así, plantas introducidas en regiones exóticas o plantines cultivados en suelo estéril sólo nodulan si son inoculados con suspensiones de nódulos macerados o con cultivos puros de huéspedes apropiados (Zhongze, 1985).

En la actualidad se han citado como portadores de nódulos radicales fijadores 24 géneros pertenecientes a 8 familias de Angiospermas, todos ellos arbustos leñosos y árboles (Baker, 1987).

El endófito fue reconocido como microorganismo por Woronin (1866), aislado por primera vez desde *Alnus glutinosa* por Pommer (1959) y su capacidad de infectar plantas hospedantes y fijar nitrógeno fue demostrada por Callaham, *et al.* (1978).

El género *Frankia* desarrolla un micelio septado y ramificado resultando posible diferenciar formas morfológicamente distintas desde las pseudohifas: vesículas asociadas con la fijación de nitrógeno (Buchanan *et al.*, 1974; Fontaine *et al.*, 1984; Zhongze *et al.*, 1985; Parsons *et al.*, 1985). En algunas cepas y en determinadas épocas del año hacia fines del verano forman esporangios con función reproductiva (Quispel, 1974; Vanderbosh & Torrey, 1984, 1985).

La importancia ecológica del género *Frankia* radica en que es particularmente abundante en zonas áridas con clima seco y cálido y con elevada alcalinidad (Alexander, 1980).

*Atriplex aff. cordobensis* es un arbusto miembro de la familia Chenopodiaceae comprendido en el orden Cariofilales que habita suelos con escaso contenido de nitrógeno asimilable y de elevada alcalinidad en zonas áridas (Romero, 1981).

Teniendo en cuenta los antecedentes que se mencionan y careciendo de estudios que hayan demostrado la relación simbiótica entre el orden Actinomycetales y algún representante de Cariofilales se plantearon los siguientes objetivos: A) Verificar la existencia de la simbiosis *Atriplex-Frankia* en relación a la posible fijación de nitrógeno en zonas áridas; B) Caracterizar morfológicamente cepas de *Frankia sp.* aisladas en medio artificial provenientes de nódulos de *A. aff. cordobensis*; C) Investigar la infectividad del endófito sobre su hospedero natural.

## MATERIALES Y METODOS

### Características generales del lugar de recolección:

Este trabajo se realizó con material proveniente de una parcela del Establecimiento "El Desafío" ubicado al oeste de la Sierra de Pocho en la provincia de Córdoba. El ecosistema se ubica en la porción sureste del "Gran Chaco", llamada Chaco seco, localizada entre 28°-34° de latitud sur y 60°-64° de longitud oeste, con una extensión comprendida entre 6 y 8 millones de hectáreas.

El clima se caracteriza por altas temperaturas en verano e inviernos moderados, con precipitaciones

concentradas en verano cuyas medias anuales están cerca de los 500 mm en el borde este, descendiendo a 300 mm hacia el oeste (Pizarro, *et al.*, 1986).

La vegetación es predominantemente xerófitica, con escasa densidad, compuesta mayormente por *Aspidosperma quebracho blanco*, *Prosopis sp.* y un estrato arbustivo representado principalmente por *Larrea cuneifolia*, *A. aff. cordobensis* y *Allenrolfia sp.*

Los análisis de suelo realizados dieron valores de pH 8,5 y 9 con presencia de carbonatos.

### Material Biológico:

Se recolectaron plantas de *A. aff. cordobensis*, frutos maduros y suelo de la zona próxima a sus raíces.

Las plantas fueron analizadas macro y microscópicamente para observar la existencia de nódulos en sus raíces. Una vez extraídas las semillas se sembraron en recipientes plásticos con suelo de la zona de estudio para lograr el aislamiento biológico del endófito. Los plantines fueron mantenidos a temperatura ambiente, con luz natural y regados periódicamente (cada 4 días) con agua destilada. A los 6 meses fueron analizados para observar la presencia de nódulos radicales.

Los nódulos obtenidos fueron fijados en solución de Carnoy durante 24 hs. a temperatura ambiente; deshidratados por pasajes sucesivos en solución de alcohol de diferentes graduaciones durante intervalos de 2 hs. coloreados por la técnica de triple tinción propuesta por Ambrogio (1976); incluidos en parafina y cortados con micrótopo para ser observados microscópicamente.

### Aislamiento y cultivo de cepas de *Frankia*.

Los nódulos extraídos de los plantines de *A. aff. cordobensis* que crecían sobre suelo del Establecimiento "El Desafío" fueron desinfectados superficialmente con una solución de bicloruro de mercurio. Posteriormente se lavaron en agua estéril y se cortaron en pequeñas secciones las que fueron sembradas en cajas de Petri sobre medio complejo QMOD agarizado (Lalonde & Calvert, 1979).

Los cultivos fueron mantenidos a 28°C. durante 4 semanas.

### Ensayos de infección de plantas:

Para obtener los plantines, se sembraron semillas de *A. aff. cordobensis* en tubos con drenaje conteniendo vermiculita estéril. Los mismos fueron regados periódicamente con una solución libre de nitrógeno propuesta por Mc Knight (1949). Todos los tubos fueron mantenidos a temperatura ambiente y con luz natural.

Las pruebas de infección se llevaron a cabo cuando los plantines alcanzaron 4 semanas de desarrollo. En todos los casos los ensayos se repitieron en 3 oportunidades.

Para obtener el inóculo, las colonias de *Frankia sp.* provenientes de *A. aff. cordobensis* que crecían sobre medio QMOD agarizado fueron transferidas a tubos con medio QMOD líquido (Lalonde & Calvert, 1979) e incubadas 30 días a 28°C (Gauthier, *et al.*, 1984). Ade-

más se usó como inóculo maceradas de nódulos en agua estéril; Rodríguez-Barrueco *et al.* (1982). En todos los casos tubos sin inocular fueron mantenidos como testigos.

La presencia de *Frankia sp.* en el inóculo fue determinada por las características de crecimiento que adquirieron las colonias y que según Schlegel (1979) en medio líquido tienen aspecto de racimos blanco algodonosos de 1 mm. de diámetro aproximadamente y no alteran el medio de cultivo durante su desarrollo. Bajo microscopio fotónico se observaron pseudohifas, vesículas y esporangios del género *Frankia*.

Como prueba complementaria para demostrar la supervivencia del endófito en forma libre, se sembraron semillas de *A. aff. cordobensis* sobre la vermiculita de los tubos donde se desarrolló el ensayo anterior. A los 2 meses se observaron sus raíces bajo microscopio estereoscópico para constatar la presencia de nódulos radicales.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Sobre plantas de *A. aff. cordobensis* que crecían en su suelo natural fue posible observar bajo microscopio estereoscópico gran número de "raíces laterales" de crecimiento vertical y con geotropismo negativo de 2 a 5 milímetros de longitud aproximadamente, atribuíbles a nódulos conteniendo Actinomycetes.

En la totalidad de los plantines, que crecían sobre suelo extralido de regiones donde el género crece espontáneamente, también se encontraron raicillas con características similares (Fig. 1).

La observación microscópica de cortes de dichos "nódulos" mostró el desarrollo de esporangios maduros de 16 a 24 micras de longitud y 4 micras de diámetro, lo que permitió confirmar la presencia de Actinomycetes simbiotes (Fig. 2). (Vanderbosh & Torrey, 1984) mencionaron en su trabajo que las pseudohifas invasivas y vesículas del género *Frankia* desaparecen

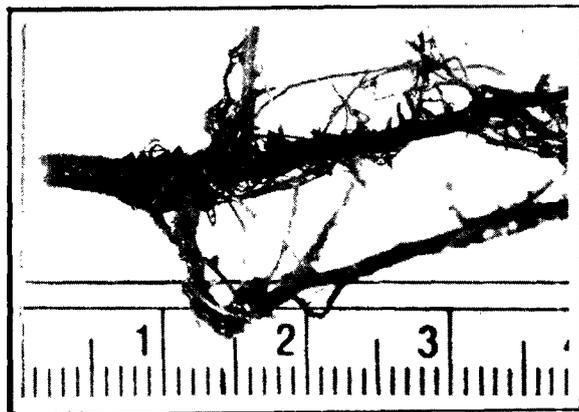


Fig. 1: Raíces noduladas de plantines de *Atriplex aff. cordobensis* con 6 semanas de crecimiento.



Fig. 2: Sección transversal de raicillas noduladas de *A. aff. cordobensis* mostrando células infectadas conteniendo esporangios (Sp) del género *Frankia*. Escala: 10 micras.

durante la diferenciación de los esporangios. Dado esta característica, las estructuras mencionadas no han sido observadas en los cortes de nódulos realizados.

Los aislamientos de *Frankia sp.* a partir de porciones de nódulos de *A. aff. cordobensis* muestran a la tercera semana de siembra sobre medio QMOD agarizado, el desarrollo de colonias pigmentadas (anaranjadas) de consistencia firme e incrustadas en el medio de cultivo. Las características observadas son citadas por Schlegel (1979) como propias de colonias de Actinomycetes.

La cepa obtenida constituye el primer aislamiento en medio artificial de microorganismos provenientes de nódulos de *A. aff. cordobensis*.

Bajo microscopio fotónico las cepas aisladas exhibieron pseudohifas septadas de aproximadamente 1 micra de diámetro, vesículas refringentes de 3 a 3,5 micras de diámetro y esporangios en distinto estado de desarrollo de 12 a 16 micras de longitud. Según Gauthier, *et al.* (1984) esto permitiría incluirla dentro de una categoría capaz de producir vesículas en medio conteniendo compuestos nitrogenados (extracto de levadura y bacto-peptona) sin fijar nitrógeno necesariamente (Fig. 3).

Las pseudohifas responden a la coloración Gram positivo.

Todo lo expuesto anteriormente permite, en base a criterios morfológicos, demostrar que el microorganismo hallado en nódulos de *A. aff. cordobensis* y aislado en medio artificial corresponde a Actinomycetes del género *Frankia*.

Los ensayos de infectividad dieron los siguientes resultados:

1 - En la totalidad de los plantines inoculados con cultivos puros de *Frankia sp.* aislados de *A. aff. cordobensis* se observaron nódulos radicales conteniendo

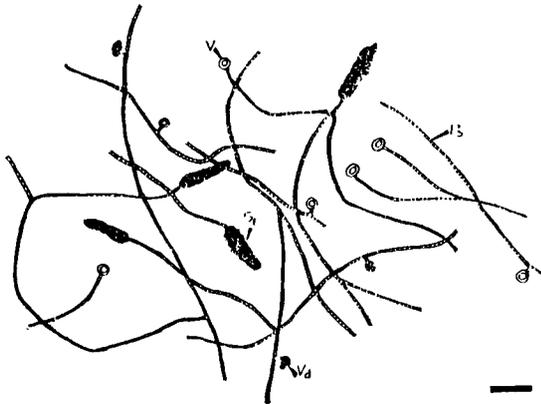


Fig. 3: Cultivo puro de cepas de *Frankia* sp. aisladas desde *A. aff. cordobensis* creciendo sobre medio artificial QMOD. Se observan pseudohifas (ps), vesículas (V), vesículas dañadas (vd) y esporangios jóvenes (sp). Escala 10 micras.

#### Actinomycetes.

2 - Los plantines inoculados con macerado, nodularon en el 100% de los casos.

La observación microscópica de los nódulos aislados mostró las mismas características morfológicas de Actinomycetes presentes en los nódulos originales (pseudohifas, vesículas y esporangios).

En ambos ensayos fue posible aislar el género *Frankia* sobre medio QMOD sólido.

Los testigos sin inocular murieron al poco tiempo de germinar, ésto demostraría que la supervivencia de los plantines inoculados se debe al aporte de nitrógeno derivado de la fijación biológica del microorganismo y la relación de dependencia por parte de la planta hospedante.

Zhonge *et al.* (1985) citan en su trabajo que entre las plantas con actinorrizas existen dos tipos de nódulos morfológicamente distintos. Ambos se originan en raíces laterales modificadas por la presencia de Actinomycetes. En nódulos "tipo-*Alnus*" se reduce la actividad del meristema apical, aumentan las mitosis en el sitio de infección y se produce un engrosamiento de las raicillas laterales formando estructuras coraloides. En nódulos "tipo *Myrica*", las raicillas infectadas se elongan adquiriendo geotropismo negativo.

Según las observaciones realizadas en el presente trabajo, los nódulos presentes en *Atriplex aff. cordobensis* corresponden al "tipo *Myrica*".

Con respecto a los ensayos colaterales de supervivencia de cepas, la totalidad de las plantas de *A. aff. cordobensis* mostraron desarrollo de nódulos, por lo que se infiere que el endófito puede permanecer en forma libre, sin perder su capacidad infectiva, en soportes como la vermiculita.

## CONCLUSIONES

Se verifica la existencia de una asociación simbiótica entre la especie *Atriplex aff. cordobensis* y Actinomycetes del género *Frankia*.

Es posible el aislamiento en medio artificial de cepas de *Frankia* sp. provenientes de nódulos de *A. aff. cordobensis*.

Actinomycetes del género *Frankia* son infectivos sobre su hospedante natural (*A. aff. cordobensis*).

## AGRADECIMIENTOS

Las autoras del presente trabajo agradecen a la Biól. Adriana Abril por sus valiosas sugerencias y la lectura crítica del manuscrito, a la Dra. Marta Astegiano por la determinación de la especie arbustiva y al Ing. Agr. Daniel Igarzábal, Biól. Judit Alemany, Prof. Stella Luque, Sr. Daniel Fontana y Prof. Elizabeth Mc Michael por la asistencia técnica prestada.

## BIBLIOGRAFIA

- Alexander, A., 1980. Introducción a la Microbiología del suelo. México. A.G.T. Editor. 1-483.
- Ambrogio, A., 1986. Manual de Técnicas de Histología Vegetal. Buenos Aires. Ed. Hemisferio Sur. 1-83.
- Baker, D., 1987. Opportunities for autoecological studies of *Frankia*, a symbiotic Actinomycete. Connecticut. Program for forest Microbiology School of Forestry and Environmental Studies.
- Becking, J., 1970. Frankiaceae fam. nov. (Actinomycetales) with one new combination and six new species of genus *Frankia* Brunchorst 1866, 174. Int. J. Syst. Bacteriol. 20: 201-220.
- Buchanan, R. Gibbons, E., 1974. Bergey's manual of Determinative Bacteriology. Eighth Edition. The Williams & Wilkins Company. Baltimore. 657-706.
- Callaham, D del Tredici, P. Torrey, G., 1978. Isolation and cultivation in vitro of the Actinomycete causing root nodulation in *Comptonia*. Science. 199: 899-902.
- Fontaine, M. Lancelle, S. Torrey, G. 1984. Initiation and Ontogeny of Vesicles in Cultured *Frankia* sp. Strain HFP Ar 13. J. Bacteriol. 3: 921-927.
- Gauthier, D. Frioni, L. Diem, G. Dommergues, Y., 1984. La simbiosis *Colletia spinosissima* - *Frankia*. Acta Ecológica. 5: 231-239.
- Lalonde, M. Calvert, H., 1979. Production of *Frankia* hyphae and spores as an infective inoculant for *Alnus* species. Symbiotic Nitrogen Fixation in the Management of Temperate Forest. Corvallis. Forest Reserch Laboratory. J. C. Gordon, C. T. Wheeler and Perry, A. (ed). 95-110
- Lechevalier, M., 1986. Nitrogen Fixing Actinomycetes of the genus *Frankia*. Waksman Institute of Microbiology, Rutgers, The State University of New Jersey. Proc. IV ISME. 253-256.
- Mc Knigh, T., 1949. Efficiency of isolates of *Rhizobium* in the cowpea group with proposed addition on this group. J. Agric. 6: 61-76.
- Parsons, R. Silvester, B. Harris, S. Gruijters, W. Bullivant, S., 1987. *Frankia* vesicles provide inducible and absolute oxygen protection for nitrogenase. Plant Physiol 83: 728-

731.

- Pommer, E., 1959. Über die Isolierung des Endophyten aus den Wurzelknöllchen *Alnus glutinosa* Gaertn. und über erfolgreiche Reinfektionsversuche. Ber. Deutsch Bot. Gesell. 72: 138-150.
- Pizarro, M., Ayerza, R., Karlin, U., 1986. Management of arboreal *Prosopis* in Agroforestry production systems Dry Chaco, Argentina. Proyecto de investigación, convenio NAS-FCA. BOSTID (Board of Science and Technology for International Development).
- Quispel, A., 1974. The Biology of Nitrogen Fixation. Oxford. North Holland Publishing Company Amsterdam. 342-520.
- Rodríguez-Barrueco, C., Subramanian, P., Martins-Loçao, M., 1982. La fijación biológica de nitrógeno atmosférico y la producción vegetal. Anu. Cent. Edafol. Apl. 221-241.
- Romero, M., 1981. Contribuciones al estudio del género *Atriplex* (Chenopodiaceae) en la Argentina. I. Darwiniana. Revista del Instituto Darwiniano. V. 23 (1) 119-150.
- Ruschel, P., 1980. Curso rápido sobre tecnología de *Rhizobium*. Porto Alegre. MIRCEN/UNESCO/ICRO.
- Schlegel, G., 1979. Microbiología General. Barcelona. Ed. Omega. 1-429.
- Vanderbosh, A., Torrey, G., 1984. Consequences of sporangial development for nodule function in root nodules of *Comptonia peregrina* and *Myrica gale*. Plant Physiol. 76: 556-560.
- Vanderbosh, A., Torrey, G., 1985. Development of endophytic *Frankia* sporangios in field and laboratory grown nodules of *Comptonia peregrina* and *Myrica gale*. Amer. J. Bot. 72: 99-108.
- Woronin, M., 1986. Über die bei der Schwarzerle (*Alnus glutinosa*) und der gewöhnlichen Garten-Lupine (*Lupinus mutabilis*) auftretenden; Wurzelanschwellungen. Mem. Acad. Sci. St. Peterburg. 101-110.
- Zhongze, A., Torrey, G., 1984. Initiation and ontogeny of vesicles in cultured *Frankia* sp. strain HFP ar13. J. of Bacteriol. 3: 921-927.
- Zhongze, A., Torrey, G., 1985. Studies of an effective strain of *Frankia* from *Allocasuarina lehmanniana* of Casuarinaceae. Plant and Soil. 87: 61-78.