

**AISLAMIENTO DE *FRANKIA* A PARTIR DE NODULOS DE
ALNUS GLUTINOSA OBTENIDOS AXENICAMENTE**

Mónica B. Rodríguez y María A. Monzón de Asconegui

Cátedra de Microbiología. Facultad de Agronomía, UBA.
Av. San Martín 4453. 1417 Buenos Aires

RESUMEN

Este trabajo describe el aislamiento de *Frankia*, un actinomicete fijador de nitrógeno en nódulos de plantas no leguminosas leñosas y arbustivas. Se presenta la metodología utilizada para la producción axénica de nódulos actinorrhizales en macetas con arena estéril y tubos con agar nutritivo donde crecieron, en condiciones controladas, plántulas de *Alnus glutinosa* (aliso europeo) inoculadas con una dilución de nódulos macerados procedentes de la misma especie forestal y recogidos en el Delta del Paraná (Argentina). Se obtuvieron nódulos representativos de *Frankia* en ambos casos. A partir de los nódulos obtenidos se aisló el endófito en medio Quispel modificado (QMod) sólido. Las colonias desarrollaron a los 15 días y, aunque estuvieron rodeadas de contaminantes, se observaron las características típicas del género *Frankia*. Estas colonias fueron repicadas a medio QMod líquido donde mostraron el crecimiento característico para este actinomicete. A pesar de la presencia de esporangios distribuidos irregularmente sobre las hifas, no se observaron esporos en los cultivos sólidos ni líquidos.

Palabras clave: *Frankia*, *Alnus glutinosa*, fijación de nitrógeno, actinomicete, nódulos actinorrhizales.

**ISOLATION OF *FRANKIA* FROM NODULES OF *ALNUS GLUTINOSA*
PRODUCED AXENICALLY**

ABSTRACT

This paper describes the isolation of *Frankia*, a nitrogen-fixing actinomycete in nodules of non-leguminous woody shrubs and trees. The methodology used for the axenic production of actinorrhizal nodules in pots with sterile sand and test tubes with nutritive agar is presented. Plants of *Alnus glutinosa* (alder tree), inoculated with a dilution of crushed nodules belonging to the same species and taken from the Paraná river Delta (Argentina), were grown under controlled conditions. Representative nodules of *Frankia* were obtained in both cases. The isolation of the endophyte in solid Quispel modified (QMod) medium from those nodules was performed. At 15 days from plating, some colonies showing the typical characteristics of the genus *Frankia*, grew on the plating, though surrounded by microbial contamination. These colonies were transferred into liquid QMod medium where they showed the characteristic growing pattern of that actinomycete. In spite of the presence of sporangia, which were irregularly distributed on the hyphae, spores were not observed neither in solid nor in liquid media.

Key words: *Frankia*, *Alnus glutinosa*, nitrogen-fixation, actinomycete, actinorrhizal root-nodules.

INTRODUCCION

En los últimos años se ha incrementado la preocupación del hombre por la disminución de los recursos forestales. Ello ha conducido a que la reforestación y la producción de fibra de madera para fines industriales a bajo costo y con la mínima contaminación ambiental, sean objetivos prioritarios a nivel mundial (Rodríguez Barrueco y Sevillano, 1987). Es por esto, que está aumentando el interés por la Fijación Biológica de Nitrógeno en especies forestales no leguminosas leñosas arbóreas y arbustivas. Estas plantas establecen simbiosis con el actinomicete *Frankia*, responsable de la nodulación y fijación de nitrógeno en las mismas. A través de esta asociación, el endófito recibe de la planta las sustancias carbonadas necesarias para su metabolismo y le provee a la misma, sustancias nitrogenadas sintetizadas en el nódulo (Torrey, 1978). La importancia ecológica de esta simbiosis reside en que los hospedantes (*Alnus*, *Casuarina*, *Comptonia* y *Myrica*, entre otros) son considerados pioneros o colonizadores de zonas marginales y mejoradores del suelo en regiones degradadas o de pobre fertilidad (Medán y Tortosa, 1976).

En este trabajo se describen en detalle los procedimientos utilizados para el aislamiento de una cepa de *Frankia* a partir de nódulos de *Alnus glutinosa* obtenidos previamente en condiciones axénicas. Se detallan las características morfológicas y de cultivo de las colonias así obtenidas.

MATERIALES Y METODOS

La metodología aplicada se dividió en dos etapas principales:

Obtención de nódulos de *Alnus glutinosa* en condiciones axénicas

Se recogieron rizosferas con nódulos actinorrícos de *Alnus glutinosa* (aliso europeo) provenientes de la zona del Delta del Río Paraná, donde es cultivado como mejorador del suelo (Fig. 1). Se eliminaron los restos vegetales de la superficie y luego se tomaron muestras de los 5 a 20 cm de profundidad. Las mismas fueron colocadas en bolsas plásticas y mantenidas a bajas temperaturas (4 a 10°C) hasta su procesamiento.

En el laboratorio se separaron los nódulos del resto del material. Estos fueron lavados cuidadosamente con agua corriente y esterilizados superficialmente siguiendo la secuencia: 1) Cloramina T (1 % en agua destilada estéril): 5 min. 2) Lavado con agua destilada estéril: 2 min. 3) Tampón fos-

fato (3,4 g/L de $K_2H_2PO_4$ + 5 ml de BTA (bromotimol-azul); agregar solución de K_2HPO_4 (3,4 g/L) hasta pH 6,8 : 2 min. 4) Lavados con agua destilada estéril: 2 min. El material así tratado fue macerado en un mortero y diluido con agua estéril varias veces (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}), constituyendo el inóculo a usar en los pasos siguientes.

Por otra parte, fueron desinfectadas semillas de *Alnus glutinosa* con $KMnO_4$ (0,1 %) durante 3 min. (Jiabin et al., 1985) y lavadas varias veces con agua destilada estéril. Seguidamente, fueron puestas a germinar a 28 ° C en cajas de Petri y, cuando aparecieron las primeras raicillas, se las transplantó siguiendo dos metodologías:

a) Macetas: se usaron recipientes plásticos de 250 cm³ de capacidad que contenían arena lavada fina y esterilizada por tinalización en autoclave. Se depositaron 3 semillas pregerminadas en cada uno de los recipientes. Las plantas fueron regadas diariamente con agua destilada estéril y, una vez por semana, con una solución nutritiva para fijadores de nitrógeno ($Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ 1 M, 1,33 ml/L; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 M, 1ml/L; elementos traza, 1ml/L; FeEDTA, 1 ml/L; KH_2PO_4 1 M, 2 ml/L; K_2SO_4 0,5 M, 6 ml/L; $CaCl_2$ 1 M, 2,66 ml/L; $NH_4H_2PO_4$ 1 M, 0,33 ml/L; pH: 5,5 - 6,8) (Tortosa, 1988; comunicación personal). Al mes de la siembra, cada una de las plántulas fue inoculada con 1 ml de la dilución 10^{-3} del inóculo (Diem et al., 1982). Se exceptuó de la inoculación a algunas plántulas, las cuales cumplieron la función de testigos. Las macetas fueron mantenidas en condiciones controladas (28° C, 7000 lx y 14 hs de fotoperíodo) durante 3 meses más. Al cabo de ese tiempo, se cosecharon los nódulos desarrollados (Fig. 2).

b) Tubos de ensayo: la siembra de semillas pregerminadas se realizó en tubos de ensayo de 50 ml que contenían solución nutritiva de Johnson agarizada (8 % de agar) y esterilizada. Se colocó 1 semilla por tubo. Las plántulas desarrollaron en condiciones controladas de luz y temperatura hasta el final del ensayo. Transcurrido 1 mes del trasplante, cada plántula fue inoculada con 1 ml de la dilución 10^{-3} del inóculo. A los 3 meses de la inoculación fueron removidos los nódulos obtenidos.

El proceso de nodulación fue fácilmente observado en los tubos de ensayo, que permitieron establecer el momento óptimo para la cosecha de los nódulos (Fig. 3). Los nódulos obtenidos constituyeron el inóculo producido axénicamente, el que fue utilizado para llevar a cabo el aislamiento de *Frankia*. Para su conservación,

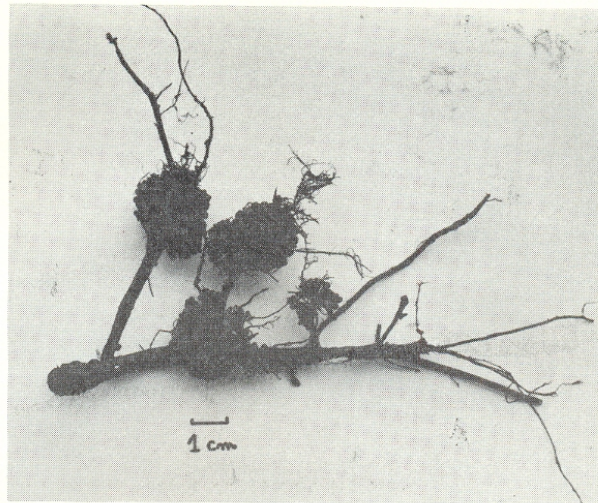


Fig. 1. Nódulos actinorrhizicos de *Alnus glutinosa*.



Fig. 2. Nódulos actinorrhizicos de *Alnus glutinosa* correspondientes al tratamiento T_A, a los 4 meses de la siembra de las semillas.

la parte aérea de las plantas noduladas
ió el contenido de las macetas en bolsas
que fueron mantenidas a bajas tempera-

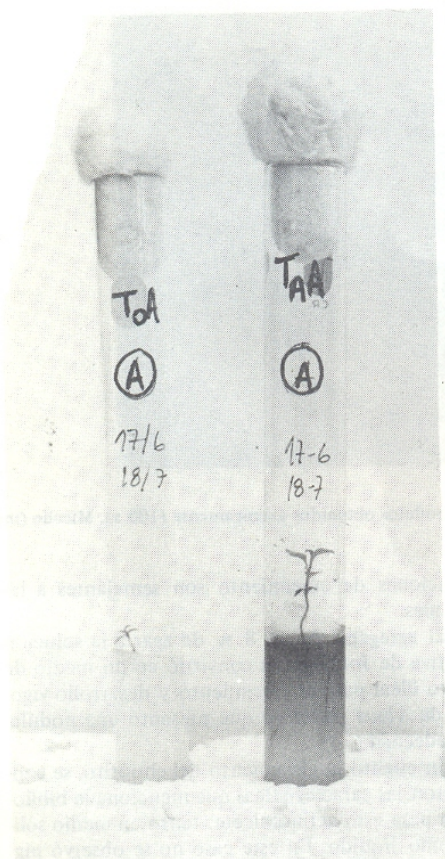


Fig. 3. Plántulas de *Alnus glutinosa* en tubos con agar nutritivo.

T₀A: testigo

T_AA: inoculadas con nódulos de *Alnus glutinosa*.

Aislamiento de *Frankia*.

Los nódulos obtenidos en la etapa 1 fueron macerados en un mortero de porcelana. Con el material resultante, se confeccionó una batería de diluciones en agua estéril (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}). Estas diluciones se utilizaron para inocular el medio QMod sólido (1,5 % en agar) (Diem et al., op. cit.). Para llevar a cabo el aislamiento, se sembraron 0,2 ml de cada dilución, en cajas de Petri de 9 cm de diámetro que contenían el medio de cultivo solidificado. Sobre ese material se depositó

una sobrecapa de 2 ml del mismo medio de cultivo que se mantuvo a 40 °C. La sobrecapa tuvo la función de favorecer condiciones de microaerofilia para *Frankia*. Luego de la inoculación, las cajas fueron incubadas a 28-30 °C.

A los 15 días de la inoculación, se observaron los resultados bajo microscopio óptico (100X). Se detectaron colonias típicas de *Frankia* (Gauthier et al., 1981; Diem et al., op. cit.). Estas colonias fueron extraídas de las cajas con la ayuda de un tubo capilar, cuidando las condiciones de esterilidad. Se sembraron en tubos de ensayo que contenían 15 ml de medio QMod líquido, con el fin de observar la morfología de las colonias desarrolladas en este medio. Se incubó el material a 28 °C y a los 30 días se realizaron las observaciones.

RESULTADOS

En el ensayo para la obtención de inóculo axénico de *Frankia* en *Alnus glutinosa*, la inoculación fue exitosa. Se cosecharon nódulos actinorrhizicos tanto en las macetas como en los tubos de ensayo, los que presentaron la típica morfología "coraloide" (Tortosa y Medán, 1983). Al momento de la recolección, las plantas de *Alnus* habían alcanzado aproximadamente 8 a 10 cm de altura y los nódulos un promedio de 0,2-0,4 cm de diámetro. En todos los casos, las plantas tuvieron un buen desarrollo sin manifestar stress o deficiencia de ninguna naturaleza.

Las colonias de *Frankia* desarrolladas en las cajas de Petri con medio QMod sólido y sobrecapa, presentaron la típica morfología de "estrella de mar" (Diem et al., op. cit.), si bien rodeadas de contaminantes, principalmente bacterias. El número de colonias de *Frankia* por caja fue variable, en función de la dilución del inóculo empleada. Con el paso del tiempo, las colonias crecieron en diámetro. Su estructura estuvo constituida por un núcleo central compuesto por hifas, esporangios y vesículas embebidas en mucílago. A partir de ese núcleo, se observaron hifas creciendo radialmente con unos pocos esporangios y vesículas.

En el medio QMod líquido, se observó a los 30 días una buena cantidad de tubos de ensayo con turbidez a causa de la presencia de contaminantes. En el resto de los tubos, el medio se encontraba translúcido, sin turbidez. En el fondo de los tubos se detectó la acumulación de un material blanquecino constituido por las estructuras de *Frankia*. Este material fue observado al microscopio óptico (100 X) (Fig. 4). El micelio estuvo compuesto por hifas muy tabicadas y delgadas

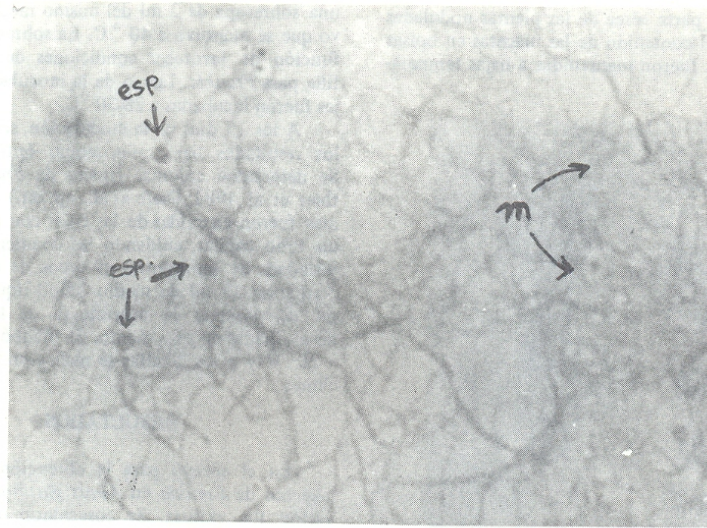


Fig. 4. Estructuras de *Frankia* correspondientes al material aislado de nódulos obtenidos axénicamente (100 x). Micelio (m) y esporangios globosos (esp).

sobre las cuales se observaron estructuras de forma globosa distribuidas irregularmente. Se supone que podría tratarse de esporangios, a pesar de no haberse detectado la presencia de esporos.

DISCUSION

En la elección de la metodología aplicada para realizar el aislamiento de *Frankia*, se partió de nódulos obtenidos axénicamente para evitar al máximo la interferencia de contaminantes en la experiencia. Este objetivo fue logrado, ya que se comprobó que el material aislado puede conservarse en tubos de ensayo con medio QMod líquido a bajas temperaturas, sin contaminación alguna. Cabe destacar la practicidad de la metodología de obtención de inóculo axénico con macetas y tubos, ya que es posible observar el desarrollo gradual de la nodulación en los tubos y, por lo tanto, detectar el momento en que los nódulos están listos para ser cosechados de las macetas, sin necesidad de descalzar las plantas. El ritmo de crecimiento de las plantas en ambas metodologías fue similar, ya que todas se desarrollaron simultáneamente bajo condiciones semejantes. El sistema de cultivo de las plantas en macetas con arena fue considerado más adecuado y práctico que el de hidroponía, a causa de que no se necesitan cambios frecuentes de la solución nutritiva y las

condiciones de crecimiento son semejantes a las naturales.

El agregado de un 8 % de agar a la solución nutritiva de Johnson, la convirtió en un medio de cultivo ideal para el crecimiento y desarrollo vigoroso de *Alnus glutinosa* que presentó una nodulación adecuada.

En cuanto al aislamiento del endófito, se confirmaron las características que menciona la bibliografía para este actinomicete, tanto en medio sólido como líquido. En este caso no se observó pigmentación de las colonias. La presencia de esporangios indicaría la existencia de esporos, aunque éstos no se hayan detectado, tal vez por el estado fisiológico del actinomicete en el momento de realizarse las observaciones. No obstante, las características morfológicas y de cultivo descritas en este trabajo sugieren que el actinomicete aislado pertenecería al género *Frankia*.

CONCLUSIONES

El aislamiento de *Frankia* fue realizado a partir de nódulos recogidos en condiciones naturales de una zona del Delta del Paraná (Argentina), estudio aún no registrado en la bibliografía del país. Se espera que en los estudios sobre técnicas de aislamiento se logren avances importantes, ya que aún se presentan dificultades como la apari-

ción de contaminantes junto a las colonias de *Frankia*. El perfeccionamiento de las metodologías de aislamiento y cultivo "in vitro" traerán como consecuencia progresos en el estudio de las características morfofisiológicas del actinomicete, que sin duda aportarán datos para una mejor comprensión de esta simbiosis actinorrícica fijadora de nitrógeno.

AGRADECIMIENTOS

A la Cátedra de Botánica (Facultad de Agronomía - UBA) por haber atendido consultas gentilmente en varias oportunidades. Al personal del IFONA (Paraná Miní) por haber cedido el material que posibilitó la realización de este trabajo. Al Sr. Esteban Masuello por su colaboración en las experiencias.

REFERENCIAS

- Diem, H. G.; D. Gauthier e Y. R. Dommergues, 1982. Isolation of *Frankia* from nodules of *Casuarina equisetifolia*. Can. J. Microbiol., 28: 526-530.
- Gauthier, D.; H. G. Diem e Y. Dommergues, 1981. In vitro nitrogen fixation by two actinomycete strains isolated from *Casuarina* nodules. Applied and Environmental Microbiology, 41: 306-308.
- Jiabin, H.; Z. Zheyang; Ch. Guanxiang y L. Huichang, 1985. Host range of *Frankia* endophytes. Plant and Soil, 87: 61-65.
- Medán, D. y R. D. Tortosa, 1976. Nódulos radicales en *Discaria* y *Colletia* (Rhamnáceas). Boletín de la Soc. Arg. de Botánica. Vol. XVII: 323-336.
- Rodríguez Barrueco, C. y F. Sevillano, 1987. Valor potencial aplicado de *Frankia* sp., *Azospirillum* sp. y simbiosis *Azolla-Anabaena*. En: XII Congreso Nacional de Microbiología. España.
- Torrey, J. G., 1978. Nitrogen Fixation by actinomycete-nodulated angiosperms. Bioscience, 28: 586-592.
- Tortosa, R. D. y D. Medán, 1983. Nódulos radicales simbióticos en espermatófitas argentinas. Kurtziana 16: 101-122.