



Gabbarini, Luciano Andrés

# Interacciones tempranas y señales de reconocimiento en la simbiosis entre Frankia y plantas actinorrícicas



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.  
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

*Cita recomendada:*

Gabbarini, L. A. (2016) *Interacciones tempranas y señales de reconocimiento en la simbiosis entre Frankia y plantas actinorrícicas. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes* <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/212>

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

## Interacciones tempranas y señales de reconocimiento en la simbiosis entre *Frankia* y plantas actinorrícicas

TESIS DOCTORAL

**Luciano Andrés Gabbarini**

luciano.gabbarini@unq.edu.ar

### Resumen

La simbiosis actinorrícica involucra a actinomicetes filamentosos, Gram positivos, del genero *Frankia* y a la raíz de plantas dicotiledóneas de 8 familias, comprendiendo 25 géneros. Estas plantas conocidas en su conjunto como actinorrícicas tienen la habilidad de formar nódulos fijadores de nitrógeno. Los nódulos radiculares actinorrícicos son los órganos donde se lleva a cabo la fijación de nitrógeno atmosférico por parte de *Frankia* y la asimilación del nitrógeno fijado por parte de la planta.

Todas las plantas excepto *Datisca*, que es una herbácea, son árboles o arbustos leñosos. Se las puede encontrar en muy diversos ambientes y suelen ser pioneras en las etapas tempranas de sucesión de suelos pobres en nitrógeno. Presentan tasas de fijación de nitrógeno altas y comparables a las de la simbiosis entre rizobios y leguminosas. Esta ventaja, sumada a la capacidad de crecer en ambientes muy disímiles hacen que las plantas actinorrícicas resulten muy importantes y deban ser consideradas a la par de los árboles leguminosos para planes de reforestación y restauración de suelos.

A pesar de los avances logrados en los últimos 30 años, son muchos los aspectos que aún permanecen oscuros debido a la carencia de herramientas genéticas para trabajar con los aislamientos de *Frankia*. Aun no se ha logrado encontrar una técnica que permita generar mutantes, con lo cual el avance en el conocimiento de la simbiosis actinorrícica ha sido limitado respecto a otras simbiosis en las que también participan plantas y bacterias.

En este trabajo se buscó desarrollar el conocimiento básico acerca de las interacciones tempranas que se producen necesariamente en la rizósfera de las plantas actinorrícicas para que se establezca la simbiosis fijadora de nitrógeno con *Frankia*. Como modelo de estudio se utilizaron dos plantas nativas argentinas - *Discaria trinervis* y *Alnus acuminata*- que presentan diferente vía de infección y crecen en regiones muy definidas y distantes entre si.

A lo largo de los capítulos de esta Tesis, en ensayos mayoritariamente fisiológicos y en condiciones controladas de invernáculo se logró definir una serie de parámetros relacionados con el proceso de nodulación que permitieron definir de un modo novedoso las interacciones tempranas entre *Frankia* y su planta hospedadora. Analizando la variación en los valores de estos parámetros debido a diferencias en las condiciones de inoculación o coinoculación de las plantas se realizaron los siguientes descubrimientos:

- 1- Existiría más de una señal de origen bacteriano involucrada en el proceso de nodulación. Al menos una señal sería de reconocimiento ya que algunos parámetros de nodulación se modifican únicamente por la cepa infectiva y nodulante de la planta.
- 2- Existirían otros factores que no condicionan el reconocimiento simbiótico pero que participan del proceso de nodulación ya que algunos de los parámetros también fueron modificados en ensayos de dosis – respuesta con cepas de *Frankia* no infectivas en *D. trinervis*, e inclusive con *Streptomyces coelicolor* inoculadas en altas dosis en forma conjunta con la cepa infectiva en dosis limitante.
- 3- La expresión del fenómeno de autoregulación de la nodulación de *D. trinervis* dependería de la concentración de exudados radiculares.
- 4- La cepa BCU110501 de *Frankia* no infectiva en *A. acuminata* puede estimular el mecanismo de autoregulación cuando se la inocula en forma conjunta con la cepa Arl3, sugiriendo algún grado de coinfección que no pudo corroborarse con los análisis de ocupación de nódulos realizados, aún cuando los dos sistemas simbiótico se encontraban activados por encontrarse en el mismo espacio físico.
- 5- Existiría una señal capaz de favorecer la nodulación cuando ambas especies crecen juntas y se encuentran con su huésped, que podría interpretarse como un cambio en la composición de los exudados radiculares.
- 6- La cepa BCU110501 de *Frankia* produciría factores difusibles de tamaño menor a 12 KDa de carácter peptídico y con carga negativa a pH fisiológico capaces de activar y mejorar la eficiencia de la nodulación, en menos de 96 horas, de células lavadas y diluidas de la misma cepa.
- 7- *Frankia* BCU110501 se comporta de modo similar a *Streptomyces coelicolor* A(3)2 en un ensayo biológico que pone en evidencia la actividad de una molécula involucrada en señalización de tipo Quorum sensing.

## **Agradecimientos**

A mis padres, valoro profundamente la libertad que me dieron, el modo en que me hicieron sacar provecho de ella y el apoyo incondicional que me dieron cuando tuve que tomar decisiones. A medida que corren los años voy tomando mayor conciencia de lo importante que son los valores humanos que me inculcaron, espero que ustedes también lo noten.

A mis abuelos, fueron todos responsables de que mi juventud haya sido fascinante, me hicieron ser -cada uno a su manera- el protagonista de un libro de aventuras. Jamás podré olvidar las historias y cuentos con que me hicieron deleitar.

A mi hija, Juana, porque al escribir su nombre y pensar en todo lo que vivimos me provoca una gran emoción y se me hace difícil seguir escribiendo. Sin duda ella se lleva gran parte de los créditos, me acompañó al laboratorio en muchísimas ocasiones y ayudó en todo.

A Barbi, mi compañera!!!!

A Luis, porque es un docente tiempo completo, por su generosidad, por confiar en mí, por su agudeza a la hora de discutir resultados y fundamentalmente por su valor humano.

A Claudio, si bien estrictamente no tuve un codirector, considero que el cumplió con creces esa función. Colaboró desinteresadamente a lo largo de todos estos años, me aconsejó, discutió resultados e hizo mucho más fácil mi trabajo en el laboratorio.

A los chicos del laboratorio, Pato, Bety, Lea, Leo, Ale, Germán, Danay, Minna por todos los momentos lindos que pasamos juntos.

A Kerstin, por la increíble atención que me brindó en Umea y por sus valiosísimos consejos, Kerstin Tack så mycket för er värdefulla råd.

También voy a agradecer a algunas personas que no conozco personalmente, pero hicieron mucho: Paul (2), Carlos, Luis Alberto (2), Robert, Andrés, Rodolfo, Jhonny, Manuel, Joaquín, Roger, Peter, Neil, Joan, Jhonn, Fiodor, Jorge L, Julio, George, Bryan, Brian, Milan, Oscar, Edgard, Henry, David (3), Raymond, Elvis, Tom (2), Matías, Leonard y Charles entre muchos otros más.

## Índice

Resumen

Antecedentes personales

Abreviaturas

Capítulo 1. “Introducción a la simbiosis actinorrónica”

1.1 Situación actual

1.2 Historia de la simbiosis actinorrónica

1.3 El microsimbionte: Frankia

1.3.1 Morfología y fisiología

1.3.2 Taxonomía

1.4 Plantas actinorrónicas

1.4.1 Distribución geográfica de las plantas actinorrónicas

1.5 Infección y nodulación

1.5.1 Interacciones tempranas

1.5.2 Colonización de la raíz

1.5.3 Fijación biológica de nitrógeno

1.6 Ecología de las plantas actinorrónicas

1.7 Objetivo del trabajo

1.8 Referencias

Capítulo 2. “Análisis de las cinéticas de nodulación en la simbiosis Frankia – Discaria trinervis y estudio de factores involucrados en el desarrollo de la nodulación”

2.1 Introducción

2.2 Materiales y métodos

2.3 Resultados

2.4 Discusión

2.5 Referencias

Capítulo 3. “Estudio de factores difusibles bacterianos en la nodulación de Discaria trinervis”

3.1 Introducción

3.2 Materiales y métodos

3.3 Resultados

3.4 Discusión

3.5 Referencias

Capítulo 4. “Análisis de la nodulación en Alnus acuminata y estudio influencia de un par simbiótico heterólogo”

4.1 Introducción

4.2 Materiales y métodos

4.3 Resultados

4.4 Discusión

#### 4.5 Referencias

### Capítulo 5. “Estudio de los mecanismos de Quórum sensing en Frankia”

#### 5.1 Introducción

#### 5.2 Materiales y métodos

#### 5.3 Resultados

#### 5.4 Discusión

#### 5.5 Referencias

### 6 Conclusiones finales y perspectivas

## ANTECEDENTES PERSONALES

### CARGO DOCENTE

Instructor de Bioquímica I en la Universidad Nacional de Quilmes desde marzo de 2001, en Planta Interina desde junio de 2007.

### BECAS OBTENIDAS

Entrenamiento - CIC – Buenos Aires. 10/2000 – 9/2001. Estudio de Posgrado - CIC – Buenos Aires. 4/2002– 3/2004. Doctoral - CONICET. 4/2004-3/2009.

### VIAJES DE CAPACITACIÓN

Visitó el laboratorio de la Profesora. Kerstin Huss-Danell en Umeå, Suecia, como parte del proyecto apoyado económicamente por STINT, desde el 1 de Septiembre hasta el 29 de Noviembre de 2004. Realizó experimentos con el sistema simbiótico *Frankia* – plantas actinorrhizas, me entrené en el reconocimiento de centros de división celular de raíces de *Alnus* y di un seminario en base a los resultados obtenidos.

### SUBSIDIOS OBTENIDOS

"Subsidios de Apoyo a la investigación para estudiantes de grado e investigadores en formación de la Universidad Nacional de Quilmes". \$ 2000, 12/2006-11/2007.

### CURSOS DE POSGRADO REALIZADOS

1. "BIOLOGÍA DE ACTINOMYCETES". Universidad Nacional del Comahue (CRUB). Julio de 2007 en la ciudad de Bariloche.
2. "INTERACCIONES ENTRE PLANTAS Y MICROORGANISMOS. Bases moleculares, bioquímicas y fisiológicas". Universidad Nacional de General San Martín (INTECH). Septiembre de 2006 en la ciudad de Chascomús.
3. "BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION AND THE USE OF N BY THE PLANT" Universidad Nacional de Quilmes. Octubre de 2005.
4. "INTERACCIÓN PLANTA-BACTERIA. El rol de polisacáridos y proteínas bacterianas de superficie". Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Río Cuarto. Diciembre de 2003.
5. "ASPECTOS FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS DE LAS RELACIONES PLANTA - MICROORGANISMOS". IFFIVE, Ciudad de Córdoba Marzo de 2003.
6. "BIOLOGÍA DEL SUELO" "Tópicos seleccionados e Interacciones Microbiológicas" Instituto de Investigaciones Bioquímicas – Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Noviembre de 2001.

### TRABAJOS PUBLICADOS

1. **Gabbarini, L.**, y Wall, L. (2008): Analysis of nodulation kinetics in *Frankia-Discaria trinervis* symbiosis reveals different factors involved in the nodulation process. *Physiologia Plantarum* 133, 776-785.
2. dos Santos, M., y **Gabbarini, L.** (2005): Hidroponia y promoción de crecimiento de plántulas de tomate inoculadas con bacterias PGPR. *Serie Digital Ciencia y Tecnología*, 65-74.

### TRABAJOS ENVIADOS

1. Gabbarini, L. y Wall, L. (2008): Analysis of Actinorhizal Nodulation: Diffusible Signal Factors are not enough for symbiotic recognition between *Frankia* and its host plant. Enviado a Plant Physiology.

#### TRABAJOS EN PREPARACIÓN

1. Gabbarini, L. y Wall, L. Factores difusibles de *Frankia* involucrados en la nodulación de *Discaria trinervis*.

#### PRESENTACIONES A CONGRESOS

1. **L Gabbarini** y L Wall. Study of early interactions and recognition phenomena in actinorhizal symbioses with different infections pathways. 15 th International *Frankia* and Actinorhizal Plants Meeting. October 19-23, 2008, Bariloche, Argentina.
2. D Valdés, L Imanishi, **L Gabbarini**, K Huss-Danell and L Wall. Actinomycetes different from *Frankia* induce effective nodulation in *Alnus acuminata* and can be genetically transformed. 15 th International *Frankia* and Actinorhizal Plants Meeting. October 19-23, 2008, Bariloche, Argentina.
3. **L Gabbarini** y L Wall. Estudio de Quorum Sensing en bacterias del género *Frankia*. XI Congreso Argentino de Microbiología. 10-12 de Octubre de 2007, Ciudad de Córdoba, Argentina.
4. **L Gabbarini** y L Wall. Estudio de complementación fisiológica para la nodulación entre *Frankia* y plantas actinorrícicas heterólogas. III Congreso Argentino de Microbiología General. 5 y 6 de Octubre de 2006, Quilmes, Argentina.
5. **L Gabbarini** y L Wall. Interactions between *Frankia* and actinorhizal plants with different infection pathways. 14th International Meeting on *Frankia* and Actinorhizal Plants. July 15-18, 2006. Umeå, Sweden.
6. **L Gabbarini** y L Wall. Factores de interacción simbiótica evidenciados por el análisis de la nodulación de *Discaria trinervis* con *Frankia*. V Reunión Nacional Científico Técnica de Biología del Suelo. 6-8 de Julio de 2005, San Salvador de Jujuy, Argentina.
7. **L Gabbarini** y L Wall Simbiosis *Frankia* - *Discaria trinervis*: factores extracelulares de la bacteria modifican la susceptibilidad de la planta para el desarrollo del nódulo radicular. XXV Reunión De Fisiología Vegetal, SAFV, 22-24 setiembre 2004, Santa Rosa, La Pampa.
8. **L Gabbarini** and L Wall. *Frankia* diffusible signal factor(s) can modify bacterial activity for nodulation and susceptibility of *Discaria trinervis* root for infection and nodule development. XIII Symposium on *Frankia* and Actinorhizal Plants 1-4 August 2004, New Hampshire, USA.
9. **L Gabbarini** y L Wall. Aumento de la velocidad de nodulación de *Discaria trinervis* por activación de *Frankia* en ausencia de la planta. IV Reunión Nacional Científico - Técnica de Biología de Suelos, IV Encuentro Sobre Fijación Biológica de Nitrógeno. Termas de Río Hondo, Argentina. Julio de 2003..
10. **L Gabbarini** y L Wall. Bacteria - bacteria interaction modifies nodulation rate in *Frankia* - *Discaria trinervis* symbiosis. 4<sup>th</sup> International Symbiosis Society Congress. Halifax, Nova Scotia, Canadá. Agosto de 2003.
11. **L Gabbarini** y Wall L. Interacciones tempranas en la simbiosis actinorrícica. Libro de actas XI reunión Latinoamericana de Fisiología Vegetal. Punta del Este, Uruguay. 22 al 25 de Octubre de 2002.
12. LG Wall, **L Gabbarini**. Novel interactions between *Frankia* and actinorrizal plants. Book of abstracts 8<sup>th</sup> New Phytologist Symposium, Helsinki, Finland, June 9-14, 2002.
13. **L Gabbarini**, L Wall. Early interaction in *Alnus acuminata*-*Frankia* symbiosis. More

- than one signal to control root hair deformation?. Book of abstracts 12<sup>th</sup> International Meeting on *Frankia* and Actinorhizal Plants. Carry-le-Rouet, France. 17 al 21/6/2001.
14. Wall LG, Valverde C, Chaia E, Enrico R, Valdés La Hens D, Ferrari A, Ramirez S, Lucki G, Obertello M, **Gabbarini L**, Massa G. News from research on south american native plants *Discaria trinervis* and *Alnus acuminata*. 5<sup>th</sup> International PGPR Workshop, Carlos Paz, Argentina, 29 Oct 3 Nov 2000. *Frankia*-actinorhizal plant symbioses.
  15. **L Gabbarini**, L Wall. Interacciones entre la susceptibilidad a patógenos y la simbiosis en plantas actinorrícicas. Libro de actas XIII Reunión argentina de Fisiología Vegetal, Río Cuarto, Argentina. 29/11 al 1/12 de 2000.

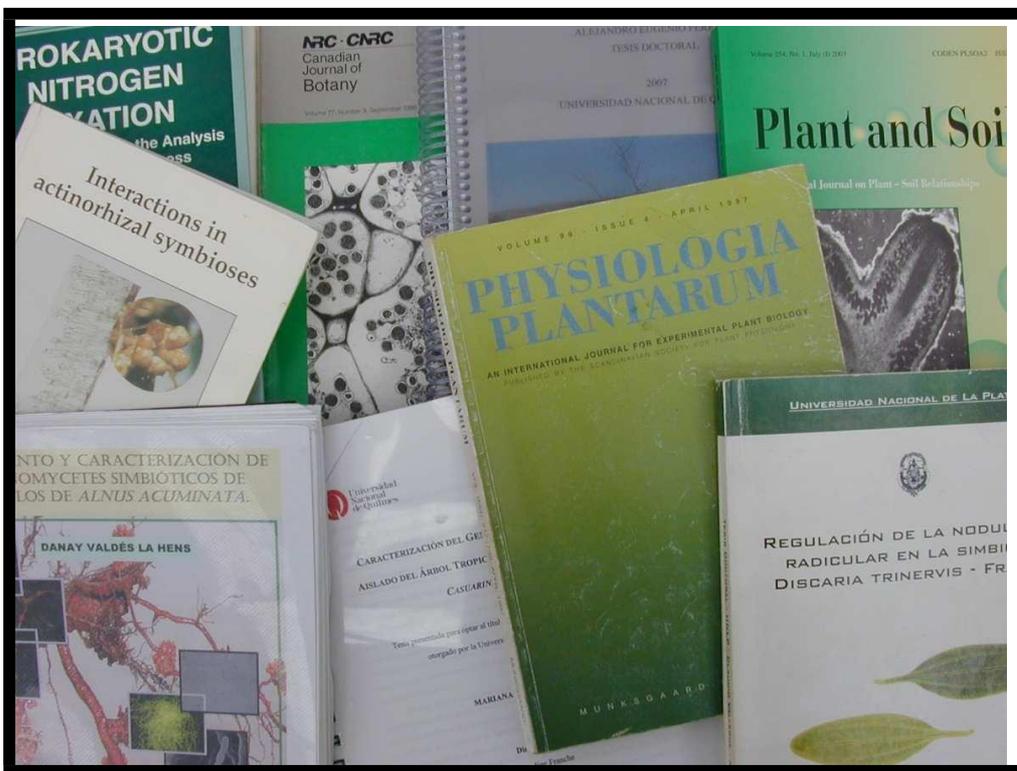
Parte de mis resultados experimentales fueron expuestos en forma oral por Luis Wall en conferencias a las que fue invitado por el comité organizador:

1. Nodulation of *Discaria trinervis* by *Frankia*. 14th International Congress on Nitrogen Fixation, Beijing, China, Octubre 27 - Noviembre 1, 2004.
2. Early interactions between *Frankia* and actinorhizal plants. XXII RELAR y I RBFBN, Miguel Pereira, Rio de Janeiro, Brasil, 13 a 15 de Septiembre de 2004.
3. Bacteria - bacteria interaction modifies nodulation rate in *Frankia* - *Discaria trinervis* symbiosis. 4<sup>th</sup> International Symbiosis Society Congress. Halifax, Nova Scotia, Canadá. Agosto de 2003.

## ABREVIATURAS

Act	actinorodina
AHL	acil-L-homoserín lactona
AI-2	Autoinductor 2
AIP	Péptido autoinductor, (del inglés <u>a</u> u <u>t</u> o <u>i</u> nducing <u>p</u> eptides)
BLAST	del inglés <u>b</u> asic. <u>l</u> ocal <u>a</u> lignment <u>s</u> earch tool)
CCSM	moléculas de señalización célula a célula (del inglés <u>c</u> ell- <u>t</u> o- <u>c</u> ell <u>s</u> ignal <u>m</u> olecules)
CD	dominio conservado (del inglés <u>c</u> onserved <u>d</u> omain)
DSF	Factor de señalización difusible (del inglés, <u>d</u> iffusible <u>s</u> ignal <u>f</u> actor)
E 1/10	solución Evans diluida al décimo
FD	Factor difusible
GAB	-butirolactona
HHL	N-hexanoil-L-homoserinlactona
HPK	proteína histidín quinasa, (del inglés <u>h</u> istidin <u>p</u> rotein <u>k</u> inase)
HTH	hélice giro hélice (del inglés <u>h</u> elix turn <u>h</u> elix)
N-	sin nitrógeno
pcv	volumen de empaquetamiento celular, (del inglés <u>p</u> acked <u>c</u> ell <u>v</u> olume)
QS	Quorum Sensing
Red	undecilprodigiosina
RFLP	del inglés <u>r</u> estriction <u>f</u> ragment <u>l</u> ength <u>p</u> olymorphism
RR	regulador de respuesta
RT	punta radicular (del inglés <u>r</u> oot <u>t</u> ip)
SE	error estándar (del inglés <u>s</u> tandard <u>e</u> rror)
$t_0$	tiempo que transcurre post inoculación hasta la aparición del primer nódulo
$t_{NOD}$	tiempo total de nodulación
ufc	unidad formadora de colonia
$v_0$	velocidad de nodulación inicial
$v_R$	segunda velocidad de nodulación

## Capítulo 1 “Introducción a la Simbiosis actinorrónica”



LAG

### 1.1 Situación actual

Las plantas actinorrónicas son definidas por su habilidad de formar nódulos fijadores de nitrógeno en simbiosis con actinomicetes del género *Frankia*. Esta simbiosis involucra al actinomicete y a la raíz de plantas dicotiledóneas de 8 familias: *Betulaceae*, *Casuarinaceae*, *Myricaceae*, *Eleagnaceae*, *Rhamnaceae*, *Rosaceae*, *Coriariaceae* y *Datisceae*, comprendiendo 25 géneros (Carú y col., 2003) (Tabla 1). Los nódulos radiculares actinorrónicos son los órganos donde se lleva a cabo la fijación de nitrógeno por parte de *Frankia* y la asimilación del N fijado por parte de la planta.

El microsimbionte filamentoso Gram positivo *Frankia* pertenece a la familia *Frankiaceae*, suborden *Frankineae*, orden *Actinomycetales*, subclase *Actinobacteridae* y clase *Actinobacteria* (Goodfellow, 1986; Normand y col., 1996). Si bien las células de este género se vienen estudiando desde hace más de un siglo, el primer aislamiento exitoso y reproducible de *Frankia* se documentó en 1978 y se trató de la cepa Cpl1, aislada de

*Comptonia peregrina* (Callaham y col., 1978) en el laboratorio de Torrey. A partir de esta fecha creció notablemente la cantidad de científicos en todo el mundo que se volcaron al estudio de *Frankia*, incrementándose como consecuencia lógica la cantidad de aislamientos a partir de nódulos y el conocimiento en taxonomía, fisiología, bioquímica y genética de este organismo en cultivo (Huss-Danell, 1997; Wheeler y col., 2008). A pesar de los avances logrados en los últimos 30 años, son muchos los aspectos que aún permanecen oscuros debido a la carencia de herramientas genéticas para trabajar con los aislamientos de *Frankia*. Aun no se ha logrado encontrar un vector apropiado ni técnicas de conjugación y transformación que permitan generar mutantes y con su estudio avanzar en el conocimiento de la simbiosis. Recientemente se han obtenido las secuencias de los tres primeros genomas de *Frankia* (Normand y col., 2007) y se especula que a partir de dicha información se pueda avanzar en el aspecto genético de *Frankia*.

Todas las plantas excepto *Datisca*, que es una herbácea, son árboles o arbustos leñosos. Estas plantas habitan varios ambientes diferentes y suelen ser pioneras en las etapas tempranas de sucesión de suelos pobres en nitrógeno. Las tasas de fijación de nitrógeno en las simbiosis actinorrícicas son altas y comparables a las de la simbiosis entre rizobios y leguminosas. Esta ventaja, sumada a la capacidad de crecer en ambientes muy disímiles que incluyen suelos secos tropicales, tierras inundadas, bosques, dunas arenosas, pantanos subárticos, tundra, tierras donde hubo glaciares, chaparrales y matorrales, hacen que las plantas actinorrícicas resulten muy importantes y deban ser consideradas a la par de árboles leguminosos para planes de reforestación y restauración de suelos (Clawson y Benson, 1999; Dawson, 1986; Torrey, 1978).

## 1.2 Historia de la simbiosis actinorrícica

La simbiosis actinorrícica fue conocida desde fines del siglo XIX y hasta el año 1978 por la denominación poco informativa de **simbiosis fijadora de nitrógeno de plantas no leguminosas**. Ese año, en el congreso de Harvard Forest en Petersham, Massachusetts, se propuso el término **actinorhizal**, palabra inglesa que se traduce al español como **actinorrizas**. Esta denominación surge a partir de la unión de los términos **actyno** (en inglés) que hace referencia al actinomicete *Frankia* y **rhiza** (en inglés) que refiere a la raíz vegetal involucrada en la simbiosis (Tjepkema y Torrey, 1979). Esta denominación es análoga al término micorriza, mucho más antiguo que se usa para describir la simbiosis entre hongos y raíces vegetales.

El estudio de las plantas actinorrícicas comenzó hace aproximadamente 180 años,

aunque las publicaciones en esa época fueron bastante esporádicas. La primera cita en la que se describe un nódulo actinorrícico data de 1829, y allí Meyen, quien estudiaba plantas parasitarias, mencionó nódulos en las raíces de alisos (*Alnus glutinosa*) que crecían en la proximidad de zonas húmedas y sugirió que en el interior de los mismos se hallaban plantas parasitarias (Meyen, 1829). En 1853 Schacht consideró que los nódulos eran un ejemplo de crecimiento defectuoso (Schacht, 1853), y pocos años después von Jager sugirió que los nódulos se formaban a partir de mordeduras de insectos (von Jager, 1860). Además por aquella época se describieron nódulos en *Ceanothus intermedius* (Gasparrini, 1851) y en *Hippophae rhamnoides* (Oersted, 1865). Estudios anatómicos del nódulo radicular mostraron la presencia de hifas intercelulares (Woronin, 1885), pero la naturaleza del microorganismo estaba en discusión y solía ser referido como un hongo parasitario o un mixomicete.

Hacia fines del siglo XIX se logró obtener evidencia experimental para demostrar que plantas de *Alnus glutinosa* noduladas tenían la capacidad de utilizar el nitrógeno atmosférico (Hiltner, 1895). Más adelante en la línea temporal, entre 1950 y 1978 Bond y colaboradores demostraron que existe un incremento en el nitrógeno total de las plantas actinorrícicas noduladas. Sus experimentos también mostraron que los factores ambientales (pH, oxígeno gaseoso, amonio, nitrato, período de luz) afectan a la nodulación y a la fijación de nitrógeno atmosférico (Bond, 1955; Bond, 1956)

### 1.3 El microsimbionte: *Frankia*

El nombre genérico *Frankia* fue propuesto inicialmente por Bruncchorst entre los años 1886 y 1888 en honor al microbiólogo suizo Frank para describir los endófitos de raíces noduladas de plantas no leguminosas. El nombre fue adoptado por Becking (1970) en sus estudios taxonómicos (Becking, 1970) y ahora es mundialmente aceptado. *Frankia* es, hasta el día de la fecha, el único miembro confirmado de la familia *Frankiaceae*.

Los miembros del género *Frankia* son generalmente definidos como actinomicetes fijadores de nitrógeno que forman nódulos radiculares en simbiosis con las 200 especies de plantas actinorrícicas (Benson y Silvester, 1993; Huss-Danell, 1997). Los primeros intentos que se hicieron con intención de caracterizar taxonómicamente a esta bacteria, referían al microsimbionte como una bacteria simbiótica obligada que utiliza sus capacidades, ya sea desarrollo de filamentos o de vesículas dentro de las células del nódulo, como criterio de diferenciación respecto del resto de los actinomicetes (Becking, 1970).

Las células de *Frankia* ocupan dos nichos ecológicos diferentes, el nódulo radicular y el suelo. Aunque hay poca información acerca de la actividad fisiológica de *Frankia* en el suelo,

utilizando un ensayo clásico de planta trampa, donde potenciales plantas hospedadoras son inoculadas con una suspensión de suelo, han mostrado que hay *Frankia* en el suelo donde crecen las plantas hospedadoras (Huss-Danell, 1997; Valdés, 2008), e inclusive donde las plantas hospedadoras no han crecido por largo tiempo (Burleigh y Dawson, 1994) o sorpresivamente, en suelos donde no hay conocimiento de que haya crecido alguna vez la planta hospedadora (Huss-Danell, 1997; Huss-Danell y Frej, 1986). Se ha encontrado *Frankia* en ecosistemas muy diversos que van desde suelos del círculo polar a suelos con roca volcánica (Burleigh y Dawson, 1994; Valdés, 2008).

Como ya se mencionó anteriormente, el primer aislamiento exitoso de *Frankia* se obtuvo hace aproximadamente 30 años, y desde esa fecha cientos de aislamientos se han obtenidos a partir de nódulos radiculares, el principal nicho ecológico de diferentes especies actinorrícicas aunque no de todas (Huss-Danell, 1997), usando diferentes técnicas de aislamiento (Baker, 1990; Baker y col., 1979a; Baker y O'Keefe, 1984; Baker y col., 1979b; Benson, 1982; Berry y Torrey, 1979; Diem y Dommergues, 1983). Por otro lado, hasta la fecha, solo existe un reporte en el cual se habría logrado aislar con éxito *Frankia* a partir de su segundo nicho ecológico en importancia, el suelo (Baker y O'Keefe, 1984). La gran dificultad para obtener aislamientos de *Frankia* se debe en gran parte a los elevados tiempos de duplicación *in vitro*, al requerimiento de factores especiales no siempre conocidos (Quispel y col., 1989), el desconocimiento de requerimientos nutricionales específicos de los cultivos puros (Akkermans et al., 1992), y la gran variabilidad de aislamientos combinados en el género *Frankia* (Akimov and Dobritsa, 1992; Fernandez et al., 1989; Lechevalier, 1994).

### **1.3.1 Morfología y fisiología**

*Frankia* tiene la capacidad de diferenciarse en al menos tres tipos de células y estas tres formas de células son observadas tanto en cultivo puro (*in vitro*) como en su hábitat simbiótico (*in planta*). Las células vegetativas son filamentosas y forman un micelio a partir del cual se generan las otras dos formas celulares. Los esporangios multiloculados, típicos del género, contienen numerosas esporas ovoides y son producidos con frecuencia *in vitro* si el medio de cultivo presenta "ciertos requerimientos nutricionales" pero en la planta solo se los encuentra en algunas plantas de ciertos géneros (Baker y Schwintzer, 1990). Las vesículas son estructuras esféricas con pared gruesa formada por una multicapa lipídica compuesta de hopanoides que nacen sobre una corta ramificación lateral del micelio vegetativo y es producida solo si *Frankia* crece en ausencia de Nitrógeno. La forma de esta estructura cuando es desarrollada en la planta es determinada por la planta hospedadora

(Lalonde, 1979), por ejemplo, vesículas producidas por la misma cepa de *Frankia* son esféricas en nódulos de *Alnus* y con forma de bate de beisbol en *Myrica*. La enzima nitrogenasa ha sido encontrada en estas estructuras especializadas tanto en cultivos (*in vitro*) (Meesters y col., 1985; Meesters y col., 1987) como en la planta (Sasakawa y col., 1988). Las vesículas serían funcionalmente análogos a los heterocistos en cianobacterias porque ambos restringen la difusión de oxígeno del sitio donde se encuentra el complejo de la enzima nitrogenasa (Baker y Schwintzer, 1990).

Las bacterias del género *Frankia* son heterotróficas, aeróbicas y algunas microaerófilas. A partir de los estudios realizados de los aislamientos en cultivo puro, se logró conocer y entender muchos aspectos más relacionados con la fisiología y la morfología de *Frankia*. Estas bacterias, una vez aisladas, generalmente crecen bien en medios simples formulados con las principales sales, una fuente de carbono (propionato, piruvato, glucosa y acetato son las más usadas), y solo unas pocas cepas requieren aditivos complejos para su crecimiento (Lechevalier y Lechevalier, 1990). Muchas cepas de *Frankia* degradan celulosa y algunas tienen actividad pectinasa. La trealosa y el glicógeno son las principales moléculas utilizadas como reserva de energía dentro del género *Frankia* (Baker y Schwintzer, 1990).

Las células de *Frankia* se caracterizan por tener una pared celular tipo-III que contiene ácido meso-aminopimélico, ácido glutámico, alanina, glucosamina y ácido murámico, fosfolípidos tipo PI, con fosfatidil inositol, fosfatidil manosidos y difosfatidil glicerol, 2-O-metil-D- manosa (Lechevalier, 1994).

La enzima nitrogenasa de *Frankia* es, como en todos los microorganismos que la poseen, altamente sensible al O<sub>2</sub>. Esta característica presenta un gran dilema fisiológico, pues *Frankia* necesita un gran flujo de O<sub>2</sub> para suplir el gran costo energético que requiere el complejo nitrogenasa. Los nódulos actinorrícos, pueden desarrollar dos potenciales mecanismos de controlar el O<sub>2</sub>, uno al nivel de la vesícula, controlando el grosor de la pared, y el otro al nivel de la estructura y la fisiología del nódulo (Silvester y col., 1998).

### **1.3.2 Taxonomía**

Los intentos iniciales para caracterizar taxonómicamente a esta bacteria se realizaron considerando al microsimbionte como una bacteria simbiótica obligada y usaron su habilidad para desarrollar nódulos radiculares y sus características morfológicas, entiéndase, formación de filamentos y vesículas dentro de la célula vegetal, como criterio distintivo respecto de otros actinomicetes (Becking, 1970; Hahn, 2008). En un primer intento de definir especies fueron propuestas 10 especies diferentes dentro del género *Frankia* usando como

criterio la infectividad en grupos de inoculación cruzadas, definiendo especificidad de planta hospedadora y utilizando como inóculo (macerado) de nódulos (Becking, 1970). Investigaciones posteriores realizadas con la posibilidad de utilizar cultivos puros, demostraron que los grupos de infección según la planta hospedadora eran muy diferentes (Baker, 1987).

Los aislamientos de *Frankia* pueden ser claramente diferenciados de bacterias de otro género sobre la base de sus características morfológicas, citoquímicas y fisiológicas (Baker, 1990). Entre las características distintivas de los aislamientos se encuentran: el crecimiento filamentosos, la formación de esporangios multiloculados conteniendo esporas no móviles y la diferenciación de vesículas en el extremo de los filamentos en vesículas, siendo éstas, estructuras de pared gruesa (Lechevalier, 1994).

La combinación de características fenotípicas ha sido una herramienta útil para la identificación de *Frankia*, aunque alguna de las características sea compartida por otros organismos. Los caracteres morfológicos y el tipo de pared celular de *Frankia* fue la base para una clasificación en un taxón morfológico, caracterizado por el “esporangio multilocular” (Goodfellow, 1986). Sin embargo, la expresión y la presencia de varias de las características de *Frankia*, pueden variar respecto de un aislamiento a otro y de las condiciones de crecimiento. Por ejemplo, la medida de la formación de esporangios varía de aislamiento a aislamiento y puede estar totalmente suprimida bajo determinadas condiciones de crecimiento. También se pueden encontrar esporas de *Frankia* en nódulos de varias plantas actinorrhizas como por ejemplo *Alnus sp.* (van Dijk, 1984; van Dijk y Weber, 1988; Weber, 1986). Sin embargo, las bacterias que producen esporas dentro del nódulo (tipo espora (+)) hasta la fecha no se las ha podido obtener en cultivo puro, de esta manera, todas las cepas de *Frankia* que se obtuvieron en cultivo puro a partir de nódulos espora (+) fueron tipo espora (-) en planta.

Más recientemente, en paralelo con los avances que se han producido en la biología molecular, han incrementado las posibilidades tecnológicas para realizar análisis taxonómicos. Esto ha generado una serie de estudios que basan la taxonomía en diferentes criterios como: plásmidos totales (Simonet y col., 1988), genes *nif* (Normand y col., 1996; Rouvier y col., 1996; Simonet y col., 1991; Simonet y col., 1990), regiones intergénicas (RI) (Lumini y Bosco, 1996; Navarro y col., 1997; Simonet y col., 1991), gen de la glutamina sintasa (Cournoyer y Lavire, 1999; Rochefort y Benson, 1990), el gen *recA* (Marechal y col., 2000), y los ARNs ribosomales (Hahn, 2008; Navarro y col., 1997; Simonet y col., 1994), han sido usados extensa y exitosamente para la caracterización de aislamientos tanto como para la identificación de endófitos de nódulos radiculares no cultivables. El avance más

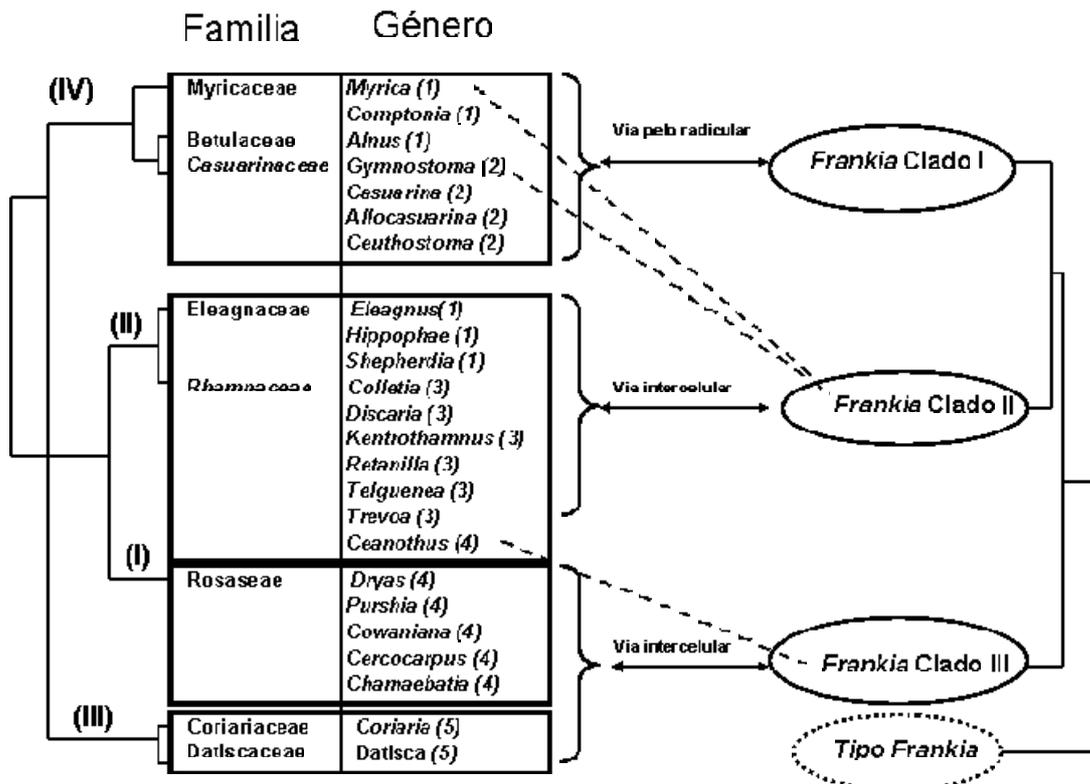
significativo en el estudio de la taxonomía de *Frankia* proviene de la utilización de la taxonomía polifásica, en la que se integra información proveniente de un amplio rango de técnicas con diferente grado de resolución taxonómica (Hahn, 2008; Murray y col., 1990). Esta técnica revela mucha información acerca de la diversidad genética, la distribución de *Frankia* y expande el conocimiento acerca de la especificidad entre la planta hospedadora y el microsimbionte. Debido a las serias dificultades para aislar *Frankia* a partir de nódulos radiculares se han hecho análisis basados en secuenciación de productos génicos obtenidos por PCR. Estas técnicas han sido muy útiles para revelar la relación filogenética de aislamientos y de endófitos de nódulos no cultivables de muchas plantas actinorrícicas de las cuales no se han obtenido aislamientos. Los árboles filogenéticos generados a partir de las secuencias del ADN ribosomal 16S (Normand y col., 1996) generaron 3 clados principales de *Frankia* y un cuarto de actinomicetes “tipo *Frankia*” que se comporta como Nod- y Fix- (Figura 1). Hay varios aislamientos conocidos incluidos en los clados I y II, mientras que hasta la fecha no se han obtenido aislamientos puros del clado III, el cual está definido sobre la base de ADN extraído de nódulos (Hahn, 2008; Wall, 2000). Estudios realizados usando el gen *glnA* (glutamina sintetasa I) que presenta más variabilidad que el gen ribosomal 16S, amplificado de nódulos y de diferentes aislamientos, han confirmado la existencia de tres clados principales dándole mayor solidez a la división propuesta (Benson y Clawson, 2000).

#### 1.4 Plantas actinorrícicas

Las plantas actinorrícicas se distribuyen entre ocho familias de plantas angiospermas que se denominan así por ser noduladas por *Frankia*. Hasta fines de la década del 70 del siglo XX, solo siete familias eran conocidas como plantas actinorrícicas hasta que Chaudhary (1979) reportó que *Datisca* (Datiscaceae) también forma simbiosis con *Frankia*.

La taxonomía clásica, basada en estudios morfológicos y florísticos, sugirió que la distribución de las plantas actinorrícicas a través de las ocho familias se caracterizaba por la no relación taxonómica, introduciendo así, la posibilidad de que las simbiosis fijadoras de nitrógeno que involucran a las plantas actinorrícicas y leguminosas tuvieron origen en grupos de plantas taxonomicamente diferentes. Este concepto fue cambiado a partir de los hallazgos de Swensen y Mullin quienes priorizaron técnicas moleculares por encima de los criterios morfológicos para estudiar la filogenia de las plantas actinorrícicas. Utilizando datos de la secuencia del gen de la subunidad mayor de la Rubisco (*rbcL*) mostraron que los representantes de las ocho familias de plantas actinorrícicas, junto con los representantes de las familias de las leguminosas noduladas por rizobios pertenecen a un solo clado de fijación

de nitrógeno (Soltis y col., 1995). Hasta la fecha se han definido 4 grupos de plantas actinorrícicas (Figura 1). La distribución geográfica de las especies actinorrícicas soportan esta distribución en grupos (Benson y Clawson, 2000). Datos moleculares adicionales, junto con árboles filogenéticos construidos a partir de los genes *nifH* y de la secuencias de los ADN ribosomales 16S de *Frankia*, han dado información importante acerca de la coevolución en la simbiosis actinorrícica y sugiere que esta simbiosis se originó tres veces después de la divergencia del clado de las plantas superiores (Benson y Clawson, 2000).



**Figura 1. Grupos filogenéticos de Frankia y plantas actinorrhizas.** El número entre paréntesis que se indica después del género indica la distribución geográfica nativa: (1) en la mayoría de los continentes, (2) en Australia, (3) en América del Sur y sur de Nueva Zelanda, (4) en el oeste de América del Norte y (5) en zonas de climas templados. Los grupos I-IV fueron propuestos por Soltis y col. (1995). Adaptado de Wall (2000).

### 1.4.1 Distribución geográfica de las plantas actinorrhizas

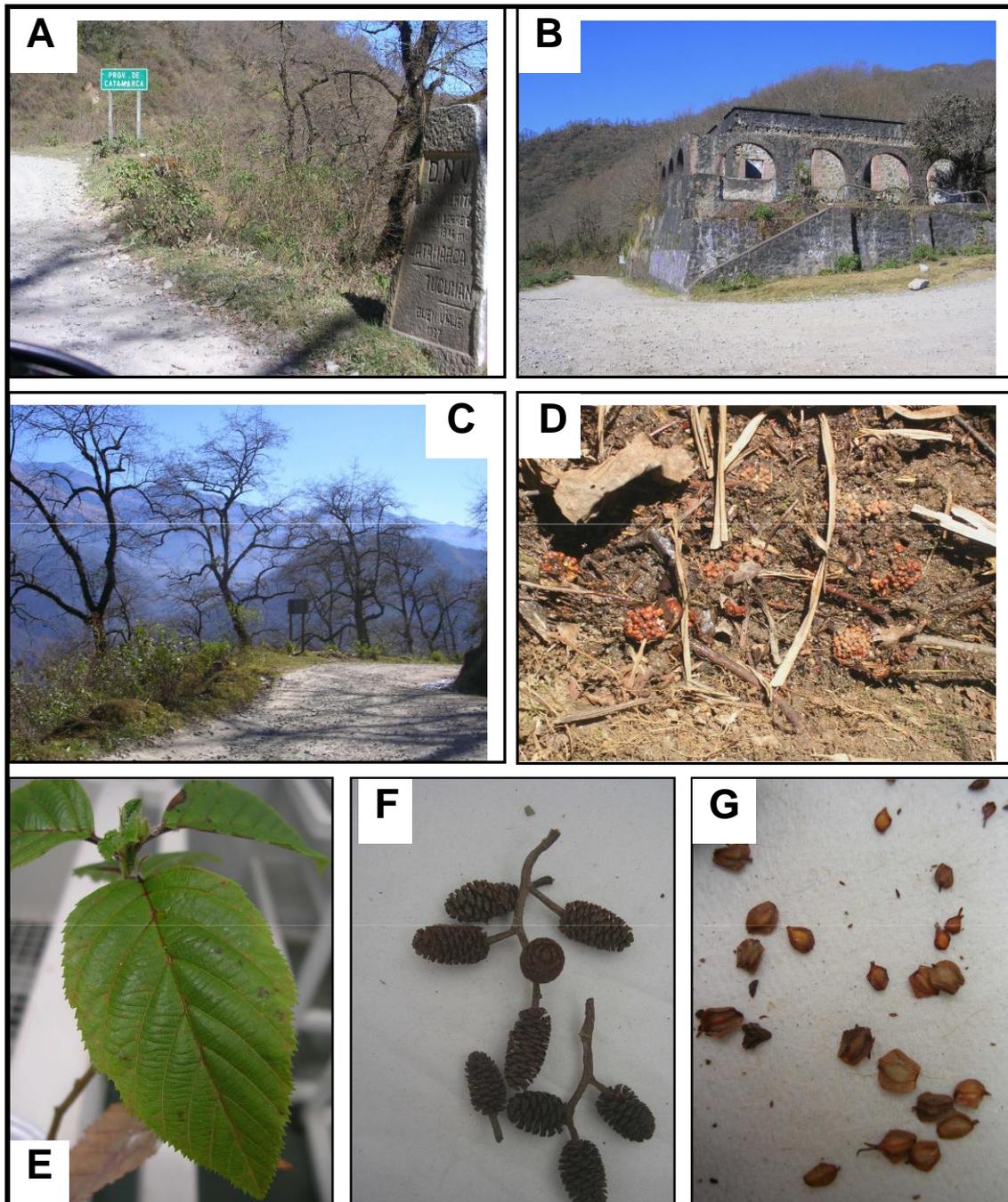
A excepción de la Antártida, las plantas actinorrhizas se encuentran en todos los continentes.

*Alnus* es el único miembro actinorrhizo de la familia betulaceae. Las especies de *Alnus* se encuentran ampliamente distribuidas en regiones templadas del hemisferio norte, a excepción de *A. glutinosa* (L.) Gaertn., que se extiende en África y los alisos andinos, *A. acuminata* HBK (Figura 2), que se distribuyen a lo largo del cordón andino, desde América Central hasta Argentina (Figura 2). *Alnus* crece en un amplio rango de ecosistemas, inclusive en glaciales, montañas arenosas, turberas y sobre ceniza volcánica (Schwencke y Carú, 2001).

La familia *Casuarinaceae* presenta 4 géneros y al menos 96 especies. Los géneros

son: *Gymnostoma* L. Johnson (18 especies, en Queensland, Malasia e Islas Fiji), *Ceuthostoma* L. Johnson (2 especies en Malasia, desde Palawan y Borneo hasta Nueva Guinéa), *Casuarina* L. (17 especies, 6 en Australia, las otras desde el Bengala a Polinesia) y *Allocasuarina* L. Johnson (58 especies, todas en Australia). Todas crecen bien en climas tropicales. Las especies de *Casuarina* son preferentemente encontradas en regiones con temperaturas cálidas y las de *Allocasuarina* se hallan principalmente en regiones de Australia donde el clima va de cálido a fresco (en el sur). Una característica de las plantas de esta familia es que tienen ramas delgadas y hojas relativamente pequeñas. Miembros de los cuatro géneros tienen la capacidad de nodular aunque con cepas de *Frankia* de diferente grupo, *Gymnostoma* son noduladas por cepas de *Frankia* del grupo 3, mientras que miembros de las familias *Casuarina* L. y *Allocasuarina* interactúan con un restringido conjunto de cepas de *Frankia* del grupo 1 (Maggia y Bousquet, 1994).

La familia Coriariaceae está compuesta tan solo por el género *Coriaria*, y éste, dependiendo de la clasificación, puede reunir entre 5 y 20 especies (Yokoyama y col., 2000). El género presenta una marcada distribución geográfica. Pueden encontrarse ejemplares en el Mediterráneo, Sudeste de Asia, América Central, América del Sur, Islas del Pacífico, Nueva Zelanda y Nueva Guinea. Se ha observado nodulación en especies provenientes de Nueva Zelanda, América Central, Europa y Asia central, pero aún no se ha determinado el número final de especies de *Coriaria* capaces de desarrollar nódulos (Mirza y col., 1994; Nick y col., 1992).



**Figura 2. *Alnus Acuminata*: algunas características de la planta.** *Alnus acuminata* crece en las laderas del sistema montañoso andino. (A) Mirador “La Banderita” ubicado entre el límite de las provincias de Tucumán y Catamarca a 2000 m de altura y situada en la Cuesta del Clavillo, dista a 48 kilómetros de la ciudad de Concepción. (B) Alta densidad de árboles de *Alnus* rodean una vieja construcción y el camino que une las dos provincias mencionadas. (C) *A. acuminata* sin hojas (foto tomada en junio). (D) Nódulos radiculares multilobulados de plantas adultas. (E) Plántula de *Alnus acuminata* germinada en el invernáculo. (F) Frutos maduros de *A. acuminata*. (G) Semillas de *A.*

*acuminata*.

A partir de trabajos de filogenia molecular se llegó a la decisión de ubicar al género *Datisca* como único género dentro de la familia Datisceaceae con solo dos especies, *D. cannabina* L. y *D. glomerata* (Presl.) Baill. Ambas especies presentan una muy interesante distribución geográfica, principalmente en el Mediterráneo y en la pendiente oeste de Sierra Nevada, desde el norte de California hasta Baja California (Swensen y col., 1994). Las dos especies desarrollan nódulos con un actinomicete *Frankia* que aún no ha podido ser cultivado en laboratorio, pero del cual recientemente se ha obtenido la secuencia de su genoma (en período de anotación) (Pawlowski y col. en prensa).

La familia Eleagnaceae contiene tres géneros, *Eleaagnus* L., *Hippophae* L., y *Shepherdia* Nutt. Al género *Elaeagnus* (45 especies) se le puede encontrar ejemplares nativos en América del Norte y Eurasia, aunque muchos miembros del género han sido cultivados y utilizados como regeneradores de suelos fuera de su hábitat natural y hoy se los encuentra con una gran dispersión geográfica (Baker y Schwintzer, 1990). El número de especies dentro del género *Hippophae* ha estado en disputa con un rango que va de 1 a 7 con numerosas subespecies (Bartish y col., 2002). Las distintas especies y subespecies de este género son nativas de Asia Central, distribuidas desde el Mar del Norte hasta el Mar Negro y al este de los Himalayas. *Shepherdia* está compuesta de 3 especies y se la encuentra solo en América del Norte (Mabberely 1988). Las especies *Elaeagnus*, *Shepherdia* y *Hippophae* son capaces de nodular inclusive en suelos no nativos. Las cepas de *Frankia* presentes en los nódulos provienen del Grupo filogenético 2 (Benecke, 1969; Clawson y col., 1998; Huguet y col., 2001).

La familia Myricaceae consiste de 3 géneros: *Morella*, *Myrica*, y *Comptonia*. De los tres géneros, *Morella* es el género más populoso presentando cerca de 50 especies descritas y al igual que las especies de *Myrica* muestran una amplia distribución en América del Norte, América del Sur, Europa, África y Asia. *Comptonia peregrina* L. es nativa de América del Norte. Se ha observado nodulación en todas las especies de *Myrica*, *Morella* y *Comptonia* (Navarro y col., 1999).

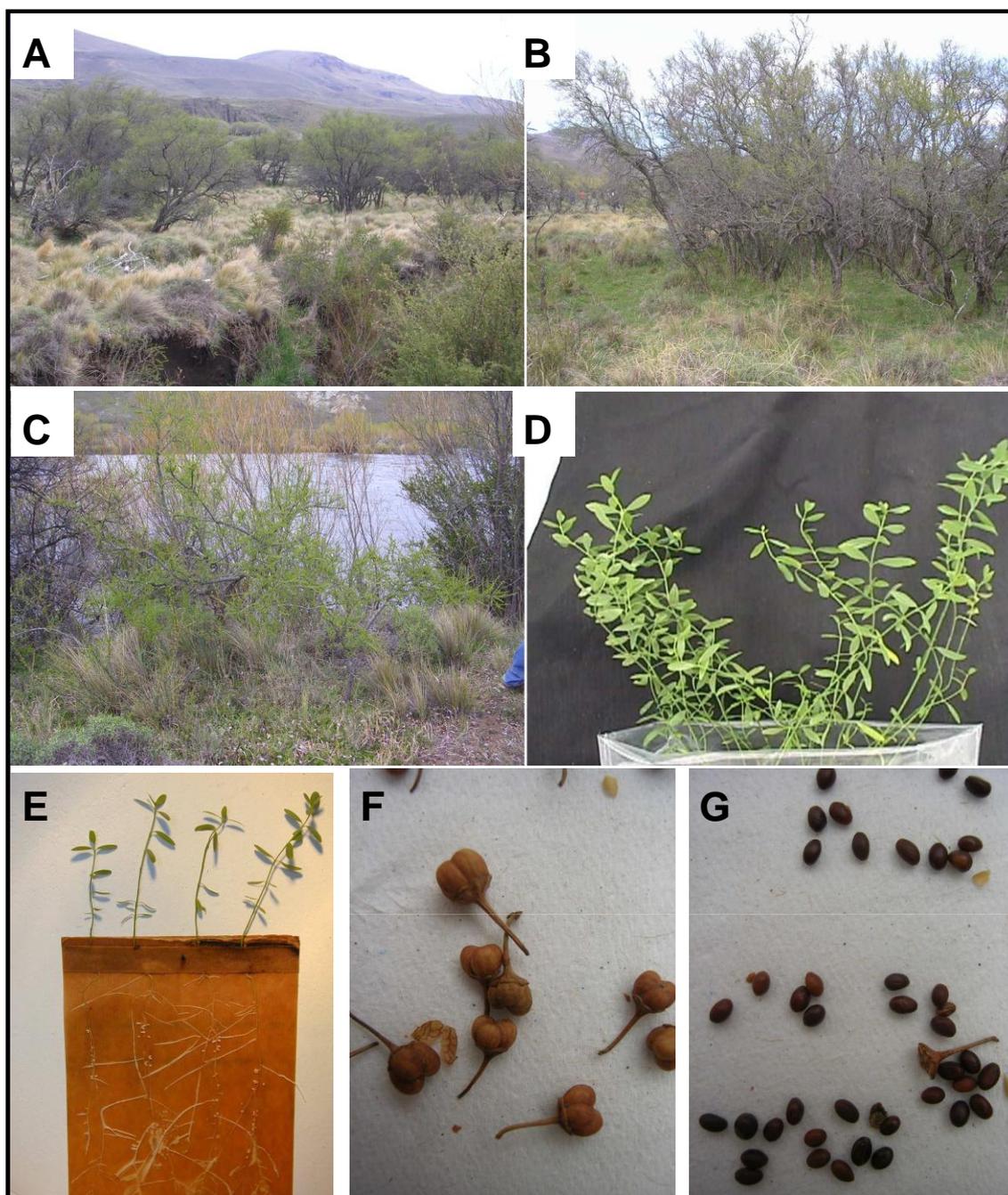
La familia Rhamnaceae contiene 50 géneros y alrededor de 900 especies que se distribuyen alrededor de todo el planeta (Richardson y col., 2000). Seis de los 50 géneros han sido identificados como actinorrícicos y a excepción de *Ceanothus* L., todos provienen de la tribu Colletieae Reis. Ex. Ende. Estos géneros son: *Colletia* Comm. Ex Juss. (17 especies en América del Sur), *Discaria* Hook. (15 especies en América del Sur, Australia y Nueva Zelanda) (Figura 3), *Kentrothamnus* Susseng, y *Overk* (1 especie en Bolivia), *Retanilla*

(DC) Brongn. (4 especies en Peru y Chile), y *Trevoa* Mires ex. Hook. (1 especie en América del Sur). Talgueña se incluye en el género *Trevoa* (Tortosa, 1992). El único miembro de la otra tribu Colletieae con naturaleza actinorrícica es *Adolphia* Meisner., y se halla en el sudeste de América del Norte (Cruz-Cisneros y Valdés, 1991). El otro género actinorrícico dentro de la familia Rhamnaceae es *Ceanothus* L., y cuenta con 55 especies que se encuentran estrictamente en América del Norte. La mayoría de los miembros de la familia Rhamnaceae que nodulan crecen en matorrales o chaparrales.

La familia Rosaceae cuenta con 122 géneros y unas 3000 especies (Heywood, 1993) pero tan solo 4 géneros son considerados actinorrícicos. Tres de los cuatro (*Cercocarpus*, *Chamaebatia* y *Purshia*) se los encuentra en Noroeste de América y el cuarto, *Dryas*, en la región Circumboreal, pero se la ha encontrado nodulada solo en América del Norte.

La habilidad de ciertos árboles actinorrícicos de formar nódulos fijadores de nitrógeno no está restringida a las raíces, existen árboles como *Casuarina equisetifolia* y *C. glauca* que pueden formar nódulos en sus tallos y los exhiben por encima del suelo (Prin y col., 1991; Valdés y Cruz-Cisneros, 1996). Estos nódulos aéreos se forman como raíces adventicias del tallo y son idénticos en estructura y morfología a los subterráneos.

La presencia de este tipo de nódulo se favorece con una alta humedad en el ambiente.



**Figura 3. *Discaria trinervis*: algunas características de la planta.** (A) Estepa neuquina (cerca de Bariloche). *D. trinervis* crece en las márgenes de ríos y arroyos de la etapa. (B) y (C) plantas (arbustos) a orillas del río Limay. (D) Set de plantas creciendo en el invernáculo. (E) Plántulas de *D. trinervis* creciendo en un pouche, donde se ven las raíces y los nódulos. (F) Frutos maduros de *D. trinervis*. (G) Semillas de *D. trinervis*.

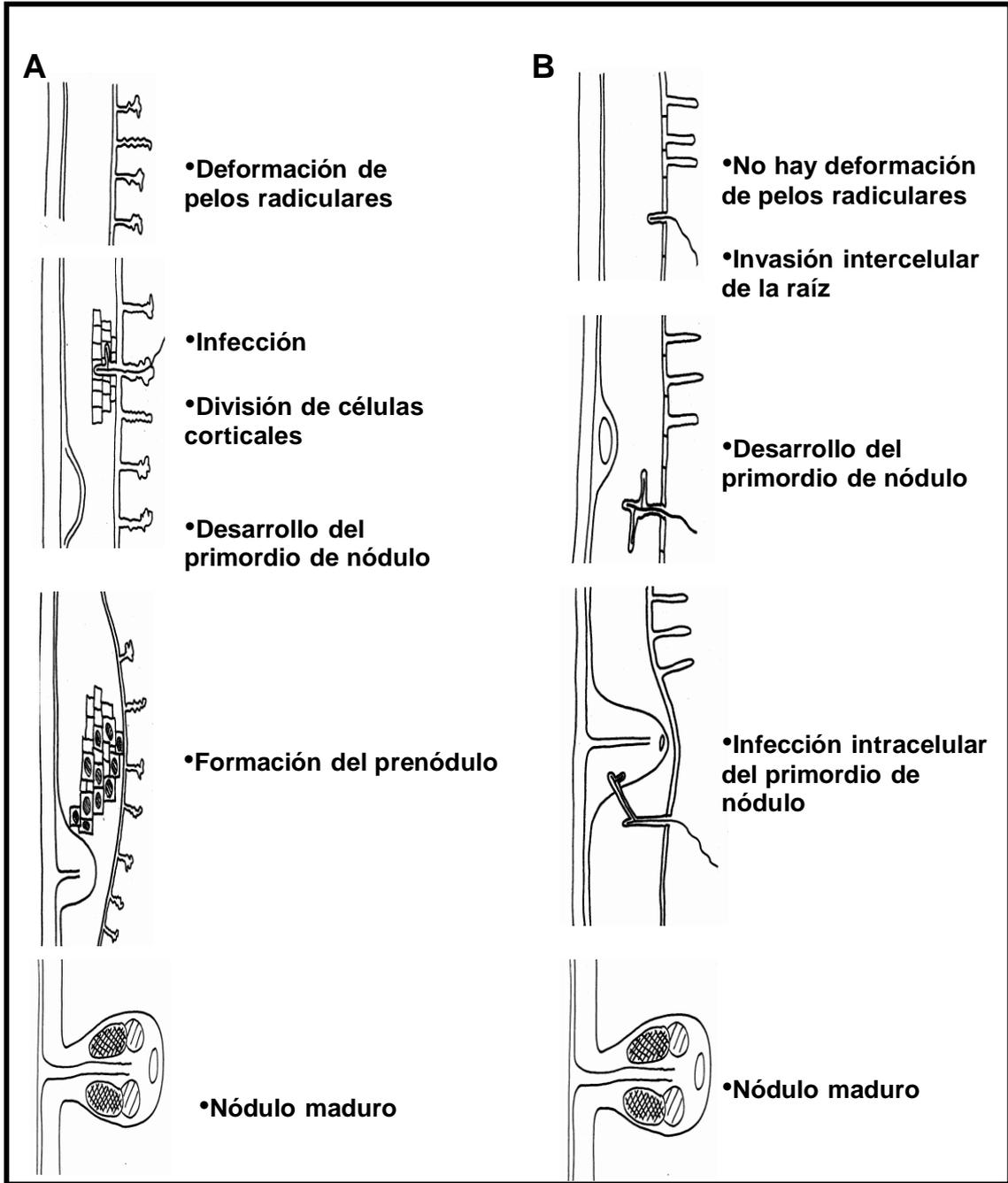
## 1.5 Infección y nodulación

La interacción entre el actinomicete *Frankia* y las plantas actinorrícicas comienza en la rizósfera de la planta hospedadora, donde los filamentos de *Frankia* colonizan la superficie radicular y dispara cambios en las células de la planta, que a su vez, conducen la entrada de *Frankia* y la colonización interna del nódulo radicular en desarrollo. Debido al origen filogenético común de las plantas actinorrícicas y las plantas noduladas por rizobios en un mismo clado, Rosid (Soltis y col., 1995), se sugiere que el proceso de nodulación es conservado en sus principales características entre ambas simbiosis. Además, *Parasponia* (Ulmaceae) es el único género hospedador no leguminosa que es nodulado por un rizobio y, basándose en el análisis de secuencia de *rbdL* se demostró que está filogenéticamente más cercana a las plantas actinorrícicas que a las leguminosas (Swensen, 1996).

Una de las características que comparten las simbiosis en leguminosas y en actinorrizas es que en ambos grupos se encuentran desarrollados los dos mecanismos de infección conocidos. Uno de los mecanismos está relacionado con la entrada del microsimbionte a la raíz mediante una penetración intracelular que se inicia en un pelo radicular deformado, mientras que el otro mecanismo comienza con una colonización intercelular del tejido radicular, sin deformación en los pelos radiculares y no habiendo penetración intracelular hasta alcanzar el primordio de nódulo (Wall y Berry, 2008). En la simbiosis actinorrícicas, tres de las ocho familias hospedadoras son noduladas por el mecanismo de infección vía pelo radicular, mientras que las otras cinco familias utilizan el mecanismo de colonización intercelular (Huss-Danell, 1997; Swensen y Mullin, 1997). No hay descripción crack entry en actinorrizas.

<b>Familia</b>	<b>Género</b>	<b>• de especies</b>	<b>Ecosistema o Suelo</b>
Betulaceae	<i>Alnus</i>	47	Ripario, suelos húmedos, bosques templados, valles de montañas, suelos circumpolares.
Casuarinaceae	<i>Allocasuarina</i>	54	Dunas costeras, suelos muy pobres.
	<i>Casuarina</i>	16	Bosques subtropicales, algunas especies en ripario, chaparrales, dunas costeras.
	<i>Gymnostoma</i>	18	Bosques secundarios, suelos volcánicos, suelos ultramáficos, ornamentales.
	<i>Ceuthostoma</i>	2	
Coriariaceae	<i>Coriaria</i>	Al menos 5	
Datisceae	<i>Datisca</i>	2	Bosques templados y frios.
Eleagnaceae	<i>Eleagnus</i>	38	Dunas costeras, campos deteriorados por la agricultura.
	<i>Hippophaë</i>	2	Dunas costeras, laderas de montañas, acantilados, costas.
	<i>Shepherdia</i>	2	Bosques templados.
Myricaceae	<i>Comptonia</i>	1	Bosques abiertos y secos.
	<i>Myrica</i>	28	La distribución mas alta en el planeta
Rhamnaceae	<i>Adolphia</i>		Pendientes erosionadas, suelos muy pobres, climas templados.
	<i>Ceanothus</i>	31	Chaparrales de mediana a baja elevación.
	<i>Colletia</i>	4	Matorral.
	<i>Discaria</i>	5	Matorral.
	<i>Kentrothamus</i>	1	Matorral.
	<i>Retanilla</i>	2	Matorral.
	<i>Talguenea</i>	1	Matorral.
	<i>Trevoa</i>	2	Matorral.
Rosaceae	<i>Cercocarpus</i>	4	Bosques montañosos perturbados, bosques de regiones semi áridas.
	<i>Cowania</i>	1	Chaparral.
	<i>Dryas</i>	3	Tundra.
	<i>Prusia</i>	2	Bosques de suelos semi áridos.

Tabla 1. Especies actinorróicas y su distribución natural en los ecosistemas. Adaptado de (Valdés, 2008).



**Figura 4. Mecanismos de infección.** (A) esquema del avance de la infección vía pelo radicular deformado. (B) Esquema del avance de infección que comienza con colonización intercelular.

La existencia de especificidad y reconocimiento simbiótico para la nodulación entre cepas de *Frankia* y un taxón de hospedador en particular, fue demostrado a lo largo de la historia del estudio de la simbiosis a través de experimentos de inoculación cruzada (Torrey, 1990; Wall y Berry, 2008). Cuando se compara la filogenia de especies de *Frankia*, en combinación con la tipificación genética de cepas de *Frankia* de nódulos obtenidos en el campo, se pueden encontrar grupos de rango de hospedadores que combinan las diferentes clases de especies de plantas (Benson y col., 1996; Jeong y col., 1999; Normand y col., 1996). Esta especificidad de grupos fue corroborada por comparaciones filogenéticas de los hospedadores (Benson y Clawson, 2000; Jeong y col., 1999; Soltis y col., 1995).

Previo a la colonización radicular, el proceso infectivo necesariamente comenzaría con un intercambio de señales en la rizósfera entre la planta y la bacteria que continuaría durante el proceso de infección y el desarrollo del nódulo, determinando compatibilidad a diferentes niveles de interacción (Wall y Berry, 2008). Es muy probable que ocurran intercambios de señales que disparen sus respectivos mecanismos de transducción antes de que ambos partícipes de la simbiosis entren en contacto físico. Estos eventos tempranos de señalización han sido ampliamente caracterizados en la simbiosis entre rizobios y leguminosas (Spaink, 2000) sin embargo es relativamente poco lo que se avanzó en este tipo de conocimientos en la simbiosis actinorrícicas.

### 1.5.1 Interacciones tempranas

Como resultado de la evolución hoy observamos mecanismos moleculares muy delicados y precisos para el reconocimiento entre los simbioses. En la simbiosis entre rizobios y leguminosas este preciso ensamble se produce a través del producto de los genes de nodulación de los rizobios (genes *nod*), llamados **Factores od** (lipoquitinooligosacáridos), que disparan una serie de respuestas en la planta hospedadora como son la deformación de los pelos radicales y la secreción de flavonoides que magnifican la expresión de los genes *nod* (Dénarié y col., 1996). La deformación de pelos radicales se ha utilizado como ensayo biológico para detectar una posible señal de *Frankia* involucrada en el reconocimiento debido a la carencia de un sistema reportero

genético molecular en *Frankia*. Existe un factor de deformación de pelos radiculares llamado Had (del inglés *hair deformation*), producido por *Frankia* en cultivos puros. En algunas cepas el nivel de producción de Had es independiente de que la bacteria sea incubada o no con raíces o con exudados de raíces (Cérémonie y col., 1999; Van Ghelue y col., 1997). A diferencia de los Factores Nod que producen los rizobios, el Factor Had no es anfipático y no es sensible a quitinasa, pero, mediante GC-MS (Espectrometría de masas – cromatografía de gases) de diferentes fracciones se detectó N-acetil- glucosamina, molécula que forma parte del Factor Nod, de manera que queda abierta la posibilidad de que exista un factor de *Frankia* que esté relacionado a los Factores Nod. Además, aunque la deformación de pelos radiculares por Factores Had fue inhibida con la presencia de nitrato y amonio, como ocurre en la simbiosis de leguminosas (Heidstra y col., 1994), no se observó división celular en las células de la corteza, sugiriendo que los factores de *Frankia* no son funcionalmente comparables a los producidos por rizobios en el proceso de nodulación (Cérémonie y col., 1999).

Por el lado de la planta, los flavonoides están involucrados en la inducción de genes microbianos en numerosas simbiosis planta – bacteria, incluyendo la simbiosis entre rizobios y leguminosas (Phillips, 2000), la germinación de esporas y el desarrollo de hifas en micorriza arbuscular (Tsai y Phillips, 1991). Los flavonoides estarían involucrados en el proceso de nodulación de las plantas actinorrícicas, dado que el agregado exógeno de estas sustancias pueden estimular o inhibir la nodulación (Benoit y Berry, 1997). Además, la preincubación de *Frankia* en Kaempferol, molécula que fue identificada en exudados de raíces de *Alnus*, produjo una inhibición de la nodulación en esta misma planta; y, la exposición de las raíces de *Alnus* a la luz, fenómeno que produce una inhibición de la nodulación, se correlacionó con un incremento de 70 veces en la concentración de Kaempferol (Hughes y col., 1999). Los dos ejemplos mencionados sugieren que los flavonoides en los exudados radiculares participan positiva y negativamente controlando las interacciones tempranas en la simbiosis actinorrícicas, sin embargo, aún deben ser determinadas las identidades de los compuestos. Resulta muy sugestivo e interesante de mencionar que se ha encontrado en el genoma de *Frankia* las rutas metabólicas de producción de flavonoides. Otro ejemplo de interacciones tempranas en la simbiosis actinorrícicas fue sugerido a partir de la preincubación de la cepa ACN14a de *Frankia* con exudados radiculares de su hospedador natural, *Alnus glutinosa*, quienes indujeron una modificación en el patrón de expresión de proteínas. La secuencia N-terminal de las

proteínas que más se estimularon con los exudados radiculares mostraron una alta similitud con proteínas relacionadas con estrés (Hammad y col., 2001).

### 1.5.2 Colonización de la raíz

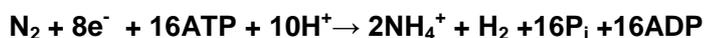
La acumulación de bacterias en la rizósfera de una planta puede generar cambios en la expresión genética de la bacteria dependiendo de la densidad poblacional a través de la detección de quórum. Este novedoso paradigma de señalización bacteriano es esencial para la colonización rizosférica en diferentes interacciones planta – bacteria, ya sean patogénicas o simbióticas (Kuiper y col., 2001; Miller y Bassler, 2001). Los patrones de expresión genética dependiente de quórum han sido caracterizados en la simbiosis de las plantas leguminosa mostrando influencia con las señales de nodulación. Los genes *rhi* de *Rhizobium leguminosarum biovar viciae* son expresados en la rizósfera y pueden jugar un papel importante en la interacción con las leguminosas. El operón *rhiABC* es regulado por RhiR bajo un mecanismo dependiente de la densidad celular que involucra a homólogos de LuxI y LuxR (Rodelas y col., 1999). Además, en plantas de soja la expresión de genes *nod* es atenuada a altas densidades celulares de *Bradyrhizobium*, y esta represión basada en detección de quórum está mediada por el gen regulatorio *nwsB*, que al ser mutado da una ventaja adaptativa en la nodulación respecto a la cepa salvaje (Loh y col., 2002).

Otro ejemplo que demuestra la relevancia de este tipo de señalización surge después de que se demostró mediante análisis proteómico que las raíces de las plantas leguminosas son capaces de diferenciar señales del tipo de las acil homoserin lactonas (AHLs) provenientes de rizobios de aquellas otras que son producidas por bacterias patógenas (Mathesius y col., 2003).

Estos ejemplos muestran que hay interacción por detección de quórum a diferentes niveles y con impacto, tanto negativo como positivo para la nodulación en la etapa de colonización de la rizósfera de plantas leguminosas. Si bien para la simbiosis actinorrícicas no se han publicado trabajos donde se describa con detalle el proceso de colonización, es posible imaginar que también utilicen un sistema de detección de quórum del tipo del que se describió aquí para los rizobios, donde la molécula censada es un derivado de la AHL.

### 1.5.3 Fijación biológica de nitrógeno

A pesar de que el aire tiene un 80 % de N<sub>2</sub>, el crecimiento vegetal se encuentra muy frecuentemente limitado por la disponibilidad de nitrógeno. Esta aparente paradoja se explica por la alta estabilidad de la molécula de di nitrógeno y la incapacidad que tienen las plantas para metabolizar este gas. No obstante, la molécula de nitrógeno gaseoso puede ser escindida y combinada con otras especies químicas en procesos que requieren grandes aportes de energía. Estos procesos pueden ser realizados biológicamente o industrialmente. Entre todos los organismos vivos, solo ciertos microorganismos procarióticos evolucionaron hasta adquirir la capacidad metabólica indispensable para la fijación de di nitrógeno, siendo el complejo nitrogenasa el principal responsable para que se lleve a cabo la reacción. La ecuación para esta reacción es:



La fijación biológica de di nitrógeno se encuentra restringida a ciertos géneros de bacterias entre los cuales podemos mencionar *Rhizobium*, *Bradirhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Cyanobacterium*, *Anabaena*, *Derrisia*, *Paenebacillus*, *Beijerinckia*, *3ostoc* y *Frankia* (Halbleib y Ludden, 2000). Recientemente se han encontrado otros actinomicetes no simbióticos con la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico asociados a las raíces y nódulos de plantas actinorrízicas, pertenecientes a la familia *Thermomonosporaceae* y *Micromonosporaceae* (Gtari *et al*, 2004; Valdés *et al*, 2005; Trujillo *et al*, 2006).

La enzima o complejo nitrogenasa es la encargada de llevar a cabo la reacción que transforma el N<sub>2</sub> gaseoso en amonio, este proceso requiere al menos de 16 moléculas de ATP por cada molécula reducida, lo cual implica una actividad respiratoria alta para mantener la tasa de fijación y por tanto una demanda alta de oxígeno. Dependiendo del organismo el complejo puede estar compuesto por una o dos subunidades que contienen Fe y una o dos subunidades que contienen Fe y Mo. La nitrogenasa de *Frankia* es, como en los otros microorganismos, altamente sensible al O<sub>2</sub> y es activa solo en ambientes libre de este gas. La sensibilidad al O<sub>2</sub> es crucial en muchos aspectos de la ecología y fisiología de todos los organismos que sintetizan nitrogenasa y muchos de los estados simbióticos y nichos ecológicos de los microbios que expresan esta enzima están determinados por la sensibilidad al O<sub>2</sub>. Para los microorganismos anaeróbicos el problema está resuelto, pero para el resto que necesita al O<sub>2</sub> para producir energía, la separación de la nitrogenasa de la respiración resulta un dilema fisiológicamente fascinante. El dilema se centra sobre la

necesidad de proveer un flujo importante de O<sub>2</sub> para generar la energía demandada por la nitrogenasa y proteger a la nitrogenasa de la desnaturalización que pueda causar el O<sub>2</sub> libre. Unas cuantas estrategias para resolver el dilema del O<sub>2</sub> han sido descritas y van desde la evasión total (estrategia anaeróbica) hasta la de coexistir con el gas (estrategia de balancear la síntesis de nitrogenasa con inactivación) (Silvester y col., 2008). Sin embargo, la gran mayoría de los organismos, ya sea en simbiosis o en vida libre, adoptan una estrategia intermedia y cuentan con barreras para mantener el sitio de la nitrogenasa libre de O<sub>2</sub>. En el caso de *Frankia* y otras pocas bacterias la estrategia más difundida se basa en mantener mediante su propia fisiología la adecuada barrera de difusión de O<sub>2</sub>, produciendo células especializadas, llamadas vesículas, con un espesor en la pared que provee la resistencia requerida para sostener la actividad de la nitrogenasa a pO<sub>2</sub> atmosférica.

Los nódulos actinorrícos tienen dos posibles mecanismos para controlar al O<sub>2</sub>, uno al nivel de la vesícula y el otro al nivel de la estructura y la fisiología del nódulo.

El rol de la hemoglobina en las células de *Frankia* es aun un gran misterio ya que no parece ser una herramienta de protección fundamental contra el O<sub>2</sub>. Sin embargo, la hemoglobina que produce el hospedador puede ser determinante en algunos sistemas como por ejemplo en *Myrica* y *Casuarina* (Silvester y col., 2008).

## 1.6 Ecología de las plantas actinorrícas

Debido a su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, las plantas actinorrícas juegan un papel muy importante dentro de los ecosistemas naturales y son ampliamente utilizadas para recuperar suelos, como cortinas de viento, en agroforestación y horticultura. Dixon y Wheeler (1986) estimaron que la contribución de plantas actinorrícas a la fijación biológica global puede alcanzar al 25 % del total. Las velocidades de fijación de nitrógeno estimadas para plantas actinorrícas son comparables a la de las leguminosas (Dawson, 2008). Las plantas actinorrícas tienen importancia económica como productoras de madera, de leña, y son importantes para la recuperación de terrenos. Si bien no se conocen usos agrícolas de estas plantas, los frutos de algunas de ellas son de consumo humano como es el mirto de mar recolectado de *Hippophae rhamnoides*, cuyos frutos son ricos en vitamina C, carotenos, y ácidos grasos (linoleico y linolénico). Además, la presencia de plantas actinorrícas provoca incrementos en la productividad de muchas comunidades vegetales vecinas, mediante la incorporación de nitrógeno al suelo a través de la hojarasca que se acumula en

el mismo y del desarrollo de su sistema radicular, incorporando materia orgánica con nitrógeno al suelo. En Argentina se pueden encontrar diferentes géneros actinorrícicas nativos tales como: *Discaria*, *Colletia*, *Kentrothamnus*, *Trevoa*, y *Alnus*. También existen géneros introducidos como *Casuarina* y *Elaeagnus*. Todos ellos presentan nódulos radicales (Tortosa y Medan, 1983; Tortosa y Medan, 1989).

### 1.7 Objetivo del trabajo

El objetivo general de este trabajo ha sido estudiar las interacciones tempranas que se producen en la rizósfera de las plantas actinorrícicas entre las raíces de éstas y los actinomicetes del género *Frankia*. Como modelo de estudio se utilizaron dos plantas, *Discaria trinervis* y *Alnus acuminata*. Se eligieron éstas dos especies por el hecho de ser nativas de este país, por presentar diferente vía de infección y porque había una gran experticia de su manipulación en el laboratorio donde se realizaron los trabajos de esta tesis. Los objetivos y enfoques particulares de este trabajo fueron:

1. Estudiar la relación entre la concentración del inóculo y el desarrollo de la nodulación.
2. Buscar respuestas de la planta que pongan en evidencia la actividad biológica del inóculo y estudiar su implicancia de acuerdo a la vía de infección que presente la planta.
3. Estudiar la posibilidad de una complementación fisiológica para la nodulación utilizando sistemas heterólogos y barreras físicas que impidan el contacto entre sistemas compatibles, y análisis de posibles coinfecciones.
4. Investigar los factores difusibles bacterianos y medir su implicancia en la nodulación.
5. Intentar caracterizar químicamente los factores difusibles de *Frankia*.
6. Investigar la posibilidad de que en el proceso infectivo de *Frankia* intervenga un sistema de detección de quórum.

### 1.8 Referencias

Baker, D. (1987): Relationships among pure cultured strains of *Frankia* based on host

- specificity. *Physiologia Plantarum* **70**, 245-248.
- Baker, D. (1990): Methods for isolation, culture and characterization of the *Frankiaceae*: Soil actinomycetes and symbionts of actinorhizal plants, pp. 213-236. In H. Labeda (Ed.): *Isolation of biotechnological organism from nature*, McGraw Hill, Inc., New York.
- Baker, D., Kidd, G., and Torrey, J. (1979a): Separation of Actinomycete Nodule Endophytes from Crushed Nodule Suspensions by Sephadex Fractionation. *Botanical Gazette* **140**, S49-S51.
- Baker, D., and O'Keefe, D. (1984): A modified sucrose fractionation procedure for the isolation of frankiae from actinorhizal root nodules and soil samples. *Plant and Soil* **78**, 23-28.
- Baker, D., and Schwintzer, C. (1990): Introduction, pp. 1-13. In C. Schwintzer, and J. Tjepkema (Eds): *The Biology of Frankia and Actinorhizal Plants*, Academic Press, San Diego.
- Baker, D., Torrey, J. G., and Kidd, G. H. (1979b): Isolation by sucrose-density fractionation and cultivation in vitro of actinomycetes from nitrogen-fixing root nodules. *Nature* **281**, 76-78.
- Bartish, I., Jeppsson, N., Nybom, H., and Swenson, U. (2002): Phylogeny of *Hippophae* (Elaeagnaceae) inferred from Parsimony Analysis of chloroplast DNA and morphology. *Syst. Bot.* **27**, 41-54.
- Becking, J. (1970): Frankiaceae fam. Nov. (Actinomycetales) with one new combination and six new species of the genus *Frankia* Brunchorst 1886. *Int. J. System. Bacteriol.* **20**, 201-220.
- Benecke, U. (1969): Symbionts of alder nodules in New Zealand. *Plant and Soil* **30**, 145-149.
- Benoit, L., and Berry, A. (1997): Flavonoid-like compounds from seeds of red alder (*Alnus rubra*) influence host nodulation by *Frankia* (Actinomycetales). *Physiologia Plantarum* **99**, 588-593.
- Benson, D. R. (1982): Isolation of *Frankia* Strains from Alder Actinorhizal Root Nodules. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**, 461-465.
- Benson, D. R., and Clawson, M. L. (2000): Evolution of the Actinorhizal Plant Symbiosis pp. 207-224. In E. Triplett (Ed.): *Prokaryotic Nitrogen Fixation: A Model System for the Analysis of a Biological Process*, Horizon Scientific Press.

- Benson, D. R., and Silvester, W. B. (1993): Biology of *Frankia* strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. *Microbiol Rev* **57**, 293-319.
- Benson, D. R., Stephens, D. W., Clawson, M. L., and Silvester, W. B. (1996): Amplification of 16S rRNA genes from *Frankia* strains in root nodules of *Ceanothus griseus*, *Coriaria arborea*, *Coriaria plumosa*, *Discaria toumatou*, and *Purshia tridentata*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2904-2909.
- Berry, A., and Torrey, J. G. (1979): Isolation and Characterization in vivo and in vitro of an actinomyceteous endophyte from *Alnus Rubra* Bong, pp. 69-83. In J. Gordon, C. Wheeler, and D. Perry (Eds): *Symbiotic Nitrogen Fixation in the Management of Temperate Forest*, Corvallis: Oregon State University, Forest research Laboratory.
- Bond, G. (1955): An isotopic study of the fixation of nitrogen associated with nodulated plants of *Alnus*, *Myrica* and *Hippophae*. *Journal of Experimental Botany* **6**, 303-311.
- Bond, G. (1956): Evidence for fixation of nitrogen by roots nodules of alder (*Alnus*) under field conditions. *New Phytol.* **55**, 147-153.
- Burleigh, S., and Dawson, J. (1994): Occurrence of *Myrica*-nodulating *Frankia* in Hawaiian volcanic soils. *Plant and Soil* **164**, 283-289.
- Callaham, D., Deltredici, P., and Torrey, J. G. (1978): Isolation and Cultivation in vitro of the Actinomycete Causing Root Nodulation in *Comptonia*. *Science* **199**, 899-902.
- Carú, M., Mosquera, G., Bravo, L., Guevara, R., Sepúlveda, D., and Cabello, A. (2003): Infectivity and effectivity of *Frankia* strains from the Rhamnaceae family on different actinorhizal plants. *Plant and Soil* **251**, 219-225.
- Cérémonie, H., Debelle, F., and Fernandez, M. P. (1999): Structural and functional comparison of *Frankia* root hair deforming factor and rhizobia Nod factor. *Can. J. Bot.* **77**, 1293-1301.
- Chaudhary, A. (1979): Nitrogen-fixing root nodules in *Datisca Cannabina* L. *Plant and Soil* **51**, 163-165.
- Clawson, M. L., and Benson, D. R. (1999): Natural Diversity of *Frankia* strains in actinorhizal root nodules from promiscuous host in the family Myricaceae. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 4521-4527.
- Clawson, M. L., Caru, M., and Benson, D. R. (1998): Diversity of *Frankia* Strains in Root Nodules of Plants from the Families Elaeagnaceae and Rhamnaceae. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3539-3543.
- Cournoyer, B., and Lavire, C. (1999): Analysis of *Frankia* evolutionary radiation using

- glnII sequences. *FEMS Microbiology Letters* **177**, 29-34.
- Cruz-Cisneros, R., and Valdés, M. (1991): Actinorhizal root nodules on *Adolphia infesta* (H.B.K.) Meissner (Rhamnaceae). *Nitrogen Fixing Tree Res.* **9**, 87-89.
- Dawson, J. (1986): Actinorhizal Plants - their use in forestry and agriculture. *Outlook Agric* **15**, 202-298.
- Dawson, J. (2008): Ecology of actinorhizal plants, pp. 199-234. In K. Pawlowski, and W. Newton (Eds): *Nitrogen-fixing Actinorhizal Symbioses*, Springer, Dordrecht. Dénarié, J., Debelle, F., and Prome, J. (1996): Rhizobium Lipo-Chitooligosaccharide Nodulation Factors: Signaling Molecules Mediating Recognition and Morphogenesis. *Annual Review of Biochemistry* **65**, 503-535.
- Diem, H., and Dommergues, Y. (1983): The isolation of *Frankia* from nodules of *Casuarina*. *Canadian Journal of Botany* **61**, 2822-2825
- Dixon, R. O. D., and Wheeler, C. (1986): *Nitrogen fixation in plants*. Chapman and Hall. New York, NY.
- Gasparrini, G. (1851): Osservazioni sulla struttura die tubercoli spongiolari di alcune piante legumineuse. *Atti. Accad. Sci. fys. mat. Zepoli* **6**, 221-139.
- Goodfellow, M. (1986): Actinomycete systematics: Present and future prospects., pp. 487-496. In G. Szabo, S. Biro, and M. Goodfellow (Eds): *Biological, biochemical and biomedical aspects of actinomycetes.*, Akademiai Kiado, Budapest.
- Hahn, D. (2008): Polyphasic Taxonomy of the Genus *Frankia*. In K. Pawlowski, and W. Newton (Eds): *Nitrogen-fixing Actinorhizal Symbioses*, Springer, Dordrecht.
- Halbleib, C., and Ludden, P. (2000): Regulation of Biological Nitrogen Fixation. *The Journal of Nutrition* **130**, 1081-1084.
- Hammad, Y., Marechal, J., Cournoyer, B., Normand, P., and Domenach, A. M. (2001): Modification of the protein expression pattern induced in the nitrogen-fixing actinomycete *Frankia* sp. strain ACN14a-tsr by root exudates of its symbiotic host *Alnus glutinosa* and cloning of the sodF gene. *Can J Microbiol* **47**, 541-7.
- Heidstra, R., Geurts, R., Franssen, H., Spaik, H. P., van Kammen, A., and Bisseling, T. (1994): Root Hair Deformation Activity of Nodulation Factors and Their Fate on *Vicia sativa*. *Plant Physiol.* **105**, 787-797.
- Hiltner, L. (1895): Über die Bedeutung der Wurzellknolchen von *Alnus Glutinosa* für die Stickstoffernahrung dieser Pflanze. *Vers. -Stn.* **46**, 153-161.
- Hughes, M., Donnelly, C., Crozier, A., and Wheeler, C. (1999): Effects of the exposure of

- roots of *Alnus glutinosa* to light on flavonoids and nodulation. *Can J Bot* **77**, 1311-1315.
- Huguet, V., Batzli, J. M., Zimpfer, J. F., Normand, P., Dawson, J. O., and Fernandez, M. P. (2001): Diversity and Specificity of *Frankia* Strains in Nodules of Sympatric *Myrica gale*, *Alnus incana*, and *Shepherdia canadensis* Determined by rrs Gene Polymorphism. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2116-2122.
- Huss-Danell, K. (1997): Actinorhizal symbiosis and their N<sub>2</sub> fixation. *3ew Phytol* **136**, 375-405.
- Huss-Danell, K., and Frej, A. (1986): Distribution of *Frankia* strain in forest and afforestation sites in Northern Sweden. *Plant and Soil* **90**, 407-418.
- Jeong, S. C., Ritchie, N. J., and Myrold, D. D. (1999): Molecular phylogenies of plants and *Frankia* support multiple origins of actinorhizal symbioses. *Mol Phylogenet Evol* **13**, 493-503.
- Kuiper, I., Bloemberg, G., and Lugtenberg, B. (2001): Selection of a Plant-Bacterium Pair as a Novel Tool for Rhizostimulation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon- Degrading Bacteria. *Molecular Plant Microbe Interaction* **14**, 1197-1205.
- Lalonde, M. (1979): Immunological and ultrastructural demonstration of nodulation of the European *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. host plant by an actinomycetal isolate from North American *Comptonia peregrina* (L.) Coult. root nodules. *Botanical Gazette* **140**, S35-S43.
- Lechevalier, M., and Lechevalier, H. (1990): Sistematics, Isolation, and Culture of *Frankia*, pp. 35-60. In C. Schwintzer, and J. Tjepkema (Eds): *The Biology of Frankia and Actinorhizal Plants*, Academic Press, San Diego.
- Lechevalier, M. P. (1994): Taxonomy of the Genus *Frankia* (Actinomycetales). *Int J Syst Bacteriol* **44**, 1-8.
- Loh, J., Pierson, E., Pierson III, L., Stacey, G., and Chaterjee, A. (2002): Quorum sensing in plant-associated bacteria. *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 285-290.
- Lumini, E., and Bosco, M. (1996): PCR-restriction fragment length polymorphism identification and host range of single-spore isolates of the flexible *Frankia* sp. strain UFI 132715. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 3026-3029.
- Maggia, L., and Bousquet, J. (1994): Molecular phylogeny of the actinorhizal Hamamelidae and relationships with host promiscuity towards *Frankia*. *Molecular Ecology* **3**, 459-467.

- Marechal, J., Clement, B., Nalin, R., Gandon, C., Orso, S., Cvejic, J. H., Bruneteau, M., Berry, A., and Normand, P. (2000): A *recA* gene phylogenetic analysis confirms the close proximity of *Frankia* to *Acidothermus*. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**, 781-785.
- Mathesius, U., Mulders, S., Gao, M., Teplitski, M., Caetano-Anollés, G., Rolfe, B., and Bauer, W. (2003): Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals. *Proc. 3at. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 1444-1449.
- Meesters, T., Genesen, S., and Akkermans, A. (1985): Growth, acetylene reduction activity and localization of nitrogenase in relation to vesicle formation in *Frankia* strains Cc1.17 and Cp1.2. *Archives of Microbiology* **143**, 137-142.
- Meesters, T., Vliet, W., and Akkermans, A. (1987): Nitrogenase is restricted to the vesicles in *Frankia* strain EAN1pec. *Physiologia Plantarum* **70**, 267-271.
- Meyen, J. (1829): Uber das hervowachsen parasitischer gebilde aus den wurzeln anderer pflanzen. *Flora (Jena)* **12**, 49-64.
- Miller, M., and Bassler, B. (2001): Quorum Sensing in Bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **55**, 165-199.
- Mirza, M., Akkermans, W., and Akkermans, A. (1994): PCR-amplified 16S rRNA sequence analysis to confirm nodulation of *Datisca cannabina* L. by the endophyte of *Coriaria nepalensis* Wall. *Plant and Soil* **160**, 147-152.
- Murray, R., Brenner, D., Colwell, R., De Vos, P., Goodfellow, M., Grimont, P., Pfennig, N., Stackebrandt, E., and Zavarzin, G. (1990): Report of the ad hoc committee on approaches to taxonomy within the proteobacteria. *Int J Syst Bacteriol* **40**, 213-215.
- Navarro, E., Jaffre, T., Gauthier, D., Gourbiere, F., Rinaudo, G., Simonet, P., and Normand, P. (1999): Distribution of *Gymnostoma* spp. microsymbiotic *Frankia* strains in New Caledonia is related to soil type and to host-plant species. *Molecular Ecology* **8**, 1781-1788.
- Navarro, E., Nalin, R., Gauthier, D., and Normand, P. (1997): The nodular microsymbionts of *Gymnostoma* spp. are *Elaeagnus*-infective *Frankia* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 1610-1616.
- Nick, G., Paget, E., Simonet, P., Moiroud, A., and Normand, P. (1992): The nodular endophytes of *Coriaria* spp. form a distinct lineage within the genus *Frankia*. *Molecular Ecology* **1**, 175-181.
- Normand, P., Lapierre, P., Tisa, L. S., Gogarten, J. P., Alloisio, N., Bagnarol, E., Bassi, C. A., Berry, A. M., Bickhart, D. M., Choisne, N., Couloux, A., Cournoyer, B.,

- Cruveiller, S., Daubin, V., Demange, N., Francino, M. P., Goltsman, E., Huang, Y., Kopp, O. R., Labarre, L., Lapidus, A., Lavire, C., Marechal, J., Martinez, M., Mastronunzio, J. E., Mullin, B. C., Niemann, J., Pujic, P., Rawnsley, T., Rouy, Z., Schenowitz, C., Sellstedt, A., Tavares, F., Tomkins, J. P., Vallenet, D., Valverde, C., Wall, L. G., Wang, Y., Medigue, C., and Benson, D. R. (2007): Genome characteristics of facultatively symbiotic *Frankia* sp. strains reflect host range and host plant biogeography. *Genome Res* **17**, 7-15.
- Normand, P., Orso, S., Cournoyer, B., Jeannin, P., Chapelon, C., Dawson, J., Evtushenko, L., and Misra, A. (1996): Molecular phylogeny of the genus *Frankia* and related genera and emendation of the family Frankiaceae. *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**, 1-9.
- Oersted, A. (1865): Smaa biologiske og morphologiske bidrag. 6. *Hippophae rhamnoides*. *Bot. Tidsskr., Ser 3*, 108-110.
- Phillips, D. A. (2000): Biosynthesis and release of rhizobial nodulation gene inducers by legumes, pp. 349-363. In E. W. Triplett (Ed.): *Prokaryotic Nitrogen Fixation: A Model System for the Analysis of a Biological Process*, Horizon Scientific Press, Wymondham, UK.
- Prin, Y., Duhoux, E., Diem, H. G., Roederer, Y., and Dommergues, Y. R. (1991): Aerial Nodules in *Casuarina cunninghamiana*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 871-874.
- Quispel, A., Svendsen, A., Schripsema, J., Baas, W., Erkelens, C., and Lugtenburg, J. (1989): Identification of Dipterocarpol as Isolation Factor for the Induction of Primary Isolation of *Frankia* from Root Nodules of *Alnus glutinosa* (L.). *Molecular Plant-Microbe Interactions* **2**, 97-106.
- Richardson, J. E., Fay, M. F., Cronk, Q. C. B., Bowman, D., and Chase, M. W. (2000): A phylogenetic analysis of Rhamnaceae using rbcL and trnL-F plastid DNA sequences. *Am. J. Bot.* **87**, 1309-1324.
- Rochefort, D. A., and Benson, D. R. (1990): Molecular cloning, sequencing, and expression of the glutamine synthetase II (glnII) gene from the actinomycete root nodule symbiont *Frankia* sp. strain Cpl1. *J. Bacteriol.* **172**, 5335-5342.
- Rodelas, B., Lithgow, J., Wisniewski-Dye, F., Hardman, A., Wilkinson, A., Economou, A., Williams, P., and Downie, A. (1999): Analysis of Quorum-Sensing- Dependent Control of Rhizosphere-Expressed (*rhi*) Genes in *Rhizobium leluminosarum* bv. viciae. *Journal of Bacteriology* **181**, 3816-3823.

- Rouvier, C., Prin, Y., Reddell, P., Normand, P., and Simonet, P. (1996): Genetic diversity among *Frankia* strains nodulating members of the family Casuarinaceae in Australia revealed by PCR and restriction fragment length polymorphism analysis with crushed root nodules. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 979-985.
- Sasakawa, H., Hiyoshi, T., and Sugiyama, T. (1988): Immuno-Gold Localization of Nitrogenase in Root Nodules of *Elaeagnus pungens* Thunb. *Plant Cell Physiol.* **29**, 1147-1152.
- Schacht, H. (1853): Beitrag zur Entwicklungsgeschichte der Wurzel. *Flora (Jena)* **36**, 257-266.
- Schwencke, J., and Carú, M. (2001): Advances in Actinorhizal Symbiosis: Host Plant-*Frankia* Interactions, Biology, and Applications in Arid Land Reclamation. A Review. *Arid Land Research and Management* **15**, 285 - 327.
- Silvester, W., Berg, R., Schwintzer, C., and Tjepkema, J. (1998): Oxygen Responses, Hemoglobin, and the Structure and Function of Vesicles, pp. 105-146. In K. Pawloski, and W. Newton (Eds): *3itrogen-fixing Actinorhizal Symbioses*, Springer, Dordrecht.
- Silvester, W. B., Berg, R. H., Schwintzer, C. R., and Tjepkema, J. D. (2008): Oxigen responses, hemoglobin, and the structureand function of vesicles., pp. 105-146. In K. Pawlowski, and W. Newton (Eds): *3itrogen-fixing Actinorhizal Symbioses*, Springer, Dordrecht.
- Simonet, P., Bosco, M., Chapelon, C., Moiroud, A., and Normand, P. (1994): Molecular characterization of *Frankia* microsymbionts from spore-positive and spore- negative nodules in a natural alder stand. *Appl Environ Microbiol* **60**, 1335-41.
- Simonet, P., Grosjean, M. C., Misra, A. K., Nazaret, S., Cournoyer, B., and Normand, P. (1991): *Frankia* genus-specific characterization by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 3278-3286.
- Simonet, P., Nguyen-Thi, L., Teissier dou Cros, E., and Bardin, R. (1988): Identification of *Frankia* strains by direct DNA hybridization of crushed nodules. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 2500-2503.
- Simonet, P., Normand, P., Moiroud, A., and Bardin, R. (1990): Identification of *Frankia* strains in nodules by hybridization of polymerase chain reaction products with strain-specific oligonucleotide probes. *Archives of Microbiology* **153**, 235-240.
- Soltis, D., Soltis, P., Morgan, D., Swensen, S., Mullin, B., Dowd, J., and Martin, P. (1995): Chloroplast gene sequence data suggest a single origin of the predisposition for

- symbiotic nitrogen fixation in angiosperms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 2647-2651. Spaink, H. P. (2000): Root Nodulation and Infection Factors Produced by Rhizobial Bacteria. *Annual Review of Microbiology* **54**, 257-288.
- Swensen, S. (1996): The evolution of actinorhizal symbioses: Evidence for multiple origins of the symbiotic association. *Am. J. Bot.* **83**, 1503-1512.
- Swensen, S., and Mullin, B. (1997): Phylogenetic relationships among actinorhizal plants. The impact of molecular systematics and implications for the evolution of actinorhizal symbioses. *Physiologia Plantarum* **99**, 565–573.
- Swensen, S., Mullin, B., and Chase, M. (1994): Phylogenetic affinities of the Datisceaceae based on an analysis of nucleotide sequences from the plastid *rbcL* gene. *Syst. Bot.* **19**, 157-168.
- Tjepkema, J., and Torrey, J. (1979): Symbiotic nitrogen fixation in actinomycete-nodulated plants., pp. i-ii: *Botanical Gazette*, Chicago.
- Torrey, J. (1990): Cross-inoculation groups within *Frankia* and host-endosymbiont associations., pp. 86-106. In C. Schwintzer, and J. Tjepkema (Eds): *The Biology of Frankia and Actinorhizal Plants*, Academic Press, San Diego.
- Torrey, J. G. (1978): Nitrogen fixation by actinomycete-nodulated angiosperms. *BioScience* **28**, 586-592.
- Tortosa, R. (1992): El complejo *Retanilla-Talguenea-Trevoa* (Rhamnaceae). *Darwiniana* **31**, 223-252.
- Tortosa, R., and Medan, D. (1983): Nódulos radicales simbióticos en espermatófitas argentinas. *Kurtziana* **16**, 101-122.
- Tortosa, R., and Medan, D. (1989): Novedades sobre nódulos actinomicorrízicos en angiospermas sudamericanas. *Revista de la Facultad de Agronomía U3LP* **10**, 79-86.
- Tsai, S. M., and Phillips, D. A. (1991): Flavonoids Released Naturally from Alfalfa Promote Development of Symbiotic Glomus Spores In Vitro. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 1485-1488.
- Valdés, M. (2008): *Frankia* Ecology, pp. 49-71. In K. Pawlowski, and W. Newton (Eds): *Nitrogen-fixing Actinorhizal Symbioses*, Springer, Dordrecht.
- Valdés, M., and Cruz-Cisneros, R. (1996): Root and stem nodulation of *Casuarina* in Mexico. *Forest Com. Tree Res. Rep.* **1**, 61-65.

- van Dijk, C. (1984): Ecological Aspects of Spore formation in the *Frankia-Alnus* symbiosis University of Leiden, Leiden.
- van Dijk, C. S., A., and Weber, A. (1988): Host range differentiation of spore (+) and spore (-) strain types of *Frankia* in stands of *Alnus glutinosa* and *Alnus incana* in Finland. *Physiologia Plantarum* **72**, 349-358.
- Van Ghelue, M., Løvaas, E., Ringø, E., and Solheim, B. (1997): Early interactions between *Alnus glutinosa* and *Frankia* strain Ar13. Production and specificity of root hair deformation factor(s). *Physiologia Plantarum* **99**, 579-587.
- von Jager, G. (1860): Uber eine Krankhafte Veränderung der Bluthenorgane der Weintraube. *Flora (Jena)* **18**, 49-51.
- Wall, L., and Berry, A. (2008): Early Interactions, Infection and Nodulation in Actinorhizal Symbiosis, pp. 147-166. In K. Pawlowski, and W. Newton (Eds): *3itrogen-fixing Actinorhizal Symbioses*, Springer, Dordrecht.
- Wzall, L. G. (2000): The Actinorhizal Symbiosis. *J Plant Growth Regul* **19**, 167-182.
- Weber, A. (1986): Distribution of spore-positive and spore-negative nodules in stands of *Alnus glutinosa* and *Alnus incana* in Finland. *Plant and Soil* **96**, 205-213.
- Wheeler, C., Akkermans, A., and Berry, A. (2008): *Frankia* and Actinorhizal plants: A Historical Perspective., pp. 1-24. In K. Pawlowski, and W. Newton (Eds): *3itrogen-fixing actinorhizal Symbioses*, Springer, Dordrocht.
- Woronin, M. (1885): Bemerkugen zu dem aufsatze von Herrn H. Muller uber Plasmodiophora Alni. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* **5**, 50-58.
- Yokoyama, J., Suzuki, M., Iwatsuki, K., and Hasebe, M. (2000): Molecular Phylogeny of *Coriaria*, with Special Emphasis on the Disjunct Distribution. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **14**, 11-19.

## Capítulo 2

### “Análisis de las cinéticas de nodulación en la simbiosis *Frankia* – *Discaria trinervis* y estudio de factores involucrados en el desarrollo de la nodulación”



LAG

#### 2.1 Introducción

Los nódulos fijadores de nitrógeno inducidos por *Frankia* en raíces de *Discaria trinervis* son un ejemplo de simbiosis actinorrícicas con mecanismo de infección vía colonización intercelular de raíces jóvenes (Valverde y Wall, 1999b; Wall y Berry, 2008) que no implica deformación de pelos radiculares durante las etapa de reconocimiento e infección en el que se reconocen fenómenos de reconocimiento y especificidad simbiótica. Este mecanismo difiere claramente de la vía de infección intracelular a través de pelos radiculares (Wall y Berry, 2008).

Los factores difusibles (FD) de señalización involucrados en las interacciones

tempranas de las plantas actinorrícicas han sido estudiados en sistemas simbióticos que requieren deformación de pelos radiculares para la infección (Cérémonie y col., 1999; Van Ghelue y col., 1997) pero no existen estudios en simbiosis con infección intercelular como *Discaria*. Los resultados que se obtuvieron en experimentos realizados en *Alnus*, sugieren que los factores de deformación de pelos radiculares de *Frankia* no serían los factores que expresan reconocimiento simbiótico como lo hacen los lipoquitinolisacáridos producidos por rizobios en respuesta a las señales que producen las raíces de las leguminosas en la simbiosis que establecen con rizobios. Además, factores de naturaleza similar a los flavonoides producidos por las leguminosas han sido detectados en el proceso de nodulación de *Alnus rubra* donde se vio que pueden actuar tanto inhibiendo como estimulando la nodulación (Benoit, 1997). De todas maneras, no está claro a partir de estos experimentos, si los efectos observados son consecuencia de una interacción planta – bacteria o una interacción planta – planta mediada por flavonoides o sustancias relacionadas. Incluso no se sabe si *Frankia* produce flavonoides en la rizósfera.

La infección y el desarrollo del nódulo en la raíz de las plantas actinorrícicas presenta un fenómeno de dosis – respuesta que tiende a la saturación a altas dosis de inóculo bacteriano. Este fenómeno se observó tanto en el caso de las plantas de *Alnus incana* infectadas a través de pelos radiculares (Wall y Huss-Danell, 1997), como en el caso de las plantas de *Discaria trinervis* donde las raíces son invadidas intercelularmente por la bacteria (Valverde y Wall, 1999b). Estos antecedentes sugieren que la inducción de la respuesta de la planta depende de la concentración de posibles factores producidos por la bacteria y por ende de la afinidad del receptor correspondiente que se expresa en la planta, como ocurre en una interacción bioquímica entre moléculas, tipo interacción enzima – sustrato.

De un modo similar a lo que ocurre en la simbiosis fijadora de nitrógeno de las plantas leguminosas, la nodulación de las plantas actinorrícicas está sujeta a controles que involucran diferentes mecanismos como son: autorregulación (Valverde y Wall, 1999a; Wall y Huss-Danell, 1997), retroinhibición por N (Valverde y col., 2000; Wall y col., 2003) y estimulación por niveles de P en tejidos vegetales (Valverde y col., 2002). Estos factores inhibitorios pueden ser organizados en un modelo de regulación de la simbiosis actinorrícicas independientemente de la vía de infección que utilice la planta (Wall, 2000). Teniendo en cuenta estos mecanismos de regulación es posible interpretar el nivel de nodulación final y la distribución de nódulos en la raíz en una determinada condición experimental (Valverde y Wall, 1999a). No se conoce hasta el presente nada acerca de la naturaleza de la/las molécula/s involucradas en estos fenómenos de regulación de la

nodulación en plantas actinorrícicas y no es muy claro aún la naturaleza de dichas señales en la simbiosis de leguminosas.

El número de nódulos que se desarrollan por planta puede ser estudiado usando un método que permite seguir la nodulación en la raíz intacta a lo largo del tiempo en el transcurso del experimento. De esta manera, diferentes parámetros de nodulación pueden ser definidos y consecuentemente cuantificados en diferentes condiciones experimentales. Algunos ejemplos de estos parámetros han sido presentados como indicadores de especificidad a nivel de género dentro de un grupo de inoculación cruzada de plantas actinorrícicas (Nesme y col., 1985) o a nivel de especies, sugiriendo un grado de reconocimiento intra género (Chaia y col., 2006).

Para estudiar la especificidad simbiótica en leguminosas a nivel de colonización radicular se han realizado ensayos de competición con bacterias compatibles y no compatibles (Caetano Anollés y Favelukes, 1986). Esta idea fue adaptada aquí para estudiar la simbiosis actinorrícicas analizando la modificación de los parámetros de nodulación en *Discaria trinervis* después de coinocular con concentraciones crecientes de distintas bacterias no infectivas junto con la cepa de *Frankia* infectiva a una concentración limitante (no saturante) o modificando la concentración del factor producido por la planta.

## 2.1 Materiales y métodos

### Crecimiento de las plantas

Las semillas de *Discaria trinervis* (Hooker et Arnot) Reiche fueron gentilmente cedidas por Eugenia Chaia (Universidad Nacional de Comahue, Argentina). Las semillas fueron extraídas de frutos maduros (Introducción, Figuras 2 F y 2 G) recolectados en Pampa de Huenuleo (41° 10' S, 71° 12' O, Bariloche, Río Negro, Argentina) y mantenidas a -20 °C. Previo a la germinación, las semillas fueron esterilizadas superficialmente y escarificadas (3 minutos de inmersión en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 96 %), luego se lavaron con solución Evans estéril (27.88 mg l<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 49.28 mg l<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O; 2.3 mg l<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 14.5 mg l<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 10.33 mg l<sup>-1</sup> CaSO<sub>4</sub>; 7.35 mg l<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O; 0.66 mg l<sup>-1</sup> FeNaEDTA; 0.143 mg l<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 0.0773 mg l<sup>-1</sup> MnSO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O; 0.0022 mg l<sup>-1</sup> ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O; 0.0079 mg l<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O; 0.005 mg l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O and 0.0141 mg l<sup>-1</sup> CoSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O) diluida al décimo (E 1/10). La germinación fue llevada a cabo en cajas de Petri con perlita esteril. Doce días después de la germinación, las plántulas fueron transferidas a pouches (Mega Internacional, Minneapolis, MN). El pouche o

bolsa germinadora, es un dispositivo para crecer plántulas que permite ver la raíz a lo largo del experimento (Introducción, Figura 2 E) sin dañar las raíces, y está formado por un papel absorbente (de 15 x 16 cm) dentro de un sobre de plástico transparente en tres de sus lados. Cuatro plántulas seleccionadas al azar fueron colocadas en cada pouche con 10 ml de solución nutritiva libre de nitrógeno (E 1/10). La germinación y el posterior crecimiento de las plántulas se llevó a cabo en el invernáculo de la Universidad Nacional de Quilmas (34° 7' S, 58° 3' O) con luz artificial adicional (400 W, K048, OSRAM, Osasco, Brasil) y un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad, el rango de temperatura se mantuvo entre 18 y 26 °C y la humedad relativa entre un 40 y un 90 %.

### **Cultivo de bacterias y preparación del inóculo**

La cepa BCU110501 de *Frankia* (Figura 1) fue aislada a partir de nódulos de *Discaria trinervis* y es infectiva (Nod<sup>+</sup>) y efectiva (Fix<sup>+</sup>) en plantas de *D. trinervis* (Chaia, 1998). La cepa Arl3 de *Frankia* (K Huss-Danell, Umeå, Suecia) fue aislada originalmente en cultivo puro a partir de nódulos de *Alnus rubra* (Berry y Torrey, 1979). El aislamiento Cpl1 (K Huss-Danell, Umeå, Suecia) se realizó a partir de nódulos de *Comptonia peregrina* (L) Coult (Torrey y Callahan, 1982). La cepa Cj82 (J Dawson, Chicago, IL, Estados Unidos) fue aislada de nódulos de *Casuarina japonicum*. Todas las cepas de *Frankia* fueron crecidas por 6 semanas a 28 °C en cultivo estático con medio de cultivo mínimo BAP (Murry y col., 1984). El medio de cultivo para las cepas BCU110501, Cpl1 y Cj82 fue suplementado con glucosa 0.055 M, mientras que el medio en que se cultivó la cepa Arl3 fue suplementado con propionato de sodio 0.005 M como fuente de carbono. La cepa A(3)2 de *Streptomyces coelicolor* (Gernot Vobis, Bariloche, Argentina) fue crecida en 40 ml de medio BAP suplementado con glucosa 0.055 M por 96 horas a 28 °C. Los aislamientos *Bacillus thuringiensis* (L Del Federico, UNQ, Argentina), *Bacillus subtilis* (L Del Federico, UNQ, Argentina), *Pseudomonas putida* GR12-2 (Glick y col., 1997) y *Azospirillum brasilense* Cd pRKLACC (Holguin y Glick, 2001) fueron crecidos en 10 ml de caldo nutritivo por 72 horas a 28 °C.

Para la preparación del inóculo, las células de *Frankia* y *Streptomyces* fueron lavadas con E 1/10, resuspendidas en 5-8 ml de E 1/10 y homogenizado por pasaje a través de jeringas y agujas (21G), 5 veces. La cantidad de biomasa en la suspensión fue estimada por volumen celular empaquetado (pcv, por packed cell volume) después de una centrifugación durante 5 minutos a 1100 g (Nittayajarn y Baker, 1989). Las otras bacterias fueron crecidas

por 15 horas a 28 °C y 120 rpm, luego lavadas 2 veces y resuspendidas en 10 ml de E 1/10.

La cantidad de células de estas bacterias no filamentosas fue estimada por conteo de unidades formadoras de colonia (ufc) en placas.

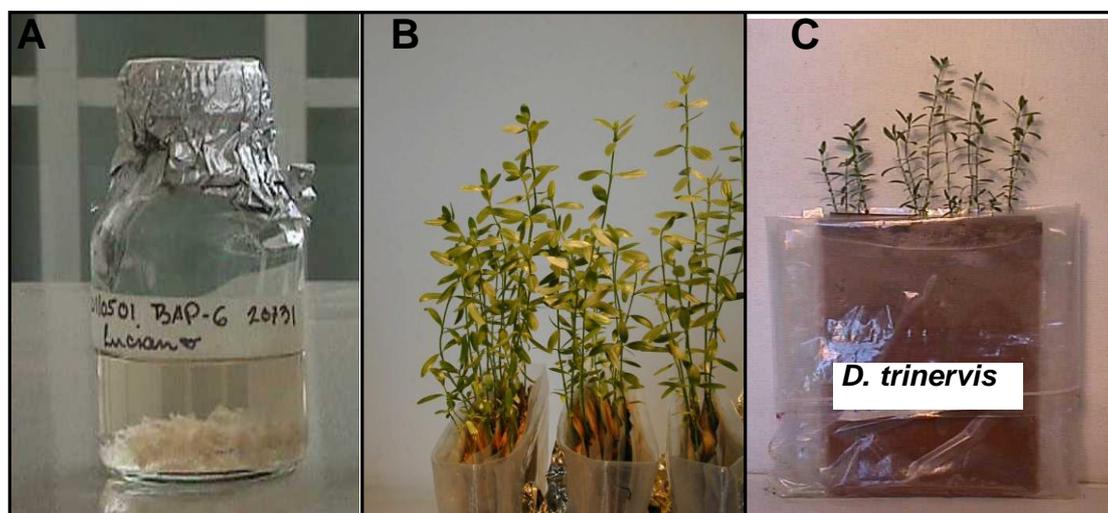


Figura 1. (A) Cultivo de *Frankia* BCU110501 en medio BAP suplementado con glucosa. (B) Plantas de *D. trinervis* distribuidas en tres tratamientos de 5 pouches cada uno. (C) Cada tratamiento se coloca dentro de una bolsa plástica en la cual se vierte la solución de riego.

### Inoculación de las plantas

En el momento de realizar la inoculación, 20 plántulas de *Discaria trinervis* fueron distribuidas en 5 pouches colocando 4 plantas por pouche y separadas aleatoriamente. Todos los pouches que correspondieron al mismo tratamiento se ubicaron juntos dentro de una bolsa de plástico (Figuras 1 B y 1 C). Se realizó la dilución apropiada para cada suspensión bacteriana en E 1/10 y con 200  $\mu$ l de la suspensión se inoculó sobre la raíz, descargando el volumen con micropipeta desde la punta de la raíz hasta la base del tallo.

Con el objetivo de estudiar el efecto dosis respuesta en *D. trinervis*, diferentes dosis de *Frankia* BCU110501 fueron usadas como inóculo: 0.01, 0.1, 1, 5 y 20  $\mu$ l pcv por raíz.

También se estudió el efecto de coinocular *Frankia* BCU110501 junto a bacterias no compatibles (no infectivas) con diferentes características. En todos los casos, ambas bacterias fueron mezcladas en el mismo frasco y 200  $\mu$ l del inóculo combinado fue utilizado para inocular las plantas de *D. trinervis* como se explicó más arriba. Se realizaron los siguientes ensayos de coinoculación: (1) *Frankia* BCU110501 (0.01  $\mu$ l pcv raíz<sup>-1</sup>) junto con

*Frankia* Arl3 en diferentes dosis (0.1, 1, 5 y 20  $\mu\text{l pcv raíz}^{-1}$  y 0  $\mu\text{l pcv raíz}^{-1}$  para el tratamiento control); (2) *Frankia* BCU110501 (0.01  $\mu\text{l pcv raíz}^{-1}$ ) junto con *Frankia* Cpl1 en diferentes dosis (1 y 10  $\mu\text{l pcv raíz}^{-1}$  y 0  $\mu\text{l pcv raíz}^{-1}$  para el tratamiento control); (3) *Frankia* BCU110501 (0.01  $\mu\text{l pcv raíz}^{-1}$ ) junto con *Frankia* Cj82 (10  $\mu\text{l pcv raíz}^{-1}$  y 0  $\mu\text{l pcv raíz}^{-1}$  para el tratamiento control); (4) *Frankia* BCU110501 (0.01  $\mu\text{l pcv raíz}^{-1}$ ) junto con *Streptomyces coelicolor* A(3)2 M145 en diferentes dosis (0.1, 1, y 4  $\mu\text{l pcv raíz}^{-1}$  y 0  $\mu\text{l pcv raíz}^{-1}$  para el tratamiento control); (5) *Frankia* BCU110501 (0.01  $\mu\text{l pcv raíz}^{-1}$ ) junto con *A. brasilense* Cd pRKLACC en diferentes dosis ( $1 \times 10^9$  y  $1 \times 10^6$  ufc  $\text{raíz}^{-1}$  y 0 ufc  $\text{raíz}^{-1}$  para el tratamiento control); (6) *Frankia* BCU110501 (0.01  $\mu\text{l pcv raíz}^{-1}$ ) junto con *P. putida* GR12-2 en diferentes dosis ( $1 \times 10^{10}$  y  $1 \times 10^7$  ufc  $\text{raíz}^{-1}$  y 0 ufc  $\text{raíz}^{-1}$  para el tratamiento control); (7) *Frankia* BCU110501 (0.01  $\mu\text{l pcv raíz}^{-1}$ ) junto con *B. thuringensis* en diferentes dosis ( $2 \times 10^8$  y  $2 \times 10^5$  ufc  $\text{raíz}^{-1}$  y 0 ufc  $\text{raíz}^{-1}$  para el tratamiento control); y (8) *Frankia* BCU110501 (0.01  $\mu\text{l pcv raíz}^{-1}$ ) junto con *B. subtilis* en diferentes dosis ( $5 \times 10^6$  y  $5 \times 10^3$  ufc  $\text{raíz}^{-1}$  y 0 ufc  $\text{raíz}^{-1}$  para el tratamiento control).

Finalmente, con el objetivo de observar que efectos pueden tener los factores de la planta *D. trinervis* en la simbiosis, se realizó un ensayo en el que la variable fue el número de plantas por pouche: 4, 8 o 12 plantas fueron colocadas en cada pouche y como cada pouche tenía 4 orificios para plantas, dependiendo el tratamiento, por cada orificio se pasaron 1, 2 o 3 plántulas. Al comienzo del experimento todos los tratamientos fueron regados con 12 ml de E 1/10 y en lo sucesivo se siguió adicionando la misma solución de riego cuando fue necesario. En todos los tratamientos, las plantas se inocularon descargando 200 ml de inóculo *Frankia* BCU110501 (0.05  $\mu\text{l pcv ml}^{-1}$ ) sobre las raíces que se encontraban en cada uno de los cuatro orificios destinados a plantas. De esta manera, la concentración total de *Frankia* BCU110501 por pouche fue la misma en todos los tratamientos, independientemente del número de plantas por pouches. Así, la concentración de exudados radiculares fue necesariamente diferente de acuerdo al número de plantas por pouche y consecuentemente fue esta la variable del experimento.

### **Registro de la nodulación**

Al momento de la inoculación, la posición de cada punta radicular (RT de Root Tip) fue marcada con una fibra indeleble en la superficie plástica del pouche (Valverde y Wall, 1999b). Las raíces de *D. trinervis* se observaron cada 2-3 días con el objetivo de registrar y contar a simple vista los nódulos que se desarrollan. La posición de los nódulos a lo largo de

la raíz se registraron sobre el plástico del pouche con una fibra resistente al agua y la distancia (en mm) de cada nódulo a la marca de referencia RT (posición cero) fue medida. La frecuencia de nódulos se agrupó cada 5 mm a lo largo de la raíz y se graficó el perfil de nodulación para cada tratamiento. Las posiciones por encima de la marca RT se consideraron como valores positivos (+) y los que se encuentran por debajo de la marca se consideraron como valores (-) (Valverde y Wall, 1999b).

### **Análisis estadístico**

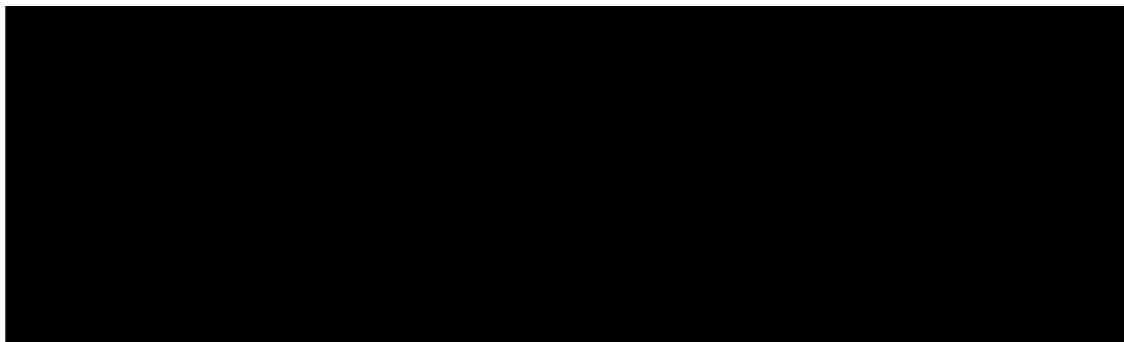
La significancia entre los valores obtenidos para los parámetros de nodulación de los diferentes tratamientos respecto a los controles apropiados fue obtenida con el test de Student's para datos no apareados con el programa SIGMA PLOT (versión 8).

## **2.3 RESULTADOS**

### **Análisis de la nodulación**

Al observar la aparición de los nódulos para una planta y analizarla en función del tiempo, aparece un patrón regular que se muestra en la Figura 2 A. A partir del análisis de la gráfica se definieron diferentes parámetros: (1)  $t_0$  es el tiempo que transcurre desde el momento de la inoculación hasta que aparece el primer nódulo; (2)  $v_0$  es la velocidad de nodulación inicial; (3)  $v_R$  es una segunda velocidad de nodulación que no siempre aparece; (4)  $t_R$  es el tiempo que transcurre desde la inoculación hasta que comienza  $v_R$ ; (5)  $t_F$  es el tiempo final después del cual no aparecen nuevos nódulos; (6)  $t_{NOD}$  es el tiempo total de nodulación,  $t_F - t_0$ ; y (7) el número de nódulos por planta. Los parámetros se pueden determinar para cada planta individualmente (Figura 2B) y luego el promedio y el error para cada tratamiento puede ser comparado con los controles. Estos datos dan información adicional a la estimación que surge después del análisis del gráfico que muestra el promedio del número de nódulos por planta en función del tiempo (Figura 2 C). En este gráfico (Figura 2 C) cada punto representa el promedio de número de nódulos por planta a determinado tiempo considerando el número total de plantas del tratamiento. Esta gráfica (Figura 2 C) es menos precisa para estimar los parámetros de nodulación definidos más arriba en esta sección ( $t_0$ ,  $v_0$ ,  $t_{NOD}$ , etc), por ejemplo, la determinación del  $t_0$  a partir de este gráfico se obtiene a partir de la primera planta del tratamiento que presenta un nódulo visible, mientras

el  $t_0$  de las demás plantas no son tenidos en cuenta para dicha estimación.

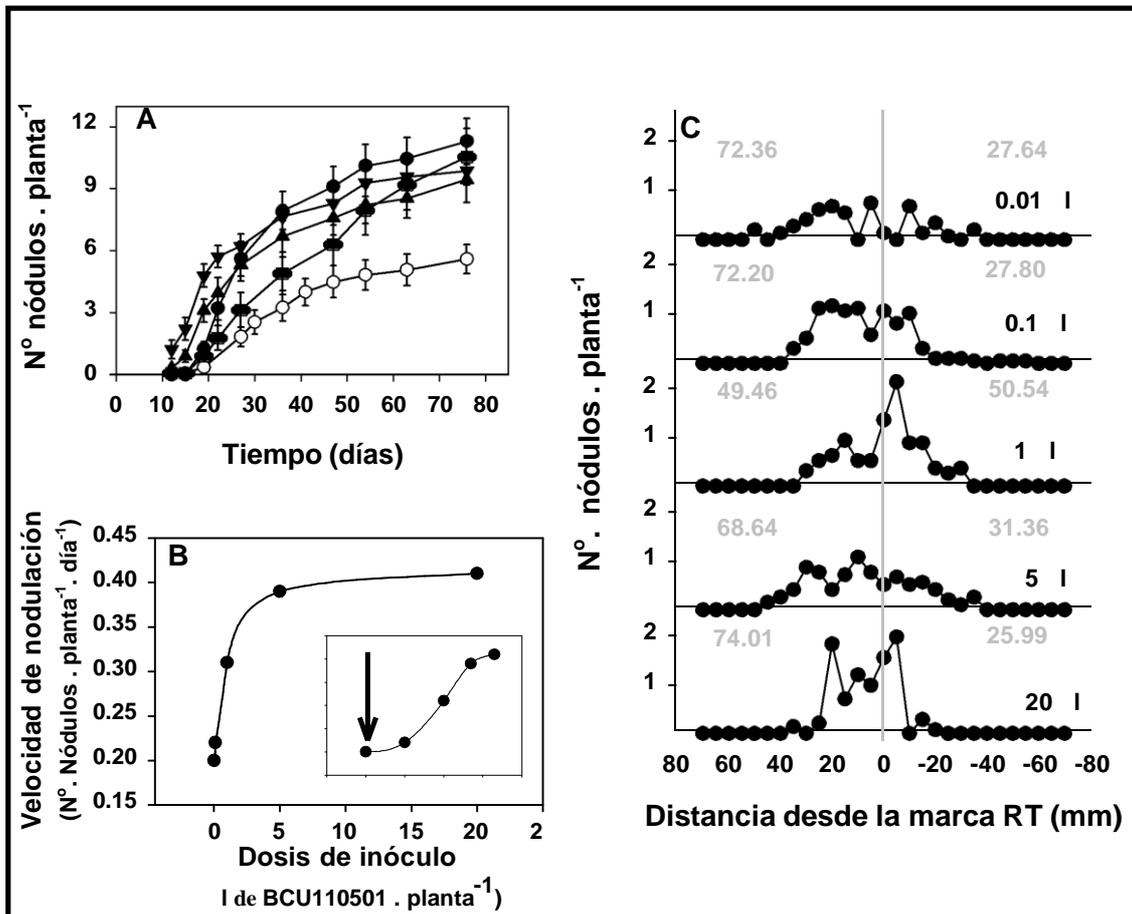


**Figura 2.** Análisis de la cinética de nodulación. (A) Gráfico esquemático de la cinética de nodulación que muestra los parámetros analizados para plantas individuales:  $t_0$  es el tiempo necesario para la aparición del primer nódulo,  $v_0$  es la velocidad inicial de nodulación,  $v_R$  es la velocidad regulada de nodulación,  $t_F$  es el tiempo que tarda en aparecer el último nódulo y  $t_{NOD}$  es el tiempo total de nodulación. (B) Grupo de curvas donde cada una corresponde a una planta de un grupo de plantas provenientes del mismo tratamiento. (C) Gráfico promedio donde cada punto representa el promedio de nódulos registrados a una fecha dada teniendo en cuenta todas las plantas del tratamiento.

#### **Efectos de diferentes dosis de *Frankia* BCU110501 infectiva en *Discaria trinervis***

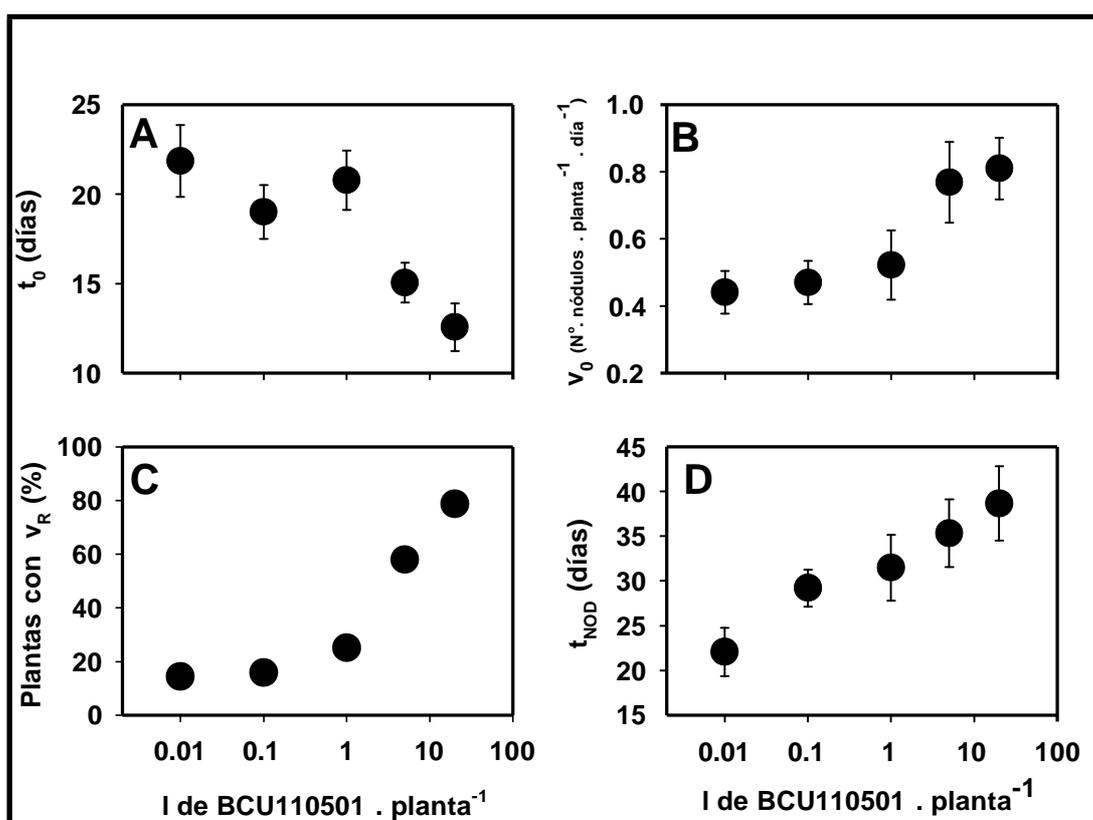
La nodulación en las raíces de *D. trinervis* mostró dependencia sobre la concentración de *Frankia* BCU110501 en el inóculo (Figura 3). Este efecto dosis – respuesta puede ser fácilmente visualizado como un incremento en el número de nódulos por planta (Figura 3 A) así también como en el incremento de las diferentes velocidades de nodulación que fueron obtenidas de la pendiente inicial de la gráfica individual para cada planta con las dosis de inóculo. Por otro lado, la distribución de nódulos a lo largo de la raíz, un fenotipo que expresa autorregulación de la nodulación en la simbiosis (Valverde y Wall, 1999b), no mostró una variación coherente con el tratamiento, el porcentaje de nódulos por encima y por debajo de la marca RT no fue diferente con respecto a la dosis del inóculo (Figura 3 C).

Los parámetros de nodulación fueron determinados por el análisis de la cinética de cada planta en forma individual como se describió más arriba en Materiales y Métodos, y los valores medios de estos parámetros fueron analizados y representados en función de la dosis del inóculo (Figura 4).



**Figura 3. Nodulación de *Discaria trinervis* inoculada con diferentes dosis de *Frankia* BCU110501.** (A) Cinéticas de nodulación variando la dosis de inóculo *Frankia* BCU110501: 0.01 (○), 0.1 (●), 1 (■), 5 (▲) y 20 (▼) I pcv (200 I)<sup>-1</sup> de suspensión bacteriana por planta. Los valores son el promedio  $\pm$  SE para n =16-20 plantas. (B) El gráfico pequeño insertado muestra lo mismo en escala logarítmica decimal y la flecha apunta a la dosis de inóculo limitante al que se hace referencia en el texto. (C) Perfil de distribución de nódulos a lo largo de la raíz de *D. trinervis*. Diferentes dosis de *Frankia* BCU110501 expresadas como microlitros de *Frankia* pcv por raíz se encuentran indicadas a la derecha de cada gráfica. La línea gris muestra la posición de la marca RT al momento de la inoculación. Los valores en porcentaje de nódulos por encima y por debajo de la marca RT son mostrados dentro del gráfico a la izquierda y a la derecha respectivamente. Para realizar estos gráficos de perfiles de nodulación se midió la posición de los nódulos de entre 16 y 20 plantas 79 días después de la inoculación. El crecimiento de la raíz se representa de izquierda a derecha.

El incremento en la dosis de inóculo de *Frankia* BCU110501 redujo  $t_0$ , el tiempo que transcurre desde la inoculación hasta la aparición del primer nódulo (Figura 4 A), incrementó  $v_0$  (Figura 4 B), incrementó el número de plantas con una segunda velocidad de nodulación reducida (Figura 4 C), incrementó  $t_{NOD}$ , el tiempo total durante el cual aparecen nuevos nódulos (Figura 4 D) y también incrementó el número total de nódulos por planta al final del experimento, cuando se cosecharon las plantas (Figura 3 A). Este experimento fue repetido en un total de 3 veces en forma independiente y en distintas épocas del año. El análisis de los datos de los diferentes experimentos dio resultados similares y aquí se muestra el grupo de datos más completo.



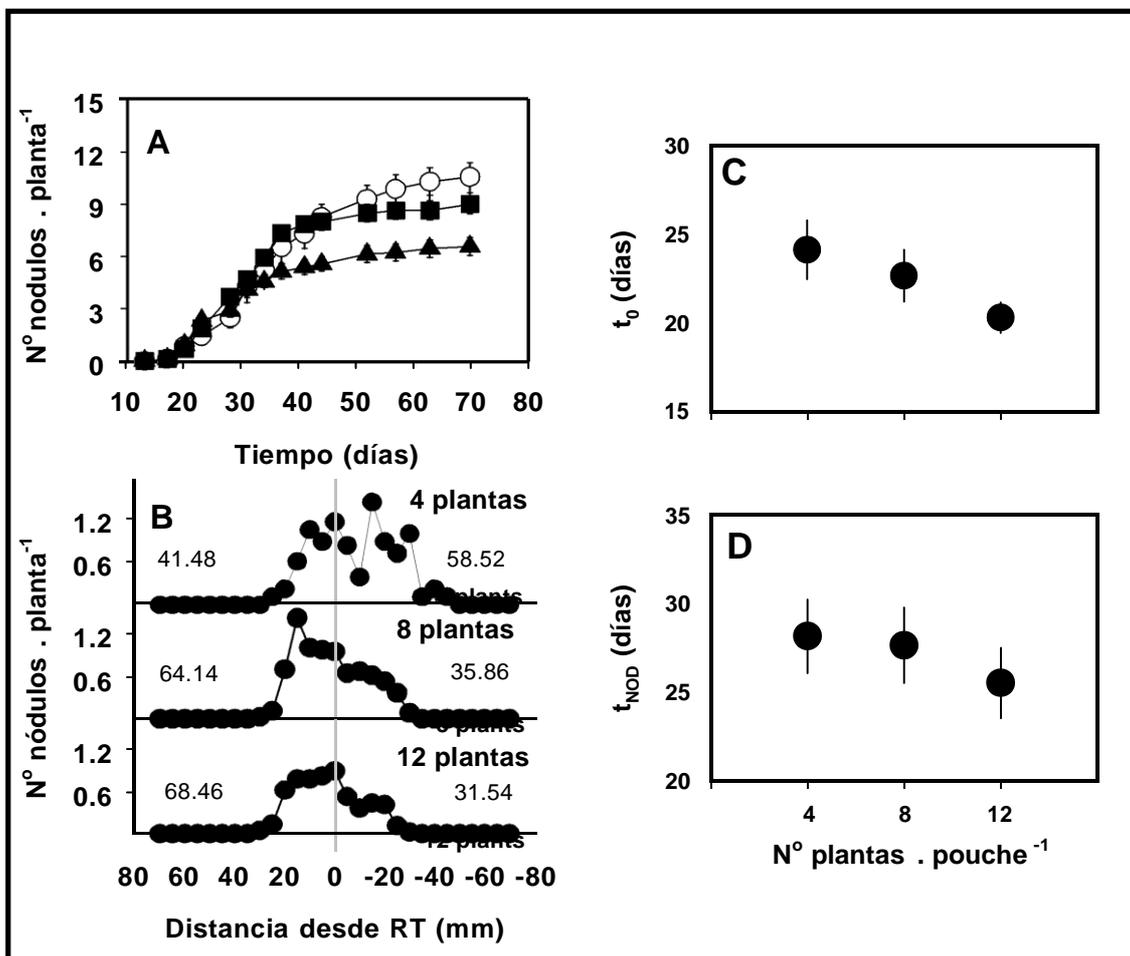
**Figura 4. Parámetros de nodulación en *Discaria trinervis* inoculada con diferentes dosis de *Frankia* BCU110501.** (A) Tiempo que transcurre desde la inoculación hasta la aparición del primer nódulo,  $t_0$ . (B) Velocidad inicial de nodulación,  $v_0$ . (C) Porcentaje de plantas con velocidad de nodulación regulada,  $v_R$ . (D) Tiempo de nodulación total,  $t_{NOD}$ . Los valores son el promedio  $\pm$  SE para un  $n = 16-20$  plantas.

## Efecto de diferentes dosis de exudados radiculares de *Discaria trinervis*

Con el objetivo de estudiar el efecto de otros factores en los ensayos de nodulación, se decidió trabajar a concentración de inóculo *Frankia* BCU110501 limitante (valor indicado por la flecha en la figura 3 B) y variar otros factores. Con esta premisa, se empezó explorando el efecto de los factores de la planta *D. trinervis* incrementando el número de plantas por pouche. Ya que la cantidad de solución mineral por pouche no fue modificada, la concentración de exudados radiculares fue variando entre tratamientos de acuerdo al número de plantas presentes en cada pouche. El incremento en la concentración de exudados radiculares redujo  $t_0$ , el tiempo que transcurre desde que se inocula la raíz hasta que aparece el primer nódulo (Figura 5 C) y aparentemente se redujo  $t_{NOD}$ , el tiempo total de nodulación (Figura 5 D). El perfil de nodulación se modificó como si el mecanismo de inhibición de la nodulación por retro alimentación hubiese comenzado a actuar más temprano, desarrollándose grupos de nódulos en una extensión reducida de la raíz (Figura 5, B Tabla 1). Este efecto provocó una prematura finalización de la nodulación y consecuentemente el número final de nódulos por planta se redujo (Figura 5 A). En este ensayo no se observaron diferencias en otros parámetros de nodulación como  $v_0$ , la velocidad inicial de nodulación fue 0.60, 0.71, y 0.67 (número de nódulos por planta por día) para 4, 8 y 12 plantas por pouche, respectivamente.

	Número de plantas por pouche		
	4	8	12
$X_i$ (mm) (promedio $\pm$ SE)	8.22 $\pm$ 2.79 <sup>a</sup>	14.94 $\pm$ 1.61	14.21 $\pm$ 1.63
$X_f$ (mm) (promedio $\pm$ SE)	-15.39 $\pm$ 3.98 <sup>a</sup>	-4.91 $\pm$ 2.25	-0.74 $\pm$ 1.78
$X_i - X_f$ (mm) (promedio $\pm$ SE)	23.61 $\pm$ 3.39	19.85 $\pm$ 2.02	12.23 $\pm$ 1.41 <sup>b</sup>

**Tabla 1. Análisis de la nodulación a lo largo de la raíz.**  $X_i$  es la posición del nódulo que se encuentra más arriba a lo largo de la raíz.  $X_f$  es la posición del último nódulo en la raíz.  $X_i - X_f$  es la longitud del grupo de nódulos en la raíz principal, esto es, la distancia entre el primer y el último nódulo. <sup>a</sup> $P \leq 0.05$ , para test-t de datos no apareados (SIGMA PLOT 8.0) y diferencias estadísticamente significativas entre 4 plantas comparados con 8 y 12 plantas por pouche. <sup>b</sup> $P \leq 0.001$ , test-t de datos no apareados (SIGMA PLOT 8.0) y diferencias estadísticamente significativas entre 12 plantas comparada con 4 y 8 plantas por pouche. Las posiciones están en mm, los valores son el promedio  $\pm$  SE.



**Figura 5. Nodulación de *Discaria trinervis* con diferente cantidad de plantas por pouche.**

(A) Cinética de nodulación para 4 plantas por pouche (○), 8 plantas por pouche (■) y 12 plantas por pouche (▲). Todos los tratamientos fueron inoculados con 800  $\mu$ l de suspensión bacteriana por pouche distribuida en 4 dosis de 200  $\mu$ l que contenían 0.01  $\mu$ l pcv de *Frankia* BCU110501 sobre cada grupo de 1, 2 y 3 raíces por ranura del pouche. (B) Perfil de distribución de nódulos a lo largo de la raíz de *D. trinervis*. El número de plantas por pouche está indicado a la derecha de cada gráfica. La posición de los nódulos con respecto a la marca RT se registró 70 días después de la inoculación. El perfil de nodulación a lo largo de la raíz se obtuvo para cada grupo de plantas como se describió en la sección Materiales y métodos. El crecimiento de la raíz se presenta de izquierda a derecha y la línea gris muestra la posición de la marca RT al momento de la inoculación. Los valores expresados como porcentaje de nódulos por encima y por debajo de la marca RT se muestran dentro de cada gráfico a la izquierda y a la derecha, respectivamente. (C) Se expresa el cambio en  $t_0$  respecto a la dosis de plantas. (D) Se muestra el cambio en el tiempo total de nodulación ( $t_{NOD}$ ) con la dosis de exudados radiculares. Los valores son el promedio  $\pm$  SE para un  $n = 24 - 48$  plantas.

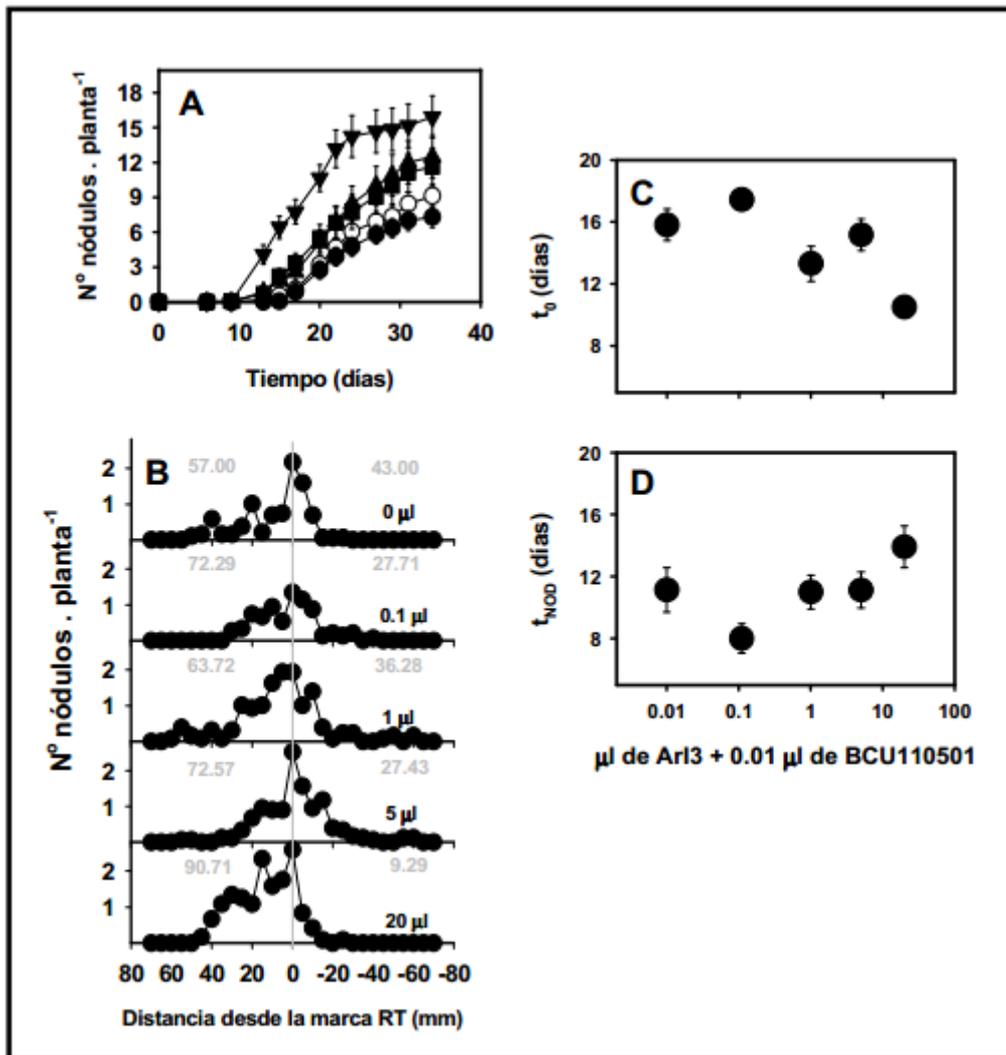
### Efecto de coinocular *Discaria trinervis* con diferentes dosis de bacterias no

## infectivas

Cuando se coinoculó *D. trinervis* con una dosis limitante de *Frankia* BCU110501 (indicado con la flecha en la Figura 3 B) junto con altas dosis de bacterias no infectiva proveniente de distintos grupos de rizobacteria, se encontró una estimulación de la nodulación respecto al tratamiento control inoculado solo con *Frankia* BCU110501 únicamente cuando la bacteria coinoculada pertenecía al género *Frankia* (Figura 6, Tabla 2, líneas 1-4). Cabe destacar que las cepas de *Frankia* Arl3, Cpl1 y Cj82 no fueron capaces de inducir nódulos en *D. trinervis* cuando se inocularon individualmente y en altas dosis. Por el contrario, cuando distintas rizobacterias, ya sean Gram positivas ó Gram negativas, se coinocularon a altas dosis (por encima de  $1 \times 10^7$  ufc por ml), no se observó ningún efecto en la nodulación de *D. trinervis*. No se encontró ningún efecto, ya sea de estimulación o de inhibición de ninguno de los parámetros de nodulación (Tabla 2, fila 5-13).

Se realizó un análisis más detallado después de la coinoculación de *Frankia* Arl3 en diferentes dosis junto con *Frankia* BCU110501 en una dosis limitante (Figuras 6 A y 6 C). *Frankia*Arl3 provocó una estimulación de la nodulación final de *Frankia* BCU110501 en *D. trinervis*, siendo el principal efecto que se observó una reducción en  $t_0$ , el tiempo que transcurre desde la inoculación hasta la aparición del primer nódulo (Figura 6 C) e incrementando  $t_{NOD}$ , el tiempo total de nodulación (Figura 6 D). En estos ensayos no se encontró efecto ya sea de estimulación como de inhibición de la velocidad inicial de nodulación [ $v_0$ : 1.11, 1.31, 1.29, 1.11 y 1.17 (número de nódulos planta<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>) para 0, 0.1, 1,5 y 20  $\mu$ l de Arl3, respectivamente]. El perfil de nodulación no se alteró cuando la dosis de Arl3 incrementó en el inóculolo (Figura 6 B), salvo para el valor más alto de Arl3 de 20 ml pcv por planta.

Se observaron resultados similares con respecto al parámetro  $t_{NOD}$ , el tiempo total de nodulación (Tabla 2) para la coinoculación con otras cepas no infectivas de *Frankia* como son las cepas Cpl1 y Cj82 (Tabla 2, línea 1-4).



**Figura 6. Nodulación de *Discaria trinervis* coinoculada con *Frankia* BCU110501 y diferente dosis de *Frankia* Arl3.** (A) Cinética de nodulación para 0 (○), 0.1 (●), 1 (■), 5 (▲) y 10 (▼) ml pcv de *Frankia* Arl3 por planta; *Frankia* BCU110501 fue inoculada a 0.01 l pcv planta. Ambas bacterias se mezclaron previo a la inoculación en la concentración final apropiada y cada raíz fue inoculada con 200 l de esta suspensión. (B) Perfil de nodulación en las raíces de *D. trinervis* inoculadas con *Frankia* BCU110501 (0.01 l pcv planta) y diferentes dosis de *Frankia* Arl3, indicadas como microlitros de pcv inoculadas por raíz a la derecha de cada gráfico. La posición de los nódulos respecto a la marca RT fue registrada 35 días después de la inoculación. La dirección de crecimiento de la raíz es de izquierda a derecha, la línea gris muestra la posición de la marca RT al momento de la inoculación y los valores expresados en porcentaje de nódulos por encima y por debajo de la marca RT son mostrados dentro del gráfico a la izquierda y a la derecha, respectivamente. (C)  $t_0$ , tiempo que transcurre desde la inoculación hasta la aparición del primer nódulo con la variación de la dosis de *Frankia* Arl3. (D)  $t_{NOD}$ , tiempo total de nodulación con respecto a la variación en la dosis de *Frankia* Arl3. Los valores son promedios  $\pm$  SE para un n = 17-20 plantas.

Número	Coinoculation	Nº Nódulos . planta <sup>-1</sup>	t <sub>0</sub>	V <sub>0</sub>	t <sub>NOD</sub>
1	Ninguna (control) <sup>1</sup>	5.6 ± 0.7	20.0 ± 1.5	0.29 ± 0.03	24.0 ± 2.6
2	<i>Frankia</i> Cpl1 <sup>1</sup> 10 µl	10.9 ± 1.0 <sup>a</sup>	23.5 ± 2.1	0.44 ± 0.04 <sup>a</sup>	32.2 ± 2.6 <sup>b</sup>
3	<i>Frankia</i> Cpl1 <sup>1</sup> 0.1 µl	10.6 ± 0.9 <sup>a</sup>	22.5 ± 1.5	0.40 ± 0.04 <sup>b</sup>	32.7 ± 2.7 <sup>b</sup>
4	<i>Frankia</i> Cj82 <sup>1</sup> 10 µl	10.3 ± 1.4 <sup>a</sup>	21.1 ± 2.1	0.40 ± 0.07	36.6 ± 2.8 <sup>a</sup>
5	Ninguna (control) <sup>3</sup>	9.5 ± 0.8	20.2 ± 0.9	0.99 ± 0.11	15.0 ± 1.7
6	<i>Streptomyces coelicolor</i> A(3)2 <sup>3</sup>	10.8 ± 1.0	18.3 ± 0.9	0.97 ± 0.10	18.4 ± 2.4
7	ninguna (control) <sup>2</sup>	7.7 ± 1.0	25.2 ± 2.1	0.23 ± 0.03	33.0 ± 2.8
8	<i>Bacillus thuringiensis</i> <sup>2</sup> 2x10 <sup>8</sup> ufc por raíz	6.9 ± 0.9	28.0 ± 2.5	0.30 ± 0.04	32.6 ± 3.6
9	<i>Bacillus thuringiensis</i> <sup>2</sup> 2x10 <sup>9</sup> ufc por raíz	7.0 ± 1.1	28.5 ± 1.4	0.26 ± 0.04	33.6 ± 3.4
10	<i>Azospirillum brasilense</i> <sup>2</sup> 1x10 <sup>9</sup> ufc por raíz	10.2 ± 1.4	29.1 ± 2.6	0.34 ± 0.05	35.8 ± 3.3
11	<i>Azospirillum brasilense</i> <sup>2</sup> 1x10 <sup>6</sup> ufc por raíz	8.3 ± 0.7	22.0 ± 2.0	0.22 ± 0.03	35.8 ± 4.6
12	<i>Bacillus subtilis</i> <sup>2</sup> 5x10 <sup>6</sup> ufc por raíz	8.0 ± 1.0	35.8 ± 3.8 <sup>b</sup>	0.29 ± 0.05	34.0 ± 4.0
13	<i>Bacillus subtilis</i> <sup>2</sup> 5x10 <sup>3</sup> ufc por raíz	8.8 ± 1.7	31.4 ± 4.1	0.31 ± 0.05	34.6 ± 4.7
14	<i>Pseudomonas putida</i> <sup>2</sup> 1x10 <sup>10</sup> ufc por raíz	8.4 ± 1.2	28.3 ± 2.9	0.22 ± 0.03	36.3 ± 3.8
15	<i>Pseudomonas putida</i> <sup>2</sup> 1x10 <sup>7</sup> ufc por raíz	5.1 ± 0.8 <sup>b</sup>	28.4 ± 3.6	0.20 ± 0.04	38.1 ± 3.8

Tabla 2. Parámetros de nodulación de *Discaria trinervis* coinoculada con *Frankia* BCU110501 y diferentes bacterias. *Frankia* BCU110501 fue inoculada con 0.01 ml pcv raíz<sup>-1</sup> en todos los casos. Las bacterias se mezclaron previo a la inoculación en la concentración final apropiada (indicado en la columna) y cada raíz fue inoculada con 200 l de esta suspensión. Las filas 1 y 5 son tratamientos control para los datos que se encuentran entre las filas 2-4 y 6-13, respectivamente, y está indicado con la misma letra "a" ó "b" en superíndice. Diferencias estadísticamente significantes de <sup>b</sup>P < 0.01 y <sup>c</sup>P < 0.05, test-t no apareado (SIGMA PLOT 8.0) comparado con sus correspondientes tratamientos controles.

## 2.4 Discusión

En el progreso de nodulación radicular de las plantas actinorrícicas se espera que se generen interacciones entre los simbioses a través del intercambio de señales y su interacción física como lo es la colonización de la superficie radicular y los espacios intercelulares. Estos eventos probablemente dependan de un estado fisiológico particular de la bacteria regulado por la concentración local de la bacteria, sin embargo hasta la fecha esto sigue siendo una hipótesis en la simbiosis actinorrícica. En la simbiosis entre rizobios y leguminosas, las señales producidas por la planta (flavonoides) activan la producción de los factores Nod de los rizobios (lipoquitinooligosacáridos), los cuales inducen cambios en la expresión de la planta induciendo la infección y el desarrollo del nódulo (Mulder y col., 2005). Este modelo de reconocimiento entre leguminosas y rizobios ha sido confirmado a través de numerosos análisis genéticos en plantas y rizobios mutantes (Geurts y col., 2005). A pesar de haber probado todas las técnicas disponibles, la comunidad científica no ha logrado transformar *Frankia* y el modelo de reconocimiento que se conoce para leguminosas y rizobios no ha sido aun descifrado para la simbiosis actinorrícica (Wall y Berry, 2008; Wall,

2000). Ante la imposibilidad de obtener mutantes para la nodulación, se planteó la utilización de herramientas alternativas para abordar el estudio de factores en la planta y en el microsimbionte que participan y modulan el avance de la nodulación. Un detallado análisis de la cinética de nodulación (Figura 2) reveló diferentes factores con efecto dosis respuesta relacionado a la nodulación (Figuras 4, 5 C, 5 D, 6 C y 6 D).

Todos los parámetros de nodulación fueron modificados cuando la dosis de la cepa infectiva *Frankia* BCU110501 fue variada (Figura 4). Debido a que la nodulación es un proceso en continuo desarrollo, cada etapa de este proceso puede ser considerada como una consecuencia de la etapa previa. De este modo, el cambio en todos los parámetros a causa del incremento en la dosis de BCU110501 se puede interpretar fácilmente como una serie de modificaciones que surgen como consecuencia de la primera etapa limitante en el proceso de nodulación. Alternativamente, muchas interacciones entre plantas y microbios podrían ocurrir en paralelo.

El hecho de que cepas de *Frankia* no infectivas en *D. trinervis* (Tabla 2), y un género de actinomicete como *Streptomyces* (Figura 6) puedan provocar algunos de los cambios que genera la cepa BCU110501 en ciertos parámetros de nodulación y no en todos, hace suponer que hay más de una etapa limitante en el comienzo de la nodulación. Al mismo tiempo, estos resultados sugieren la existencia de al menos más de una señal de origen bacteriano involucrada en el proceso de nodulación. Hay un reporte que menciona la influencia positiva de una bacteria, que sin ser un actinomicete, favorece la nodulación de *Alnus glutinosa* incrementando la deformación de pelos radiculares (Knowlton y col., 1980). Por otro lado, en los ensayos que se realizaron con *D. trinervis*, no se observaron efectos similares cuando en los ensayos se adicionaron bacterias rizosféricas (no actinomicetes) (Tabla 2). La diferencia puede deberse a que *Alnus glutinosa* y *Discaria trinervis* presentan diferente vía de infección, o bien a que las cepas que se utilizaron para realizar los ensayos no expresaron la actividad que observaron Knowlton y sus colaboradores (1980) en sus experimentos con *Alnus*.

El  $t_0$ , tiempo que transcurre desde la inoculación hasta la aparición del primer nódulo, no parece reflejar reconocimiento simbiótico debido a que puede ser modificado por factores difusibles de cepas de *Frankia* no infectivas o de *Streptomyces coelicolor* (Tabla 2 y 3). Además, esta etapa parece ser donde la naturaleza de actinomicete que posee *Frankia* es expresada debido a que otras bacterias no actinomicetes no pudieron remplazar este efecto (Tabla 2).

La  $v_0$ , velocidad inicial de nodulación es una expresión de reconocimiento simbiótico debido a que solo pudo ser modificada por *Frankia* BCU110501. Ninguna de las otras cepas de *Frankia*, al igual que las otras bacterias ensayadas, pudieron modificar el parámetro  $v_0$ . Estos resultados sugieren que la señal de reconocimiento puede ser de origen bacteriano.

La variación en la concentración de los factores producidos por las raíces de *Discaria trinervis* hasta un factor de 3 (Figura 5) redujo el  $t_0$ , sugiriendo que estos factores están involucrados en una etapa muy temprana de la interacción entre los simbiontes condicionando el comienzo del proceso de nodulación. Estos factores producidos por la planta también modificaron el número de nódulos por planta y la agrupación de los nódulos a lo largo de la raíz principal (Figura 5, Tabla 1), evidenciando la expresión del fenómeno de autorregulación. Estos resultados sugieren la existencia de una interacción planta – bacteria mediada por factores difusibles producidos por la planta. A partir de estos resultados no se puede saber en forma concluyente si los efectos producidos por *D. trinervis* están relacionados a los efectos que produjeron los flavonoides sobre la nodulación de *Alnus rubra* (Benoit y Berry, 1997) o si son efectos sobre la *Frankia* que luego se expresan en la simbiosis. La autorregulación de la nodulación (Valverde y Wall, 1999a; Wall y Huss-Danell, 1997) puede ser considerada como una respuesta de defensa de la planta a adaptada a controlar a las infecciones, lo que implica la inhibición de nuevas infecciones en la raíz y el control del desarrollo de nódulos una vez que la infección tuvo lugar y así prevenir de una hipernodulación que implicaría un drenaje de fotosintatos excesivo a los microsimbiontes en detrimento del desarrollo vegetal.

En el experimento que estudia los efectos de los factores de la planta, se introdujo una nueva variable dependiente de la relación bacteria – planta debido a que la concentración bacteriana se mantuvo constante dentro del pouche y se modificó el número de plantas dentro del pouche. Teniendo en cuenta estas observaciones se considera que la relación bacteria – planta no es relevante. El incremento en la concentración de factores de la planta modificó el modo de agrupación de nódulos en la raíz principal haciendo que se agrupen en la zona más vieja de la raíz y que cambien las posiciones de los nódulos extremos del grupo de nódulos y la longitud del grupo de nódulos a lo largo de la raíz (Tabla 1). Estos cambios en el patrón de nodulación no estarían asociados a un efecto bacteriano debido a que la reducción de la concentración de *Frankia* BCU110501 fue de tan solo 3 veces entre los diferentes tratamientos, siendo que cuando la concentración varió entre 0.01 y 20  $\mu$ l de pcv de *Frankia* BCU110501 por planta no se observaron cambios en los perfiles de nodulación

(Figura 3). Además, cuando la concentración de bacterias y como consecuencia la relación bacteria – planta se incrementó, la posición del primer nódulo se corrió hacia la parte superior de la raíz ( $X_i = 13$  y  $18$  para  $0.01$  y  $0.1 \mu\text{l pcv}$  de *Frankia* BCU110501, respectivamente) Un cambio similar fue encontrado cuando los factores de *Discaria trinervis* fueron incrementados (Tabla 1, línea  $X_i$ ) pero en este caso la relación bacteria – planta fue reducida 3 veces. De todas maneras, no se puede descartar que al inocular con una concentración limitante de inóculo (Figura 3 B), una reducción de 3 veces en la relación bacteria – planta pudiera estar afectando el efecto de los factores de la planta sobre la nodulación. Es preciso notar que el incremento en la dosis de *Frankia* BCU110501 no mostró un cambio estricto de los nódulos hacia la zona madura de la raíz (Figura 3 C) como se podría esperar considerando la reducción en  $t_0$ . Por el contrario, el tiempo de nodulación total,  $t_{\text{NOD}}$ , se incrementó con la concentración del inóculo bacteriano y también aumentó el tamaño de la zona de la raíz en la que se extendió el grupo de nódulos ( $X_i - X_f = 13.4$  y  $21.9$  mm para inóculos de  $0.01$  y  $20 \mu\text{l pcv}$  de *Frankia*, respectivamente). Estos resultados sugieren que la autorregulación de la nodulación por parte de la planta sería contrarestanda por factores de *Frankia* sin que necesariamente expresen reconocimiento simbiótico, ya que ambas cepas de *Frankia*, BCU110501 y Arl3 produjeron efectos similares (Figuras 3, 4 y 6).

Se concluye que el análisis de las cinéticas de nodulación podría ser una herramienta apropiada y útil para investigar nuevos factores, ya sean señales o componentes físicos involucrados en las interacciones simbióticas que conducen a la formación de nódulos fijadores de nitrógeno. Al mismo tiempo, se puede concluir que este análisis puede ser muy útil para investigar el rol que juegan diferentes sustancias involucradas en el proceso de nodulación.

## 2.5 Referencias

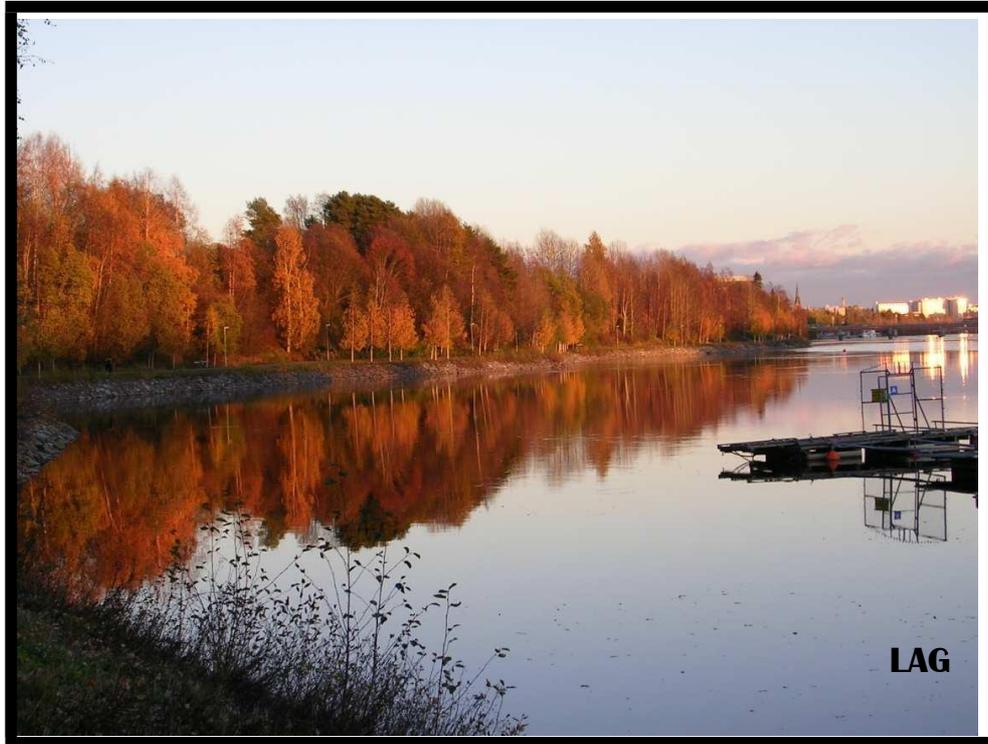
- Benoit, L., and Berry, A. (1997): Flavonoid-like compounds from seeds of red alder (*Alnus rubra*) influence host nodulation by *Frankia* (Actinomycetales). *Physiologia Plantarum* **99**, 588-593.
- Berry, A., and Torrey, J. G. (1979): Isolation and Characterization in vivo and in vitro of an actinomyceteous endophyte from *Alnus Rubra* Bong, pp. 69-83. In J. Gordon, C. Wheeler, and D. Perry (Eds): *Symbiotic Nitrogen Fixation in the Management of Temperate Forest*, Corvallis: Oregon State University, Forest research Laboratory.

- Caetano Anollés, G., and Favelukes, G. (1986): Quantitation of adsorption of rhizobia in low numbers to small legume roots. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**, 371-376.
- Cérémonie, H., Debelle, F., and Fernandez, M. P. (1999): Structural and functional comparison of *Frankia* root hair deforming factor and rhizobia Nod factor. *Can. J. Bot.* **77**, 1293–1301.
- Chaia, E. (1998): Isolation of an effective strain of *Frankia* from nodules of *Discaria trinervis* (Rhamnaceae). *Plant and Soil* **205**, 99-102.
- Chaia, E. E., Valverde, C., and Wall, L. G. (2006): Local adaptation of *Frankia* to different *Discaria* (Rhamnaceae) host species growing in patagonia. *Curr Microbiol* **53**, 523-8.
- Geurts, R., Fedorova, E., and Bisseling, T. (2005): Nod factor signaling genes and their function in the early stages of *Rhizobium* infection. *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 346-352.
- Glick, B., Changping, L., Ghosh, S., and Dumbroff, E. (1997): Early development of canola seedlings in the presence of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Soil Biology & Biochemistry* **29**, 1233-1239.
- Holguin, G., and Glick, B. (2001): Expression of the ACC deaminase gene from *Enterobacter cloacae* UW4 in *Azospirillum brasilense*. *Microbial Ecology* **41**, 281-288.
- Knowlton, S., Berry, A., and Torrey, J. (1980): Evidence that associated soil bacteria may influence root hair infection of actinorhizal plants by *Frankia*. *Can J Microbiol.* **26**, 971-977.
- Mulder, L., Hogg, B., Bersoult, A., and Cullimore, J. (2005): Integration of signalling pathways in the establishment of the legume-rhizobia symbiosis. *Physiologia Plantarum* **123**, 207-218.
- Murry, M., Fontaine, M., and Torrey, G. (1984): Growth kinetics and nitrogenase induction in *Frankia* sp. HFPAr1 3 grown in batch culture. *Plant and Soil* **78**, 61-78.
- Nesme, X., Normand, P., Tremblay, F., and Lalonde, M. (1985): Nodulation speed of *Frankia* sp. on *Alnus glutinosa*, *Alnus crispa*, and *Myrica gale*. *Can J Microbiol* **63**, 1292-1295.
- Nittayajarn, A., and Baker, D. (1989): Methods for the quantification of *Frankia* cell biomass. *Plant and Soil* **118**, 199-204.
- Torrey, J., and Callahan, D. (1982): Structural Features of the Vesicle of *Frankia* sp. CplI in Culture. *Canadian Journal of Microbiology* **28**, 749-757.
- Valverde, C., Ferrari, A., and Wall, L. G. (2002): Phosphorus and the regulation of

- nodulation in the actinorhizal symbiosis between *Discaria trinervis* (Rhamnaceae) and *Frankia* BCU110501. *New Phytologist* **153**, 43-51.
- Valverde, C., and Wall, L. (1999a): Regulation of nodulation in *Discaria trinervis* (Rhamnaceae) - *Frankia* symbiosis. *Can. J. Bot.* **77**, 1302–1310.
- Valverde, C., Wall, L., and Huss-Danell, K. (2000): Regulation of nodulation and nodule mass relative to nitrogenase activity and nitrogen demand in seedlings of *Discaria trinervis* (Rhamnaceae). *Symbiosis* **19**, 167-182.
- Valverde, C., and Wall, L. G. (1999b): Time course of nodule development in the *Discaria trinervis* (Rhamnaceae) –*Frankia* symbiosis. *New Phytologist* **141** 345-354.
- Van Ghelue, M., Løvaas, E., Ringø, E., and Solheim, B. (1997): Early interactions between *Alnus glutinosa* and *Frankia* strain Ar13. Production and specificity of root hair deformation factor(s). *Physiologia Plantarum* **99**, 579-587.
- Wall, L., and Berry, A. (2008): Early Interactions, Infection and Nodulation in Actinorhizal Symbiosis, pp. 147-166. In K. Pawlowski, and W. Newton (Eds): *Nitrogen-fixing Actinorhizal Symbioses*, Springer, Dordrecht.
- Wall, L., Valverde, C., and Huss-Danell, K. (2003): Regulation of nodulation in the absence of N<sub>2</sub> is different in actinorhizal plants with different infection pathways. *J Exp Bot* **54**, 1253-8.
- Wall, L. G. (2000): The Actinorhizal Symbiosis. *J Plant Growth Regul* **19**, 167-182. Wall, L. G., and Huss-Danell, K. (1997): Regulation of nodulation in *Alnus incana*-*Frankia* symbiosis *Physiol Plant* **99**, 594–600.

## Capítulo 3

### “Estudio de factores difusibles bacterianos en la nodulación de *Discaria trinervis*”



#### 3.1 Introducción

Trabajos previos de nuestro y otros laboratorios muestran que la nodulación está fuertemente determinada por la dosis del inóculo en *Discaria trinervis* (Gabbarini y Wall, 2008; Valverde y Wall, 1999a), en *Alnus incana* (Wall y Huss-Danell, 1997). La deformación de pelos radiculares, un evento necesario para la nodulación en las plantas que son infectadas por la vía intracelular (Van Ghelue y col., 1997), no requiere necesariamente que exista contacto entre células de *Frankia* y de las plantas, indicando que sería un compuesto difusible el que produce la reacción de deformación de pelos radiculares (Burggraaf y col., 1983). La producción del factor de deformación de pelos radiculares por parte de *Frankia* y la liberación al medio de cultivo se produce, aparentemente, independientemente de una posible inducción por parte de la planta hospedadora (Van Ghelue y col., 1997). El grado de

deformación de los pelos radiculares es también dependiente de la concentración del factor responsable, ya sea en la suspensión de *Frankia*, como de un filtrado de células de *Frankia* (Van Ghelue y col., 1997). Un trabajo realizado por Knowlton y cols. (1980) mostró que microorganismos considerados rizosféricos juegan un papel muy significativo en la infección de plantas actinorrhizas que utilizan la vía intracelular de infección. Los autores (Knowlton y col., 1980) sugirieron que podría deberse a que los microorganismos, aún sin ser infectivos, aumentaban masivamente la deformación de los pelos radiculares. Si bien *Discaria trinervis* utiliza la vía de infección intercelular cuando es nodulada por *Frankia* BCU110501, hemos encontrado que la cepa *Frankia* BCU110501 es capaz de producir deformación de pelos radiculares en *Alnus acuminata* y *Alnus incana* a pesar de no nodular ninguna de las dos especies. La deformación producida por BCU110501 es morfológicamente equivalente a la que produce la cepa infectiva Arl3 (dato no publicado). En el capítulo 2 mostramos que otras cepas de *Frankia* no infectivas en *D. trinervis* como Arl3, Cj82 y Cpl1 e inclusive una bacteria de otro género como lo es *Streptomyces coelicolor*, son capaces de favorecer la infección y la nodulación cuando se los inocula junto con la cepa infectiva *Frankia* BCU110501. Si bien en *D. trinervis* no ocurre deformación de pelos radiculares, este fenómeno se asemeja a lo que producen los microorganismos rizosféricos sobre la nodulación en *Alnus rubra* por Arl3 (Knowlton y col., 1980). Estos antecedentes permiten suponer que existen diferentes compuestos bacterianos que podrían actuar sobre el establecimiento de la simbiosis y no necesariamente del mismo modo. Si bien en las plantas que son infectadas por la vía intercelular no se produce deformación de pelos radiculares, es posible que las bacterias que infectan este tipo de plantas produzcan señales similares o idénticas a los factores de deformación de pelos radiculares pero que en este caso sean censadas o percibidas por otro tipo de células de la raíz. A partir de estos antecedentes nos interesamos en el estudio de factores difusibles (FD) de *Frankia* que actúan en su huésped natural *Discaria trinervis* que es infectada por la vía intercelular. Como la deformación de los pelos radiculares no puede utilizarse como bioensayo en este caso particular, para medir el (los) factor(es) difusible(s) se utilizó un análisis de la nodulación basado en la comparación de cinéticas de nodulación y los parámetros que surgen de analizar cada planta individualmente ( $t_0$ ,  $v_0$ ,  $v_R$  y  $t_{NOD}$ , ver Capítulo 2). También se observaron los perfiles de nodulación y el número final de nódulos por planta para poder diferenciar el mecanismo de acción de los factores difusibles bacterianos. Para ello se realizaron ensayos con un inóculo de *Frankia* BCU110501 en cantidades limitantes y previamente lavado con solución

mineral y suplementados con sobrenadantes de: i) su propio medio de cultivo, ii) cultivos de BCU110501 de diferentes estados fisiológicos, iii) cultivos de cepas de *Frankia* no infectivas en *Discaria trinervis*, y iv) cultivos de otro géneros como *Streptomyces coelicolor*.

Además, se hicieron ensayos activando al inóculo BCU110501, previo a la inoculación, con diferentes cantidades de la misma cepa separados por una membrana de diálisis.

Estos ensayos, en su conjunto, buscaron establecer si los FDs actúan sobre la bacteria, provocándoles un cambio en el estado fisiológico y/o en su capacidad de infección o nodulación, o si actúan sobre la planta de modo que en definitiva modifican de alguna manera el proceso de nodulación. Es por esto que también se realizaron ensayos donde se suplementó y preincubó la planta con FDs bacterianos.

### **3.2 Materiales y métodos**

#### **Crecimiento de las plantas**

Semillas de *Discaria trinervis* (Hooker et Arnot) Reiche fueron gentilmente cedidas por Eugenia Chaia (Universidad Nacional de Comahue, Argentina). Las semillas fueron extraídas de frutos maduros recolectados en Pampa de Huenuleo (41° 10' S, 71° 12' O, Bariloche, Río Negro, Argentina) y mantenidas a -20 °C. Previo a la germinación, las semillas fueron esterilizadas superficialmente y escarificadas (3 minutos de inmersión en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 96 %), luego se lavaron con solución de Evans esteril (ver Materiales y métodos Capítulo 2) diluida al décimo (E 1/10). La germinación fue llevada a cabo en cajas de Petri con perlita esteril humedecida con agua. Doce días después de colocar las semillas sobre la perlita, las plántulas fueron transferidas a pouches (Mega Internacional, Minneapolis, MN). Cuatro plántulas seleccionadas al azar fueron colocadas en cada pouche con 10 ml de solución nutritiva libre de nitrógeno (E 1/10). La germinación y el posterior crecimiento de las plántulas se realizó en el invernáculo de la Universidad Nacional de Quilmas (34° 7' S, 58° 3' O) con luz adicional artificial (400 W, K048, OSRAM, Osasco, Brasil) para asegurar un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad; el rango de temperatura se mantuvo entre 18 y 26 °C y la humedad relativa entre un 40 y un 90 %. En el momento de la inoculación los pouches se abrieron por abajo cortando el borde inferior de cada pouche; todos los pouches de un mismo tratamiento se colocaron dentro de una bolsa plástica y los riegos subsiguientes se realizaron colocando la solución mineral dentro de esta bolsa plástica para

que la solución de riego se absorbiera por todo el pouche distribuyéndose por capilaridad.

### **Cultivo de bacterias y preparación del inóculo**

Las cepas de *Frankia* BCU110501 (Chaia, 1998) y Arl3 (Berry y Torrey, 1979) fueron crecidas durante 6 semanas a 28 °C en cultivo estático en medio de cultivo mínimo BAP (Murry y col., 1984). El medio de cultivo para la cepa BCU110501, fue suplementado con glucosa 0.055 M, mientras que para la cepa Arl3 fue suplementado con propionato de sodio 0.005 M como fuente de carbono. *Streptomyces coelicolor* A3 (2) M145 (Gernot Vobis, Bariloche, Argentina) fue crecida en 40 ml de medio BAP suplementado con glucosa 0.055 M por 96 horas a 28 °C.

Para la preparación del inóculo, las células de *Frankia* y *Streptomyces* fueron lavadas por centrifugación y resuspensión con E 1/10 y homogenizado por pasaje a través de jeringas y agujas (21G), 5 veces. La cantidad de biomasa en la suspensión fue estimada por volumen celular empaquetado (pcv) después de una centrifugación en tubos wintrobe durante 5 minutos a 1100 g (Nittayajarn y Baker, 1989).

### **Tratamiento del inóculo con factores difusibles bacterianos**

En este tipo de ensayos la suspensión diluida de *Frankia* fue pretratada antes de su inoculación sobre las raíces de las plantas con factores difusibles producidos por la misma u otras bacterias. Para producir los factores difusibles se partió de un cultivo de *Frankia* BCU110501 de 6 semanas que fue lavado (5000 g durante 5 minutos) y resuspendido con solución E 1/10 hasta alcanzar los 50  $\mu\text{l}$  pcv  $\text{ml}^{-1}$ , 5 ml de esta suspensión bacteriana se introdujeron dentro de una bolsa de diálisis tubular de celulosa (12 KDa de corte) de 15 mm de diámetro (Sigma, St. Louis, MO). La bolsa de diálisis conteniendo la suspensión bacteriana se utilizó como fuente de factores difusibles. Se tomaron 25 ml de un inóculo preparado con células de *Frankia* provenientes del mismo cultivo original, lavadas y diluidas hasta alcanzar una concentración de 0.05  $\mu\text{l}$  de pcv  $\text{ml}^{-1}$  en solución E 1/10 y luego fueron tratadas con los FDs utilizando la bolsa de diálisis que se sumergió en el inóculo durante 96 horas a 28 °C en oscuridad (Figura 1).



**Figura 1. Factores difusibles de *Frankia* BCU110501.** Bolsa de diálisis con 5 ml de suspensión bacteriana lavada. Los dos extremos de la bolsa están cerrados con un nudo. El tubo de 50 ml se mantuvo durante las 96 horas de incubación a 28 °C y en oscuridad dentro del inóculo (ver texto).

Luego de transcurridas las 96 horas de tratamiento, la bolsa de diálisis fue quitada de la suspensión y 200  $\mu$ l del inóculo así tratado fueron utilizados para inocular la raíz de cada planta de *D. trinervis* como se describió anteriormente. Como control negativo se utilizó una suspensión de inóculo que fue tratado con una bolsa de diálisis que contenía 5 ml de solución E 1/10 sin bacterias. Cada tratamiento fue ensayado en 20 plantas distribuidas en 5 pouches (4 plantas por poche).

Con el fin de estudiar el efecto de FDs de diferentes orígenes, en otro experimento, el inóculo de *Frankia* BCU110501 ( $0.05 \mu\text{l pcv ml}^{-1}$ ) preparado como se explicó anteriormente, fue tratado con 5 ml de diferentes suspensiones bacterianas concentradas ( $10 \mu\text{l pcv ml}^{-1}$ ) contenidas dentro de una bolsa de diálisis. Se utilizaron las siguientes bacterias: *Frankia* BCU110501 de cultivos de 6 semanas, *Frankia* BCU110501 de cultivos de 6 semanas muertas por exposición a 3 kGry de rayos, *Frankia* Arl3 de cultivos de 6 semanas y *S. coelicolor* de cultivos de 1 semana. En este experimento, el tratamiento del inóculo fue de 24 horas. La inoculación de las plantas después del tratamiento del inóculo se realizó de la forma anteriormente detallada. Como control se utilizó un inóculo tratado con una bolsa de diálisis conteniendo E 1/10 sin bacterias.

### **Tratamiento de raíces con FDs bacterianos**

Raíces de *Discaria trinervis* fueron tratadas con factores difusibles de *Frankia* BCU110501, *Frankia* Arl3 y *Streptomyces coelicolor* durante las 96 horas previas a la

inoculación. Se tomaron 5 ml de cada suspensión bacteriana y se introdujeron dentro de una bolsa de diálisis tubular de celulosa (12 kDa de corte) de 15 mm de diámetro (Sigma, St. Louis, MO). La bolsa de diálisis permaneció apoyada 96 horas sobre la raíz. Al momento de inocular se quitaron las bolsas de diálisis y se descargaron 200  $\mu\text{l}$  de una suspensión de *Frankia* BCU110501 diluida (0.05  $\mu\text{l}$  pcv  $\text{ml}^{-1}$ ). Se utilizó una bolsa por cada sistema radicular y se utilizaron 5 pouches con cuatro plántulas por cada pouche, generando 20 réplicas por tratamiento.

### **Efecto del tiempo en la incubación del inóculo con FDs**

Un cultivo de *Frankia* BCU110501 de 6 semanas fue lavado y resuspendido con solución E 1/10 hasta alcanzar los 50  $\mu\text{l}$  pcv  $\text{ml}^{-1}$ . Se tomaron 5 ml de esta suspensión bacteriana y se introdujeron dentro de una bolsa de diálisis tubular de celulosa (12 kDa de corte) de 15 mm de diámetro (Sigma, St. Louis, MO). La bolsa de diálisis permaneció sumergida en un frasco Erlenmeyer de 100 ml con 50 ml de una suspensión de inóculo (0.05  $\mu\text{l}$  de pcv  $\text{ml}^{-1}$ ) preparada con células lavadas de *Frankia* BCU110501 provenientes del mismo cultivo. El frasco Erlenmeyer con el inóculo diluido y la bolsa de diálisis permanecieron estáticos a 28 °C y en oscuridad. A diferentes tiempos después de haber expuesto el inóculo a los factores difusibles (0, 24, 48 y 96 horas) 200  $\mu\text{l}$  del inóculo contenidos en el frasco Erlenmeyer fueron utilizados para inocular la raíz de cada planta de *D. trinervis* como se describió más arriba. Cada tratamiento fue ensayado en 20 plantas distribuidas en 5 pouches (4 plantas por pouche).

### **Preincubación del inóculo durante distintos tiempos con el agregado de FDs de *Frankia* BCU110501**

Con el objetivo de estudiar como los FDs actúan sobre el inóculo independientemente de la presencia de las bacterias que los generan, se realizó el siguiente experimento. Se prepararon primero los factores difusibles y luego se utilizaron estos para tratar al inóculo durante diferentes tiempos ante de la inoculación en las plantas. Se colocaron 5 ml de una suspensión de células lavadas de *Frankia* BCU110501 (20  $\mu\text{l}/\text{ml}$  en E 1/10) dentro de una membrana de diálisis tubular (12 kDa de corte) de 15 mm de diámetro (Sigma, St. Louis, MO). La bolsa cerrada en sus extremos se colocó en un frasco Erlenmeyer con 30 ml de

solución mineral Evans. Como control del experimento se colocaron 5 ml de solución mineral E 1/10 sin bacterias dentro de una membrana de diálisis igual a la anterior y ésta, cerrada en sus extremos, se colocó dentro de otro frasco Erlenmeyer con 30 ml de E 1/10. Los dos tratamientos se mantuvieron por 96 hs a 28 °C y en oscuridad. Transcurridas las 96 hs se quitaron las bolsas de diálisis de ambos recipientes y sus contenidos se utilizaron para resuspender células de un cultivo lavado de *Frankia* BCU110501 para preparar un inóculo de concentración final de 0.05 l/ml. Las dos preparaciones de inóculo (resuspendidos en FDs y resuspendidos en E 1/10) se utilizaron para inocular raíces de *D. trinervis*. Los inóculos así preparados se incubaron a 28 °C y en oscuridad durante distintos tiempos. La primera inoculación se realizó acto seguido a la resuspensión de cada inóculo (tiempo 0), luego se hicieron inoculaciones a las 24, 48 y 96 horas de transcurrida la resuspensión de *Frankia* en factores difusibles o E 1/10. Las plantas se inocularon con 200 µl de suspensión bacteriana.

### **Tratamientos físicos y químicos de los FDs de *Frankia* BCU110501**

Para preparar factores difusibles de *Frankia* BCU110501 se prosiguió de la siguiente manera. Un cultivo de *Frankia* BCU110501 de 6 semanas fue lavado y resuspendido con solución E 1/10 hasta alcanzar 40 µl pcv ml<sup>-1</sup>. Se tomaron 5 ml de esta suspensión bacteriana y se introdujeron dentro de una bolsa de diálisis tubular de celulosa (12-kDa de corte) de 15 mm de diámetro (Sigma, St. Louis, MO). Una membrana de diálisis de las mismas características se llenó con 5 ml de solución mineral E 1/10 para utilizar como control negativo. Las bolsas de diálisis permanecieron sumergidas en frascos Erlenmeyers de 125 ml con 100 ml de E 1/10. Ambos recipientes con sus bolsas de diálisis permanecieron a 28 °C y en oscuridad durante 96 horas. Transcurridas las horas de incubación, el contenido de cada frasco de Erlenmeyer se dividió en 5 submuestras de 20 ml cada una. Las submuestras, con o sin factores difusibles de *Frankia* BCU110501 fueron sometidos a los del siguientes tratamientos: i) **calor**, las submuestras de 20 ml en recipiente cerrado estéril se colocaron en un baño termostatzado a 100 °C durante 30 minutos, luego se mantuvieron 90 minutos a 4 °C; ii) **digestión con proteasa**, se adicionó a las submuestras 50 µl de Proteinase K (Promega Corporation) (100 mg/ml) y se incubó durante 120 minutos a 36 °C; iii) **resina de intercambio aniónico**, se adicionó 1 ml de Q Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) a cada submuestra y se incubó durante 120 minutos a

temperatura ambiente y con agitación (50 rpm); iv) **resina de intercambio catiónico**, se adicionó 1 ml de SP Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) y se incubó durante 120 minutos a temperatura ambiente y con agitación (50 rpm); y v) **sin tratar**, en este caso la muestra se deja 120 minutos en reposo como control negativo. Luego de realizados los tratamientos todas las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 5000 rpm y se descartaron los precipitados en el caso de los tratamientos con resinas. Células de un cultivo de *Frankia* BCU110501 se lavaron dos veces con E 1/10 y se resuspendieron en las diferentes submuestras ya tratadas hasta alcanzar una concentración final de *Frankia* de 0.05 µl de pcv ml<sup>-1</sup>. Cada suspensión de inóculo se incubó durante 20 horas y pasado este tiempo se inocularon 20 plantas con cada preparación descargando 200 µl a lo largo de toda la raíz con micropipeta.

### **Registro de la nodulación**

Al momento de la inoculación, la posición de cada RT fue marcada con una fibra indeleble en la superficie plástica del pouche (Valverde y Wall, 1999b). Las raíces de *D. trinervis* se observaron cada 2-3 días para registrar y contar a simple vista los nódulos que se desarrollaran. La posición de los nódulos a lo largo de la raíz se registraron sobre el plástico del pouche con un fibrón resistente al agua y la distancia (en mm) de cada nódulo a la marca de referencia RT (posición cero) fue medida a posteriori. La frecuencia de nódulos se agrupó cada 5 mm a lo largo de la raíz y se graficó el perfil de nodulación para cada tratamiento. Las posiciones por encima de la marca RT se consideraron como valores positivos (+) y los que se encontraron por debajo de la marca se consideraron como valores (-) (Valverde y Wall, 1999b).

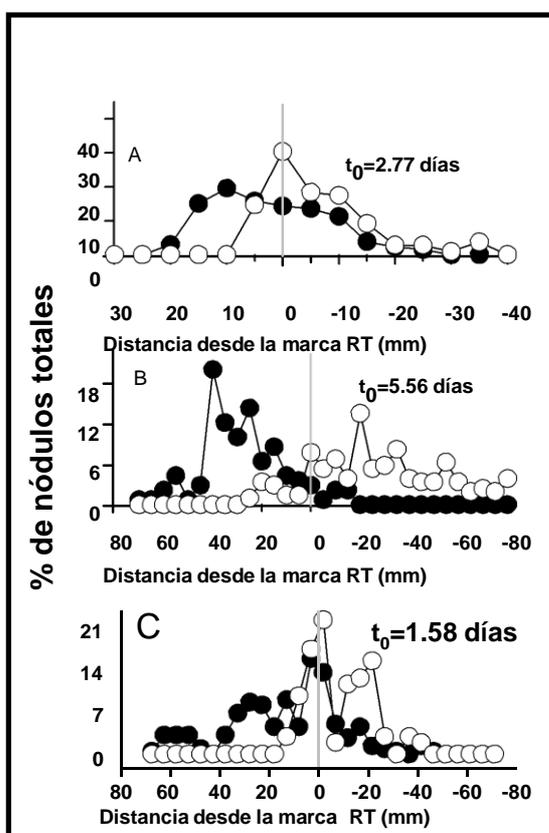
### **Análisis estadístico**

La diferencia estadística entre los valores obtenidos para los parámetros de nodulación de los diferentes tratamientos respecto a los controles apropiados fue obtenida con el test de Student's para datos no apareados con el programa SIGMA PLOT (versión 8).

## **3.3 Resultados**

### **Efecto de los factores difusibles de *Frankia* sobre la nodulación de *Discaria trinervis***

Cuando una suspensión de inóculo de *Frankia* BCU110501 fue pretratada durante 96 horas antes de ser adicionada a las raíces con factores difusibles dializados desde una suspensión concentrada de *Frankia* BCU110501 la cinética de la nodulación en *D. trinervis* se modificó respecto del control. Este experimento se repitió en tres oportunidades diferentes. Los tratamientos del inóculo con factores difusibles de *Frankia* BCU110501 redujeron significativamente el  $t_0$  en 2.77, 5.56 y 1.58 días en cada experimento con valores  $P$  de 0.064, 0.003 y 0.45, respectivamente. El perfil de nodulación fue claramente modificado por los tratamientos con factores difusibles del inóculo (Figura 2). El perfil de nodulación se movió hacia la región superior de la raíz (Figura 2).



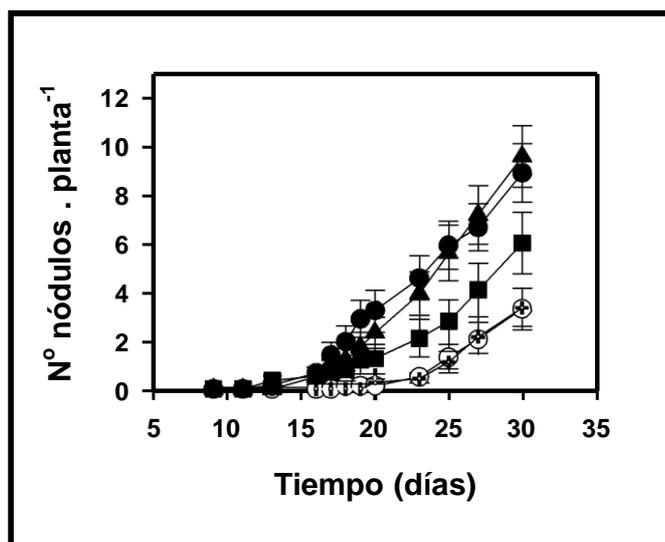
**Figura 2. Efecto de los factores difusibles de *Frankia* BCU110501.** Perfil de distribución de los nódulos a lo largo de las raíces de *Discaria trinervis* inoculadas con *Frankia* BCU110501 preincubado con FDs de *Frankia* BCU110501 en una alta concentración ( $50 \mu\text{l pcv ml}^{-1}$  E 1/10) (●) y preincubado con factores difusibles de la solución mineral E 1/10 (○). Las distancias medidas desde la marca RT hasta la posición de todos los nódulos de 20 plantas fueron utilizados para graficar los perfiles de distribución. El gráfico fue normalizado debido a la diferencia en la cantidad de nódulos totales por planta entre los diferentes tratamientos y representan la probabilidad de que un nódulo se desarrolle a cierta distancia respecto a la posición del ápice radicular (RT) al momento de la inoculación. El  $\Delta t_0$  denota la reducción en el tiempo que transcurre desde la inoculación hasta la aparición del primer nódulo cuando el inóculo fue pretratado con FD de *Frankia* (●) comparado con el inóculo control tratado con solución mineral (○). A, B y C son resultados de experimentos independientes.

## Efecto de los FDs de bacterias no infectivas en la nodulación de *Discaria trinervis*

La estimulación de la nodulación de *D. trinervis* por coinoculación de *Frankia* BCU110501 con otras cepas de *Frankia* provenientes de diferentes grupos de inoculación cruzada (ver Capítulo 2, Figura 6, Tabla 2) nos indujo a preguntarnos si la coinoculación podía ser reemplazada por FDs de dichas bacterias.

Cuando el inóculo *Frankia* BCU110501 ( $0.05 \text{ ml pcv ml}^{-1}$ ) fue preincubado durante 24 horas (antes de adicionarlo a las plantas) con factores difusibles de suspensiones concentradas de *Frankia* BCU110501, *Frankia* Ar13 y *Streptomyces coelicolor*, los factores difusibles de todos los actinomicetes fueron capaces de estimular la nodulación del inóculo de *Frankia* BCU110501 comparando con el efecto de la solución mineral E 1/10 utilizada como control negativo (Figura 3).

La suspensión de *Frankia* BCU110501 muerta no produjo ninguna diferencia respecto al control, sugiriendo que los factores difusibles que modifican la nodulación fueron activamente producidos por células vivas. Al realizar el análisis de los parámetros de nodulación se observa que el  $t_0$  fue significativamente disminuido por el pretratamiento del inóculo con factores difusibles de *Frankia* Ar13 ( $P < 0.188$ ), y con factores difusibles de *S. coelicolor* ( $P < 0.00037$ ) comparado a el tratamiento control (Tabla 1). Los FDs de *Frankia* BCU110501 muerta no modificaron el  $t_0$  comparado con el control (Tabla 1). La velocidad de nodulación inicial  $v_0$  del inóculo pretratado con factores difusibles de *Frankia* BCU110501 fue más alta que la del control ( $P < 0.05$ ), pero este efecto no fue observado cuando el inóculo fue pretratado con factores difusibles de *Frankia* BCU110501 muerta, de *Frankia* Ar13 o de *S. coelicolor* (Tabla 1).



**Figura 3. Nodulación en plantas de *Discaria trinervis* inoculadas con *Frankia* BCU110501 preincubado con FDs de diferentes bacterias.** Cinéticas de nodulación para el mismo inóculo original tratado con factores difusibles de diferentes suspensiones bacterias contenidas en un tubo de diálisis (ver Materiales y métodos): control negativo, E 1/10 (○) 10 l pcv de *Frankia* BCU110501 ml<sup>-1</sup> E 1 /10 (●), 10 l pcv de *Frankia* BCU110501 muerta ml<sup>-1</sup> E 1/10 (+), 10 l pcv de *Frankia* ArI3 ml<sup>-1</sup> (■) y 10 l pcv de *Streptomyces coelicolor* ml<sup>-1</sup> E 1/10 (▲); *Frankia* BCU110501 pretratada con los diferentes FDs fue inoculada a 0.01 l pcv raíz<sup>-1</sup>.

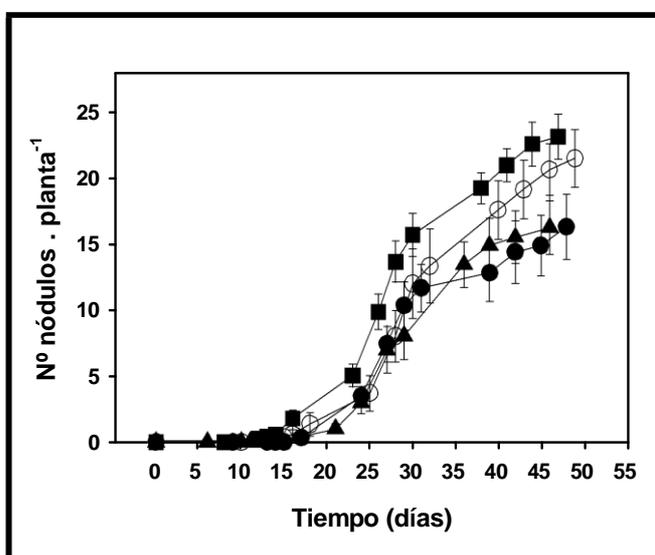
Origen de los FDs	t <sub>0</sub> (días)	v <sub>0</sub> ( ° nódulos planta <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )
<i>Frankia</i> BCU110501	19.9 ± 1.5 <sup>a</sup>	1.29 ± 0.18 <sup>b</sup>
<i>Frankia</i> BCU110501 muerta	27.1 ± 1.4	0.71 ± 0.06
<i>Frankia</i> ArI3	23.3 ± 1.8	0.95 ± 0.09
<i>Streptomyces coelicolor</i> A(3)2	19.7 ± 1.0 <sup>a</sup>	0.96 ± 0.10
Ninguno-Evans 1/10	26.4 ± 1.4	0.77 ± 0.10

**Tabla 1. Parámetros de nodulación de *Discaria trinervis* inoculado con *Frankia* BCU110501 preincubado con FDs de diferente bacterias.** La cepa *Frankia* BCU110501 fue utilizada como inóculo a una concentración de 0.01 l pcv raíz<sup>-1</sup> en todos los casos. El origen de los factores difusibles y el modo de preparación fue explicado detalladamente en la sección Materiales y métodos. Diferencias estadísticamente significativas de aP ≤ 0.005 y bP ≤ 0.05, test-t no apareado (SIGMA PLOT 8.0) comparado con el tratamiento control.

### Efecto del tiempo en la incubación del inóculo con FDs producidos *in situ*

Para estudiar la variable tiempo en el fenómeno observado por el tratamiento del inóculo, se utilizaron inóculos que fueron tratados con FD durante diferentes tiempos de contacto con la bolsa de diálisis cargada con una dosis alta de *Frankia* BCU110501.

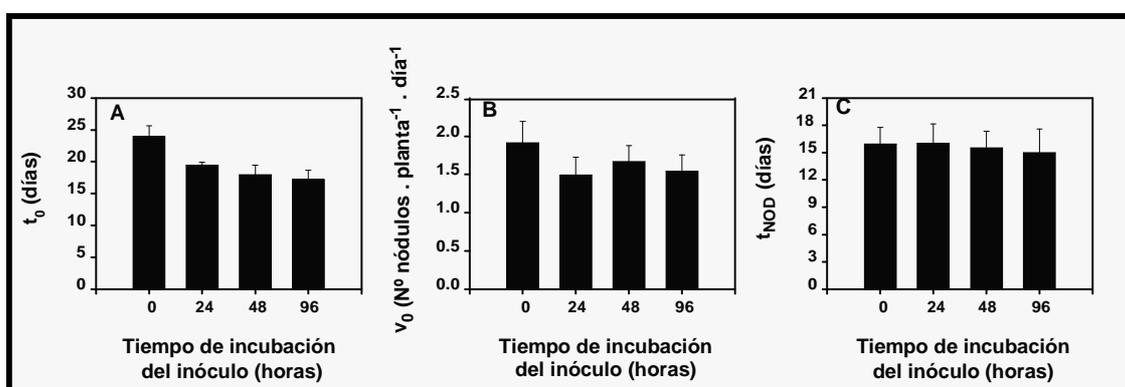
El registro periódico de los nódulos de cada planta muestra que las cinéticas de nodulación de los diferentes tratamientos tienen diferente forma (Figura 4). Las plantas nodularon todas sin inconvenientes y desarrollaron una cantidad alta de nódulos por planta al final del experimento (Figura 4).



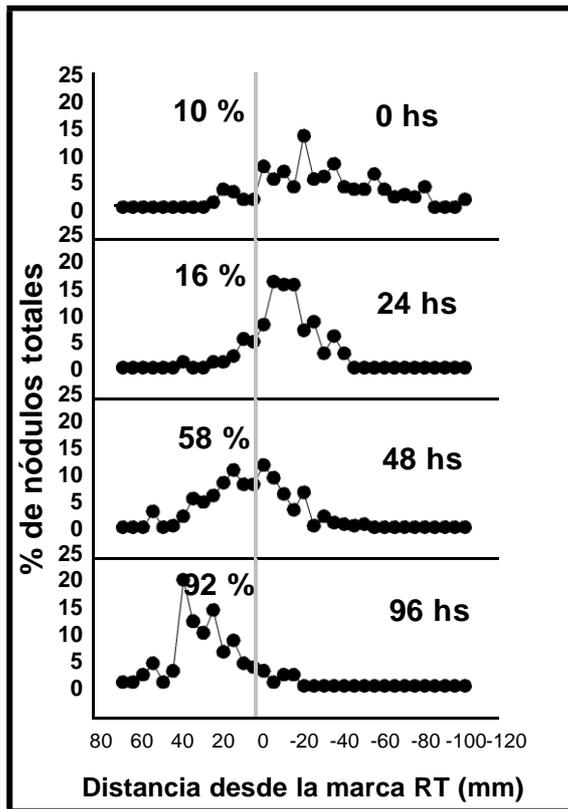
**Figura 4. Cinética de nodulación en *D. trinervis* modificando el tiempo de incubación del inóculo con FDs.** Las plantas de todos los tratamientos fueron inoculadas con *Frankia* BCU110501 (200 l por raíz). La suspensión de inóculo fue preincubada durante diferentes tiempos: 0 (○), 24 (●), 48 (■) y 96 (▲) horas previo a la inoculación como se explicó en Materiales y métodos. Los valores son el promedio  $\pm$  SE para n = 16-20 plantas.

Al calcular los parámetros de nodulación (Figura 5) se observó una disminución en el  $t_0$  (Figura 5 A) a medida que aumentaba el tiempo de contacto con los posibles FD. Cuando el inóculo se trató con FDs de *Frankia* BCU110501 24, 48 y 96 horas, el  $t_0$  disminuyó significativamente en 4.55, 6.13 y 6.82 días ( $P$  valores de 0.024, 0.010 y 0.006) respecto del tratamiento control, donde el inóculo se preincubó 0 horas con una alta concentración de *Frankia* BCU110501. Por otro lado, si bien  $t_0$  disminuyó siempre que aumentó el tiempo de tratamiento del inóculo mostrando una clara tendencia, las diferencias en este caso no fueron significativas. Algo similar se observó cuando se analizó la  $v_0$  de nodulación (Figura 5 B), se observó una tendencia de disminución pero sin embargo no hubo diferencias significativas entre los valores. En cambio, al analizar el tiempo de nodulación total,  $t_{NOD}$ , se ve claramente que los promedios de cada tratamiento no mostraron diferencias entre si (Figura 5 C) y por lo tanto no hubo tendencias.

El análisis de la distribución de los nódulos a lo largo de la raíz mostró, por su parte, un desplazamiento hacia la parte superior de la raíz relacionado al aumento en el tiempo de incubación previa del inóculo (Figura 6). El porcentaje de nódulos por encima de la marca RT fue de 10, 16, 58 y 92 para 0, 24, 48 y 96 horas de incubación del inóculo (Figura 6).



**Figura 5. Análisis de los parámetros de nodulación en *D. trinervis* con inóculos tratados por diferentes tiempos previo a la inoculación con FDs de *Frankia* BCU110501.** (A) Tiempo que transcurre desde el momento de la inoculación hasta la aparición del primer nódulo en una planta,  $t_0$ ; (B)  $v_0$  ó tasa de nodulación diaria; y (C) Tiempo de nodulación total,  $t_{NOD}$ . Los barras muestran el promedio y el error estandar de los parámetros calculados individualmente para cada planta. Cada tratamiento contó un número de plantas que varió entre 16 y 20.



**Figura 6. Distribución de nódulos a lo largo de la raíz de *D. trinervis* con inóculos tratados por diferentes tiempos con FDs de *Frankia* BCU110501.** El número de horas que el inóculo permaneció en contacto con la bolsa de diálisis llena con una alta concentración de *Frankia* BCU110501 ( $50 \text{ l pcv ml}^{-1}$ ) está indicado a la derecha de cada gráfica. La posición de los nódulos con respecto a la marca RT se registró aproximadamente 50 días después de la inoculación. El perfil de nodulación se obtuvo para cada grupo de plantas como se describió en la sección Materiales y métodos. El crecimiento de la raíz es de izquierda a derecha y la línea gris muestra la posición de la marca RT al momento de la inoculación. Los valores expresados como porcentaje de nódulos por encima de la marca RT se muestran dentro de cada gráfico a la izquierda.

## Efecto del pretratamiento de raíces con FDs de *Frankia* sobre la nodulación de *Discaria trinervis*

En los ensayos de pretratamientos de las raíces, las plantas de *D. trinervis* no sufrieron ni fueron dañadas por la bolsa de diálisis que tuvieron apoyada sobre su raíz durante 96 horas. Al quitar las bolsas se inoculó cada raíz con 200  $\mu\text{l}$  de una suspensión de *Frankia* BCU110501 en baja concentración ( $0.1 \mu\text{l pcv} \cdot \text{ml}^{-1}$ ). A la semana siguiente de la inoculación se empezaron a observar algunos nódulos en plantas de todos los tratamientos. El registro periódico de la nodulación mostró curvas de cinéticas muy similares para los cuatro tratamientos aunque la curva del tratamiento control, donde las raíces fueron tratadas con E 1/10 dentro de la membrana de diálisis, se adelanta respecto de las otras tres curvas, correspondientes a los tratamientos que presentaban bacterias dentro de las bolsas de diálisis (Figura 7). El tratamiento control junto con el tratamiento en el cual la raíz se trató con FDs de *Streptomyces coelicolor* presentaron una mayor cantidad de nódulos totales por planta promedio (20.4 ambos tratamientos) respecto de los tratamientos restantes, tratados con las cepas de *Frankia* BCU110501 y Ar13 (17.3 y 17.8 respectivamente).

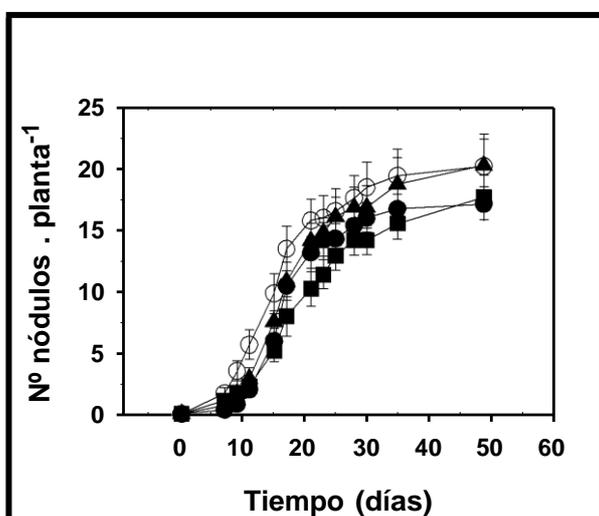
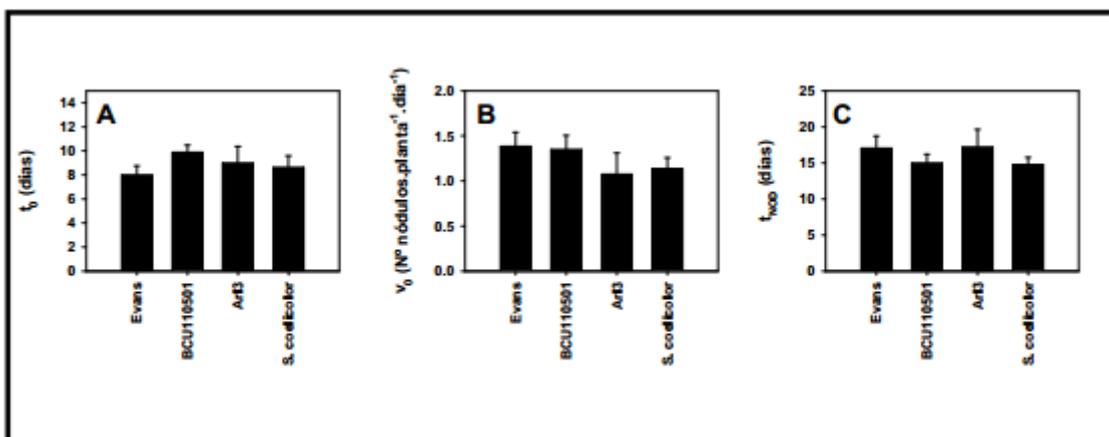


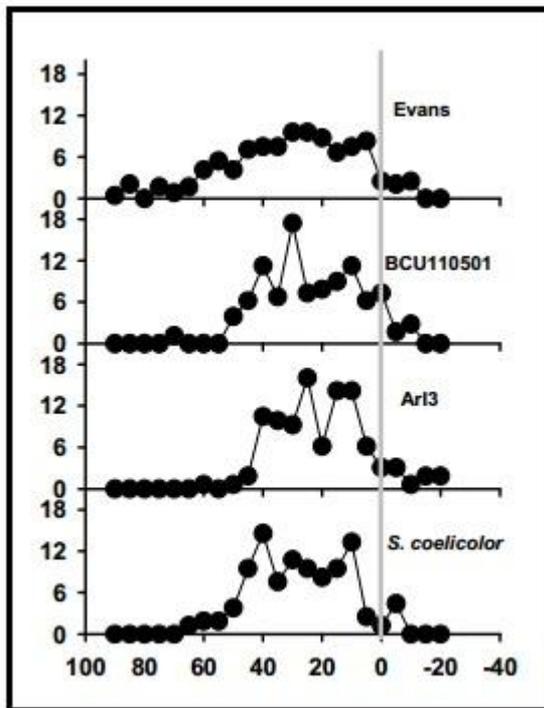
Figura 7. Cinética de nodulación en *D. trinervis* con raíces pretratadas con FDs de diferentes bacterias. Las plantas de todos los tratamientos fueron inoculadas con *Frankia* BCU110501 (200 l por raíz). Las raíces fueron preincubadas durante 96 hs previo a la inoculación con bolsas de diálisis llenas con: E 1/10 (○), *Frankia* BCU110501 (●), *Frankia* Ar13 (■) y *Streptomyces coelicolor* (▲). Los valores son el promedio  $\pm$  SE para n = 16-20 plantas.

Al analizar la nodulación para cada planta y hacer la comparación entre los diferentes tratamientos se observó que el parámetro  $t_0$  aumenta significativamente ( $P \leq 0.067$ ) de 8 a 9.9 días de promedio cuando las raíces fueron preincubadas con factores difusibles de *Frankia* BCU110501 respecto del control (figura 8 A). No se encontraron diferencias entre los tratamientos al analizar la velocidad inicial de nodulación ( $v_0$ ) (Figura 8 B) y el tiempo total de nodulación ( $t_{NOD}$ ) (Figura 8 C).

Los resultados indican que la distribución de los nódulos a lo largo de la raíz fue bastante más acotada en los tratamientos en los que las raíces de *D. trinervis* fueron pretratadas con factores difusibles de bacterias, ya sean las dos cepas de *Frankia* (BCU110501 o Ar13) como *Streptomyces coelicolor* (Figura 9). En el tratamiento control, los nódulos aparecieron mucho más dispersos a lo largo de la raíz e inclusive en la zona más vieja de la raíz principal (Figura 9).



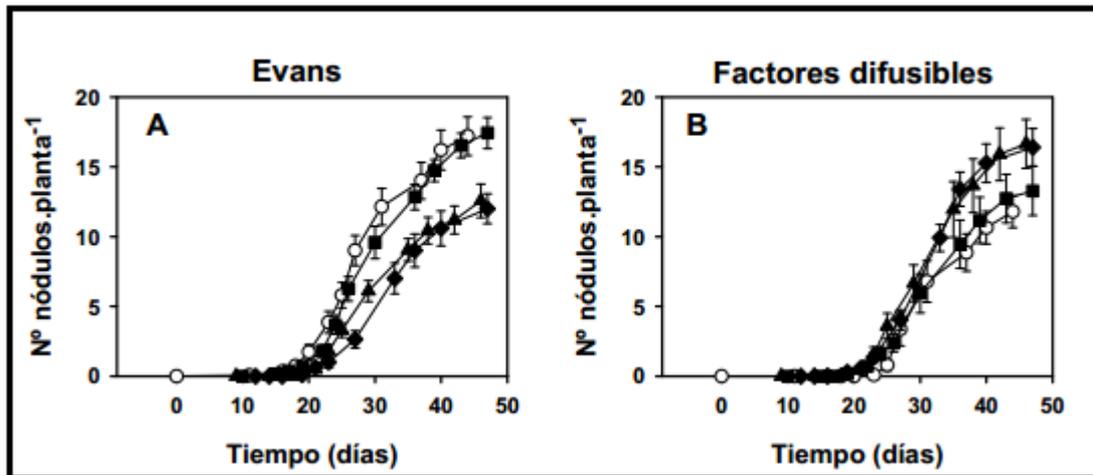
**Figura 8. Análisis de los parámetros de nodulación en *D. trinervis* cuando las raíces fueron tratadas con FDs de diferentes bacterias durante 96 horas previo a la inoculación.** Las plantas de los 4 tratamientos fueron inoculadas con la misma preparación de inóculo *Frankia* BCU110501 ( $0.01 \text{ I pcv raíz}^{-1}$ ). (A) Tiempo que transcurre desde el momento de la inoculación hasta la aparición del primer nódulo en una planta,  $t_0$ . (B) Tasa de nodulación diaria,  $v_0$ . (C) Tiempo de nodulación total,  $t_{NOD}$ . Las barras muestran el promedio y el error estándar de los parámetros calculados individualmente para cada planta. Cada tratamiento contó un número de plantas que varió entre 16 y 20.



**Figura 9. Efecto de la preincubación de raíces con FDs de diferentes bacterias sobre el perfil de nodulación de *D. trinervis*.** Las raíces permanecieron 96 hs. en contacto con la bolsa de diálisis (llenas con diferentes bacterias) previo a la inoculación. La posición de los nódulos con respecto a la marca RT se registró aproximadamente 50 días después de la inoculación. El perfil de nodulación se obtuvo para cada grupo de plantas como se describió en la sección Materiales y métodos. El crecimiento de la raíz es de izquierda a derecha y la línea gris muestra la posición de la marca RT al momento de la inoculación. El contenido de la bolsa de diálisis de cada tratamiento se muestra dentro de cada gráfico a la derecha.

### Efecto de la incubación del inóculo con FDs de *Frankia* BCU110501 previamente obtenidos

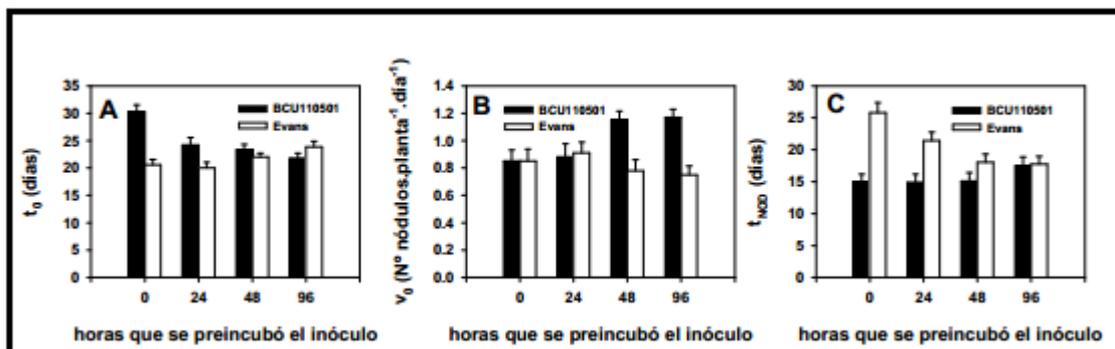
Las curvas que muestran el progreso de la nodulación se agruparon en dos gráficas separadas según el origen del dializado (Evans ó BCU110501) para visualizarlas mejor (Figura 10 A y 10 B). Los resultados de las cinéticas muestran un comportamiento inverso dependiendo del origen de los factores difusibles. En el tratamiento control donde el inóculo se preincuba con FDs de E 1/10 se observa que a medida que pasa el tiempo las cinéticas de nodulación son menos pronunciadas y el número de nódulos por planta es menor (Figura 10 A, observar alrededor de los días 27-30). Mientras tanto, cuando la suspensión de inóculo se preparó con FDs de *Frankia* BCU110501, la nodulación mejoró cuando el inóculo fue preincubado por mayor cantidad de tiempo con los FDs (figura 10 B, observar alrededor de los días 36-38).



**Figura 10. Cinética de nodulación en *D. trinervis* con inóculos pretratados con FDs.** Las plantas de todos los tratamientos fueron inoculadas con *Frankia* BCU110501 (200 l por raíz). (A) Inóculos tratados con FDs de E 1/10 (control) (B) Inóculos tratados con FDs de *Frankia* BCU110501. Los inóculos fueron preincubados antes de la inculación por: 0 (○), 24 (■) y 48 (▲) y 96 (◆) horas. Los valores son el promedio  $\pm$  SE para n = 16-20 plantas.

Luego de calcular los parámetros de nodulación para cada tratamiento a partir de los resultados de cada planta se observa que el  $t_0$  muestra un leve aumento a partir de las 24 horas de preincubación del inóculo con FDs de Evans (control) (Figura 11 A, barras blancas). El tiempo necesario para la aparición del primer nódulo promedio fue de 20.6, 20.1, 22 y 23.9 días para 0, 24, 48 y 96 horas respectivamente, con un valor  $P \leq 0.1$  cuando se compara el aumento en  $t_0$  entre 24 y 48 horas,  $P \leq 0.01$  cuando se compara  $t_0$  entre 24 y 96 horas y  $P \leq 0.15$  cuando se comparan los promedios de los tratamientos de 48 y 96 horas (Tabla 2).

Por el otro lado cuando el inóculo se preincubó con FDs provienen de *Frankia* BCU110501 los parámetros de nodulación mostraron (Figura 11 A, barras negras) un comportamiento diferente respecto de lo que se observó en el tratamiento control. En este caso el tiempo necesario para que se desarrolle el primer nódulo disminuyó conforme aumentó el tiempo de preincubación del inóculo con los FDs (30.2, 24.2, 23.3 y 21.8 para tiempos de preincubación de 0, 24, 48 y 96 horas respectivamente). Estas variaciones en el resultado de  $t_0$  presentó diferencias significativas importantes entre los tratamiento (Tabla 2).



**Figura 11. Análisis de los parámetros de nodulación en *D. trinervis* con inóculos pretratados con FDs.**

(A) Tiempo que transcurre desde el momento de la inoculación hasta la aparición del primer nódulo en una planta,  $t_0$ . (B)  $v_0$  o tasa de nodulación diaria. (C) Tiempo de nodulación total,  $t_{NOD}$ . Los barras muestran el promedio y el error estándar de los parámetros calculados individualmente para cada planta. Las barras negras corresponden al inóculo preincubado con factores difusibles de *Frankia* BCU110501 y las barras blancas corresponden al tratamiento control, donde el inóculo fue preincubado con Evans. Cada tratamiento contó un número de plantas que varió entre 16 y 20.

Respecto del tiempo de nodulación total,  $t_{NOD}$ , se observó una marcada disminución (Tabla 2) en el ensayo control conforme al paso del tiempo (Figura 11 C, ver barras blancas). Sin embargo, cuando el inóculo se trató con factores difusibles de *Frankia* el tiempo total de nodulación no se modificó con el paso del tiempo (Figura 11 C, ver barras negras).

Al enfocarnos en la velocidad inicial de nodulación,  $v_0$ , encontramos que no se afectó (Tabla 2) con el paso del tiempo en el tratamiento que el inóculo fue incubado con factores difusibles de Evans (control) (Figura 11 B, ver barras blancas), mientras que el mismo parámetro aumentó significativamente (Tabla 3) después de que el inóculo se incubó 48 horas con factores difusibles de *Frankia* BCU110501 (Figura 11 B, ver barras negras).

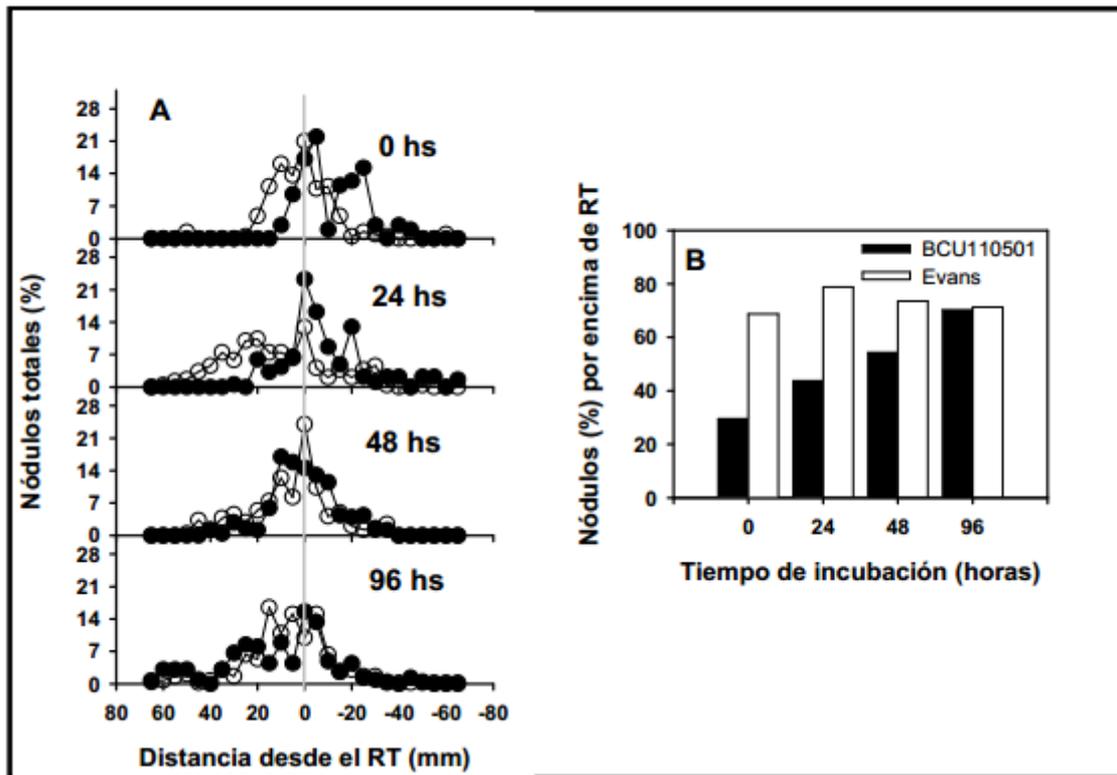
Valor <i>P</i> . Inóculo preincubado con Evans									
Tiempo de preincubación (hs)	<i>t</i> <sub>0</sub>			<i>v</i> <sub>0</sub>			<i>t</i> <sub>NOD</sub>		
	24	48	96	24	48	96	24	48	96
0	0.40	0.23	0.03	0.62	0.53	0.33	0.042	0.0006	0.0002
24		0.10	0.01		0.23	0.11		0.079	0.047
48			0.15			0.76			0.87

**Tabla 2.** Valor *P* que compara los promedios de los diferentes tratamientos. Los resultados corresponden al experimento en que el inóculo se preincubó con solución mineral Evans. Los valores fueron obtenidos con el test-t mediante el programa SigmaPlot 8.0.

Inóculo preincubado con <i>Frankia</i> BCU110501									
Tiempo de preincubación (hs)	<i>t</i> <sub>0</sub>			<i>v</i> <sub>0</sub>			<i>t</i> <sub>NOD</sub>		
	24	48	96	24	48	96	24	48	96
0	0.004	0.007	0.000003	0.80	0.007	0.003	0.95	0.95	0.22
24		0.81	0.11		0.03	0.01		0.91	0.19
48			0.05			0.80			0.22

**Tabla 3.** Valor *P* que compara los promedios de los diferentes tratamientos. Los resultados corresponden al experimento en que el inóculo se preincubó con *Frankia* BCU110501. Los valores fueron obtenidos con el test-t mediante el programa SigmaPlot 8.0.

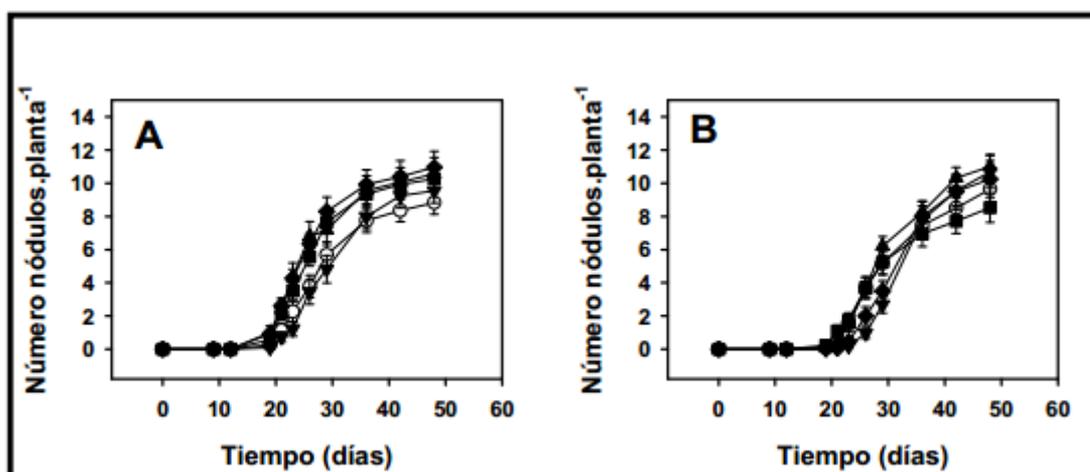
La distribución de los nódulos a lo largo de la raíz también se modificó al aumentar el tiempo de preincubación del inóculo con los FDs de *Frankia* BCU110501. Los nódulos se desarrollaron en mayor número hacia la región más vieja de la raíz a medida que mayor fue el tiempo de preincubación del inóculo con FD de BCU110501 (Figura 12 A) y alcanzaron el porcentaje de nódulos totales por encima del RT del tratamiento control recién después de permanecer 96 horas con los factores difusibles de la cepa BCU110501 (Figura 12 B). Los tratamientos del ensayo control no mostraron variaciones importantes respecto a la distribución de nódulos a lo largo de la raíz (Figura 12 A, círculos blancos) y al porcentaje de nódulos por encima de la marca RT (Figura 12 B, barras blancas).



**Figura 12. Distribución de los nódulos en *D. trinervis* con inóculos pretratados con FDs.** (A) Distribución de los nódulos totales a lo largo de la raíz. La posición de los nódulos con respecto a la marca RT se registró aproximadamente 50 días después de la inoculación. El perfil de nodulación se obtuvo para cada grupo de plantas como se describió en la sección Materiales y métodos. El crecimiento de la raíz se representa de izquierda a derecha y la línea gris muestra la posición de la marca RT al momento de la inoculación. Los círculos negros corresponden a las inoculaciones realizadas con el inóculo preincubado con FDs de *Frankia* BCU110501, mientras que los círculos blancos corresponden a los tratamientos control, donde el inóculo se preincubó con FDs de solución mineral Evans. Dentro de cada gráfico sobre la derecha se indica el tiempo de preincubación del inóculo. (B) Porcentaje de nódulos por encima de la marca RT. Las barras negras hacen referencia al inóculo preincubado con FDs de *Frankia* BCU110501, mientras que las barras blancas corresponden a los tratamientos en que el inóculo se preincubó con solución mineral Evans.

### Caracterización del FD

En estos ensayos se buscó caracterizar de un modo general a los factores difusibles que produce *Frankia* BCU110501. Con los FDs sometidos a diferentes tratamientos (calor, proteinasa K, SP sepharose y Q sepharose) se preincubó por 24 hs al inóculo y luego se inoculó las plantas de *Discaria trinervis*. Las plantas de todos los tratamientos inoculados con *Frankia* BCU110501 nodularon muy bien y en un 100 %. Los recuentos de nódulos a lo largo del tiempo en las plantas de los diferentes tratamientos no mostraron diferencias aparentes cuando se compararon las curvas promedio (Figuras 13 A y B), inclusive no hubo diferencias significativas con los tratamientos control (FDs de Evans) (Figuras 13 A y B).



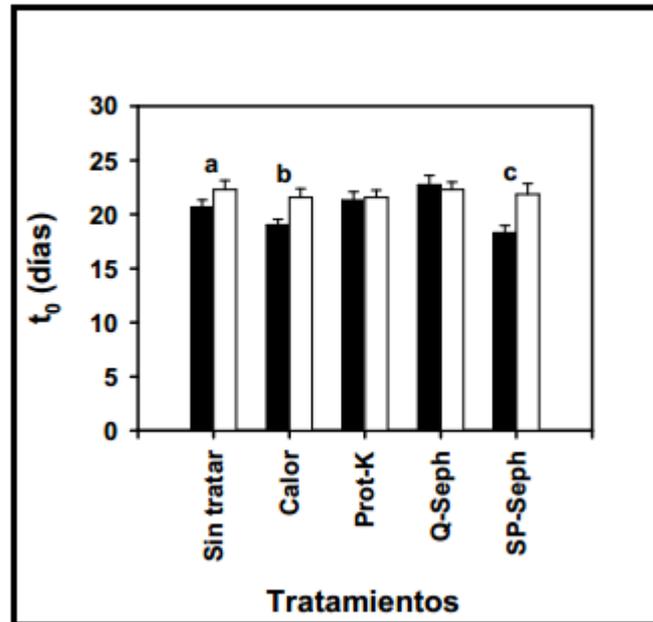
**Figura 13. Cinética de nodulación en *D. trinervis* inoculada con *Frankia* BCU110501 preincubada con FDs tratados químicamente o físicamente.** El inóculo BCU110501 diluido ( $0.05 \text{ l pcv.ml}^{-1}$ ) fue preparado 20 horas antes de la inoculación con: (A) FDs provenientes del dializado de *Frankia* BCU110501 contra solución mineral E 1/10 N- durante 96 horas. (B) FDs provenientes del dializado de E 1/10 N- durante 96 horas contra la misma solución mineral (controles negativos). Pasadas las 96 horas los factores difusibles, independientemente del origen, fueron sub divididos y tratados del modo que especifica en la sección Materiales y métodos con: sin tratar ( $\circ$ ), calor ( $\blacksquare$ ), proteinasa K ( $\blacktriangle$ ), Q sepharose ( $\blacktriangledown$ ), y SP sepharose ( $\blacklozenge$ ).

Al analizar los parámetros de nodulación ( $t_0$ ,  $v_0$  y  $t_{\text{NOD}}$ ) individualmente y comparar los promedios entre los diferentes tratamientos no se observaron diferencias significativas. No

obstante, se aprecia una diferencia entre los promedios del tiempo inicial de nodulación ( $t_0$ ) (Figura 14). Los resultados muestran que  $t_0$  disminuyó respecto al control cuando el inóculo fue incubado con factores difusibles de *Frankia* BCU110501 sin tratamiento posterior. Un resultado similar se encontró cuando el factor difusible fue tratado con calor y con SP-sepharose, sin embargo no se registraron diferencias respecto a los controles cuando el FD fue tratado con proteinasa K y Q-sepharose.

Un patrón similar de resultados se encontró al analizar la distribución de los nódulos a lo largo de la raíz de las plantas de *D. trinervis* (Figura 15 A), los nódulos de las plantas inoculadas con *Frankia* BCU110501 en concentración limitante incubada con factores difusibles sin tratar química ni físicamente, se desarrollaron relativamente en una zona más vieja de la raíz que su respectivo control (factor difusible que se obtuvo de la misma solución E 1/10 en la bolsa de diálisis, es decir control negativo de los FDs) (Figura 15 A, sin tratar). Al comparar el resultado anterior con los tratamientos en los que el factor difusible fue sometido química o físicamente encontramos que el resultado se repite para el caso en que los factores difusibles fueron tratados con la resina de intercambio catiónico SP-sepharose y en menor medida con calor (100 °C durante 30 minutos). Esta diferencia se visualiza mejor al graficar el porcentaje de nódulos desarrollados por encima de la marca RT (posición del extremo de la raíz principal al momento de la inoculación). Este valor mostró un aumento en los ensayos: **sin tratar**, **tratado con calor** y **tratado con SP-sepharose** respecto de sus respectivos controles (Figura 15 B).

Los ensayos en los que los factores difusibles de *Frankia* BCU110501 fueron tratados con proteinasa K o la resina de intercambio aniónico Q-sepharose antes de ser utilizados para la preincubación del inóculo diluido, no mostraron ningún tipo de diferencia respecto de sus respectivos controles, en los cuales el inóculo de *Frankia* se preincubó con E 1/10 tratados en forma equivalente (Figuras 13, 14 y 15).



**Figura 14. Tiempo inicial de nodulación en *D. trinervis* inoculada con *Frankia* BCU110501 preincubada con FDs tratados química o físicamente.** Las barras negras muestran el  $t_0$  promedio de los tratamientos que fueron inoculados con *Frankia* BCU110501 incubada con factores difusibles provenientes de *Frankia* y pretratados según se indica en el eje x, mientras las barras blancas corresponden a los controles, donde el inóculo fue tratado con factores difusibles de E 1/10 y pretratados según se indica en el eje x. En el eje x se indican los tratamientos que se hicieron sobre los factores difusibles: sin tratar, calor, proteinasa K, Q sepharose, y SP sepharose. Las letras a, b y c hacen referencia a diferencia significativa para valores  $P$  (0.14, 0.0095 y 000024, respectivamente) entre iguales tratamientos de FDs de bacteria (barras negras) y de E 1/10 (barras blancas).

### 3.4 Discusión

A partir de los resultados obtenidos en el Capítulo 2, donde se mostró que aumentando la dosis de inóculo *Frankia* BCU110501 sobre *Discaria trinervis* se modifican los parámetros de nodulación surgió el interés por estudiar los factores que difunden a partir de una suspensión con una alta concentración bacteriana. Se estudiaron los FDs que pueden difundir a través de una membrana de diálisis.

El conjunto de experimentos aquí descriptos, ha permitido poner en evidencia factores difusibles de *Frankia* que participarían en las interacciones tempranas con las plantas y que cumplirían con un rol importante en el proceso de establecimiento de la simbiosis. Además se logró caracterizar la actividad de estos factores con relación a la regulación de la

nodulación de *Discaria trinervis*.

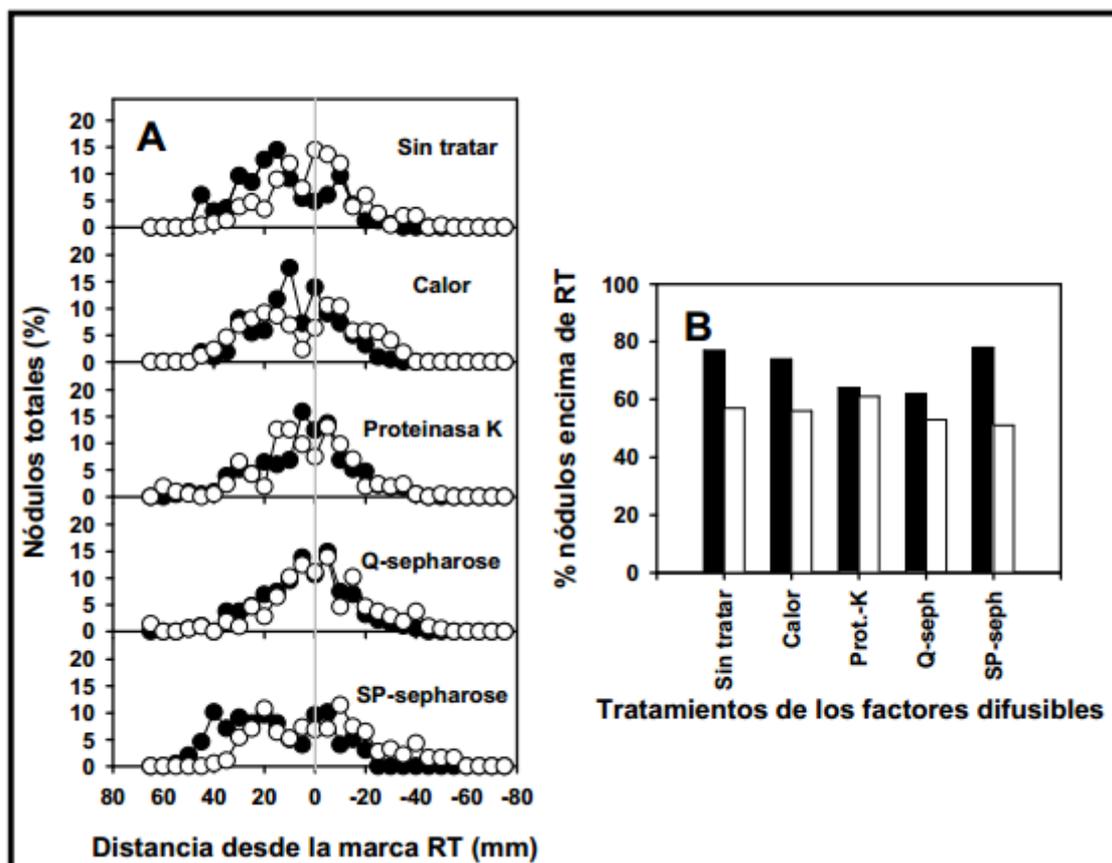


Figura 15. Distribución de los nódulos a lo largo de la raíz en *D. trinervis* inoculada con *Frankia* BCU110501 preincubada con FDs tratados química o físicamente. (A) Distribución de los nódulos a lo largo de la raíz. La posición de los nódulos con respecto a la marca RT se registró aproximadamente 50 días después de la inoculación. El perfil de nodulación se obtuvo para cada grupo de plantas como se describió en la sección Materiales y métodos. El crecimiento de la raíz es de izquierda a derecha y la línea gris muestra la posición de la marca RT al momento de la inoculación. Los círculos negros corresponden a las inoculaciones realizadas con el inóculo preincubado con FD de *Frankia* BCU110501, mientras que los círculos blancos corresponden a los tratamientos control, donde el inóculo se preincubó con FDs de solución mineral E 1/10 N-. Dentro de cada gráfico sobre la derecha se indica el que se le realizó a los FDs. (B) Porcentaje de nódulos por encima de la marca RT. Las barras negras hacen referencia al inóculo preincubado con FDs de *Frankia* BCU110501, mientras que las barras blancas corresponden a los tratamientos en que el inóculo se preincubó con solución mineral E 1/10.

Los FDs de la cepa BCU110501 de *Frankia* activarían en menos de 96 horas a las bacterias de *Frankia* del inóculo diluido provocando un desplazamiento de los nódulos hacia la parte superior de la raíz, en comparación con los tratamientos controles donde el inóculo no se trató con FDs, en tres experimentos independientes (Figura 2 A, 2 B y 2 C). Además en los tres experimentos disminuyó el tiempo necesario para la aparición del primer nódulo respecto de los controles. Los dos resultados permiten suponer que los FD activan a las células de *Frankia* haciéndolas más infectivas de modo que logran iniciar el proceso de infección y nodulación más rápido. Como consecuencia de la existencia de una zona susceptible de la raíz para la infección localizada en la zona de elongación de la raíz que se mueve junto con el crecimiento de la raíz y teniendo en cuenta los fenómenos de regulación de la nodulación (Bhuwaneswari y col., 1980; Burggraaf y col., 1983; Caetano-Anollés y Bauer, 1988; Wall y Huss-Danell, 1997) es de gran importancia el análisis de los perfiles de nodulación. En *D. trinervis* la zona de la raíz principal que va madurando por diferenciación completa pierde susceptibilidad para la infección por maduración de la epidermis, probablemente debido al engrosamiento y lignificación de la pared celular (Valverde y Wall, 1999a). Al perder susceptibilidad con el paso del tiempo, una diferencia en los tiempos de colonización e infección de la raíz por parte de dos inóculos fisiológicamente diferentes conlleva necesariamente a un perfil de nodulación diferente (Figura 2) y por consiguiente la aparición de los nódulos también estará desfasada.

Los factores difusibles al activar a las bacterias corren el perfil de nodulación hacia arriba en la raíz (Figuras 2 A, 2 B, 2 C, 6). Estos fenómenos de activación para la nodulación no reflejarían reconocimiento simbiótico ya que diferentes cepas de *Frankia*, Arl3, Cj82 y Cpl1 e incluso otros actinomicetes, *S. coelicolor* A(3)2, no infectivas en *D. trinervis* fueron capaces de estimular la nodulación al disminuir el t<sub>0</sub> cuando fueron inoculados en forma conjunta con la cepa infectiva BCU110501 en una dosis limitante (Capítulo 2, esta tesis; y (Gabbarini y Wall, 2008)). Con estos antecedentes se quiso estudiar si sus factores difusibles son capaces de modificar el perfil de nodulación y el t<sub>0</sub> como lo hacen los factores difusibles de BCU110501. Para resolver esta incógnita se incubó el inóculo diluido de *Frankia* BCU110501 con las cepas Arl3 de *Frankia*, A(3)2 de *S. coelicolor* y *Frankia* BCU110501 muerta en altas concentraciones dentro de una membrana de diálisis. Los resultados mostraron que los factores difusibles de Arl3 y *S. coelicolor* modifican el t<sub>0</sub> del mismo modo que la cepa BCU110501 (Tabla 1, columna 2). Además, la incubación del inóculo con la cepa BCU110501 de *Frankia* muerta por radiación con rayos gama no mostró

diferencia alguna con el tratamiento control, demostrando que es necesaria la célula viva para generar factores de difusión biológicamente activos. En el Capítulo 2 de esta Tesis se mostró que en ensayos de coinoculación con bacterias no infectivas en *D. trinervis* hay parámetros de nodulación que pueden ser modificados del mismo modo que lo hace la cepa infectiva BCU110501 en dosis altas de inóculo ( $t_0$ ,  $t_{NOD}$ ), pero no otros parámetros como  $v_0$ , sugiriendo que hay más de una etapa limitante en el comienzo de la nodulación. Esta hipótesis de trabajo se corrobora en este capítulo ya que solo los factores difusibles provenientes de la cepa infectiva BCU110501 produjeron un incremento significativo ( $P$  valor  $\leq 0.05$ ) de  $v_0$  que va de 0.77 a 1.29 nódulos planta<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup> (Tabla 1, col. 3), esto sugiere que el factor de reconocimiento específico que modifica  $v_0$  sería un factor difusible.

Dado que hasta el momento los experimentos discutidos no permitían diferenciar sobre que simbionte actúan directamente los factores difusibles, si sobre la bacteria, la raíz o ambos, se diseñó un experimento especialmente para probar si los factores difusibles bacterianos actúan sobre la raíz de las plantas de *D. trinervis*. En este ensayo, las bolsas de diálisis llenas con altas concentraciones de diferentes cultivos (*Frankia* BCU110501, *Frankia* Ar13, *S. coelicolor* A(3)2) o solo con solución mineral E 1/10 (control) fueron colocadas sobre la raíz durante las 96 horas previas a la inoculación con *Frankia* BCU110501 en concentración limitante. Los resultados de este experimento, ya sea en la cinéticas (Figura 7), en los parámetros de nodulación (Figuras 8 A, 8 B y 8 C) y en los perfiles de nodulación (Figura 9) sugieren que no habría un efecto directo de los factores difusibles bacterianos sobre las raíces de *D. trinervis*, al menos en los términos observados previamente cuando los factores difusibles se utilizaron para preincubar *in situ* a *Frankia*. Cabe destacar que al ver los perfiles de nodulación (Figura 9) se observa claramente que los nódulos se desarrollaron muy por encima de la marca RT, comparado a perfiles de nodulación de otros experimentos (Figuras 2, 6 y 12). Esta diferencia, para todos los tratamientos de este ensayo pudo deberse simplemente a que la bolsa de diálisis permaneció en contacto con la raíz y seguramente generó un ambiente diferente evitando que las células maduren a la velocidad habitual en un pouche y pierdan susceptibilidad a la infección.

Con el objeto de entender mejor el efecto producido por los factores difusibles se diseñó un experimento para estudiar el efecto del tiempo de difusión necesario para que se activen las bacterias de inóculo *Frankia* BCU110501 diluido. Los resultados obtenidos para los diferentes tiempos de incubación del inóculo (0, 24, 48 y 96 horas) mostraron que a las

24 horas ya se había producido la activación del inóculo, disminuyendo significativamente el  $t_0$ . La estimulación de la nodulación a través de la disminución en  $t_0$  aumentó a medida que se incrementaron las horas de incubación del inóculo con los factores difusibles (Figura 5 A). Los resultados de los perfiles de nodulación mostraron que los nódulos se desarrollaron en una zona cada vez más distante del ápice radicular de la raíz principal como consecuencia directa de la activación que el inóculo adquiere con el paso del tiempo con los factores difusibles (Figura 6). Por otra parte, los nódulos de las plantas que fueron inoculadas con *Frankia* BCU110501 tratada con los factores difusibles, aparecieron en una zona más acotada de la raíz principal. Estos resultados ponen en evidencia que el mecanismo de autorregulación de la nodulación (Valverde y Wall, 1999a) estaría siendo alterado por las variables de este experimento. Una explicación posible para que el mecanismo de autorregulación de la nodulación se dispare prematuramente es que la cepa BCU110501 tratada con factores difusibles esté fisiológicamente mejor preparada que el inóculo diluido para interactuar con las células de la raíz, haciendo más eficientes los pasos iniciales de colonización e infección. Esta hipótesis también explica la disminución observada en el tiempo necesario para que se desarrolle el primer nódulo,  $t_0$  (Figura 5 B).

Estos resultados sugieren una rápida y progresiva activación del inóculo por parte de los factores difusibles de *Frankia*, además de corroborar que los FDs actúan sobre la propia bacteria. Este fenómeno en el cual factores difusibles de una alta concentración bacteriana provoca un cambio de expresión en células de la misma cepa en baja concentración sugiere que se está expresando un sistema de señalización del tipo de detección de quórum (González y Marketon, 2003; Otero Casal y col., 2005).

Dado que los resultados de FD sobre la raíz no reflejan una posible activación de las mismas, el efecto de los FD estaría dirigido principalmente hacia las mismas bacterias.

Hasta aquí los tratamientos del inóculo con los FDs discutidos se realizaron en simultáneo, en el mismo envase, con las bacterias (de alta y baja concentración) separadas por una membrana de diálisis. Este diseño supone que puede haber interacción entre las bacterias de diferente concentración. En un nuevo experimento se buscó separar temporalmente a las dos suspensiones bacterianas. En un primer paso se generaron los FDs y luego se utilizó la solución mineral con los factores difusibles para resuspender un cultivo lavado de *Frankia* BCU110501 diluido y estudiar el tiempo de activación del inóculo. Esta preparación se utilizó para inocular plantas de *D. trinervis* 0, 24, 48 y 96 horas después de que se preparó el inóculo. Los resultados mostraron que los FDs

generados a partir de una suspensión concentrada de la cepa BCU110501 durante 96 horas tienen la capacidad de actuar positivamente sobre el inóculo diluido con una incubación de poco más de 24 horas. Esta conclusión se sustenta al observar los valores de  $v_0$ , velocidad inicial de nodulación, donde se encontró un incremento significativo (Figura 11 B y Tabla 3). Pero por otro lado, al poner el foco del análisis en los resultados de  $t_0$ , un parámetro que da información de cuán rápida o efectiva es la interacción entre planta y bacteria, se observó un aumento a tiempo 0 del tratamiento que contó con FDs de *Frankia* BCU110501 respecto del control (Figura 11 A). Los valores de  $t_0$  disminuyeron conforme aumentó el tiempo de incubación con los FD, hasta alcanzar a las 96 horas un valor próximo al tratamiento control (Figura 11 A), el cual permaneció invariable respecto al tiempo de incubación (Figura 11 A, barras blancas). La situación experimental en la que *Frankia* BCU110501 se encuentra con los FD (concentrados y previamente obtenidos) en el momento de la inoculación supone una situación de stress para el inóculo. Es posible que esta situación de stress sea la causa del aumento en el tiempo inicial de nodulación, resultado que se revierte gradualmente a medida que la bacteria tiene más tiempo en contacto con los FD previo a la inoculación (Figura 11 A). El tiempo seguramente estaría permitiendo la adaptación del inóculo diluido a la situación de stress. Además, observando la tendencia de los resultados y los valores alcanzados con 96 horas de incubación (Figura 11 A) no se puede descartar que se alcance una reducción en  $t_0$  respecto del control con mayores tiempos de incubación que los realizados, como se observó cuando los FD se generaron *in situ* con el inóculo diluido (Figura 2, Tabla 1, Figura 5 A). Otra explicación a este resultado, menos probable biológicamente, es que el/los factores difusibles en la condición experimental lograda tengan actividad inhibitoria y pierdan su actividad gradualmente en el tiempo. Ésta última explicación es poco probable debido a que pasadas las 24 horas de incubación del inóculo con FDs se encontró un significativo incremento en  $v_0$  respecto del control, que se mantuvo invariable en el tiempo (Figura 11 B, Tabla 2 y Tabla 3). Los perfiles de nodulación obtenidos son congruentes con los resultados de  $t_0$ . Tanto la distribución de los nódulos a lo largo de la raíz como el porcentaje de nódulos por encima de RT de los tratamientos en que el inóculo fue incubado con FD de E 1/10 (controles) fueron prácticamente idénticos a pesar de los diferentes tiempos de incubación (Figura 12 A, círculos blancos y Figura 12 B, barras blancas). Estos resultados indican que el inóculo de *Frankia* BCU110501 diluido en solución E 1/10 no modifica su capacidad de nodulación por incubación de al menos 96 horas previo a la inoculación sobre plántulas de *Discaria trinervis*. Por otro lado, las plantas inoculadas

acto seguido de poner en contacto al inóculo con FDs de *Frankia* BCU110501 desarrollaron sus nódulos en una zona de la raíz más próxima a su ápice en comparación a las plantas control (Figura 12 A). Este resultado también se visualizó en el menor porcentaje de nódulos por encima de la marca RT (Figura 12 B). Sin embargo, a medida que aumentó el tiempo de incubación del inóculo con los FDs de la cepa BCU110501 la tendencia se revirtió hasta alcanzar a las 96 horas resultados similares a los del tratamiento control, ya sea en los perfiles de nodulación casi solapados que se obtuvieron (Figura 12 A), como en el porcentaje de nódulos por encima de RT (Figura 12 B). Del mismo modo que se explicó el aumento inicial en  $t_0$  respecto al control y su retracción conforme la bacteria pasó tiempo con los FDs, se puede explicar el fenómeno observado en la distribución de los nódulos a lo largo de la raíz. Los resultados sugieren que el inóculo diluido entró en un estado fisiológico de stress cuando se puso en contacto con FDs, obtenidos previamente, provocando una interacción simbiótica deficiente entre *Frankia* BCU110501 y *D. trinervis*.

Finalmente se diseñó un experimento con la intención de conocer alguna característica química de los FDs de *Frankia* BCU110501. Se prepararon los factores difusibles y luego fueron sometidos a diferentes tratamientos (calor, proteasa y resinas de intercambio iónico) antes de incubar con el inóculo diluido. Se utilizó como medida de actividad biológica la disminución en el tiempo inicial de nodulación y el cambio en el perfil de nodulación que se producen en *D. trinervis* cuando el inóculo es preincubado con FDs de una alta dosis de *Frankia* BCU110501. Los resultados de este experimento sugieren que la actividad de los factores difusibles no es sensible a las altas temperaturas (30 minutos a 100 °C) y tampoco presentaría cargas positivas en su estructura (tratamiento con SP Sepharose) ya que los promedios de los parámetros fueron muy similares a los que mostraron los controles (Figuras 14 y 15). Sin embargo los resultados sugieren (Figuras 14 y 15) que la actividad de los factores difusibles es sensible a proteinasa K y que se retienen por resina de intercambio aniónico (Q Sepharose), sugiriendo carga negativa para el FD, ya que el tiempo de nodulación inicial y los perfiles de nodulación no se diferenciaron de sus controles (Figuras 14 y 15). Con estos resultados se intuye que los factores difusibles capaces de producir un estímulo del inóculo diluido que lo lleva a colonizar, infectar y desarrollar nódulos en *Discaria trinervis* con menor tiempo, tienen  $PM < 12000$  Da, cierto carácter peptídico y presenta carga negativa a pHs fisiológicos (Evans pH = 6.8) debido a que la actividad se perdió al tratar a los factores difusibles con una resina que retiene fuertemente a moléculas que a pH 6.8 presentan carga negativa (Q Sepharose).

En resumen, los resultados de este capítulo permitieron avanzar en el conocimiento de una señal que es secretada al medio por *Frankia*, al menos por las cepas BCU110501 y Ar13 que fueron las únicas ensayadas, y por *Streptomyces coelicolor* A(3)2. Se encontró que esta señal o factor difusible actúa sobre *Frankia* BCU110501 en bajas dosis (concentración limitante para la nodulación) provocando que éste, al permanecer en contacto con los factores por al menos 24 horas, optimice los tiempos de colonización, infección y nodulación de la planta actinorrhiza *D. trinervis* que se ven reflejados en una reducción en el tiempo que transcurre desde la inoculación hasta la aparición del primer nódulo y en una distribución de los nódulos hacia la región más vieja de la raíz. Una hipótesis para explicar el modo de acción de esta señal es que *Frankia* necesite de un cambio en el patrón de expresión para poder ser infectiva en su planta hospedadora y el disparador de este cambio de expresión sea una señal difusible, producida y secretada al medio por la misma bacteria, que al acumularse y alcanzar una concentración umbral produzca el cambio de expresión. Esta hipótesis se sustenta con experimentos realizados en el Capítulo 2 en los que se vio el efecto de dosis – respuesta en plantas de *Discaria trinervis* y con los reportes que muestran que la nodulación está fuertemente determinada por la dosis del inóculo en *Discaria trinervis* (Gabbarini y Wall, 2008; Valverde y Wall, 1999a) y en *Alnus incana* (Wall y Huss-Danell, 1997). Continuando con el mismo razonamiento, es esperable que cuanto antes se alcance la concentración umbral del factor difusible, condición que se produce o bien aumentando la dosis del inóculo o bien suplementando a una dosis baja de inóculo con los factores que producen una alta dosis, antes se produzca el cambio de expresión en el inóculo y por lo tanto antes se comenzará con los pasos de colonización e infección de la raíz.

Por otro lado, el hecho que los factores difusibles de otras bacterias, no infectivas en *D. trinervis*, como *Frankia* Ar13 y *S. coelicolor* A(3)2, puedan actuar sobre el inóculo diluido de *Frankia* BCU110501 (Tabla 1) sugiere que el factor difusible tiene un cierto carácter común y no determina la especificidad entre bacteria y planta.

Hasta la fecha no se han publicado trabajos en los que se haga referencia al estudio de detección de quórum en *Frankia*, pero si hay numerosos trabajos que demuestran que un mecanismo de este tipo está involucrado en el establecimiento de la simbiosis de rizobios (González y Marketon, 2003; Otero Casal y col., 2005), por ejemplo *Mesorhizobium tianshanense* utiliza el sistema de detección de quórum tipo LuxR/LuxI para regular el crecimiento y la infectividad en la planta leguminosa orozus (Cao y col., 2008). En relación a las bacterias del género *Streptomyces* hay mucha evidencia de que las bacterias de este

género utilizan un mecanismo de detección de quórum mediado por una -butirolactona, entre otras cosas para regular y sincronizar la producción de antibióticos y para disparar la diferenciación celular (Takano, 2006).

Si bien hasta aquí, con los resultados presentados, no se puede ser concluyente, es altamente probable que el FD estudiado sea parte de un mecanismo de detección de quórum. La molécula inductora de este mecanismo podría ser compartida por las bacterias del género *Frankia* y es factible que el género *Streptomyces* también.

### 3.5 Referencias

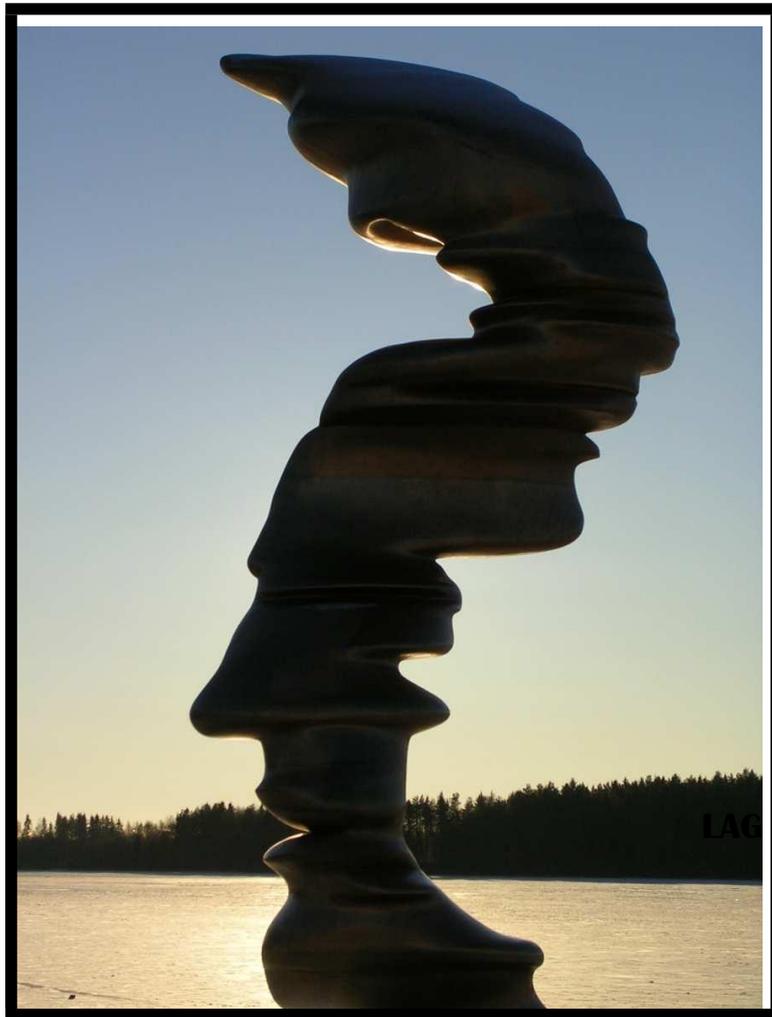
- Berry, A., and Torrey, J. G. (1979): Isolation and Characterization in vivo and in vitro of an actinmyceteous endophyte from *Alnus Rubra* Bong, pp. 69-83. In J. Gordon, C. Wheeler, and D. Perry (Eds): *Symbiotic Nitrogen Fixation in the Management of Temperate Forest*, Corvallis: Oregon State University, Forest research Laboratory.
- Bhuwaneswari, T., Turgeon, B., and Bauer, W. (1980): Early events in the infection of soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) by *Rhizobium japonicum*. I. Localization of infectible root cells. *Plant Physiology* **66**, 1027-1031.
- Burggraaf, A., Van Der Linden, J., and Tak, T. (1983): Studies on the localization of infectible cells on *Alnus glutinosa* roots *Plant and Soil* **74**, 175-188.
- Caetano-Anollés, G., and Bauer, W. (1988): Feedback regulation of nodule formation in alfalfa. *Planta* **175**, 546-557.
- Cao, H., Yang, M., Zheng, H., Zhang, J., Zhong, Z., and Zhu, J. (2008): Complex quorum-sensing regulatory systems regulate bacterial growth and symbiotic nodulation in *Mesorhizobium tianshanense*. *Archives of Microbiology* **191**, 283-289.
- Chaia, E. (1998): Isolation of an effective strain of *Frankia* from nodules of *Discaria trinervis* (Rhamnaceae). *Plant and Soil* **205**, 99-102.
- Gabbarini, L., and Wall, L. (2008): Analysis of nodulation kinetics in *Frankia*-*Discaria trinervis* symbiosis reveals different factors involved in the nodulation process. *Physiologia Plantarum* **133**, 776-785.
- González, J., and Marketon, M. (2003): Quorum Sensing in Nitrogen-Fixing Rhizobia. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **67**, 574-592.
- Knowlton, S., Berry, A., and Torrey, J. (1980): Evidence that associated soil bacteria may influence root hair infection of actinorhizal plants by *Frankia*. *Can J Microbiol.* **26**,

971-977.

- Murry, M., Fontaine, M., and Torrey, G. (1984): Growth kinetics and nitrogenase induction in *Frankia* sp. HFPArl 3 grown in batch culture. *Plant and Soil* **78**, 61-78.
- Nittayajarn, A., and Baker, D. (1989): Methods for the quantification of *Frankia* cell biomass. *Plant and Soil* **118**, 199-204.
- Otero Casal, A., Muñoz Crego, A., Bernárdez Hermida, M., and Fábregas Casal, J. (2005): *Quorum sensing: El lenguaje de las bacterias*. Zaragoza.
- Takano, E. (2006): -Butyrolactones: *Streptomyces* signalling molecules regulating antibiotic production and differentiation. *Current Opinion in Microbiology* **9**, 287-294.
- Valverde, C., and Wall, L. (1999a): Regulation of nodulation in *Discaria trinervis* (Rhamnaceae) - *Frankia* symbiosis. *Can. J. Bot.* **77**, 1302–1310.
- Valverde, C., and Wall, L. G. (1999b): Time course of nodule development in the *Discaria trinervis* (Rhamnaceae) –*Frankia* symbiosis. *New Phytologist* **141** 345-354.
- Van Ghelue, M., Løvaas, E., Ringø, E., and Solheim, B. (1997): Early interactions between *Alnus glutinosa* and *Frankia* strain Arl3. Production and specificity of root hair deformation factor(s). *Physiologia Plantarum* **99**, 579-587.
- Wall, L. G., and Huss-Danell, K. (1997): Regulation of nodulation in *Alnus incana*-*Frankia* symbiosis *Physiol Plant* **99**, 594–600.

## Capítulo 4

### “Análisis de la nodulación en *Alnus acuminata* y estudio de la influencia de un par simbiótico heterólogo”



#### 4.1 Introducción

Los nódulos fijadores de nitrógeno inducidos por *Frankia* en *Alnus acuminata* son un

ejemplo de simbiosis actinorrícica (Wall, 2000) con vía de infección intracelular e invasión a través de pelo radicular deformado (Wall y Berry, 2008). Como ya se adelantó en el capítulo 1, esta vía de infección es claramente diferente a la vía de infección intercelular que ocurre en *Discaria trinervis* cuando es infectada por *Frankia* sin que haya deformación de pelos radiculares (Valverde y Wall, 1999b).

En la década del 90 se han estudiado señales o factores difusibles en plantas actinorrícicas utilizando como bioensayo la deformación de pelos radiculares, obviamente en especies actinorrícicas que utilizan esta vía de infección (Cérémonie y col., 1999; Van Ghelue y col., 1997). Estos estudios sugieren que los factores de deformación de pelos radiculares de *Frankia* no expresarían reconocimiento simbiótico como si ocurre con los lipoquitinooligosacáridos que producen los rizobios en respuesta a flavonoides específicos que secretan las raíces de las plantas en las simbiosis entre rizobios y leguminosas (Hirsch y col., 2001; Spaink, 2000). Se ha mostrado en *Alnus rubra* que factores vegetales del tipo de los flavonoides pueden modular la nodulación, ya sea estimulando o inhibiéndola (Benoit y Berry, 1997). Se han encontrado rutas metabólicas de síntesis de flavonoides en *Frankia* y algunos genes relativos a los genes NOD, pero hasta la fecha no se ha podido encontrar un modelo de comunicación molecular como en la simbiosis entre rizobios y leguminosas.

El proceso de infección y desarrollo de nódulos en las raíces de las plantas actinorrícicas es un fenómeno dependiente de la dosis que alcanza un estado de saturación a altas dosis de inóculo bacteriano, ya sea en el caso de plantas infectadas a través de pelos radiculares deformados, como es el caso de *Alnus incana* (Wall y Huss-Danell, 1997), o en el caso de plantas donde la bacteria invade la raíz intercelularmente como *D. trinervis* (Gabbarini y Wall, 2008; Valverde y Wall, 1999a) que se estudió en el Capítulo 2 de esta Tesis. Estos resultados sugieren que la inducción de la respuesta de la planta depende de la concentración de posibles factores producidos por la bacteria y de la afinidad de estos con los receptores expresados por la raíz, y/o viceversa, como ocurre en interacciones bioquímicas entre moléculas que expresan reconocimiento, por ejemplo un sustrato y su enzima.

De un modo similar al que presentan las plantas leguminosas, la nodulación en las plantas actinorrícicas se encuentra regulada por mecanismos como el de autorregulación (Valverde y Wall, 1999a; Wall y Huss-Danell, 1997), inhibición por retroalimentación de N (Valverde y Wall, 2003; Valverde y col., 2000) y estimulación por altos niveles de P en tejidos vegetales (Valverde y col., 2002). Los efectos inhibitorios/estimulantes pueden ser

organizados en un modelo de regulación de la simbiosis actinorrícica independientemente de la vía de infección radicular (Wall, 2000). Teniendo en cuenta los mecanismos de regulación, es posible explicar el nivel de nodulación y la distribución de los nódulos a largo de la raíz en una condición experimental particular (Valverde y Wall, 1999a). Sin embargo, se desconoce la naturaleza de la/s señal/es involucrada/s en este fenómeno. Como hemos visto en el capítulo anterior el número de nódulos desarrollados y los diferentes parámetros de nodulación que surgen de analizar la cinética de cada planta (Capítulo 2) pueden utilizarse para estudiar la nodulación a lo largo del tiempo de un experimento dado (Gabbarini y Wall, 2008).

La competición para la nodulación con bacterias homólogas y heterólogas fue adaptada aquí para estudiar la simbiosis entre *Alnus acuminata* y la cepa Arl3 de *Frankia*. Se utilizaron preparaciones de inóculo a concentraciones limitantes, no saturantes, del mismo modo que en el capítulo 2 se hizo con el par simbiótico compatible que forman *Frankia* BCU110501 y *D. trinervis*.

Avanzando con esta idea, se estudió la nodulación de *Alnus acuminata* por *Frankia* Arl3 en presencia de la cepa BCU110501 de *Frankia* en diferentes dosis, y/o *Discaria trinervis*, creciendo ambas especies de plantas en el mismo pouche, con el objetivo de buscar si es posible romper la barrera de reconocimiento entre *Frankia* y un planta actinorrícica por complementación fisiológica, permitiendo la coinfección de nódulos por parte de una cepa de *Frankia* perteneciente a un grupo diferente de inoculación cruzada.

## 4.2 Materiales y métodos

### Crecimiento de las plantas

Frutos de *Alnus acuminata* H. B. K. fueron colectados en San Javier (65° 22' O, 26° 50' S) muy cerca de la ciudad de San Miguel de Tucuman, Los Toldos (65° 12 O, 26° 51' S) en la provincia de Salta y La Banderita (Capítulo 1, Figura 2) en el límite entre las provincias de Tucumán y Catamarca. Las semillas se esterilizaron superficialmente sumergiéndolas durante 15 minutos en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 % v/v), luego se lavaron unas 10 veces con solución mineral Evans (E 1/10, ver Materiales y métodos del Capítulo 2) estéril.

Las semillas de *Discaria trinervis* (ver Materiales y Métodos del Capítulo 2) se esterilizaron superficialmente por escarificación, se agitaron en forma manual durante 3

minutos en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 96 % y luego se lavaron 10 veces con E 1/10 estéril (Valverde y Wall, 1999b).

Las dos especies de semillas fueron puestas a germinar en cajas de Petri con perlita humedecida en E 1/10. Dos semanas después de puestas a germinar cuatro plántulas seleccionadas al azar fueron transferidas a cada pouche (Capítulo 2, Figura 1 A) (Mega Internacional, Minneapolis, Estados Unidos). En los ensayos en que ambas especies, *Alnus acuminata* y *Discaria trinervis*, fueron puestas a crecer juntas, sus raíces compartieron el mismo espacio de crecimiento, permitiendo que los exudados radiculares de ambas especies se mezclen. Para realizar el ensayo cuatro plántulas de *A. acuminata* y cuatro de *D. trinervis* fueron seleccionadas al azar y transferidas al mismo pouche, quedando en contacto las raíces de ambas especies (Figura 1). Cada pouche se humedeció con 10 ml de solución mineral E 1/10 libre de nitrógeno ya sea en los ensayos de cuatro como así también en los de ocho plantas por pouche. La germinación y el crecimiento posterior de las plantas fue llevado a cabo en el invernáculo de la Universidad Nacional de Quilmes (34° 7' S, 58° 3' O) con suplementación de luz artificial (400 W, Osram, K048, Brasil), con un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, el rango de temperatura fue de 18 y 25 °C, y una humedad relativa de 40-95 %. Se regó con Evans 1/10 libre de nitrógeno para mantener la humedad del papel soporte cuando se consideró necesario.

### **Cultivo de las bacterias y preparación del inóculo**

La cepa Arl3 de *Frankia* (Figura 2) fue cedida gentilmente por K. Huss-Danell (SLU, Umeå, Suecia). Este aislamiento que es infectivo y efectivo en plantas de *Alnus acuminata* fue aislado originalmente en cultivo puro a partir de un nódulo de *Alnus rubra* (Berry y Torrey, 1979). Como ya se mencionó en el Capítulo 2, la cepa BCU110501 de *Frankia* es infectiva y efectiva en plantas de *Discaria trinervis* (Chaia, 1998). Ambas cepas de *Frankia* fueron crecidas por 6 semanas a 28 °C sin agitación en medio mínimo BAP (Murry y col., 1984).

El medio de cultivo en el que se creció la cepa BCU110501 fue suplementado con glucosa 0.055 M mientras que el medio de cultivo en que se creció a la cepa Arl3 se suplementó con propionato de sodio 0.005 M como fuente de carbono.

Para la preparación del inóculo, las células de *Frankia* fueron lavadas con E 1/10 sin N un par de veces y resuspendidas en un volumen de 8-10 ml de E 1/10 sin N para luego

homogenizarlas pasándolas 5 veces a través de agujas 21G con la ayuda de una jeringa. La cantidad de biomasa en la suspensión se estimó midiendo el volumen celular empaquetado (pcv, de packed cell volume) después de centrifugar una muestra de la suspensión bacteriana a 1100 g durante 5 minutos (Nittayajarn y Baker, 1989). Una vez estimada la biomasa celular de la suspensión se realizó la dilución necesaria en E 1/10 N- para inocular con la concentración bacteriana deseada.

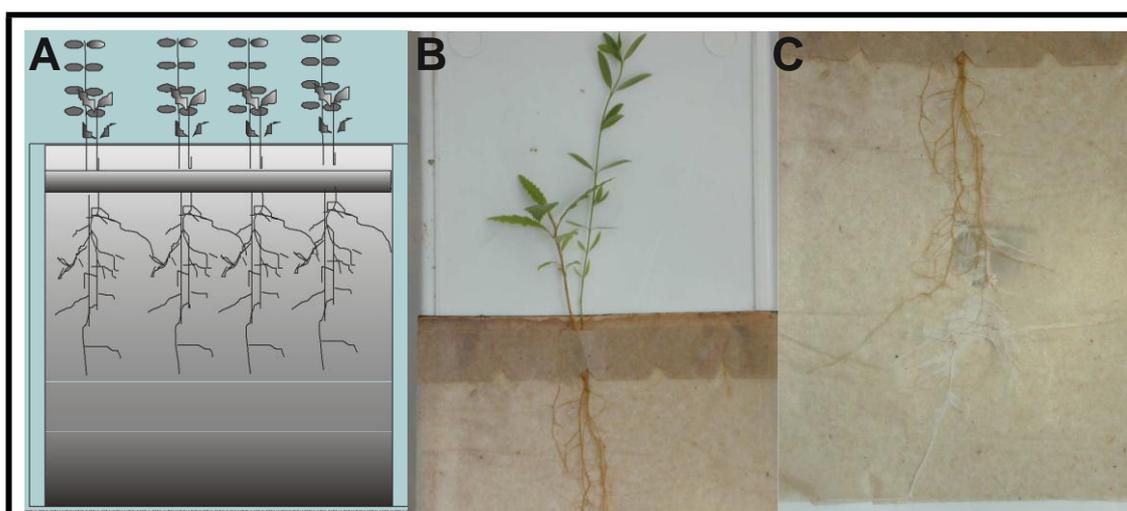
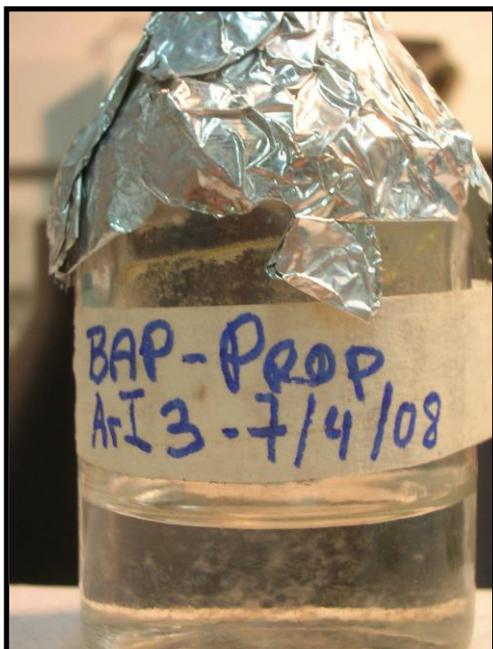


Figura 1. *Alnus acuminata* y *Discaria trinervis* creciendo juntas en el mismo pouche. (A) Esquema que muestra como se colocaron las cuatro plántulas de cada especie dentro del mismo pouche. Una plántula de *Discaria trinervis* y otra de *Alnus acuminata* se colocaron juntas en el pouche. (B) La foto muestra a la plántula de *A. acuminata* (a la izquierda) y *D. trinervis* (a la derecha). (C) Raíces de las dos plantas compartiendo el espacio en el pouche. La raíz más rojiza es de *A. acuminata* y se pueden ver en rojo oscuro los nódulos, la raíz blanca pertenece a *D. trinervis*.

### Inoculación de las plantas

Al momento de la inoculación, 20 plantas, o 40 en el caso del experimento en que las dos especies fueron crecidas juntas, distribuidas en 5 pouches, fueron separadas aleatoriamente. Todos los pouches pertenecientes al mismo tratamiento fueron ubicados juntos dentro de una única bolsa plástica. Cada raíz se inoculó descargando 200  $\mu$  l de suspensión a lo largo de la misma con micropipeta.



**Figura 2. Cultivo de *Frankia* Ar13.** La cepa crece formando agregados de filamentos cuando se la cultiva en medio BAP suplementado con propionato de sodio como fuente de carbono y se la hace crecer en medio líquido a 28 °C y sin agitación. Para preparar el inóculo los agregados de filamentos se rompen pasando las células a través de una aguja 21G con una jeringa y luego se estima la concentración midiendo volumen de empaquetamiento celular como se describe en la sección Materiales y métodos del Capítulo 2.

### Registro de la nodulación

Al momento de la inoculación, la posición de cada punta radicular (RT de Root Tip) fue marcada con una fibra indeleble en la superficie plástica del pouche (Valverde y Wall, 1999b). Las raíces de *D. trinervis* se observaron cada 2-3 días con el objetivo de registrar y contar a simple vista los nódulos que se desarrollaban. La posición de los nódulos a lo largo de la raíz se marcó sobre el plástico del pouche con una fibra resistente al agua y luego se midió la distancia (en mm) de cada nódulo a la marca de referencia RT (posición cero). La frecuencia de nódulos se agrupó cada 5 mm a lo largo de la raíz y se graficó el perfil de nodulación para cada tratamiento. Las posiciones por encima de la marca RT se consideraron como valores positivos (+) y los que se encuentran por debajo de la marca se consideraron como valores (-) (Valverde y Wall, 1999b).

### Efecto de la dosis de inóculo en la nodulación de *Alnus acuminata*

A partir de un único cultivo se prepararon suspensiones de *Frankia* Ar13 en solución

mineral E 1/10 N- de diferente concentración y se inoculó con: 0.04, 0.4, 4 y 40  $\mu\text{l pcv raíz}^{-1}$ . Cada planta se inoculó descargando 200  $\mu\text{l}$  de suspensión desde el extremo de la raíz hacia la base de la raíz.

### **Coinoculación en *Alnus acuminata* con la cepa *Frankia* BCU110501**

Células lavadas de *Frankia* Arl3 (infectiva en *Alnus acuminata*) y *Frankia* BCU110501 (no infectivas en *A. acuminata*) fueron mezcladas en el mismo recipiente y 200  $\mu\text{l}$  de esta suspensión de inóculo fue aplicado sobre cada raíz, desde el extremo hacia su base. Se realizaron diferentes inóculos manteniendo constante la concentración de *Frankia* Arl3 ( $0.01 \mu\text{l pcv raíz}^{-1}$ ) y variando la cantidad de *Frankia* BCU110501 en la mezcla del siguiente modo: (0.25, 2.5, 12.5  $\mu\text{l pcv raíz}^{-1}$ , y 0  $\text{pcv raíz}^{-1}$  como control).

### ***Alnus acuminata* y *Discaria trinervis* crecidas juntas**

Cuando las plántulas de *D. trinervis* y de *A. acuminata* fueron colocadas en el mismo pouche (ver antes) fueron inoculadas con 200  $\mu\text{l}$  de suspensión bacteriana aplicados a lo largo de las 2 raíces (Figura 1 B), desde la punta hasta la base de ambas raíces. Se armaron los grupos o tratamientos seleccionando aleatoriamente 5 pouches y se colocaron los pouches de un mismo tratamiento dentro de una única bolsa plástica de mayor tamaño. Cada tratamiento fue inoculado con una de las siguientes preparaciones de inóculo: i) E 1/10 sin N (control negativo), BCU110501 ( $0.01 \mu\text{l pcv raíz}^{-1}$ ), Arl3 ( $0.01 \mu\text{l pcv raíz}^{-1}$ ), una suspensión compuesta por BCU110501 ( $0.01 \mu\text{l pcv raíz}^{-1}$ ) + Arl3 ( $0.01 \mu\text{l pcv raíz}^{-1}$ ), y BCU110501 ( $0.01 \mu\text{l pcv raíz}^{-1}$ ) + Arl3 separada físicamente de la raíz por una membrana de diálisis. Dentro de cada membrana de diálisis tubular de celulosa (corte de 12 KDa) de 15 mm de diámetro (Sigma, St. Louis, MO) se colocaron 3 ml de una suspensión de *Frankia* Arl3 ( $3.5 \mu\text{l pcv ml}^{-1}$ ). Cada membrana de diálisis tubular fue cuidadosamente cerrada en sus extremos y ubicada a lo largo de cada par de raíces (Figura 1 B), de modo que se colocaron 4 membranas por pouche. Los tratamientos control fueron pouches con solo una de las especies (4 plantas por pouche). Las diluciones de las suspensiones generadas fueron preparadas en solución mineral E 1/10 N-.

## **Análisis ocupacional de los nódulos**

Nódulos de *Discaria trinervis* y *Alnus acuminata* fueron separados de sus raíces y su ocupación bacteriana fue ensayada mediante dos técnicas diferentes. Los nódulos fueron individualmente separados de la raíz con la ayuda de una hoja de bisturí, se desinfectaron superficialmente sumergiéndolos en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 Volúmenes) durante 2 minutos y se lavaron haciendo pasajes a través de abundante agua estéril. Cada nódulo fue cortado en trozos muy pequeños con la ayuda de un bisturí y este fue el material de partida con el que se comenzaron los dos tipos de análisis ocupacional.

**Análisis molecular.** Los pequeños trozos de nódulos generados como se mencionó antes, fueron pasados a través de una malla con poros de 100µm con la intención de remover los restos grandes de vegetales que puedan haber quedado y luego a través de una malla de 20µm con el objetivo de retener los cúmulos de vesículas bacterianas. Las vesículas fueron trasvasadas con micropipeta a tubos estériles. Tanto las vesículas colectadas como cultivos frescos de *Frankia* fueron tratados con CTAB (cetil trimethyl ammonium-bromide) 2 % para purificar su ADN genómico (Myrold y col., 1994). El gen del ARN ribosomal 16S fue amplificado por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los cebadores universales P0 y P6 (Chaia y col., 2006). La mezcla de PCR contenía 1 µl de muestra de ADN en 20 µl de buffer Taq (Fermentas) compuesto de 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 pmol de cada cebador, 200 mM de cada nucleótido y 1 U de Taq ADN polimerasa (Fermentas). La mezcla de reacción fue incubada a 95 °C durante 5 minutos seguido de 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos y 72 °C por 2 minutos. Finalizados los 35 ciclos la reacción se incubó a 72 °C por 10 minutos. Los productos de PCR fueron digeridos con las enzimas *PvuI* y *SacI* y posteriormente los fragmentos fueron separados en geles de agarosa (1 % p/v) y teñidos con bromuro de etidio para analizar el polimorfismo en longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, restriction fragment length polymorphism).

**Análisis por planta trampa.** Los nódulos macerados como se mencionó anteriormente, se resuspendieron en E 1/10 sin N para generar una suspensión de 1 mg (peso fresco de nódulo)/ml y luego se utilizó como inóculo. 20 plantas de *Discaria trinervis* y 20 de *Alnus acuminata* crecidas en pouches fueron inoculadas con 200 ml de la suspensión generada y su nodulación fue registrada.

## Registro de los nódulos

Se marcó la posición de cada punta radicular (RT) en el momento de la inoculación se marcó con tinta resistente al agua sobre la superficie plástica del pouche (Valverde y Wall, 1999a). Las raíces de *Discaria trinervis* y *Alnus acuminata* crecidas en pouches se analizaron a simple vista cada 2-4 días en busca de nódulos. La posición de cada nódulo a lo largo de la raíz se marcó con tinta resistente al agua en la superficie externa del pouche y se contó la cantidad de nódulos de cada planta. Se midió la distancia (en mm) desde cada nódulo a la marca de referencia RT (posición cero). Con estos datos se graficaron los perfiles de nodulación. Las posiciones de los nódulos por encima del RT se consideraron como valores positivos (+), mientras que los nódulos posicionados por debajo de la marca RT fueron considerados valores negativos (-) (Valverde y Wall, 1999a).

## Análisis estadístico

Las diferencias, expresadas en **valor P**, entre los valores promedio obtenidos para los diferentes parámetros de nodulación de los diferentes tratamientos experimentales contra sus controles fueron obtenidas a través del test-t para datos desapareados utilizando el programa Sigma-Plot (versión 8.0).

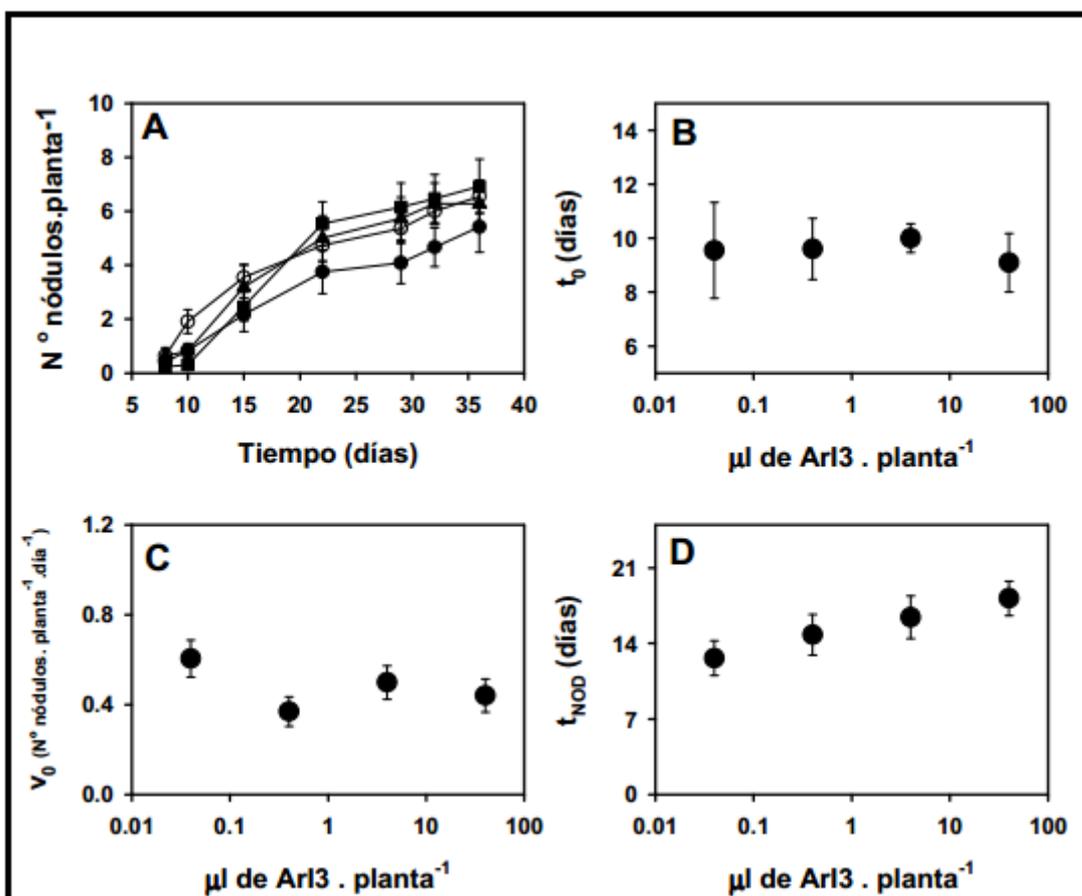
## Análisis de los parámetros de nodulación

Los diferentes parámetros de nodulación definidos en el Capítulo 2 de esta tesis (Gabbarini y Wall, 2008): 1)  $t_0$ , tiempo que transcurre desde la inoculación hasta la aparición del primer nódulo; 2)  $v_0$ , velocidad inicial de nodulación; 3)  $t_{OD}$ , el tiempo total de nodulación; 4)  $^{\circ}$  **nódulos por planta**, número final de nódulos por planta; y 5)  $v_R$ , velocidad de nodulación reducida, se determinaron y analizaron para cada planta en forma individual y sus promedios y error estándar fueron comparados entre los diferentes tratamientos.

## 4.3 Resultados

### **Efecto de las diferentes dosis de *Frankia* Ar13 infectiva**

En las condiciones experimentales que se desarrolló el experimento, los niveles de nodulación en las plantas de *Alnus acuminata* no se modificaron con las variaciones en las dosis del inóculo ensayadas (Figura 3 A). Sin embargo, al analizar los parámetros considerando cada planta en forma individual como se describió en el capítulo 2, se observó que al incrementar la dosis de *Frankia* Ar13 en el inóculo se correspondía con una leve tendencia a la disminución en  $v_q$  de 0.60 a 0.44 nódulos planta<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup> ( $P < 0.15$ ) cuando la dosis de inóculo se incrementó desde 0.04 a 40  $\mu$ l planta<sup>-1</sup> (Figura 3 C). El tiempo que transcurre hasta la aparición del primer nódulo  $t_0$ , en cambio, no mostró diferencias entre los diferentes tratamientos (Figura 3 B) y si el tiempo de nodulación total,  $t_{NOD}$ , mostró un aumento de 12.6 a 18.2 días ( $P < 0.024$ ) cuando la dosis de inóculo incrementó de 0.04 a 40 ml planta<sup>-1</sup> (Figura 3 D).

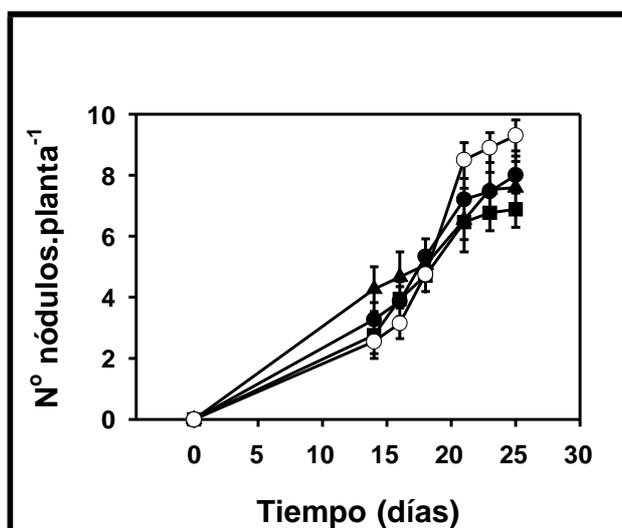


**Figura 3. Análisis de la nodulación en *Alnus acuminata* inoculada con diferentes dosis de *Frankia Ar13*.** (A) Cinéticas de nodulación variando la dosis de inóculo *Frankia Ar13*: 0.04 (○), 0.4 (●), 4 (■) y 40 (▲) l pcv (200 l)<sup>-1</sup> de suspensión bacteriana por planta. (B) Tiempo que transcurre desde la inoculación hasta la aparición del primer nódulo, t<sub>0</sub>. (C) Velocidad inicial de nodulación, v<sub>0</sub>. (D) Tiempo de nodulación total, t<sub>NOD</sub>. Los valores son el promedio ± SE para un n = 16-20 plantas.

### Efecto de la coinoculación con una cepa no infectiva de *Frankia*

La cepa BCU110501 de *Frankia*, proveniente de un grupo de inoculación diferente e incapaz de nodular *Alnus acuminata*, fue coinoculada en altas y crecientes dosis junto con una cantidad limitante de la cepa infectiva *Frankia Ar13*. Esta coinoculación promovió

una estimulación temprana de la nodulación en comparación con el tratamiento control, en que las plantas fueron inoculadas solo con una cantidad limitante de *Frankia* Arl3 (Figura 4, ver datos antes del día 20). Llamativamente, la estimulación temprana de la nodulación se convirtió en una inhibición de la nodulación hacia el final del experimento debido a la creciente dosis de *Frankia* BCU110501 en el inóculo (Figura 4, ver datos después del día 20).



**Figura 4. N odulación en *Alnus acuminata* coinoculada con diferentes dosis de *Frankia* BCU110501 y Arl3 en concentración limitante.** Cinéticas de nodulación con inóculos mixtos de *Frankia* Arl3 (0.01 ml pcv por raíz<sup>-1</sup>) y *Frankia* BCU110501 en diferentes dosis: 0 (○), 0.25 (●), 2.5 (■) y 12.5 (▲) l pcv (200 l)<sup>-1</sup> de suspensión bacteriana por planta. Los valores son el promedio ± SE para un n = 18-20 plantas.

En un análisis más detallado, donde se determinaron los parámetros de nodulación en forma individual para cada planta, se encontró una clara tendencia de disminución en  $t_0$ , (Figura 5 A). El promedio calculado con los  $t_0$  de todas las plantas de un mismo tratamiento disminuyó de 12.0 a 9.7 días ( $P < 0.0075$ ) cuando la dosis de *Frankia* BCU110501 en el inóculo se incrementó desde 0 a 12.5 l de pcv por raíz. Mientras tanto el  $t_{NOD}$ , tiempo total de nodulación, fue reducido (Figura 5 B) de 11.0 a 9.08 días ( $P < 0.041$ ) para el mismo aumento de la dosis de *Frankia* BCU110501. Además, la  $v_0$ , velocidad inicial de nodulación (Figura 5 C) incrementó de 0.94 a 1.17 nódulos por planta por día ( $P < 0.1$ ), y el porcentaje de plantas con una velocidad de nodulación reducida  $v_R$  (Figura 5 D) se incrementó conforme aumentó la dosis de la cepa BCU110501 en la suspensión de inóculo mixta.

Es preciso destacar que la cepa BCU110501 no fue capaz de inducir nódulos en ninguna planta de *Alnus acuminata* cuando fue inoculada sola y aún en altas dosis. El registro negativo de la nodulación en las plantas se realizó hasta tres meses después del

momento de la inoculación.

Por otro lado, el análisis molecular de la ocupación por RFLP-PCR de las vesículas extraídas de nódulos de *Alnus acuminata* corroboró que solo la cepa Ar13 y no BCU110501 estaban ocupando los mismos, sugiriendo que no hubo coinfección (Figura 6) en el ensayo de coinoculación. Como se puede apreciar en la figura 6, no se observó el patrón de bandas correspondientes a *Frankia* BCU110501 (Figura 6, calles 1 y 4) en el material proveniente de nódulos de plantas coinoculadas (Figura 6, calles 3 y 6).

### Nodulación en *A. acuminata* y *D. trinervis* creciendo juntas

A partir de los resultados de la influencia de la cepa BCU110501 de *Frankia* en la nodulación de *Alnus acuminata* por Ar13 (Figuras 4 y 5) se decidió estudiar si la cepa no infectiva BCU110501 al ser activada en forma completa por los exudados radiculares de su planta hospedadora natural podría infectar la planta actinorrhiza heteróloga *Alnus acuminata*.

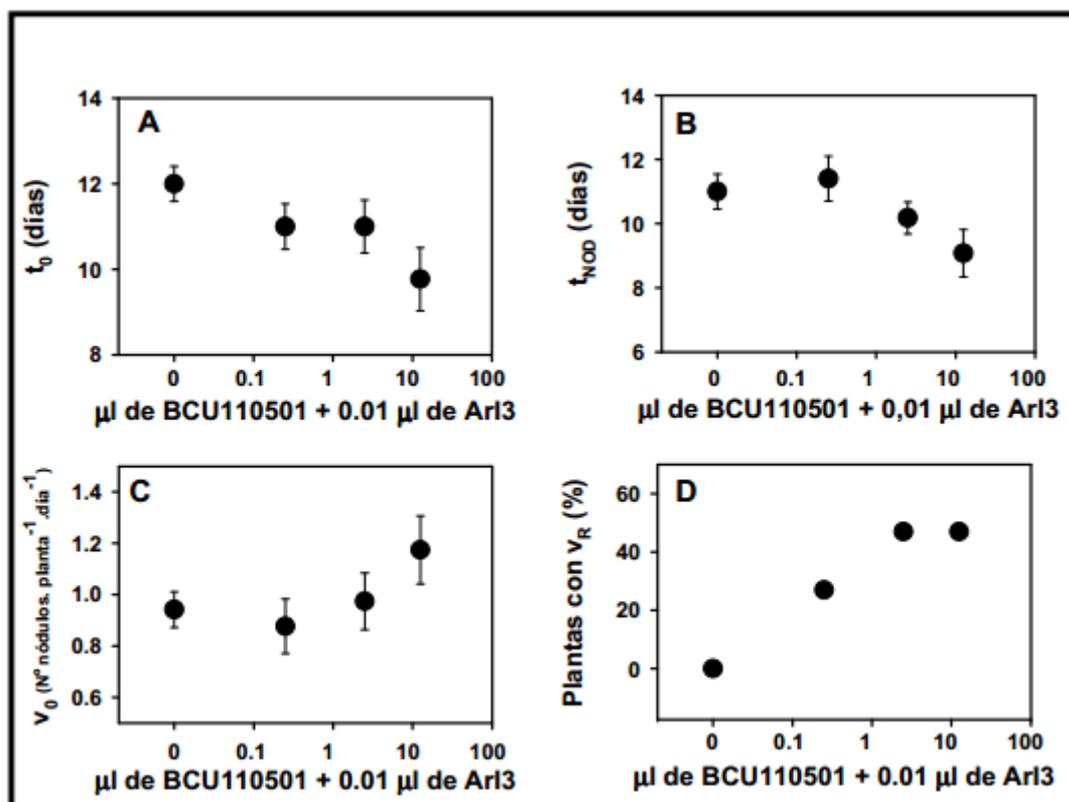


Figura 5. **Parámetros de nodulación en *Alnus acuminata* inoculada con *Frankia* Arl3 y diferentes dosis de *Frankia* BCU110501.** (A) Tiempo que transcurre desde la inoculación hasta la aparición del primer nódulo,  $t_0$ . (B) Tiempo de nodulación total,  $t_{NOD}$ . (C) Velocidad inicial de nodulación,  $v_0$ . (D) Porcentaje de plantas con velocidad de nodulación regulada,  $v_R$ . A excepción de (D) que son porcentajes, el resto de los valores son el promedio  $\pm$  SE para un  $n = 18-20$  plantas.

En un primer ensayo se busco activar BCU110501 por presencia directa de *D. trinervis* y se buscó activar las raíces de *Alnus acuminata* por FDs de Arl3, manteniendo a esta cepa separada físicamente de la raíz de su planta hospedadora por membrana de diálisis. Se inocularon plantas de *Alnus acuminata* y *Discaria trinervis* crecidas juntas con *Frankia* BCU110501 y *Frankia* Arl3 dentro de una membrana de diálisis para que no entre en contacto directo con las raíces, permitiendo solamente el flujo de moléculas de tamaño menor a 12 KDa. Este ensayo no dio nodulación en ninguna de las plantas de *A. acuminata*, si bien las plantas de *Discaria* nodularon correctamente.

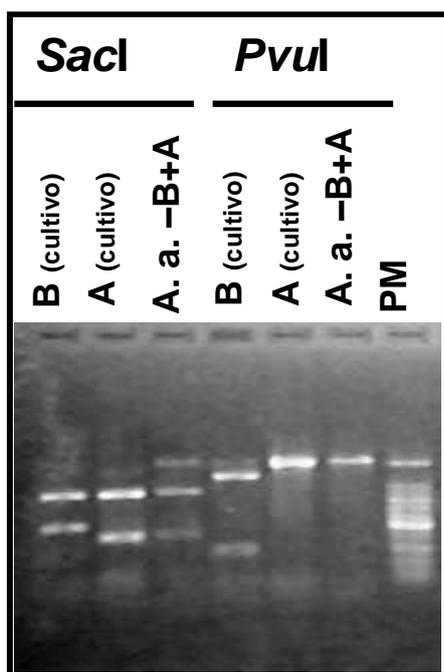
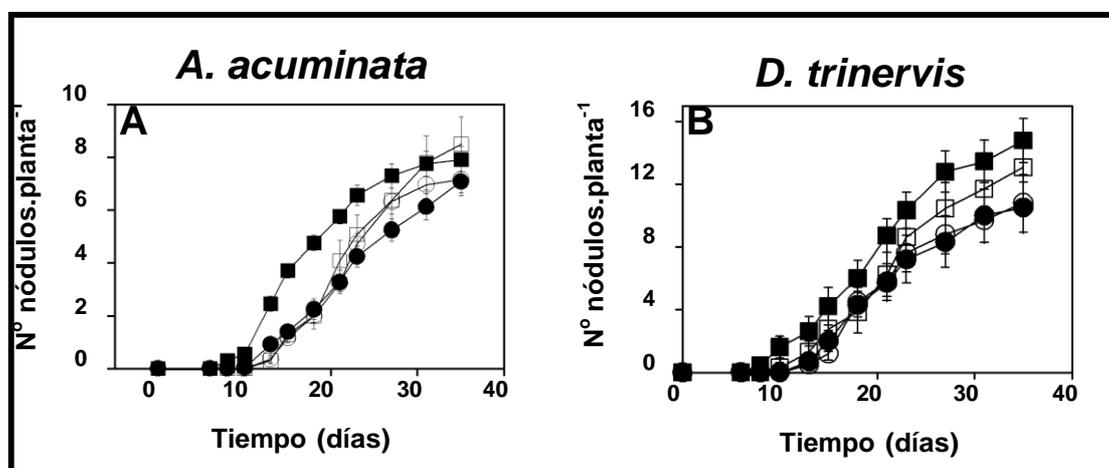


Figura 11. **Análisis de la longitud de los fragmentos de restricción del gen AR ribosomal 16S de *Frankia*.** Los amplicones generados con los cebadores P0 y P6 fueron digeridos con las enzimas de restricción *Sacl* y *Pvul*, fueron separados en agarosa (1 % p/v) y teñidos con bromuro de etidio. El ADN que se utilizó como molde fue extraído de: BCU110501 (B) (cultivo), Arl3 (A) (cultivo) y vesículas extraídas de nódulos de *A. acuminata* coinoculada con Arl3 y BCU110501. El tamaño de los marcadores (PM) es de 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 y 1500 pares de bases.

En una posterior oportunidad se eliminó la barrera entre Arl3 y *A. acuminata*, y se planteo la posibilidad de coinfección como evidencia de franqueamiento de la barrera de especificidad. Con este planteo, ambas especies vegetales fueron inoculadas con diferentes combinaciones de inóculos: i) BCU110501, ii) BCU110501 + Arl3, y iii) Arl3.

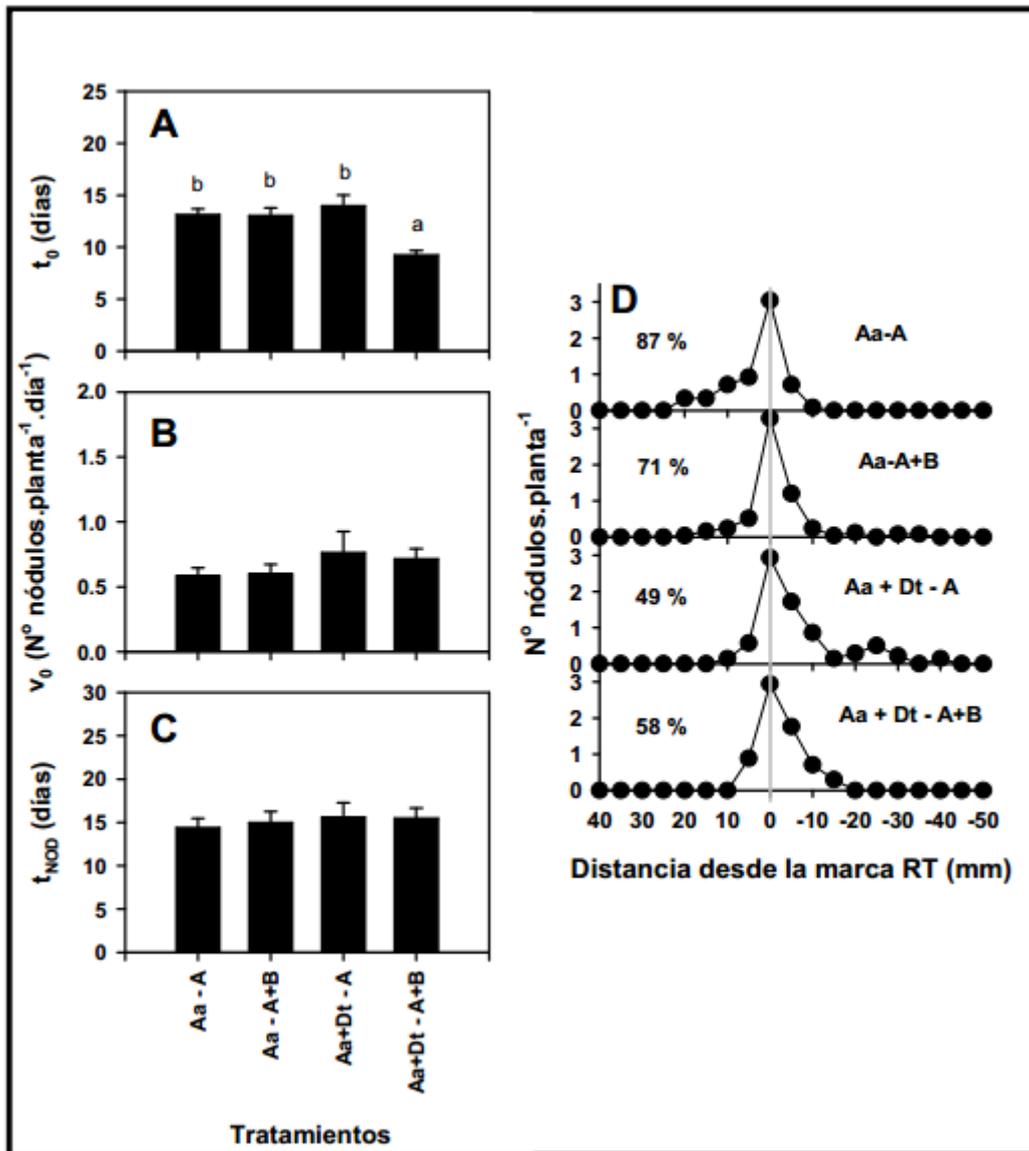
Este experimento fue repetido en ocasiones diferentes y en cada una de las repeticiones se probaron semillas de *Alnus acuminata* obtenidas de bosques distintos (San Javier y Los Toldos). Como era de esperar todas las plantas nodularon, y se analizó la cinética de nodulación en búsqueda de alguna señal de nueva interacción en el sistema. En un primer análisis de las cinéticas de nodulación de *Alnus acuminata* (bosque San Javier) se encontró que no hubo efecto por la sola adición, ya sea de *Frankia* BCU110501 como de la planta *Discaria trinervis* comparada al tratamiento control en el que *Alnus acuminata* solo fue inoculada con la cepa Arl3 de *Frankia* (Figura 7 A). Sin embargo, cuando ambos, *D. trinervis* y BCU110501 estuvieron presentes en el pouche además del par simbiótico *A. acuminata* – Arl3, se encontró una estimulación de la nodulación en las plantas de *Alnus* (Figura 7 A, cuadrados).

Un resultado similar y simétrico se encontró en la nodulación de las plantas de *D. trinervis* cuando el par simbiótico heterólogo compuesto por *A. acuminata* y Arl3 estuvo presente en el mismo pouche (Figura 7 B, cuadrados).



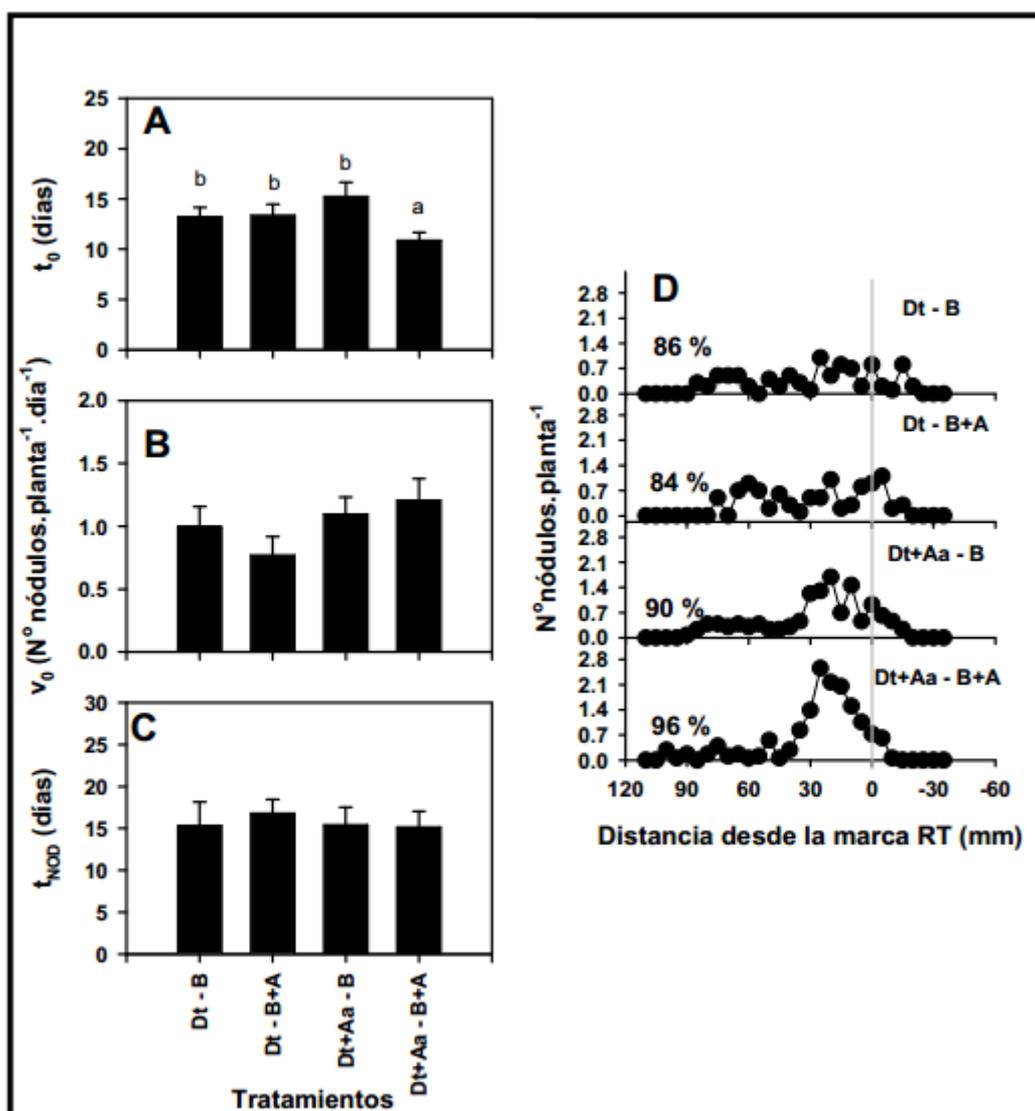
**Figura 7.** Cinéticas de nodulación en: (A) *Alnus acuminata* y (B) *Discaria trinervis* crecidas en forma individual (círculos) y conjunta (cuadrados) e inoculadas con una de las cepas (símbolo vacío) o con un inóculo mixto (símbolo lleno). El inóculo mixto consta de las cepas BCU110501 y Ar13 de *Frankia* y fue preparado como se explicó en la sección Materiales y métodos. En el caso de los tratamientos de inoculación simple ( $\circ$ ) y ( $\square$ ) en las cinéticas de *A. acuminata* (A) el inóculo fue *Frankia* Ar13, mientras que para las plantas de *D. trinervis* (B) fue *Frankia* BCU110501. Los valores son el promedio  $\pm$  SE para un  $n = 17-20$  plantas.

Se analizaron los parámetros de nodulación en ambos sistemas en forma individual y se compararon los promedios de cada tratamiento. De este análisis surgió que hubo una disminución estadísticamente significativa en el tiempo que transcurre desde la inoculación hasta la aparición del primer nódulo,  $t_0$ , en ambos sistemas ( $P < 0.00015$  y  $P < 0.085$  en *A. acuminata* y *D. trinervis* respectivamente) (Figuras 8 A y 9 A). Respecto de los demás parámetros de nodulación analizados ( $v_0$  y  $t_{NOD}$ ) no se observaron diferencias ni tendencias para ninguno de los tratamientos tanto en *Alnus* como en *Discaria* (Figuras 8 B, 8 C, 9 B y 9 C). Al analizar la distribución de nódulos a lo largo de la raíz, se encontró un claro cambio en el patrón de nodulación de *D. trinervis* (Figura 9 D) pero no en *A. acuminata* (Figura 8 D), cuando ambas plantas y ambas bacterias se encontraban presentes. Es destacable notar que cuando se cultivaron 8 plantas por pouche todas de la misma especie, *Discaria trinervis*, se observó un efecto parecido, es decir: una disminución en  $t_0$  y una nodulación en la zona más vieja de la raíz respecto del tratamiento que contaba con 4 plantas por pouche (Capítulo 2, figuras 5 B y 5 C).



**Figura 8. Parámetros de nodulación y distribución de nódulos a lo largo de la raíz de plantas de *Alnus acuminata*.** (A) Tiempo que transcurre desde la inoculación hasta la aparición del primer nódulo,  $t_0$ ; (B) Velocidad inicial de nodulación,  $v_0$ . (C) Tiempo total de nodulación,  $t_{NOD}$ . (D) Distribución de los nódulos a lo largo de la raíz. Aa, *Alnus acuminata*; Dt, *Discaria trinervis*; A, ArI3; B, BCU110501; Aa+Dt, *Alnus acuminata* y *Discaria trinervis* crecidas juntas en el mismo pouche; A+B, ArI3 y BCU110501 inoculadas en forma conjunta. Los valores de (A), (B) y (C) son el promedio  $\pm$  SE para un  $n = 17-20$  plantas. La posición de los nódulos con respecto a la marca RT se registró 38 días después de la inoculación. El perfil de nodulación a lo largo de la raíz se obtuvo para cada grupo de plantas como se describió en la sección Materiales y métodos. El crecimiento de la raíz es de izquierda a derecha y la línea gris muestra la

posición de la marca RT al momento de la inoculación. Los valores expresados como porcentaje de nódulos por encima de la marca RT se muestran dentro de cada gráfico a la izquierda.



**Figura 9. Parámetros de nodulación y distribución de nódulos a lo largo de la raíz de plantas de *Discaria trinervis*.** (A) Tiempo que transcurre desde la inoculación hasta la aparición del primer nódulo,  $t_0$ ; (B) velocidad inicial de nodulación,  $v_0$ ; (C) tiempo total de nodulación,  $t_{NOD}$ ; y (D) distribución de los nódulos a lo largo de la raíz. Dt, *Discaria trinervis*; Aa, *Alnus acuminata*; B, BCU110501; A, Arl3; Dt+Aa, *Discaria trinervis* y *Alnus acuminata* crecidas juntas en el mismo pouche; B+A, BCU110501 y Arl3 inoculadas en forma conjunta. Los valores de (A), (B) y (C) son el promedio  $\pm$  SE para un  $n = 17-20$  plantas. La posición de los nódulos con respecto a la marca RT se registró 38 días después de la inoculación. El perfil de nodulación a lo largo

de la raíz se obtuvo para cada grupo de plantas como se describió en la sección Materiales y métodos. El crecimiento de la raíz es de izquierda a derecha y la línea gris muestra la posición de la marca RT al momento de la inoculación. Los valores expresados como porcentaje de nódulos por encima de la marca RT se muestran dentro de cada gráfico a la izquierda.

Inesperadamente, las plántulas de *Alnus acuminata* germinadas a partir de semillas obtenidas en la localidad de Los Toldos, provincia de Salta, no desarrollaron nódulos después de ser inoculadas con *Frankia* Ar13, resultado corroborado por Roxana Enrico en otro trabajo de laboratorio (Enrico y Wall, no publicado). Sin embargo, se observó estimulación de la nodulación (Figura 10 A) y una disminución en el tiempo de nodulación inicial,  $t_0$  ( $P < 0.0015$ ) (Figure 10 B) de *Discaria trinervis* por *Frankia* BCU110501 que fue expresado solo cuando *Alnus acuminata* y *Frankia* Ar13 estuvieron presente en el mismo pouche del mismo modo que sucedió con la variedad del bosque La Banderita. Es preciso destacar que en subsecuentes ensayos se confirmó que las plántulas de *A. acuminata* de Los Toldos no desarrollan nódulos con *Frankia* Ar13, inclusive al inocularse con altas dosis, al menos en condiciones de invernáculo.

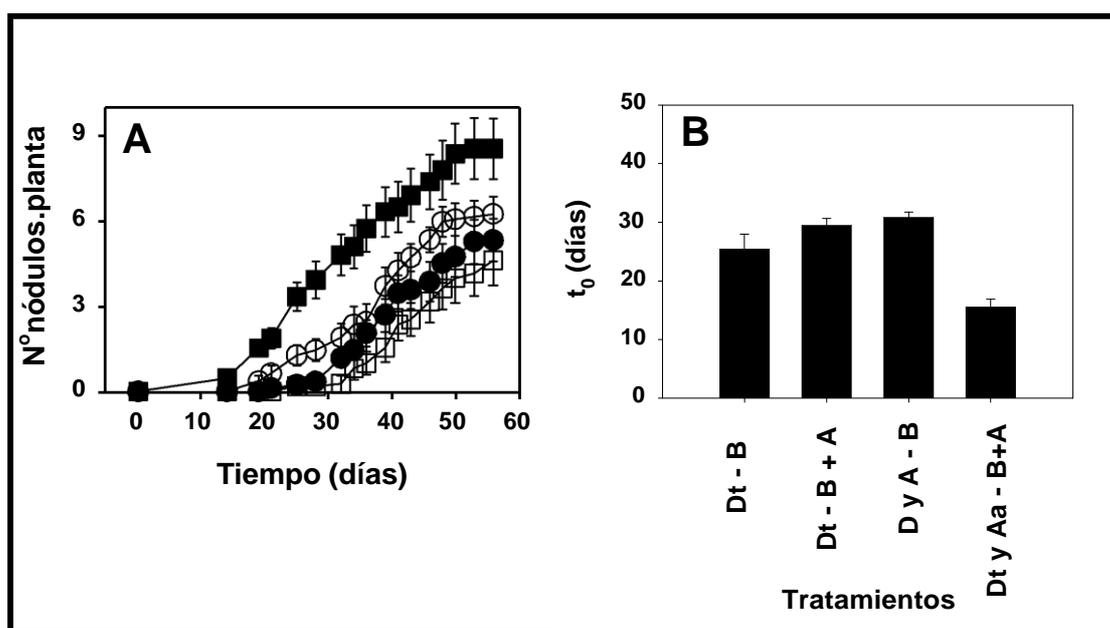
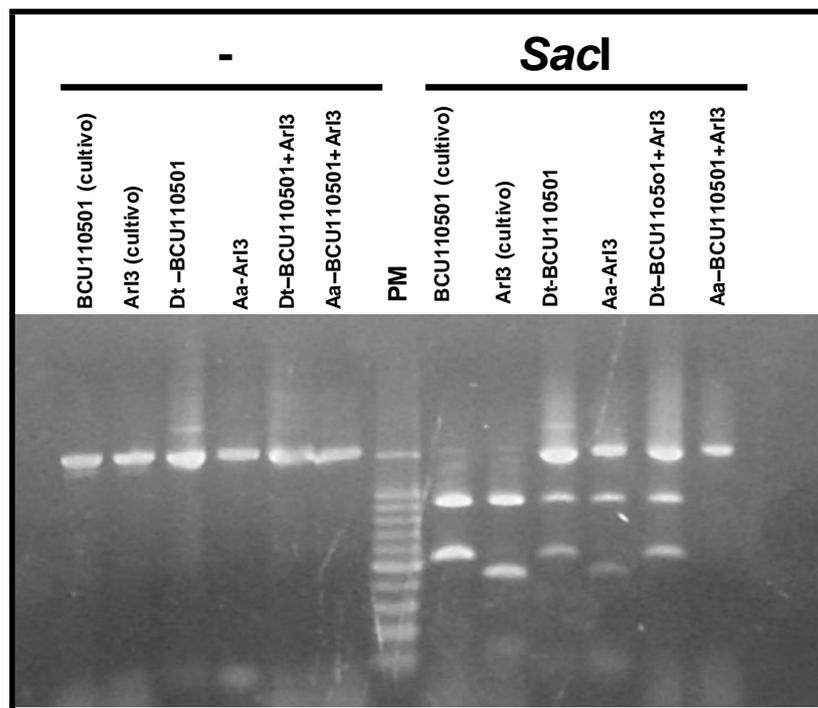


Figura 10. Nodulación en *Discaria trinervis* al ser crecida junto a *A. acuminata* proveniente de Los Toldos, Salta. (A) Cinéticas de nodulación de plantas de *D. trinervis* tratadas del siguiente modo: crecidas como única especie en el mismo pouche (círculos), crecidas junto a *A. acuminata* en el mismo pouche (cuadrados), inoculadas con *Frankia* BCU110501 (símbolos vacíos), e inoculadas con una

suspensión mixta formada por *Frankia* BCU110501 y *Frankia* Arl3 (símbolos negros). (B) Tiempo que transcurre desde el momento de la inoculación hasta la aparición del primer nódulo,  $t_0$ . Los valores son el promedio  $\pm$  SE para un  $n = 16-20$ .

### Análisis de la ocupación de los nódulos

Utilizando enzimas de restricción apropiadas, se puede distinguir cada cepa de *Frankia*, Arl3 o BCU110501, por su particular patrón de restricción del amplicón 16 S ADNr que se genera por PCR utilizando como cebadores a las secuencias P0 y P6 (Figura 11). La identificación de las cepas ocupantes por este método a partir de las vesículas extraídas de los nódulos de *Discaria trinervis* y *Alnus acuminata* coinoculadas con ambas cepas de *Frankia*, reveló, cuando se comparó con los controles generados a partir de cultivos puros de BCU110501 y Arl3, que solo una de las cepas se encontraba dentro de los nódulos (Figuras 6 y 11). La cepa BCU110501 fue la única bacteria encontrada en los nódulos de *D. trinervis* (Figura 11) y Arl3 fue la cepa encontrada en los nódulos de *A. acuminata* (Figura 6).



**Figura 11. Análisis de la longitud de los fragmentos de restricción del gen AR ribosomal 16S de *Frankia*.** Los amplicones generados con los cebadores P0 y P6 fueron digeridos con la enzima de restricción *SacI*, fueron separados en agarosa (1 % p/v) y teñidos con bromuro de etidio. El ADN que se utilizó como molde fue extraído de: BCU110501 (cultivo), ArI3 (cultivo), vesículas extraídas de nódulos de *D. trinervis* (Dt) inoculada con BCU110501, vesículas extraídas de nódulos de *A. acuminata* (Aa) inoculada con ArI3, vesículas extraídas de nódulos de *D. trinervis* coinoculadas con BCU110501 y ArI3, vesículas extraídas de nódulos de *A. acuminata* coinoculada con ArI3 y BCU110501. El tamaño de los marcadores (PM) es de 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 y 1500 pares de bases.

Llamativamente, cuando los nódulos fueron preservados a -20 °C durante 48 horas antes de la extracción de las vesículas, no se observó amplificación cuando el material provenía de materiales de *Alnus acuminata* (Figura 11). Por tal motivo se repitió el ensayo y se evitó congelar los nódulos, de esta manera la amplificación fue normal (Figura 12).

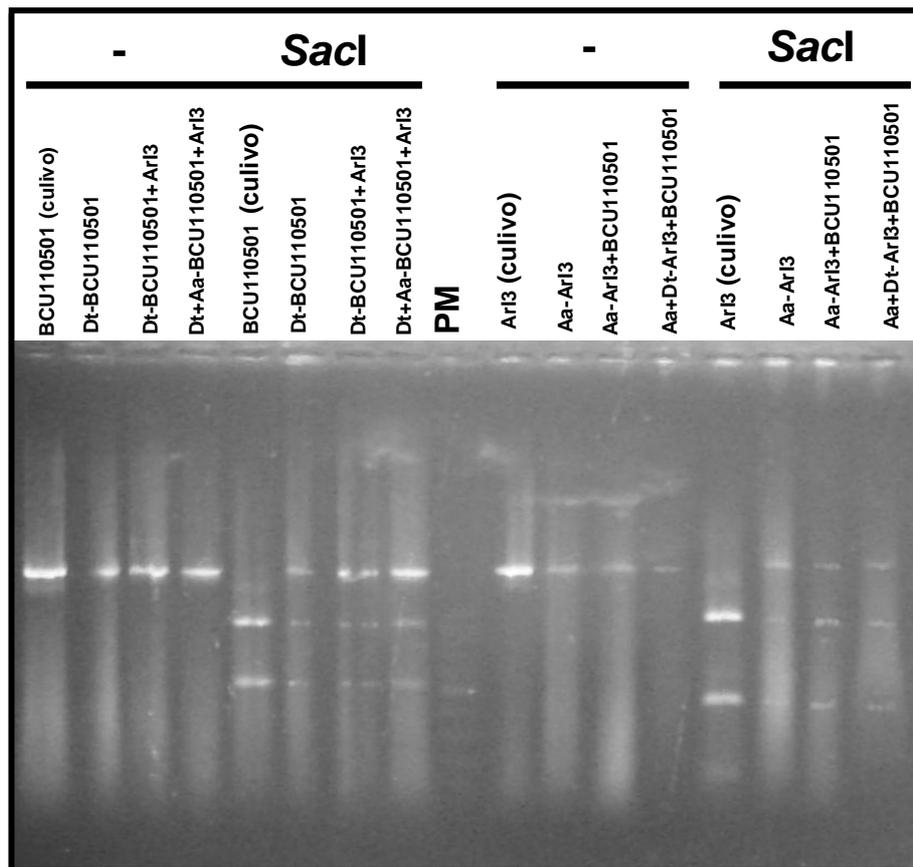
Al analizar la ocupación de los nódulos por el método de plantas trampa, se encontró que los nódulos macerados obtenidos de *Discaria trinervis*, ya sea creciendo como única especie o junto a *Alnus acuminata* e inoculada en forma mixta (*Frankia* BCU110501 + *Frankia* ArI3) o simple (*Frankia* BCU110501), solo desarrollaron nódulos las plantas de *D. trinervis* (Tabla 1). Por otra parte, cuando se analizaron los macerados de nódulos de *Alnus acuminata* se encontró nodulación solo en *A. acuminata*, aun cuando había sido crecida junto a *D. trinervis* e inoculada en forma singular con ArI3 o conjunta con la cepa *Frankia* BCU110501 (Tabla 1). Los mismos resultados en cuanto a ocupación de los nódulos se encontraron al analizar los nódulos de ambas especies en forma molecular (RFLP-PCR) (Figura 12).

Planta trampa	Plantas noduladas (%) utilizando macerado de nódulos como inóculo			
	<i>D. trinervis</i> inoculada con		<i>A. acuminata</i> inoculada con	
	BCU110501	BCU110501+ArI3	ArI3	ArI3+BCU110501
<i>D. trinervis</i>	100	100	0	0
<i>A. acuminata</i>	0	0	85	90

Tabla 1. Análisis de la ocupación de los nódulos de *Discaria trinervis* y *Alnus acuminata* crecidas en el mismo pouche. Los nódulos que se utilizaron para realizar el análisis surgen del experimento de las Figuras 6, 7 y 8.

#### 4.4 Discusión

Las interacciones entre los participantes de la simbiosis actinorrónica muy probablemente ocurren a través del intercambio de señales, incluyendo interacciones físicas en la superficie de las células radiculares y colonización del espacio intercelular. Todos los eventos mencionados pueden depender de un estado fisiológico de la bacteria regulado por la concentración local de bacterias y de la planta dado por el grado de desarrollo de la raíz. Esta hipótesis ha sido corroborada en la simbiosis entre rizobios y leguminosas, una simbiosis que también involucra la formación de nódulos, donde señales de la planta de tipo flavonoides activan la producción de Factores Nod lipoquitooligosacáridos de origen bacterianos, que actúan a su vez sobre la planta induciendo la infección y el desarrollo de los nódulos (Mulder y *col.* , 2005)



**Figura 12. Análisis de la longitud de los fragmentos de restricción del gen del AD r 16S de *Frankia*.** Los amplicones generados con los cebadores P0 y P6 fueron digeridos con la enzima de restricción *SacI*, fueron separados en agarosa (1 % p/v) y teñidos con bromuro de etidio. El ADN que se utilizó como molde fue extraído de: BCU110501 (cultivo); vesículas extraídas de nódulos de *D. trinervis* (Dt) inoculada con BCU110501; Arl3 (cultivo), vesículas extraídas de nódulos de *D. trinervis* (Dt) coinoculadas con BCU110501 y Arl3; vesículas extraídas de nódulos de *D. trinervis* (Dt) crecidas junto a *A. acuminata* (Aa) coinoculadas con BCU110501 y Arl3; Arl3 (cultivo); vesículas extraídas de nódulos de *A. acuminata* (Aa) inoculada con Arl3; vesículas extraídas de nódulos de *A. acuminata* (Aa) coinoculada con Arl3 y BCU110501; y vesículas extraídas de nódulos de *A. acuminata* (Aa) crecida junto a *D. trinervis* (Dt) coinoculadas con Arl3 y BCU110501. El tamaño de los marcadores (PM) es de 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 y 1500 pares de bases.

Teniendo en cuenta ensayos previos del grupo de investigación (Gabbarini y Wall, 2008; Valverde y Wall, 1999a; Wall y Huss-Danell, 1997) resultó inesperado no encontrar una clara respuesta en la nodulación respecto a la variación en la dosis del inóculo de Arl3. Solamente  $t_{NOD}$  fue claramente modificado pero no  $t_0$  y  $v_0$  que son parámetros que esperábamos se modificasen. Como se mostró en los resultados el parámetro  $t_{NOD}$  fue modificado consecuentemente con el aumento en la dosis de inóculo infectivo Arl3 sobre *A. acuminata* (Figura 3 D), mientras que el tiempo que transcurre desde el momento de la inoculación hasta la aparición del primer nódulo,  $t_0$  (Figura 3 B) y la velocidad inicial de nodulación,  $v_0$  (Figura 3 C) no fueron afectadas.

El hecho que no se haya encontrado en *Alnus acuminata* una respuesta entre los parámetros de nodulación respecto de la dosis y la concentración de Arl3 en la suspensión de inóculo (Figura 3) del mismo modo que el encontrados en la simbiosis *D. trinervis* – BCU110501 (capítulo 2 de esta tesis) puede tener al menos dos interpretaciones: que la diferencia esté dada por la vía de infección, del mismo modo que para cada vía de infección se encontró un mecanismo de regulación de la nodulación (Valverde y Wall, 1999a); o puede ser que el rango de concentraciones de Arl3 utilizados en este ensayo haya sido demasiado alto y las señales ya estaban en concentraciones saturantes con la suspensión más diluida de inóculo.

Los dos análisis de ocupación de los nódulos que se realizaron, molecular (RFLP-PCR) y utilizando macerado de nódulos como inóculo de plantas trampa, mostraron de manera concluyente que no hubo coocupación en plantas de *Alnus* cuando estas fueron inoculadas con una suspensión mixta compuesta por las cepas de *Frankia* Arl3 y BCU110501 (Figura 11). A pesar de que la cepa BCU110501 no ocupó los nódulos de *A. acuminata* provocó cambios en los parámetros de nodulación en *Alnus acuminata* al inocularse en forma conjunta con la cepa infectiva Arl3 (Figura 5), esto sugiere fuertemente que hay al menos una etapa en el establecimiento de la simbiosis que no requiere de una

total compatibilidad simbiótica y que puede ser determinante en muchos aspectos del progreso de la nodulación, ya que como vimos puede modificar el tiempo de nodulación total  $t_{\text{NOD}}$  (Figura 5 B), el tiempo de nodulación inicial  $t_0$  (Figura 5 A) y la velocidad inicial de nodulación  $v_0$  (Figura 5 C).

El resultado que muestra la estimulación temprana de la nodulación por una disminución del  $t_0$  y que después se corresponde con una disminución en el tiempo total de nodulación  $t_{\text{NOD}}$  cuando la dosis de *Frankia* BCU110501 creció respecto de Arl3 en la suspensión de inóculo (Figuras 4 y 5) sugiere que el mecanismo de autorregulación de la nodulación ha sido estimulado por la cepa BCU110501 induciendo el control de las infecciones en la raíz, sorpresivamente antes de que el nódulo se desarrolle. Este proceso usualmente tiene lugar en una etapa temprana de la interacción entre el microsimbionte y la planta, después de la penetración intracelular (Wall y Huss-Danell, 1997) pero antes de que comience la fijación de nitrógeno en el nódulo (Valverde y Wall, 1999b; Wall, 2000). Mediante este mecanismo las plantas controlan la nodulación final como biomasa respecto de la biomasa radicular, ya sea regulando el número de nódulos o el tamaño de los mismos. Teniendo en cuenta estas consideraciones y los resultados obtenidos parece altamente probable que *Frankia* BCU110501 fuese capaz de producir infección en *Alnus acuminata* y de poner en funcionamiento el mecanismo de autorregulación, pero estas infecciones seguramente no prosperan o son detenidas por la planta, seguramente debido a la falta de complementariedad, provocando que el número de nódulos finales desarrollados por la cepa Arl3 sea menor que en el tratamiento control, donde la suspensión de inóculo estaba compuesta solo por Arl3, cepa en la que no esperamos el aborto de infección o bloqueo en el desarrollo de la nodulación.

Por otro lado, en un experimento previo (Capítulo 2) se encontró un resultado diferente en *Discaria trinervis* inoculada con un cultivo mixto de *Frankia* compuesto por la cepa infectiva BCU110501 y la no infectiva Arl3. En este caso, la concentración creciente de la cepa heteróloga Arl3 estimuló la nodulación temprana pero también el número final de nódulos por planta fue mayor. Utilizando el mismo razonamiento que en el párrafo anterior se puede interpretar para los resultados del Capítulo 2 que *Frankia* Arl3 no fue capaz de iniciar la infección en *Discaria trinervis* y por tal motivo no se disparó prematuramente el mecanismo de autorregulación por parte de la planta. Estos efectos disímiles sobre los parámetros de nodulación de las dos especies actinorrhizas puede ser consecuencia de la diferente vía de infección que presentan cada una de ellas.

Con un objetivo completamente distinto, con el foco puesto en el desarrollo del nódulo y en la actividad de la enzima nitrogenasa, en un trabajo previo del laboratorio se encontró que la autorregulación de la nodulación es expresada de modo diferente de acuerdo a la vía de infección de la planta (Wall y col., 2003) lo que podría explicar la diferencia que se observa en este caso también.

Al considerar que *Frankia* BCU110501 induce respuestas de *Alnus* se sugiere que existe una especie de infección pero insuficiente para llegar al nódulo. Dado que BCU110501 es capaz de deformar los pelos radiculares del mismo modo que lo hace la cepa Arl3 (Gabbarini y Wall, 2001), surgió una pregunta: ¿Es posible que ocurra una complementación fisiológica de la cepa BCU110501 para inducir el desarrollo del nódulo o al menos, coinfectar o coocupar nódulos de *Alnus* cuando se inocula junto con la cepa Arl3?.

Para responder a esta pregunta se realizó un complejo diseño experimental en el cual se buscó activar a la cepa BCU110501 con su huésped natural *Discaria trinervis* pensando que de ese modo podría quedar activada para infectar las raíces de *Alnus acuminata*, que a su vez fue activada por los factores difusibles de la cepa infectiva Arl3 de *Frankia*. Plantas de *Discaria trinervis* y *Alnus acuminata* se crecieron juntas y se inocularon con *Frankia* BCU110501 más una bolsa de diálisis con una suspensión de Arl3 dentro, que se colocó sobre la raíz para establecer una barrera física entre esta cepa y las raíces. De este modo solo fue posible la interacción mediante moléculas de tamaño menor a 12 KDa. Bajo estas condiciones ninguna planta de *Alnus* desarrolló nódulos sugiriendo que no hubo suficiente activación o complementación de señales como para que la cepa no infectiva (BCU110501) produzca nódulos en una planta heteróloga (*A. acuminata*). Ante este resultado negativo se decidió quitar la separación física para que no hubiese ningún tipo de barrera y la interacción entre los pares simbióticos fuese óptima. Para ello se realizó un nuevo ensayo con ambas especies de plantas actinorrhizas creciendo juntas y se inoculó con una suspensión mixta de las cepas BCU110501 y Arl3 de *Frankia*. A pesar de una completa activación de los microsimbiontes debido a la interacción con los exudados radiculares de sus plantas huésped, no se encontró *Frankia* BCU110501 en los nódulos de *Alnus*, ni *Frankia* Arl3 en los nódulos de *Discaria*. Este resultado negativo sugiere que existiría una barrera de reconocimiento aún cuando la bacteria y la raíz heterólogas se encuentran activadas para la infección y la nodulación, sugiriendo que esta barrera sería de contacto. En otras palabras, es factible y probable que la cepa no infectiva logre interactuar con las células de la raíz, e inclusive comience con la colonización de la misma, pero fracase en lo sucesivo por falta de complementariedad fina entre los simbiosiontes, seguramente por señales celulares de membrana o componentes de interacción superficial que no permiten un correcto reconocimiento. En el caso del reconocimiento entre rizobios y leguminosas se pudo mostrar que una cepa mutante de *S. meliloti* en los genes nodF/nodL resulta deficiente para infectar y nodular en alfalfa debido a que los Factores Nod no presentan las modificaciones moleculares correctas. Las raíces inoculadas con estos mutantes no producen deformación de pelos radiculares, formación de hilo de infección ni de pre-infección (Ardourel y col., 1994; Timmers y col., 1999; Vernoud y col., 1999). No obstante al inocular raíces de alfalfa con la cepa mutante de *S. meliloti* junto con los Factores Nod

purificados de la cepa salvaje produjeron deformación de los pelos radiculares y división de las células corticales pero nódulos vacíos (Ardourel y col., 1994; Oldroyd y col., 2001; Vernoud y col., 1999; Wais y col., 2002). La incapacidad del mutante para inducir la formación del hilo de infección condujo a los autores a suponer que hay un sistema de reconocimiento del Factor Nod ligado a la bacteria con requerimientos aun más específicos hacia la estructura del Factor Nod (Wais y col., 2002).



Figura 13. Distribución geográfica de los árboles de *Alnus acuminata* utilizados en este trabajo. (A) Mapa político de Argentina que muestra las provincias de Salta y Tucumán (Región del Noroeste) donde se encuentran los *Alnus acuminata*. (B) Provincia de Salta, se marca en rojo la localidad de **Los Toldos**, una localidad situada en el extremo noroeste de la provincia de Salta, entre montañas y valles, en el límite con la República de Bolivia. Se halla en el borde oeste de las selvas de las Yungas en el punto exacto donde los bosques empiezan a fundirse a cada paso con los pastizales prepuneños, surge como una aparición el pueblo, a 1.800 metros sobre el nivel del mar. (C) Provincia de Tucumán. Se marca en rojo El **Cerro San Javier** que se encuentra a 25 km de la ciudad capital y tiene una altura máxima de 1876 metros sobre el nivel del mar. En azul se marca el mirador **La Banderita**, situado en la Cuesta del Clavillo, dista a 48 kilómetros de la ciudad de Concepción y alcanza los 1846 metros sobre el nivel del mar.

El hecho que aún sin llegar a desarrollar nodulación en *Alnus* (con semillas

provenientes de Los Toldos) se haya observado estimulación de la nodulación (Figura 9 A) y disminución en el tiempo de nodulación inicial  $t_0$  (Figura 9 B) en *Discaria trinervis* cuando ambas plantas y ambas bacterias se encontraban presentes en el mismo pouche sugiere que existió una etapa de reconocimiento entre Arl3 y las raíces de los plantines de Los Toldos, capaz de producir una señal difusible que afectó en trans, positivamente a la nodulación en *Discaria*. Sin embargo, el curioso resultado negativo en la nodulación de *Alnus acuminata* por Arl3 (proveniente de Los Toldos) (Figuras 13 A y B) sugiere que no hubo reconocimiento completo entre los simbiositos. Probablemente las semillas de Los Toldos correspondan a un ecotipo o variedad de *Alnus acuminata* que ha divergido en el reconocimiento de su microsimbionte, respecto de las plántulas generadas a partir de semillas colectadas en San Javier y La Banderita, dos sitios bastante más próximos entre sí (Figura 13), que si son capaces de nodular eficientemente con la cepa Arl3. Es importante remarcar que la cepa Arl3 no es un aislamiento de *Alnus acuminata* sino de *Alnus rubra* (Berry y Torrey, 1979) y es posible que las plantas que crecen en Los Toldos se hayan adaptado a las cepas locales y que hayan perdido o especializado su reconocimiento con *Frankia*. Sin embargo, la disminución en  $t_0$  que se observó en *D. trinervis* solo cuando ambas especies vegetales y ambas cepas de *Frankia* estaban presentes implica necesariamente existió un evento de reconocimiento entre *Alnus* (Los Toldos) y la cepa Arl3 de *Frankia* y que su interacción desencadenó la expresión de una señal capaz de intervenir en la relación simbiótica que establecen *Discaria trinervis* y la cepa BCU110501 de *Frankia*. Es muy probable que esta señal tenga un amplio rango de acción debido a que su efecto se puso en evidencia en *D. trinervis* y *A. acuminata*, dos especies con diferente vía de infección.

Es importante remarcar que el factor relacionado a  $t_0$  se libera después de establecida la correcta interacción entre la planta y la bacteria. Este factor podría actuar muy temprano y en forma cruzada sobre un par simbiótico heterólogo pero necesita una interacción simbiótica para expresarse (Figuras 7 y 8). Si bien es difícil especular acerca del significado de este factor difusible, con estos resultados la hipótesis de su existencia se sostiene aún más y quizás se relacione con cambios en los perfiles de exudación de flavonoides como fue encontrado en alfalfa luego de su interacción con *Sinorhizobium meliloti* (Hartwig y col., 1991).

#### 4.5 Referencias

- Ardourel, M., Demont, N., Debelle, F., Maillet, F., de Billy, F., Prome, J., Denarie, J., and Truchet, G. (1994): *Rhizobium meliloti* Lipooligosaccharide Nodulation Factors: Different Structural Requirements for Bacterial Entry into Target Root Hair Cells and Induction of Plant Symbiotic Developmental Responses. *Plant Cell* **6**, 1357-1374.

- Benoit, L., and Berry, A. (1997): Flavonoid-like compounds from seeds of red alder (*Alnus rubra*) influence host nodulation by *Frankia* (Actinomycetales). *Physiologia Plantarum* **99**, 588-593.
- Berry, A., and Torrey, J. G. (1979): Isolation and Characterization in vivo and in vitro of an actinomyceteous endophyte from *Alnus Rubra* Bong, pp. 69-83. In J. Gordon, C. Wheeler, and D. Perry (Eds): *Symbiotic Nitrogen Fixation in the Management of Temperate Forest*, Corvallis: Oregon State University, Forest research Laboratory.
- C eremonie, H., Debell e, F., and Fernandez, M. P. (1999): Structural and functional comparison of *Frankia* root hair deforming factor and rhizobia Nod factor. *Can. J. Bot.* **77**, 1293–1301.
- Chaia, E. (1998): Isolation of an effective strain of *Frankia* from nodules of *Discaria trinervis* (Rhamnaceae). *Plant and Soil* **205**, 99-102.
- Chaia, E. E., Valverde, C., and Wall, L. G. (2006): Local adaptation of *Frankia* to different *Discaria* (Rhamnaceae) host species growing in patagonia. *Curr Microbiol* **53**, 523-8.
- Gabbarini, L., and Wall, L. (2001): Early interaction in *Alnus acuminata*-*Frankia* symbiosis. More than one signal to control root hair deformation? 12th International Meeting on *Frankia* and Actinorhizal Plants.
- Gabbarini, L., and Wall, L. (2008): Analysis of nodulation kinetics in *Frankia*–*Discaria trinervis* symbiosis reveals different factors involved in the nodulation process. *Physiologia Plantarum* **133**, 776-785.
- Hartwig, U., Joseph, C., and Phillips, D. (1991): Flavonoids Released Naturally from Alfalfa Seeds Enhance Growth Rate of *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol* **95**, 797-803.
- Hirsch, A., Lum, M., and Downie, A. (2001): What Makes the Rhizobia-Legume Symbiosis So Special? *Plant Physiology* **127**, 1484-1492.
- Mulder, L., Hogg, B., Bersoult, A., and Cullimore, J. (2005): Integration of signalling pathways in the establishment of the legume-rhizobia symbiosis. *Physiologia Plantarum* **123**, 207-218.
- Murry, M., Fontaine, M., and Torrey, G. (1984): Growth kinetics and nitrogenase induction in *Frankia* sp. HFPAr1 3 grown in batch culture. *Plant and Soil* **78**, 61-78.
- Myrold, D., Hilger, A., Huss-Danell, K., and Martin, K. (1994): Use of molecular methods to enumerate *Frankia* in soil., pp. 127–136. In K. Ritz, J. Dighton, and K. Giller (Eds): *Beyond the biomass*, Chichester: Wiley - Sayce.
- Nittayajarn, A., and Baker, D. (1989): Methods for the quantification of *Frankia* cell biomass. *Plant and Soil* **118**, 199-204.
- Oldroyd, G., Mitra, R., Wais, R., and Long, S. (2001): Evidence for structurally specific negative feedback in the Nod factor signal transduction pathway *The Plant Journal*

**28**, 191-199.

- Spaink, H. P. (2000): Root Nodulation and Infection Factors Produced by Rhizobial Bacteria. *Annual Review of Microbiology* **54**, 257-288.
- Timmers, A., Auriac, M., and Truchet, G. (1999): Refined analysis of early symbiotic steps of the *Rhizobium-Medicago* interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. *Development*. **126**, 3617-3628.
- Valverde, C., Ferrari, A., and Wall, L. G. (2002): Phosphorus and the regulation of nodulation in the actinorhizal symbiosis between *Discaria trinervis* (Rhamnaceae) and *Frankia* BCU110501. *New Phytologist* **153**, 43-51.
- Valverde, C., and Wall, L. (1999a): Regulation of nodulation in *Discaria trinervis* (Rhamnaceae) - *Frankia* symbiosis. *Can. J. Bot.* **77**, 1302–1310.
- Valverde, C., and Wall, L. (2003): The regulation of nodulation, nitrogen fixation and ammonium assimilation under a carbohydrate shortage stress in the *Discaria trinervis-Frankia* symbiosis. *Plant and Soil* **254**, 155-165.
- Valverde, C., Wall, L., and Huss-Danell, K. (2000): Regulation of nodulation and nodule mass relative to nitrogenase activity and nitrogen demand in seedlings of *Discaria trinervis* (Rhamnaceae). *Symbiosis* **19**, 167-182.
- Valverde, C., and Wall, L. G. (1999b): Time course of nodule development in the *Discaria trinervis* (Rhamnaceae) –*Frankia* symbiosis. *New Phytologist* **141** 345-354.
- Van Ghelue, M., Løvaas, E., Ringø, E., and Solheim, B. (1997): Early interactions between *Alnus glutinosa* and *Frankia* strain Ar13. Production and specificity of root hair deformation factor(s). *Physiologia Plantarum* **99**, 579-587.
- Vernoud, V., Journet, E., and Barker, D. (1999): MtENOD20, a Nod Factor-Inducible Molecular Marker for Root Cortical Cell Activation. *Molecular Plant Microbe Interaction* **12**, 604-614.
- Wais, R., Keating, D., and Long, S. (2002): Structure-Function Analysis of Nod Factor-Induced Root Hair Calcium Spiking in Rhizobium-Legume Symbiosis. *Plant Physiol* **129**, 211-224.
- Wall, L., and Berry, A. (2008): Early Interactions, Infection and Nodulation in Actinorhizal Symbiosis, pp. 147-166. In K. Pawlowski, and W. Newton (Eds): *Nitrogen-fixing Actinorhizal Symbioses*, Springer, Dordrecht.
- Wall, L., Valverde, C., and Huss-Danell, K. (2003): Regulation of nodulation in the absence of N<sub>2</sub> is different in actinorhizal plants with different infection pathways. *J Exp Bot* **54**, 1253-8.
- Wall, L. G. (2000): The Actinorhizal Symbiosis. *J Plant Growth Regul* **19**, 167-182. Wall, L. G., and Huss-Danell, K. (1997): Regulation of nodulation in *Alnus incana-Frankia* symbiosis *Physiol Plant* **99**, 594–600.