

✓
Universidad de la República
FACULTAD DE AGRONOMIA



JUN. 1993

**NODULACION Y FIJACION DE
NITROGENO EN ESPECIES
DE *Casuarina* Y *Allocasuarina*
CULTIVADAS EN EL PAIS**

LILLIAN FRIONI - ALICIA SPINELLI - ADRIANA MAGGI

BOLETIN DE INVESTIGACION N° 30

MONTEVIDEO

1991

URUGUAY

~~FACULTAD DE AGRONOMIA~~
DEPARTAMENTO DE DOCUMENTACION Y BIBLIOTECA

El "Boletín de Investigación" es una publicación seriada que recoge los resultados de las investigaciones realizadas por el personal académico de la Facultad de Agronomía, una vez que ellos fueron revisados y aprobada su publicación por la Comisión de Publicaciones Científicas. Las solicitudes de adquisición y de intercambio con este Boletín debe dirigirse al Departamento de Documentación, Facultad de Agronomía, Garzón 780, Montevideo - URUGUAY.

Comisión de Publicaciones Científicas:

Martín Buxedas, Primavera Azaguirre, Carlos Bentancourt (docentes),
Pablo Fernández (estudiante),
Roberto Malfatti (profesional),
Alicia Torres (comunicadora rural),
Gustavo Uriarte (editor técnico).

Nodulación y fijación de nitrógeno en especies de *Casuarina* y *Allocasuarina* cultivadas en el país / Lilián Frioni, Alicia Spinelli y Adrián Maggi. -- Montevideo: Facultad de Agronomía, 1992. -- 20p. -- (Boletín de investigación; 30)

ALLOCASUARINA

CASUARINA

FIJACION DEL NITROGENO

NODULACION

Frioni, Lilián

Spinelli, Alicia, coaut.

Maggi, Adriana, coaut.

CDU 581.133.1

NODULACIÓN Y FIJACIÓN DE NITRÓGENO EN ESPECIES DE *Casuarina* Y *Allocasuarina* CULTIVADAS EN EL PAÍS

Lillian Frioni, Alicia Spinelli y Adriana Maggi*

RESUMEN

Las plantas actinorríticas son muy estudiadas en los últimos años por su capacidad de adaptación a zonas pobres, con suelos erosionados, salinos, o como fijadoras y recolonizadoras de dunas. Esta habilidad se debe en parte a la asociación que establecen con microorganismos del género *Frankia*. En el país se cultivan 4 especies de *Casuarina* y *Allocasuarina*: *C. equisetifolia*, *C. cunninghamiana*, *C. torulosa* y *A. stricta*.

En este trabajo se analizó la frecuencia de nodulación en diferentes localidades, se describió la morfología de los nódulos, se evaluó la actividad nitrogenasa de los mismos y se procuró el aislamiento de cepas nativas.

Se observó que tres de las cuatro especies presentaron nódulos en más del 60% de los ejemplares analizados. *C. torulosa* no presentó nodulación. Un alto porcentaje de la nodulación en las restantes especies se presentó en suelos bien drenados y en predios rellenos artificialmente. La actividad nitrogenásica de los nódulos evidenció mayor actividad en *A. stricta* (22,18 μ mol C₂H₄/g de nódulo seco/hora), mientras que los valores para *C. cunninghamiana* y *C. equisetifolia* fueron de 11,30 y 10,50 μ mol de etileno por gramo por hora. Los nódulos resultaron de gran tamaño, sobre todo en *A. stricta* (más de 12 cm de diámetro) y la morfología interna evidenció las estructuras típicas de estas asociaciones.

Se verificó inoculación cruzada en tres de las especies: *C. cunninghamiana*, *C. equisetifolia* y *A. stricta*, con macerado de nódulos de *C. cunninghamiana* y *A. stricta*. *C. torulosa* no noduló en ningún caso. Se logró aislar una cepa de *Frankia* a partir de nódulos de *A. stricta* que se incorporó a la colección de estas cepas con la designación de CFN 022301. Se analizaron sus características de crecimiento empleando diferentes parámetros: proteínas, absorción del INT, densidad óptica de cultivos homogeneizados, actividad nitrogenasa. Los tres primeros métodos mostraron buena correlación en la determinación de la biomasa. En la fase exponencial, en medio sin N se sintetizaron 2,35 μ g de proteínas por ml de medio y por día. El sistema de cultivo descripto permite un rápido desarrollo en un dispositivo sencillo.

Palabras Clave: *Casuarina*, *Allocasuarina*, fijación de Nitrógeno en árboles, Nodulación por *Frankia*.

Recibido el 16 de Julio de 1990

Aceptado el 24 de Setiembre de 1990

* Area Biología, Microbiología, Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay.

SUMMARY

Actinorrhizal plants have been extensively studied during the last years for their adaptive capacity in poor salty and/or eroded soils and as sand dune stabilizers. Associations with *Frankia* enable these species atmospheric N₂ fixation. *Casuarina cunninghamiana*, *C. equisetifolia*, *C. torulosa* and *Allocauarina stricta* are the four species grown as exotics in the country. Nodulation frequency in several regions, nodule morphology, nitrogenase activity and the isolation of native strains were studied.

More than 60% of the samples analysed for three of the four species were nodulated; all were taken from well-drained and poor soils.

The highest nitrogenase activity was measured in *A. stricta* (22,18 μ mol C₂H₄.g⁻¹ dry nodules per h⁻¹) using the biggest nodules (more than 12 cm diameter); the typical internal morphology described for this association was observed.

Cross-inoculation were performed to *C. cunninghamiana*, *C. equisetifolia* and *A. stricta* using macerated nodules from *C. cunninghamiana* and *A. stricta*. Nodulation was not observed on *C. torulosa* in either case. A *Frankia* strain was isolated from *A. stricta* nodules; this strain was given the designation CFNO22301. Growth characteristics of this strain were studied through the determination of several parameters, viz. biomass characterization by enzymatic protein, INT absorption, optical density of homogenized cultures and nitrogenase activity. The first three methods yielded values highly correlated to biomass determinations. During the exponential phase 2,35 mg of protein per ml culture medium per day were synthesized on N-free medium. The system developed seems to be useful for the culture of this filamentous actinomycete in a very simple device.

Key Words: *Casuarina*, *Allocauarina*, Nitrogen fixation in trees, Nodulation by *Frankia*.

INTRODUCCION

Casuarina es una dicotiledónea leñosa con cerca de 90 especies de árboles y arbustos. Especies de este género y del muy relacionado, *Allocasuarina* son extensamente cultivadas en áreas tropicales, sub-tropicales y templadas del mundo para múltiples usos, como leña, barrera contra el viento, mejoradoras de suelos o estabilizadoras de dunas (Innov. in Trop. Reforest. 1984). Algunas especies poseen la capacidad de tolerar suelos áridos, erosionados, debido en parte, al aporte de la fijación del nitrógeno por nódulos radicales que forman con un actinomicete del género *Frankia* (Torrey, Racette, 1989). Esta capacidad brinda a estos árboles un uso potencial muy importante en agroforestación, en la producción de madera y en la recuperación de suelos pobres. En condiciones favorables, los nódulos de *Casuarina* son capaces de fijar N_2 en rangos comparables a los de las leguminosas noduladas eficientemente (Torrey, 1978). En ensayos para estimar la fijación de N_2 en estas especies, se estimaron rangos entre 40-60 kg N/ha/año (Dommergues, 1963; Gauthier et al, 1985; Sougoufara et al, 1989). Reddell et al, (1988) señalan incrementos en producción de madera, en tres localidades, del orden de 50 al 70% en relación al tratamiento no inoculado.

El aislamiento del organismo responsable de la fijación del N_2 fue descrito por Diem et al, en 1982. Antes, se empleaban macerados de nódulos para inocular las plántulas, en general, las semillas de *Casuarina* no llevan en su superficie hifas o esporas de *Frankia*, que aseguren la formación de nódulos, de modo que la inoculación es práctica corriente sobre todo al inicio de plantaciones en suelos sin historia previa de plantas actinorríticas.

En la selección de cepas, además de las dificultades que ofrece el aislamiento en cultivo puro, se agrega el hecho de que a veces, cepas de *Frankia* altamente efectivas en la fijación del N_2 en una especie, resultan frecuentemente inefectivas en otras (Reddell y Bowen, 1986). El éxito del establecimiento de plántulas en el campo depende de la presencia de cepas infectivas y altamente efectivas (Rosbrook y Bowen, 1987).

Los objetivos de este trabajo fueron:

- * Relevamiento de la capacidad de nodulación en especies de *Casuarina* y *Allocasuarina* en distintas zonas del país.
- * Descripción macro y microscópica de los nódulos.
- * Determinación de la actividad nitrogenásica de los nódulos.
- * Ensayos de inoculación cruzada.
- * Aislamiento de cepas nativas de *Frankia*.
- * Determinación de sus características de crecimiento empleando distintos parámetros de evaluación de la biomasa (proteínas, densidad óptica) y de actividades metabólicas (coloración con INT, nitrogenasa).

MATERIALES Y METODOS

Relevamiento de la nodulación en *Casuarina* y *Allocasuarina*

Se realizaron giras de observación y colección en diferentes zonas del país que figuran en el cuadro 1.

CUADRO Nº 1
Zonas de recolección

- 1 11 sitios en Montevideo
 - 2 Balnearios de Canelones
 - 3 Canelones, R 7, Km 26
 - 4 Maldonado (Arboretum Lussich)
 - 5 San José, R 1, Km 22
 - 6 Cerro Largo, Estación Experimental Bañados de Medina (Facultad de Agronomía)
 - 7 Cerro Largo, R8, Km 388
 - 8 Tacuarembó, R 26, Km 345
 - 9 Salto, Estación Experimental San Antonio (Facultad de Agronomía)
-

Se exploró el sistema radical de los árboles en un círculo de 1 metro alrededor del tronco. Los nódulos se trasladaron al laboratorio para su estudio, confeccionándose una ficha con los datos más relevantes (Stowes, 1987).

Descripción macro y microscópica de los nódulos

La observación macroscópica se efectuó a simple vista o con ayuda de lupa de 10 aumentos. Los cortes de lóbulos se efectuaron luego de su acondicionamiento y posterior inclusión en parafina, según técnica de Johansen (1940). Las coloraciones fueron con safranina y fast green. El montaje se efectuó en bálsamo de Canadá.

Actividad nitrogenásica de nódulos

Los nódulos frescos se limpiaron, quitándoles las partes muertas, restos de raíces y de suelo y se lavaron con agua corriente. Una alícuota de unos 4 g se trasladó a tubos de ensayo grandes (2,5 x 20 cm) con tapón hermético de goma. Se reemplazó un 10% del aire por acetileno y se incubó por períodos de hasta 1 hora. Se evaluó el etileno formado en cromatografía en fase gaseosa, frente a patrones (Turner y Gibson, 1980). Los resultados se expresaron en μ mol de C_2H_4 /g nódulos secos / hora. Los nódulos se secaron a 65 °C por 24 horas.

Inoculación cruzada con macerados de nódulos

Se trabajó en tubos de 20 x 3 cm con solución mineral de Crone (Lalonde y Calvert, 1979) agarizada con 15 g/l e inclinados. Se sembraron 2 plántulas portubo, germinadas luego de desinfección superficial de las semillas con HgCl₂ al 2% y repetidos lavados en agua destilada estéril (Vincent, 1975). A las 3 semanas las plántulas fueron fertilizadas con KNO₃ (70 ppm N concentración final) 1 o bien inoculadas con 1 ml de macerado de nódulo. Este se obtuvo a partir de unos 15 gramos de nódulo fresco desinfectado superficialmente con hipoclorito de sodio comercial al 20% en 100 ml de agua estéril. El líquido se filtró y enrasó a 100 ml. Se trabajó con nódulos de *C. cunninghamiana* y *A. stricta* frente a las cuatro especies de *Casuarina* y *Allocasuarina* (10 repeticiones por tratamiento). El ensayo se mantuvo en solarío con 14 horas de fotoperíodo hasta aparición de nódulos.

Aislamiento de Frankia

Bajo microscopio estereoscópico se procedió a retirar la gruesa cutícula de los lóbulos, con ayuda de agujas hipodérmicas. La desinfección se efectuó con OsO₄ al

3%, durante 3 minutos, bajo campana de gases. (Gauthier et al, 1984a). Luego de repetidos lavados con agua estéril los lóbulos se cortaron en trozos pequeños en caja de Petri vacía. Luego de enjuagarlos, los trocitos se colocaron en el fondo de cajas de Petri y se recubrieron con los medios de cultivo empleados, en sobrefusión. Se efectuaron entre 30 y 40 cajas para cada especie. Las cajas se sellaron con Parafilm y se incubaron a 28 °C. Se descartaron las cajas contaminadas con hongos y bacterias. En los primeros días se descartaron más del 50% de las cajas.

Bajo lupa se aprecia el desarrollo de colonias típicas, con hifas radiales desde el trozo de nódulo, muy finas, de estructura procariota.

Los medios de cultivo empleados fueron dos (Murry et al, 1984).

BAP: (g/l) SO₄Mg 7H₂O 0,05; CaCl₂ 2H₂O 0,01; propionato de Na 0,48; FeNaEDTA 0,01; sol. oligoelementos 1 ml; vit BAP 1 ml; Tampón BAP 10 ml; pH 6,7-6,8 Con fuente de N: NH₄Cl 0,267 g/l.

(sol oligoelementos: H₃BO₃ 2,86 g/l; MnCl₂ 4 H₂O 1,81; ZnSO₄ 5H₂O 0,08; Na₂MoO₄ 2 H₂O 0,025; CoSO₄ 7 H₂O 0,001); vit BAP: en 100 ml; ácido nicotínico 5 mg; piridoxina 5 mg; biotina 2,25 mg; ácido fólico 1 mg; pantotenato de Ca 1 mg. Tampón BAP: KH₂PO₄ y K₂HPO₄ 10 µM, pH 6,7).

QMOD: Extracto de levadura 0,5 g; bactopectona 5,0 g; glucosa 10,0; MgSO₄ 7 H₂O 0,2; KCl 0,2; lecitina 5,0 g; FeNa EDTA 0,01; Tampón fosfato 10 ml.

Tampón: K₂HPO₄ 0,3 g/l y NaH₂PO₄ 0,26 g/l.

Las colonias logradas en las cajas se repicaron a medio líquido y se observaron las estructuras típicas: hifas septadas, esporangios y vesículas.

Curva de crecimiento de la cepa Frankia CFN 022301

La cepa se cultivó en fermentador de 10 litros con 3 litros de medio BAP-N, empleando como inóculo un cultivo fresco de 5 días desarrollado en 300 ml de medio, centrifugado, lavado y poderizado (1 mg proteína por litro de medio). La incubación se realizó a 28 °C, con agitación suave. Se tomaron muestras periódicas, de unos 15 ml, con ayuda de bomba peristáltica, bajo flujo laminar (3 repeticiones). Las muestras se centrifugaron a 1.000 rpm durante 15 minutos y se lavaron en agua destilada estéril. El cultivo (50 ml) se homogeneizó en Potter durante 30 segundos, en posición 5 (Modelo S 63C Tri-R stirr de 1/15 HP). Las determinaciones efectuadas fueron:

Proteínas: Se empleó la técnica preconizada por Pin et al (1988), adaptación de la de Bradford (Murry et al, 1984) ligeramente modificada: la muestra es sonificada a frecuencia constante 1 minuto y la hidrólisis alcalina se mantuvo por 20 minutos a BM a 90-95 °C.

Coloración con INT Prin et al (1988) desarrollaron la técnica de determinación de la viabilidad por la absorción de una sal de tetrazolium, el CI (2-<4 - iodo fenil < 3 < 4 - nitro fenil > 5 feniltetrazolium (INT). En la respiración, las células reducen la sal soluble e incolora al estado oxidado, en cristales insolubles de INTFormazán (INTF) que se acumula en las células. Los resultados se expresan en μM INTF/ml.

Densidad óptica de cultivos homogeneizados. Se determinó en suspensiones potarizadas a 600 nm (Koch, 1981).

Actividad nitrogenasa. Por cada muestra se inocularon 3 frascos de tipo antibiótico de 15 ml con 5 ml de medio BAP-N, con el equivalente de 1 μg de proteína/ml de cultivo, en cada punto de la curva analizado. La actividad nitrogenasa fue máxima entre los 4 y 5 días de incubación.

RESULTADOS Y DISCUSION

Nodulación y fijación de N₂

El cuadro 2 presenta la distribución de la capacidad de nodulación en función de las especies de *Casuarina* y *Allocasuarina* estudiadas.

CUADRO N° 2
Nodulación en *Casuarina* y *Allocasuarina*

Especies	N° estudiados	N° nodulados	% árboles nodulados
<i>C. cunninghamiana</i>	95	64	67
<i>A. stricta</i>	17	11	65
<i>C. torulosa</i>	20	0	0
<i>C. equisetifolia</i>	5	3	60
Total	137	78	60

C. cunninghamiana se encuentra ampliamente distribuida en el país, empleándose como cortina de abrigo y como ornamental. Por este hecho el número de ejemplares analizados fue superior a las otras especies. *A. stricta* es de más reciente empleo como ornamental, encontrándose sobre todo ejemplares jóvenes (6-7 años), en la zona sur, como ornato de la ciudad de Montevideo (Foto 1). De *C. equisetifolia* existen pocos ejemplares, sobre todo ubicados en el Jardín Botánico y zona costera. *C. torulosa* está sólo cultivada en el Arboretum Lussich, en Maldonado.



FOTO 1: *Allocasuarina stricta*

De los datos del cuadro 2 se aprecia que el 69% de los árboles muestreados correspondieron a *C. cunninghamiana* y sólo el 3,6% a *C. equisetifolia*. El porcentaje de árboles nodulados estuvo comprendido entre el 60 y el 67% de las muestras analizadas. Este dato resulta revelador, ya que Gauthier et al (1984 b) señalan que menos del 30% de las Casuarinas nativas de Australia, presentaban nódulos. Datos que concuerdan con los de Bond (1976). Este hecho podría deberse a una abundante distribución del endofito en nuestros suelos, aportado tal vez por plántulas llegadas del extranjero a principios de siglo.

Descripción macroscópica de los nódulos

En las tres especies noduladas, los nódulos se concentraron en general, en un círculo de 1 metro de diámetro con el tronco como centro y a no más de 20 cm de profundidad. Se los encontró aislados o formando grandes masas con nódulos secos y frescos entrelazados por abundantes raíces. Este tapiz cubrió en muchos casos, amplias superficies alrededor del tronco. Los nódulos de las tres especies estudiadas son de tipo rizotamnio, compuesto por numerosas formaciones lobulares, cada una de las cuales es una raíz lateral ramificada (Foto 2). En la parte superior o ápice de cada lóbulo se originan 4 o 5 ramificaciones que terminan en pequeñas raíces. Este tipo de crecimiento se repite sucesivamente hasta formar un nódulo de aspecto coraloide omado de numerosas raicillas. El ápice de los lóbulos corresponde a la parte activa y se presenta de color más claro que el conjunto. (Foto 3).



FOTO 2: Formación de nódulos, observándose lóbulos y raíces laterales que son posteriormente infectadas, dando el aspecto coraloide típico.



FOTO 3: Mayor detalle de la estructura lobular de los nódulos.

Ningún ejemplar de *C. torulosa* se presentó nodulado, pero es necesario tener en cuenta que los 22 ejemplares analizados provenían del mismo lugar y podría atribuirse a la presencia de algún inhibidor de *Frankia* en ese suelo.

En la experiencia se pudo apreciar que los suelos pesados, mal drenados, parecen inhibir la nodulación.

Actividad nitrogenásica

El cuadro 3 presenta la evaluación de la actividad nitrogenásica de los nódulos.

CUADRO Nº 3

Evaluación de la actividad nitrogenásica en nódulos.
(Media de tres repeticiones)
(μ mol de C_2H_4 /g. nódulo seco/hora)

	<i>A. stricta</i>	<i>C. cunninghamiana</i>	<i>C. equisetifolia</i>
muestra 1	25,64	8,01	12,05
muestra 2	24,62	13,35	10,25
muestra 3	16,27	12,53	9,45
Media 3 árboles	22,18	11,30	10,58

Se apreció una mayor actividad de la enzima responsable de la fijación del nitrógeno en *A. stricta* en relación a las otras dos especies noduladas. Si bien se reconoce el valor relativo de esta medición, su aplicación nos permite detectar rápidamente nódulos activos y comparar la actividad fijadora potencial de numerosas muestras en forma sencilla y rápida.

Descripción microscópica de nódulos.

La foto 4 presenta un corte transversal de nódulos de *A. stricta* en donde se aprecia de afuera hacia adentro, una capa de células suberificadas, ricas en taninos (d). Interiormente se aprecia la corteza con dos tipos de células: las hipertrofiadas, con el endofito (a), y otras más pequeñas, libres del microorganismo, con granos de almidón, cristales y taninos. Se aprecian grandes espacios intercelulares. El cilindro vascular (b) está rodeado por la endodermis y recorre los lóbulos por su eje (concéntrico).

Inoculación cruzada entre especies

El cuadro 4 presenta los resultados del ensayo de inoculación de las 4 especies estudiadas con macerados de nódulos de las tres especies que presentaron nodulación.

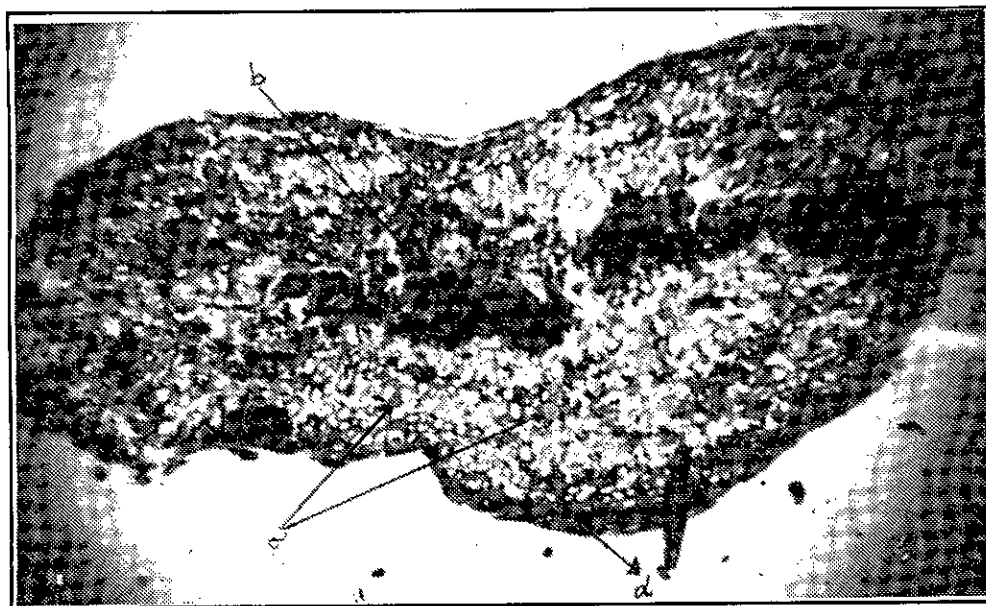


FOTO 4: Corte transversal de nódulo de *Allocasuarina stricta*

- a) células hipertrofiadas con el endofito
- b) cilindro vascular
- c) capa de células suberificadas, ricas en taninos

CUADRO Nº 4
Ensayo de inoculación

Inóculo	<i>C. cunninghamiana</i>	<i>A. stricta</i>	<i>C. equisetifolia</i>	<i>C. torulosa</i>
<i>C. cunninghamiana</i>	+++	+	++	-
<i>A. stricta</i>	++	+++	+++	-

+++	50% de los tubos nodulados	+	menos del 35% de los tubos nodulados
++	25 y 50% de los tubos nodulados	-	sin nodulación

Se aprecia que *C. torulosa* no noduló con inóculo proveniente de las dos especies estudiadas, mientras que los tres restantes nodularon con los macerados de *C. cunninghamiana* y *A. stricta*. Las cepas contenidas en nuestros suelos aparentan ser infectivas. De aquí que su aislamiento resulta de interés a los efectos de evaluar además, su eficiencia en la fijación del N_2 y su capacidad para infectar otras especies de no leguminosas actinorríticas (Guathier et al, 1984a).

Aislamiento de cepas nativas de *Frankia*

Luego de numerosos intentos fallidos, se logró aislar una cepa de *Frankia* a partir de nódulos de *A. stricta* cultivada en la zona de Carrasco (Montevideo). La misma ingresó a la colección del BSSFT de Nogent sur Mame (Francia) con la denominación CFN 022301 (CNF: colección de *Frankia* en Nogent, 02: Allocasuarina, 23: stricta y 01: primera cepa) e integra un ensayo de especificidad de *Casuarina* y *Allocasuarina*, en el campo.

El aislamiento se produjo en medio BAP a partir de colonias formadas alrededor de trozos de lóbulos (Foto 5), luego de 3 semanas de incubación. Las colonias exhibieron protuberancia cónica central, con hifas, esporangios y vesículas, mientras que radialmente crecían las hifas con menos esporangios y esporas.

En la foto 6 se aprecia la morfología típica de este organismo, desarrollado en medio líquido con hifas procariotas septadas, grandes esporangios con esporas polihédricas y vesículas septadas, similares a las descriptas por Diem et al (1982).

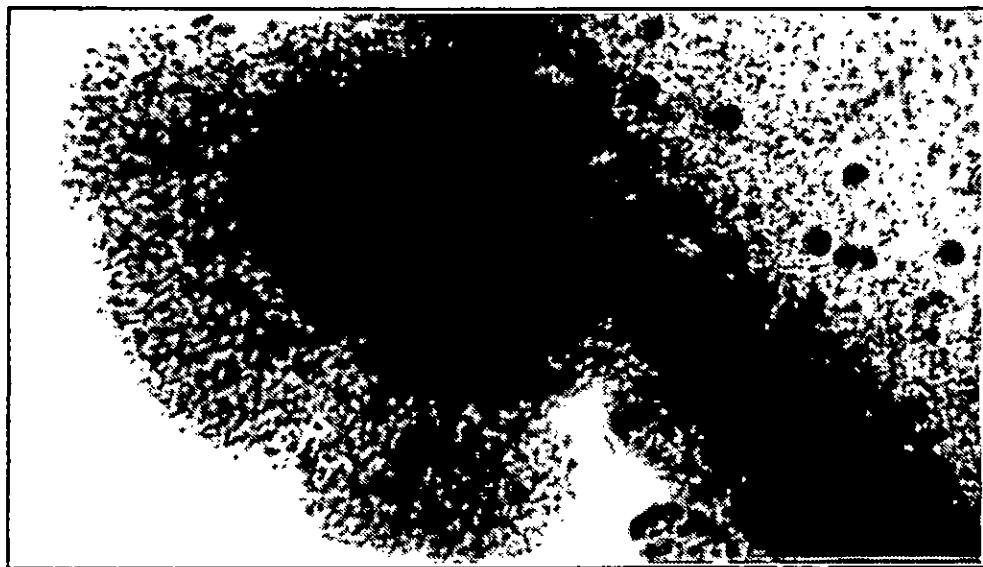


FOTO 5: Inicio de una colonia de *Frankia*, a partir de lóbulos desinfectados superficialmente.

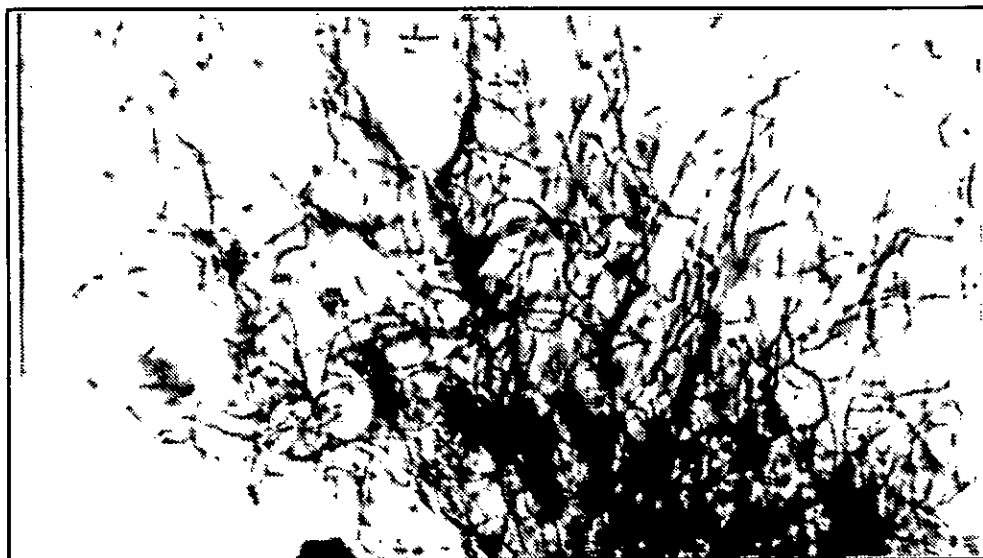


FOTO 6: Cultivo puro de *Frankia* CFN022301, aislada de nódulos de *Allocasuarina stricta*, apreciándose las hifas, esporangios y vesículas.

En medio líquido, este organismo filamentoso no produce turbidez y las colonias son pequeñas, elipsoidales de 0,5 a 1,0 micras de diámetro y 0,2 mm de espesor. No se disgregan al agitar, sino que por el contrario, flocculan formando agrupamientos de colonias.

Las hifas se ven ramificadas, septadas, de diámetro 0,5 a 1,0 micras y cuando envejecen, se hacen más gruesas. Los esporangios se observan en general, en el extremo de las hifas, pero pueden aparecer intercalados. Se apreció abundante producción de vesículas, reconocidas como los sitios de activa fijación de nitrógeno (Meesters et al, 1987).

Curva de crecimiento de *Frankia* CFN 022301.

El cuadro 5 presenta los resultados en la evaluación de la curva de crecimiento de esta cepa mediante diferentes parámetros.

CUADRO N° 5
Crecimiento de *Frankia* CFN 022301

días	Proteínas µg/ml	INTF nM/ml	D óptica 600 nm	N2asa nMC2H4/ml/4 días
0	1	2,90	ND	ND
3	3,12	5,00	ND	22,33
5	5,00	10,61	ND	32,04
7	6,87	12,11	0,026	98,02
10	17,50	23,22	0,083	137,15
12	23,33	34,22	0,151	152,22
17	35,62	39,16	0,224	212,80

ND - No determinado

Los coeficientes de correlación (r^2) entre los distintos métodos empleados fueron:

proteínas/INT	0,96
Proteínas/Dóp	0,94
INT/Dóp	0,92
Proteínas/N ₂ asa	0,32
INT/N ₂ asa	0,27
Dop/N ₂ asa	0,37

Se observó un incremento progresivo en el contenido de proteínas y en la determinación del INTF formado, luego de una corta fase de latencia. Entre los 5 y los 7 días se apreció un aumento rápido de la actividad nitrogenasa, coincidente con una masiva formación de vesículas en el medio (Foto 6). El desarrollo prosiguió durante los 17 días de la experiencia, obteniéndose cerca de 40 microgramos de proteína por mililitro de medio, lo que equivaldría a una síntesis de 2,35 μ g de proteínas por ml de medio al día, en fase exponencial de crecimiento.

Se aprecia una estrecha correlación entre el contenido de proteínas, la densidad óptica y la toma del colorante INT por el cultivo. Este último método posee la ventaja de su rapidez y sencillez de aplicación. Nittayajam y Baker (1989) en estudio de cuantificación de biomasa en *Frankia*, concluyeron que los métodos más adecuados son los basados en la determinación de proteínas, volumen celular empaquetado (PCV) y turbidimetría de suspensiones homogeneizadas. La determinación de proteínas totales continúa siendo el método más sensible y por lo tanto aplicable en determinaciones precisas, aunque conlleva a la destrucción de la muestra.

CONCLUSIONES

Se ha observado que tres de las 4 especies de *Casuarina* y *Allocasuarina* cultivadas en el país, presentaban nódulos en más del 60% de los ejemplares analizados. *C. torulosa* no presentó nodulación. La nodulación fue más abundante en suelos bien drenados y gran proporción noduló en predios rellenos artificialmente, o en suelos arenosos.

La actividad nitrogenásica de los nódulos fue superior en *A. stricta* y sus nódulos resultaron de gran tamaño (más de 12 cm de diámetro). La observación microscópica de estos nódulos reveló los detalles morfológicos descritos para las especies actinorríticas.

Se verificó inoculación cruzada en tres de las especies (*C. cunninghamiana*, *A. stricta* y *C. equisetifolia*) con macerado de nódulos de *C. cunninghamiana* y *A. stricta*. No noduló *C. torulosa*.

Se logró aislamiento de una cepa de *Frankia* que está siendo estudiada por su capacidad de nodulación y fijación de nitrógeno en distintas especies y que ingresó a la colección del BSSFT (Francia). Esta cepa aislada de nódulos de *A. stricta* presenta los caracteres morfológicos típicos de este microorganismo, alta actividad nitrogenasa y fuerte absorción del INT, en cultivo puro. Los parámetros empleados para evaluar la biomasa microbiana en distintos puntos de la curva de crecimiento, resultaron de utilidad, destacándose la coloración con INT y la turbidimetría de cultivos homogeneizados, por su simplicidad y rapidez.

BIBLIOGRAFIA

- BOND, G. 1976. The results of the IBP survey of root nodule formation in non-leguminous angiosperms. En: Nutman P.S. ed. **Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants** Londres, Cambridge Univ. Press: 443-475.
- DIEM, H.G.; D. GAUTHIER y Y.R. DOMMERGUES 1982. Isolation of *Frankia* from nodules of *Casuarina equisetifolia* Can. J. Microb. 28 (5): 526-530.
- DOMMERGUES, Y.R. 1963 Evaluation du taux de fixation de l'azote dans un sol dunaire reboise en filao (*Casuarina equisetifolia*) Agrochim. 7: 335-340.
- GAUTHIER, D.; L. FRIONI; H.G. DIEM y Y.R. DOMMERGUES 1984 a The Colletia-spinosissima- *Frankia* symbiosis. Oecol. Plant. 5 (19). No. 3: 231-239.
- GAUTHIER, D.L.; H.G. DIEM y Y.R. DOMMERGUES 1984 b Tropical and subtropical actinorhizal plants. Pesq. Agr. Bras. Brasilia 19: 110-136.
- GAUTHIER, D.L.; H.G. DIEM y Y.R. DOMMERGUES, 1985 Assessment of N₂ fixation by *Casuarina equisetifolia* inoculated with *Frankia* ORS 021001 using N₁₅ methods. Soil Biol. Biochem. 17: 375-37.
- KOCH, A. 1981 Growth Measurement. En: Manual of Methods for General Bacteriology. Eds. P. Gerhardt; R.G.E. Murray; R.N. Costilow; E.W. Nester; W.A. Wood; N.R. Krieg y G.B. Phillips: 179-207 Amer. Soc. for Microb., Washington, D.C.
- LALONDE, M. y H.E. CALVERT 1979 Production of *Frankia* hyphae and spores as an infection inoculant for *Alnus* species. En: J.C. Gordon y C.T. Weeler eds. **Symbiotic Nitrogen Fixation in the Management of Temperate Forest**. Oregon, Corvallis: 95-110.
- INNOVATIONS IN TROPICAL REFORESTATION 1984 *Casuarinas*: Nitrogen-Fixing Trees for Adverse Sites. National Academic Press: 118 pág.
- JOHANSEN, D.A. 1940 Plant microtechnique Mac Graw ed. Hill Book Co. N.Y. London.
- MEESTERS, T. M.; W. van VLIET y A.D. AKKERMANS 1987. Nitrogenase is restricted to the vesicles in *Frankia* strain EAN1 pcc. Physiol. Plant. 70: 267-271.
- MURRY, M.A.; M.S. FONTAINE y J.C. TORREY 1984 Growth kinetics and nitrogenase induction in *Frankia* sp HFPAr13 growth in bath culture. Plant & Soil 78: 61-78.

- NITTAYAJARN, A. and D.D. BAKER 1989 Methods for the quantification of *Frankia* cell biomass Plant and Soil 118: 199-204.
- PRIN, Y.; NEIRA, M. and H.G. DIEM 1988 Evaluation of *Frankia* growth and viability using Bradford protein and INT reduction tests. 6 th Int. Conf. on *Frankia* and actinorhizal plants. Univ. Conn. Storrs USA 7-10 august 1988.
- REDDELL, P. y G.D. BOWEN 1986 Host- *Frankia* specificity within the *Casuarinaceae*. Plant & Soil 93: 293-298.
- REDDELL, P. P.A. ROSSBROOK; G.D. BOWEN y D. GWAZE 1988 Growth responses in *Casuarina cunninghamiana* plantings to inoculation with *Frankia*. Plant & Soil 108: 79-86.
- ROSSBROOK, P.A. y G.D. BOWEN 1987 The abilities of three species of *Casuarina*. Physiol. Plant. 70: 373-377.
- SOUGOUFARA, B; H.G. DIEM y Y.R. DOMMERGUES 1989 Response of field growth *Casuarina equisetifolia* to inoculation with *Frankia* strain ORS 021001 entrapped in alginate beads. Plant & Soil. 118: 133-137
- STOWES, M.D. 1987 Collection, isolation, cultivation and maintenance of *Frankia*. En: H. Elkan y M. Dekker eds. **Symbiotic Nitrogen Fixation Technology** N.Y. Basel: 29-53.
- TORREY, J.C. 1978 Nitrogen fixation by actinomycetes nodulated angiosperms. Bioscience 28: 586-592.
- TORREY, J.C. y S. RACETTE 1989 Specificity among the *Casuarinaceae* in root nodulation by *Frankia*. Plant & Soil 118: 157-164.
- TURNER, G. y A.H. GIBSON 1980 Measuremnt of nitrogen fixation by indirect means. En: F.S. Bergersen ed. **Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation** Witer & Sons N. York: 139-184.
- VINCENT, J. M. 1975 **Manual práctico de Rhizobiología** Ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires.

