

## Caracterización morfo-anatómica y secuencia de desarrollo estacional de nódulos actinorrizicos en *Colletia hystrix* y *Discaria chacaye*

Eugenia E Chaia

Centro Regional Universitario Bariloche, Universidad Nacional del Comahue, CC 1336, (8400) San Carlos de Bariloche, Río Negro, Argentina

Recibido 24 de marzo de 1993; aceptado 8 de septiembre de 1993.

### RESUMEN

Las plantas de las especies *Colletia hystrix* y *Discaria chacaye* (*Rhamnaceae*), que crecen en el Parque Nacional Nahuel Huapí, Argentina, presentan en general nódulos actinorrizicos, los cuales constituyen un sistema de raíces laterales modificadas con forma coraloides. En este trabajo se examinó el desarrollo estacional de lóbulos nodulares a través del estudio de caracteres anatómicos provocados por cepas endosimbióticas del género *Frankia* (actinomicetes). En secciones longitudinales de lóbulos, mediante observaciones microscópicas, se analizaron número y dimensiones de células infectadas hipertrofiadas. Se observó una mayor intensidad de la infección por racimos de vesículas de *Frankia* durante el verano y otoño y una disminución hacia el invierno. Para la especie *Colletia hystrix* se registró una asociación significativa negativa ( $P < 0,05$ ) entre el número y la superficie de células hipertrofiadas.

**Palabras claves:** *Colletia hystrix*, *Discaria chacaye*, nódulos actinorrizicos, desarrollo estacional.

### Morpho-anatomical characterization and sequences of the seasonal development of actinorrhizal nodules in *Colletia hystrix* and *Discaria chacaye*

### SUMMARY

The species *Colletia hystrix* and *Discaria chacaye* (*Rhamnaceae*) growing in the Nahuel Huapi National Park, Argentina, develop in general actinorrhizal nodules, which form a coralloid system of modified lateral roots. In this study, the seasonal development of the nodule lobes was examined for anatomical characters, caused by endosymbiotic strains of the genus *Frankia* (Actinomycetes). The numbers and the dimensions of the hypertrophied infected cells were analyzed microscopically in longitudinal sections of the lobes. A more intensive rate of infection by *Frankia* vesicle clusters was observable in summer and autumn, decreasing during winter. In *C. hystrix* a negative association ( $P < 0,05$ ) was found between the numbers and dimensions of hypertrophied cells.

**Key words:** *Colletia hystrix*, *Discaria chacaye*, actinorrhizal nodules, seasonal development

## INTRODUCCION

El tipo de asociación simbiótica denominado actinorriza se halla constituido por actinomicetes del género *Frankia* y plantas leñosas pertenecientes a diferentes familias, entre ellas Rhamnaceae. Se evidencian por la presencia de nódulos ubicados en el sistema radical de estas plantas. Estos nódulos son raíces laterales modificadas en cuanto a estructura y desarrollo; allí ocurren cambios al nivel molecular que permiten la invasión y proliferación del endófito responsable de la fijación del nitrógeno (Rerry y Sunell, 1990), en células huéspedes que aumentan de tamaño progresivamente, hasta llegar a un estado hipertrofiado.

Las plantas actinorrízicas se hallan en suelos pobres en nitrógeno y, muchas veces, sujetas a severas fluctuaciones de humedad y temperatura (Bakery y Schwintzer, 1990). Estos factores, que influyen en la fisiología de la planta, también afectan a los nódulos (Zitzer y Dawson, 1992), siendo una de las causas la variación en el suministro de fotoasimilados a los mismos (Wheeler, 1984). Por otra parte, existiría una correlación estacional entre la actividad de la nitrogenasa en el tejido simbiótico y la secuencia de desarrollo morfológico en los nódulos (Huss Danell, 1990).

Las especies *Colletia hystrix* Clos y *Discaria chacaye* (G. Don) Tortosa (Rhamnaceae) se hallan en el Parque Nacional Nahuel Huapi. Son árboles o arbustos espinosos, con hojas efímeras o deciduas, tallos fotosintéticos en el caso de *C. hystrix* y amplia capacidad de rebrote en *D. chacaye*. Sus ejemplares presentan nódulos actinorrízicos coraloides (Tortosa y Medan y 1983).

El objetivo de este trabajo fue establecer una caracterización morfo-anatómica de nódulos de *Colletia hystrix* y *Discaria chacaye* que permita indicar la actividad de *Frankia*, y

probar la existencia de variaciones estacionales en el grado de infección del endosimbionte.

## MATERIALES Y METODOS

### Descripción del área de estudio

Se eligió un sector del Parque Nacional Nahuel Huapi (41° 03' LS, 71° 34' LW, 800 msnm), al oeste de San Carlos de Bariloche (Pcia. de Río Negro), Argentina, en dos localidades: «Villa Golf» y «Llao Llao», incluido en la región de los bosques andino patagónicos (Dimitri, 1972). El régimen climático es templado fresco con temperatura media anual de 8°C, precipitación media anual de 1800 mm y un predominio de lluvias en otoño (800 mm). Los suelos son de tipo andosólico, en «Villa Golf» se observa un horizonte superficial mineral de tipo grava y subsuperficial con fracción mineral arcillosa; en «Llao Llao» el horizonte superficial es de material orgánico en descomposición con fracción mineral arcillosa y el subsuperficial con la misma fracción. Para ambos lugares se registró un pH entre 6,2 y 6,1.

«Villa Golf» es la costa de una bahía, frente a Puerto Pañuelo, sobre el lago Nahuel Huapi; «Llao Llao» corresponde a un bosque de *Nothofagus dombeyi*.

### Obtención y análisis de nódulos radicales

Se determinó una parcela de 20 x 20 m en cada localidad. En éstas se midió la cobertura vegetal total. Se coleccionaron ejemplares jóvenes de hasta seis años, con sus raíces, de *D. chacaye* en «Villa Golf» y de *C. hystrix* en «Llao Llao», en forma estacional, en las fechas 6-XII-1991, 24-II-1992, 1-IV-1992 y 1-VIII-1992. Los nódulos fueron fijados

en glutaraldehído al 4 %.

Para comparar la secuencia de desarrollo estacional de infección por el endosimbionte *Frankia* se adaptó la metodología utilizada para la estimación microscópica de la densidad de acumulación de esporas, por Van Dijk (1978), de la siguiente manera: se utilizaron nódulos, de por lo menos dos ejemplares actinorrhizales de cada especie por temporada. De cada nódulo se separaron de dos a cuatro lóbulos de ubicación periférica. Los mismos fueron cortados longitudinalmente con el micrótopo de congelación en secciones de 25  $\mu\text{m}$  hasta la parte central del cilindro vascular. Se confeccionaron preparados permanentes montados en lactofenol de Ammann con azul de algodón, bordeados con «Glyceel» (Gurr, BDH Chemicals Ltd., Poole, England) (Vobis, 1980).

Se observaron con microscopio óptico dos secciones centrales de cada lóbulo, para registrar las características del micelio de *Frankia* y las células con diámetros superiores a 40  $\mu\text{m}$  (células hipertrofiadas), con y sin racimos de vesículas en su interior (se asumió que su tamaño es debido a la infección y que el endófito se desprendió durante el manipuleo del material).

Para probar en forma cuantitativa la existencia de variaciones estacionales en el grado de infección se realizaron las siguientes comparaciones:

a) el número de células hipertrofiadas en las secciones de lóbulos colectados en las distintas estaciones ( $n = 16$ )

b) el área de células hipertrofiadas, elegidas al azar, de las mismas secciones que en a), para lo cual se hizo una aproximación a la superficie de una elipse ( $\pi \times a \times b$  siendo  $a =$  radio mayor de la célula y  $b =$  radio menor;  $n = 32$ ). Se aplicó el método de «Notched Box and Whiskers Plot» para un análisis exploratorio de los datos. El mismo indica para cada grupo

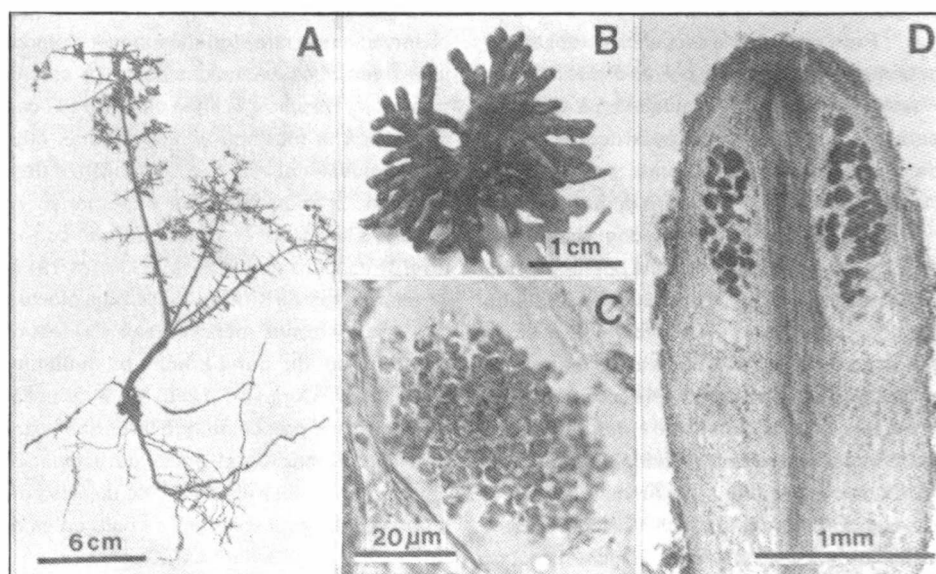
de datos: una caja que divide la mitad de las observaciones entre el cuartil superior e inferior, líneas verticales extendidas hasta los valores máximos y mínimos, la línea central de la caja que indica la mediana y escotaduras cuyo ancho muestra el intervalo de confianza de la mediana, cuando éstas se superponen no existen diferencias entre los grupos con un nivel de confianza del 95% (Mc Gill *et al*, 1978.) Se utilizó el test de Kruskal-Wallis para efectuar las comparaciones mencionadas y el test no paramétrico de comparaciones múltiples ( $P < 0,05$ ) (Conover, 1980) para aquellas pruebas que presentaron diferencias significativas. Se calculó el grado de asociación entre la superficie y el número de células para ambas especies mediante los coeficientes de Spearman y Kendall ( $P < 0,05$ ).

## RESULTADOS

Los lugares muestreados representan condiciones ambientales disímiles en cuanto a cobertura vegetal y tipo de suelo. Se registró una cobertura vegetal total de 80% para «Llao Llao» y 50% para «Villa Golf». Los ejemplares de *C. hystrix* y *D. chacayo* colectados presentan nódulos actinorrhizales, tanto en raíces principales como laterales, a partir de una profundidad de 3 cm (Fig 1A).

Los nódulos son de tamaños variables (hasta 20 mm de diámetro) y sus lóbulos, con distinto grado de cohesión, pueden alcanzar hasta 6 mm de longitud (Fig 1B). En cortes histológicos de lóbulos (Fig 1D) se observó un meristema apical y luego una región de células hipertrofiadas, rodeando al cilindro vascular, con diámetros de hasta 140  $\mu\text{m}$ , en cuyo interior se hallan racimos de vesículas de *Frankia* y células parenquimáticas pequeñas, ca. 30  $\mu\text{m}$  (Fig 1C).

No se hallaron esporangios en el material



**Figura 1.** Aspectos morfo-anatómicos de los nódulos actinorrhizales. (A) Ejemplar joven de *Colletia hystrix* con infección radical. (B) Nódulo coralóide de *C. hystrix*. (C) Racimo de vesículas del endófito *Frankia* en una célula hipertrofiada de *Discaria chacaye*. (D) Sección longitudinal de un lóbulo nodular de *D. chacaye* con células infectadas (de tinción oscura).

Morphological and anatomical characters of actinorrhizal nodules. (A) *Colletia hystrix*: young plant with infected root. (B) Coralloid nodule of *C. hystrix*. (C) Cluster of vesicles of the *Frankia* endophyte inside a hypertrophied cell of *Discaria chacaye*. (D) Longitudinal section through a lobe nodule of *D. chacaye* with infected cells (dark stained).

nodular observado, lo cual se corresponde con las descripciones de Akkermans *et al* (1979) para Rhamnaceae con cepas de *Frankia* sp.

Las figuras 2 y 3 resumen en forma gráfica el análisis estadístico de los datos para ambas especies por estación.

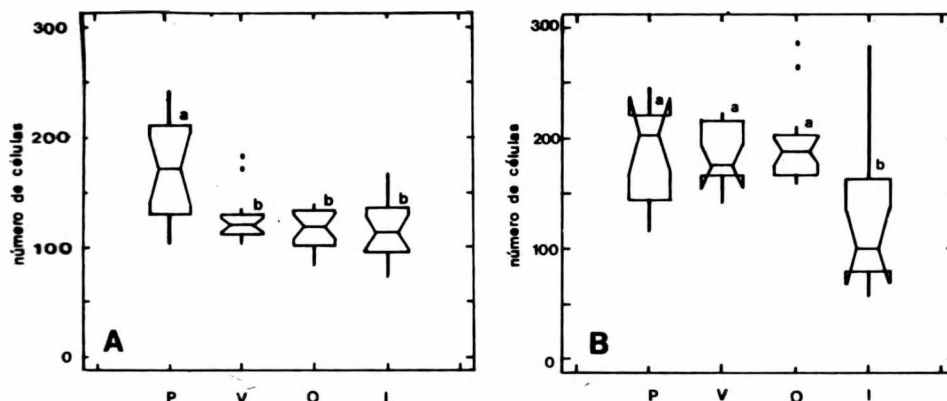
Para la especie *C. hystrix* (Fig 2A) se obtuvieron promedios decrecientes en el número de células hipertrofiadas, por corte histológico de lóbulo desde la primavera hacia el invierno ( $T = 15.492$ ;  $P < 0,05$ ) y diferencias significativas entre primavera y cada una de las restantes estaciones (test de comparaciones múltiples,  $P < 0,05$ ).

Para la especie *D. chacaye* (Fig 2B) se

obtuvo un mayor número de células infectadas por lóbulo que en *C. hystrix*. Se registraron diferencias significativas entre muestras colectadas, en particular entre la de invierno y las restantes estaciones ( $T = 15,0751$ ; test de comparaciones múltiples,  $P < 0,05$ ).

La estimación de la superficie de células hipertrofiadas (Fig 3) en ambas especies, presentó un aumento desde primavera a otoño y un brusco descenso hacia el invierno (en *C. hystrix*  $T = 56,8352$  y en *D. chacaye*  $T = 56,6766$ ,  $P < 0,05$ ).

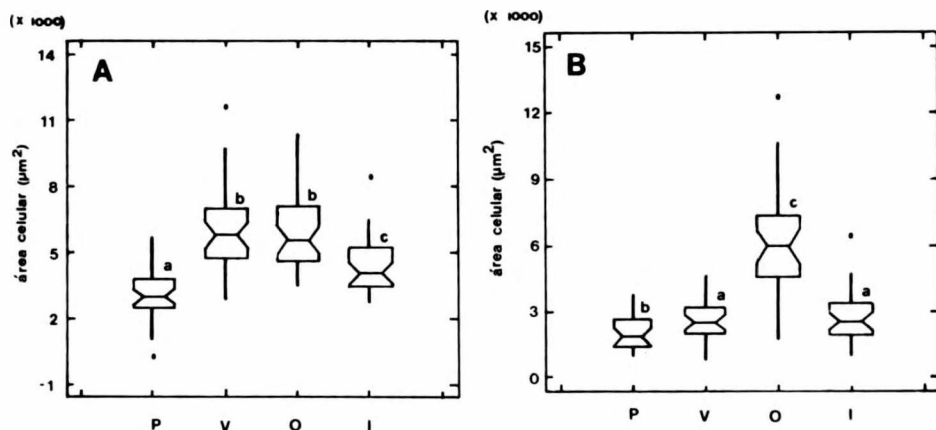
*C. hystrix* presentó diferencias en primavera-verano, primavera-otoño, primavera-invierno, verano-invierno, invierno-otoño (test de comparaciones múltiples,  $P < 0,05$ ).



**Figura 2** Evolución estacional del número de células hipertrofiadas de (A) *Colletia hystrix*, (B) *Discaria chacaye*; (método gráfico «notched box and whiskers plot») (1),  $P < 0,05$ ). Letras minúsculas iguales indican grupos homogéneos, letras distintas representan diferencias significativas en el número de células entre estaciones (P = primavera, V = verano, O = otoño, I = invierno; test no paramétrico de comparaciones múltiples,  $P < 0,05$ )

(1) Para cada grupo de datos (P, V, O, I) se indica el cuartil superior e inferior (caja), valores máximos y mínimos del rango de datos (líneas verticales), la mediana (línea central de cada caja) y el intervalo de confianza de la mediana (incisuras de cajas).

Seasonal evolution in a number of hypertrofiated cells of (A) *Colletia hystrix*, (B) *Discaria chacaye* (graphic method «notched box and whiskers plot») (1),  $P < 0,05$ ). Same small letters show homogenous groups, different letters are statistically significant in number of cells between seasons (P = spring, V = summer, O = autumn, I = winter; nonparametric test of multiples comparisons,  $P < 0,05$ )



**Figura 3** Evolución estacional de la superficie de células hipertrofiadas, (A) *Colletia hystrix*, (B) *Discaria chacaye* (método gráfico «notched box and whiskers plot»).  $P < 0,05$ ). Letras minúsculas iguales indican grupos homogéneos, letras distintas representan diferencias significativas en la superficie celular entre estaciones (P = primavera, V = verano, O = otoño, I = invierno; test no paramétrico de comparaciones múltiples,  $P < 0,05$ )

Seasonal evolution in surface of hypertrofiated cells (A) *Colletia hystrix*, (B) *Discaria chacaye* (graphic method «notched box and whiskers plot»).  $P < 0,05$ ). Same small letters show homogenous groups, different letters are statistically significant in number cells among seasons (P = spring, V = summer, O = autumn, I = winter; nonparametric test of multiples comparisons,  $P < 0,05$ )

Es decir, en verano las células alcanzaron su máxima superficie, que se mantuvo durante el otoño (Fig 3A).

Se notó un marcado aumento del área promedio celular a partir de primavera en *D. chacaye*, presentando diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre todas las estaciones, excepto verano con invierno (Fig 3B).

El grado de asociación entre la superficie y el número de células, medido con los coeficientes de Spearman y Kendall ( $P < 0,05$ ), indican para *C. hystrix* una correlación significativa negativa ( $r = -0,3280$ ;  $r = -0,2241$ , respectivamente). Para *D. chacaye* estos coeficientes no indican algún tipo de asociación.

El diámetro de las vesículas de *Frankia* aumentó desde la primavera al otoño de 2 a 6  $\mu\text{m}$ . Durante el invierno se observaron racimos de vesículas colapsados en el interior de células hipertrofiadas.

## DISCUSION

El reinicio de la actividad meristemática, el desarrollo y expansión de yemas y tejido fotosintético fue seguido por divisiones celulares en los nódulos y diferenciación de nuevas vesículas endofíticas fijadoras de nitrógeno (Wheeler, 1991; Schwintzer *et al.*, 1982). Se registró un aumento progresivo en el número de células hipertrofiadas en nódulos de ambas especies hacia la primavera. Asimismo, comenzó el crecimiento de la superficie de dichas células que llegaron a valores máximos en el verano en nódulos de *C. hystrix* con disminución proporcional en el número de células debido posiblemente al espacio disponible.

Para *D. chacaye* el aumento en superficie de células infectadas por el endófito *Frankia* fue más gradual y recién se alcanzaron superficies semejantes a las de *C. hystrix*

durante el otoño.

Es probable que las condiciones a las que se hallan expuestas las dos especies causen las diferencias observadas. El bosque de Llao Llao es un ambiente más protegido, por la alta cobertura vegetal, lo cual permitiría cambios más notables en los nódulos ya en los meses de verano. Para *D. chacaye* se presentaría una situación diferente, ya que las playas de Villa Golf se hallan inundadas como consecuencia del aumento del nivel del lago por los deshielos. Esto produciría una reducción de la difusión del oxígeno hacia los sistemas radicales, influyendo en la actividad nodular (Zitzer y Dawson, 1989; Wheeler, 1991) retardando su crecimiento y la diferenciación del endófito (Schwintzer, 1985).

Durante el otoño, época en la que se producen las lluvias, ocurre la mayor intensidad de infección. Schwintzer y Lancelle (1983) indican que el desarrollo nodular en *Myrica gale* es mayor en suelos más húmedos, lo cual puede ser relacionado con la estación lluviosa.

En el invierno, con temperaturas ambientales que promedian los 2° C y suelos que se hallan helados, se observaron las menores superficies en células infectadas, como así también, racimos de vesículas colapsados en el interior de la célula huésped y vesículas poco desarrolladas. Se ha observado un estado de dormición en los nódulos de plantas de climas templados (Huss-Danell, 1990).

Wheeler (1984) indica que en plantas actinorrhizas de zonas templadas ocurren cambios en la actividad de la nitrógenasa. Es de interés estudiar si existe una correspondencia entre la intensidad de fijación de nitrógeno y esta secuencia de desarrollo de micelio de *Frankia* en nódulos de *D. chacaye* y *C. hystrix*, como ya ha sido documentado en *Myrica gale* (Schwintzer *et al.*, 1982).

## CONCLUSIONES

Se registró para los lóbulos nodulares de *D. chacay* y *C. hystrix* un mayor desarrollo de células infectadas con racimos de vesículas durante el verano y otoño y una disminución hacia el invierno. En *Colletia hystrix* se halló una asociación negativa entre el número y la superficie de células infectadas.

Las observaciones realizadas indican una variación estacional en el grado de la infección del endosimbionte *Frankia*, en los nódulos actinorrhizales de las especies nombradas.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr G Vobis por la dirección de la investigación, a la Lic N Baccalá por el asesoramiento en temas de estadística, al Dr J Puntieri, los Ing Agr R Tortosa y D Medan y a la Lic MI Mesutti por la lectura crítica del manuscrito.

La financiación para esta investigación fue provista por el proyecto «Flora de Puerto Blest y sus alrededores» de la Universidad Nacional del Comahue y el proyecto Binac 91-4 de la Red Latinoamericana de Botánica.

## BIBLIOGRAFIA

- Akkermans ADL, W Roelofsen and J Blom (1979) Dinitrogen fixation and ammonia assimilation in Actinomycetes root nodules of *Alnus glutinosa*. En: Proceedings workshop symbiotic nitrogen fixation in the management of temperate forests. Eds C Gordon, C Wheeler and DA Perry: 160-170
- Baker DD and CR Schwintzer (1990) Introduction. En: The biology of *Frankia* and actinorhizal plants. Eds CR Schwintzer and JD Tjepkema Academic Press Inc. New York 3-13
- Berry AM and LA Sunell (1990) The infection process and nodule development. En: The biology of *Frankia* and actinorhizal plants. CR Schwintzer and JD Tjepkema Academic Press Inc New York 61-81
- Conover WS (1980) Practical non-parametric statistics. 2nd. Ed J Wiley and Sons. U.S.A. 213-251
- Dimitri M (1972) La región de los bosques Andino Patagónicos. Sinopsis general. Colección Científica del INTA. Bs.As.
- Huss-Danell K (1990) The physiology of actinorhizal nodules. En: The biology of *Frankia* and actinorhizal plants. Ed CR Schwintzer and JD Tjepkema Academic Press Inc New York 129-156
- Mc Gill R, JW Tukey and WA Larsen (1978) Variations of box plots. Amer Stat 32: 12-16
- Schwintzer CR, AM Berry and LD Disney (1982) Seasonal patterns of root nodule growth, endophyte morphology, nitrogenase activity and shoot development in *Myrica gale*. Can J Bot 60 (6): 746-757
- Schwintzer CR, SA Lancelle (1983) Effect of water table depth on shoot growth, root growth, and nodulation of *Myrica gale* seedlings. Journal of Ecology (71): 489-501
- Schwintzer CR (1985) Effect of spring flooding on endophyte differentiation, nitrogenase activity, root growth and shoot growth. Plant and Soil 87: 109-124
- Tortosa RD y D Medan (1983) Nódulos radicales simbióticos en espermatófitas argentinas. Kurtziana 16: 101-122
- Van Dijk C (1978) Spore formation and endophyte diversity in root nodules of *Alnus glutinosa* (L.) Vill. New Phytol 81: 601-615
- Vobis G (1980) Bau und Entwicklung der Flechten-Pycnidien und ihrer Conidien. Bibliotheca Lichenologica Cramer 14: 1-141
- Wheeler CT (1984) *Frankia* and its symbiosis in non-legume (actinorhizal) root nodules. En Current developments in biological nitrogen fixation. Ed NS

*Chaia*. Caracterización morfo-anatómica y secuencia de ...

Subba Rao, Oxford Univ Press IBH Publ India 173-195

Wheeler CT (1991) Symbiotic nitrogen fixation. En: Physiology of trees. Ed: AS Ragshavendra John Wiley & Sons Inc :111-135

Zitzer SF and JO Dawson (1989) Seasonal changes in nodular nitrogenase activity of *Alnus glutinosa* and

*Eleagnus angustifolia* En: Tree physiology 5. Heron Publishing-Canada 185-194

Zitzer SF and JO Dawson (1992) Soil properties and actinorhizal vegetation influence nodulation of *Alnus glutinosa* and *Eleagnus angustifolia* by *Frankia*. Plant and Soil 140: 197-204