

**ESTUDIO MORFOLÓGICO, HISTOLÓGICO Y ESTRUCTURAL DE LA
NODULACIÓN DE *Frankia* EN *Morella pubescens* H. & B. ex Willidenow *in situ***

JAIRO ANDRES MURCIA VELASCO

UNIVERSIDAD DEL CAUCA

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN

PROGRAMA DE BIOLOGÍA

POPAYÁN

2006

**ESTUDIO MORFOLÓGICO, HISTOLÓGICO Y ESTRUCTURAL DE LA
NODULACIÓN DE *Frankia* EN *Morella pubescens* H. & B. ex Willidenow *in situ***

JAIRO ANDRES MURCIA VELASCO

**Trabajo de Grado
Para Optar al Título de Biólogo**

**Director
Mg. NELSON BOLÍVAR ROJAS MARTÍNEZ**

**Asesor
Mg. GERARDO ANDRÉS TORRES RODRÍGUEZ**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
POPAYÁN**

Nota de aceptación:

Firma del director del Trabajo de Grado

Firma del jurado

Firma del jurado

Popayán, 10 Marzo de 2006

Este estudio esta dedicado a las personas que hicieron posible la culminación de este Trabajo de Grado.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecerle al Mg. profesor Nelson Bolívar Rojas quien me dio la idea del trabajo y por su paciencia , al Mg. Gerardo Andrés Torres por su gran apoyo y asesoría en técnica de Microscopia Óptica de Alta Resolución y Microscopia Electrónica de Transmisión.

Un especial agradecimiento a la Lic. Patricia Mosquera por el apoyo dado en la Unidad de Microscopia Electrónica, que con su ayuda su pudo obtener unas muy buenas fotomicrografías de la ultraestructura.

Un gran agradecimiento muy especial a mi compañero Nestor José Perafan Dizú, quien me apporto sus conocimientos en el tema y su asesoría.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	13
1. JUSTIFICACIÓN	14
2. OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GENERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3. ANTECEDENTES	17
4. MARCO TEÓRICO	19
4.1 Plantas actinorrizas	20
4.1.1 <i>Morella pubescens</i> Humboldt et Bonpland ex Willd	20
4.1.1.1 Aspectos botánicos	20
4.1.1.2 Distribución geográfica	21
4.1.1.3 Características generales de <i>Morella pubescens</i> Humboldt et Bonpland ex Willd	22
4.1.1.4 Usos	25

4.2	<i>Frankia</i>	26
4.2.1	Estructuras características de <i>Frankia</i> en simbiosis	26
4.2.2	Taxonomía, especificidad del hospedero y fisiología de <i>Frankia</i>	28
4.3	MORFOLOGÍA Y ANATOMÍA DE LOS NÓDULOS ACTINORRÍZICOS	30
	MORFOLOGÍA	
4.4	FORMAS DE INFECCIÓN DE <i>FRANKIA</i> EN LAS PLANTAS	30
	ACTINORRIZAS	
4.5	FORMACIÓN DEL PRENODULO Y DEL LÓBULO NODULAR	32
	PRIMARIO	
4.4.1	Infección vía pelos radicales.	31
4.4.2	Vía penetración intercelular	32
5.	METODOLOGÍA	35
5.1	MICROSCOPIA ÓPTICA DE ALTA RESOLUCIÓN (M.O.A.R.)	35
5.2	HISTOQUÍMICA	36
5.3	MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	36
6.	RESULTADOS	37
6.1	MORFOLOGÍA EXTERNA	37
6.2	MORFOLOGÍA INTERNA	38
6.3	ULTRAESTRUCTURA	44

7.	DISCUSIÓN	47
8.	CONCLUSIONES	51
	BIBLIOGRAFÍA	53
	ANEXOS	60

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Frankia</i> .	30
Tabla 2. Especificidad hospedera en la simbiosis actinorrízica	30

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1.	Fotografía de Plántula de Laurel de Cera (<i>Morella pubescens</i>)	22
Figura 2.	Distribución geográfica en Colombia de <i>M. pubescens</i> Willd.	23
Figura 3.	<i>Morella pubescens</i> Willd.	25
Figura 4.	Dibujo sistemático de una célula de nódulo de <i>Alnus</i> infectada con <i>Frankia</i> .	29
Figura 5.	Infección y organogénesis temprana de un lóbulo nodular en las plantas actinorrizas.	35
Figura 6.	Nódulos de <i>Morella pubescens</i> infectados por <i>Frankia</i> sp, colectados en la vereda La Esperanza.	38
Figura 7.	Nódulos radiculares de <i>Morella pubescens</i> infectado por <i>Frankia</i> sp, colectado en la vereda La Esperanza.	38
Figura 8.	Corte transversal de un lóbulo de nódulo de <i>Morella pubescens</i> , colectado en la vereda La Esperanza, teñido con Azul de Toluidina.	39
Figura 9.	Corte longitudinal de nódulo de <i>Morella Pubescens</i> , colectado en la vereda La Esperanza, teñido con Azul de Toluidina	40
Figura 10.	Corte longitudinal de nódulo de <i>Morella pubescens</i> , colectado en la vereda La Esperanza, teñido con Azul de Toluidina. Detalles del Cilindro Central.	41
Figura 11.	Corte longitudinal de nódulo radicular de <i>Morella pubescens</i> , colectado en La vereda la Esperanza, teñido con Azul de Toluidina.	41
Figura 12.	Corte transversal de nódulo de <i>Morella pubescens</i> , colectado en la vereda La Esperanza. teñido con Azul Mercúrico de Bromofenol.	42
Figura 13.	Corte transversal de nódulo de <i>Morella pubescens</i> , colectado en la vereda La Esperanza, teñido con lugol.	42
Figura 14.	Corte transversal de lóbulo de nódulo de <i>Morella pubescens</i> , colectado en la vereda La Esperanza, teñido con KMNO ₃	43
Figura 15.	Corte transversal de lóbulo de nódulo de <i>Morella pubescens</i> , colectado en la vereda La Esperanza, teñido con Verde Rápido – Safranina.	43
Figura 16	Corte longitudinal de lóbulo de nódulo de <i>Morella pubescens</i> , colectado en Chiribio, teñido con Azul de Toluidina	44
Figura 17.	Fotomicrografía electrónica de una célula cortical de <i>Morella pubescens</i> Humboldt et Bonpland ex Willd, infectada por el actinomiceto <i>Frankia</i> , estructuras características de <i>Frankia</i> .	45

- Figura 18.** Fotomicrografía electrónica de hifa de *Frankia* penetrando pared celular del hospedero de una célula cortical de *Morella pubescens* Humboldt et Bonpland ex Willd, corte longitudinal, colectado en la vereda la Esperanza. 46
- Figura 19.** Fotomicrografía electrónica de vesícula de una célula cortical de *Morella pubescens* Humboldt et Bonpland ex Willd infectada por el actinomiceto *Frankia*, corte longitudinal, colectado en la vereda la Esperanza. 47

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A Protocolo de preparación de muestras para Microscopia Óptica de Alta Resolución (M.O.A.R) y Microscopia Electrónica de Transmisión (M.E.T.)	61
Anexo B Protocolo de preparación de muestras para Histoquímica.	62
Anexo C Protocolo de tinción con Azul Mercúrico de Bromofenol (AMB) de tejido incluido en parafina.	63
Anexo D Protocolo de tinción con Lugol del tejido incluido con parafina.	64
Anexo E Protocolo de tinción con $KMNO_3$ del tejido incluido con parafina.	65
Anexo F Protocolo de tinción Verde Rápido Safranina en tejido incluido con parafina.	66

INTRODUCCIÓN

El laurel de cera *Morella pubescens* es una planta endémica en Suramérica fijadora de nitrógeno que se distribuye desde Nicaragua hasta Bolivia (Pinzon, 1997), es una planta actinorriza, *actino* de actinomicetes y *rhiza* de raíz (Baker y Miller, 1992), es decir una planta que establece simbiosis con la bacteria fijadora de nitrógeno *Frankia* en sus nódulos, lo que le permite obtener amonio (Berry y Sunell, 1990). Se han descrito hasta ahora 270 especies de plantas actinorrizas (Swensen y Mullin, 1997) pertenecientes a 25 géneros (Lancelle y Torrey, 1985; Huss - Danell, 1997) de 8 familias (McEwan y Gatherer, 1999; Berry, 1994), a diferencia de las leguminosas que pertenecen a una sola familia y a un género de la familia Ulmaceae (Benson y Silvestre, 1993).

El significado de la simbiosis actinorrízica en el presupuesto del nitrógeno global es ante todo ecológico (Berry, 1994); es decir, cumplen un papel ecológico en el balance global del nitrógeno. Tienen importancia económica como productoras de madera y de leña, la mayoría habita las zonas templadas. Las cantidades de nitrógeno fijadas por estas plantas son usualmente mayores que las cantidades fijadas por las leguminosas (Schwencke y Carú, 2001). La capacidad de adaptación de estas plantas a suelos marginales, está seguramente relacionada no sólo a su capacidad de autoabastecerse de nitrógeno, a través de su simbiosis con *Frankia*, sino también a que se asocia hongos endo y ectomicorrízicos; simbiosis que le provee de muchos nutrientes, sobre todo fósforo (ibid.); es decir, dichas plantas son capaces de formar varios y diferentes asociaciones con microorganismos del suelo. El Laurel de ceras por ser fijadora de nitrógeno sirve para la recuperación de suelos, control de erosión, uso artesanal, retención de taludes, soporta sequía y se adapta en pendientes acusadas. Se recomienda para la protección de riberas y como alimento para fauna silvestre (Elias, 1971). Se han llevado a cabo estudios a nivel del género *Morella*, pero no de la especie *Morella pubescens*: por lo tanto la siguiente investigación dentro de la línea de Biología

Celular y Molecular se enfoca principalmente a la investigación básica, principalmente a nivel de morfología, estructura y ultraestructura de los nódulos producto de la simbiosis.

1. JUSTIFICACIÓN

En Colombia se presentan problemas de deforestación, degradación de suelos y erosión, actualmente se busca implementar alternativas de bajos costos para solucionar parte de estos problemas, sin embargo, se requieren investigaciones que permitan desarrollar dichas tecnologías, en algunos casos es necesaria la investigación básica.

El laurel de cera es una especie que sirve para proteger las cuencas hidrográficas, se puede integrar en procesos de recuperación de suelos, se adapta a diferentes tipos de terrenos, es un arbusto pionero en la colonización de terrenos deforestados (Muñoz, 2000).

De sus frutos se obtiene una cera que se emplea en la industria como materia prima para la elaboración de panela ó chancaca, velas, jabones y cera para pisos, productos que pueden reemplazar a otros similares, obtenidos a partir de síntesis químicas que pueden ser sustancias contaminantes. Además el ripio o producto sobrante de la extracción es utilizado como abono orgánico.

En la Universidad del Cauca se han llevado a cabo estudios sobre la producción técnica y comercialización de la cera de laurel (Rebolledo, 2000), producción y comercialización del jabón de tierra (García, 1995), investigaciones que han determinado una viabilidad y dónde se plantea la recuperación de tradiciones culturales, como es la producción artesanal tradicional de cera.

La universidad de Nariño es pionera en el sur occidente Colombiano en el estudio de ésta especie; llevando a cabo estudios sobre producción, germinación y descripción general de la especie, sin embargo, en Colombia y otros países Latinoamericanos no se han hecho estudios a nivel celular, molecular ni genético del proceso de nodulación *Frankia* - laurel de cera. La Unidad de Biotecnología Vegetal de la Pontificia Universidad Javeriana estableció la línea de investigación en aislamiento, caracterización, cultivo e inoculación

de fijadores de nitrógeno, siendo la simbiosis *Frankia* - Laurel de cera uno de sus intereses promisorios.

Esta es la primera investigación a nivel de Biología Celular y Microbiología que contribuye a un mayor conocimiento del laurel de cera, como la determinación de la infectividad y la efectividad de fijación de nitrógeno en sus nódulos y establece algunas de las bases de una interesante línea de investigación a nivel de Biología Celular y molecular en la Universidad del Cauca.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

- Estudiar los cambios morfológicos y estructurales durante el proceso de nodulación de Frankia en las raíces del laurel de cera *Morella pubescens* H. & B. ex Wilidenow *in situ*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar y determinar la secuencia de transformación morfológica y estructural a nivel de raíz y nódulo mediante técnicas de microscopía óptica y electrónica durante el proceso de nodulación.
- Determinar la secuencia de transformaciones estructurales a nivel celular mediante técnicas histoquímicas durante el proceso de nodulación.
- Observar el modo de acción del actinomiceto Frankia durante el proceso de la nodulación en las raíces del laurel de cera *Morella pubescens* H. & B. ex Wilidenow *in situ* por medio de microscopía óptica y electrónica.

3. ANTECEDENTES

No se han llevado a cabo investigaciones a nivel celular, molecular ni genético de la simbiosis de *Frankia* – *Morella pubescens*. La investigación bibliográfica se llevo a cabo en el centro de documentación del CIAT, biblioteca y bases de datos de la Universidad del Cauca y de la Universidad del Valle y la taxonomía se obtuvo de dos trabajos de grado de Botánica de la Universidad Nacional de Colombia.

La primera descripción de nódulos actinorrizicos la hizo Meyen en 1829, por medio de una observación de microscopio de muestras de los nódulos descubrió el supuesto parásito (Quispel, 1990), una mejor descripción la hizo Schacht en 1853 y otros investigadores posteriores, pero en 1866 Woronin describió la estructura anatómica de los nódulos de *Alnus glutinosa*, pudiendo observar algunas de las estructuras características de *Frankia* (ibid.). Las investigaciones continuaron avanzando en la descripción del microorganismo, en 1902 Shibata observa en detalle células de nódulos de *Alnus* y observa que las hifas se ubican principalmente en el meristemo y que se ramifican formando células de gran tamaño fué el primero en considerar el microsimbionte de *Alnus* como un *Mycobacterium* y el de *Morella* como un Actinomiceto. En 1956 Pomer lleva a cabo la primera descripción ultraestructural de los nódulos *Alnus*. En 1963 Silver Warren lleva a cabo el estudio de ultraestructura de *Morella cerifera* donde *Frankia* es descrita como un endófito (Warren, 1963), este es uno de los trabajos que mas se acerca a esta investigación, pues la mayoría de los estudios a nivel del género *Morella* se han llevado a cabo en las especies *Morella gale*, *Morella cerifera*, *Morella faya* y *Morella pensylvanica* y ningún estudio morfológico, estructural y ultraestructural en *Morella pubescens*.

La Universidad del Nariño es pionera en el estudio de ésta especie. Sus trabajos en marcha son: El laurel de cera (*Morella pubescens*) en sistemas agroforestales, una alternativa de

desarrollo en el departamento de Nariño; Investigación participativa sobre laurel de cera, una estrategia de educación ambiental en los municipios de San Pablo, Chachagui y Pasto, departamento de Nariño. Los trabajos ejecutados son: Estudio agroeconómico del laurel de cera en el departamento de Nariño; Evaluación de tres métodos de pregerminación de semillas de laurel de cera; Estudio de comercialización de la cera de laurel en el departamento de Nariño.

La Universidad de Nariño ejecutó el proyecto “Estudio de distancias de siembra y fertilización del laurel (*Morella pubescens*) y del procesamiento de la cera en la zona norte del departamento de Nariño con el apoyo de Pronatta.

En la Universidad del Cauca se han llevado a cabo los trabajos de grado: “Producción técnica y comercialización de la cera de laurel en el Municipio de la Cruz (Nariño) (Rebolledo y Tituaña, 2000) en la Facultad de Ciencias Contables, Económicas y Administrativas, estudio que determinó la factibilidad de crear una empresa dedicada a la producción técnica y comercialización de la cera de laurel en el municipio de la Cruz y el trabajo de grado “Producción y comercialización del jabón de tierra” (García et al., 1995), en la Facultad de Humanidades, estudio que desarrollo los elementos publicitarios para la comercialización del jabón de tierra.

El Cauca y Nariño son los departamentos dónde más se utiliza la práctica de la extracción de la cera de laurel (Muñoz y Luna, 2000), siendo una especie de interés económico y cultural. Esta investigación a porta al conocimiento básico de la simbiosis de la bacteria y el Laurel de Cera, es el primer estudio a nivel morfológico, estructural y ultraestructural de los nódulos producto de la simbiosis y que determinó la infectividad y efectividad de la fijación de nitrógeno, por lo tanto es importante estudiar ésta simbiosis para desarrollar técnicas de micropropagación para proyectos de producción y mejoramiento o recuperación ambiental, es decir, es factible la tecnificación del cultivo del laurel de cera pues en simbiosis con *Frankia* se lleva a cabo la fijación de nitrógeno, cultivo tecnificado que aportaría al desarrollo de la región.

4. MARCO TEÓRICO

Frankia es una bacteria filamentosa o actinomiceto fijador de nitrógeno que cuando lleva a cabo simbiosis con las plantas actinorrizas, induce en sus raíces la formación de nódulos fijadores de nitrógeno. Dicha fijación de nitrógeno es llevada a cabo por la enzima nitrogenasa (Berry y Sunell, 1990).

La simbiosis formada por la bacteria *Frankia* y el nódulo radical de la planta se conoce con el término de actinorriza (Torrey y Tjepkema, 1979; Berry et al., 1986; Guillén, 1993), *actino* de actinomicetes y *rhiza* de raíz (Baker y Miller, 1992).

Los beneficios de esta simbiosis se conocen desde hace muchos años y ya desde 1886 se suponía que el endófito de estas plantas era microbiano (Lechevalier, 1979). Se han encontrado evidencias fósiles del pleistoceno del árbol aliso (*Alnus*) cuyos nódulos albergaban actinomicetos en su interior (Baker y Miller, 1980). Sin embargo no fué sino hasta 1978 en que el grupo del Dr. Torrey, en la Universidad de Harvard logro aislar de *Comptonia peregrina* la primera cepa de *Frankia* en cultivo puro bajo condiciones axénicas, a la que llamaron CpII (Benson y Silvestre, 1993), estableciéndose una nueva línea de investigación de la simbiosis *Frankia* – hospedero *in vitro*.

Este estudio morfológico y estructural hace énfasis en la simbiosis *Frankia-Morellas*, es decir en los nódulos que son modificaciones de las raíces laterales de la planta hospedera.

4.1 Plantas actinorrizas

Las plantas actinorrizas son arbustos o árboles que habitan diversos ecosistemas y se adaptan a condiciones ambientales extremas como suelos salinos y terrenos pantanosos. Son plantas que crecen rápidamente y son pioneras en las primeras etapas de sucesiones vegetales. Se han descrito hasta ahora 270 especies de plantas (Swensen y Mullin, 1997) pertenecientes a 25 géneros (Lancelle y Torrey, 1985; Huss – Danell, 1997) de 8 familias (McEwan y Gatherer, 1999; Berry, 1994), a diferencia de las leguminosas que pertenecen a una sola familia y a un género de la familia Ulmaceae (Benson y Silvestre, 1993).

El significado de la simbiosis actinorrízica en el presupuesto del nitrógeno global es ante todo ecológico, es decir, cumplen un papel ecológico en el balance global del nitrógeno, las tasas de fijación de nitrógeno en los nódulos de los generos *Alnus* y *Elaeagnus* (10-90 $\mu\text{mol g}^{-1}$ (f.w.) h^{-1} etileno como acetileno reducido) son mas altas que las tasas obtenidas en las leguminosas como las arvejas y la soya (Berry, 1994), las tasas anuales estimadas de acumulación de nitrógeno en los géneros de las actinorrizas están dentro de los mismos rangos de muchas leguminosas (40-350 kg ha^{-1}) (Torrey, 1978 citado en Berry, 1994).

Tienen importancia económica como productoras de madera y de leña, la mayoría habita las zonas templadas. Las cantidades de nitrógeno fijadas por estas plantas son usualmente mayores que las cantidades fijadas por las leguminosas (Schwencke y Carú, 2001).

La capacidad de adaptación de estas plantas a suelos marginales, está seguramente relacionada no sólo a su capacidad de autoabastecerse de nitrógeno, a través de su simbiosis con *Frankia*, sino también a que se asocia hongos endo y ectomicorrízicoz; simbiosis que le provee de muchos nutrientes, sobre todo fósforo (Schwencke y Carú, 2001); es decir, dichas plantas son capaces de formar varios y diferentes asociaciones con microorganismos del suelo.

4.1.1 *Morella pubescens* Humboldt et Bonpland ex Willd

4.1.1.1 Aspectos botánicos



Figura 1. Plántula de Laurel de Cera (*Morella pubescens*)

Morellaceae Blume (1829) es una familia de árboles y arbustos tradicionalmente ubicada dentro de la subclase Hammamelidae de las Dicotiledóneas y dentro de su propio orden, las Morellales (Cronquist 1981, 1988, Takhtajan 1997 citado en Parra 2003). Cronquist (1981) sugirió que la familia estaba relacionada con otras familias dentro de los órdenes Juglandales y Fagales, estos últimos también pertenecientes a Hammamelidae. En la actualidad, la evidencia molecular y los nuevos análisis filogenéticos proponen que la clase Hammamelidae es un grupo parafilético y Morellaceae (que es considerada monofilética), es agrupada en el orden Fagales contenido en el grupo “Eurosids I” de las “Rosids”, que a su vez están contenidas en el gran grupo de las ‘verdaderas dicotiledóneas’ (“Tricolpates”) (Judd et al. 1999 citado en Parra 2003).

En Colombia son conocidas con el nombre de "laurel de cera" u "Olivo de cera", porque sus frutos producen una gran cantidad de cera (Parra, 1998)

4.1.1.2 Distribución geográfica

La familia Morellaceae es de origen holártico, de las zonas templadas y frías septentrionales. Fue dispersado al Sur de América y Africa y actualmente cuenta con más de 50 especies con distribución cosmopolitana, a excepción de Australia y Nueva Zelanda (Pinzon, 1997).

Las especies de *Morella pubescens* y *Morella parvifolia* son endémicas en Suramérica; *Morella pubescens* se distribuye desde Nicaragua hasta Bolivia y *Morella parvifolia* desde Colombia hasta Ecuador. En Colombia se encuentran en la franja altitudinal comprendida entre los 1700 y 2990 m.s.n.m. en el subpáramo, bosques secos, bosques muy secos y bosques húmedo montano bajo, donde las temperaturas oscilan entre 12 a 20 °C. Son abundantes en las regiones altas de los Santanderes, Boyacá, Cundinamarca, Tolima, Quindío, Cauca, Nariño y Putmayo (Parra, 2003) (Figura 2).

Pueden encontrarse a orillas de caminos, carreteras, ríos, en el interior o áreas aledañas al bosque (Muñoz y Luna, 2000).

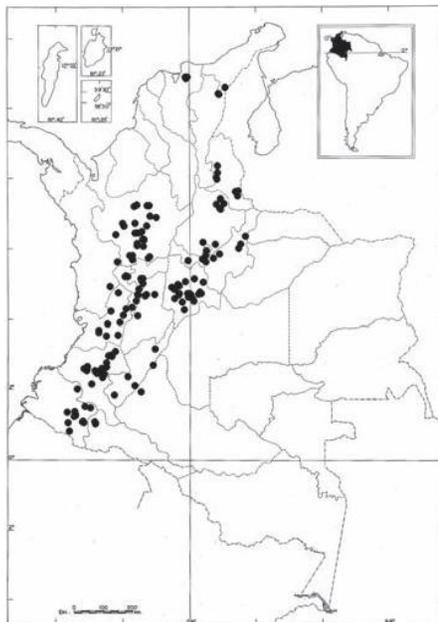


Figura 2. Distribución geográfica en Colombia de *M. pubescens* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) (Tomado de Parra, 2003)

4.1.1.3 Características generales de *Morella pubescens* (Humb. & Bonpl. Ex Willd.) Arbustos o árboles generalmente aromáticos, siempreverdes. Pueden crecer más de 12 m de alto. Tronco corto, lignificado de más de 30 cm de diámetro. Copa de forma redondeada; follaje denso verde, algo brillante, persistente; ramificación a 1 m., simpódica, desigual, torcido, de sección circular; ritidoma de intenso marrón, muy delgado, que al picarlo salta fácilmente; lenticelas lineares, subcirculares, medianas, ordenadas en filas horizontales, abundantes y conspicuas en la corteza muerta; ramas horizontales a decumbentes; ramitas terminales tiernas, irregulares, verde marrón y subverticiladas, sistema radicular profundo y abundante (Parra, 1998). (Figura 3).

Presenta hojas simples; de más o menos 9 cm de largo; alternas, enteras, dentadas, o de borde aserrado. Generalmente sin estípulas; coriáceas, rugosas, con peciolo corto, acanalado y nerviación marcada por el envés, con glándulas vesiculares llenas de un aceite esencial. Es monoica, las flores femeninas son aperianteas, sésiles en las axilas de las brácteas, rojizas, de 2 mm de diámetro, agrupadas y pequeñas; las flores masculinas hacia la base de la inflorescencia y las femeninas hacia el ápice con 2 estigmas; en lugar de cáliz y corola poseen unas piezas escamosas (Pinzon, 1997). (Figura 3)

Flores femeninas, ovoideas o cilíndricas; ovario súpero, unilocular, el estilo tiene 2 cortos estigmas filiformes; bifurcados; sin discos; sésiles comprimido en 2 carpelos fusionados, el cual forma un simple lóculo con un óvulo solitario; erecto u ortótropo, más o menos basal (Pinzon, 1997). Frutos en drupas, redondos (diámetro 5 mm) de color gris; exocarpo de consistencia granulosa, frecuentemente cubierto con cera y papilas suculentas o glándulas olorosas, simples con el endocarpo endurecido a modo de hueso, el cual recibe el nombre de pireno y en cuyo interior se encuentra una semilla pequeña, globosa (Parra, 1998).

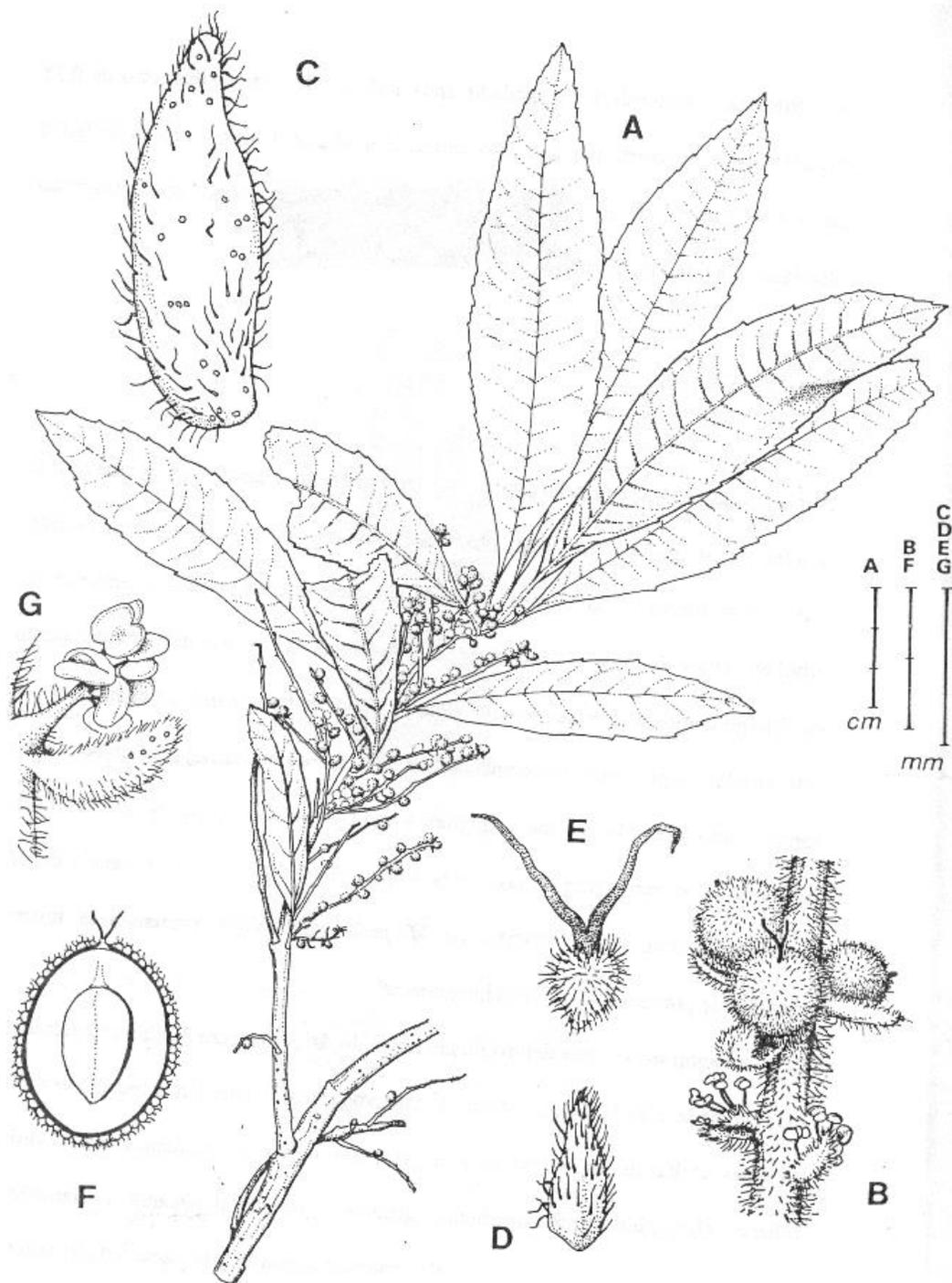


Figura 3. *Morella pubescens* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) Wilbur. **A**, rama con flores y frutos; **B**, inflorescencia, flor masculina y frutos; **F**, corte longitudinal del fruto; **C**, bráctea principal de la flor femenina; **D**, bráctea secundaria de la flor femenina; **E**, ovario y estigma; **G**, detalle de la flor masculina [H. García-Barriga & R. Jaramillo-M. 20751 (COL)]. (Tomado de Parra, 2003)

4.1.1.4 Usos

Ecológicos: por ser fijadora de nitrógeno sirve para la recuperación de suelos, control de erosión, retención de taludes, soporta sequía y se adapta en pendientes acusadas. Se recomienda para la protección de riberas. Alimento para fauna silvestre (Elias, 1971).

Industriales: de sus frutos se extrae cera que se utiliza en la fabricación de velas, jabones y materia prima para betunes y barnices; fotograbados, grabado de metales, fundición de metales y limpieza de metales; moldes para dentistería; lacado de muebles; recubrimiento de quesos y para la elaboración de granulados alimenticios (Rodríguez, 1993). Ayuda a la purificación y dureza de la panela. Las hojas se utilizan como condimento para estofados y sopas (Elias, 1971).

Religiosos: Para sahumerios (Parra, 1998) y para la construcción de la cruz de mayo, con una amplia aceptación religiosa.

Medicinales: las raíces o la corteza del laurel tomadas en infusiones en cantidades moderadas son astringentes y ayudan a combatir las diarreas; si se toma en grandes cantidades, sirve como emético. La corteza en forma de polvo o en cocción se usa para tratamientos de inflamaciones, úlceras y otros problemas internos (Elias, 1971).

Otros: ornamental, para antejardines, parques, separadores, avenidas y plazas (Parra, 1998). Los huesecillos de las pepitas, después de extraída la cera, son buen abono para los jardines y árboles frutales. Se usa para leña y elaboración de carbón vegetal.

4.2 *Frankia*

Frankia es una bacteria Gram-positiva filamentosa con una composición de su ADN de 70% de guanina más citosina, es una bacteria microaerófila que utiliza nitrógeno atmosférico (N₂) para crecer y es absolutamente aeróbica cuando se le proporciona nitrógeno combinado (NH₃) en medio de cultivo (Schwencke y Carú, 2001).

Cuando crece en medio de cultivo *Frankia* se caracteriza por desarrollar tres estructuras características: hifas, vesículas y esporangios (Benson y Silvestre, 1993). En simbiosis no siempre se desarrollan esporangios y vesículas; eso depende de la planta hospedera con la que se lleva a cabo la simbiosis.

Este estudio morfológico y estructural se enfatiza específicamente en la simbiosis, es decir en los nódulos.

4.2.1 Estructuras características de *Frankia* en simbiosis Cuando *Frankia* crece en medio de cultivo se caracteriza por desarrollar tres estructuras: hifas, vesículas y esporangios, pero en simbiosis la planta hospedera juega un papel significativo en la modificación de la estructura de *Frankia* como la presencia o ausencia de esporangios o en el tamaño, forma y presencia o ausencia de vesícula (Benson y Silvestre, 1993). Este marco teórico se centra en las características de dichas estructuras en simbiosis.

Todas las estructuras de *Frankia* dentro de las células hospederas son envueltas en una “cápsula” del tipo pared celular derivada del plasmalema y de la pared celular del hospedero (Berry y Torrey, 1983; Berry et al., 1986; Berg, 1990).

Hifas: La fase vegetativa de *Frankia* se caracteriza por el desarrollo de hifas filamentosas, ramificadas y septadas, formando un micelio cuando crece en medio de cultivo (Benson y Silvester, 1993). La estructura de la hifa consiste de una pared celular de dos capas, con septaciones que se originan de la capa interna (Newcomb y Susan, 1987). La composición de las paredes celulares de *Frankia* son del tipo III (Lechavalier y Lechavalier, 1990). Las

hifas pueden tener un diámetro de 0.5 a 1.5 μm (Torrey y Callaham, 1982). Se dice que las hifas son invasivas cuando penetran las paredes celulares del hospedero por medio de la degradación enzimática. (Van, 1999).

Vesículas: Su función es la de ser la estructura en la que se fija el nitrógeno por medio de la nitrogenasa (Benson y Silvester, 1993). Su forma depende del tipo de planta hospedera, por ejemplo, en *Alnus* y *Elaeagnus* son esféricas, alargadas y septadas, en *Rosaceae* y *Ceanothus* son elípticas y no septadas; en *Coriaria*, *Morella* y *Comptonia* son alargadas pero abultadas en el extremo terminal y septadas (Newcomb y Susan, 1987). Pueden presentar diámetros de 1.5 a 2.0 μm , las prevesículas que se desarrollan en vesículas maduras no presentan septos (Torrey y Callaham, 1982). Las vesículas se caracterizan por presentar una envoltura lipídica formada por lamelas de 3 a 5 nm, cuando la presión de oxígeno dentro de la célula hospedera aumenta, las vesículas generan mas capas lipídicas para proteger la nitrogenasa (Berry, 1994). Cuando se observan fotomicrografías de células hospederas infectadas por *Frankia* que presentan vesículas, a veces se puede ver que la vesícula está rodeada por un espacio vacío (Figura 4), este espacio vacío presumiblemente se forma por la pérdida de capas lipídicas en el proceso de la fijación de la muestra para estudios ultraestructurales (Lancelle et al., 1985 citado en Newcomb y Susan, 1987). En la figura 3 se observan las estructuras características de las vesículas de *Frankia* .

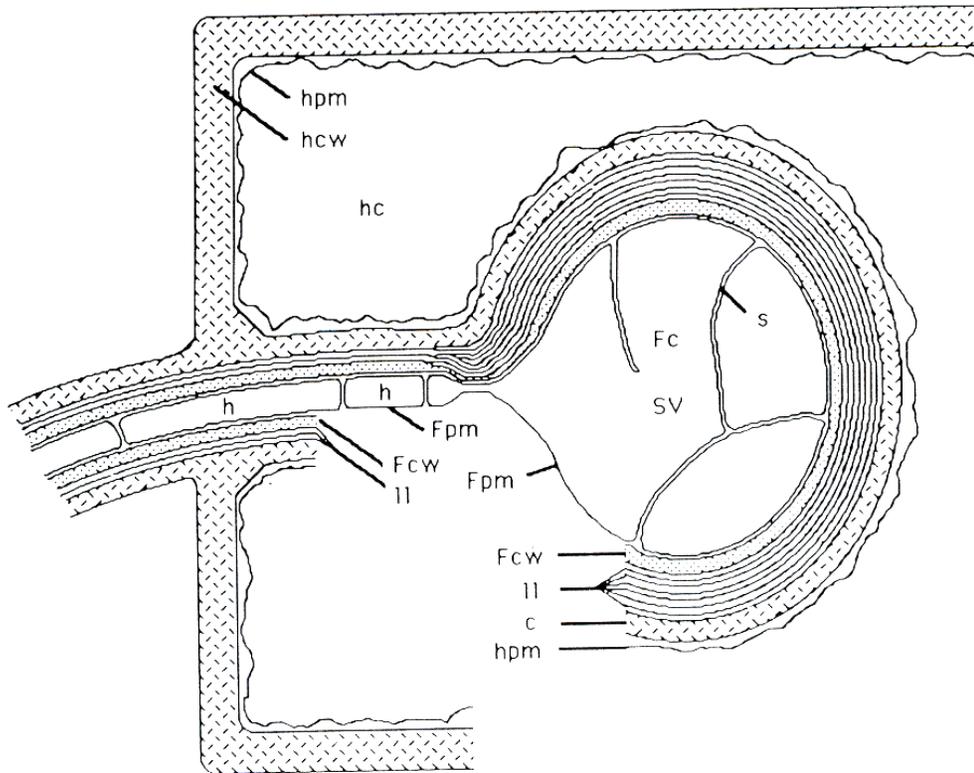


Figura 4. Dibujo sistemático de una célula de nódulo de *Alnus* infectada con una hifa (**h**) de *Frankia* y una vesícula simbiótica (**SV**). **hcw**, pared celular del hospedero; **hpm**, membrana plasmática del hospedero; **hc**, citoplasma del hospedero; **c**, capsula (originada del hospedero); **ll**, lámina lipídica; **Fcw**, pared celular de *Frankia*; **Fpm**, membrana plasmática de *Frankia*; **s**, septo; **Fc**, citoplasma de *Frankia*. Para simplificar la figura, el tamaño relativo de varias estructuras no está dibujado a escala. Basado en datos de Newcomb and Word (1987) y Abeysekera et al. (1990). (Tomado de Huss Danell, 1990).

Esporangios: Estas estructuras son generadas en cultivo por todas las cepas de *Frankia*, la esporulación ocurre en algunos nódulos de las plantas actinorrizas; especialmente en *Morella* y en *Alnus* (Schwintzer, 1990; Torrey, 1987). Los esporangios en simbiosis presentan formas circulares, cilíndricas o formas irregulares (Newcomb et al., 1978), son estructuras terminales de las hifas o intercalares, con paredes celulares internas gruesas (Newcomb y Wood, 1987).

4.2.2 Taxonomía, especificidad del hospedero y fisiología de *Frankia* En 1970 Becking redefinió el género *Frankia* (Becking, 1970 citado en Lechevalier, 1984) como procariotes

dentro del orden de los Actinomicetales (Kalakoutskiip y Agre, 1976), son bacterias Gram Positivas, filamentosas y esporulantes (Lechevalier, 1994).

El género *Frankia* es clasificado de acuerdo al manual de Bergey así:

Phylum BXIV	<i>Actinobacteria</i>
Clase I	<i>Actinobacteria</i>
Subclase V	<i>Actinobacteridae</i>
Suborden XIII	<i>Frankineae</i>
Familia I	<i>Frankiaceae</i>
Genero	<i>Frankia</i>

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Frankia*.

De acuerdo a la especificidad de *Frankia* para nodular las plantas, se aceptan actualmente tres grupos llamados “grupos de especificidad hospedero” (Tabla 1)

Grupo especificidad	Cepas ondulantes de:
1	<i>Alnus</i> y <i>Morella</i>
2	<i>Casuarina</i> y <i>Morella</i>
3	<i>Elaeagnus</i> y <i>Morella</i>

Tabla 2. Especificidad hospedera en la simbiosis actinorrízica. (Tomado de Baker, 1987)

Fisiológicamente *Frankia* puede ser separado en dos grupos (Lechevalier, 1984 citado por Perafan, 2005):

Cepas tipo A: son generalmente heterogénicas, relativamente aeróbicas, usan carbohidratos como fuente de carbono, y usualmente no reinfectan sus plantas hospederas.

Cepas tipo B: conocidas también como bacterias del grupo I, están serológicamente, genéticamente, y químicamente relacionadas (Lechevalier, 1984 citado por Perafán, 2005). Son poco tolerantes al oxígeno, usan pocos carbohidratos y son reinfectivas – capaces de

formar nódulos – y efectivas – capaces de fijar nitrógeno atmosférico – en sus plantas hospederas (Lechevalier y Lechevalier, 1986 citado por Perafán, 2005).

4.3 MORFOLOGÍA Y ANATOMÍA DE LOS NÓDULOS ACTINORRÍZICOS

MORFOLOGÍA

Un nódulo actinorrízico se forma de múltiples unidades estructurales llamadas “lóbulos nodulares”, dichos nódulos son perennes como en *Morella* o cubiertos por una cutícula como los nódulos de *Alnus* y tienen apariencia coraloide. Dependiendo de la planta hospedera y de las condiciones ambientales los nódulos pueden medir de 1cm a 5 cm de diámetro. Los lóbulos nodulares actinorrizicos son raíces laterales modificadas (Baker y Schwintzer, 1990). Dentro del nódulo, *Frankia* infecta solamente las células corticales (Newcomb y Wood, 1987), el primordio que da origen a los lóbulos se forma en el periciclo a diferencia de las leguminosas que se forma en el córtex (Newcomb y Wood, 1987). Dependiendo de la presencia o ausencia de raicillas que se originan solamente en los lóbulos maduros se dice que los nódulos son tipo *Morella* cuando las poseen y tipo *Alnus* si no las tienen (Newcomb y Susan, 1987). En *Morella* los lóbulos no se encuentran tan compactados como en *Alnus*.

Anatomía

Si un lóbulo nodular radicular actinorrízico es una raíz lateral modificada se entiende que la disposición o arreglo de los tejidos son similares, es decir tienen una estele central rodeada por endodermis, células corticales y peridermis o epidermis. La mayoría de las células de cada lóbulo se originan de un meristemo llamado “meristemo lobular nodular” localizado en la terminación distal del mismo (Newcomb y Word, 1987). En el lóbulo las células infectadas más alejadas del meristemo son las más maduras.

4.4 FORMAS DE INFECCIÓN DE *FRANKIA* EN LAS PLANTAS ACTINORRIZAS

No se ha determinado cual es la naturaleza bioquímica del mecanismo de reconocimiento del microsimbionte para llevar a cabo la adhesión a las raíces actinorrízicas (Newcomb y Word, 1987; Diouf y et al., 2003). Sin embargo se han propuesto ciertos tipos de lectinas

como algunas de las moléculas que intervendrán en dichos procesos (Kijne et al., 1992), pero no están claramente identificadas. Dependiendo del tipo de planta hospedera se ha determinado que existen dos formas o caminos de infección: infección vía pelos radiculares y infección vía penetración intercelular.

4.4.1 Infección vía pelos radiculares

Este tipo de forma de infección se presenta en: *Alnus* (Berry et al., 1986), *Morella* y *Comptonia* y *Casuarina* (Callaham et al., 1978). Comienza con la adhesión de *Frankia* a la superficie del pelo radicular, inmediatamente comienza a rizarse; en la superficie de éste se excreta un mucílago que asegura dicha adhesión (Berry y Torrey, 1983; Prin y Rougier, 1987). La hifa tiende a penetrar por una zona plegada debido al rizamiento del pelo radicular, en dicha zona aparecen las paredes celulares primarias con un arreglo alterado de las microbrillas (Berry et al., 1986), la degradación de las paredes celulares de las células del hospedero la lleva a cabo la hifa por medio de hidrólisis con enzimas (Diouf y Diop, 2003). Cuando la hifa penetra las paredes celulares y entran en contacto con el citoplasma de las células, se forma alrededor de ella una envoltura tipo pared celular llamada “capsula”, dicho proceso es denominado “encapsulación” (Berry y Torrey, 1983; Berry et al., 1986), ésta envoltura se compone de celulosa, xylan y es rica en pectinas (Berg, 1990). Cuando la hifa ha penetrado y ha sido encapsulada, las células corticales cercanas a la base del pelo radicular comienzan a dividirse y a presentar hipertrofia, formándose un pequeño abultamiento llamado “prenoludo” (Berry y Sunell, 1990), microscópicamente observable, luego el periciclo es activado mitóticamente para formar el “primordio lobular nodular primario” (Schwencke y Carú, 2001), se pueden originar múltiples primordios lobulares, eso depende de la planta hospedera, cuando uno o más lóbulos maduran se forma el nódulo actinorrízico, se debe aclarar que cuando se origina el prenodulo, simultáneamente el periciclo y endodermo comienzan a originar el primordio lobular nodular primario, entendiendo que estos dos procesos ocurren casi al mismo tiempo se dice que el prenodulo el primordio lobular primario constituyen en conjunto el “nódulo primario”.

4.4.2 Vía penetración intercelular En este caso la hifa penetra la lamela media que se encuentra entre las células de la epidermis o células corticales adyacentes (Miller y Baker, 1986), se presenta en Elaeagnaceae; en los géneros *Ceanothus* y *Cercocarpus* (Berry y Sunell, 1990). La hifa invasiva crece a través de los espacios intercelulares mientras que la epidermis y las células corticales excretan material del tipo pectinasas y proteinasas (Liu y Berry, 1991), formando la “capsula”, aquí no ocurre formación del prenolado, las hifas llegan hasta el periciclo para inducir la formación del “primordio lobular nodular primario” o más, en dicha zona las hifas penetran intracelularmente y son también encapsuladas.

4.5 FORMACIÓN DEL PRENODULO Y DEL LÓBULO NODULAR PRIMARIO

Los primeros estudios morfológicos y estructurales de la formación del prenodulo y del “lóbulo nodular primario”; fueron hechos por Angulo Carmona en 1974 y por Quispel en 1974. En 1977 Callaham y Torrey hicieron estudios del mismo tipo en la planta *Comptonia* (Morellaceae), se aclararon los términos como “nodulo primario”; que para Callaham y Torrey es la equivalencia de “prenodulo”. El problema de dicha conceptualización radicaba en el hecho de que un “nodulo primario” no es un “prenodulo”, pues durante el origen del “nodulo primario” suceden casi simultáneamente el origen de dos estructuras: la formación del “prenodulo” cerca del sitio de infección; caracterizandose por la hipertrofia y división celular de las células corticales cercanas a dicho sitio y casi al mismo tiempo ocurre la estimulación del inicio de la formación de la segunda estructura, el “primordio lobular primario” en el periciclo y endodermo (Berry y Sunell, 1990), es decir, cuando la hifa penetra el pelo radicular (infección vía pelo radicular) y entra en contacto con el citoplasma de las células del hospedero, casi al mismo tiempo el periciclo y el endodermo son estimulados para originar el “primordio lobular primario” por medio de señales moleculares desconocidas, estas dos estructuras conforman el origen del “nodulo primario”. Si el tipo de infección es vía intercelular no ocurre formación de prenodulo, solamente se presenta la formación del “primordio lobular primario”. Conceptualizando se determina que un “prenodulo” se inicia de la proliferación limitada y del hipertrofismo de las células corticales del hospedero cercanas al punto de infección; un “lóbulo nodular primario” es

un primordio que se origina casi simultáneamente en el periciclo y el endodermo, mientras que cerca del punto de infección se está formando el “prenodulo”. Un “nodo primario” incluye el prenodulo y el primordio o todos los primordios originados (Callaham y Torrey, 1977). Se debe aclarar que a partir de un punto de infección se puede estimular el origen de múltiples primordios, eso depende el tipo de planta hospedera (Newcomb y Susan, 1987): 1 primordio es común en *Casuarina* (Torrey, 1997 citado en Newcomb y Susan, 1987), 1-3 es común en *Alnus* (Carmona et al., 1976 citado en Newcomb y Susan, 1987), 1-6 en *Morella gale* y 1-14 en *Comptonia* (Torrey y Callaham, 1979 citado en Newcomb y Susan, 1987). Aclarados dichos conceptos, el proceso de desarrollo del nódulo continua con el desarrollo del primordio lobular primario o más, las hifas comienzan a desplazarse desde la zona del prenodulo hacia el primordio lobular primario en desarrollo, finalmente invaden ésta estructura que madura y finalmente se origina un lóbulo maduro siendo una raíz lateral modificada en la Figura 5 se explica el proceso de infección y origen del prenódulo y del primordio lobular primario. Estudios de Bowes en 1977 y de Schwintzer en 1982, determinaron que en el crecimiento de un lóbulo nodular se presentan dos estados (Newcomb y Susan, 1987). En el primer estado la punta distal del lóbulo se expande y ocurre una división en el grupo de células del meristemo del lóbulo, en el segundo estado a partir de la división en el meristemo en la punta del lóbulo maduro se comienza a dividir en dos nuevos lóbulos (Schwintzer et al., 1982) y la infección de *Frankia* continua por el crecimiento de las hifas desde el lóbulo viejo hacia los nuevos. (Bowes et al., 1977 citado por Newcomb y Susan, 1987).

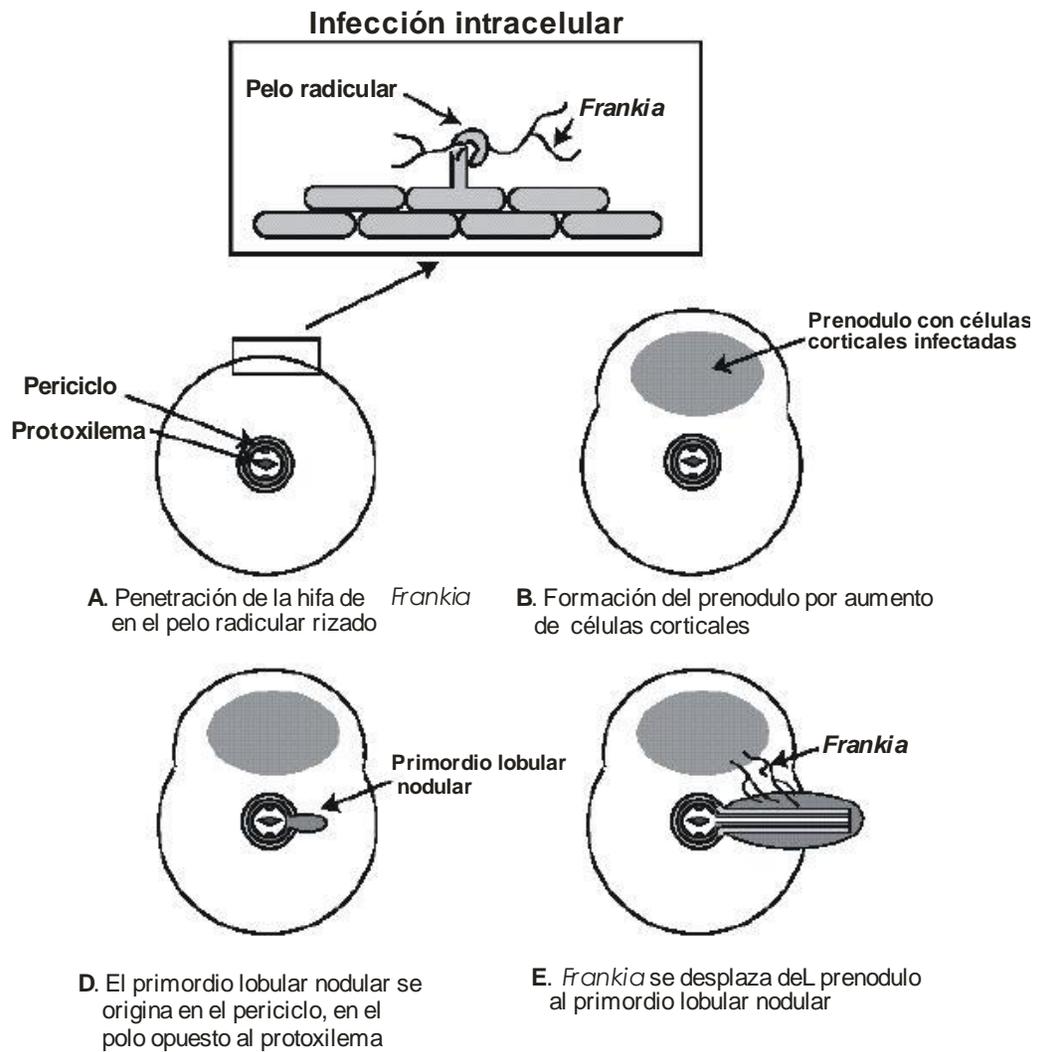


Figura 5. Infección y organogénesis temprana de de un lóbulo nodular en las plantas actinorrizas (Tomado de Obertello et al., 2003).

5. METODOLOGÍA

Las muestras para esta investigación se colectaron en de dos lugares del departamento del Cauca en el mes de febrero y marzo de 2004: vereda La Esperanza (municipio de Sotará) localizada en el flanco occidental de la cordillera central a 2.200 m.s.n.m. presentando un clima de montaña con suelos de cordillera derivados de cenizas volcánicas y temperaturas constantes o inferiores a los 18 °C (Escartín y Ubach, 2004) y Chiribio (Municipio de Popayán), localizado en el flanco occidental de la cordillera central a 2.350 m.s.n.m . presentando un clima de montaña con suelos de cordillera derivados de cenizas volcánicas y temperaturas constantes o inferiores a los 18 °C (Escartín y Ubach, 2004)

Fue relativamente difícil poder encontrar platas de Laurel de Cera noduladas, por planta promedio se encontraban 2 o 3 nódulos, luego de recolectados se transportaban en frío hasta el laboratorio, donde se les removió las partículas de suelo con agitación vigorosa, posteriormente se tomaron fotos en el Estereoscopio (Nikon) y se realizaron las mediciones correspondientes. A continuación los nódulos se fijaron durante 3 días en Glutaraldehído al 2% preparado en Buffer de Fosfato (BP) 0.2M a pH 7.4. Las muestras se almacenaron en el refrigerador (8° C) hasta su procesamiento e inclusión en resina y parafina.

5.1 MICROSCOPIA ÓPTICA DE ALTA RESOLUCIÓN (M.O.A.R.)

Las muestras, una vez pasado el tiempo de fijación con Glutaraldehído, fueron lavadas en Buffer de Fosfato 0.2M pH a 7.4 y posfijadas con Tetróxido de Osmio (OsO_3) 2% en BP 0.2M a pH 7.4, se deshidrataron en alcoholes ascendentes desde 25% a etanol puro y acetona, se infiltraron en resina spurr, para finalmente ser orientadas en moldes de inclusión y dejarlas incubando a 72 °C por 48 horas (Anexo A) (González Santander, 1977). Las muestras se cortaron con cuchilla de vidrio en el ultramicrotomo (Leica) a un espesor de 3 a 5 μm . Los tejidos se tiñeron con Azul de Toluidina durante 30 segundos y se observaron en el Microscopio Óptico de Alta Resolución (Nikon).

5.2. HISTOQUÍMICA

Las muestras fijadas con Glutaraldehido 2% en Cacodilato de Sodio 0.2M a pH 7.2 se deshidrataron en alcoholes ascendentes de 35% hasta etanol puro, posteriormente se infiltraron en Parafina – Formol, parafina pura para luego ser orientadas en moldes con parafina 52° y almacenarlas en el refrigerador (8°C) (Anexo B).

Los cortes de los nódulos radiculares se tiñeron con Azul Mercúrico de Bromofenol (AMB) –que tiñe proteínas en azul– (Anexo C), Safranina –que tiñe cromosomas, nucleolos y paredes celulares en rojo– Verde Rápido – tiñe el citoplasma y otras estructuras– (VR–S) (Anexo D), Lugol (Lu) –que tiñe almidón– (Anexo E) y Permanganato de Potasio (KMNO₄) –que tiñe taninos– (Anexo F). La preparación de los reactivos para realizar la histoquímica de los nódulos del Aliso se realizó según el protocolo y las concentraciones dadas por Jensen (1962). La estandarización de las tinciones se realizó en el Laboratorio de Patología del Hospital Universitario San José. El material se cortó a un espesor de 6µm a 7 µm. Los cortes, previamente desparafinados con temperatura y con xilol, se hidrataron desde alcohol puro hasta alcohol al 35% y una vez teñidos se deshidrataron desde alcohol al 35% hasta alcohol puro para aclararlos con Xilol puro y finalmente montarlos con entelan.

Las muestras para M.O.A.R e histoquímica se procesaron en el Sistema de Análisis de Imágenes Leica Qwin 550, que permite obtener copias de imágenes con formato PCX, y la edición de las fotos se realizó en el Programa de Diseño Gráfico Corel Draw 12[®].

5.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (M.E.T.)

A partir de los bloques obtenidos para M.O.A.R (Anexo A) se obtuvieron cortes de 60nm a 90nm con la cuchilla de vidrio en el Ultramicrotomo Leica, los cuales se recogieron en rejillas y se tiñeron con Acetato de Uranilo y Citrato de Plomo. Para la tinción de las rejillas con las muestras se siguió el protocolo de tinción de muestras para M.E.T.

6. RESULTADOS

6.1 MORFOLOGÍA EXTERNA

Los nódulos de *Morella pubescens* fueron encontrados en los dos sitios descritos en la discusión: vereda La Esperanza y Chiribio. Los nódulos son de color café claro, no tienen cutícula son perennes, se agrupan en forma de coral pero no compactados (Figura 6A), se colectaron nódulos de 0.5 cm a 2.5 cm, se originan desde las raíces laterales (Figura 6B).



Figura 6. Nódulos de *Morella pubescens* infectados por *Frankia* sp, colectados en la vereda La Esperanza. **A.** Se observa la forma coraloide. **B.** Se observa un nódulo originado desde una raíz lateral.

Los nódulos colectados presentan diferentes formas de disposición de sus lóbulos (Figura 7A y Figura 7B) con un diámetro de cada lóbulo de aproximadamente 0,6 cm (Figura 7B) se observa ramificación de dos lóbulos (Figura 7A), o más (Figura 7B). En algunos nódulos se observan raicillas nodulares que se originan desde los lóbulos (Figura 7C).



Figura 7. Nódulos radiculares de *Morella pubescens* infectado por *Frankia* sp, colectado en la vereda La Esperanza. **A.** Lóbulo ramificado en dos. **B.** Nódulo ramificado en 6 lóbulos. (Escala 0.6 cm) **C.** Nódulos con raicillas loburales.

6.2 MORFOLOGÍA INTERNA

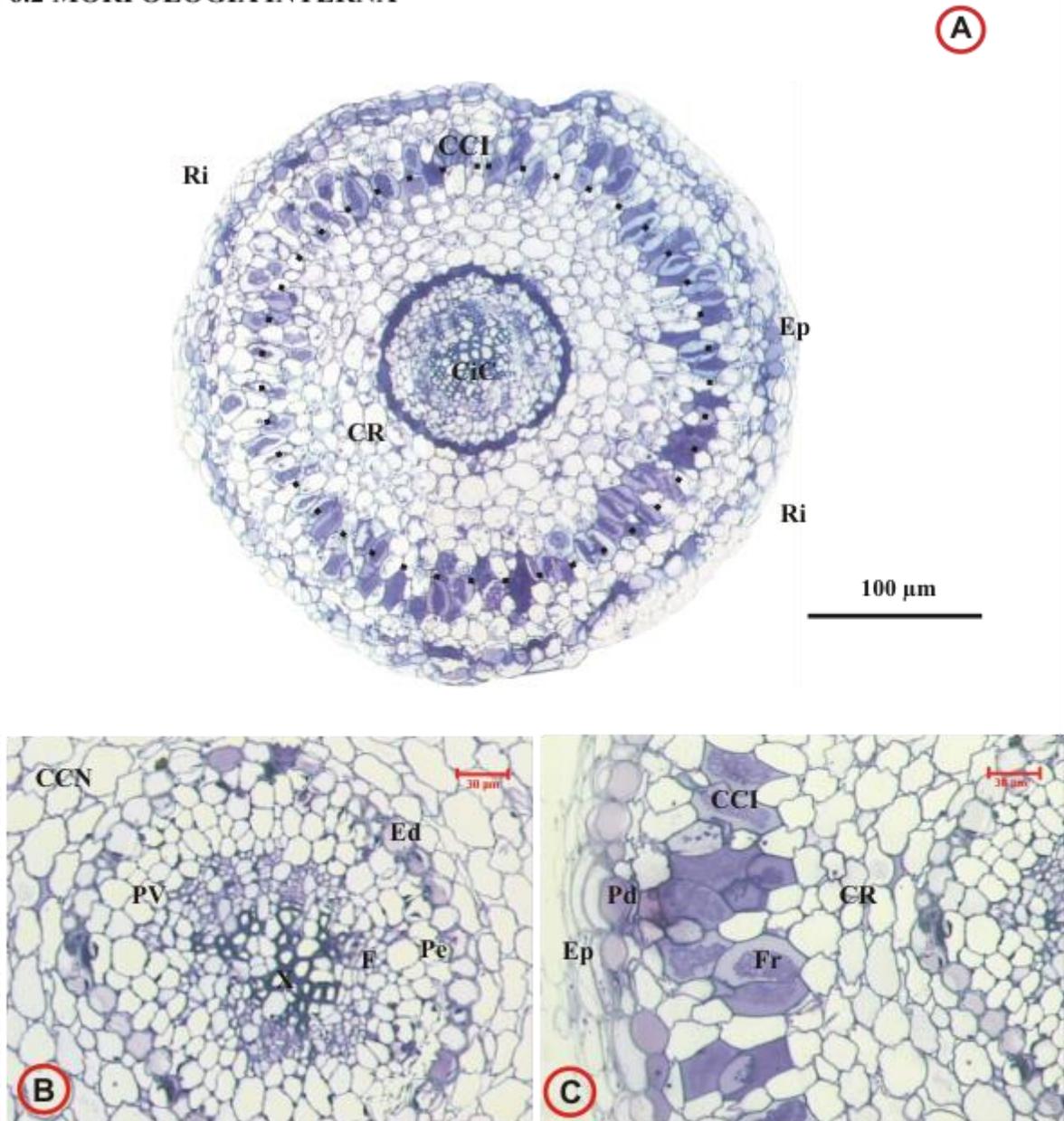


Figura 8. Corte transversal de un lóbulo de nódulo de *Morella pubescens*, colectado en la vereda La Esperanza - Sotará, teñido con Azul de Toluidina. **A.** Vista panorámica del tejido donde se observa, **Ri**: Rizósfera, **Ep**: Epidermis, **CCI**: Células Corticales Infeccionadas. El cilindro punteado muestra la disposición de las células infectadas, **CR**: Cortex Radicular, **CiC**: Cilindro Central. **B.** Detalle del Cilindro Central, **CCN**: Células Corticales Normales, **Ed**: Endoderma, **Pe**: Periciclo, **X**: Xilema, **F**: Floema, **PV**: Parénquima Vascular. **C.** Detalle del Córteix Radicular y la Epidermis, **CR**: Cortex Radicular, **Ep**: Epidermis, **Pd**: Peridermis, **CCI**: Células Corticales Infeccionadas, **Fr**: *Frankia*.

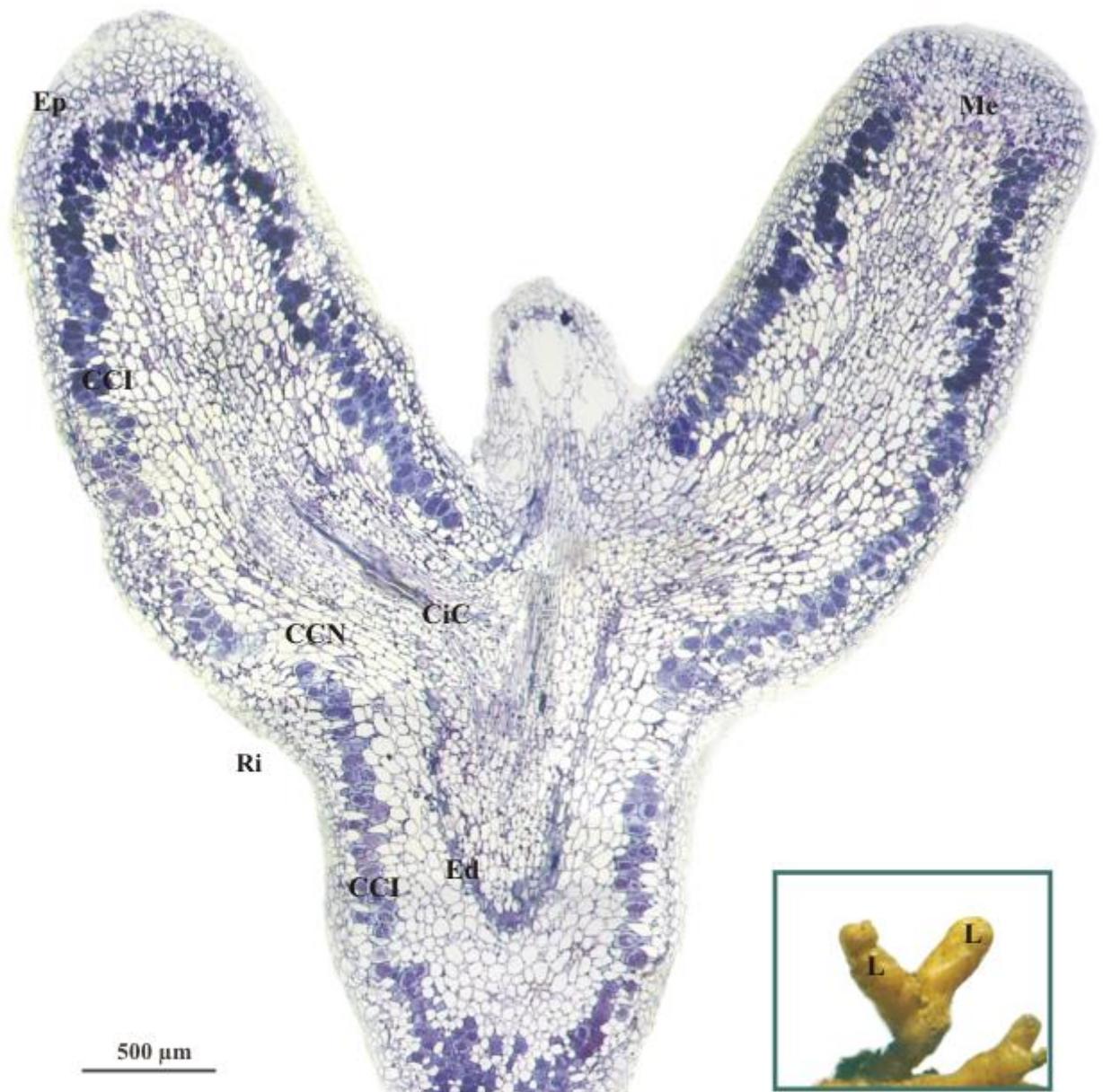


Figura 9. Corte longitudinal de nódulo de *Morella Pubescens*, colectado en la vereda La Esperanza - Sotará, teñido con Azul de Toluidina, se observa, **Ep:** Epidermis, **CCI:** Células Corticales Infeccionadas, **CCN:** Células Corticales Normales, **Ed:** Endodermo, **CiC:** Cilindro Central, **L:** Lóbulo, **Me:** Meristemo, **Ri:** Rizósfera.

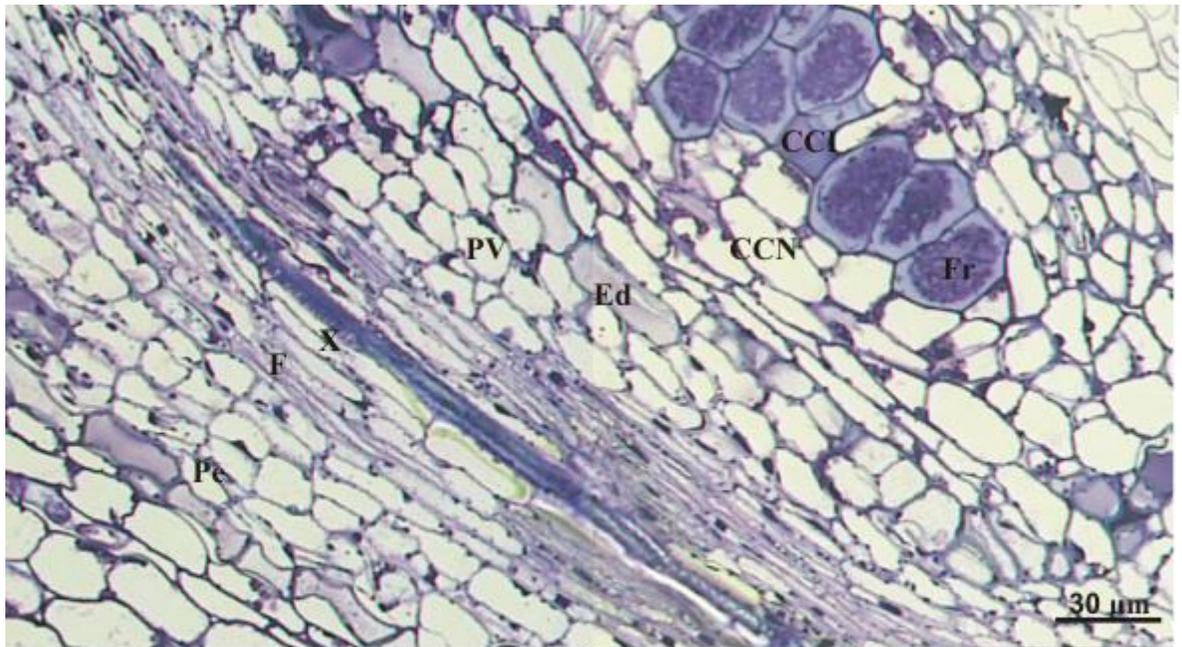


Figura 10. Corte longitudinal de nódulo de *Morella pubescens*, colectado en la vereda La Esperanza- Sotará, teñido con Azul de Toluidina. Se observa en detalles el Cilindro Central. X: Xilema, F: Floema, Pe: Periciclo, Ed: Endodermo, CCI: Células Corticales Infectados, CCN: Células Corticales Normales, PV: Parénquima Vascular, Fr: *Frankia*.

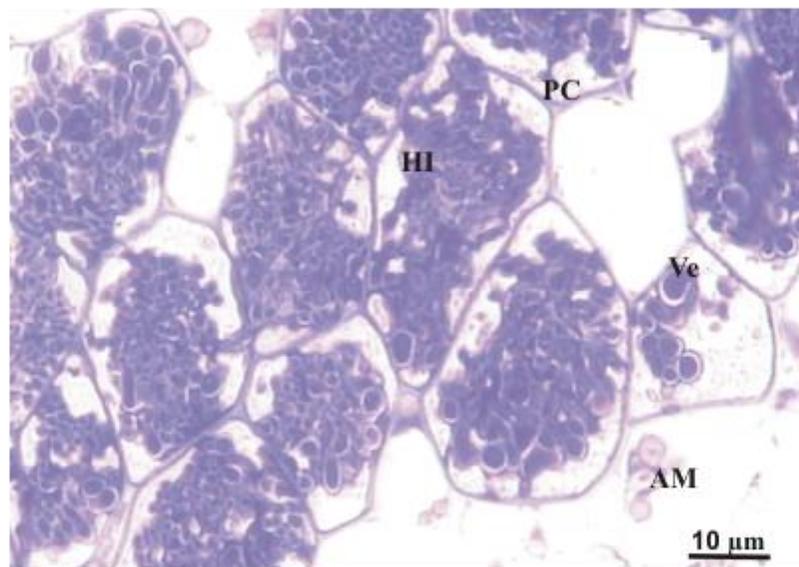


Figura 11. Corte longitudinal de nódulo radicular de *Morella pubescens*, colectado en La vereda la Esperanza - Sotará, teñido con Azul de Toluidina. Se observa PC: Pared Celular, Ve: Vesículas, HI: Hifa, AM: Amiloplastos.

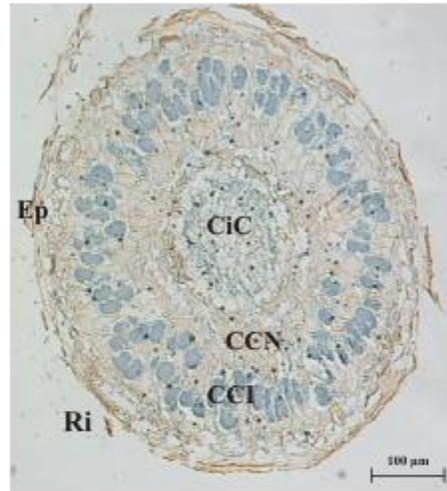


Figura 12: Prueba histoquímica Azul Mercúrico de Bromofenol de lóbulo de nódulo de *Morella pubescens*, colectado en la vereda La Esperanza - Sotará, corte transversal, se observa el alto contenido de proteínas (color azul) de las células corticales infectadas a diferencia de las células corticales no infectadas. **Ep:** Epidermis, **CCI:** Células Corticales Infectadas (color azul) , **CCN:** Células Corticales Normales, **CiC:** Cilindro Central, **Ri:** Rizósfera.

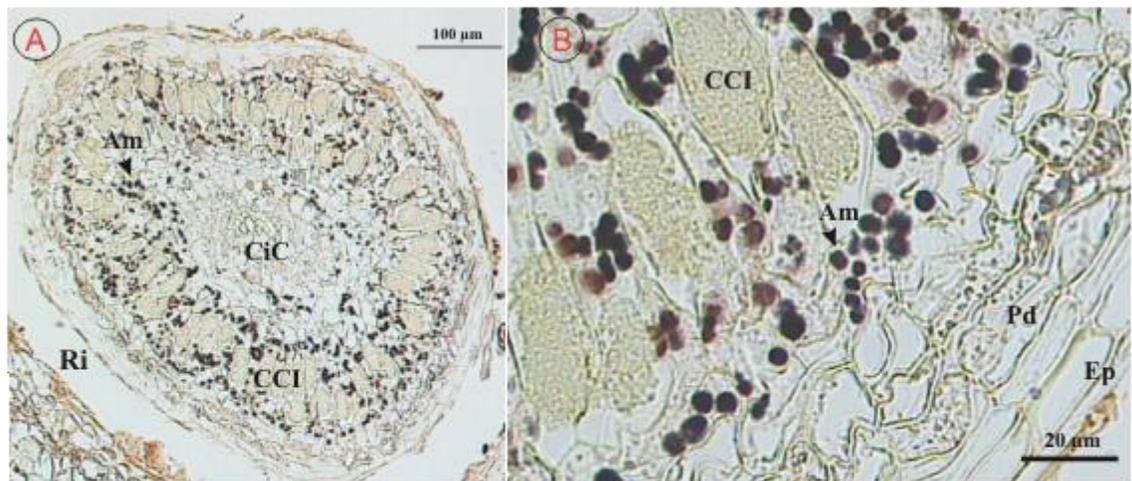


Figura 13: Prueba histoquímica con Lugol de nódulo de *Morella pubescens*, colectado en la vereda La Esperanza - Sotará, muestra la gran cantidad de Amiloplastos alrededor de las células infectadas. **A.** Corte transversal, se observa, **Am:** Amiloplastos (color marrón), **CCI:** Células Corticales Infectadas, **CiC:** Cilindro Central. **B.** Ampliación, se observa, **CCI:** Células Corticales Infectadas, **Ep:** Epidermis, **Pd:** Peridermis, **Am:** Amiloplastos, **Ri:** Rizósfera.

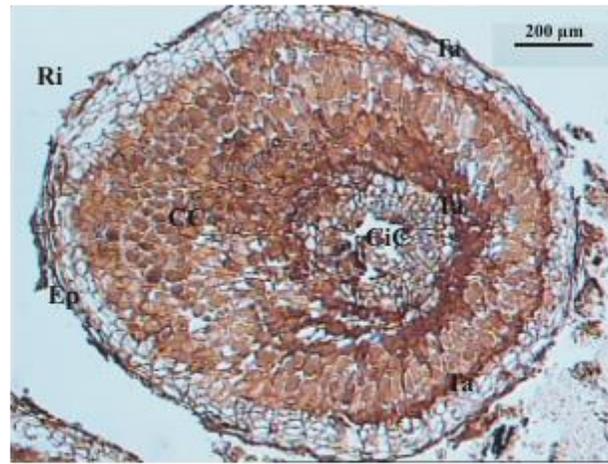


Figura 14. Corte transversal de lóbulo de nódulo de *Morella pubescens*, colectado en la vereda La Esperanza - Sotará, teñido con $KMNO_3$, se observan anillos de taninos entre la epidermis y el córtex y otro entre el córtex y el cilindro centra. **Ep:** Epidermis, **CiC:** Cilindro Central, **CC:** Células Corticales, **Ta:** Taninos, **Ri:** Rizósfera.

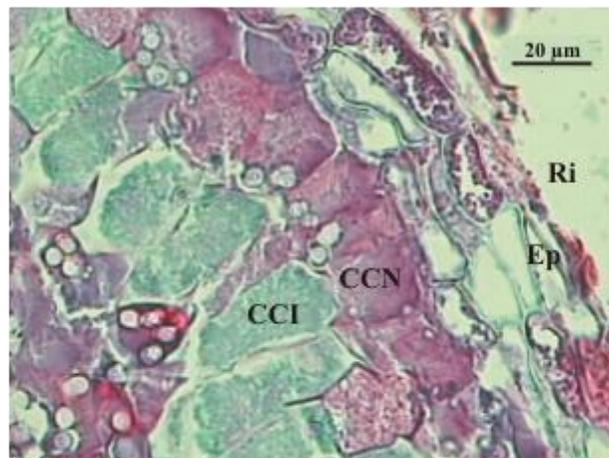


Figura15. Corte transversal de lóbulo de nódulo de *Morella pubescens*, colectado en la vereda La Esperanza - Sotará, teñido con Verde Rápido - Safranina, se observa en verde las células infectadas indicando el alto contenido de material de replicación , a diferencia de las otras células del córtex no infectadas en tonos rojos mostrando un alto contenido de citoplasma. **Ri:** Rizósfera, **Ep:** Epidermis, **CCN,** Células Corticales Normales, **CCI:** Células Corticales Infectadas.

400 μm

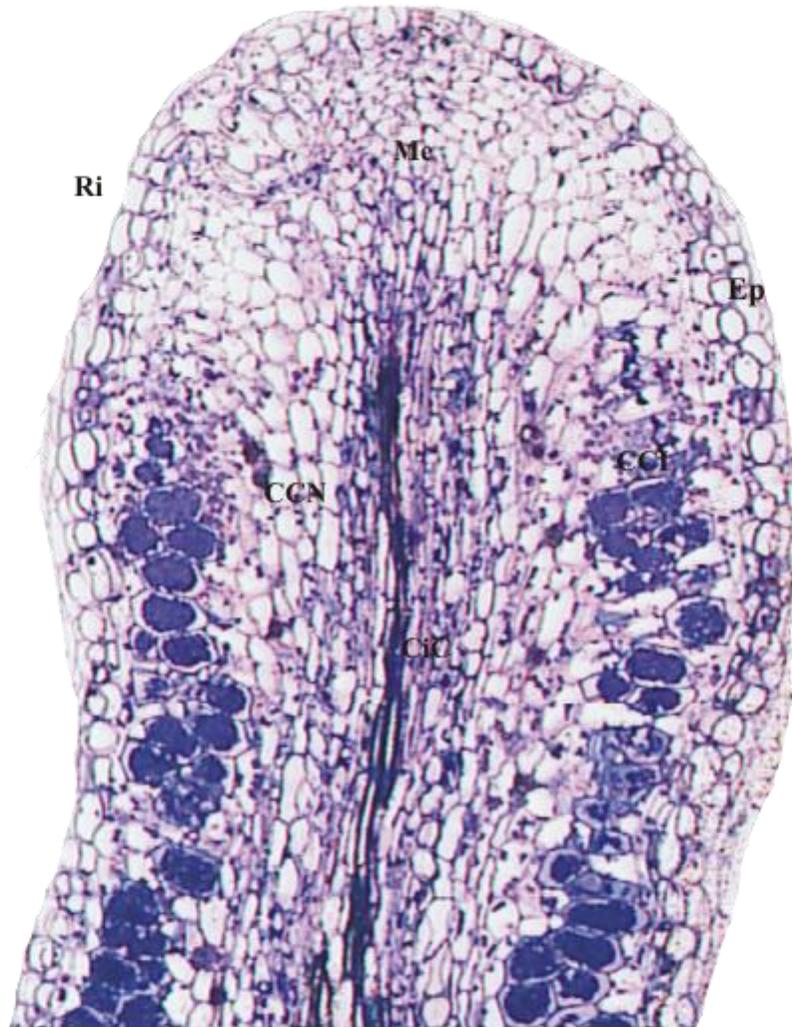


Figura 16. Corte longitudinal de lóbulo de nódulo de *Morella pubescens*, colectado en Chiribio, teñido con Azul de Toluidina, se observa **CiC**: Cilindro Central, **CCI**: Células Corticales Infectadas, **Ri**: Rizósfera, **CCN**: Células Corticales Normales, **Me**: Meristemo, **Ep**: Epidermis.

ULTRAESTRUCTURA

La figura 17 corresponde a una fotomicrografía de un corte longitudinal de una célula cortical de *Myrica* infectada por *Frankia*, se observan las estructuras características de dicha bacteria en simbiosis.

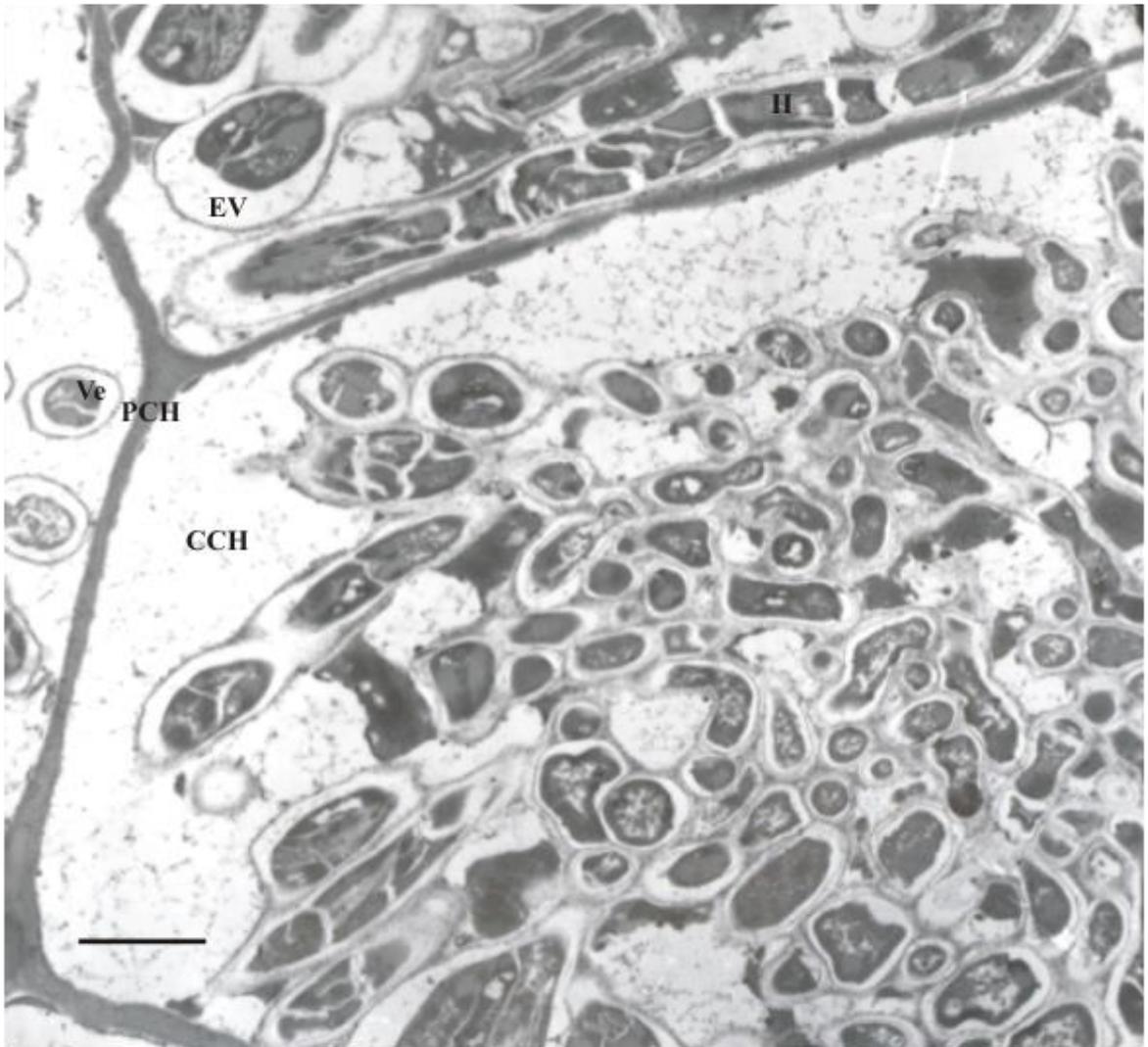


Figura 17. Fotomicrografía electrónica de una célula cortical de *Morella pubescens* Humboldt et Bonpland ex Willd, corte longitudinal, colectado en la vereda la Esperanza - Sotará, infectada por el actinomiceto *Frankia*. Se observan vesículas (Ve), hifas (H), citoplasma de la célula del hospedero (CCH), pared celular del hospedero (PCH) y el espacio vacío que se forma alrededor de algunas vesículas (EV). Escala 2 μ m.

La figura 18 corresponde a una fotomicrografía de un corte longitudinal de una célula cortical de *Morella pubescens* infectada por *Frankia*, se observa una hifa (*) penetrando la pared celular de la célula cortical del hospedero.

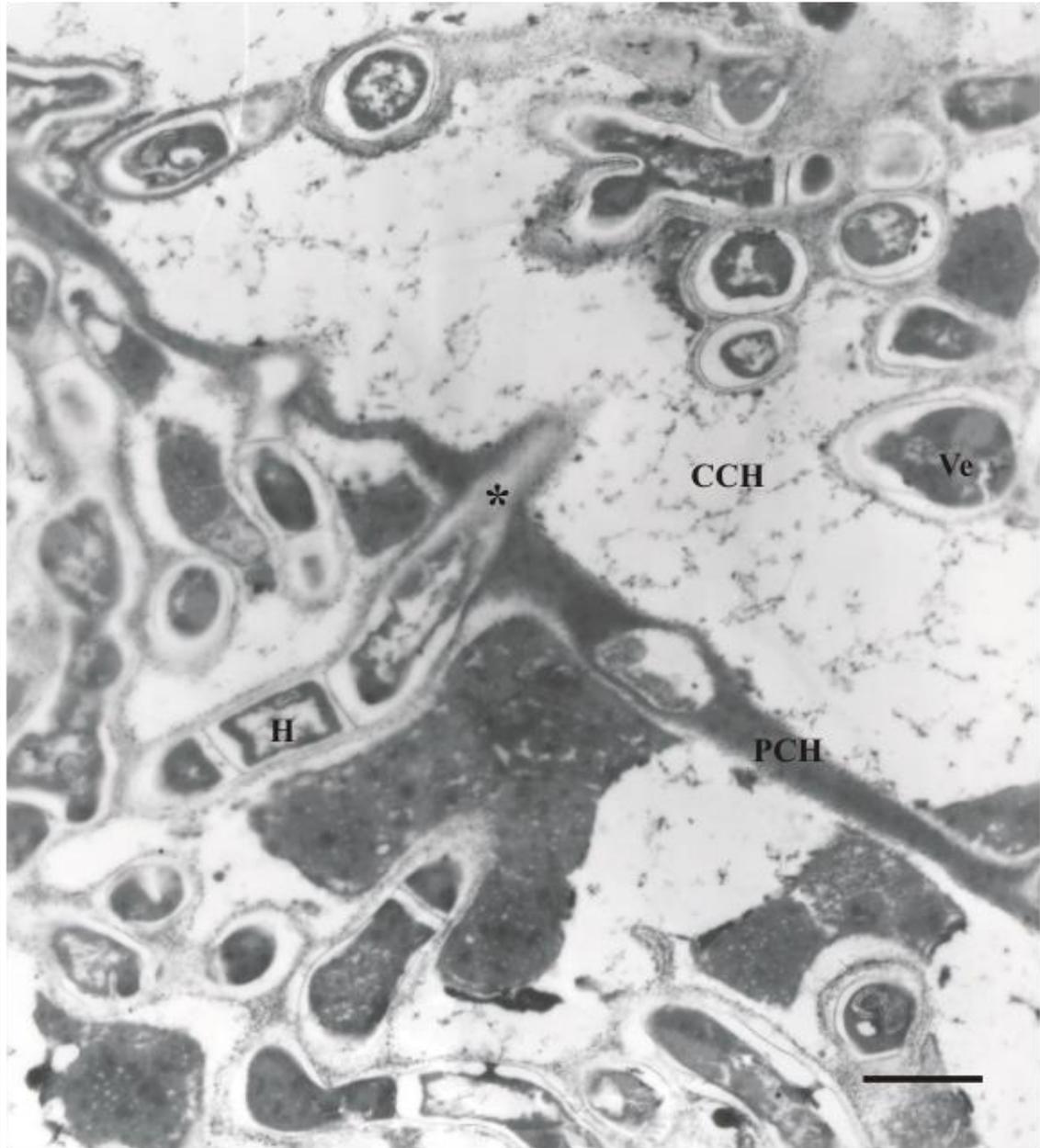


Figura 18. Fotomicrografía electrónica de una célula cortical de *Morella pubescens* Humboldt et Bonpland ex Willd infectada por el actinomiceto *Frankia*, corte longitudinal, colectado en la vereda la Esperanza - Sotará. Se observan vesículas (Ve), citoplasma de la célula del hospedero (CCH), pared celular del hospedero (PCH) y una hifa (H) penetrando la pared celular del hospedero (*). Escala 1 μ m.

La figura 19 corresponde a una fotomicrografía de un corte longitudinal de una célula cortical de *Morella pubescens* infectada por *Frankia*, se observan las vesículas maduras presentando septaciones internas.



Figura 19. Fotomicrografía electrónica de una célula cortical de *Morella pubescens* Humboldt et Bonpland ex Willd infectada por el actinomiceto *Frankia*, corte longitudinal, colectado en la vereda la Esperanza - Sotará. Se observan vesículas maduras (Ve), septaciones de la vesícula (SV), citoplasma de la célula del hospedero (CCH), pared celular del hospedero (PCH), el espacio vacío que se forma alrededor de algunas vesículas (EV), membrana vesicular externa (MVE) y membrana vesicular interna (MVI). Escala 2 μ m.

7. DISCUSIÓN

Este estudio se enfocó en la caracterización de los cambios estructurales y morfológicos que se presentan en el proceso de desarrollo de los nódulos de la simbiosis *Frankia – Morella Pubescens*, se lograron determinar los aspectos más generalizados, ya que se presentaron problemas para la obtención de nódulos en diferentes estados de desarrollo, un lóbulo nodular radicular es una raíz lateral modificada (Baker y Schwintzer, 1990) por lo tanto el proceso de desarrollo estructural y morfológico es similar al de una raíz lateral, un estudio profundo de este tipo requiere muestras a partir de cultivo *in vitro* para que los análisis puedan ser continuos y certeros. Sin embargo por medio de los resultados obtenidos se llega a un entendimiento general del fenómeno.

Los nódulos de la simbiosis *Frankia – Morella pubescens* presentan el patrón de desarrollo y crecimiento de los nódulos tipo *Morella* (Newcomb y Susan, 1987); se originan vía infección pelo radicular (Callaham et al., 1978), de un punto de infección se originan uno, dos o mas primordios lobulares (Torrey y Callaham, 1979 citado en Newcomb y Susan, 1987) que crecen por expansión de la punta distal del lóbulo y se ramifican por la división del meristemo (Schwintzer et al., 1982) (Figura 16), presenta raicillas nodulares (Newcomb y Susan, 1987), son perennes y sus nódulos no se compactan entre ellos como los de *Alnus*.

La forma o disposición de los lóbulos de los nódulos es variable (figura 7) en donde se observa una parte de nódulo con cuatro lóbulos que se originan desde un mismo punto basal, esto indica que se formaron cuatro primordios lobulares en dicho punto a partir del periciclo (Berry y Sunell, 1990). El proceso de origen y desarrollo de un nódulo en la simbiosis *Frankia – Morella Pubescens* a partir de la infección de un pelo radicular se puede resumir en tres fases: penetración de *Frankia* vía pelo radicular, estimulación del origen del prenódulo a partir del periciclo (Callaham et al., 1978), y desarrollo y maduración del nódulo, esta última fase incluye el crecimiento de los lóbulos que se da en dos fases;

expansión de la punta distal del lóbulo (Figura 16) y la división del meristemo lobular en dos para ramificarse en dos o mas lóbulos (Schwintzer et al., 1982). Los nódulos de *Frankia-Morella* presentan un patrón de desarrollo del tipo nódulo *Morella*, presentado raicillas nodulares (Figura 7C), se ramifican en dos o mas lóbulos y el arreglo general de los mismos no es compacta como los nódulos tipo *Alnus* (Figura 6) (Newcomb y Susan, 1987).

A nivel de morfología interna se observa que *Frankia* se distribuye en la parte media del córtex formando un anillo entre el cilindro central y la epidermis. En la figura 8 se puede observar claramente el cilindro central con floema y un xilema de paredes celulares engrosadas, el endodermo caracterizado por el engrosamiento de la pared celular y su notable tinción, las células corticales infectadas y las no infectadas, presentado un patrón de arreglo en el lóbulo más ordenado que en *Alnus*, pues la disposición del tejido infectado por *Frankia* en Aliso esta limitado a la región del córtex, teniendo preferencia por las células corticales (Lalonde y Knowles, 1975 citado en Perafan, 2005) y se sitúan alrededor del cilindro central en forma desorganizada (Perafan, 2005).

La figura 15 muestra claramente el meristemo localizado en la punta distal del lóbulo que se caracteriza por presentar células amorfas relativamente pequeñas, alrededor del meristemo se notan células corticales y del cilindro central en proceso de crecimiento y alargamiento, proceso correspondiente a la primera fase de crecimiento del lóbulo (Schwintzer et al., 1982), presumiblemente dicho meristemo se divide en dos y el lóbulo se ramifica. Se debe aclarar que lo anterior ocurre a nivel de crecimiento del lóbulo, pues como se explicó en el marco teórico, el origen de un nódulo incluye la generación de un prenódulo y casi simultáneamente el origen de uno o mas primordios lobulares (Berry y Sunell, 1990).

En la figura 10 se observa la disposición estructural del cilindro central con sus estructuras características, presentándose el mismo arreglo de estructuras de una raíz lateral ramificada (Baker y Schwintzer, 1990), es decir el cilindro central se ramifica del mismo.

Las observaciones de ultraestructura evidencian las estructuras características de *Frankia* (Figura 17): hifas y vesículas con excepción de esporangios que son característicos en simbiosis del género *Morella* y *Alnus* (Schwintzer, 1990; Torrey, 1987), presumiblemente en las muestras recolectadas *Frankia* no se encontraba en fase de esporulación. Se observa claramente vesículas maduras que se caracterizan por la septación interna (Torrey y Callahan, 1982), en la figura 18, se muestra una hifa invasiva que rompe la pared celular, evidenciando la forma de infección intracelular.

En la figura 19, se observa una gran cantidad de vesículas maduras con espacios vacíos, que indica la efectividad de la fijación de nitrógeno por parte de dichas estructuras en simbiosis, los espacios vacíos indican el aislamiento de la vesícula para proteger la nitrogenasa del oxígeno, cuando la presión de oxígeno dentro de la célula hospedera aumenta, las vesículas generan más capas lipídicas para proteger la nitrogenasa (Berry, 1994), este espacio vacío presumiblemente se forma por la pérdida de capas lipídicas en el proceso de la fijación de la muestra para estudios ultraestructurales (Lancelle et al., 1985 citado en Newcomb y Susan, 1987) . La simbiosis *Frankia* – *Morella pubescens* es infectiva y efectiva, sin embargo algunas muestras observadas en microscopio electrónico presentaban pocas vesículas y algunas no presentaban espacios vacíos, esto se puede deber al hecho de que posiblemente la presión de oxígeno era muy baja, o a que las vesículas son prevesículas, es decir se encuentran en proceso de desarrollo, además se debe tener en cuenta que las células más alejadas del meristemo lobular nodular tienen mayor tiempo de vida para poder desarrollar las diferentes estructuras a diferencia de las células recién generadas que se encuentran más cerca de dicho meristemo y que apenas comienzan a desarrollar dichas estructuras.

Desde el punto de vista histológico la prueba de Azul Mercúrico de Bromofenol muestra la alta actividad de división celular y metabólica por el gran contenido de proteínas que se tiñen (Figura 12), así mismo la prueba con Verde Rápido – Safranina evidencia la alta actividad de división celular por el alto contenido de material de replicación, a diferencia de las células no infectadas que presentan un alto contenido de citoplasma (Figura 15).

El reporte de Chaboud y Lalonde (1983) habla de la conjugación de proteínas de *Frankia* e información genética de *Alnus* (Perafan, 2005) que conlleva a la formación del nódulo. El mayor contenido de material genético que tienen las células corticales infectadas por el actinomiceto está en el citoplasma de *Frankia* y no en el del hospedero (Pawlowski y Bisseling, 1996). *Frankia* tiene preferencia por las células corticales, pues ellas son células excretoras con alto contenido de retículo endoplasmático, aparato de golgi y ribosomas (Jensen y Salisbury, 1984), lo que le asegura a la bacteria los altos requerimientos proteínicos para la formación de sus estructuras.

La tinción con lugol indica el alto contenido de amiloplastos en las células del parénquima alrededor del anillo de infección, esto se debe a los altos requerimientos de carbón por parte de la bacteria (Figura 13). La tinción con $KMNO_3$ evidencia los taninos que forman una especie de anillos alrededor de la zona de infección, es decir un anillo entre la epidermis y la zona de infección y otro entre la zona de infección y el cilindro central, limitando la infección a las células corticales correspondientes “casi” a la zona media del córtex y evitando que la infección se expanda fuera de dicho límite (Figura 14). Durante el proceso de infección existe una respuesta fisiológica del hospedero contra *Frankia* que causa la limitación de la infección solo al córtex de la raíz (Newcomb y Wood, 1987), y que no se expanda por toda la planta (Ibíd.), la elevada concentración de taninos en el nódulo nos indica la fuerte respuesta fisiológica que tiene el tejido del hospedero frente a la infección del actinomiceto. (Laplaze et al., 1999 y 2000).

8. CONCLUSIONES

- Los nódulos de la simbiosis *Frankia* – *Morella pubescens* presentan el patrón de desarrollo y crecimiento de los nódulos tipo *Morella*; se originan vía infección pelo radicular, de un punto de infección se originan uno, dos o mas primordios lobulares que crecen por expansión de la punta distal del lóbulo y se ramifican por la división del meristemo, presenta raicillas nodulares, son perennes y sus nódulos no se compactan entre ellos como los de *Alnus*.
- La zona de infección de *Frankia* en los lóbulos nodulares de *Morella pubescens* tiene la forma de un anillo que se encuentra en la zona media del córtex entre el cilindro central y la epidermis ya que estas células corticales son excretoras con alto contenido de retículo endoplasmático, aparato de golgi y ribosomas, lo que le asegura a la bacteria los altos requerimientos proteínicos para la formación de sus estructuras.
- En las células corticales de los lóbulos nodulares de *Morella pubescens*, *Frankia* desarrolla sus estructuras características: hifas, vesículas fijadoras de nitrógeno y esporangios que no se pudieron observar, posiblemente debido a que la bacteria no se encontraba en etapa de esporulación.
- Los altos requerimientos de carbono por parte de la bacteria está reflejado en la alta cantidad de amiloplastos alrededor de la zona de infección.
- La presencia de taninos formando anillos alrededor de la zona de infección, indica la respuesta fisiológica de *Morella* frente a *Frankia*, evitando la expansión de la bacteria hacia otras estructuras de la planta.

- La evidencia de material de replicación y alto contenido proteínico en la zona de infección muestra la alta actividad de división celular y metabólica de la bacteria dentro de las células corticales infectadas del hospedero.

BIBLIOGRAFÍA

BAKER, D. and N.G. MILLER. Ultrastructural evidence for the existence of actinorhizal symbioses in the late Pleistocene. En: Canadian Journal of Botany. Vol. 58, No. 7 (July, 1992); p. 1612 – 1620.

BAKER, D.D. Relationships among pure cultured strains of *Frankia* based on host specificity. En : Physiology Plant. Vol. 70, No. 1 (1987); p. 245 – 248.

BENSON, D. and SILVESTER, W. Biology of Frankia Strains, Actinomycete Symbionts of Actinorhizal Plants. En: Microbiology Review. Vol. 57, No. 2 (June, 1993); p. 293 – 319.

BERG, Howard. Cellulose and xylans in the interface capsule in symbiotic cells of actinorhizae. En: Protoplasma. Vol. 105, No. 159 (1990); p. 35 – 44.

BERG, Howard. Frankia forms infection threads. En: Canadian Journal of Botany. Vol. 77, No. 9 (sep. 1999); p. 1327 – 1333.

BERRY, A. and SUNELL, L. The infection process and nodule development. En: Schwintzer CR Tjepkema eds. 1990. The biology of *Frankia* and actinorhizal plants. San Diego: Academic Press. p. 61 – 81.

BERRY, A. M., L. MCINTYRE, and M. E. MCCULLY. Fine-structure of root hair infection leading to nodulation in the *Frankia-Alnus* symbiosis. En Canadian Journal of Botany. Vol. 64, No. 3 (1986); p. 292-305.

BERRY, A.; McINTYRE, L. and McCULLY. Fine structure hair infection leading to nodulation in the *Frankia – Alnus* symbiosis. En: Canadian Journal of Botanic. Vol. 64, No.____ (____, 1986); p. 292 – 305.

BERRY, Alison and TORREY, John. Root hair deformation in the infection process of *Alnus rubra*. En: Canadian Journal of Botanic, Vol. 61, No.____ (____, 1983); p. 2863 – 2876.

BERRY, Alison. Recent developments in actinorhizal symbioses. En: Plant and Soil. Vol. 161, No.____ (____, 1994); p. 135 – 145.

CALLAHAM, Dale and TORREY Jhon. Prenodule formation and primary nodule development in roots of *Comptonia* (Morellaceae). En: Canadian Journal of Botany. Vol. 55, No.____ (March, 1977): p. 2306 – 2318.

CALLAHAM, Dale; TREDICI, Peter Del and TORREY, JOHN G. Isolation and cultivation in vitro of the Actinomycete causing root nodulation in *Componia*. En: Science. Vol. 199, No 2 (Feb. 1978); p 899 – 902.

DIOUF, Diaga and DIOP, Tahir. Antinorhizal, mycorrhizal and rhizobial symbiosis: how much do we know?. En: African Journal of Biotechnology. Vol. 2, No 1 (Jan. 2003); p 1 – 7.

ELIAS, T. The Genera of *Morellaceae* in the South eastern United States. En: Journal of the Arnold Arboretum. Vol: 52, No. ____ (____, 1971); p. 305 – 318.

ESCARTÍN, R. y UBACH, T. Atlas Universal y de Colombia. Bogotá: Educar Editores, 2004.

GARCIA, V. M. y HIDROVO, J. I. Producción y comercialización del jabón de tierra. Popayán: Trabajo de grado - Universidad del Cauca. 1995.

GUILLÉN, Gabriel; VALDÉS, Maria, LIAG, Jiayu and HIRSCH, Ann. Identificación de actinobacterias aisladas de nódulos de *Casuarina*, por técnicas tradicionales y moleculares. En: Revista Latino Americana de Microbiología. Vol. 35, No.____ (____, 1993); p. 195 – 200.

HUSS – DANELL, Kerstin. Actinorhizal symbioses and their N₂ fixation. En: New Phytol. Vol. 136, No____ (____, 1997); p. 375 – 405.

HUSS – DANELL, Kerstin. Actinorhizal symbioses and their N₂ fixation. En: New Phytol. Vol. 136, No____ (____, 1997); p. 375 – 405.

JENSESN, William y SALISBURY, Frank. Botánica: 8° Edición. SantaFé de Bogotá: McGraw–Hill. 1984. p.48

KALAKOUTSKIIP L. and AGRE N. Comparative Aspects of Development and Differentiation in Actinomycetes. En: Bacteriological Review. Vol. 40, No. 2 (June, 1976); p. 469 – 524.

LANCELLE, S., TORREY, J., HEPLER, K. AND CALLAHAM, D. Ultraestructure of freeze-substituted *Frankia* strain HFPCcI3, the actinomycete isolated from root nodules of *Casuarina cunninghamiana* En: Protoplasma. Vol. 127, No.____ (____, 1985); p. 64 – 72.

LANCELLE, Susan and TORREY, John. Early development of *Rhizobium* – induced root nodule of *Parasponia rigida* II. Nodule morphogenesis and symbiotic development. En: Canadian Journal of Botanic. Vol. 63, No.____ (____, 1985); p. 25 – 35.

LECHEVALIER, M. Taxonomy of the genus *Frankia*. En: Plant and Soil. Vol.____, No. 78 (____, 1984); p. 1 – 6.

LECHEVALIER, M. and LECHEVALIER, H. Systematics, isolation and culture of *Frankia*. En: The biology of *Frankia* and actinorhizal plants. Vol.____, No____ (____, 1990); p. 35 – 60.

LECHEVALIER, M. Minireview: taxonomy of the genus *Frankia* (*Acti-nomycetales*). En: Systematic. Bacteriology. Vol.44, No____ (____, 1994); p. 1 – 8.

LECHEVALIER, M. P. And LECHEVALIER, H. A. The taxonomic position of the actinomycete endophytes. En: J.C. Gordon, C.T. Wheeler and D.A. Perry (eds.). 1979 Symbiotic nitrogen fixation in the management of temperate forests. Corvallis: University Forest Research Laboratory. p 111-121.

LAPLAZE, Laurent; DUHOUX, Emile, FRANCHE, Claudine, FRUTZ, Thierry, SVISTOONOFF, Sergio, BISSELING, Ton, BOGUSZ, Didier and PAWLOWSKI, Katharina. *Casuarina glauca* prenódulo cells display the same differentiation as the corresponding nodule cells. En: Molecular Plant – Microbe Interactions. Vol. 13, No. 1 (____, 2000); p. 107 – 112.

LAPLAZE, Laurent; GHERBI, Hassen, FRUTZ, Thierry, PAWLOWSKI, Katharina, FRANCHE, Claudine, MACHEIX, Jean – Jacques, AUGUY, Florence, BOGUSZ, Didier and DUHOUX, Emile. Flavan – containing cell delimit *Frankia* – infected compartments in *Casuarina glaucana* nodules. En: Plant Physiology. Vol. 121, No.____ (____, 1999); p. 113 – 122.

LIU, Q., and BERRY, M. The infection process and nodule initiation in the *Frankia-Ceanothus* root nodule symbiosis. En: Protoplasma Vol. 163, No.____ (1991); p. 82 – 92.

McEWAN, Neil, R. and GATHERER, Derek. Codon indices as a predictor of gene functionality in Frankia operon. En: Canadian Journal of Botany. Vol. 77, No 9 (sep. 1999); p. 1287 – 1292.

McEWAN, Neil, R. and GATHERER, Derek. Codon indices as a predictor of gene functionality in Frankia operon. En: Canadian Journal of Botany. Vol. 77, No 9 (Ssep. 1999); p. 1287 – 1292.

MILLER, I. and BAKER, D. Nodulation of actinorhizal plants by *Frankia* strains capable of both root hair infection and intercellular penetration. En: Protoplasma Vol. 131, No.____ (1986); p. 82 – 91.

MUÑOZ, H. J. y LUNA, C. C. Guía para el cultivo, aprovechamiento y conservación del Laurel de cera *Morella pubescens* H. & B. Ex Willdenow. Bogotá: C.A.B. 2000.

NEWCOMB, W.; R.L. PETERSON, , D. CALLAHAM, and TORREY, J. G.. Structure and host–actinomycete interactions in developing root nodules of *Comptonia peregrina*. En: Canadian Journal of Botany. Vol. 56, No. 4 (abr. 1978); p 502 – 531.

NEWCOMB, William and WOOD, Susan. Morphogenesis and fine structure of *Frankia* (Actinomycetales): The microsymbiont of nitrogen – fixing actinorhizal root nodules. En: International Review of Cytology. Vol. 109, No.____ (____, 1987); p.1 – 88.

OBERTELLO, M., LEPLAZE, L., SANTI, S., SVISTOONOFF, F., and CLAUDE, F. Actinorhizal nitrogen fixing nodules: infection process, molecular biology and genomics. En : African Journal of Biotechnology. Vol. 2, No.12 (Dec, 2003); p. 528 – 538.

PARRA OSORIO, CARLOS. Taxonomía del género *Morella* (Morellaceae) en Colombia.

Santafé de Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana, 1998. p. 195.

PAWLOWSKI, Katharina and BISSELING, Ton. Rhizobial and actinorhizal symbioses: What are the shared features? En: *The Plant Cell*. Vol. 8, No.____ (october, 1996); p. 1899 – 1913.

PERAFAN DIZU, NESTOR. Eestudio estructural e histológico de los nódulos radiculares del Aliso (*Alnus acuminata* H.B.K. ssp. *acuminata*) formados en la asociación simbiótica con el actinomiceto *Frankia sp.* Popayán: Universidad del Cauca, 2005. p. 26.

PINZON TORRES, JAVIER ALBERTO. Factores que afectan la germinación en semillas de *Morella pubescens* Hill y *Morella parvifolia* Benth y evaluación de la presencia de banco de semilla. Santafé de Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, 1997. p. 45 - 48.

PRIN, Y., and ROUGIER. Preinfection events in stablishment of *Alnus-Frankia* symbiosis: Study of the root hair deformation step. En: *Plant Physiology*, Vol. 6, No.____ (____, 1987); p. 99-108.

QUISPEL, A. Discoveries, discussions, and trends in research on actinorhizal root nodule symbiosis before 1978. En: Schwintzer CR Tjepkema eds. 1990. *The biology of Frankia* and actinorhizal plants. San Diego: Academic Press. p. 15 – 33.

REBOLLEDO, N. S. y TITUANA, S. M. Producción técnica y comercialización de cera de laurel en el municipio de la Cruz Nariño. Popayán: Trabajo de grado - Universidad del Cauca. 2000.

SCHWENCKE, Jaime and CARÚ, Margarita. Advances in actinorhizal symbiosis: Host plant – *Frankia* interactions, Biology, and applications in arid land reclamation. A Review. En: Arid Land Research and Management. Vol. 15, No.____ (____, 2001); p. 285 – 327.

SCHWINTZER, C. R. Spore positive and spore negative nodules. En: Schwintzer C. R. Tjepkema eds. 1990. The biology of *Frankia* and actinorhizal plants. San Diego: Academic Press. p. 177 – 193.

SCHWINTZER, C. R., BERRY, A. M., and DISNEY, L. D. Seasonal patterns of root nodule growth, endophyte morphology, nitrogenase activity and shoot development in *Morella gale*. En: Canadian Journal of Botanic. Vol. 60, No.____ (____, 1982); p. 746 – 747.

SWENSEN, Susan and MULLIN, Beth. Phylogenetic relationships among actinorhizal plants. The impact of molecular systematics and implications for the evolution of actinorhizal symbioses. En: Physiologia Plantarum. Vol. 99, No.____ (____, 1997); p. 565 – 573.

TORREY, J. and TJEPKEMA, J. Symbiotic nitrogen fixation in actinomycete – nodulated plants. En: Botanical Gazette. Vol. 140, No.____ (____, 1979); p. 1 – 2.

TORREY, John and CALLAHAM, Dale. Structural features of the vesicle of *Frankia* sp. CpI1 in culture. En: Canadian Journal of Microbiology. Vol. 28, No.____ (july, 1982): 749 – 757.

ANEXO A

Protocolo de preparación de muestras para M.O.A.R y M.E.T.

Fijación con Glutaraldehído al 0.2 M en BP a pH 7.4	3 días
↓	
Lavado del tejido en Buffer (dos veces).	15 min.
↓	
Posfijación en OsO ₄ .	2 H.
↓	
Lavado con Buffer (dos veces).	15 min.
↓	
Deshidratación en etanol al 25% (dos cambios).	10 min.
↓	
Deshidratación en etanol al 35% (dos cambios).	10 min.
↓	
Deshidratación en etanol al 50% (dos cambios).	10 min.
↓	
Deshidratación en etanol al 75% (dos cambios).	10 min.
↓	
Deshidratación en etanol al 95% (tres cambios).	30 min.
↓	
Deshidratación en etanol puro (tres cambios)	30 min.
↓	
Aclaramiento en Etanol : Acetona (3 : 1).	10 min.
↓	
Aclaramiento en Etanol : Acetona (1 : 1).	10 min.
↓	
Aclaramiento en Etanol : Acetona (1 : 3).	10 min.
↓	
Acetona pura.	20 min.
↓	
Preimbibición resina Spurr : Acetona (1 : 3).	1 H.
↓	
Preimbibición resina Spurr : Acetona (1 : 1).	1 H.
↓	
Preimbibición resina Spurr : Acetona (3 : 1).	1 H.
↓	
Preimbibición resina Spurr.	18 H.
↓	
Inclusión definitiva en resina Spurr a 65°C	24 H.

Para MET la tinción de las rejillas con el tejido nodular se siguió el protocolo de Gonzáles Santander (1977)

ANEXO B

Protocolo de preparación de muestras para Histoquímica.

Fijación con Glutaraldehído al 0.2 M en BP a pH 7.4	3 días
↓	
Lavado del tejido en Cacodilato de sodio (tres cambios).	10 min.
↓	
Deshidratación en etanol al 30%.	60 min.
↓	
Deshidratación en etanol al 70%.	60 min.
↓	
Deshidratación en etanol al 80%.	60 min.
↓	
Deshidratación en etanol al 90%.	60 min.
↓	
Deshidratación en etanol al 95%.	60 min.
↓	
Deshidratación en etanol puro.	60 min.
↓	
Aclaramiento en etanol : cloroformo (3 : 1).	60 min.
↓	
Aclaramiento en etanol : cloroformo (1 : 1).	60 min.
↓	
Aclaramiento en etanol : cloroformo (1 : 1).	60 min.
↓	
Cloroformo Puro.	10 min.
↓	
Infiltración en Cloroformo : Parafina (54°) (1 : 1) a ± 35°C.	24 H.
↓	
Infiltración en Cloroformo : Parafina (54°) (1 : 1) a ± 45°C.	38 H.
↓	
Infiltración en solo Parafina (52°) a ± 52°.	6 H.
↓	
Inclusión en Parafina (52°).	2 H.

ANEXO C

Protocolo de tinción con Azul Mercúrico de Bromofenol de tejido incluido en parafina.

Desparafinción con temperatura de 52 °C	20 min.
↓	
Desparafinación con Xilol puro (3 cambios).	1 min
↓	
Etanol 95%.	3 min.
↓	
Etanol 70%.	3 min.
↓	
Etanol 50%	3 min.
↓	
Etanol 30%.	3 min.
↓	
Azul Mercúrico de Bromofenol.	15 min.
↓	
Acido Acético.	20 min.
↓	
Lavado con H ₂ O.	2 min.
↓	
Etanol 30%.	3 min.
↓	
Etanol 50%.	3 min.
↓	
Etanol 70%.	3 min.
↓	
Etanol 95%.	3 min.
↓	
Aclarar con Xilol.	3 min

ANEXO D

Protocolo de tinción Verde Rápido Safranina en tejido incluido en parafina.

Desparafinción con temperatura de 52 °C	20 min.
↓	
Desparafinación con Xilol puro (3 cambios).	1 min.
↓	
Etanol 100%.	1 min.
↓	
Etanol 95%.	1 min.
↓	
Etanol 70%.	1 min.
↓	
Etanol 50%	1 min.
↓	
Etanol 30%.	1 min.
↓	
H ₂ O.	1 min.
↓	
Safranina 1%.	15 min.
↓	
Lavar con H ₂ O.	1 min.
↓	
Etanol 30% + ácido pícrico (1 : 1).	1 min.
↓	
Etanol 50% + ácido pícrico (1 : 1).	1 min.
↓	
Etanol 70% + ácido pícrico (1 : 1)	1 min.
↓	
Etanol 95% + ácido pícrico (1 : 1).	1 min.
↓	
Etanol 95% + amoniaco (1 : 1).	1 min.
↓	
Etanol 100%.	5 seg.
↓	
Verde Rápido	5 min.
↓	
Aclarar con Xilol.	

ANEXO E

Protocolo de tinción con Lugol de tejido incluido en parafina.

Desparafinción con temperatura de 52 °C	20 min.
↓	
Desparafinación con Xilol puro (3 cambios).	1 min.
↓	
Etanol 100%.	3min.
↓	
Etanol 95%.	3min.
↓	
Etanol 70%.	3min.
↓	
Etanol 50%.	3min.
↓	
Etanol 30%.	3 min.
↓	
Lavado con H ₂ O.	3 min.
↓	
Lugol.	5 min.

ANEXO F

Protocolo de tinción con KMNO_3 de tejido incluido en parafina.

Desparafinar con temperatura de 52 °C	20 min.
↓	
Desparafinación con Xilol puro (3 cambios).	1 min.
↓	
Etanol 100%.	2 min.
↓	
Etanol 95%.	2 min.
↓	
Etanol 70%.	2 min.
↓	
Etanol 50%.	2 min.
↓	
Etanol 30%.	2 min.
↓	
H ₂ O.	2 min.
↓	
KMNO ₃ .	15 min.
↓	
Etanol 30%.	1 min.
↓	
Etanol 50%.	1 min.
↓	
Etanol 70%.	1 min.
↓	
Etanol 95%.	1 min.
↓	
Etanol 100%.	1 min.
↓	
Aclarar con Xilol.	1 min.