

**ESTUDIO ESTRUCTURAL E HISTOQUÍMICO DE LOS NÓDULOS
RADÍCULARES DEL ALISO (*Alnus acuminata* H.B.K. ssp. *acuminata*) FORMADOS
EN LA ASOCIACIÓN SIMBIÓTICA CON EL ACTINOMICETO *Frankia sp.***

NÉSTOR JOSÉ PERAFÁN DIZÚ

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

2005

**ESTUDIO ESTRUCTURAL E HISTOQUÍMICO DE LOS NÓDULOS
RADÍCULARES DEL ALISO (*Alnus acuminata* H.B.K. ssp. *acuminata*) FORMADOS
EN LA ASOCIACIÓN SIMBIÓTICA CON EL ACTINOMICETO *Frankia sp.***

NÉSTOR JOSÉ PERAFÁN DIZÚ

**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

2005

Nota de aceptación:

Firma del director del Trabajo de Grado

Firma del jurado

Firma del jurado

Fecha de sustentación: Popayán, 27 Junio de 2005

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

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por haberme dado la oportunidad de realizar mi pregrado, a la Universidad del Cauca por haberme ofrecido la formación académica y mi familia por el apoyo brindado durante el transcurso de la carrera universitaria.

Deseo resaltar los nombres del Mg. Nelson Bolívar Rojas por su acertada dirección en el trabajo, al Mg. Gerardo Andrés Torres por su oportuna asesoría e introducción a la técnica de Microscopía Óptica de Alta Resolución y Microscopía Electrónica de Transmisión, base de este estudio.

A si mismo agradezco a la Lic. Patricia Mosquera por el apoyo dado en la Unidad de Microscopía Electrónica, a Jhon Carlos Meléndez por la colaboración dada en la estandarización de inclusión de los tejidos en parafina.

Agradezco a la Microbióloga Bibiana Stella Duarte y a Mg. Nilza Velasco por su colaboración en la revisión y evaluación final del trabajo.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	13
1. JUSTIFICACIÓN	15
2. OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GENERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3. ANTECEDENTES	18
4. MARCO TEÓRICO	22
4.1 <i>Alnus acuminata</i> H.B.K. spp. <i>acuminata</i> EN COLOMBIA	23
4.1.1 Descripción de <i>Alnus acuminata</i> H.B.K. spp. <i>acuminata</i>	24
4.2 <i>Frankia</i> COMO UN ORGANISMO DEL SUELO	25
4.2.1 Taxonomía de <i>Frankia</i>	25
4.3 NÓDULOS RADÍCULARES	26

4.3.1	Infección y formación del nódulo.	26
4.3.2	Anatomía del nódulo	28
4.3.3	Clases de nódulos	28
4.4	ESPECIFICAD DEL HOSPEDERO Y AISLAMIENTO DE <i>Frankia</i>	28
5.	METODOLOGÍA	31
5.1	MICROSCOPIA ÓPTICA DE ALTA RESOLUCIÓN (M.O.A.R.)	31
5.2	HISTOQUÍMICA	32
5.3	MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	32
6.	RESULTADOS	33
6.1	MORFOLOGÍA EXTERNA	33
6.2	MORFOLOGÍA INTERNA	34
6.3	ULTRAESTRUCTURA	43
7.	DISCUSIÓN	44
8.	CONCLUSIONES	48
	BIBLIOGRAFÍA	49

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Lista de eventos realizados sobre <i>Frankia</i> y las plantas actinorrizas	23

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Fotografía nódulo radicular de <i>Alnus acuminata</i> infectado por <i>Frankia</i> sp.	33
Figura 2. Fotografía Nódulo radicular de <i>Alnus acuminata</i> de La Esperanza, (Municipio de Sotará), La Marquesa (municipio de Silvia) y Quintana (Municipio de Popayán).	33
Figura 3. Nódulo radicular de <i>Alnus acuminata</i> en vista panorámica y con corte transversal.	34
Figura 4. Corte transversal de nódulo radicular de <i>Alnus</i> , colectado en la vereda La Marquesa, municipio de Silvia, teñido con azul de Toluidina. Vista panorámica y detalles del Cilindro Central	35
Figura 5. Corte longitudinal de nódulo radicular de <i>Alnus</i> colectado en la vereda La Marquesa, municipio de Silvia, teñido con azul de Toluidina. Vista panorámica.	36
Figura 6. Corte longitudinal de nódulo radicular de <i>Alnus</i> colectado en la vereda La Marquesa, municipio de Silvia, teñido con Azul de Toluidina mostrando detalles del Cilindro Central.	37
Figura 7. Corte longitudinal de nódulo radicular de <i>Alnus</i> colectado en la vereda La Marquesa, municipio de Silvia, teñido con azul de Toluidina mostrando detalles de una Célula Cortical Infectada por <i>Frankia</i> .	37
Figura 8. Corte transversal de nódulo radicular de <i>Alnus</i> colectado en la vereda La Esperanza, municipio de Sotará, teñido con Azul Mercúrico de Bromofenol.	38
Figura 9. Corte longitudinal de nódulo de <i>Alnus acuminata</i> colectado en la vereda La Esperanza, municipio de Sotará, teñido con Azul Mercúrico de Bromofenol.	38
Figura 10. Corte longitudinal de nódulo de <i>Alnus acuminata</i> colectado en la vereda La Esperanza, municipio de Sotará, teñido con Lugol.	39
Figura 11. Corte transversal del tallo de <i>Alnus acuminata</i> colectado en la vereda La Esperanza, municipio de Sotará, teñido con Lugol.	39
Figura 12. Corte transversal del tallo de <i>Alnus acuminata</i> colectado en la vereda La Esperanza, municipio de Sotará, teñido con Lugol mostrando Amiloplastos.	39
Figura 13. Corte longitudinal de nódulo de <i>Alnus acuminata</i> colectado en la vereda La Esperanza, municipio de Sotará, teñido con Lugol mostrando detalles del nódulo infectado.	39
Figura 14. Corte transversal de nódulo radicular de <i>Alnus</i> colectado en la vereda La	40

	Esperanza, municipio de Sotará, teñido con KMNO ₃	
Figura 15	Corte transversal de nódulo radicular de <i>Alnus</i> colectado en la vereda La Esperanza, municipio de Sotará, teñido con KMNO ₃ mostrando detalles del Cilindro Central y Células Corticales	40
Figura 16.	Corte longitudinal de nódulo de <i>Alnus acuminata</i> colectado en la vereda La Esperanza, municipio de Sotará, teñido con Verde Rápido – Safranina.	41
Figura 17.	Corte transversal de nódulo de <i>Alnus acuminata</i> colectado en la vereda La Esperanza, municipio de Sotará, teñido con Verde Rápido – Safranina mostrando detalles del Cilindro Central y Células Corticales.	41
Figura 18.	Corte longitudinal de nódulo de <i>Alnus acuminata</i> colectado en la vereda La Esperanza, municipio de Sotará, teñido con Verde Rápido –Safranina mostrando detalles de Células Corticales Infectadas	42
Figura 19.	Micrografía Electrónica de una célula cortical de <i>Alnus acuminata</i> H.B.K. ssp. <i>acuminata</i> infectada por el actinomiceto <i>Frankia</i> . Nódulo colectado en la vereda La Marquesa, municipio de Silvia.	43

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.)	70
Anexo B Protocolo de preparación de muestras para Histoquímica.	71
Anexo C Protocolo de tinción con Azul Mercúrico de Bromofenol (AMB) de tejido incluido en parafina.	72
Anexo D Protocolo de tinción con Lugol del tejido incluido con parafina.	73
Anexo E Protocolo de tinción con $KMNO_3$ del tejido incluido con parafina.	74
Anexo F Protocolo de tinción Verde Rápido Safranina en tejido incluido con parafina.	75

INTRODUCCIÓN

El Aliso es una planta actinorriza (Dalton y Taylor, 1975; Torrey y Tjepkema, 1979; Jiabin et al., 1985; Périnet et al., 1985; Restrepo, 1997; Kaelke y Dawson y, 2003; Navarro et al., 2003; Obertello et al., 2003) que es el nombre dado a la invasión simbiótica del actinomiceto de género *Frankia* (Torrey y Tjepkema, 1979; Berry et al., 1986; Guillén, 1993) al tejido radicular de 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). La asociación entre *Alnus* y *Frankia*, cuyo producto es la formación de un nódulo radicular (Huss – Danell, 1991), permite pasar el dinitrógeno contenido en la atmósfera (Ville, et al., 1998) a amonio (Salomón et al., 1998; Pawlouski, 1977) – proceso que realiza la nitrógenasa – (Callaham y Torrey, 1978; Winship, Kendall y Sllstedt, 1987; Tjepkema, Ormerod y Torrey, 1980; Kurdali, Domenach y Bardin, 1990; Vikman et al., 1990; Nalin, Domenach y Normand, 1995; Laplaze et al., 2000) que se convertirá en la fuente de nitrógeno para la planta (Teissier, Jung y Bariteau, 1984; Van Straten, Akkermass y Roelofsen, 1977). Hasta el momento es desconocida la fuente de carbono que *Frankia* obtiene de sus hospederos actinorrízicos (Huss – Danell, 1997).

Las interacciones que se dan entre plantas *Alnus* (planta actinorriza) y *Frankia* son completamente diferentes en comparación a las de *Rhizobium* y las plantas leguminosas en su morfología, genética y fisiología (Becking, 1970; Pawlowski, 1997; Huss – Danell, 1997; Schwencke y Carú, 2001; Obertello et al., 2003).

Económicamente *Alnus* y las plantas actinorrizas, por su asociación simbiótica temprana con *Frankia* (Van Ghelue, Lovaas, Ringo y Solheim, 1997), son de interés para la reforestación y recuperación de tierras, ya que habita en suelos empobrecidos en nutrientes, suelos con nitrógeno limitado (Van Straten, Akkermans y Roelofsen, 1977; Torrey, 1978;

Vogel y Dawson, 1985; Tremblay y Lalonde, 1987; Vergnaud, Chaboud y Rougier, 1987; Vickman y Huss – Danell, 1987; Van Ghelue et al., 1997; Myrold y Huss – Danell, 2003) y con pH ácidos (Burggraaf y Shipton, 1982). En países en vía de desarrollo, en las regiones tropicales y subtropicales, se usan para la reforestación y recuperación de suelos pobres (Vikman y Huss – Danell, 1987; Guillén et al., 1993). En estas regiones, al igual que en las templadas, especies *Alnus* tienen un alto potencial en la silvicultura (Botero y Russo, 1997). También son usados como plantas enfermeras de suelos degradados y como acompañantes de en conjunto con árboles valiosos (árboles frutales), para la producción de carbón – como una fuente de monocultivo maderable – y como fuente proteica, en forma de forraje para el ganado, en la producción de leche (Berry, 1994; Botero y Russo, 1997).

A pesar de la importancia ecológica que tiene el Aliso en Colombia, no se ha realizado una descripción macroscópica (nódulos), histológica y ultraestructural de los nódulos infectados por *Frankia*. Este trabajo hace un aporte al conocimiento en los tres aspectos, mediante la estandarización y uso de técnicas para microscopía óptica y electrónica, que conlleva a conocer la relación simbiótica.

1. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años en Colombia se está presentando una elevada tasa de deforestación, que conlleva a la poca productividad en las cosechas por la pérdida gradual de los componentes del suelo, macro y micro nutrientes —entre ellos el nitrógeno que es considerado como un elemento esencial para las plantas—, y la disminución de los potenciales hídricos. Por lo anterior se hace necesario investigar, en forma básica, algunas relaciones simbióticas, como la que se presenta, que permitan recuperar el suelo de forma rápida y económica.

El Aliso (*Alnus acuminata* H.B.K. ssp. *acuminata*) es una alternativa tanto para la protección de suelos y cuencas hidrográficas así como para su recuperación, pues es considerada como una planta pionera que habita en periodos y condiciones adversas. También debido a que tiene un periodo corto de maduración y un gran potencial ya que aporta al suelo nitrógeno en sus fases tempranas de desarrollo, puesto que semillas, o plántulas de una o dos semanas de edad ya se encuentran en asociación simbiótica con el actinomiceto *Frankia* sp. La formación de la simbiosis *Alnus acuminata* y *Frankia* sp., esta última además de aportar beneficios para la planta en cuanto a su nutrición con el Nitrógeno cuyos beneficios son retribuidos por la planta aportándole carbono y un ambiente anaerobio, esta aportando nitrógeno disponible al suelo para que sea utilizado por otros organismos.

En la actualidad se ha reportado la propagación de *Alnus acuminata* H.B.K. ssp. *acuminata*, pero no se han reportado estudios de la estructura en la relación simbiótica *Alnus acuminata* H.B.K. ssp. *acuminata* - *Frankia* sp., por lo que esta especie de Aliso es el único taxón de su género existente en los Andes de Suramérica, por lo cual se hace necesario describir la nodulación tanto en el campo como en el laboratorio para proporcionar indicadores y metodologías que permitirán estudiar de forma sencilla la relación simbiótica. La Unidad de Biotecnología Vegetal de la Pontificia Universidad Javeriana hace ya dos años abrió la

línea de investigación en aislamiento, caracterización, cultivo e inoculación de fijadores de nitrógeno, centrándose en la simbiosis *Frankia* sp. – plantas actinorrizas, pero hasta el momento no se ha realizado ninguna publicación al respecto.

La Biología Celular y Molecular, a través de las técnicas de microscopía óptica y electrónica, ofrece las herramientas necesarias para acercarnos a los fenómenos que se dan en la relación simbiótica entre el hospedero *Alnus acuminata* y la bacteria *Frankia* sp.

La descripción básica que se realiza en este trabajo puede encaminar a una caracterización y mayor comprensión de la relación simbiótica del Aliso y *Frankia*. Esto con miras a establecer mecanismos de monitoreo para esquemas de propagación y reforestación con *Alnus*, en suelos desgastados y empobrecidos, en donde su asociación con *Frankia* es considerada un factor clave en estos programas.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

- Estudiar los cambios estructurales que se dan por la infección del actinomiceto *Frankia* sp. en los nódulos de *Alnus acuminata* H.B.K. ssp. *acuminata*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Describir la anatomía y estructura de los nódulos en la actinoplanta *Alnus acuminata* H.B.K. ssp. *acuminata* causados por el actinomiceto *Frankia* sp.
- Investigar las componentes histoquímicos en nódulos de *Alnus acuminata* causados por *Frankia* sp.
- Comparar los resultados obtenidos con otros estudios estructurales realizados en las especies del género *Alnus*.

3. ANTECEDENTES

Las descripciones estructurales realizadas en las plantas actinorrizas han ayudado a comprender la forma como la bacteria *Frankia* interactúa con ellas. Estos estudios, que van desde simples observaciones en el microscopio construido por Leeuwenhoek, pasando por observaciones en el microscopio electrónico, han dado pie a complejos análisis geonómicos y filogenéticos tanto de la planta hospedera como del simbionte *Frankia*.

La primera descripción macroscópica de los nódulos de Aliso producto de la relación simbiótica con el actinomiceto *Frankia* la realizó por Meyen en 1829, más tarde Worinin en 1866 al utilizar el microscopio de Leeuwenhoek realiza la descripción de la estructura de los nódulos de *Alnus glutinosa* y llama al organismo causante de la infección *Schinzia alni* al mismo tiempo que hace la comparación con los nódulos del *Salix alba* (Sauce blanco). Gravis y Morin (1885) llegan a la conclusión que el agente infectante del nódulo de *Alnus* es *Schinzia* y *Plasmodium*. Frank en 1887, basado en los estudios citológicos de Brunchorst (1885), describe las diferencias entre la citología de los nódulos de leguminosas y los nódulos de *Alnus* convencido de que en estos había un microorganismo involucrado que difería de la estructura de los Mixomycetes y de las hifas de los hongos por lo que propuso el nombre de *Frankia subtilis* al organismo causante de la infección. Gravis (1889) basado en los estudios de Möller (1885) concluye que el organismo causante del nódulo en *Alnus* es un Myxomyceto (Plasmodium).

Shibata (1902) 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, además define las vesículas como formas degenerativas. Fue el primero en considerar el microsimbionte de *Alnus* como un *Mycobacterium* y el de *Myrica* como un Actinomiceto. Nobbe y Hiltner (1904) contemplan que árboles *Alnus glutinosa* de 8 años crecen normalmente en suelo con deficiencia de nitrógeno, con esta observación concluyen

que son los nódulos radiculares son los encargados de suministrarle el nitrógeno a las plantas, también determinan que el simbiote es una bacteria al encontrar la presencia de bacteriohopanetrol.

Shibata y Tahora (1917) incluyen a *Elaeagnus*, *Coriaria*, y *Casuarina* como hospederos del microsimbionte que infecta *Alnus* y *Myrica*. Mas tarde, 1952, Lawrence y sus colaboradores reportan que el simbiote de *Dryas drumondii*, basados en observaciones de microscopia de luz, es similar al microsimbionte que se encuentra en *Alnus*.

Kreber (1932), apoyado en los ensayos de Shibata y Tahora (1917), realiza una descripción de nódulos de Aliso dudando muy poco que su microsimbionte sea un actinomiceto y Schaede (1938) concluye, por medio de estudios estructurales e histológicos, que las características del microsimbionte de *Alnus* son de un actinomiceto.

Pomer en 1956 realiza la primera descripción ultraestructural en nódulos de *Alnus* y nota que la matriz de infección se forma en la región apical del lóbulo en el pelo radicular. Gardner (1965) realiza por primera vez el estudio estructural en nódulos de *Comptonia peregrina*; Gatner y Gardner (1970) describen la estructura fina en nódulos de *Hippophaë rhamnoides*; Lalonde y Devae (1976, citado por Huss – Danell, 1997), siguiendo las técnicas empleadas por Gatner y Gardner para Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) aplican esta para la descripción de los nódulos de *Alnus crispa* var. *mollis* encontrando diferencias en el tamaño de las vesículas en comparación con *Alnus glutinosa* (L) Gaertn; Callaham y Torrey (1978), estudian la prenodulación en raíces de *Comptonia* sp., encontrando que un estado clave para la penetración es la deformación de los pelos absorbentes de la raíz; Lalonde y Knowles (1975), reportan las características y biogénesis del material capsular de nódulos de *Alnus crispa* var. *mollis*; Newcomb con su grupo de investigadores (1978) aplican por primera vez una correlación entre microscopia de campo claro y fluorescencia con microscopia electrónica de barrido y Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM) en nódulos de *Comptonia peregrina*.

En el año de 1978 Callaham, Tredeci y Torrey logran aislar de *Comptonia peregrina* la primera cepa *Frankia* en cultivo puro bajo condiciones axénicas, a la que llamaron CpII, que constituiría el principio de los estudios *in vitro* de la relación simbiótica entre *Frankia* y sus hospederos.

Tomando como base el medio de cultivo de Callaham y sus colaboradores (1978) se elaboraron medios de cultivo para *Frankia* específicos para cada de hospedero pues hasta el momento no se ha obtenido un medio específico o universal para su aislamiento (Mort, Normand y Lalonde, 1983, Tisa et.al, 1983; Shipton y Burggraaf 1982; Akkermans et.al 1983; St – Laurent y Lalonde, 1987, Benson, 1993); Newcomb (1980) realizó el estudio estructural en nódulos de *Dryas drummondii* (avena amarilla de montaña), identificando una serie de polisacáridos no específicos que rodean la endófito; Lechavalier, Baker y Horrière (1983), comparando la fisiología, química, serología e infectividad de dos cepas *Frankia* aisladas de *Alnus incana* subsp. *rugosa* hallaron la existencia de dos tipos de endófito infectiva y no infectiva relacionándola con la ausencia o presencia de vesículas; Tjepkema (1983) utilizando como marcaje lectinas encuentra hemoglobina en nódulos de *Casuarina cunninghamiana* y *Myrica gale*; Hafees, Akkermans y Chaudhary (1984), en el estudio estructural en *Datisca cannabia* observaron que las variaciones estructurales (lenticelas y vesículas) eran diferentes a otras actinoplasmas como *Alnus* y *Myrica*; Berry, McIntyre y McCully (1986), en el estudio realizado del proceso que lleva a la nodulación de *Frankia* en *Alnus rubra* observaron que podría existir un agente infectivo como *Agrobacterium* o *Pseudomonas cepacia* 85 (Knowlton y Dawson, 1983), que facilitaría la entrada de *Frankia* a sus hospederos; Bloom y sus colaboradores (1989), comparan la fisiología, química y morfología de *Frankia* en nódulos de *Myrica pensylvanica* colectados en diferentes lugares encontrando diferentes cepas *Frankia* de cada uno de los lugares muestreados; Berg, Langenstein y Silvestre (1999), revisando el tipo de nodulación en *Datisca* y *Coriaria*, encontraron que estas que pertenecen a diferentes familias tienen una base de infección similar contrario al estudio realizado por Mirtza y sus colaboradores en el año 1994; Berg (1999), introduce el termino matriz interfacial, en vez de cordón de

infección dado por Brusel y sus colaboradores (1992) – propio de los pasos de infección de *Rhizobium* –, para el proceso de la infección de *Frankia* en las actinoplasmas.

Aunque en otros países, como los Europeos y de América del Norte, son abundantes los estudios sobre la simbiosis *Alnus* – *Frankia* para Colombia se han realizado solo aislamientos de cepas *Frankia* en Aliso (Orozco, Medina y Sarria, 2005) y su evaluación de infectividad y efectividad (Restrepo, 1997), pero no se ha realizado un estudio que genere una herramienta sencilla, como lo hace la microscopia, para la evaluación de la infección de *Frankia* en los nódulos de Aliso tanto en campo como en laboratorio durante los programas de reforestación y recuperación de los suelos de Colombia.

4. MARCO TEÓRICO

Parece imposible una escasez de nitrógeno en los seres vivos ya que es el mayor componente de la atmósfera terrestre (80% aproximadamente) (Salomon et al., 1998; Vitousek y Field, 1999). El nitrógeno es la parte esencial para los seres vivos ya que está presente en proteínas y ácidos nucleicos (DNA y RNA) (ibid.). Aunque este elemento es el más abundante, es de saber que no está disponible para los seres vivos, es decir, no lo pueden tomar directamente del medio y necesitan de un intermediario. (Torrey, 1978). El actinomiceto *Frankia* sp., al igual que *Rhizobium* y otras bacterias fijadoras de Nitrógeno, realiza la ruta base para la fijación del nitrógeno con la enzima nitrógenasa (Bédard y Knowles, 1989; Jeong, Ritchie y Myrold, 1999; Lundquist, 2000; Daniel y Schmidt, 2003; Schwencke y Carú, 2001), la cual por oxidarse fácilmente debe estar en un ambiente anaerobio dado por las actinorrizas, en este caso *Alnus acuminata* o por una membrana que forma las vesículas (Gatner y Gardber, 1970; Torrey, 1978; Torrey y Tjepkema, 1979; Hafeez, Akkermans y Chaudhary, 1984; Parsons et al., 1987).

Debido a la importancia de la relación simbiótica entre *Frankia* y las plantas actinorrizas constantemente se están realizando encuentros entre universidades internacionales en los cuales se expone y discute los avances en genética molecular, fisiología y morfología de la simbiosis (Tabla 1).

Tabla 1. Encuentros realizados sobre *Frankia* y las plantas actinorrizas.

Año conferencia	Lugar		Revista	
	País	Institución	Año	Nombre
1978	Estados Unidos	Harvart Forest	1979	Botanical Gazette
1979	Estados Unidos	Oregon State University	No publicadas	
1982	Estados Unidos	Universidad de Wisconsin	1984	Canadian Journal of Botanic
1983	Países Bajos	Agricultural University	1984	Plant and Soil
1984	Canada	Laval University	1985	Plant and Soil
1986	Suecia	Umeâ University	1987	Physiologia Plantarum
1988	Estados Unidos	University of Connecticut	1989	Plant and Soil
1991	Francia	University of Lyon	1992	Acta Oecologica
1993	Nueva Zelanda	University of Waikato	1993	Soil Biology and Biochemistry
1995	Estados Unidos	University of California	1997	Physiologia Plantarum
1998	Canada	Laval University	1999	Canadian Journal of Botanic
2001	Francia	University of Lyon	2002	Plant and Soil
2003	Estados Unidos	Utah Valley State Collage	No publicadas	

4.1 *Alnus acuminata* H.B.K. spp. *acuminata* EN COLOMBIA

Considerado como el único taxón de su género, se distribuye desde el noroeste de Argentina hasta el oeste de Venezuela a través de la Cordillera de los Andes (Furrow, 1979). Otras especies *Alnus* se encuentran en Sur América desde el norte de Méjico hasta el sur de Argentina (Fournier, 1989). En Colombia se le encuentra en las tres cordilleras (Oriental, Central y Occidental) entre los 1.700 msnm – 3400 msnm. Las zonas de vida donde se puede encontrar, según Holdridge, sería: bosque seco montano bajo (bs-MB), bosque húmedo montano bajo (bh-MB), bosque muy húmedo montano bajo (bmh-MB), bosque húmedo montano (bh-M) y bosque muy húmedo montano (bmh-M) (Restrepo 1997). Actualmente en Colombia es utilizando en la recuperación de cuencas hidrográficas,

como renovador de los campos de pastoreo, para la reforestación y implantación de cercas vivas (Gonzaga, 2001).

La importancia del Aliso radica en que es una planta pionera pues es capaz de habitar lugares donde existe estrés por pH bajos (Burggraaf y Shipton 1982), cambios en la temperatura, alta salinidad y poca disposición de nitrógeno (Newcomb y Wood, 1987; Dawson, 1990; Schwencke y Carú, 2001; Myrold y Huss – Danell, 2003; Kendall et al., 2003; Navarro et al., 2003). También se le encuentra en lugares con alta concentración de Cianuro, Arsénico y Mercurio (Sayed, 2003), por lo que es considerado como un buen candidato en los programas de biorremediación. El alcance de sobrevivir en estos medios extremos se lo da la asociación simbiótica que establece con el actinomiceto *Frankia* (Torrey, 1978; Torrey y Tjepkema, 1979; Obertello. Et al., 2003; Restrepo 1997; Sayed, 2003).

El Aliso, además de su importancia ecológica, es usado como combustible maderable (carbón o leña) (Torrey, 1978; Guillén, et al., 1993), para la ebanistería y en la fabricación de palillos y fósforos (Lalonde y Knowles, 1975; Newcomb y Wood, 1987; Gonzaga, 2001), como sombra de ganado o como banco forrajero (Berry, 1994; Botero y Russo, 1997)

4.1.1 Descripción de *Alnus acuminata* H.B.K. spp. *acuminata* El Aliso es un árbol que puede llegar a medir hasta 40 m de altura (Botero y Russo, 1997) con un diámetro de 70 cm. en plantaciones. Sus hojas son de ovadas, margen agudamente biserrado, el haz y el envés son glabros en la madurez. Su flor tiene inflorescencias masculinas en amentos, inflorescencias femeninas en racimos. El fruto es elíptico a obovado, papiráceo a coriáceo, con el margen alado y estilo persistente. (Academia nacional de la ciencia, 1984 citado por Restrepo, 1997).

En Colombia se presentan dos ecotipos: en la cordillera central se le llama Cerezo y puede alcanzar los 40 m de altura con un diámetro de 70 cm, mientras en la Cordillera Oriental se le dice Aliso y puede alcanzar solo los 10 m de altura (Restrepo, 1997).

4.2 *Frankia* COMO UN ORGANISMO DEL SUELO

Existe poca información sobre la actividad fisiológica de *Frankia* en el suelo. Los éxitos de aislamiento son poco frecuentes (Tjepkema, Ormeron y Torrey, 1980; Baker y O'Keete, 1984; Simonet et al., 1984; Smolander et al., 1990; Anja et al., 2003; Kohls et al., 2003). El método prevaleciente hasta el momento de saber si en tierra existe *Frankia* es realizando estudios moleculares del suelo por medio de hibridización *in situ* (Bloom, Mullin, Tate III, 1989) con referencia de que en el sitio exista, o halla existido, uno de sus hospederos (Van straten, Akkermans y Roelofsen, 1977; Huss – Danell y Frej, 1986).

La importancia de *Frankia* en suelo radica en que no es un simbiote obligatorio (Tjepkema, Ormerod y Torrey, 1980; Huss – Danell, 1997), es decir, que para realizar la fijación de nitrógeno molecular a nitrógeno orgánico no necesita formar nódulos con una planta actinorriza ya que la bacteria es capaz de formar la membrana vesicular, que protege la enzima nitrógenasa contra la oxidación, en vida libre (Tjepkema, Ormerod y Torrey, 1980).

4.2.1 Taxonomía de *Frankia* Hasta el momento todas las cepas *Frankia* son bacterias Gram Positivas, filamentosas y esporulantes (Lechevalier, 1994). Por lo anterior *Frankia* ha sido agrupada con las bacterias filamentosas del suelo en el orden Actinomicetales (Kalakoutskiip y Agre, 1976). La familia Frankiaceae tiene a *Frankia* como su único género (Couch, 1955; Becking, 1970; Kalakoutskiip y Agre, 1976).

Son considerables las variaciones morfológicas y fisiológicas que tienen lugar dentro del género *Frankia*, si bien un microorganismo puede ser fácilmente identificado como integrante del género *Frankia*, por lo cual se ha decidido que no se puede nombrar una especie del género *Frankia* hasta no tener bien claro cuales son las variaciones morfológicas y fisiológicas que se dan dentro del género (Cohan, 2002). Por el momento todas las cepas se nombran con una combinación de letras (iniciales de la planta y de donde se aisló) y números correspondientes a la cepa (Lechevalier y Lechevalier, 1990).

Fisiológicamente *Frankia* puede ser separado en dos grupos:

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). 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).

An, Riggsby y Mullin (1985) identificaron 4 posibles genogrupos usando 4 cepas sondas en experimentos de hibridización DNA–DNA. Su resultados sugieren que la diversidad genética de *Frankia* es muy grande, particularmente la del grupo A.

En la actualidad se están adaptando las técnicas de serología (Sandowsky y Graham., 1999 citado por Hahn et al., 2003) y clonación de genes (Blaha y Cournoyer, 2003; Theodore et al., 2003), que han resultado útiles en la identificación y filogenética de cepas rizobium (Hahn et al., 2003, Blaha y Cournoyer, 2003; Theodore et al., 2003), en cepas *Frankia*.

4.3 NÓDULOS RADÍCULARES

4.3.1 Infección y formación del nódulo La forma de infección (origen, interacción) de *Frankia* para la formación del nódulo en las actinorrizas es determinada por el hospedero, lo cual coincide con la forma de infección de rizobium (Pawlowski, 1977). Cepas capaces de infectar tanto *Alnus* como *Elaeagnus* causan la deformación del pelo radicular en *Alnus* pero no en *Elaeagnus* (Bosco et al., 1992). Cuando las mismas cepas se inoculan en *Elaeagnus* y *Myrica* ocurre en el primero penetración intracelular y en segundo vía pelo radicular (Miller y Baker, 1986). Igualmente la cepa GpII infecta *Gymnostoma papuanum* vía pelo radicular pero a *Shepherdia argentea* lo hace vía penetración intracelular (Racette y Torrey, 1989; Navarro et al., 1997). Se puede pensar que *Frankia* tiene heterogéneas

señales y sus hospederos perciben diferentes señales o que existe una sola señal de traducción que difiere entre las especies de hospederos (Huss-Danell, 1997), esto puede estar fundamentado en el hecho que el fenotipo bien ramificado de la raíz inducida por *Agrobacterium* en *Alnus* y *Elaeagnus* sea igual y que solo se observe diferencias solamente en cuanto a el modelo de sus hospederos pues son ellos los que inciden directamente sobre la forma del nódulo que deben de expresar.

Dos formas de infección son expresados por las plantas actinorrizas:

Infección vía pelos radiculares: que ocurre en nódulos jóvenes de *Alnus* (familia Betulaceae), en miembros de la familia Casuarinaceae y Myricaceae (Schwintzer y Tjepkema, 1983; Berry y Sunell, 1990 citados por Huss – Danell, 1997). En esta clase de infección los pelos radiculares jóvenes son deformados cuando entran en contacto con *Frankia*, ramificándose más que enrollándose. Las hifas penetran la pared celular realizando una curvatura que arruga la región del pelo radicular y crece a través de ella hasta llegar a la zona cortical. La célula del hospedero produce un material que deforma la pared celular que al final envuelve las hifas de *Frankia* durante todo su desarrollo tanto en la raíz como en el nódulo, Las células corticales son estimuladas a dividirse frente a las hifas “atrofiadas”, resultando en la formación del prenódulo con células invadidas por *Frankia*. En Aliso, la formación del prenódulo es típicamente observado después de 1 semana de incubación, y sus nódulos son vistos alrededor de 2 a 3 semanas después de la incubación, coincidiendo con el surgimiento de la actividad de la nitrógenasa, tiempo en cual deja su inmadurez (Huss-Danell, 1978; Wall y Huss-Danell, 1997).

Infección vía penetración intracelular: tiene lugar en miembros de la familia Elaeagnaceae, en los géneros *Ceanothus* y *Cercocarpus* (Berry y Sunell, 1990). En este tipo de infección no se presenta la deformación ni la infección del pelo radicular. Además, la división de las células corticales no conduce a la formación del prenódulo, sin embargo, como en la infección a través del pelo radicular, el nódulo se origina en el periciclo de la

raíz, y las células de la planta son invadidas por *Frankia* en el cortex, creciendo en el lóbulo del nódulo en la superficie de la raíz.

4.3.2 Anatomía del nódulo Teniendo origen en el periciclo de la raíz, la morfología de un nódulo de *Alnus* y de las demás plantas actinorrizas se parece a una raíz lateral. El tejido vascular, con la endodérmis como la pared celular más alejada, está centralmente localizada y rodeada por tejido cortical. La superficie del nódulo tiene una capa suberinizada, el peridermo. En el ápice del nódulo está en el meristemo pero, a diferencia que el de la raíz, este crece basalmente y no acropelicamente como se produce en la punta de la raíz. Cada lóbulo del nódulo puede ser alargado o mostrar una forma coralina. En algunos géneros actinorrízicos los nódulos son producidos a partir del ápice del nódulo.

4.3.3 Clases de nódulos Las esporas han sido nombradas como sp (+) o P (para espora positiva) y sp (-) o N (para espora negativa) (Tzean y Torrey 1989; Lalonde, Calvert y Pine, 1981) y los dos tipos de esporas se encuentran distribuidos en una amplia región geográfica (Vandijk, 1978, Vandijk, 1979; VandenBosch y Torrey, 1985). En base al grado de formación de la espora de *Frankia* en los nódulos de sus plantas hospedera se ha clasificado los nódulos en dos grupos. Esporas y esporangios son abundantes en nódulos con sp (+) y raras veces en sp (-) (Stewart, 1980). Este contraste es el resultado de la divergencia genética en el endófito (Normand y Lalonde, 1982; VandenBosch y Torrey, 1985; VanDijk, 1979). Nódulos con sp (+) y sp (-) han sido observados en *Alnus* (Normand y Lalonde, 1986; VanDijk, 1976; Wheeler, Mclaughlin y Steele, 1981), en *Myrica gale* (Schwintzer, Berry y Disney, 1981) y en *Comptonia peregrina* (VandenBosch y Torrey, 1985). Ellos también pueden ser encontrados en nódulos de *Casuarina* (Diem y Dommergues, 1985; Herg, 1986), *Hippophae* y *Ceanothus* (Gardner, 1976).

4.4 ESPECIFICAD DEL HOSPEDERO Y AISLAMIENTO DE *Frankia*

Norman y Lalonde (1986) nos dicen que la especificidad de la relación endófito–hospedero es muy grande, y que su comprensión radica en como el hospedero capta las señales moleculares enviadas por *Frankia* y/o viceversa. A demás el entendimiento de la simbiosis

es limitado porque se tienen exilo de aislamiento (y muchos no son efectivos) para solamente la mitad de los géneros actinorrízicos, y estos aislados han sido evaluados en unos pocos géneros hospederos. Las cepas *Frankia* aisladas hasta el momento han sido clasificadas en tres grupos.

El primero consiste en las cepas aisladas de *Alnus*, *Myrica*, o *Componia* y que usualmente nodulan los tres géneros hospederos y son efectivos en la fijación de Nitrógeno. Pero existen excepciones, por ejemplo, algunas cepas aisladas de *Myrica gale* forma nódulos inefectivos (causan la formación del nódulo pero no son fijadores de nitrógeno por la ausencia de vesículas) en *Alnus glutinosa* mientras que estas mismas cepas forman nódulos efectivos (causan la formación del nódulo y son fijadores de nitrógeno potenciales) en *Shepherdia*, el cual no es miembro de este grupo (St-Laurent y Lalonde, 1987).

El segundo grupo lo forman las cepas aisladas de los miembros actinorrízicos de la familia Elaeagnaceae (*Elaeagnus*, *Shepherdia* e *Hippophae*) y probablemente *Colletia* (Gauthier et al., 1984). Este grupo también incluye cepas *Frankia* aisladas de *Casuarina* la cual no nódula su planta hospedera pero si *Colletia*, *Hippophae* y *Elaeagnus* (Tisa, McBride y Ensing, 1983; Gauthier et al., 1984).

El tercer grupo lo integran las cepas aisladas de *Casuarina* que nódulan *Casuarina*, si bien es de notar que son muy pocos (Zhang, López y Torrey, 1984), excepto una que es capaz de nodular *Myrica gale* (Torrey, 1986).

Es posible que el hospedero tenga un impacto sobre la evolución de *Frankia*, posiblemente al tiempo cuando la cepa se adaptaba para la infección del pelo radicular divergía de la que se adaptaba para la penetración intracelular, o cuando una o más cepas del grupo especializado de infección de *Alnus* infectaba el grupo infectivo de *Casuarina* (Caurnoyer, Govy y Normand, 1993). Por otro lado, *Frankia* no es simbiote obligatorio y, hasta conocer más de su diversidad genética en el suelo, el impacto de la planta hospedera como marca de cualquier influencia por factores del suelo sobre *Frankia* de vida libre debe ser

evaluada por las técnicas moleculares utilizadas por Myroll y sus colaboradores (1994). El aislamiento de *Frankia* de los estados simbióticos es algunas veces directo, pero la gran mayoría de los casos las condiciones necesarias para su crecimiento son complejas (Akkermans et al., 1983; Quispel et al., 1989) o no son todavía conocidos.

El éxito del aislamiento de *Frankia* de los nódulos está reportado para todos los géneros actinorrízicos con excepción de *Ceuthostoma*, *Kentrothammus*, *Chamaebatia*, *Dryas* (Benson y Silvestre, 1993) y *Adolphia* (Huss – Danell, 1997). El aislamiento de *Frankia* de nódulos de *Alnus glutinosa* requiere de un extracto radicular el cual contiene compuestos activos (Simonet et al., 1984) que han sido identificados como dipterocarpol (hidroxidammeronona), triperteno – composición integral de la membrana de *Frankia* – (Quispel et al., 1989) y el hopanetetrol – lípido presente en las vesículas – (Yaser et al., 2003)

5. METODOLOGÍA

Este trabajo se desarrollo básicamente en tres lugares del Departamento del Cauca: La Esperanza (municipio de Sotará), La Marquesa (municipio de Silvia) y La Quintana (municipio de Popayán). Los nódulos de *Alnus acuminata* H.B.K. ssp. *acuminata* se colectaron en la vereda La Esperanza (2200 msnm), municipio de Sotará, vereda La Marquesa (2700 msnm) municipio de Silvia.

Se colectaron alrededor de 30g de cada vereda y 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 Glutaraldehido 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 Glutaraldehido, fueron lavadas en Buffer de Fosfato 0.2M pH a 7.4 y posfijadas con Tetróxido de Osmio (OsO₃) 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 5µm. 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 almacenar en el refrigerados (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 almidon– (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 realizo 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 corto 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[®] versión 12.0.0.458.

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. sugerido por Gonzáles Santander (1970).

6. RESULTADOS

6.1 MORFOLOGÍA EXTERNA

Los nódulos de *Alnus acuminata* H.B.K. ssp. *acuminata* fueron encontrados en los tres lugares de muestreo: La Esperanza, La Quintana y La Marquesa. Estos exhiben un color naranja y se agrupan en forma de coral o coliflor (Figura 1A y 3A). Cada nódulo colectado esta conformado por un promedio de 9 – 12 lóbulos. (Figura 1B).



Figura 1. Nódulo radicular de *Alnus acuminata* Infectado por *Frankia* sp. **A.** Nódulo donde se muestra la estructura en coliflor. **B.** Estructura del lóbulo del nódulo de *Alnus*.

El diámetro de los nódulos para La Esperanza es de 1 cm – 3 cm (Figura 2A), La Marquesa 1.8 cm – 5 cm (Figura 2B) y La Quintana 1.4 cm – 3.8 cm (Figura 2C).

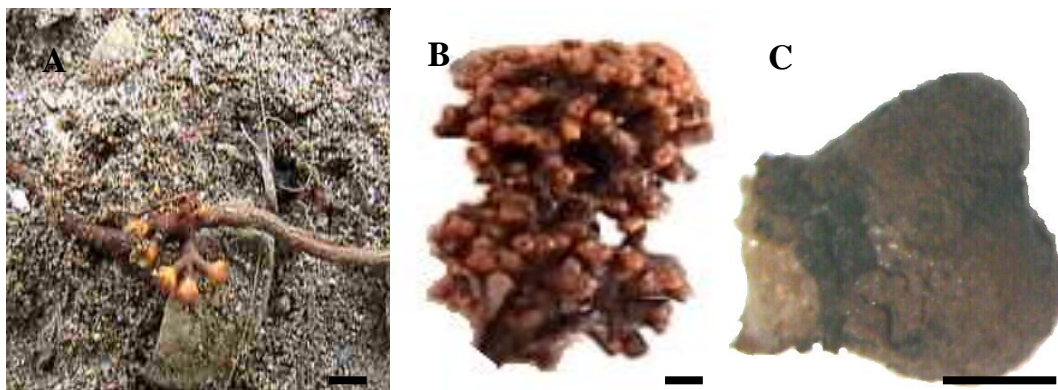


Figura 2. Nódulo radicular de *Alnus acuminata* infectado por *Frankia* sp. **A.** Nódulo colectado en La Esperanza (Escala 1.0 cm). **B.** Nódulo colectado en La Marquesa (Escala 0.5 cm). **C.** Nódulo colectado en La Quintana (Escala 0.2 cm).

6.2 MORFOLOGÍA INTERNA

Secciones de tejido cortado longitudinalmente muestran la presencia de 3 capas (Figura 3): la primera es un manto de mucopolisacárido, la segunda la cutícula del nódulo y el tercer estrato lo componen el córtex y el haz vascular.

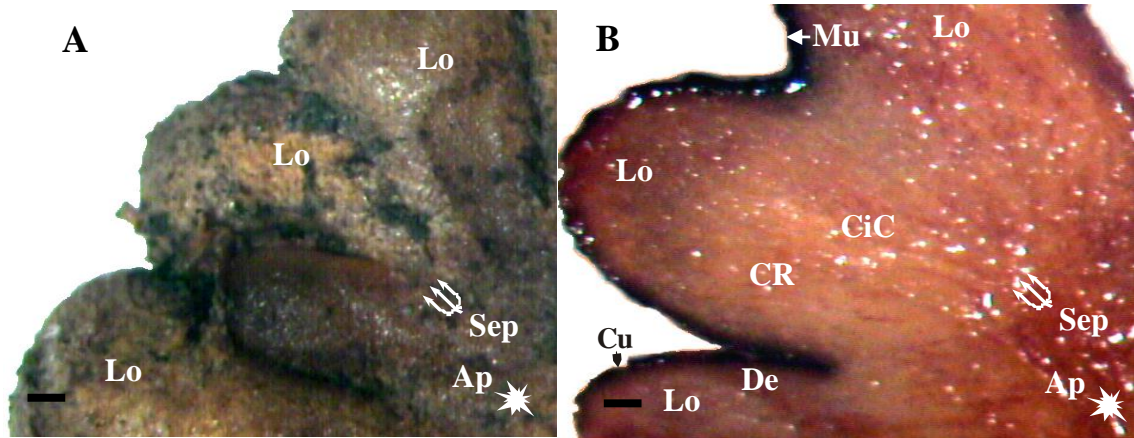


Figura 3. Nódulo de *A. acuminata*. **A.** Vista panorámica de un nódulo de *A. acuminata*. Lo: Lóbulo, Sep: Septación, Ap: Ápice del nódulo. **B.** Corte transversal del nódulo de *A. acuminata* donde se muestra la capa más externa, Mucopolisacárido (Mu), la Cutícula (Cu), el Córtez Radicular (CR) y el Cilindro Central (CiC). Escala 0.2 cm

Las observaciones realizadas en MOAR del tejido nódular radicular muestran una disposición de las células corticales infectadas por *Frankia* entorna al tejido vascular radicular, aunque en una forma desorganizada. (Figura 4, 5 y 6). También evidencia la forma circular de las vesículas – con su espacio de aire entre el citoplasma y la membrana externa de *Frankia* –, la presencia de hifas, la deformación de células corticales y la formación de espacios de aire con las células corticales adyacentes (figura 7)

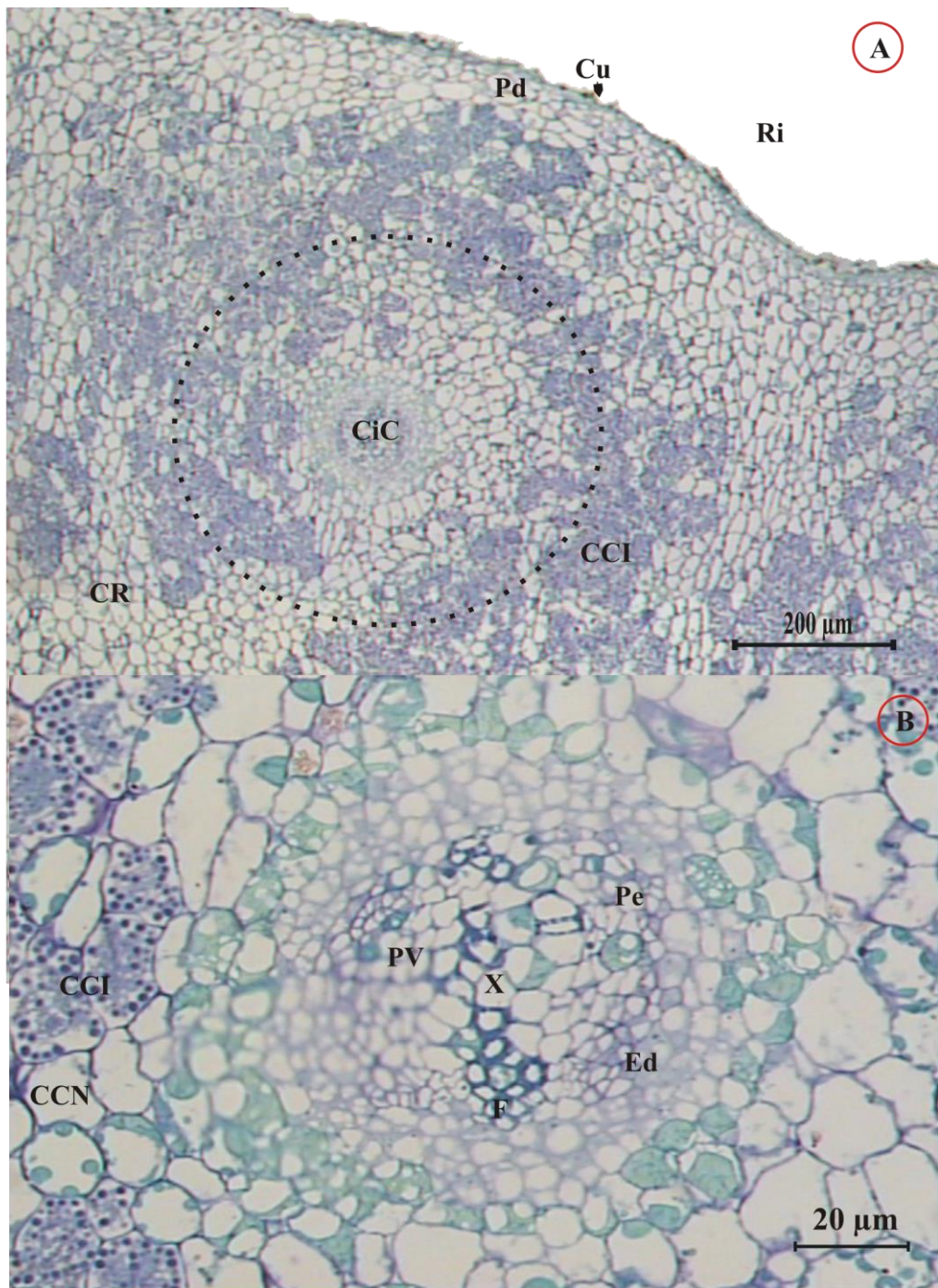


Figura 4. Corte transversal de nódulo radicular de *Alnus*, colectado en la Marquesa, teñido con Azul de Toluidina. **A.** Vista panorámica del tejido donde se muestra **Cu**: Cutícula, **CiC**: Cilindro Central, **CR**: Cortex Radicular, **Pd**: Peridermis, **Ri**: Rizósfera, **CCI**: Células Corticales Infectadas. El círculo punteado muestra la disposición de las células infectadas **B.** Detalle del Cilindro Central, **CCN**: Células Corticales Normales, **Ed**: Endodermis, **Pe**: Periciclo, **X**: Xilema, **F**: Floema, **PV**: Parénquima Vascular.

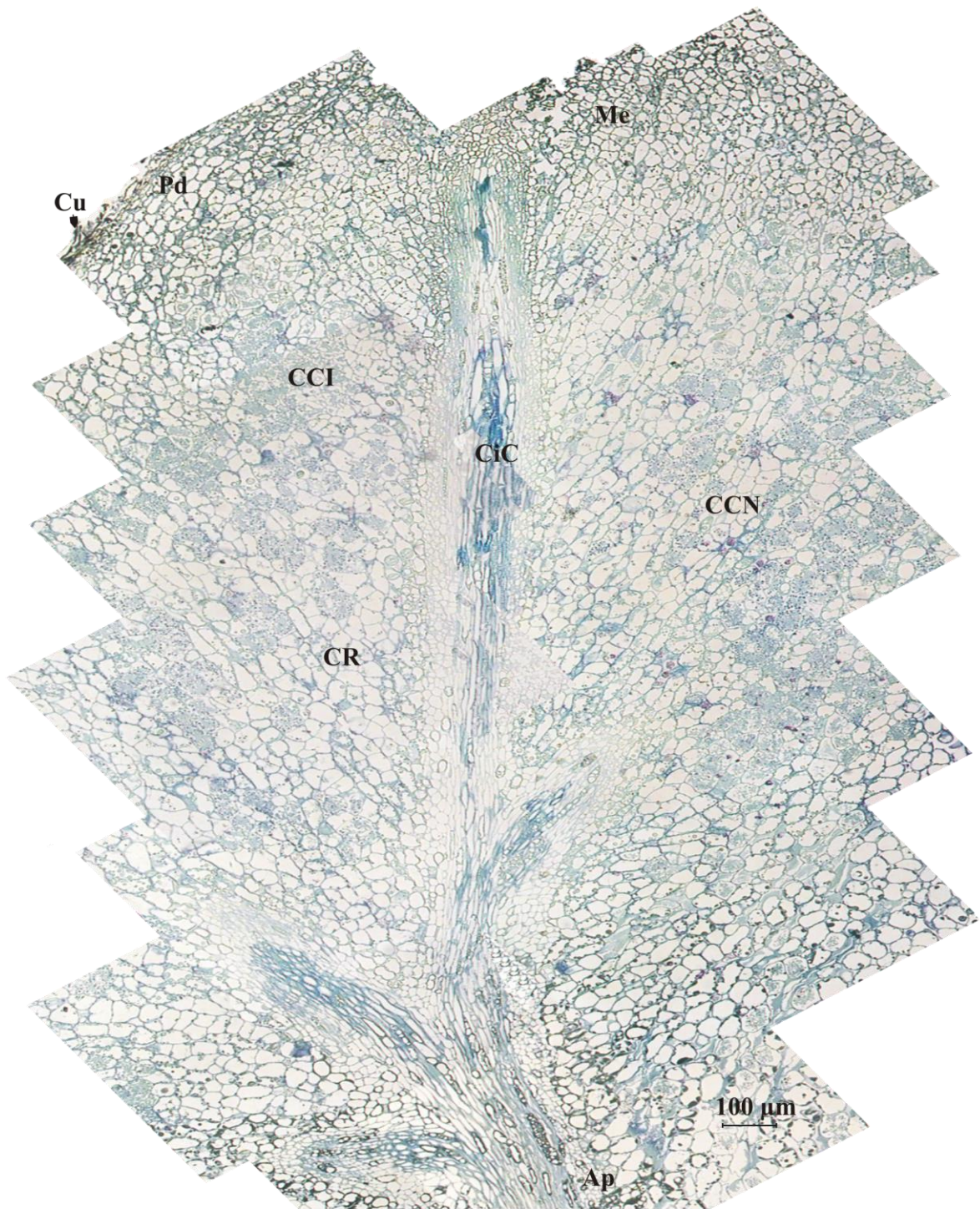


Figura 5. Corte longitudinal de nódulo radicular de *Alnus*, colectado en la Marquesa, teñido con Azul de Toluidina. **Cu:** Cutícula, **Pd:** Peridermis, **CiC:** Cilindro Central, **Ri:** Rizósfera, **CCI:** Células Corticales Infechadas, **Ap:** Ápice del Nódulo, **CCN:** Células Corticales Normales, **Me:** Meristemo

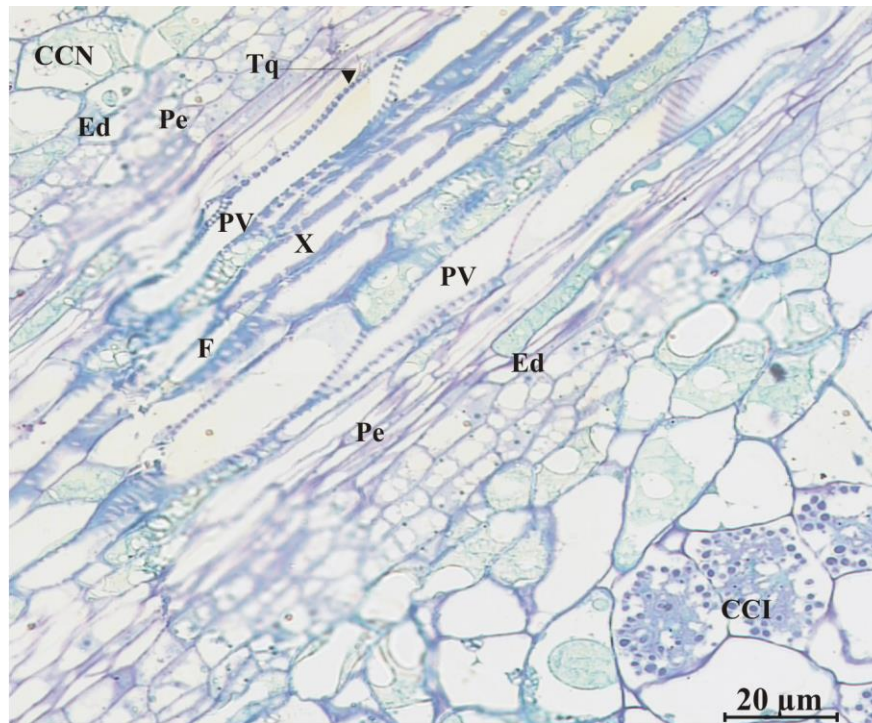


Figura 6. Corte longitudinal de nódulo radicular de *Alnus acuminata*, colectado en La Marquesa, teñido con Azul de Toluidina. Muestra los detalles del cilindro central. **CCI:** Células Corticales Infectadas, **CCN:** Células Corticales Normales, **Pe:** Periciclo, **Ed:** Endodermis, **X:** Xilema, **F:** Floema, **Tq:** Traqueidas **PV:** Parénquima Vascular.

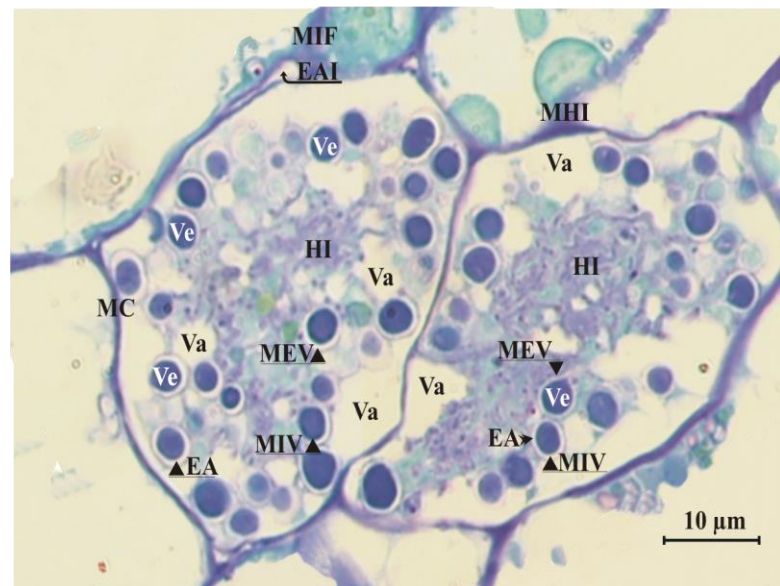


Figura 7. Corte longitudinal de nódulo radicular de *Alnus acuminata*, colectado en La Marquesa, teñido con Azul de Toluidina. Muestra **Ve:** Vesículas, **HI:** Hifa, **EA:** Espacio de Aire Vesicular, **MEV:** Membrana externa Vesicular, **MIV:** Membrana Interna Vesicular, **MIF:** Matriz Infectiva de *Frankia*, **EAI:** Espacio de Aire Interceular, **MC:** Membrana celular,

Las prueba histoquímica Azul Mercúrico de Bromofenol demuestran un alto contenido de proteínas (color azul) en células corticales infectadas, al teñir las vesículas que contienen la nitrogenasa, en comparación a otras células corticales no infectadas (Figura 8 y 9)

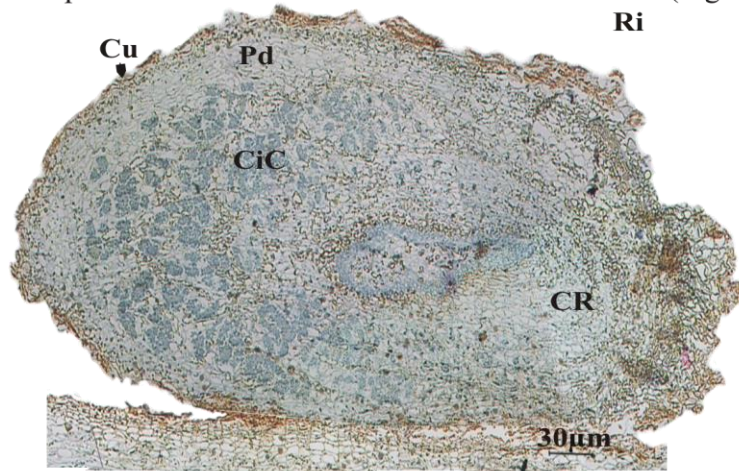


Figura 8. Corte longitudinal de nódulo de *Alnus acuminata*, colectado en La Esperanza, teñido con Azul Mercúrico de Bromofenol. Se muestra la Rizósfera (**Ri**), la capa más externa del nódulo la cutícula (**Cu**) seguida de la Peridermis (**Pd**), Cortes Radicular (**CR**) – que contiene las Células Corticales Infectadas por *Frankia* (**CCI**) – y el Cilindro Central (**CiC**)

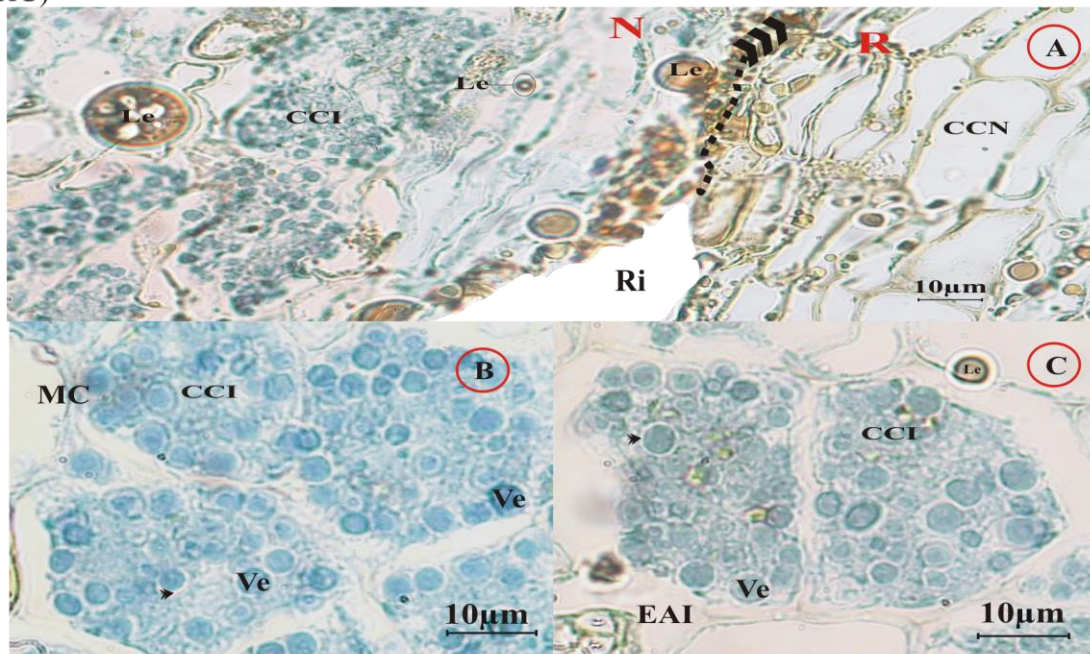


Figura 9. Corte longitudinal de nódulo de *Alnus acuminata*, colectado en La Esperanza, teñido con Azul Mercúrico de Bromofenol. **A.** Muestra la división entre la Raíz (**R**) y el Nódulo (**N**), puntos con flecha, partiendo de la rizósfera (**Ri**). **CCI**: Células Corticales Infectadas, **CCR**: Células Corticales Radiculares, **Le**: Lenticelas. **B.** y **C.** Morfología de las células corticales y vesículas de su simbionte. **CCI**: Células Corticales Infectadas, **Ve**: Vesículas, **MC**: Membrana Celular, **EAI**: Espacio de Aire Intercelular.

La tinción con Lugol no evidencia los amiloplastos en los nódulos de *Alnus* (Figura 10 y 11) pero si lo hace en el tallo de *Alnus* (Figura 12 y 13). En el tallo los amiloplastos se encuentran desorganizados, dentro de las células del parénquima, pero concentrados alrededor del haz vascular de la raíz.

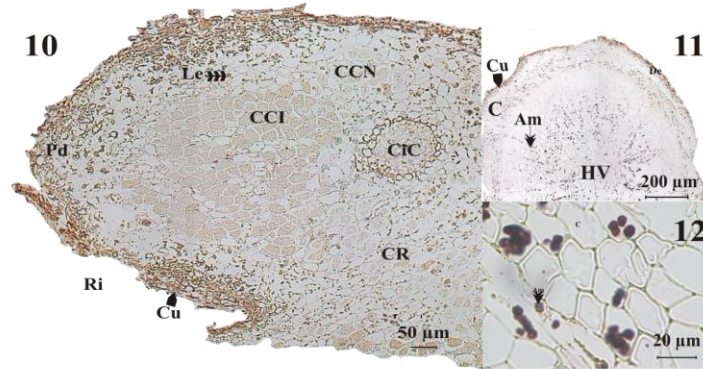


Figura 10. Corte longitudinal de nódulo de *Alnus acuminata*, colectado en La Esperanza, teñido con Lugol. Se muestra el manto más externo del nódulo, la cutícula (Cu) seguido por la Peridermis (Pd), Cortex Radicular (CR) con sus Células Corticales Infectadas por *Frankia* (CCI) y las normales (CCN), el Cilindro Central (CiC), las Lenticelas (Le) y la Rizósfera (Ri). **Figura 11.** Corte transversal del tallo de *Alnus acuminata*, colectado en La Esperanza, teñido con Lugol. Cu: Cutícula, De: Dermis, C: Cortex, HV: Haz Vascular y Am: Amiloplastos. **Figura 12.** Ampliación del corte transversal del tallo de *Alnus acuminata*, colectado en La Esperanza, teñido con Lugol. C: Cortex y Am: Amiloplastos.

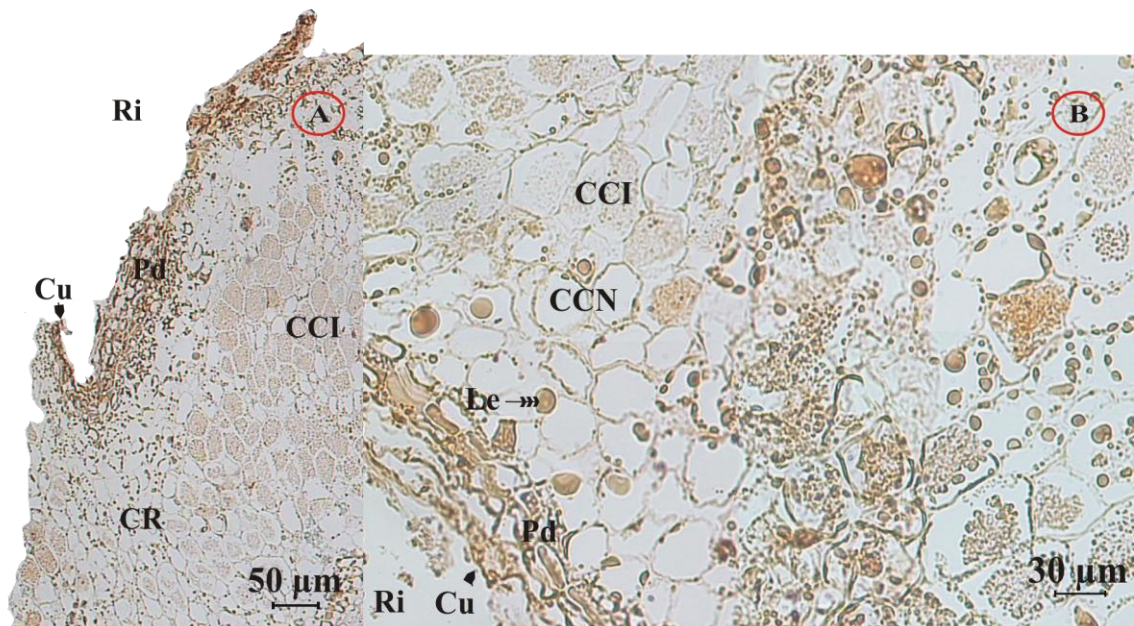


Figura 13. Corte longitudinal de nódulo de *Alnus acuminata*, colectado en La Esperanza, teñido con Lugol. **A.** Muestra la Cutícula (Cu), Peridermis (Pd), CórteX Radicular (CR) y las Células Corticales Infectadas (CCI), Ri: Rizósfera. **B.** Evidencia la presencia de lenticelas (Le) entre nódulos.

La tinción de los nódulos con Permanganato de Potasio nos descubre la presencia de taninos en todo el córtex, pero se hace más evidente en el peridermo (figura 14).

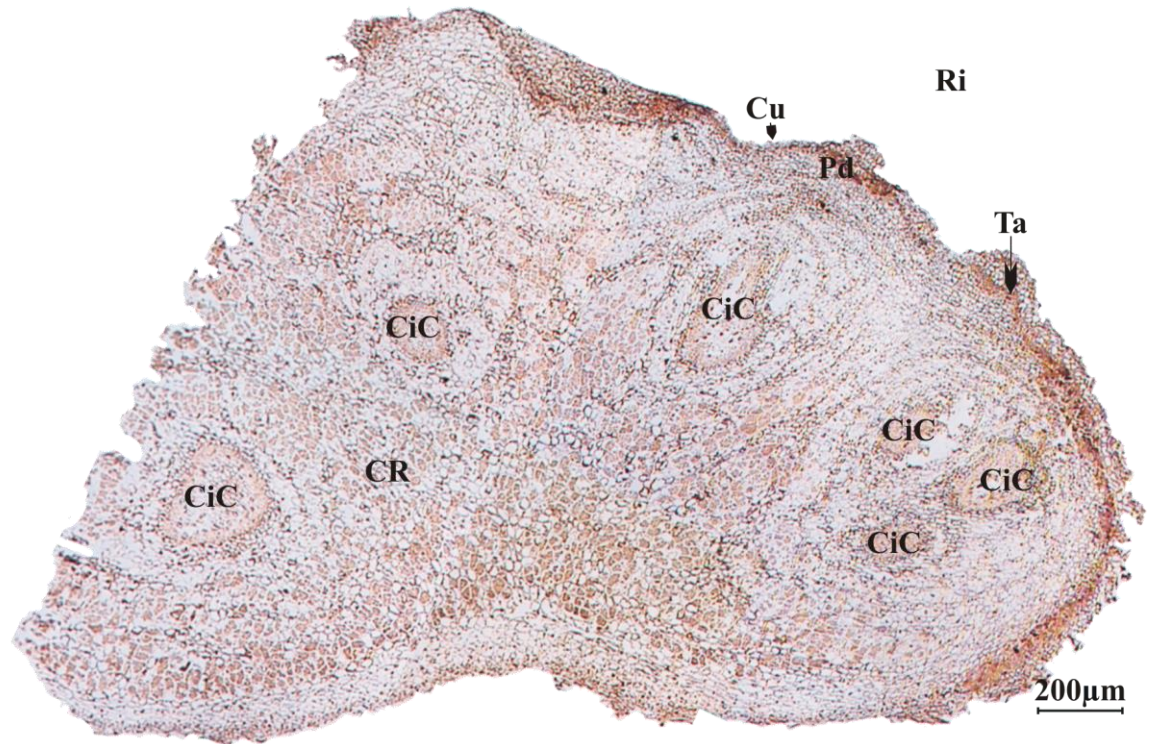


Figura 14. Corte transversal de nódulo radicular de *Alnus acuminata*, colectado en La Esperanza, teñido con $KMNO_3$. **Ta:** Banda con taninos, **Ri:** Rizósfera; **CiC:** Cilindro Central, **Cu:** Cutícula, **Pd:** Peridermis, **CR:** Cortex Radicular.



Figura 15. Corte transversal de nódulo radicular de *Alnus acuminata*, colectado en La Esperanza, teñido con $KMNO_3$. **Cu:** Cutícula, **Ri:** Rizósfera, **CCI:** Células Corticales Infectadas, **CCN:** Células Corticales Normales, **Pe:** Periciclo, **Ed:** Endodermis, **X:** Xilema, **F:** Floema, **PV:** Parénquima Vascular

Por ultimo la tinción doble Safranina –Verde Rápido nos muestra una alta contenido material de replicación (color verde) en las células corticales infectadas en comparación a células corticales no infectadas

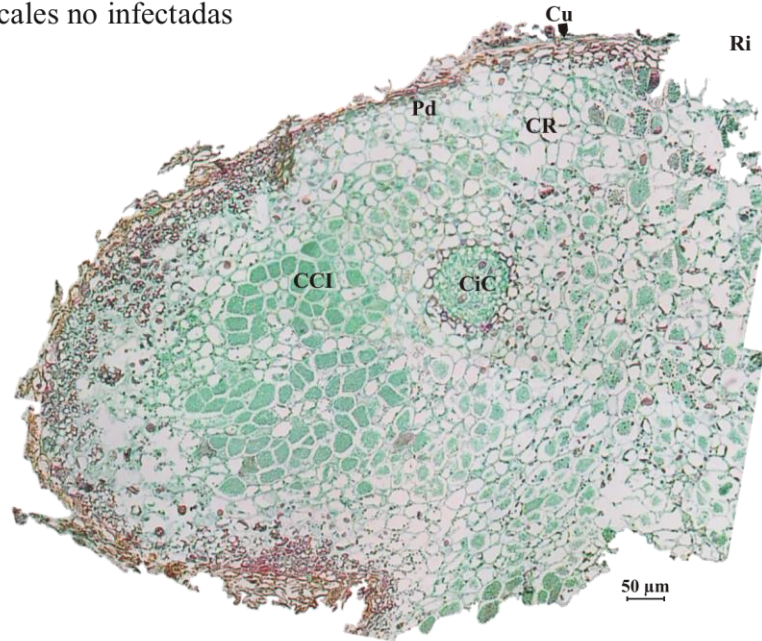


Figura 16. Corte longitudinal de nódulo de *Alnus acuminata*, colectado en La Esperanza, teñido con Verde Rápido - Safranina. Se distingue la capa más externa del nódulo la cutícula (**Cu**), la Peridermis (**Pd**), Cortes Radicular (**CR**), con Células Corticales Infectadas (**CCI**) y Células Corticales Normales (**CCN**), el Cilindro Central Vascular (**CiC**), la Rizósfera (**Ri**).

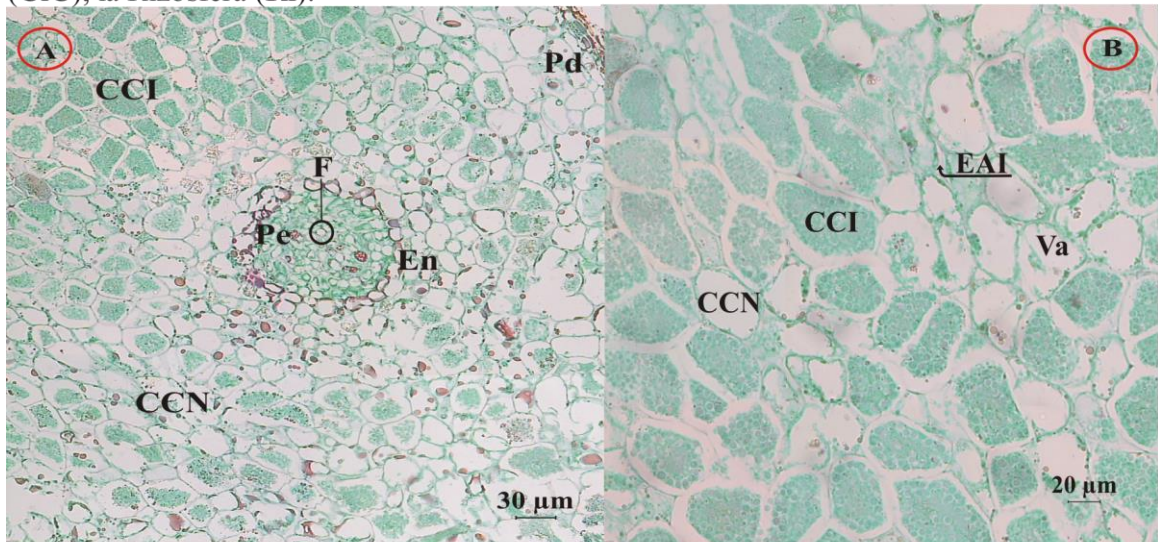


Figura 17. Corte transversal de nódulo de *Alnus acuminata*, colectado en La Esperanza, teñido con Verde Rápido – Safranina. **A.** **CCI:** Células Corticales Infectadas, **CCN:** Células Corticales Normales. **Pd:** Peridermis. **Pe:** Periciclo, **Ed:** Endodermis, **F:** Floema. **B.** Ampliación de las Células Corticales Infectadas (**CCI**) de la figura A. **Va:** Vacuola, **EAI:** Espacio de Aire Intercelular.

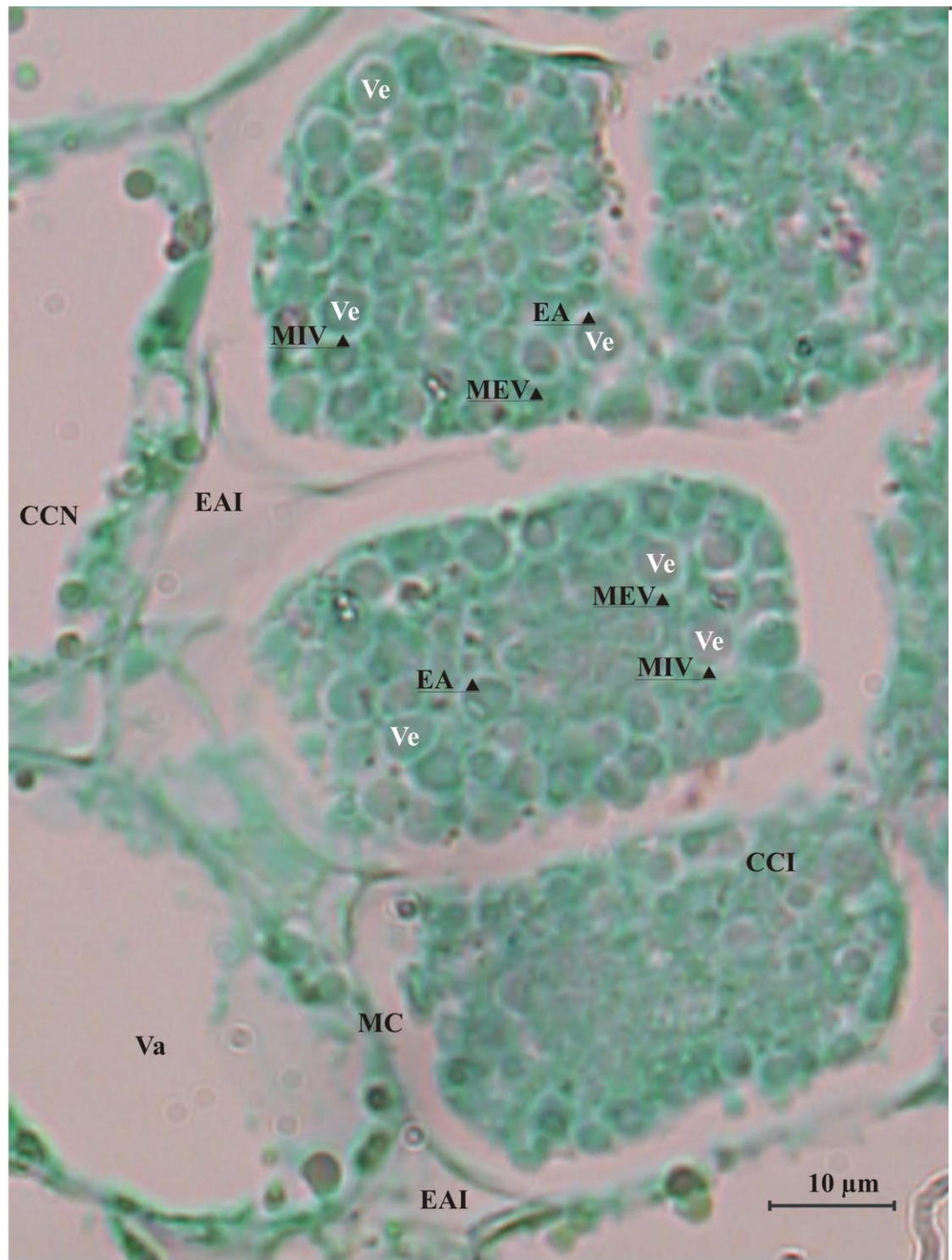


Figura 18. Corte longitudinal de nódulo de *Alnus acuminata*, colectado en La Esperanza, teñido con Verde Rápido –Safranina. **Ve:** Vesículas, **EA:** Espacio de Aire Vesicular, **MEV:** Membrana externa Vesicular, **MIV:** Membrana Interna Vesicular, **EAI:** Espacio de Aire Intracelular, **MC:** Membrana celular, **Va:** Vacuola.

7.3 ULTRAESTRUCTURA

La figura 19 nos muestra un corte transversal de una célula cortical de *Alnus* infectada por *Frankia*. Es de notar que la predominancia en el contenido celular de las células corticales infectadas son las hifas y las vesículas, es decir su simbionte *Frankia*.

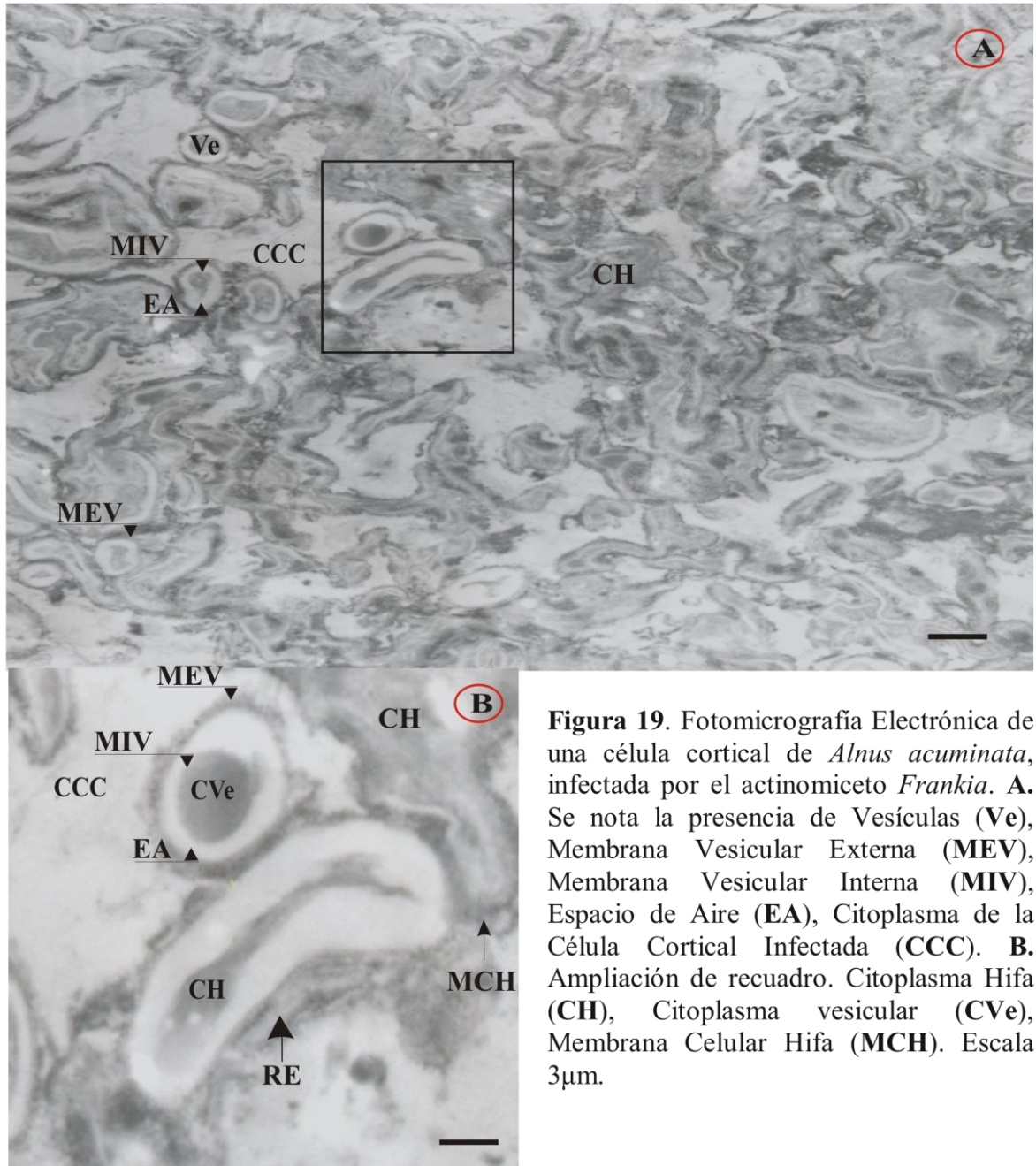


Figura 19. Fotomicrografía Electrónica de una célula cortical de *Alnus acuminata*, infectada por el actinomiceto *Frankia*. **A.** Se nota la presencia de Vesículas (Ve), Membrana Vesicular Externa (MEV), Membrana Vesicular Interna (MIV), Espacio de Aire (EA), Citoplasma de la Célula Cortical Infectada (CCC). **B.** Ampliación de recuadro. Citoplasma Hifa (CH), Citoplasma vesicular (CVe), Membrana Celular Hifa (MCH). Escala 3µm.

7. DISCUSIÓN

La estructura de los nódulos de *Alnus acuminata* H.B.K. spp. *acuminata* muestra varias semejanzas con otros nódulos inducidos por el actinomiceto *Frankia*. La disposición del tejido infectado por *Frankia* en Aliso está limitado a la región del córtex, teniendo preferencia por las células corticales (Lalonde y Knowles, 1975) (Figura 4; 7; 9 y 17), y se sitúan alrededor del cilindro central en forma desorganizada (Figura 4). La posición de la región meristemática del Aliso se localiza en la punta distal de nódulo (Figura 5) como en *Alnus glutinosa* (Becking, Boer y Houwink, 1964; Becking, 1977 citado por Newcomb, 1980), *Alnus rubra* (Berry y Torrey, 1983; Fontaine, Lancelle y Torrey, 1984), *Comptonia peregrina* (Newcomb et al., 1978; Torrey y Callahan, 1982) y *Dryas drummondii* (Torrey, 1978; Newcomb, 1980; Becking 1984).

La presencia de raíces nodulares en *Alnus* (Figura 3) no coincide con los reportes de las especies *Alnus rubra*, *Alnus glutinosa* (Newcomb y Wood, 1987), ni tampoco con *Dryas drummondii* (Newcomb, 1980), *Coriaria* (Newcomb y Pankhurst, 1982), *Talguenea* (Balboa et al., 1988) y *Chamaebatia* (Newcomb y Hersey, 1984), que utilizan el sistema de lenticelas como forma de aireación del tejido nodular. Las lenticelas (figura 9, 10 y 13), como sistema de aireación, en los nódulos radiculares de *Alnus* se encuentran en una alta concentración entre nódulos (figura 13) y en la parte externa del nódulo al igual que en *Alnus crispa* (Lalonde y Knowles, 1975).

Las vesículas esféricas de *Alnus acuminata* H.B.K. sp *acuminata* (figura 7, 9, 18 y 19) tienen una morfología parecida a las vesículas de *Shepherdia* (Newcomb y Wood, 1987), *Elaeagnus* (Newcomb y Wood, 1987; Bertrand y Lalonde, 1985), *Discaria* (Newcomb, 1980), *Alnus crispa* (Lalonde y Knowles, 1975) y *Alnus glutinosa* (Becking, 1977; Périnet y Lalonde, 1983). En contraste a las vesículas filamentosas de *Coriaria* (Newcomb y Pankhurst, 1982), *Chamaebatia* (Newcomb y Heisey, 1984) y a las alongadas de

Comptonia (Newcomb y Wood, 1987) y *Myrica* (Murcia, 2005). El tamaño promedio de las vesículas de 3 μm (Figura 7) en nódulos de Aliso encaja en el rango de 3 μm a 4 μm dado por Huss – Danell (1997). Por otro lado la separación vesicular –separación de la hifa con la vesícula – (Figura 19) no es encontrada en Aliso como lo es evidente en *Myrica* (Murcia, 2005) y *Comptonia* (Newcomb y Wood, 1987).

Es de notar que, en contraste con los nódulos de las leguminosas, el interior del nódulo de *Alnus* esta muy ventilado. Las lenticelas, como sistema de aireación, y los espacios de aire intracelulares en los nódulos radicales del Aliso se encuentran en una alta concentración entre nódulos y en la parte externa del nódulo al igual que en *Alnus crispa* (Figura 13) (Lalonde y Knowles, 1975; Massicotte et al., 1986) y aunque se encontró un solo individuo con raíz nodular en su sistema de fijación de nitrógeno se tendrían que realizar estudio mas detallado del porque esta fisiología pues esta podría ser inducida o bien por la bacteria, por lo que se hablaría de otro cepa *Frankia* inductora de nódulos en el Aliso, o por el Aliso, por lo que se hablaría de otra variedad de Aliso.

No se encontró referencia sobre la presencia de amiloplastos en nódulos de Aliso u otra planta actinorriza, solamente en *Myrica pubescens* H. & B. ex Wilidenow (Murcia, 2005) y *Comptonia peregrina* (Newcomb, 1980). La ausencia de amiloplastos en los nódulos del Aliso puede ser debido a que es poca la presencia de tejido parenquimático (Figura, 11) – tejido que contiene los plástidos (Jensen y Salisbury, 1984) –, en contraste a la presencia abundante de tejido parenquimático con amiloplastos en el tallo (Figura 12 y 13).

La elevada concentración de taninos en el nódulo (figura 14 y 15) nos indica la fuerte respuesta fisiológica que tiene el tejido de *Alnus* frente a la infección del actinomiceto. (Laplaze et al., 1999 y 2000). El reporte de Chaboud y Lalonde (1983) nos habla de la conjugación de proteínas de *Frankia* e información genética de *Alnus* que conlleva a la formación del nódulo, igualmente explican que durante el proceso de infección existe una respuesta fisiológica del Aliso contra *Frankia* que causa la limitación de la infección solo al córtex la raíz (Newcomb y Wood, 1987), y que no se expanda por toda la planta (Ibíd.), por

ejemplo que se hagan nódulos en el tallo como ocurre en *Datisca* (Berg, Langenstein y Silvester, 1999).

Es de apreciar que 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 Aliso (Figura 18). Esto nos indica que el simbiote *Frankia* no es estático (Pawlowski y Bisseling, 1996), si no que esta continuamente renovándose para iniciar nuevas infecciones en células corticales.

Las estructuras regenerativas de *Frankia* (E孢angios) no se observaron en *Alnus acuminata* H.B.K. sp *acuminata* como en *Alnus glutinosa* (Vandijk y Merkus, 1976) (figura 19), *Myrica pubescens* (Murcia, 2005) y *Elaeagnus umbellata* (Baker, Newcomb y Torrey, 1980; Newcomb, Baker y Torrey, 1987). Esto puede considerarse como una variación morfológica causada por el Aliso en *Frankia*, ya que, como lo reporta Torrey (1978), Newcomb y Wood (1987) y Benson y Silvester (1993), es la planta hospedera la que modifica la morfología de *Frankia* y el que determinó, para este caso, la ausencia de esporangios.

El uso de la tinción AMB –específica para proteínas– se puede utilizar como un indicador que evidencia la presencia y efectividad de *Frankia* en las plantas actinorrizas, ya que en las células corticales infectadas de los nódulos de Aliso tinte de azul toda la nitrógenasa contenida en las vesículas (Newcomb y Wood, 1987) en comparación a las células normales que no se tiñeron (Figura 9).

El estudio histológico mostrado en el presente trabajo reporta evidencia específica que los nódulos de *Alnus acuminata* H.B.K. sp *acuminata* están infectados por el actinomiceto *Frankia* con base a que se encontraron hifas con la habilidad de formar vesículas endófitas (Figura 7; 9 y 18), presencia de un espacio de aire entre la membrana interna y externa de la vesícula (Figura 7 y 19) y el alto grado de deformación de las células

corticales infectadas por *Frankia* ya que tienen una área de $39 \mu\text{m}^2$ frente a $24 \mu\text{m}^2$ de las no infectadas y $5 \mu\text{m}^2$ de las células corticales normales de la raíz (Figura 4; 7 y 9).

8. CONCLUSIONES

- *Alnus acuminata* H.B.K. ssp. *acuminata* tiene un doble sistema de aireación en su tejido nodular, raíz nodular y lentícelas, en comparación a *Myrica pubescens* H. & B. ex *Wilidenow*, otra planta actinorriza, que solo posee raíz nodular.
- El sistema de membrana vesicular del actinomiceto *Frankia* dentro de su hospedero es similar al de otras plantas actinorrizas, pues además de desarrollar hifas tiene una membrana externa e interna, y un espacio de aire que separa las dos membranas.
- El contenido proteico de las células corticales infectadas por *Frankia* es mayor que en las no infectadas y mucho mas elevado que en las células corticales de las raíces que no conforman el nódulo.
- A pesar de encontrarse amiloplastos en los nódulos de *Myrica pubescens* H. & B. ex *Wilidenow* y en el tallo de *Alnus*, estos no se hace presentes en los nódulos de *Alnus* debido a la poca presencia de tejido parenquimático en el córtex radicular.
- La prueba con Azul Mercurio de Bromofenol sirve como indicador de la presencia y efectividad de *Frankia* en los nódulos de Aliso y puede ser también usado como indicador en otros géneros de plantas actinorrizas.
- La respuesta fisiológica expresada por *Alnus*, causada por la infección del actinomiceto *Frankia*, se expresa en el aumento del contenido de Taninos en todo el nódulo pero con una preferencia especial en la periferia del nódulo
- El contenido de material de replicación en los nódulos de Aliso esta concentrado en las células corticales infectadas y en su mayoría pertenece al actinomiceto *Frankia* y no al Aliso.

BIBLIOGRAFÍA

AKKERMANS, Anton; ROELOFSEN, Wim, BLOM, Jan, HUSS-DANELL, Kerstin and HARKINK, Reint. Utiliazation of carbon and nitrogen compounds by *Frankia* in synthetic media and in root nodules of *Alnus glutinosa*, *hippohaë rhamnoides* and *Datisca cannabia*. En: Canadian Journal of Botanic. Vol. 61, No.____ (____, 1983); p. 2793 – 2800.

ANJA, Nickel; PELZ, Oliver, DITTMAR, Hahn, SAURER, Matthias, SIEGWOLF, Rolf y ZEYER, Josef. Effect of inoculation and litter amendment on establishment of nodule – forming *Frankia* population in soil. En: Applied and Environmental microbiology. Vol. 67, No. 6 (June, 2001); p. 2603 – 2609.

BALBOA, O., ÁVILA, G. and ARCE, P. Fine structure of actinorhizal of the Rhamnaceae growing in Chile I. *Talganea quinquenervia* (Gill et Hoot). En: Protoplasma. Vol. 147, Vol.____ (____, 1988); p. 143 – 148.

BECKING, J. Denitrogen – fixing associations in higher plants other than legumes. En: A treatise on denitrogen fixation. Vol.____, No.____ (____, 1977); p. 185 – 276.

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

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. and TORREY J. Root hair deformation in the infection process of *Alnus rubra*. En: Canadian Journal of Microbiology. Vol. 61, No. _____ (_____, 1983); p. 2863 – 2976.

BAKER, Dwight and O'KEEFE, David. A modified sucrose fractionation procedure for the isolation of frankiae from actinorhizal root nodules and soil samples. En: plant and Soil. Vol. 78, No. _____ (_____, 1984); 23 – 28.

BAKER, Dwight; NEWCOMB, William and TORREY, John. Characterization of an ineffective actinorhizal microsymbiont, *Frankia* sp. Eu11 (Actinomycetales). En: Canadian Journal of Microbiology. Vol. 26, No. _____ (september, 1980); p. 1072 – 1089.

BECKING, J. Plant – endophyte symbiosis in non . leguminous plants. En: Plant and Soil. Vol. 32, No. _____ (_____, 1970); p. 611 – 634.

BECKING, J. H; DE BOER, W. E. and HOUWINK, A. L. Electron microscopy of the endophyte of *Alnus glutinosa*. Antonie van Leeuwenhoek. En: Journal of Serology. Vol. 30, No. 3 (mar. 1964); p. 343 – 376.

BECKING, J. Identification of the endophyte of *Dryas* and *Rubus* (Rosaceae). En: Plant and Soil. Vol. 78, No. _____ (_____, 1984); p. 105 – 128

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.

BÉRDARD, Charles and KNOWLES, Roger. Physiology, biochemistry, and specific inhibitors of CH₄, NH₄⁺, and CO oxidation by methanotrophs and nitrifiers. En: Microbiological Review. Vol. 53, No. 1 (Mar. 1989); p. 68 – 84.

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

BERG, Howard. Preliminary evidence for the involvement of suberization in infection of *Casuarina*. En: Canadian Journal of Botanic. Vol. 63, No.____ (____, 1983); p. 2910 – 2918.

BERG, Howard.; LANGENSTEIN, Birgit and SILVESTER, Warwick. Development in the *Datisca – Coriaria* nodule type. En: Canadian Journal of Botany. Vol. 77, No. 9 (sep. 1999); p. 1334 – 1350.

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.

BERTRAND, L. and LALONDE, M. *In vitro* propagation and nodulation by *Frankia* of actinorhizal Russian Olive (*Elaeagnus angustifolia* L.). En: Plant and Soil. Vol. 87, No.____ (____, 1985); p. 143 – 152.

BLAHA, D. and COURNOYER, B. Cloning, characterization and phylogenetic analysis of the *sig A σ^{70}* factor gene sequence from the actinomycete *Frankia*. En: Plant and Soil. Vol. 254, No.____ (____, 2003); p. 97 – 106.

BLOOM, Raanan.; MULLIN, Beth and TATE III, Robert. DNA restriction patterns and DNA – DNA solution hybridization studies of *Frankia* isolates from *Myrica*

pensylvanica (Bayberry). En: Applied and Environmental Microbiology. Vol. 55, No. 9 (september, 1989); p. 2155 – 2160.

BOSCO, Marco.; FERNADEZ, Maria, SIMONET, Pascal, MATERASSI, Riccardo, NORMAND, Philippe. Evidence that some *Frankia* sp strains are able to cross boundaries between *Alnus* and *Elaeagnus* host specificity groups. En: Applied and Environmental Microbiology. Vol, 58, No. 5 (may, 1992); p. 1569 – 1576.

BOTERO, Raúl and RUSSO, Ricardo. Utilización de árboles y arbustos fijadores de nitrógeno en sistemas sostenibles de producción animal en suelos ácidos tropicales. En: Agroforestería para la producción animal. Vol._____, No.____ (febrero, 1997); p. 121 – 143.

BURGGRAAF, A. and SHIPTON, W. Estimates of *Frankia* growth under various pH and temperature. En: Plant and Soil. Vol. 69, No.____ (_____, 1982); p. 135 – 147.

BURGGRAAF, A. and SHIPTON, W. Studies on the growth of *Frankia* in the relation tom infectivity and nitrogen fixation (acetylene reduction). En: Canadian Journal of Botanic. Vol. 61, No.____ (_____, 1983); p. 2774 – 1782.

BURGGRAAF, A.; QUISPEL, A., TAK, T. and VALSTAR, J. Methods of isolation and cultivation of *Frankia* species from actinorhizas. En: Plant and Soil. Vol. 61, No.____ (_____, 1981); p. 157 – 168.

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.

CAURNOYER, B.; GOVY, M. and NORMAND, M. Molecular phylogeny of the symbiotic actinomycetes of the genus *Frankia* matches host – plant infection process. En: Molecular Biology and Evolution. Vol. 10, No. _____ (_____, 1993); p. 1303 – 1316.

CHABOUD, Annie and LALONDE, Maurice. Lectin binding of *Frankia* strains. En: Canadian Journal of Botanic. Vol. 61, No. _____ (_____, 1983); p. 2889 – 2897.

COHAN, Frederick. ¿What are bacterial species? En: Annual Review Microbiology. Vol. 56, No _____ (May, 2002); p. 457 – 487.

COUCH, J. N. A new genus and family of the Actinomycetales, whit revision of the genus Actinoplanes. En: Journal Mitchell Science and Society. Vol. 71, No 1 (ene.-feb. 1955); p. 148 – 155.

DALTON, D. A. and NAYLOR, A. W.. Studies on nitrogen fixation by *Alnus crispa*. En: American Journal of Botany. Vol. 62, No. 1 (ene. 1975); p. 76 – 80.

DANIEL, Buckley and SCHMIDT, Thomas. Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agro – ecosystems. En: Environmental Microbiology. Vol. 6, No. 5 (_____, 2003); p. 441 – 452.

DAWSON, J. Interaction among actinorhizal and associated plant species. En: The biology of *Frankia* and actinorhizal plants. Vol. _____, No. _____ (_____, 1990); p. 299 – 316.

DIEM, H. and DOMMERGUES, R. *In vitro* production of specialized reproductive torulose hyphae by *Frankia* strain ORS 021001 isolated from *Casuarina junghuhniana* root nodules. En: Plant and Soil. Vol. 87, No. _____ (_____, 1985); p. 17 – 29.

FONTAINE, Mark; LANCELLE, Susan and TORREY, John. Initiation and ontogeny of vesicles in cultured *Frankia* sp. Strain HFPAr13. En: Journal of Bacteriology. Vol. 160, No. 3 (december, 1984); p. 921 – 927.

FOURNIER, L. *Alnus acuminata* Kunth in H.B.K. En: Species Descriptions. Vol. 2, No.____ (____, 1989) p. 289 – 290.

FURLOW, J. The systematic of the American species of *Alnus* (Betulaceae). En: Rhodora. Vol. 81, No____ (____, 1979); p. 1 – 826.

GAUTHIER, D., FRIONI, L., DIEM, H. AND DOMMERGUES, Y. The *Colletia spinosissima-Frankia* symbiosis. En: Oecol. Plant. Vol.5, No.____ (____, 1984); p. 231 – 239.

GATNER, E. M. S. and GARDBER, I.C. Observations on the fine structure of the root nodule endophyte of *Hippophë rhamnoides* L. En: Archived Microbiology. Vol. 70, No 1 (ene.- feb. 1970); p. 183 – 196.

GONZAGA, Luís. Obtención de marcadores moleculares del germoplasma de aliso cerezo (*Alnus acuminata* H.B.K.) de dos cuencas hidrográficas de Risaralda y Quindío. En: Scientia et technica. Vol.____, No. 15 (Marzo, 2001); p. 145 – 149.

GONZÁLES, Santander, Técnicas para microscopia Electrónica 1977.p 48 – 60.

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.

HAFEEZ, Fauzua; AKKERMANS, Antoon and CHAUDHARY, Ashraf. Observation on the ultrastructure of *Frankia* sp in root nodules of *Datisca cannabina* L. En: Plant and Soil. Vol. 79, No.____ (____, 1984); p. 383 – 402.

HAHN, A.; HOCK, B., KESAVAN, A., ANIMON, M. NARAYANAN, R. and WHEELER, C. The production and utilization of monoclonal antibodies for identification of a *Frankia* strain utilized as inoculum for *Casuarina equisetifolia*. En: Plant and Soil. Vol. 254, No.____ (____, 2003); p. 27 – 33.

HUSS – DANELL, Kerstin and FREJ, Ann – Kristin. Distribution of *Frankia* in soil forest and afforestation sites in northern Swenden. En: Plant and Soil. Vol. 90, No.____ (____, 1986); p. 407 – 418.

HUSS – DANELL, Kerstin. Influence of host (*Alnus* and *Myrica*) genotype on infectivity, N₂ fixation, spore formation and hydrogenase activity in *Frankia*. En: New Phytol. Vol. 119, No.____ (____, 1991); p. 121 – 127.

HUSS – DANELL, Kerstin. Actinorhizal symbioses and their N₂ fixation. En: New Phytol. Vol. 136, No ____ (____, 1997); p. 375 – 405.

JENSEN, William. Botanical Histochemistry . Freeman & Co. 1962.

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

JEONG, S., RITCHIE, J. and MYROLD, D. Molecular phylogenies of plants and *Frankia* support multiple origins of actinorhizal symbioses. En: Molecular Phylogenetics and Evolution. Vol. 13, No. 3 (December, 1999); p. 493 – 503.

JIABIN, Hunang; ZHEYING, Zhao, GUANXIONG, Chen and HUICHANG, Liu. Host range of *Frankia* endophytes. En: Plant and Soil. Vol. 87, No.____ (_____, 1985); p. 61 – 65.

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.

KAELKE, C. and DAWSON, J. Seasonal flooding regimes influence survival, nitrogen fixation, and the partitioning of nitrogen and biomass in *Alnus incana* ssp *rugosa*. En: Plant and Soil. Vol. 254, No.____ (_____, 2003); p. 167 – 177.

KENDALL, Martin; POSAVATZ, Nancy and MYROLD, David. Nodulation potential of soil from red alder stands covering a wide age range. En: Plant and Soil. Vol. 254, No.____ (_____, 2003); p. 187 – 192.

KNOWLTON, Susan and DAWSON, Jeffrey. Effects of *Pseudomonas cepacia* and cultural factors on the nodulation of *Alnus rubra* root by *Frankia*. En: Canadian Journal of Botanic. Vol. 61, No.____ (_____, 1983); p. 2877 – 2882.

KOHL, Stven; BAKER, Dwight, VAN KESSEL, Chris and DAWSON, Jeffrey. An assessment of soil enrichment by actinorhizal N₂ fixation using $\delta^{15}\text{N}$ values in chronosequence of deglaciation at Glacier Bay, Alaska. En: Plant and Soil. Vol. 254, No.____ (_____, 2003); p. 11 – 17.

KRUMHOLZ, Glenn; CHVAL, Matthew, McBRIDE, Marck and TISA, Louis. Germination and physiological properties of *Frankia* spores. En: Plant and Soil. Vol. 254, No.____ (_____, 2003); p. 57 – 67.

KURDALI, F.; DOMENACH, A. and BARDIN, R. Alder – poplar associations: determination of plant nitrogen sources by isotope techniques. En: Biology and Fertility Soils. Vol. 9, No. _____ (_____, 1990); p. 321 – 329.

LALONDE, M. CALVERT, H. and PINE, S. Isolation and use of *Frankia* strains in actinorhizae formation. En: Perspectives in nitrogen fixation. Vol. _____, No _____ (_____, 1981); p. 296 – 199.

LALONDE, M. and DEVOE, I. Origin of the membrane envelope enclosing the *Alnus crispa* var *mollis* Fern. Root nosule endophyte as revealed by freeze – erching microscopy. En; Physiological Plant Pathology. Vol. 8, No. _____ (_____, 1976); p. 123 – 129.

LALONDE, Maurice and KNOWLES, Roger. Ultrastructure, composition, and biogenesis of the encapsulation material surrounding the endophythe in *Alnus crispa* var. *mollis* root nodules. En: Canadian Journal of Botany. Vol 53, No 18 (sep. 1975); p. 1951 – 1971.

LANCELE, 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.

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.

LAPLAZE, Laurent; RIBEIRO, Ana, FRANCHE, Claudine, DUHOUX, Emile, AUGUY, Florence, BOGUSZ, Didier and PAWLOWSKI, Katharina. Characterization of a *Casuarina glauca* nodule – specific subtilisin – like protease gene, a homolog of *Alnus glutinosa* ag12. En: Molecular Plant – Microbe Interactions. Vol. 13, No. 1 (____, 2000); p. 113 – 117.

LAVIRE, C. and COURNOYER. Progress on the genetics of the N₂ – fixing actinorhizal symbiont *Frankia*. En: Plant and Soil. Vol. 254, No.____ (____, 2003); p. 125 – 137.

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

LECHEVALIER, M.; BAKER, D. and HORRIÈRE. Physiology, chemistry, serology, and infectivity of two *Frankia* isolates from the *Alnus incana* subsp. *rugosa*. En: Canadian Journal of Botanic. Vol. 61, No____ (____, 1983); p. 2826 – 2833.

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.

LUNDQUIST, Per-Olof. Nitrogenase activity in *Alnus incana* root nodules Sweden responses to O₂ and Short-Term N₂. En: Plant Physiologists. Vol. 122 No 2 (Feb. 2000.); p. 553–561.

MASSICOTTE, H.; PETERSON, R., ACKERLEY, C. and PICHÉ, Y. Structure and ontogeny of *Alnus crispa* – *Alpova diplophloeus* ectomycorrhizae. En: Canadian Journal of Botanic. Vol. 64, No.____ (____, 1986); p. 177 – 192.

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.

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.

MIRZA, Sajjad, HAMEED, Sohail and AKKERMANS, Antoon. Genetic diversity of *Datisca cannabina* – compatible *Frankia* strains as determined by sequence analysis of the PCR – amplified 16S rRNA gene. En: Applied and Environmental Microbiology. Vol. 60, No. 7 (july, 1994); p. 2371 – 2376.

MIRZA, S.; PAWLOWSKI, K., HAFEEZ, F., CHAUDHARY, A., and AKKERMANS, A. Ultrastructure of the endophyte and localitation of nifH transcripts in root nonulesof *Coriaria nepalensis* Wall. By *in situ* hybridation. En: New Phytologist. Vol. 126, No____ (____, 1994); p. 131 – 136.

MOIROUD, A. and FAURE – RAYNAUD, M. Effects of some herbicides on the growth and infectivity of *Frankia* srains. En: Plant and Soil. Vol. 74, No.____ (____, 1983; p. 133 – 136.

MORT, A.; NORMAND, P. and LALONDE, M. 2 O – methyl – D – mannose, a key sugar in the taxonomy of *Frankia*. En: Canadian Journal of Microbiology. Vol. 29, No.____ (____, 1983); p. 993 – 1002.

MYROLD, David and HUSS – DANELL, Kerstin. Alder and lupine enhanced nitrogen cycling in a degraded forest soil in Northern Sweden. En: Plant and Soil. Vol. 254, No.____ (____, 2003); p. 47 – 36.

MURCIA, Jairo Andrés. Estudio Ultraestructural e histológico del proceso del nodulación de *Frankia* en *Myrica pubensces* (Laurel de Cera) *in situ*. Trabajo de Grado. In Press.

NALIN, R.; DOMENACH, A. and NORMAND, P. Molecular structure of the *Frankia* spp *nifD* – *K* intergenic spacer and design of *Frankia* genus compatible primer. En: Molecular Ecology. Vol. 4, No.____ (____, 1995); p. 483 – 491.

NAVARRO, Elisabeth; BOUSQUET, Jean, MOIROUND, André, MUNIVE, Antonio, PIOU, Dominique and NORMAND, Philippe. Molecular phylogeny of *Alnus* (Betulaceae), inferred from nuclear ribosomal DNA ITS sequences. En: Plant and Soil. Vol. 254, No.____ (____, 2003); p. 207 – 217.

NAVARRO, Elisabeth; NALIN, Renaud, GAUTHIER, Daniel and NORMAND, Philippe. The nodular microsymbionts of *Gymnoistoma* spp are *Elaeagnus* – infective *Frankia* strains. En: Applied and Environmental Microbiology. Vol. 64, No. 4 (april, 1997); p. 1610 – 1616.

NELSON, D. and LÓPEZ, C. Variation in fixation among populations of *Frankia* sp and *Ceanothus* sp in actinorhizal association. En: Biology and Fertility of Soil. Vo. 7 , No.____ (____, 1989); p. 269 – 274.

NEWCOMB, W. and HEISEY, R. Ultrastructure of actinorhizal root nodules of *Chamaebatia foliolosa* (Rosaceae). En: Canadian Journal of Botany. Vol. 62, No.____ (____, 1984); p. 1697 – 1707.

NEWCOMB, W. AND PANKHURST, C. Fine structure of actinorhizal root nodules of *Coriaria arborea* (Coriariaceae). En: New Zealand Journal of Botany. Vol. 20, No. _____ (_____, 1982); p. 93 – 103.

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.

NEWCOMB, William. Fine structure the root nodules of *Dryas drummondii* Richards (Rosaceae). En: Canadian Journal of Botany. Vol. 59, No 10 (Oct. 1980); p. 2500 – 2514.

NEWCOMB, William; BAKER, Dwight and TORREY, John. Ontogeny and structure of effective root nodules of the autumn olive (*Elaeagnus umbellata*). En: Canadian Journal of Botanic. Vol. 65, No. _____ (_____, 1987), p. 80 – 94.

NITTAYAJARN, Aphakorn, MULLIN, Beth, BAKER, Dwight. Screening of symbiotic Frankiae for host specific by restriction fragment length polymorphism analysis. En: Applied and Environmental Microbiology. Vol. 56, No. 4 (april, 1990); p. 1172 – 1174.

NORMAND, P. and LALONDE, M. The genetics of actinorhizal *Frankia*: A review. En: Plant and Soil. Vol. 90, No. _____ (_____, 1986); p. 429 – 453.

OBERTELLO, Mariana, LAPLAZE, Laurent, SANTI, Carole, SVISTOONOFF, Sergio, AUGUY, Florence, BOGUSZ and FRANCHE, Claudine. Actinorhizal nitrogen fixing nodules: infection process, molecular biology and enomics. En: African Journal of Biotechnology. Vol. 12, No. 2 (December, 2003) p. 528 – 538.

OROZCO, F.; MEDINA, M and SARRIA P. Aislamiento y evaluación de microorganismos endófitos de aliso (*Alnus acuminata* var. *Acuminata*). En: Livestock Research for Rural Development. Vol 17, No 1 (____, 2005); p. 1 – 12.

PARKER, Matthew. Plant fitness variation caused by different mutualist genotypes. En: Ecology. Vol. 76, No, 5 (____, 1995); p. 1525 – 1535.

PARSONS, R., SILVESTER, W., HARRIS, S., GRUIJTERS, W and BULLIVANT, S. Frankia Vesicles Provide Inducible and Absolute Oxygen Protection for Nitrogenase. En: Plant Physiol. Vol. 83, No.____ (____, 1978); p. 728 – 731.

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.

PAWLOWSKI, Katharina. Nodule – specific gene expression. En: Physiologia Plantarum. Vol. 99, No.____ (____, 1997); p. 617 – 631.

PÉRINET, P.; BROUILLETTE, J. G., FORTIN, J. A. and LALONDE, Maurice. Large scale inoculation of actinorhizal plants with Frankia . En: Plant and Soil. Vol. 87, No. 4 (abr. 1985); p. 175 – 183.

PÉRINET, Pierre and LALONDE, Maurice. Axenic nodulation of *in vitro* propagated *Alnus glutinosa* plantlets by *Frankia* strains. En: Canadian Journal of Botanic. Vol. 61, No.____ (____, 1983); p. 2883 – 2888.

QUISPEL, A. SVENDSEN, J., SCHRIPEMA, W., BAAS, C., ERKELENS, and LUGTENBURG, J. Identification of dipterocar- pol as olation factor for the induction of

primary isolation of Frankia from root nodules of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertner. En: Molecular Plant-Microbe Interaction Vol. 2, No.____ (____, 1989); p. 107-112..

RACETTE, S. and TORREY J. The isolation, culture and infectivity of a *Frankia* strain from *Gymnostoma papuanum* (Casuarinaceae). En: Plant and Soil. Vol.118, No____ (____, 1989); p. 165 – 170.

RANCOURT, M. W. and LECHEVALIER, Hubert. Electron Microscopic study of the rangial structure of an actinomycete *Microëlobosporia flavea*. En: Journal Genetic Microbiology. Vol. 31, No 2 (feb. 1963); p. 493 – 498.

RANCOURT, M. W. and LECHEVALIER, Hubert. Electron Microscopic study of the formation of spiny conidia in species *Streptomyces*. En: Canadian Journal of Microbiology. Vol. 10, No. 2 (feb. 1964); p 311 – 316.

RESTREPO, Guillermo. Infectividad y efectividad de los actinomicetos del género *Frankia* asociados con *Alnus acuminata* ssp. *acuminata* en Colombia. Crónica Forestal y del medio Ambiente. Vol.____, No. 12 (____, 1997); p. 5 – 17.

SADOWSKY, M. and GRAHAM, P. Soil Biology of the Rhizobiaceae. En: The Rhizobiaceae. Vol.____, No ____ (____, 1999); p, 155 – 172.

SALOMÓN, Eldra Pearl; BERG, Linda R., MARTIN, Diana y VILLE, Claude. Biología de Ville: Ecología. 3ed. Santafé de Bogotá: McGraw – Hill, 1998. p. 1083. ISBN 968 – 25 – 2393 – 6.

SAYED, W. Effects of land irrigation with partially – treated wastewater on *Frankia* survival and infectivity. En: Plant and Soil. Vol. 254, No.____ (____, 2003); p. 19 – 25.

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, Christa and TJEPKEMA, John. Field nodules of *Alnus incana* ssp *rugosa* and *Myrica gale* exhibit pronounced acetylene – induced declines in nitrogenase activity. En: Canadian Journal of Botanic. Vol. 75, No.____ (____, 1983); p. 1415 – 1423.

SCHWINZER, Christa. Effect of spring flooding on endophyte differentiation, nitrogenase activity, root growth and shoot growth in *Myrica gale*. En: Plant and Soil. Vol. 87, No.____ (____, 1985); p. 109 – 124.

SHIPTON, W. and BURGGRAAF, A. A comparison of the requirements for various carbon and nitrogen sources and vitamins in some *Frankia* isolates. En: Plant and Soil. Vol. 69, No.____ (____, 1982); p. 149 – 161.

SHIPTON, W. and BURGGRAAF, A. *Frankia* growth and activity as influenced by water potential. En: Plant and Soil. Vol. 69, No.____ (____, 1982); p. 293 – 297.

SILVESTER, Warwick; SILVESTER, Janet and TORREY, John. Adaptation of nitrogenase to varying oxygen tension and the role of the vesicle in root nodules of *Alnus incana* ssp. *rugosa*. En: Canadian Journal of Botanic. Vol. 66, No.____ (____, 1988); p. 1772 – 1779.

SIMON, L.; STEIN, A. CÔTÉ, S. and LALONDE, M. Performance of *in vitro* propagated *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn clones inoculated with *Frankiae*, En: Plant and Soil. Vol. 87, No.____ (____, 1985); p. 125 – 133.

SIMONET, Pascal; CAPELLANO, Andre, NAVARRO, Elisabeth, BARDIN, Rene and MOIROUD Andree. An improved method for lysis of *Frankia* with achromopeptidase allows detection of new plasmids. En: Canadian Journal of Microbiology. Vol. 30, No.____ (____, 1984); p. 1292 – 1295.

SMOLANDER, A.; RÖNKKÖ, R. NURMIAHO – LASSILA, E. and HAAHTELA, K. Growth of *Frankia* in the rhizosphere of *Betula pendula*, a nonhost tree species. En: Canadian Journal of Microbiology. Vol. 36, No.____ (____, 1990); p. 649 – 656.

ST – LAURENT, L.; BOUSQUET, J., SIMON, L. and LALONDE, M. Separation of various *Frankia* strains on the *Alnus* and *Elaeagnus* host specificity groups using sugar analysis. En: Canadian Journal of Microbiology. Vol. 33, No.____ (____, 1987); p. 764 – 772.

ST-LAURENT, Louis and LALONDE, Maurice. Isolation and characterization of *Frankia* strains isolated from *Myrica gale*. En: Canadian Journal of Botanic. Vol. 65, No.____ (____, 1987); p. 1356 – 1363. 1987

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.

TEISSIER, E.; JUNG, G. and BARITEAU, M. Alder – *Frankia* interaction and Alder – poplar association for biomass production. En: Plant and Soil. Vol. 78, No.____ (____, 1984); p. 235 – 243.

THEODORE, John; WIGGINGTON, James, BOCK, Joyce, KLEMT, Ryan and JOHNSON, Jerry. An insertion sequence unique to *Frankia* strain ArI5. En: Plant and Soil. Vol. 254, No.____ (____, 2003); p. 107 – 113.

TISA, L., McBRIDE, M. and ENSING, J. Studies of growth and morphology of *Frankia* strains EAN1_{pec}, Eu11_c, Cp11, and ACN^{AG}. En: Canadian Journal of Botanic. Vol. 61, No.____ (____, 1983)p; 2768 – 2773.

TJEPKEMA, John. Hemoglobins in the nitrogen – fixing root nodules of actinorhizal plants. En: Canadian Journal of Botanic. Vol. 61, No.____ (____, 1983); p. 2924 – 2929.

TJEPKEMA, John; ORMEROD, William and TORREY, John. Vesicle formation and acetylene reduction activity in *Frankia* sp CPI1 cultured in defined nutrient media. En: Nature. Vol. 287, No.____ (____, 1980); p. 633– 635.

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

TORREY, John and CALLAHAM, Dale. Structural features of the vesicle of *Frankia* sp. Cp11 in culture. En: Canadian Journal of Microbiology. Vol. 28, No.____ (july, 1982): 749 – 757.

TORREY, John G.. Nitrogen fixation by actinomycete – nodulated angiosperms. En: BioScience. Vol. 28, No. 9 (sep. 1978); p. 586 – 592.

TREMBLAY, Marie – Francine and LALONDE, Maurice. Effect of photoperiod and temperature on the development of frost hardiness in tree *Alnus* species. En: Physiologia Plantarum. Vol. 70, No.____ (____, 1987); p. 327 – 331.

TZEAN, S. and TORREY, J. Spore germination and the life cycle of *Frankia in vitro*. En: Canadian Journal of Microbiology. Vol. 35, No.____ (____, 1989); p. 801 – 806.

VAN BRUSSEL, Anton.; BAKHUIZEN, Robert., VAN SPROSEN, Paulina., SPAINK, Herman., TAK, Teun., LUGTENBERG, Ben and KIJNE, Jan. Induction of Pre – infection tread structures in leguminous host plant by mitogenic lipo – oligosacharides of *Rhizobium*. En: Science. Vol. 257, No. 7 (jul. 1992); p. 70 – 72.

VANDENBOSCH, K. A., AND J. G. TORREY. Development of endophytic *Frankia* sporangia in field- and laboratory-grown nodules of *Comptonia peregrina* and *Myrica gale*. En: American Journal of Botanic. Vol. 72, No.____ (____, 1985); p. 99 – 108.

VAN DIJK, C. Spore formation and endophyte diversity in root nodules of *Alnus glutinosa* (L.) Vill. En: New Phytol. Vol. 81, No.____ (____, 1978); p. 601 – 615.

VAN DIK, C. Endophyte distribution in the soil. En: Symbiotic nitrogen fixation in the management of temperate forest. Vol.____, No.____ (____, 1979); p. 84 – 94.

VAN DIJK, C. and MERKUS, E. A microscopical study of the development of a spore – like stage in the life cycle of the root – nodule endophyte of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. En: New phytologist. Vol. 77, No.____ (____, 1976); p. 73 – 91.

VAN GHELUE, Marijke; LOVAAS, Erik, RINGO, Einar and SOLHEIM, Bjorn. Early interactions between *Alnus glutinosa* and *Frankia* strain ArI3. Production and specificity of root hair deformation factor (s). En: Physiologia Plantarum. Vol. 99, No.____ (____, 1997); p. 579 – 587.

VAN STRATEN, J.; AKKERMANS, A. and ROELOFSEN, W. Nitrogenase activity of endophyte suspensions derived from root nodules of *Alnus*, *Hippophaë*, *Shepherdia* and *Myrica* spp. En: Nature. Vol. 266, No.____ (march, 1977); p. 257 – 258.

VERGNAUD, L.; CHABOUD, A. and ROUGIER, M. Preliminary analysis of root exudates *in vitro* – micropropagated *Alnus glutinosa* clones. En: Physiologia Plantarum. Vol 70, No.____ (____, 1987); p. 319 – 326.

VIKMAN, P., LUNDQUIST, P. and HUSS – DANELL, K. respiratory capacity, nitrogenase activity and structural changes of *Frankia*, in symbiosis with *Alnus incana*, in response to prolonged darkness. En: Planta. Vol. 182, No.____ (____, 1990); p. 617 – 625.

VIKMAN, Per – Åke and HUSS – DANELL, Kersitin. Capacity for hexose respiration in symbiotic *Frankia* from *Alnus incana*. En: Physiologia Plantarum. Vol. 70, No.____ (____, 1987); p. 349 – 354.

VITOUSEK, P and FIELD, C. Ecosystem constraints to symbiotic nitrogen fixers: A simple mode and its implications. En: Biogeochemistry. Vol. 46, No.____ (____, 1999); p. 179 – 202.

VOGEL, Christoph and DAWSON, Jeffrey. Effect of juglone on growth *in vitro* of *Frankia* isolates and nodulation of *Alnus glutinosa* in soil.. En: Plant and Soil. Vol. 87, No.____ (____, 1985); p. 79 – 89.

WINSHIP, Lawrence; MARTIN, Kendall and SELSTEDT, Anita. The acetylene reduction assay inactivates root nodule uptake hydrogenase in some actinorhizal plants. En: Physiologia Plantarum. Vol. 70, No.____ (____, 1987); p. 361 – 366.

WOLTERS, D.; VAN DIJK, E. ZOETENDAL, E. and AKKERMANS, A. Phylogenetic characterization of ineffective *Frankia* in *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. nodules from wetland soil inoculants. En: Molecular Ecology. Vol. 6, No.____ (____, 1997); p. 971 – 981.

YASER, Hammand; NALIN, Renaud, MARECHAL, Joelle, FIASSON, Katia, PEPIN, Régis, BERRY, Alison, NORMAND, Philippe and DOMENACH, Anne – Marie. A possible role for phenyl acetic acid (PAA) on *Alnus glutinosa* nodulation by *Frankia*. En: Plant and Soil. Vol. 254, No. _____ (_____, 2003); p.193 – 205.

ZHANG, Z., LOPEZ, M and TORREY, J. A comparison of cultural characteristics and infectivity of *Frankia* isolates from root nodules of *Casuarina* species. En: Plant Soil Vol.78, No _____ (_____,1984); p. 79 – 90

ZHONGZE, Zhang and TORREY, John. Studies of an effective of *Frankia* from *Allocasuarina lehmanniana* of the Casuarinaceae. En: Plant and Soil. Vol. 87, No. _____ (_____, 1985); p. 1 – 16.

ZIMPFER, J.; KAELEKE, C., SMYTH, C., HAHN, D. and DAWSON, J. *Frankia* inoculation, soil biota, and host tissue amendment influence *Casuarina* nodulation of a tropical soil. En: Plant and Soil. Vol. 254, No. _____ (_____, 2003); p. 1 – 10.

ANEXO A

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

Fijación con Glutaraldehido 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	48 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.