

Procesos Morfológicos en la Iniciación y Desarrollo de Nódulos en Aliso (*Alnus acuminata* H.B.K.)¹

LUZ MARINA NIÑO², ROSALIA PEREZ², MARTHA OROZCO DE AMEZQUITA³ y
EMIRA G. DE GRANADA³

RESUMEN. La especie nativa *Alnus acuminata* H.B.K. (Aliso) establece una relación simbiótica en las raíces con un Actinomycete del género *Frankia*. De esta asociación resulta la formación de nódulos que tienen capacidad para fijar nitrógeno atmosférico y mejorar la disponibilidad de este elemento en los suelos.

Para evaluar y analizar los cambios morfológicos originados por el establecimiento de la asociación, se inocularon con nódulos macerados plántulas de Aliso sembradas en medio estéril. Periódicamente, a partir de los tratamientos, las raíces de Aliso fueron muestradas y procesadas empleando técnicas de microscopía óptica y electrónica.

Las observaciones efectuadas mostraron al simbiote en cuatro formas: esporas, hifas, vesículas y bacteroides y revelaron que el proceso de iniciación y desarrollo de los nódulos fue similar al de otras especies del género *Alnus* estudiadas en las Zonas templadas. *Frankia* penetró a los tejidos de la planta vía pelo radical, invadió luego el tejido cortical e indujo la formación del nódulo, el cual emergió a manera de una raíz lateral. Además se estableció que la hifa, forma inefectiva de *Frankia*, penetró por células epidérmicas jóvenes. En estadios iniciales de

infección, el Actinomycete se encontró en espacios intercelulares, aunque siempre terminó estableciéndose en células del tejido cortical.

INTRODUCCION

Las asociaciones simbióticas entre organismos diazotrofos y raíces han sido ampliamente estudiadas en leguminosas, ya que reducen los costos de producción y permiten el mejoramiento de los suelos agrícolas. Debido al éxito de las leguminosas se inició el estudio de las asociaciones simbióticas en Angiospermas no leguminosas que entran en simbiosis con Actinomycetes diazotrofos. Entre las especies investigadas, las del género *Alnus* son actualmente el centro de estudios sobre procesos de fijación de nitrógeno.

En Colombia, la especie nativa *Alnus acuminata* H.B.K. está distribuida en la franja altitudinal comprendida entre los 2.000 y 3.000 msnm. y ha ido adquiriendo importancia en la medida en que se ha reconocido su valor como recurso forestal, por el aporte de nitrógeno al suelo y la posibilidad de emplearla en zonas que por efecto de la pendiente y uso irracional de suelos, presentan problemas de erosión.

Con el fin de contribuir a las investigaciones sobre el simbiote, al conocimiento de los procesos básicos de formación de nódulos y para establecer los cambios morfológicos originados por la inoculación de la raíz con extracto nodular, se realizó el presente trabajo, empleando técnicas de microscopía óptica y electrónica.

El establecimiento de la asociación simbiótica entre la planta y el Actinomycete se inicia con la deformación de pelos radicales. En las etapas iniciales de la simbiosis, en géneros como *Casuarina* y *Alnus* se ha ob-

¹ El presente artículo se derivó del trabajo de grado de las dos primeras autoras para optar el título de Biólogas, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Hace parte del proyecto de investigación "Contribución al estudio de la biología de *Alnus acuminata* H.B.K.", financiado por CINDEC y la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia.

² Estudiantes del Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

³ Profesora Asociada, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia, Apartado Aéreo 23227, Bogotá.

servado pigmentación roja en el lugar donde se forma el nódulo, posiblemente debida a la presencia de antocianinas (Rodríguez Barrueco, 1966; Torrey, 1976).

En el sitio de infección aparece una capa de mucílago secretada por el hospedero, de color azul brillante a verde oliva cuando es teñida con azul de toluidina "O", indicando la presencia de compuestos fenólicos, mientras en pelos no infectados esta capa es de color azul oscuro (Berry, McIntyre y McCully, 1986).

La penetración del endófito en *Alnus*, *Myrica*, *Comptonia* y *Casuarina* es por vía pelo radical. En *Elaeagnus angustifolia* ocurre a través de la epidermis con colonización apoplástica del cortex (Torrey, 1982; Berry, McIntyre y McCully, 1986). En cuanto a la penetración, la mayoría de autores están de acuerdo en que es de tipo químico; Berry, McIntyre y McCully en 1986 observaron en la pared celular por donde entraba *Frankia*, arreglo irregular de microfibrillas y atribuyeron este cambio a la acción enzimática del simbiote.

La forma infectiva del Actinomycete es la hifa, la cual penetra al pelo radical atravesando la pared celular. El filamento hifal se extiende e invade células corticales tetraploides disolviendo sus paredes, provocando hipertrofia en las células que infecta y ocasionando división celular en las células adyacentes (Lalonde y Knowles, 1975; Torrey, 1976).

Después de la proliferación del endófito, se producen hinchamientos terminales en las hifas, los cuales originan las vesículas que se localizan en la periferia de las células corticales, en tanto las hifas ocupan el citoplasma central (Torrey, 1978; Hafeez, Akkermans y Chaudary, 1984).

Los nódulos actinorrizales son morfológica y anatómicamente diferentes a los nódulos de leguminosas, en estas últimas el cilindro vascular es externo al área infectada la cual ocupa la zona central del nódulo; en cambio en las plantas no leguminosas, el sistema vascular se encuentra en el centro y está rodeado por las células corticales que contienen el endófito (Burns y Hardy, 1975).

La anatomía de los nódulos muestra los

tejidos típicos de una raíz lateral. La epidermis, generalmente no presenta pelos radicales y tiene gran acumulación de súber; el meristemo apical, que técnicamente no es del nódulo, ya que éste es perpetuado por otro mecanismo; el cortex, donde crece el simbiote; la endodermis, cuya capa de células nunca es traspasada por el Actinomycete y el cilindro central, que se conecta al eje vascular de la raíz parental (Becking, 1970).

La iniciación del nódulo es inducida por un estímulo producido por el simbiote y presenta dos etapas: En la primera, las células corticales infectadas sufren hipertrofia y las adyacentes divisiones celulares, dando lugar a un hinchamiento llamado prenódulo. En la segunda etapa, en el periciclo opuesto al protoxilema más próximo al prenódulo, se origina la salida del nódulo, al igual que si fuese una raíz lateral; a esto se le llama primordio nodular. En *Comptonia* a diferencia de *Alnus* se desarrollan simultáneamente varios primordios nodulares (Torrey, 1976; Bowes, Callaham y Torrey, 1977).

MATERIALES Y METODOS

Para la obtención de plántulas se emplearon semillas de aliso recolectadas de árboles previamente seleccionados en la zona de reforestación del acueducto de Manizales en el Departamento de Caldas. Doce días a partir de la siembra, cuando las plántulas obtenidas asépticamente expusieron sus hojas cotiledonares, fueron transplantadas a materas, cuyo sustrato era arena estéril. Con el fin de crear condiciones propicias para inducir nodulación las soluciones de nutrientes se aplicaron según la recomendación de Bowes, Callaham y Torrey (1977).

En la cuarta semana después del transplante se hizo la inoculación. El inóculo se preparó macerando un gramo de nódulo en 20 ml de agua estéril y filtrando el macerado en un tamiz, este inóculo fue aplicado a cada una de las materas con jeringa.

Luego de la inoculación se realizaron 12 muestreos, el primero a las seis horas, el segundo a los tres días siguientes a la inoculación y los diez restantes se efectuaron a continuación dos veces por semana. Para cada

muestreo se seleccionaron diez plántulas y mediante observación estereoscópica se escogió el material al que se le hizo el correspondiente tratamiento de microscopía.

Con el objeto de reconocer el simbionte, se prepararon nódulos ya formados en raíces de aliso de dos años de edad, siguiendo el mismo tratamiento que se hizo a las raíces de la prueba.

Las muestras se fijaron durante dos horas en glutaraldehído al 5% preparado en buffer de fosfato de pH 7,3, a continuación se lavaron tres veces durante varios segundos en buffer fosfato pH 7,3 y luego se posfijaron en tetróxido de osmio al 1% durante una hora a 40°C, por último fueron lavadas nuevamente en buffer de fosfato (Mercer y Birbeck, 1979).

Las muestras fueron deshidratadas en alcohol etílico de 30%, 50%, 70%, 90%, 100% y acetona; a continuación fueron incluidas en resina pura; la polimerización se efectuó en una estufa a 80°C durante cuatro horas.

Los bloques fueron cortados en un ultramicrotomo LKB Modelo 1 con cuchillas de vidrio, se obtuvieron cortes semifinos de 150 a 190 nm de grosor y cortes ultrafinos de 60 a 90 nm de espesor para microscopía óptica y electrónica respectivamente.

Los cortes semifinos fueron teñidos con azul de Toluidina "O" al 1% (Newcomb y Fowke, 1974). Para la tinción los cortes ultrafinos se colocaron sobre rejillas de cobre cubiertas con una capa de collodion y se les añadió solución saturada de acetato de uranio en etanol 50%, seguido por el tratamiento con citrato de plomo Reynolds.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la presentación de los resultados y su discusión es indispensable en primer lugar, precisar algunos aspectos relacionados con la realización del trabajo.

A diferencia de lo expuesto por Rodríguez Berruero (1966), en *Alnus acuminata* H.B.K., las raíces no presentaron zonas con pigmentación roja en el área de salida de nódulos, lo que hizo imposible su localización; sin embargo esta pigmentación se ob-

servó en el ápice de la mayoría de las raíces y en zonas cercanas al tallo.

Según Becking (1970), otra manera de localizar las zonas de infección, es revisando los pelos absorbentes, los cuales se deforman por acción del Actinomycete. Esta respuesta fue observada durante la realización del trabajo, pero por medio de este método, no fue posible establecer exactamente los sitios o lugares de penetración del simbionte.

En algunos cortes se observó plasmólisis en células de la epidermis y el cortex, posiblemente debida a factores biológicos relacionados con la formación de peridermis y procesos de degradación de células epidérmicas.

En primer lugar se analizan las formas del simbionte que se encontraron y a continuación se presenta la secuencia de eventos que llevan al establecimiento de la asociación simbiótica de acuerdo a la interpretación realizada con base en las observaciones efectuadas y en la literatura citada y consultada.

La observación y análisis de las formas del Actinomycete permitió diferenciar: esporas, hifas, vesículas y bacteroides.

Las esporas como las describe Torrey (1978) presentaron paredes gruesas, membrana citoplasmática carente de plasmolemosomas y contenidos traslúcidos electrónicamente, cuya posible función sea la de servir como sitio para almacenar alimento. En general, la forma de las esporas fue redondeada y su diámetro con valores que oscilaron entre 0.5 y 1.3 micras (Figura 1).

Las hifas presentaron en el citoplasma contenidos y estructuras no definidos, membrana plasmática relacionada con la formación de septos transversales, plasmolemosomas y pared celular definida que las rodea totalmente (Figura 2).

Algunas hifas se ramificaron y no siempre llevaron septos en las ramificaciones; su diámetro osciló entre 0.5 y 2.0 micras (Figura 3). Becking en 1974 determinó que la composición química de la pared celular de la hifa de Frankia es típica de un Actinomycete Gram variable, observación que fue corroborada.

En los nódulos de *Alnus acuminata* las vesículas se formaron por hinchamiento ter-

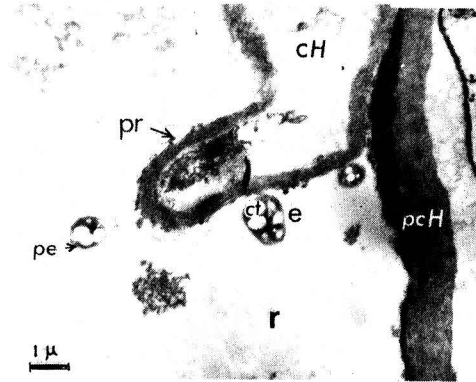


Figura 1. Micrografía electrónica de las esporas de *Frankia* en la rizósfera de *A. acuminata*. En la rizósfera (r) cerca al pelo radical (pr) se encuentran las esporas (e) con paredes engrosadas (pe) y contenidos traslúcidos (ct). Citoplasma del hospedero (ch); pared celular del hospedero (pcH). Barra= 1 micra.

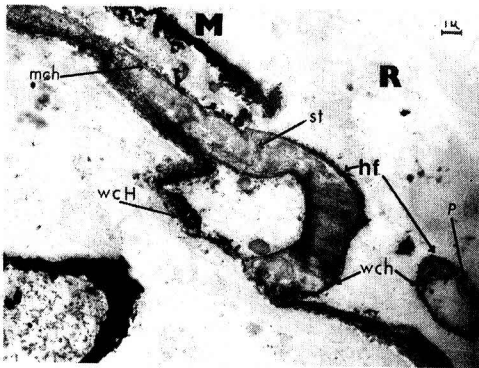


Figura 2. Micrografía electrónica de una hifa de *Frankia* en la rizósfera de *A. acuminata*. La hifa (hf) se encuentra en la rizósfera (R), presenta membrana celular (mch), septos (st), plasmolemosomas (p) y pared celular (wch). El ápice entra en contacto con la pared celular del hospedero (wch). Hay presencia de mucílago (M) en la rizósfera. Barra = 1 micra.

minal, apical o lateral de las hifas, tal como ocurre en *Casuarina cunninghamiana* según Torrey (1982) y Murry, Zhang y Torrey (1985) (Figuras 4 y 5); además desarrollaron numerosas divisiones, formando compartimientos en los cuales algunas veces se presentaron estructuras denominadas nucleoides. Las vesículas estaban rodeadas por cuatro capas, las dos internas pertenecientes al Actinomyците y las dos externas originadas

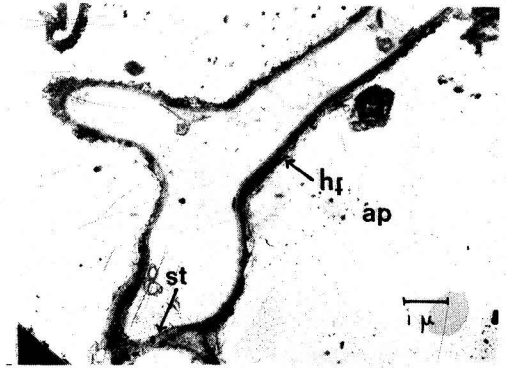


Figura 3. Micrografía electrónica de una hifa de *Frankia* localizada en un espacio intercelular en el tejido cortical de una raíz de *A. acuminata*. Hifa ramificada (hf) y septada (st) en el apoplasto (ap). Barra= 1 micra.

por el hospedero, una de estas se ha denominado cápsula y se señala que su función es proteger a la nitrogenasa de la oxidación (Figura 6). Durante el desarrollo de las vesículas se presentó una fase que se ha denominado provevícula, en ella las vesículas carecían de septos; según Schwintzer, Berry y Disney (1982) las provevículas no tienen actividad de nitrogenasa a diferencia de lo que ocurre en las vesículas, en las cuales la fijación de nitrógeno es efectiva.

El término bacteroide es empleado para descubrir estructuras similares a las fotografiadas por Berry, McIntyre y McCully en 1986, las cuales no corresponden a la descripción de hifas porque carecen de plasmolemosomas, ni a la de esporas pues sus paredes y contenidos son diferentes; es posible que sean esporas que han consumido los contenidos de reserva, pero por no estar claramente definidas en la literatura, aquí se llaman bacteroides; estas estructuras presentaron diámetro de 0.6 micras, pocos contenidos y forma redondeada (Figura 7).

El proceso de infección que se estableció en este trabajo sigue la siguiente secuencia:

1. El Actinomyците en la rizósfera
2. La interacción hospedero-Actinomyците
3. La penetración del Actinomyците
4. El Actinomyците en las células epidermales

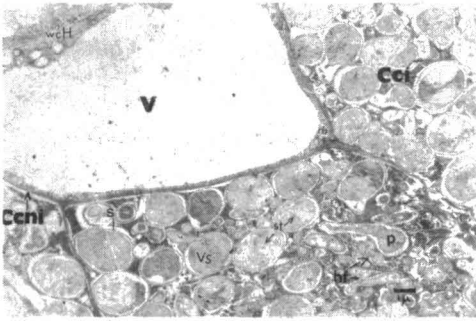


Figura 4. Micrografía electrónica de las vesículas de *Frankia* ocupando células corticales de *A. acuminata*. Las vesículas (Vs) desarrollan septos (st) y están rodeadas por una cápsula (S). Las hifas (hf) ocupan completamente el citoplasma de algunas células (Cci). Las células no invadidas (Ccni) presentan una gran vacuola (V), numerosos ribosomas (rb) y otros organelos. Pared celular del hospedero (wch); provesícula (P). Barra = 1 micra.

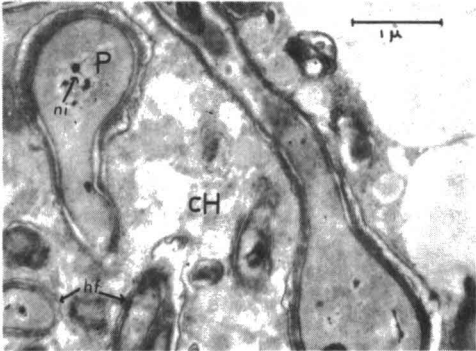


Figura 5. Micrografía electrónica de las provesículas de *Frankia* en células corticales de la raíz de *A. acuminata*. En el citoplasma del hospedero (ch) se presentan hifas en corte transversal (hf) y provesículas (p) con nucleoides (ni). Barra = 1 micra.

5. El Actinomyce en los pelos radicales
6. El Actinomyce en los espacios intercelulares
7. La invasión y proliferación del Actinomyce en el tejido cortical
8. La formación del nódulo.

El Actinomyce en la rizósfera:

El organismo diazótrofo en la rizósfera se encontró en forma de esporas, hifas y bacteroides. Numerosas esporas fueron vistas cerca a la epidermis, como se observa en la

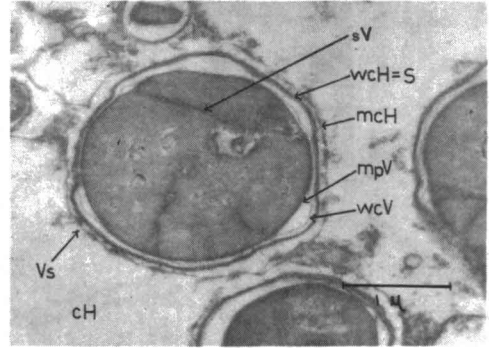


Figura 6. Micrografía electrónica de una vesícula de *Frankia* en una célula cortical de *A. acuminata*. En el citoplasma del hospedero (ch) se presenta la vesícula de *Frankia* (Vs) rodeada por cuatro membranas las dos externas son: la membrana celular del hospedero (mcH) y la pared celular del mismo (wch). Las internas son: la pared celular de la vesícula (wcV) y la membrana plasmática de la misma (mpV); en el interior de la vesícula hay septos vesiculares (sV). Barra = 1 micra.

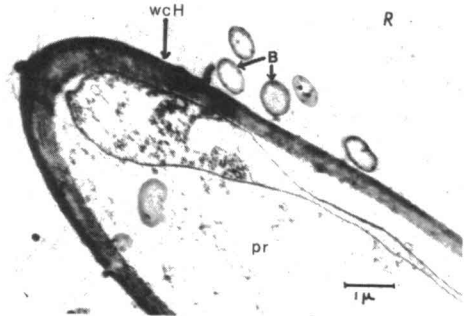


Figura 7. Micrografía electrónica de los bacterioides de *Frankia* en la rizósfera de un pelo radical de *A. acuminata*. Rizósfera (R); Bacterioides (B), paredes celulares (wch); pelos radicales (pr). Barra = 1 micra.

Figura 1; en general estas estructuras estuvieron presentes en casi todos los muestreos; su gran número comparado con los de otras formas posiblemente se debió a la inoculación con nódulos maduros, los cuales presentaron numerosos esporangios que al finalizar el ciclo de vida liberaron esporas para la reproducción del simbionte. En trabajos anteriores, las esporas han sido vistas en esporangios, cultivos puros y tejidos nodulares (Torrey, 1978), nunca en la rizósfera como se registra aquí.

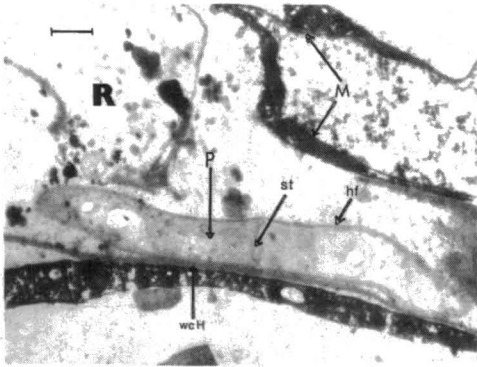


Figura 8. Micrografía electrónica de la hifa de *Frankia* en la rizósfera de *A. acuminata*. La hifa de *Frankia* (hf) en la rizósfera (R). Células epidermales (wcH); mucílago (M); plasmolemosoma (P); septo (st). Barra= 1 micra.

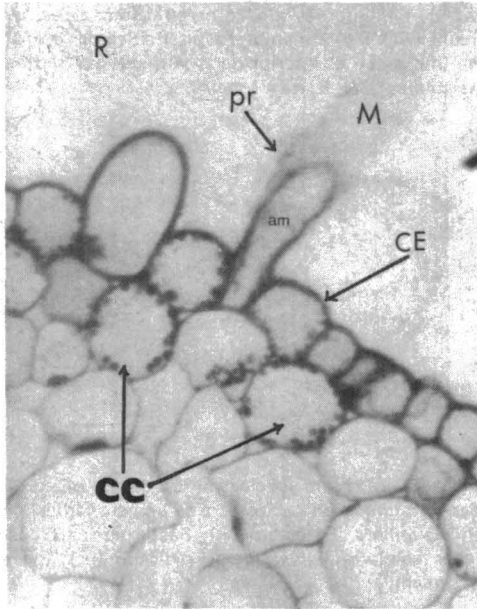


Figura 9. Mucílago en la zona apical de pelos radicales de *A. acuminata*. Mucílago (M); pelo radical (pr); Actinomycete (am); células corticales (cc) y células epidermales (CE) en la rizósfera (R). X640. Tinción: Azul de Toluidina O.

Anterior a este trabajo no hay información gráfica publicada sobre la estructura de las hifas de *Frankia* en la rizósfera; sin embargo, éstas se observaron claramente, muy cerca a las paredes de células epidermales de raíces de *Alnus* (Figura 8).

Los bacteroides se observaron cerca a pelos radicales y a las células de la epidermis (Figura 7); se desconoce el papel que juegan en la rizósfera.

La interacción hospedero-Actinomycete:

En observación microscópica de cortes transversales de raíces de Aliso, se observó que antes de la penetración del simbionte, se presentaron cambios evidentes en la forma y estructura de las células epidermales y pelos radicales; estos cambios se describen en forma secuencial de acuerdo a la evidencia fotográfica obtenida.

Como se ve en la Figura 9, se produjo abundante secreción de mucílago en el ápice de algunos pelos radicales, originado por el hospedero y con posible función de crear un medio propicio, específico y adherente para el simbionte, como ocurre en la rizocenosis diazotrófica entre *Azospirillum brasilense* y gramíneas (Umali *et al.*, 1979); adyacente a estos pelos radicales se observaron células epidermales y corticales con abundantes compuestos de reserva.

El mucílago según Berry, McIntyre y McCully en 1986, presenta diferente coloración, azul brillante cuando el pelo está infectado, debido a los compuestos fenólicos presentes, y azul oscuro cuando no hay infección.

Una capa de mucílago se observó sobre células epidérmicas, presentando discontinuidad y a veces extendiéndose hacia la rizósfera (Figura 8).

Otra evidencia de esta interacción se aprecia en la figura 10 donde se observan claramente los cambios de forma en células epidermales y pelos radicales, aquí el simbionte se situó muy cerca de las paredes celulares multiplicándose y formando microcolonias, que posiblemente secretaron sustancias inductoras de deformación; la célula epidermal se tornó cóncava y el pelo radical se inclinó hacia los Actinomycetes, formando una estructura que parece encerrarlos, facilitando su acercamiento y penetración a la raíz.

El curvamiento de pelos, posiblemente fue una consecuencia de la excreción de auxinas o sustancias relacionadas con el cre-

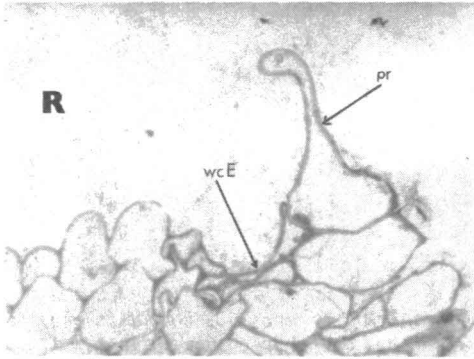


Figura 10. Célula epidermal y pelo radical de *A. acuminata* deformados por efecto del Actinomycete, Rizósfera (R); pared de célula epidermal (wcE); pelo radical (pr). X640. Tinción: Azul de toluidina O.

cimiento por parte de *Frankia* (Kefford, Brockwell y Zwar, 1960); una de esas sustancias el AIA, hormona reguladora del crecimiento vegetal, ha sido encontrada en pequeñas cantidades como producto del metabolismo de *Frankia* (Wheeler, Croizer y Sandberg, 1984).

La penetración del Actinomycete

La penetración de *Frankia* a través de las paredes celulares de la epidermis parece ser más de tipo químico que mecánico (Lalonde y Knowles, 1975). En la figura 2 se observa que el ápice de la hifa entra en contacto con la pared celular haciendo pensar que esta zona guarda estrecha relación con la actividad enzimática y la producción de sustancias que degradan la pared y permiten la entrada del Actinomycete.

En la figura 11 se observa la hifa en corte transversal, ésta al penetrar es rodeada por la pared de la célula epidermal, quedando entre las paredes primaria y secundaria.

En la hifa se observó un plasmolemosoma; el citoplasma presentó un contenido homogéneo no limitado por membrana, probablemente relacionado con actividad nuclear y dos estructuras bien definidas localizadas al centro que pueden ser sitios de acumulación de sustancias de reserva; además se observó que la regeneración y síntesis de pared celular parece ser llevada a cabo

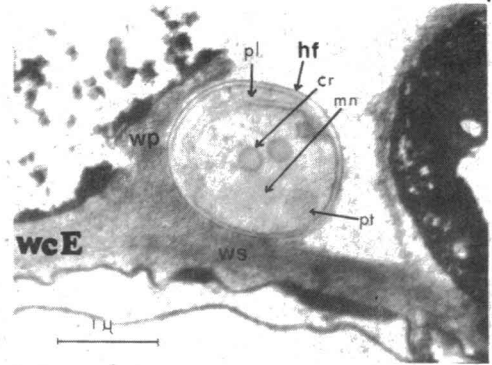


Figura 11. Micrografía electrónica del corte transversal de una hifa de *Frankia* penetrando a través de una célula epidermal de la raíz de *A. acuminata*. Hifa de *Frankia* (hf); pared de célula secundaria (ws). En el interior del actinomycete se presenta un plasmolemosoma lamelar (pl); uno tubular (pt), material nuclear (mn) y contenido de reserva (cr). Barra= 1 micra.

muy rápidamente. En las células corticales adyacentes, se presume que presentaron gran actividad metabólica, debido al alto número de mitocondrias, ribosomas y vacuolas presentes en ellas. La infección por parte del simbionte ocurrió en células epidermales jóvenes y en pelos radicales.

El Actinomycete en las células epidermales

Una vez *Frankia* penetró al interior de la raíz, se dividió y originó segmentos cortos que llenaron totalmente el citoplasma de la célula epidermal infectada; la célula presentó el material citoplasmático localizado en la periferia y contra las paredes celulares; en ella se observó la pared externa más delgada, sugiriendo una reciente regeneración, debida a la anterior degradación inducida por la infección del Actinomycete (Figura 12).

En las células epidermales en las que el Actinomycete se estableció, la capa que rodeaba al simbionte y que fue producida por la célula del hospedero según lo reportan Lalonde y Knowles en 1975, no es evidente, esto podría significar que la planta en este estadio no produjo dicha capa, o que no se observó por razón de la técnica de preparación del material, o por no haberse alcanzado el período final de organización química.

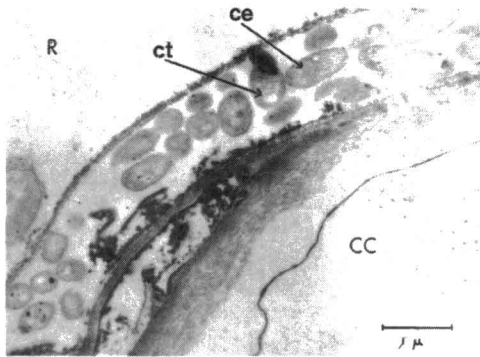


Figura 12. Micrografía electrónica de una célula epidermal de la raíz de *A. acuminata* infectada por hifas *Frankia*. Las hifas presentan: contenidos citoplasmáticos electrolúcidos (ct), una banda homogénea de color gris y cuerpos estriados (ce) a lo largo de las hifas. Célula cortical (cc); rizósfera (R). Barra= 1 micra.

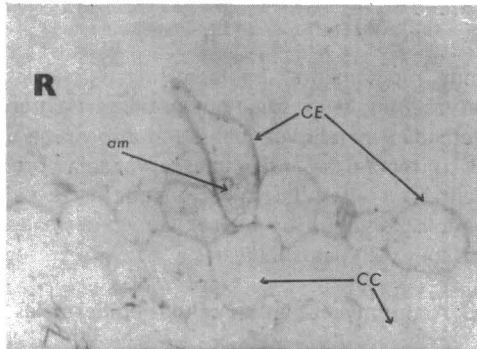


Figura 13. Pelo radical de *A. acuminata* deformado e invadido por el Actinomicete. Actinomicete (am); célula epidermal (CE); célula cortical (cc); rizósfera (R). X 640. Tinción: Azul de Toluidina.

Las hifas dentro de la célula epidermal fueron diferentes en su morfología a las localizadas en la rizósfera, en ellas se observaron algunos contenidos citoplasmáticos electrolúcidos, una banda gris que se localizó en la periferia y contenidos estriados electroneutros, generalmente ubicados a lo largo de éstas (Figura 14).

El Actinomicete en los pelos radicales

En la Figura 13 se observa un pelo radical deformado, que al ser teñido con azul de toluidina adquirió un color azul más intenso que el de las células adyacentes no infec-

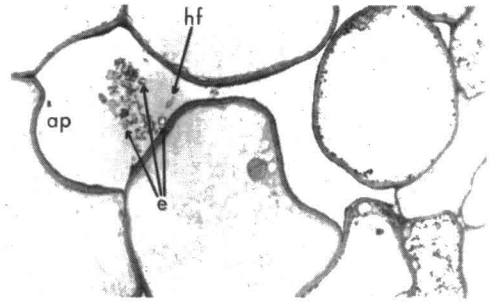


Figura 14. Hifas y esporas de *Frankia* en espacios intercelulares del tejido cortical de la raíz de *A. acuminata*. Apoplasto (ap); esporas con contenidos electrolúcidos (e); hifas (hf). Barra= 1 micra.

tadas. El Actinomicete creció y formó micelios que colonizaron la célula epidermal localizándose en la zona próxima a las células corticales, en las cuales no se evidenció alta actividad metabólica.

El Actinomicete en los espacios intercelulares

En estados más avanzados de infección, el Actinomicete se localizó en los espacios intercelulares del córtex en forma de hifa y espora (Figura 14). Las hifas presentaron septos y ramificaciones, estaban rodeadas por una capa de densidad similar a la de las paredes celulares del hospedero, al igual que por una membrana citoplasmática no homogénea (Figura 3), ambas capas fueron originadas por el hospedero, como se confirma en el trabajo de Lalonde y Knowles en 1975; esta colonización en espacios intercelulares es llamada apoplástica, y en leguminosas es común y funcional, ya que el ciclo de vida del huésped es completo y la fijación del nitrógeno es efectiva. En plantas no leguminosas este hecho no había sido reportado hasta 1985, fecha en que Miller y Baker observaron en *Elaeagnus angustifolia* L. dicha colonización. En *Alnus*, a pesar de ser el género más estudiado de plantas actinorrizales, el tipo de colonización apoplástica no ha sido reportado.

Es de anotar que las esporas en los espacios intercelulares fueron similares a las observadas en la rizósfera. No se logró establecer las razones por las cuales ocurrió la colo-

nización apoplástica, ya que en estadios mucho más avanzados en los que el nódulo estaba completamente formado, no se observó la presencia de *Frankia* en espacios intercelulares, muy posiblemente se debió a que la ruta de invasión del simbiote fue vía célula epidermal, espacio intercelular, célula cortical.

La invasión y la proliferación del Actinomicete en el tejido cortical

En la invasión y proliferación de *Frankia* en el tejido cortical, el Actinomicete inicialmente penetró a las células corticales próximas a la epidermis invadiendo luego las de la zona media del córtex; las hifas erccion y colonizaron la zona central del citoplasma de la célula cortical infectada, la cual presentó en las paredes coloración diferente a la de las células no invadidas; esta tinción posiblemente se debió a una respuesta por parte del hospedante a la infección; las hifas quedaron embebidas en una matriz rica en organelos y contenidos citoplasmáticos, y fueron rodeadas por una capa de densidad electrónica similar a la de las paredes de dichas células (Figura 15).

La formación del nódulo

En la formación del nódulo se observaron varias etapas. En la primera, las células corticales invadidas se hipertrofiaron y las adyacentes sufrieron divisiones celulares, dando lugar a una proliferación limitada del tejido cortical, llamada prenódulo o sitio de invasión por Callaham y Torrey (1977) (Figura 18). En la segunda etapa, el prenódulo indujo la formación del primordio nodular primario, el cual se desarrolló igual que una raíz lateral; en el primordio, las células del periciclo, endodermis y córtex adyacentes al polo protoxilemático, sufrieron divisiones (Figura 16), crecieron y luego las células corticales fueron invadidas por el endófito. En la tercera etapa el lóbulo nodular que se ha desarrollado como una raíz lateral, presentó cilindro central, endodermis, córtex y epidermis. En sección, en el lóbulo nodular se observó una zona meristemática localizada

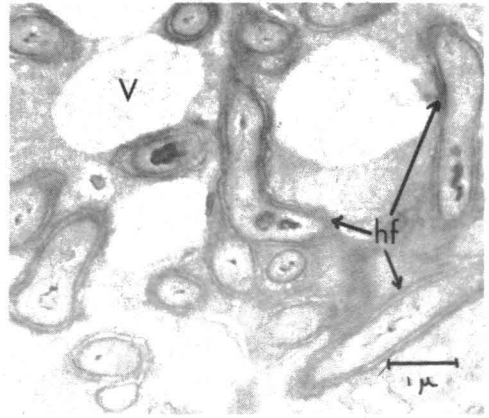


Figura 15. Micrografía electrónica de la proliferación de hifas de *Frankia* en una célula cortical de *A. acuminata*. Vacuola (V); hifa (hf). Barra = 1 micra.

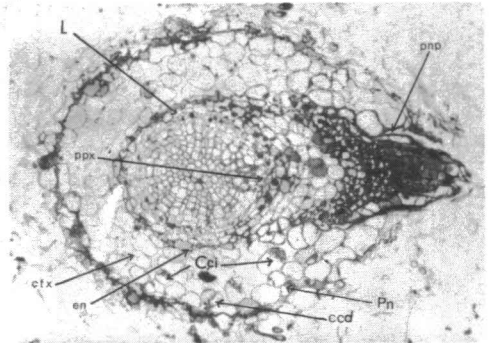


Figura 16. Prenódulo y primordio nodular primario en una raíz de *A. acuminata*. La zona del prenódulo (Pn); células corticales invadidas (Cci); sitios de alta división celular (ccd); primordio nodular primario (pnp) desarrollado a partir del periciclo (L); endodermis (en); córtex (ctx) y polo protoxilemático (ppx). X 160. Tinción: Azul de toluidina O.

en el ápice, rodeada por un tejido compacto y libre del endófito; una zona media con células corticales llenas del simbiote; y la zona basal más próxima a la raíz parental, en donde las células corticales en general se presentaron menos invadidas. El tejido externo del nódulo se caracterizó por capas celulares suberizadas (Figura 17)

En el tejido cortical del lóbulo nodular, las hifas de *Frankia* produjeron hinchamientos formando las vesículas, las cuales en estadios intermedios ocuparon la periferia de las

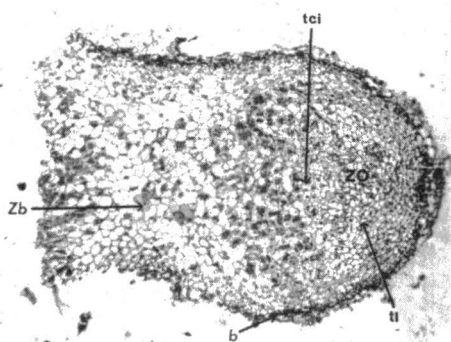


Figura 17. Lóbulo nodular de *A. acuminata*. Zona meristemática (ZO), rodeada por tejido libre del endófito (tl); tejido cortical invadido por el Actinomicete (tci); zona basal del lóbulo (zb); suber (b). X60. Tinción: Azul de toluidina O.

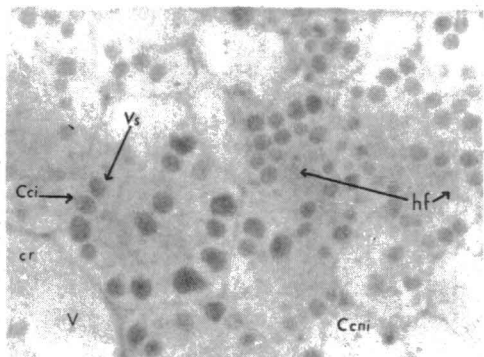


Figura 18. Tejido cortical de un nódulo actinorrizal de *A. acuminata*. Células corticales infectadas (cci); vesículas (Vs); masa hifal (hf); células corticales no invadidas (Ccn) con vacuolas (V) y contenidos de reserva (cr). X 640. Tinción: Azul de toluidina O.

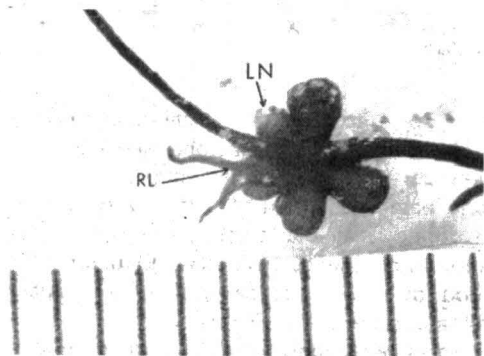


Figura 19. Observación estereoscópica de un nódulo actinorrizal de *A. acuminata*. Lóbulo nodular (LN), raíz lateral (RL).

células (Figura 18); más tarde llenaron por completo las células de la corteza.

Externamente, el nódulo de *Alnus acuminata* (Figura 19) presentó forma coraloides, ya que cada lóbulo nodular se ramificó dicotómicamente y no hubo crecimiento longitudinal por acción de meristemo, como ocurre en *Myrica* (Torrey, 1976); en conjunto los lóbulos nodulares crecieron radialmente, determinando la forma coraloides redondeada del nódulo, el cual llega a medir hasta ocho centímetros de diámetro (Lepineux y Arango, 1984). Cada lóbulo observado era ancho en el ápice y angosto en la base. La parte apical, zona más joven del lóbulo nodular, presentó coloración rojizo-anaranjado, debido a la presencia de taninos, en tanto la base de cada lóbulo fue la zona con tejido más viejo cuya coloración se tornó café oscura a medida que alcanzaba la senescencia.

En zonas templadas como lo reporta Becking en 1970, el crecimiento de los nódulos es estacional y depende de la interacción entre el clima local, la fenología de la planta y el ciclo de vida del endófito. En Colombia este estudio aún no ha sido realizado, pero algunas observaciones y experiencias recogidas, indican que el crecimiento de los nódulos es estacional y que puede depender de los factores anteriormente citados; este crecimiento también podría influir en el grado de infectividad de los mismos ya que el macerado de nódulos jóvenes sería diferente al macerado de nódulos senescentes, dependiendo del estadio del ciclo de vida en que se encuentre *Frankia*.

Para comprender mejor este fenómeno, es necesario hacer un estudio encaminado a dilucidar los mecanismos de crecimiento de los nódulos en el trópico.

Finalmente, cabe anotar, que las raíces de las plantas control, muestreadas y observadas en microscopio óptico y microscopio electrónico, no presentaron evidencia alguna de formación de nódulos actinorrizales.

CONCLUSIONES

- Las técnicas de preparación de muestras histológicas para la observación a través

- del microscopio electrónico, son adecuadas para el estudio del desarrollo de la asociación Actinomycete - raíz de aliso.
- Mediante la inoculación de las raíces de aliso (*Alnus acuminata* H.B.K.) con extracto nodular, se puede inducir la formación de nódulos.
 - El proceso de iniciación y desarrollo de nódulos fijadores de nitrógeno en *A. acuminata* es similar al observado en otras especies del género *Alnus* estudiadas en zonas templadas.
 - En el establecimiento de la asociación simbiótica entre la raíz de aliso y un Actinomycete del género *Frankia*, se presentaron cambios morfológicos en los tejidos del hospedero, ocasionados por el Actinomycete el cual indujo la deformación de células epidermales y pelos radicales, además de la hipertrofia y división de células corticales. Los mecanismos involucrados parecen ser respuestas a sustancias químicas y dan lugar a la formación de nódulos.
 - En el proceso de penetración a los tejidos de *A. acuminata*, la hifa, forma infectiva de *Frankia*, atravesó las paredes de pelos radicales y células epidermales jóvenes. Dentro de las células fue rodeada por una capa y una membrana originadas por la planta como forma de protección, y aunque se localizó algunas veces en los espacios intercelulares, siempre se estableció en las células corticales donde completó el ciclo.
 - *Frankia* se presentó en cuatro formas diferentes: Hifas, vesículas, esporas y bacteroides. La respuesta de hifas y vesículas a la tinción de Gram fue típica de un Actinomycete Gram variable.

LITERATURA CITADA

1. Becking, J.H. 1970. Plant-endophyte symbiosis in non-legumes. *Plant Soil*. 32:611-654.
2. Becking, J.H. 1974. The family Frankiaceae. In *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8th. ed. Ed. R.E. Buchanan and N.E. Gibbons. The Williams and Wilkins Company, Baltimore. p. 701-706.
3. Berry, A.M., L. McIntyre, and McCully. 1986. Fine structure of root hair infection leading to nodulation in the *Frankia-Alnus* symbiosis. *Can. J. Bot* 64(2):292-305.
4. Bowes, B., D. Callaham, and J. Torrey. 1977. Time lapse photographic observation of morphogenesis in root nodules of *Comptonia peregrina* (Myricaceae). *Amer. J. Bot.* 64(5): 516-525.
5. Burns, R.C., and R.W.F. Hardy. 1975. Nitrogen fixation in bacteria and higher plants. *Molecular biology, biochemistry and biophysics*. No. 1. Springer Verlag, Berlin N.Y. 189p.
6. Hafeez, F.A., D.L. Akkermans, and A.H. Chaudhary. 1984. Observations on the ultrastructure of *Frankia* sp in root nodules of *Datisca cannabina*. *Plant Soil* 79(3):383-402.
7. Kefford, N.P., J. Brockwell, and J.A. Zwar. 1960. The symbiotic synthesis of auxin by legumes and nodule bacteria and its role in nodule development. *Aust. J. Biol. Sci.* 13: 456-467.
8. Lalonde, M., and R. Knowles. 1975. Ultrastructure of the *Alnus crispa* var. *mollis* bern. root nodule endophyte. *Can J. Microbiol* 21: 1028-1080.
9. Mercer, E.H., M.S.C. Birbeck. 1979. *Manual de microscopia electrónica para biólogos*. Ed. Blume, España. 134 p.
10. Miller, I.M., and D.D. Baker. 1985. The initiation, development and structure of root nodules in *Elaeagnus angustifolia* L. (Elaeagnaceae). *Protoplasma*. 128(2-3):107-119.
11. Murry, M.A., Z. Zhang., and J.G. Torrey, 1985. Effect of O₂ on vesicle formation, acetylene reduction and O₂-uptake kinetics in *Frankia* sp HFPCc13 isolate from *Casuarina cunninghamiana*. *Can. J. Microbio.* 31(9): 804-809.
12. Newcomb, W., and L.C. Fowke. 1974. *Stellaria media* embryogenesis the development and ultrastructure of the suspensor. *Can. J. Bot.* 52:607-614.
13. Rodríguez Barrueco, C. 1966. Fixation of nitrogen in root nodules of *Alnus jorullensis* H.B.K. *Phyton* 23(2):103-110.
14. Schwintzer, Ch.R., A.M. Berry, and L.D. Disney. 1982. Seasonal patterns of root nodule growth, endophyte morphology, nitrogenase activity, and shoot development in *Myricagale*. *Can J. Bot.* 60:746-757.
15. Torrey, J.G. 1976. Initiation and development of root nodules of *Casuarina* (Casuarinaceae). *Am. J. Bot.* 63(3):335-344.
16. Torrey, J.G. 1978. Nitrogen fixation by actinomycete-nodulated angiosperms. *Bio-Science* 28(9):586-592.
17. Torrey, J.G. 1982. *Casuarina*: actinorhizal nitrogen fixing tree of the tropics. In *Biological Nitrogen Fixation Technology for Tropical Agriculture*. Eds. P.H. Graham and S.C. Harris. CIAT. Cali, Colombia. p. 427-439.

18. Umali García, M., D.H. Hubell, M.H. Gaskins, and F.B. Dazzo. 1979. Absortion and mode of entry of *Azospirillum brasilense* to grass roots. In *Associative N₂-fixation*. Vol. I P.B. Vose and A.P. Ruschel. CRC. Press Inc. EE.UU.
19. Wheeler, C.T., A. Crozier, and F. Sandberg. 1984. The biosynthesis of indole-3-acetic acid by *Frankia*. *Plant Soil* 78(1):99-104.