



98 2ci

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**  
**FACULTAD DE QUIMICA**

**FALLA DE ORIGEN**

**"IMPORTANCIA DE LA ASOCIACION  
FRANKIA-PLANTAS ARBOREAS NO  
LEGUMINOSAS EN LA FIJACION  
BIOLOGICA DEL NITROGENO"**



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

**TRABAJO MONOGRAFICO  
DE ACTUALIZACION  
PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A  
ANA BERTHA NAJERA LOPEZ**

México, D. F. 1990



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# I N D I C E

|          |  |    |
|----------|--|----|
| 1.       | INTRODUCCION   | 1  |
| 2.       | REVISION BIBLIOGRAFICA   | 4  |
| 2.1.     | Importancia de la fijación biológica del nitrógeno y de los microorganismos fijadores de nitrógeno | 4  |
| 2.2.     | Importancia de la asociación <u>Frankia</u> -vegetales arbóreos no leguminosos                     | 11 |
| 2.3.     | Características de <u>Frankia</u>  | 13 |
| 2.3.1.   | Morfología   | 13 |
| 2.3.1.1. | Hifas septadas ramificadas   | 15 |
| 2.3.1.2. | Esporangios  | 16 |
| 2.3.1.3. | Vesículas  | 18 |
| 2.3.2.   | Fisiología   | 20 |
| 2.3.3.   | Utilización de fuentes de carbono  | 22 |
| 2.3.4.   | Diferenciación de estructuras morfológicas y actividad metabólica                                  | 22 |
| 2.3.5.   | Producción de fitohormonas   | 23 |
| 2.3.6.   | Algunos aspectos generales de algunas enzimas de <u>Frankia</u>                                    | 23 |
| 2.3.6.1. | Nitrogenasa  | 23 |
| 2.3.6.2. | Hidrogenasa  | 26 |
| 2.3.6.3. | Superóxido dismutasa y catalasa  | 27 |
| 2.3.6.4. | Glutamino sintetasa  | 28 |

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| 2.3.6.5.  | Isoenzimas  | 29 |
| 2.4.      | Proceso de infección  | 29 |
| 2.4.1.    | Reconocimiento de los hospederos  | 31 |
| 2.4.2.    | Infección del pelo radicular  | 33 |
| 2.5.      | Vegetales con los que se asocia <u>Frankia</u>  | 41 |
| 2.6.      | Compatibilidad de <u>Frankia</u> con diferentes hospederos  | 46 |
| 2.7.      | Distribución de vegetales actinorrhizales   | 48 |
| 2.7.1.    | Ecossistema natural   | 49 |
| 2.7.1.1.  | <u>Alnus</u>  | 49 |
| 2.7.1.2.  | <u>Casuarina</u>  | 50 |
| 2.7.1.3.  | <u>Coriaria</u>   | 51 |
| 2.7.1.4.  | <u>Ceanothus</u>  | 52 |
| 2.7.1.5.  | <u>Cercocarpus</u>  | 53 |
| 2.7.1.6.  | <u>Elaeagnus</u>  | 53 |
| 2.7.1.7.  | <u>Purshia</u>  | 54 |
| 2.7.1.8.  | <u>Hippophae</u>  | 54 |
| 2.7.1.9.  | <u>Discaria</u>   | 55 |
| 2.7.1.10. | <u>Shepherdia</u>   | 55 |
| 2.7.1.11  | <u>Myrica</u>   | 56 |
| 2.8.      | Utilización de los vegetales actinorrhizales  | 64 |
| 2.9.      | Metodología para el aislamiento, propagación, conservación e inoculación de <u>Frankia</u> y aislamiento de vesículas | 67 |
| 2.9.1.    | Aislamiento de <u>Frankia</u>   | 67 |

|          |   |    |
|----------|---|----|
| 2.9.2.   | Propagación de <u>Frankia</u>   | 68 |
| 2.9.3.   | Conservación de <u>Frankia</u>  | 71 |
| 2.9.4.   | Inoculación de <u>Frankia</u>   | 72 |
| 2.9.5.   | Metodología para el aislamiento de vesículas                                  | 73 |
| 2.9.5.1. | Método de presión de French   | 74 |
| 2.9.5.2. | Método de digestión con lisosima  | 75 |
| 2.9.5.3. | Método de separación sónica   | 75 |
| 2.9.5.4. | Método de densidad de centrifugación en un pa-<br>so de gradiente de sacarosa | 75 |
| 2.10.    | Perspectivas de la inoculación con <u>Frankia</u>                             | 77 |
|          | <b>RESUMEN</b>  | 83 |
|          | <b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>   | 84 |
|          | <b>BIBLIOGRAFIA</b>   | 86 |

## 1. INTRODUCCION

La creciente población a nivel mundial, ha determinado que la necesidad por obtener alimentos aumente, conduciendo a la intensificación de la agricultura, del pastoreo, al uso excesivo de agroquímicos y a la tala de bosques con el consecuente deterioro ambiental.

La fijación biológica de nitrógeno es un proceso natural de gran importancia, debido a que asegura la transformación del nitrógeno a formas útiles y cuya potencialización permite mantener la fertilidad del suelo y disminuir el uso de fertilizantes químicos nitrogenados sin detrimento de la producción agrícola.

Este proceso es llevado a cabo por microorganismos procaríotes, algunos de ellos fijan el nitrógeno atmosférico en vida libre en el suelo o el agua, otros necesitan vivir en simbiosis con diversos vegetales. Estos últimos aún cuando son menos numerosos han recibido particular atención debido a que su efecto se manifiesta directamente en el mayor desarrollo del vegetal con el que están asociados.

De este modo existe información abundante respecto a las características de las bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno, así como de los hospederos específicos con los que se asocian; a los mecanismos mediante los que se

establece la simbiosis, a las características de la asociación, a la distribución de los diversos sistemas simbióticos y al efecto de estas asociaciones sobre el entorno ecológico. Estableciéndose claramente que la inoculación de cepas seleccionadas de Rhizobium favorece la producción de granos de leguminosas; que la utilización como abono verde de éstos y otros sistemas simbióticos permite mantener en el suelo niveles adecuados de nitrógeno en forma de amoníaco y nitratos asegurando el buen desarrollo de otros cultivos de interés agrícola que carecen de las características para asociarse con bacterias fijadoras de nitrógeno.

Así mismo se sabe que el abono verde en suelos empobrecidos favorece la aparición de otras especies vegetales que aseguran la reconstrucción de la capa de humus y la acumulación de elementos nutritivos.

Otro sistema simbiótico fijador de nitrógeno corresponde al integrado por actinomicetos y diversos arbustos y árboles llamadas plantas actinorríficas, las que están siendo utilizadas en programas de reforestación para proteger a los suelos de la erosión y restaurar el ambiente degradado.

Lo anterior indica la importancia de la asociación de ve-

getales con microorganismos fijadores de nitrógeno y el potencial que tiene el uso de estas asociaciones en la solución de problemas tales como la productividad agrícola, el mantenimiento y recuperación de la fertilidad del suelo y la protección y regeneración de suelos erosionados. Considerando estos aspectos y de manera particular la importancia de las plantas actinorríficas en la recuperación de suelos erosionados y de que en México se reporta la pérdida anual de 400 000 hectáreas de bosques y el aumento de superficies erosionadas, el presente trabajo tiene como objeto recopilar la información reciente acerca de las características de las plantas actinorríficas, metodología sobre el aislamiento, caracterización, propagación e inoculación del microsimbionte y distribución de vegetales que establecen simbiosis con actinomicetos a fin de contribuir al uso de esta simbiosis que puede repercutir favorablemente en los programas nacionales de reforestación, recuperación y conservación de suelos.

## 2. REVISION BIBLIOGRAFICA

### 2.1. Importancia de la fijación biológica del nitrógeno y de los microorganismos fijadores de nitrógeno.

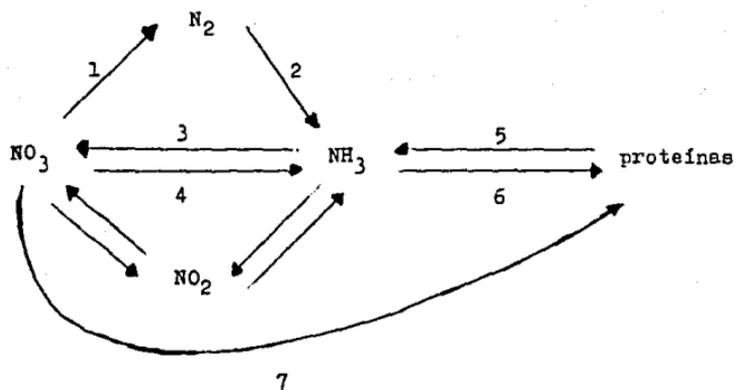
El nitrógeno en el aire es el elemento más abundante. Despues del carbono, hidrógeno y oxígeno, el nitrógeno es el elemento más abundante en los organismos vivos, encontrándose formando parte de compuestos tan importantes como proteínas, ácidos nucleicos, algunos reguladores del crecimiento de las plantas, en vitaminas y porfirinas. El nitrógeno es importante en los seres vivos ya que interviene en todas las reacciones bioquímicas.

Las plantas para sobrevivir necesitan continuamente abastecerse de nitrógeno, de hecho en todas las áreas cultivadas, si hay suficiente agua y energía solar, la productividad de estos suelos está determinada por la disponibilidad de nitrógeno inorgánico en el suelo. Sin embargo, encontrándose un 80% de nitrógeno en la atmósfera cubriendo los vegetales estos no pueden usarlo para su metabolismo. Esto se debe a que el nitrógeno es uno de los elementos más inertes, requiriendo 222Kcal, Temperaturas y presiones altas para poder reaccionar. Sin embargo nitrógeno fijo o combinado puede llegar al suelo de dos formas. Una es sin la participación de organismos vivos, por ejemplo: formación de

óxidos de nitrógeno por medio de descargas eléctricas y relámpagos y la otra es por mediación de microorganismos del suelo, los cuales fijan nitrógeno.

Los elementos más abundantes en los seres vivos (C,H,O y N) están sujetos a ciclos. El ciclo del nitrógeno es la recirculación del nitrógeno desde su forma molecular como elemento libre pasando a través de los organismos vivos. Se inicia cuando el nitrógeno atmosférico es fijado por algunos microorganismos, relámpagos y descargas electricas, siendo llevado hasta nitrógeno inorgánico reducido ( $\text{NH}_4$ ), en el suelo éste puede ser oxidado por los microorganismos del suelo hasta nitrógeno. El nitrato absorbido por las plantas es reducido hasta amonio e incorporado en algunos aminoácidos y en otros compuestos nitrogenados, éstos son ingeridos por los animales, quienes los degradan para incorporarlos a sus propios componentes nitrogenados. El nitrógeno pasa así de un animal a otro regresandé al suelo cuando el animal muere o excreta sus productos de desecho, los microorganismos del suelo aprovechan estos compuestos para sus propias necesidades y así el nitrógeno puede ser convertido de nuevo en amonio o nitratos que podrán ser asimilados por la planta. Finalmente hay microorganismos que convierten al nitrato en nitrógeno molecular regresandolo a la atmósfera para cerrar el ciclo.

fig. 1.- Ciclo del nitrógeno



1. denitrificación
2. fijación de nitrógeno
3. nitrificación
4. reducción asimilatoria
5. amonificación
6. asimilación
7. asimilación

En este trabajo nos enfocamos a la incorporación de nitrógeno atmosférico al suelo mediante un proceso biológico llamado fijación de nitrógeno, que es el proceso mediante el cual se transforma el nitrógeno del aire en nitrógeno combinado, compensando así la pérdida por denitrificación, esta fijación es llevada a cabo por microorganismos procariotes (bacterias, actinomicetos y cianofíceas), algunos de ellos fijan nitrógeno estando en vida libre en el suelo o el agua y otros necesitan vivir en simbiosis con una planta. Estos organismos procariotes fijadores de nitrógeno abarcan una gran variedad de formas metabólicas pudiendo ser anaerobios estrictos, aerobios estrictos, autótrofos, quimioautótrofos, heterótrofos o fotosintéticos.

(2)

fig. 2.- Sistemas biológicos que fijan nitrógeno

| Microorganismo                                      | Hospedero                             | Estructura especializada |
|---|---------------------------------------|--------------------------|
| <u>Nostoc</u> , <u>Anabaena</u>                     | Hongos                                | -                        |
| <u>Nostoc azollae</u>                               | <u>Azolla</u>                         | -                        |
| <u>Azotobacter paspali</u> ,<br><u>Azospirillum</u> | pastos tropicales                     | -                        |
| <u>Rhizobium</u>                                    | leguminosas                           | nódulos de raíz          |
| <u>Frankia</u>                                      | Diferentes especies<br>no leguminosas | nódulos de raíz          |

|                   |              |   |
|-------------------|--------------|---|
| Células<br>libres | Aerobias     | { <u>Nostoc muscorum</u> , <u>Anabaena cilíndrica</u><br><u>Beijerinckia indica</u><br><u>Micobacterium flavum</u><br><u>Spirulina</u> , <u>Azotobacter vinelandi</u> |
|                   | Facultativos | { <u>Klebsiella pneumoniae</u><br><u>Citrobacter freundii</u>   |
|                   | Anaerobios   | { <u>Rhodospirillum rubrum</u><br><u>Clostridium pasteurianum</u><br><u>Chromatium vinosum</u>  |

Estos microorganismos llevan a cabo la fijación de nitrógeno reactivando la molécula de nitrógeno a temperaturas y presiones ordinarias, pero también lo hacen en el agua o en una atmósfera de oxígeno. El catalizador biológico o enzima responsable de este proceso es la nitrogenasa que cataliza la reducción de una variedad de sustratos con la hidrólisis concomitante de ATP.

La fijación de nitrógeno atmosférico es de vital importancia para las plantas, los microorganismos fijadores de nitrógeno contribuyen con  $150 \times 10^6$  toneladas de nitrógeno al año, por lo que este proceso ha despertado un interés muy grande debido a la importancia agronómica y económica que representa. De los organismos fijadores de nitrógeno, han recibido particular atención aquellos que se encuentran

en asociación con organismos superiores debido a la repercusión que tienen en la productividad agrícola, en la regeneración de la fertilidad.

Debido a la necesidad de abastecimiento de alimento a la población, la productividad agrícola representa un problema grave especialmente en suelos pobres.

Para obtener rendimientos agrícolas adecuados es necesario mantener un nivel apropiado de elementos minerales en el suelo, los cuales se agotan rápidamente debido a las siembras sucesivas por lo que es necesario fertilizar y abonar estos suelos, pero debido al alto costo de los fertilizantes químicos se tienen que buscar otras soluciones.

Una alternativa que se considera además como más conveniente es la utilización de vegetales que se asocian con microorganismos fijadores de nitrógeno. Normalmente se usan leguminosas y el efecto de la fijación repercute en dos formas: aumentando el rendimiento del grano (frijol, soya, haba, chicharos) y el contenido de nitrógeno en hojas, tallos y raíces, material que al ser enterrado como residuo agrícola o abono verde es transformado a amoníaco y nitratos, asegurando de este modo un abastecimiento adecuado de nitrógeno para otras plantas cultivables que no tienen la posibilidad de asociarse con microorganismos

fijadores de nitrógeno y que de otro modo requieren de la adición de fertilizantes.

El agotamiento de los suelos provocado por la intensificación de la agricultura y el pastoreo, se agrava más con la erosión. Sin embargo se puede regenerar la fertilidad de los suelos empobrecidos y fijar los suelos erosionados.

Para el caso de los suelos erosionados los vegetales empleados para fijar dunas o pendientes desnudas son árboles y arbustos los que con su poderosa red radical retienen el suelo. Estos árboles y arbustos pertenecen a la familia de las leguminosas como las acacias que se asocian con Rhizobium, o forman parte de otras familias diferentes a las leguminosas como Adolphia infesta, Alnus acerminata, Casuarina y Myrica que se asocian con actinomicetos del género Frankia dando lugar a la formación de nódulos en las raíces por lo que se les llama plantas actinorríficas.

Estas plantas además de retener o fijar el suelo contribuyen a la fertilidad del mismo al enriquecerlo con el nitrógeno fijado por las bacterias e incorporado al vegetal, por lo que al caer al suelo las hojas e incorporarse al mismo raíces y nódulos muertos son transformados liberando nitrógeno asimilable para otros microorganismos y vegetales ( 2 )

2.2. Importancia de la asociación Frankia-vegetales arbóreos no leguminosos.

La superficie de la raíz de la planta es conocida por estar en contacto con varios microorganismos colonizadores de la rizosfera, uno de estos microorganismos, el actinomiceto Frankia, penetra, infecta y nodula para fijar nitrógeno en simbiosis con numerosas plantas a las que se les conoce como actinorrhizas ( 19 )

De las plantas actinorrhizas, los alisos (Alnus spp) en países templados y los filados (Casuarina) en los países tropicales son probablemente las mejor conocidas. La cantidad de nitrógeno fijado mediante estos sistemas varía desde varias decenas hasta cientos de kilogramos por hectárea al año. El nitrógeno fijado por las plantas actinorrhizas es incorporado al ecosistema como nitrógeno combinado por tres caminos: 1) materia orgánica de partes aéreas de la planta principalmente por hojas, las que son descompuestas y el nitrógeno es mineralizado, 2) materia orgánica del sistema de raíz que es descompuesto bajo el suelo y 3) entrada de nitrógeno al suelo en forma de exudados de raíz, siendo la materia orgánica aérea la más rica en nitrógeno. ( 7 )

Las plantas actinorrhizas tienen importancia ecológica y económica porque muchas especies pueden colonizar suelos alterados o pobres de nitrógeno y participar en la estabi-

lización y restauración de tales suelos ( 13 ) y porque tienen múltiples usos: ejemplo: Casuarina equisetifolia que es uno de los árboles combustibles mas usados por el hombre en los trópicos. Debido a la existencia e importancia potencial de las plantas actinorrhizas y en especial de la Casuarina en la agricultura tropical y reforestación se han hecho esfuerzos en años recientes para aislar y cultivar cepas de Frankia de nódulos de raíces de diferentes géneros y especies de plantas actinorrhizas ( 37 )

La utilización de estas especies para propósitos relacionados a la reforestación han sido el tema de investigación y discusión durante esta década. Es común que los proyectos con plantas actinorrhizas se consideren usos como combustible de madera o madera de construcción, para plantación de biomasa, para control de erosión y como intercultivos con especies de reforestación.

Las plantas actinorrhizas arbustivas y arborescentes podrían tener múltiples usos en agronomía y en el campo forestal tropical. Pueden ser cultivadas en monocultivos o mezcladas con otros árboles no fijadores de nitrógeno; en este caso contribuirían a la nutrición nitrogenada de éstos últimos. Las especies arborescentes como Casuarina, y en especial C. equisetifolia, ya son empleadas en numerosos países tropicales como cortavientos, para fijar las dunas móviles

y para proteger a los cultivos de la invasión de arena. A lo largo de la costa de China meridional se han plantado desde 1954 más de un millón de hectáreas de Casuarina para formar un cinturón de protección de 3000 Km de largo por 500 m a 5Km de ancho. Igualmente se ha recurrido a Casuarina para proteger a la Ciudad de México contra los vientos cargados de polvo procedentes del lago de Texcoco. ( 2 )

### 2.3. Características de Frankia

#### 2.3.1. Morfología

Frankia es una bacteria Gram positiva, filamentososa que crece radialmente como los microhongos; de aquí el nombre de actinomycetos que se da a este grupo bacteriano al que pertenece (actinos, radio y myces, hongo). Esta bacteria penetra a las raíces de diversos vegetales e induce la formación de nódulos por lo que los hospederos son designados como plantas actinorríficas (actino, por actinomycetos y rhizos, raíz ). ( 2 )

En los nódulos, los actinomycetos fijan nitrógeno ( 32 ). Experimentos de campo y laboratorio muestran que el endófito Frankia puede sobrevivir por largos períodos en algunos suelos, que la destrucción natural de los nódulos da lugar a la liberación del endófito y se considera que esto

contribuye a mantener la densidad de población de Frankia en el suelo. ( 34 )

El primer cultivo in vitro de Frankia lo realizó el grupo de J. Torrey en 1978 en la Universidad de Harvard, Estados Unidos; aislándolo a partir de Comptonia peregrina planta que coloniza los suelos degradados norteamericanos. El éxito del equipo de Torrey constituye el punto de partida para el aislamiento, cultivo y caracterización de diversas cepas de Frankia a partir de otras plantas actinorríficas de regiones templadas, especialmente en distintas especies de alisos. En las Casuarinas, el aislamiento de su simbiote presentó dificultades que fueron superadas hasta 1982, cuando H.G. Diem, obtuvo la primera cepa de Frankia infectiva (capaz de producir nódulos) y efectiva (capaz de fijar nitrógeno), a partir de un nódulo fresco de Casuarina junghuhniana extraído de una planta viva. Esta cepa demostró ser capaz de fijar nitrógeno tanto in vitro como en asociación con la planta-huesped. Desde 1982 se han aislado más de una decena de cepas infectivas, cuya eficiencia está en estudio, a partir de nódulos de Casuarina procedentes de distintas regiones del mundo (especialmente de Asia). ( 2 )

Respecto a las características de Frankia in vitro y en nódulos, se han descrito 3 formas morfológicas distintas que corresponden a:

- hifas septadas ramificadas
- esporangios terminales o intercalados
- vesículas

( 8, 12, 17, 16 )

### 2.3.1.1 Hifas septadas ramificadas

En un estudio realizado por Zhang Zhongu y John G. Torrey con una cepa de Frankia HFPC13 aislada de nódulos de raíz de Casuarina cunninghamiana, observaron que en un medio líquido el crecimiento vegetativo es filamentososo con ramificaciones, ocasionalmente septadas. La mata micelial aparece blanca o incolora y no hay aparición de pigmento. Los filamentos tienen un diámetro promedio de  $1 \mu\text{m}$  con engrosamientos ocasionales que alcanzan  $2 \mu\text{m}$  de diámetro. La variación de los filamentos depende de los componentes del medio y de la edad del cultivo.

Quando Frankia se cultiva en el medio BAP (Murry y colaboradores, 1984) el cual contiene piruvato de sodio a 10 mM y Cloruro de amonio a 5 mM, solo aparece crecimiento filamentososo en periodos tempranos de desarrollo, en tanto que cuando se transfiere al mismo medio pero carente de nitrógeno combinado se observa la formación de vesículas las que aumentan a través del periodo de incubación. ( 37 )

### 2.3.1.2. Esporangios

Los esporangios se han observado in vitro y en nódulos. La mayoría de las cepas, pueden formar esporangios in vitro en función del tiempo después del subcultivo. En tanto que no se han observado en todos los nódulos, por lo que se reportan nódulos sp + (formadores de esporas) y sp - (sin esporas).

Las esporangiosporas se forman por la aparición repetida de septos dentro de las hifas, seguida por el agrandamiento de células (Newcomb y colaboradores, 1978). Las esporas maduras tienen paredes densas y una membrana característica se presenta en el exterior de la superficie de la pared de la espora (Lechevalier y Lechevalier, 1979). ( 11 )

En cultivos viejos cuando los nutrientes comienzan a ser agotados aparece la formación de vesículas y esporangios.

El esporangio varía en tamaño en estados tempranos de desarrollo, al sub-dividirse los filamentos se elaboran estructuras que engrosan a las esporas las que alcanzan unos 60  $\mu$ m de longitud. En observaciones bajo microscopio de contraste de fase las esporas maduras están en la fase brillante y los filamentos en la fase oscura. Cuando son fotografiadas en un microscopio óptico Normarski el esporan

gio muestra que en la maduración de las esporas hay diferenciación interna, la que ocurre primero, en las esporas distales del esporangio. La liberación espontánea de las esporas del esporangio puede ocurrir in vitro. ( 37 )

Se supone que las esporas de Frankia funcionan como propágulos inmóviles que se encuentran en nódulos viejos o en forma libre en el suelo. La germinación de esporas in vitro no se ha logrado y esto resulta importante de lograr para obtener células únicas aisladas ( 11 )

La formación de los esporangios es determinada por características genéticas de la bacteria y aún cuando se reportan ciertos hospederos con nódulos sp - o carentes de esporas Torrey, 1987 considera que esto no se debe a la interacción endófito-hospedero, ya que casi todas las cepas aisladas de nódulos sp - son capaces de formar esporas in vitro y que la formación de estas parece estar determinada por las condiciones ambientales como lo demuestran los estudios de Weber, Holman y Kashanki entre otros quienes al estudiar nódulos aislados de Alnus glutinosa, A. indica y A. rugosa y Myrica gale observaron que la mayor cantidad de nódulos sp + se encuentran en suelos con pHs ácidos en tanto que en los mismos hospederos el número de nódulos sp - aumenta con el incremento de pH, así mismo reportan una correlación positiva entre nódulos sp + y contenido de ma-

teria orgánica en el suelo. De los factores metabólicos que gobiernan la diferenciación esporangial in vivo o in vitro se conoce muy poco, pero la existencia de nódulos sp+ y sp- tienen otras repercusiones y se considera que la presencia de un gran número de esporas o partículas infecciosas en los nódulos sp+ aseguran el mantenimiento y propagación de Frankia en el suelo. En tanto que los nódulos sp- son mas efectivos en la fijación y por tanto más importantes para el desarrollo de la planta. ( 6, 9, 34 )

#### 2.3.1.3. Vesículas

Las vesículas son estructuras especializadas, se considera que son el sitio de fijación de nitrógeno de Frankia en la planta actinorrhiza ( 32 )

Las vesículas de Frankia son ramificaciones de hifas, las que se diferencian por agrandamiento esférico de las células terminales ( 11 ). El tallo de las vesículas es aproximadamente igual en longitud al diámetro de la vesícula, el cual varia de 3 a 5  $\mu$ m, ocasionalmente las vesículas aparecen al final de largos filamentos no ramificados ( 37 )

La mayoría de las vesículas maduras son multicelulares con numerosos septos internos, las vesículas jóvenes tienen

pocos septos o carecen de ellos. Todas las vesículas están rodeadas por una cápsula que se extiende hasta la región del tallo, pero no alrededor de la hifa. La cápsula fué descrita por Torrey y Callahan como una envoltura densa multilamelar cuya función es la de actuar como barrera física a la difusión de oxígeno ( 17, 32 ). Las cápsulas se tiñen ligeramente con acetato de uranilo y citrato. Sobre su composición química se indica la presencia de un glicolípido análogo al detectado en las paredes de los heterocistos de Anabaena ( 11 ) . Este glicolípido fué aislado de la envoltura mediante la adición de solventes orgánicos y tratamiento posterior con tiocarbazida de osmio.

Estudios sobre la fisiología de las vesículas aisladas indican que en estas se efectúa la fijación de nitrógeno, ya que se ha comprobado la reducción de acetileno en vesículas incubadas anaeróbicamente con iones  $Mg^{++}$ , ATP y ditionato.

Las vesículas contienen ácidos nucleicos, los análisis revelan el porcentaje de peso seco de ácidos nucleicos total en células creciendo en nitrógeno y amonio, son muy similares (4.9 y 4.5% respectivamente), mientras que el valor para vesículas fué 0.64%. El porcentaje de peso seco de DNA fue 0.11 para ambas células creciendo en nitrógeno y amonio, y 0.06 para vesículas aisladas. El contenido

individual de DNA en vesículas fué calculado como  $1.2 \times 10^{-11}$  mg  
( 37 )

### 2.3.2. Fisiología

Frankia es una bacteria fijadora de nitrógeno, proceso que ha sido localizado en las vesículas, reportándose una relación directa entre la reducción de acetileno y el número de vesículas producidas en cultivos in vitro. Sin embargo el proceso parece no estar dado únicamente por la presencia de estas estructuras y la cápsula que presentan la que actúa regulando la tensión de oxígeno en el interior de éstas, sino que es acompañado por altos niveles de actividad respiratoria (Akkermans, 1971 citado en 11) y que esto proporciona un mecanismo adicional para establecer tensiones limitadas de oxígeno.

Como complemento a lo anterior se ha observado que las vesículas purificadas no reducen acetileno cuando son incubadas aeróbica o anaeróbicamente con sustratos como el succinato, propionato o manitol, en tanto que sí hay reducción cuando se incuban aeróbicamente en presencia de ditionato y ATP lo que sugiere la posibilidad de que las vesículas sean incapaces de generar el poder de reducción y energía para efectuar la fijación de nitrógeno y que el micelio participe en el abastecimiento de este sustrato.

Por otra parte las vesículas no se han observado dentro de los nódulos de Casuarina lo que indica que la protección al oxígeno para la actividad de la nitrogenasa no está restringida a la presencia de las vesículas y que en algunas cepas de Frankia, esta actividad se lleva a cabo en las hifas y que estas hifas presentan una especialización o diferenciación en la estructura de la pared.

También se reportan en las células del hospedero mecanismos que regulan la distribución de oxígeno y la reducción de nitrógeno efectuada por Frankia. Entre éstos se tiene la presencia de hemoglobina en Myrica y Casuarina, en tanto que esta hemoproteína no se ha detectado en los nódulos de Ceanothus, Datisca y Alnus. Las paredes celulares de células infectadas de Casuarina y Myrica aparecen marcadamente impregnadas por suberina y lignina, en adición las células corticales infectadas de diversas especies aparecen densamente empaquetadas, pudiendo contribuir la presencia de las sustancias antes indicadas o el empaquetamiento de células a mantener localmente niveles bajos de oxígeno.

In vitro se ha demostrado que Frankia utiliza el nitrógeno atmosférico, sales de amonio y numerosos aminoácidos como sustrato para su metabolismo nitrogenado, probablemente vía glutamino sintetasa.

### 2.3.3. Utilización de fuentes de carbono

In vitro se ha puesto de manifiesto que las diferentes cepas de Frankia presentan la posibilidad de emplear una amplia gama de fuentes de carbono incluyendo ácidos orgánicos tales como el propiónico, succínico y málico así como a la glucosa, sacarosa, arabinosa, trehalosa y otras sustancias.

En los nódulos la vía de asimilación de carbono no ha sido bien establecida. Vesículas aisladas de nódulos de tres géneros de hospederos utilizan succinato; dos de estos también utilizan malato y glutamato y se reporta que el glicógeno y trehalosa funcionan como carbono de reserva.

( 15, 25, 30, 35, 36 y 39 )

### 2.3.4. Diferenciación de estructuras morfológicas y actividad metabólica.

Ambos son regulados por la cantidad de nitrógeno presente. En cultivos desarrollados en medios carentes de nitrógeno la diferenciación de vesículas se observa dentro de las primeras 24 h, observándose también un cambio en el patrón de asimilación de amonio.

Carbohidratos endógenos tales como el glicógeno y la trehalosa parecen tener la función de reserva de energía

durante el desarrollo rápido o la diferenciación.

Los resultados de estudios in vitro indican que el tiempo de generación de este actinomiceto es largo de 40 a 45 h ( 14 ) y que al menos para la cepa HFPCcl3 de Frankia aislada de Casuarina las condiciones óptimas de desarrollo corresponden a pH de 6.3, temperatura de 33° C, piruvato y NH<sub>4</sub>Cl como fuentes de carbono y nitrógeno, condiciones en las que se registró el máximo desarrollo a las 24 h ( 11 )

#### 2.3.5. Producción de fitohormonas

Recientemente se demostró que in vitro una cepa de Frankia es capaz de producir niveles bajos de ácido indol acético en un medio suplementado con triptofano. Pero aún se desconoce su vía de síntesis en Frankia así como el significado de este compuesto en el proceso de nodulación, ( 11 )

#### 2.3.6. Algunos aspectos generales de algunas enzimas de Frankia

##### 2.3.6.1. Nitrogenasa

Cataliza la reducción del nitrógeno a amoníaco



En 1966 I.R. Kennedy y colaboradores demostraron que es la misma nitrogenasa la que opera en todas las bacterias fijadoras de nitrógeno, ya se trate de bacterias libres del suelo o de bacterias simbióticas. R.R. Eady en 1972 indicó que la nitrogenasa no es una enzima simple sino que se trata de un complejo enzimático que contiene dos proteínas Fe-S, llamadas proteína I y II ( 2 )

En todas las bacterias investigadas la nitrogenasa contiene dos proteínas Fe-S, las cuales son necesarias para su actividad in vitro.

El componente protéico que contiene FeMo ha sido llamado componente I, éste es una proteína tetramérica del tipo  $\alpha_2 \beta_2$  o sea que contiene 4 subunidades de dos tipos diferentes y tiene un peso molecular entre 200 000 y 270 000. El contenido de Fe varía de 16 a 36 átomos por tetrámero, si bien el número más probable es de  $30 \pm 2$  éstos parecen encontrarse en 6 diferentes agrupamientos de los cuáles sólo dos son iguales, y hay 2 Mo por tetrámero. Existen otros metales asociados con la proteína Fe-Mo como son Mg, Cu, Ca y Zn., los ligandos que ocurren son: Mo-S y Fe-Mo y no se ha determinado un ligando Mo-O el cual se forma en presencia de oxígeno provocando una pérdida en la actividad.

El componente II de la nitrogenasa tiene un peso molecular entre 55 500 y 72 600 y es una proteína del tipo  $\alpha_2$  que comprende dos subunidades idénticas. Contiene 4Fe y 4S en un solo agrupamiento. Esta proteína transfiere electrones in vitro ya sea desde un donador biológico o químico hacia la proteína FeMo

La función de la proteína I es la reducción del  $N_2$  en amoníaco  $NH_3$ , y la función de la proteína II es transferir a la proteína I la energía necesaria para su funcionamiento

( 2 y 14 )

Cuando la nitrogenasa se encuentra in vitro es rápidamente inhibida por el oxígeno y ésta propiedad es común a la enzima de todos los microorganismos estudiados hasta ahora. Este fenómeno no es privativo de la enzima in vitro, también se da in vivo. Sin embargo, los organismos que fijan nitrógeno han desarrollado una serie de medidas tendientes a proteger a su nitrogenasa del oxígeno, entre estas estrategias tenemos:

- a) Medio anaeróbico.- Bacterias anaeróbicas estrictas por lo que su nitrogenasa se mantiene activa evitando el contacto con el aire.
- b) Barreras físicas o bioquímicas.- En el caso de Frankia hay una cápsula envolvente en las vesículas que impide la difusión de oxígeno.

c) Eliminación metabólica de oxígeno.- Los organismos aeró**bi**os fijadores de nitrógeno poseen una elevada velocidad de respiración; estos microorganismos tienen una cadena respiratoria que en altas concentraciones de oxígeno se encuentra pobremente acoplada a la producción de ATP, lo cual da por resultado mantener una concentración de oxígeno muy cercano a cero.

d) Protección conformacional.- Se ha sugerido que cuando Azotobacter se encuentra expuesto al oxígeno, su nitrógena sufre un cambio conformacional generando una forma de la enzima resistente al oxígeno pero inactiva.

El sistema enzimático de nitrógenasa acoplado con hidrogenasa es responsable de la fijación de nitrógeno en Frankia. ( 11 ).

#### 2.3.6.2. Hidrogenasa

Todos los organismos fijadores de nitrógeno producen hidrógeno, cuando el nitrógeno es reducido a  $NH_3$ .

La hidrogenasa es la enzima que cataliza tanto la eliminación de electrónes del hidrógeno, como la reducción de los protones. Hay tres tipos en la naturaleza; el primero es la hidrogenasa presente en bacterias anaeróbicas la cual actúa como un vertedero de electrónes asociado con la re-

ducción de la ferredoxina; el segundo es una hidrogenasa que toma hidrógeno unidireccionalmente y la cual se encuentra en bacterias fijadoras de nitrógeno; el tercer tipo de hidrogenasa es la que se encuentra asociada a la nitrogenasa y en la cual la liberación de hidrógeno es dependiente de ATP.

Las funciones de la hidrogenasa son:

a) Ayudar a la protección respiratoria y b) reciclar el hidrógeno para mejorar la eficiencia metabólica, pues aproximadamente el 30% de la energía requerida para la fijación de nitrógeno se pierde al producirse hidrógeno molecular.

### 2.3.6.3. Superóxido dismutasa y catalasa

La superóxido dismutasa y catalasa son enzimas importantes en la protección de componentes celulares a la oxidación vía superóxido radicales libres ( $O_2^-$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).

La reducción univalente de oxígeno resulta en la producción de especies intermediarias tóxicas, dos de estas, el radical libre superóxido ( $O_2^-$ ) y el radical libre hidroxilo ( $OH^-$ ) son capaces de causar severo daño celular, tal como la oxidación de proteínas y lípidos. La reducción de oxige

no y subsecuente producción del radical anión tóxico son un resultado normal de respiración aeróbica en especies microbianas, por eso estos organismos deben tener medios de depuración de este radical, convirtiéndolas en moléculas menos tóxicas. Dos enzimas capaces de estas conversiones son la superóxido dismutasa y la catalasa. ( 29 )

#### 2.3.6.4. Glutamino sintetasa (GSI)

La cepa de Frankia CpI<sub>1</sub> tiene dos glutamino sintetasa la cual está presente durante el crecimiento con amonio o nitrógeno y es muy similar a la glutamino sintetasa de otros procariontes. El peso molecular estimado es aproximado a 680 000 para la holoenzima de GSI y la desnaturalización produce una subunidad de peso molecular aproximado a 59 000 indicando que la GSI es probablemente un dodecámero. La GSI está regulada por adenilación como lo muestra la presencia de dos sitios en la electroforesis en gel de poli acrilamida y su comportamiento durante el tratamiento con fosfodiesterasa de veneno de serpiente.

La GSI de Frankia es similar a la enzima GSII encontrada en todos los miembros de Rhizobiaceae analizados. ( 3 )

### 2.3.6.5. Isoenzimas

40 especies de Frankia pertenecientes a huéspedes específicos de Alnus y Elaeagnus, aislados de varias especies de plantas en diferentes áreas geográficas fueron caracterizados por separación electroforética de isoenzimas de ocho enzimas. Todos los sistemas enzimáticos que fueron investigados muestran grandes variaciones. Diaforasas y esterases dan múltiples modelos de banda y confirman la identificación de cepas específicas de Frankia. Menor variabilidad fue observada con enzimas tales como isomerasa fosfoglucoasa, leucina aminopeptidasa y malato deshidrogenasa, lo cual permitió trazar un gran grupo de clases de Frankia.

( 4 )

### 2.4 Proceso de infección y desarrollo del nódulo

Frankia penetra en las células de la raíz de su planta huésped y forma los nódulos. Se trata de una verdadera infección que se transforma posteriormente en una simbiosis mutualista, es decir en una asociación mutuamente benéfica ( 2 )

El nódulo de la raíz de la actinorriza es una estructura perineal formada por repetidas ramificaciones laterales de raíces modificadas llamadas lóbulos de nódulo ( de

aproximadamente 5-10 mm de longitud), estos tienen un cilindro vascular, una zona cortical y un peridermo, estos contribuyen a la formación de una estructura compacta irregular o coraloide llamada nódulo.

Dentro del lóbulo del nódulo individual, Frankia pasa de célula a célula, invadiendo células de la corteza de la raíz a través del meristemo del nódulo, aparentemente durante la expansión celular.

Antes de abordar el proceso de infección se describirán algunos aspectos importantes sobre la anatomía de los pelos radiculares, los cuales son considerados por representar la zona de infección.

Las raíces laterales están constituidas de fuera hacia adentro por la epidermis, la exodermis que normalmente presenta células de tamaño mayor a las que constituyen a la epidermis, la corteza formada por capas de 4 a 6 células de espesor que son largas, redondas y separadas por espacios de aire (fig. 3) y en la parte central se encuentra el tejido vascular. Por fuera de la epidermis Prin y Rougier en 1985 detectaron una delgada capa de mucilago y la presencia de sustancias osmeoflicas que se depositan en las vacuolas, siendo más abundantes en las células periféricas de la corona de la raíz, estos autores reportan que el

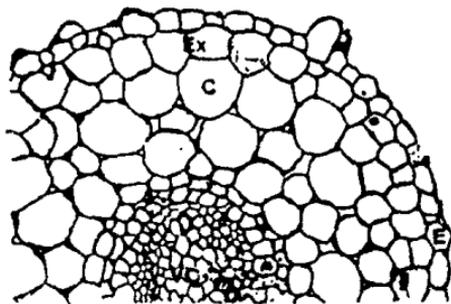


fig. 3 .- Sección transversal de una raíz lateral joven mostrando la epidermis (E), exodermis (Ex), corteza (C) y tejido vascular (VC).

mucilago se produce en la corona de la raíz y se extiende a través de ésta y de los pelos radiculares.

#### 2.4.1. Reconocimiento de los hospederos

El reconocimiento entre Rhizobium y leguminosas ha sido explicado por la reacción que se establece entre las lectinas presentes en la superficie de los pelos radiculares de las leguminosas, las cuales reaccionan con azúcares específicos de la pared celular de Rhizobium. Se supone que una reacción similar puede estar involucrada en el reconocimiento de Frankia y su hospedero correspondiente, pero esto no ha sido demostrado. Algunos autores consideran que el mucilago que rodea a las raíces de los hospederos reacciona

con la bacteria pero no se ha reportado el componente específico de Frankia con el que se lleva a cabo la reacción. Por otra parte no se han encontrado fimbrias u otras estructuras especializadas en el actinomiceto que pudieran actuar en un reconocimiento químico. Newcomb y colaboradores reportan que las hifas al ramificarse dan lugar a hifas extremadamente finas (0.01  $\mu$ m de diámetro) y que en los sitios en donde se efectúa la penetración existen numerosas ramificaciones hifales incipientes lo que sugiere que estas hifas actúan como puntos de adhesión bacteriana ( 19 )

Los sitios de infección fueron descritos por Burgraf y colaboradores en 1983, quienes indican que la infección se lleva a cabo en las células de la punta de la raíz, las cuales están en proceso de desintegración. En este sentido se supone que las enzimas producidas por Frankia intervienen en la degradación de la celulosa, hemicelulosa y pectina, sin embargo esto no ha sido demostrado in vivo; observándose in vitro que algunas cepas de Frankia son capaces de hidrolizar papel filtro y carboxil metil celulosa, y que esta actividad se lleva a cabo bajo condiciones de cultivo muy específicas (pH 5.0 y con piruvato o propionato como fuente de carbono primaria ( 28 )

#### 2.4.2. Infección del pelo radicular

Durante la infección de Frankia en cultivos axénicos se ha demostrado con el microscopio electrónico que el mucilago adquiere una estructura fibrilar, las causas de este cambio no han sido aclaradas.

En Eleagnus se reporta que antes de que ocurra la invasión intracelular se estimula la producción de la matriz extracelular que presumiblemente es originada por el hospedero, Miller y Baker 1985.

Kosuge y colaboradores en 1980, mediante experimentos de inoculación observaron que se estimula la deformación de los pelos radiculares, en donde aparecen zonas localizadas con células desorganizadas, se supone que en este momento las enzimas hidrolíticas y otras enzimas producidas por Frankia desempeñan un papel importante en la alteración del pelo radicular, (Robertson y colaboradores 1986). En los sitios de infección las paredes de las células radiculares infectadas presentan numerosas capas las cuales no existen en las zonas no infectadas por lo que se cree que Frankia estimula la síntesis de pared. El enroscamiento de los pelos radiculares ha sido observado en Casuarina y Alnus japonica. Posterior a la curvatura de los pelos absorbentes Frankia penetra y en el interior se desarrollan filamentos, llamadas hifas infecciosas, que se alargan paralelamente o

describiendo espiras y alcanzan las células de la corteza radicular. Las hifas se encuentran envueltas por una cubierta de naturaleza péptica sintetizada por la planta.

El desarrollo del prenódulo se caracteriza por la proliferación de las células corticales que se lleva a cabo como una respuesta a la invasión del endófito (fig. 4 ), las células infectadas se caracterizan por carecer de gránulos de almidón, los cuales se mantienen presentes en células corticales adyacentes no infectadas (fig. 5 ). Esta etapa corresponde al prenódulo el cual es visible 2 semanas después de la inoculación. 4 semanas después se observa que Frankia está perfectamente establecida en un gran número de células de la corteza, algunas de estas contienen numerosas hifas, en tanto que en otras existen hifas y vesículas. (fig. 6 )

La infección se encuentra restringida a las células corticales de la porción media en tanto que a las 6 semanas el endófito prolifera hasta las células corticales que rodean al tejido vascular ( fig. 7 ), observándose el lóbulo nodular perfectamente diferenciado.

En este trabajo se asume que la fijación de nitrógeno se inicia a las 4 semanas, período al cual se observaron las vesículas en tanto que 10 semanas después de la inoculación

se observaron vesículas senescentes y que después de 13 semanas los nódulos se multilobularon presentando el mismo patrón de distribución del endófito alrededor del tejido vascular lo que asegura su relación con el floéma (fig. 8 ) Las células corticales recientemente formadas continúan siendo infectadas por Frankia (fig. 9 ), observándose en las células de la base únicamente hifas en tanto que en las células de la periferia existen vesículas.



fig. 4 .- Porción de un pelo lateral, 2 semanas después de la infección con Frankia. Las hifas han invadido un pelo de la raíz (flecha) y las células corticales han proliferado (\*). Algunas células corticales de la periferia han iniciado el felógeno( punta de flecha )

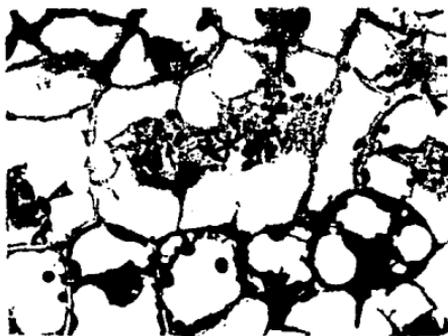


fig. 5 .- Células corticales infectadas (\*) conteniendo hifas (flechas) rodeadas por células corticales no infectadas conteniendo plástidos con granos de almidón (punta de flecha)



fig. 6 .- Sección longitudinal de primordio de nódulo de raíz joven (4 semanas despues de la inoculación), mostando el cilindro vascular central (VC) y una zona de infección limitada (flechas) sobre un lado distal del primordio.

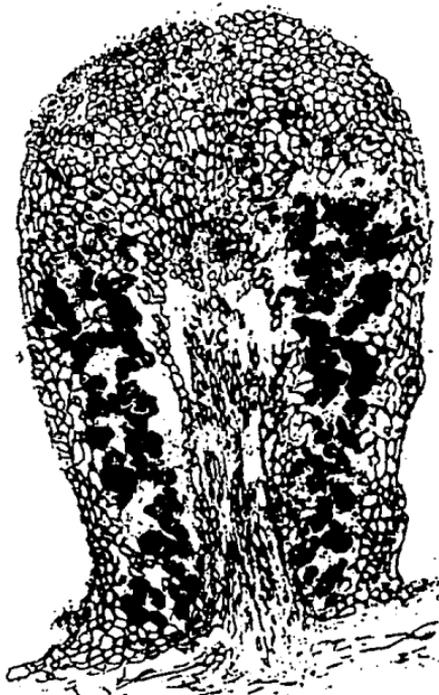


fig. 7 .- Sección longitudinal mostrando elongación del lóbulo de nódulo debido a actividad meristemática en el ápice (\*). El cilindro vascular central (VC) está rodeado por células infectadas. Zonas de células recientemente infectadas (flechas) y células totalmente colonizadas (punta de flecha) son evidentes.



fig. 8 .- Agrandamiento del cilindro vascular rodeado por una endodermis (EN), una multicapa, citoplasma pericíclico (P), y una considerable cantidad de floéma (flechas).



fig. 9 .- Células corticales cerrando al meristemo del nódulo mostrando invasión de hifas (flechas). Células no infectadas tienen densos depósitos, presumiblemente fennícos (\*).

El proceso de infección observado en A. japonica es similar en otras plantas actinorrhizas en las que la inducción de los nódulos ocurre mediante la infección a través de los pelos radiculares en tanto que en Eleagnus se reporta que la infección ocurre por penetración directa a través de la epidermis, en este mismo hospedero no se ha reportado la formación de prenodulo.

Las plantas actinorrhizas presentan diferencias en cuanto al número de nódulos y número de lóbulos por nódulo. En Myrica gale el número es bajo, generalmente uno, mientras que en Comptonia peregrina se reportan numerosos nódulos.

La posición de las células corticales infectadas varía con el género del hospedero; en A. japonica se observa una zona en la corteza media en tanto que en Ceanothus se restringen a la mitad externa de la zona cortical ( 1 ) . Las formas de los nódulos varían con la planta hospedera y la edad de los nódulos ( 11 )

En el género Alnus basándose en la formación de esporas por Frankia (Van Dijk y Merkus, 1976) se han descrito dos tipos de nódulos, unos contienen numerosas esporas y son designados sp(+) (para esporas positivas), los otros no contienen esporas o solo unas pocas y son designadas sp(-) (para esporas negativas). La aparición de esporas dentro del nódulo

es aparentemente un rasgo genético del Actinomyceto, aunque el huésped puede también influir en la formación de esporas (Torrey, 1987). Resulta de interés que cepas sp(-) esporulan libremente en medios de crecimiento in vitro (Baker, 1982), así ambas cepas sp (+) y sp (-), tienen la capacidad genética para esporular, pero en cepas sp (-) la esporulación es suprimida dentro del nódulo.

Los nódulos sp (+) y sp (-) difieren en varios aspectos importantes (Tjepkema y colaboradores, 1986). Los nódulos sp (-) son probablemente más eficientes en sostener el crecimiento de la planta huésped (Hall, y colaboradores, 1979), puede haber gran especificidad en la actividad de nitrógenoasa (Vanden Bosch y Torrey, 1984, Wheeler y colaboradores 1986) y puede haber un más bajo costo de energía en la fijación de nitrógeno que en los nódulos sp (+) (Vanden Bosch y Torrey, 1984).

Los nódulos sp (+), en contraste, contienen más de 1000 x partículas infectivas que los nódulos sp (-) quizá debido a la presencia de numerosas esporas (Houwers y Akkermans, 1981; Van Dijk, 1984). Dado estas diferencias uno puede esperar encontrar cepas de Frankia sp (+) y sp (-) bajo diferentes condiciones ambientales. ( 6, 19 y 34 )

## 2.5. Vegetales con los que se asocia Frankia

El actinomiceto Frankia invade, habita y fija nitrógeno en las raíces de cerca de 200 especies de árboles y arbustos pertenecientes a 10 familias de angiospermas filogenéticamente diversas.

En la tabla 1 se registran las 10 familias y los géneros y especies noduladas más comunes. Algunos de estos se conocen desde hace muchos años, pero los reportes sobre otras especies noduladas han aumentado, por lo que es razonable esperar que la lista sea aún incompleta por lo menos a nivel genérico. ( 11 )

Tabla..1.- Familias, generos y especies noduladas

| Familia             | género                                | especie               |
|---------------------|---------------------------------------|-----------------------|
| Betulacea           | <u>Alnus</u><br>33 especies noduladas | <u>A. cordata</u>     |
|                     |                                       | <u>A. japonica</u>    |
|                     |                                       | <u>A. crispa</u>      |
|                     |                                       | <u>A. glutinosa</u>   |
|                     |                                       | <u>A. incana</u>      |
|                     |                                       | <u>A. rubra</u>       |
|                     |                                       | <u>A. rugosa</u>      |
|                     |                                       | <u>A. sioboldiana</u> |
|                     |                                       | <u>A. inokumae</u>    |
|                     |                                       | <u>A. viridis</u>     |
|                     |                                       | <u>A. sibirica</u>    |
|                     |                                       | <u>A. tenuifolia</u>  |
|                     |                                       | <u>A. jorullensis</u> |
| <u>A. acuminata</u> |                                       |                       |

## Casuarinaceae

Casuarina

43 especies noduladas

C. junghuhniana  
C. rumphiana  
C. equisetifolia  
C. littoralis  
C. collina  
C. cristata  
C. cunninghamiana  
C. oligodon  
C. timorensis  
C. glauca  
C. obesa  
C. sumatrana

Gymnostoma

G. vitiense  
G. deplancheanum  
G. papuanum

Allocasuarina

A. fraseriana  
A. littoralis  
A. torulosa  
A. lehmanniana  
A. campestris  
A. huegeliana  
A. muelleriana  
A. nana  
A. verticillata  
A. dielsiana

## Coriariaceae

Coriaria

13 especies noduladas

C. arborea  
C. myrtifolia

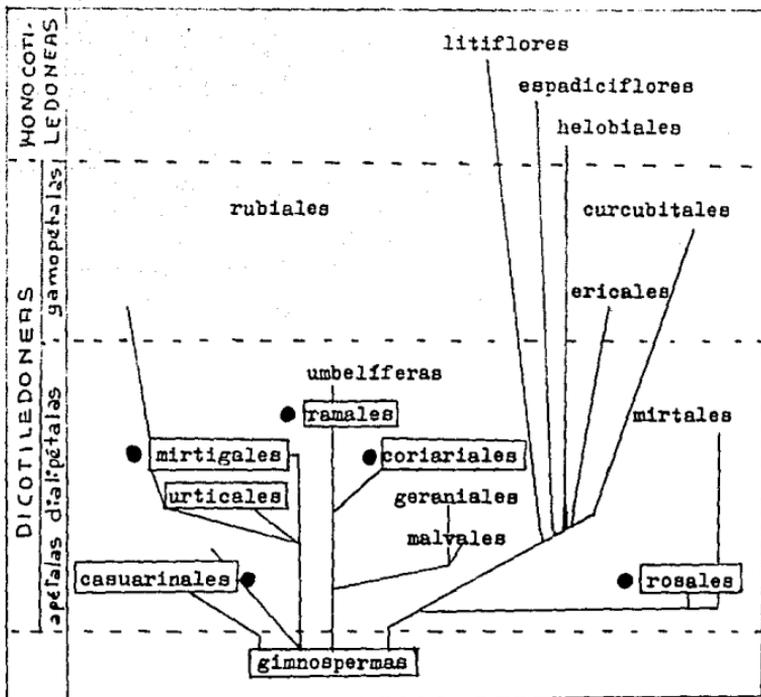
## Datisceaceae

DatiscaDatisca spp

|              |                        |                         |  |
|--------------|------------------------|-------------------------|--|
| Elaeagnaceae | <u>Elaeagnus</u>       | <u>E. angustifolia</u>  |  |
|              |                        | <u>E. umbellata</u>     |  |
|              |                        | <u>E. orientalis</u>    |  |
|              |                        | <u>E. commutata</u>     |  |
|              |                        |                         |  |
|              | <u>Shepherdia</u>      | <u>S. argentea</u>      |  |
|              | <u>Hippophae</u>       | <u>H. rhamnoides</u>    |  |
|              | unica especie nodulada |                         |  |
| Myricaceae   | <u>Myrica</u>          | <u>M. gale</u>          |  |
|              |                        | <u>M. corifera</u>      |  |
|              |                        | <u>M. cordifolia</u>    |  |
|              |                        | <u>M. rubra</u>         |  |
|              |                        | <u>M. pululifera</u>    |  |
|              |                        | <u>M. javanica</u>      |  |
|              |                        | <u>M. asplerifolia</u>  |  |
|              |                        | <u>M. pensilvánica</u>  |  |
|              |                        |                         |  |
|              |                        |                         |  |
|              | <u>Comptonia</u>       | <u>C. peregrina</u>     |  |
| Rhamnaceae   | <u>Ceanothus</u>       | <u>C. sanguineus</u>    |  |
|              | 3l especies noduladas  | <u>C. velutinus</u>     |  |
|              |                        | <u>C. integerrimus</u>  |  |
|              |                        |                         |  |
|              | <u>Discaria</u>        | <u>D. toumatou</u>      |  |
|              | unica especie nodulada |                         |  |
| Rosaceae     | <u>Cercocarpus</u>     | <u>C. butuloides</u>    |  |
|              | 3 especies noduladas   | <u>C. montanus</u>      |  |
|              |                        | <u>C. paucidentatus</u> |  |

|                  |                      |                        |
|------------------|----------------------|------------------------|
|                  | <u>Dryas</u>         | <u>D. integrifolia</u> |
|                  |                      | <u>D. drummondii</u>   |
|                  |                      | <u>D. octopetala</u>   |
| Scrophulariaceae | <u>Purshia</u>       | <u>P. tridentata</u>   |
|                  | 2 especies noduladas | <u>P. glandulosa</u>   |
| Ulmaceae         | <u>Colletia</u>      | <u>C. crucata</u>      |

El estudio del árbol genealógico de las plantas vasculares indica que los vegetales susceptibles a ser infectados por Frankia, forman nódulos y fijan nitrógeno, pertenecen a los grupos más antiguos de vegetales con flores que corresponden a las apétalas y dialipétalas, en tanto que en los grupos más recientes representados por dicotiledóneas gamopétalas (flores con pétalos soldados) y en las monocotiledóneas no se ha encontrado hasta el momento vegetales actinorrhizales ( 2 ) . ver tabla 2 .



Los ordenes de plantas simbióticas con *Frankia* están marcadas con un círculo ●

Tabla 2 . Estudio del árbol genealógico de las plantas vasculares.

## 2.6. Compatibilidad de Frankia con diferentes hospederos

Respecto a la compatibilidad de las diferentes cepas de Frankia con los diversos hospederos se requiere de más investigación.

Algunos investigadores indican que ciertas cepas de Frankia solo infectan a ciertos hospederos por lo que se habla de especificidad de grupo. ( 11 )

Rodríguez-Barrueco en 1979 define varios grupos de hospederos en tanto que Jiabin y colaboradores 1985, proponen solo dos grupos principales Alnus y Elaeagnus . ( 13 ) . Sin embargo se ha observado que ciertas cepas aisladas de un hospedero son incapaces de reinfectar al hospedero del que derivan. Estos resultados indican la necesidad de efectuar mas estudios para caracterizar a Frankia y elucidar la naturaleza de su especificidad con el hospedero. ( 11 )

De este modo en adición a los ensayos biológicos de inoculación o pruebas de infectividad para la caracterización de Frankia se han introducido otros análisis. Baker y colaboradores en 1981 con base en los resultados obtenidos mediante técnicas de inmunodifusión, describen dos serogrupos de Frankia . Chaboud en 1983 estableció patrones de enlaces con lectinas que también permitieron diferenciar a

Frankia en dos grupos e indica que estas diferencias están dadas porque la composición y estructura de la pared celular de Frankia aislada de Alnus es diferente a la de las cepas aisladas de Eleagnus, lo que se traduce en la especificidad de grupo y compatibilidad con hospederos determinados (- 13.)

Esto ha sido comprobado por estudios de homología de ADN; por electroforesis en gel de poliacrilamida en donde se han establecido diferencias protéicas (mencionado en 13).

Estudios mas recientes sobre la composición de la pared celular de Frankia, evidenciaron la presencia de seis azúcares, de estos la 2-O metil-D-manosa se encontró de manera constante en todas las cepas de Frankia, pero la concentración de ésta, es mayor en las cepas del grupo de Eleagnus que en la de Alnus reconociéndose especificidad para estos dos grupos. En tanto que las cepas aisladas de Myrica gale fueron consideradas como pertenecientes a un grupo diferente debido a que tienen la capacidad de infectar a ambos grupos y recomiendan mas investigación sobre las cepas aisladas de otros hospederos como Casuarina, Dryas y otras las que son capaces de infectar a hospederos diferentes a aquellos de los que fueron aislados "inoculación cruzada" ( 13 )

Por otra parte es importante mencionar que en un mismo nódulo se ha descrito la presencia de mas de un tipo de cepa de Frankia. ( 20 )

## 2.7. Distribución de vegetales actinorrhizales.

La mayoría de los vegetales actinorrhizales constituyen la vegetación pionera de diversas áreas. Soportan condiciones extremas y son capaces de desarrollarse directamente sobre rocas volcánicas, en suelos inmaduros, desarrollados y aún en los altamente degradados o sobre desechos de minas, toleran deficiencias de nitrógeno en el suelo. Su habitat es variado y se encuentran en bosques conservados o perturbados así como en matorrales xerófitos.

La mayoría de los géneros se localizan en áreas templadas y algunos como Dryas y Arcotostaphylos aparecen en áreas circumpolares. En los trópicos se ha reportado a Coriaria en Nueva Guinea y Perú, Cercocarpus en México y Alnus en Perú. Casuarina se extiende por el trópico oeste del pacífico con una especie C. equisetifolia siendo naturalmente distribuida a través del área costera del oceano Indico. Varios de los géneros por ej: Coriaria y Discaria poseen amplia distribución mientras que otros están más restringidos a áreas templadas.

La distribución de los vegetales actinorrhizos contrasta grandemente con la distribución de las leguminosas que es esencialmente tropical. En países con altas latitudes tales como Escandinavia, Canadá y Nueva Zelanda donde las leguminosas están ausentes o existen en forma insignificante, - los vegetales actinorrhizos son ecológicamente mas significantes y más eficientes. Así las plantas no leguminosas en virtud de su amplitud ecológica y su amplio rango de temperaturas, contribuyen enormemente a la economía del nitrógeno de las áreas naturales especialmente en las áreas en donde la temperatura restringe el desarrollo de las leguminosas.

## 2.7.1. Ecosistema natural

### 2.7.1.1. Alnus

Se conocen 33 especies noduladas y este es el género diazotrófico mas importante en ecosistemas naturales y manipulados ( 5 ) . Se localiza en regiones cálidas del hemisferio norte y crece naturalmente en un amplio rango de habitats, y constituye la planta actinorrhiza de mayor importancia en los bosques templados. Los alisos son normalmente bien nodulados, lo cual indica que el endófito debe tener una amplia distribución.

Finlandia tiene dos especies nativas de alisos, Alnus inca-

na (Aliso gris) y Alnus glutinosa (Aliso negro), las cuales tienen diferente distribución. Alnus incana es un árbol pequeño distribuido por todo el país a 70° N, florece sobre suelos secos, especialmente en bosques anteriormente quemados y en las orillas del campo. Alnus glutinosa crece sobre tierras húmedas minerotrópicas tales como orillas de mar y lagos, y en pantanos ( 34 ) , en Inglaterra crece naturalmente en áreas húmedas.

Alnus crispa se desarrolla en suelos pobres, arena de colina y laderas desgastadas. Alnus seiboldiana pionera en lava volcánica y cenizas en Japón. Alnus rubra crece sobre ladera desgastada, aluvión y montañas húmedas. Alnus rugosa adyacente a cursos de agua y en pantanos y tierras húmedas en Montreal Canadá. Alnus tenuifolia crece a un lado del lago en California. Alnus viridis arbusto alpino de Europa Central. (Ver. mapa 1). ( 5 )

#### 2.7.1.2. Casuarina

Se conocen aproximadamente 43 especies noduladas, este género se distribuye naturalmente en Australia, en el sureste de Asia, el oeste tropical del Pacífico y bordeando el océano Índico ( Ver mapa 1), aparece desde bosques tropicales a bosques áridos, dunas costeras, pantanos, en áreas del interior del país sujetas a sequías periódicas y en tierras altas de Nueva Guinea. ( 22 )

Con objeto de emplearla como leña, Casuarina es plantada artificialmente en áreas relativamente áridas y aunque su establecimiento es difícil termina por adaptarse al medio ambiente, Casuarina ha sido descrita como una de las especies más resistentes a las sequías siendo apropiada para plantaciones en desiertos y se emplea también en la reforestación en zonas tropicales. En virtud de la amplia variedad de condiciones ecológicas en las que se desarrolla se considera como uno de los 13 géneros críticos en Sarawak Borneo.

El tamaño del árbol de Casuarina es de 12-15 m, aunque ha habido casos de árboles de hasta 35 m y circunferencia de 1.65 m.

#### 2.7.1.3. Coriaria

El género está ampliamente distribuido y se encuentra principalmente en zonas cálidas hacia el norte y hacia el sur, se conocen al menos 13 especies noduladas, Coriaria crece sobre suelos pobres, arenosos y con cascajos; en tierras bajas y subalpinas y también sobre arcilla. C. myrtifolia produce en España suelos fértiles y contribuye a la productividad. En Nueva Zelanda se emplea para reforestar estableciéndose en aluviones y morenas. Coriaria arborea se introdujo en la montaña Tarawera, la cual fue devastada por erupción volcánica en 1886, constituye la primera espe

cie arbolada que reinvasió la zona lo cual se convirtió en una importante vegetación de arbustos de áreas húmedas (ver mapa 2).

#### 2.7.1.4. Ceanothus

Ceanothus (matorral de nieve) comprende 55 especies, todas nativas de norte América, de las cuales 31 han sido reportadas como noduladas. Este género es el más importante en el Oeste de E.U. apareciendo prácticamente asociado con todo tipo de vegetación en California. Es el arbusto mas importante en zona subalpina y chaparral seco. Despues de un incendio, las semillas que pueden estar latentes por cientos de años, son estimuladas a germinar por el calor y la lluvia. Arriba de 400 000 arbolillos/ ha pueden estar presentes en el primer año despues de cortes e incendios resultando árboles achaparrados que proveen buena protección tanto a árboles naturales como plantados.

Sobre suelos deficientes de nitrógeno C. integerrimus nodula creciendo 9 veces más que las plantas sin nódulos. La materia aerea de Ceanothus es baja en nitrógeno total, la estimulación del crecimiento reportada en respuesta para materia aerea de Ceanothus fué hecha sobre suelos de contenido excepcionalmente bajo de nitrógeno ( 0.002-0.009 %), mientras que no hubo respuesta para materia aerea de Ceanothus que fuera registrada sobre suelos con alto contenido

de nitrógeno (ver mapa 2)

#### 2.7.1.5. Cercocarpus

Cercocarpus esta limitado al oeste de E.U. y México, generalmente se encuentra a altas latitudes (ver mapa 3). Los nódulos de raíz han sido reportados en tres de las veinte especies conocidas.

Las especies de Cercocarpus son más prósperas sobre suelos bajos en fertilidad y esto se atribuye a que simultánea a la infección de Frankia existen micorrizas ectotróficas.

#### 2.7.1.6. Elaeagnus

Aunque Elaeagnus fué una de las primeras plantas actinorríficas estudiadas, se conoce poco de su significado ecológico. Existe un gran número de especies noduladas.

E. commutata es una planta importante en la flora nativa de Manitoba donde aparece en habitats alterados tales como laderas erosionadas. Elaeagnus estimula el crecimiento de especies herbáceas, tanto E. commutata y E. angustifolia son muy abundantes en muchos lugares de norteamérica.

En Japón, E. umbellata es usada para estabilizar las dunas, y en Europa E. angustifolia ( una de las especies mas resistentes a la sal), es recomendada para la estabilización

de las dunas, después de ser fijada la duna por Hippophae. E. angustifolia y E. orientalis se reconocen tanto tolerantes a la sal como a la sequía (ver mapa 3)

#### 2.7.1.7. Purshia

Hay dos especies noduladas y en estudios con  $^{15}N_2$  se ha confirmado que son fijadoras de nitrógeno. El género esta restringido a los estados del oeste de norte america (ver mapa 4) en donde cubren un total de 121 000 000 ha. P. tridentata aparece por todo el bosque y Pinus ponderosa y sobre suelos pumíticos en zonas de desagüe y suelos arenosos.

Las dos especies no han sido bien definidas y P. tridentata forma un híbrido con Cowania mexicana.

#### 2.7.1.8. Hippophae

Hippophae rhamnoides es la unica especie nodulada registrada y está ampliamente distribuida en la costa oeste de Europa y Escandinavia, en Europa oriental, y en Asia generalmente al norte de los  $10^{\circ}C$  isoterma de Enero (ver mapa 4) sobre arena, suelos calcáreos y dunas costeras. La nodulación solo aparece en suelos neutros o alcalinos a un pH óptimo de 6.8 - 7.0 . La nodulación disminuye con la edad de la planta.

Hippophae da lugar a poblaciones densas impenetrables por exparcimiento del vegetal y estimula el crecimiento de otros vegetales. En Rusia, la reforestación de las cuencas secas de lagos han sido posibles por la plantación de Hippophae y Elaeagnus, Hippophae también ha sido utilizada para control de la erosión en las costas de este país.

Estudios sobre dunas costeras en Francia muestran que la mayoría del nitrógeno mineral es concentrado bajo Hippophae.

#### 2.7.1.9. Discaria

El género está distribuido en el sur, en áreas cálidas (ver mapa 5). D. toumatou es la única especie nodulada conocida. Discaria en Nueva Zelanda crece sobre aluvión, grava y en tierras secas.

El género es importante en la sucesión y estabilización, y se desarrolla de manera sobresaliente en las pendientes de las Islas del sur. En Nueva Zelanda se ha determinado la importancia ecológica o económica.

#### 2.7.1.10. Sheperdia

Las tres especies de Sheperdia noduladas están confinadas a norte América, se encuentran a lo largo de arroyos, cerca de ríos en asociación con Alnus rugosa, y a menudo constituye la vegetación de sitios pobres o secos en Manitoba.

S. canadiensis es común sobre suelos arenosos y sobre laderas erosionadas, y es abundante sobre sitios pobres siendo un excelente indicador de especie de suelos con bajo nitrógeno, la nodulación en el campo es reportada como variable, siendo mejor en suelos arenosos.

Hasta el momento no se conoce nada de la contribución de esta planta a la economía del nitrógeno en ecosistemas naturales. S. canadensis esta ampliamente distribuida en Alaska. (ver mapa 5)

#### 2.7.1.11. Myrica

Myrica tiene su distribución central en Africa y esta ampliamente distribuida en Europa, Asia y America; 18 especies noduladas han sido reportadas.

Myrica gale es la mejor adaptada a condiciones ácidas, en pantanos, aparece alrededor de muchos lagos ingleses en el Sur de Africa. Las especies de Myrica crecen como árboles pequeños, por ejemplo: M. pululifera y M. rubra ambas especies son los arbustos más pequeños que aparecen a lo largo de las orillas de arroyos o sobre pendientes en montañas. En Florida, M. cerifera actua como pionera natural para el bosque de Pinus y en Indonesia, M. javanica es un activo colonizador de suelos expuestos al fuego o a la actividad volcánica.

M. asplenifolia es la única planta capaz de colonizar minas en Pensilvania, en las cuales hay deficiencia de nitrógeno, alta temperatura en la superficie y bajo pH que evita el crecimiento de plantas incluyendo las leguminosas (ver mapa 5). ( 5 )

México cuenta con un buen número de plantas que se han descrito en otros países como actinorrícicos y en la tabla 3 se indican los géneros que se han estudiado, así como aquellos en los que se determinó infección por Frankia y hongos formadores de ectomicorrizas y endomicorrizas.

Tabla 3 . Plantas actinorrícicas mexicanas; su habitat y estado simbiótico

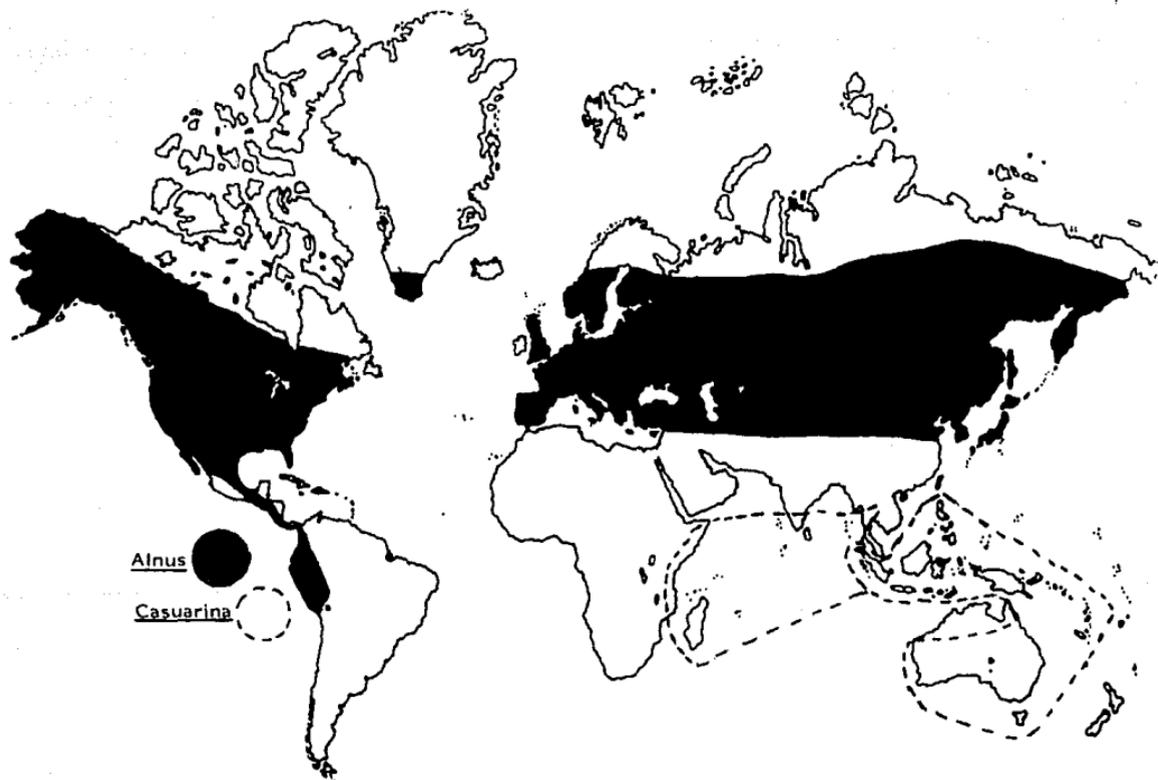
| planta   | habitat  | nódulos | Micorriza<br>ecto | VA |
|--|--|---------|-------------------|----|
| <u>Adolphia infesta</u>                            | matorrales xerófilos<br>espinosos  | *       |                   | +  |
| <u>Alnus acuminata</u><br>ssp <u>arguta</u>        | no específico: bosque<br>de pino, pino-encino,<br>conservado o con dis-<br>turbio, orilla de<br>arroyos. | +       | +                 | +  |
| <u>Alnus acuminata</u><br>ssp <u>glabrata</u>      | ripario, cultivado en<br>bordes de canales,<br>áreas urbanas.  | +       | +                 | +  |
| <u>Alnus jorullensis</u><br>ssp <u>jorullensis</u> | bosque de pino-encino  | +       | +                 |    |
| <u>Alnus jorullensis</u><br>ssp <u>lutea</u>       | bosque templado húme-<br>do de pino y oyamel   | +       | +                 | +  |

|  |   |   |   |   |
|--|---|---|---|---|
| <u>Casuarina cunnin-</u><br><u>ghamiana</u>                        | especie introducida.<br>Amplia distribución<br>en ambientes degra-<br>dados.  | * |   | + |
| <u>Casuarina equise-</u><br><u>tifolia</u>                         | idem, además en dunas   | * |   | + |
| <u>Ceanothus buxii-</u><br><u>folius</u>                           | bosque de pino y de<br>pino-encino  | + | + | + |
| <u>Ceanothus coe -</u><br><u>ruleus</u>                            | bosque de encino, en<br>cino-pino, conserva-<br>dos o perturbados.  | + | + | + |
| <u>Cercocarpus mycro-</u><br><u>phyllus</u>                        | bosque de pino, pino-<br>encino y oyamel  | - |   | + |
| <u>Coriaria ruscifo-</u><br><u>lia ssp mycro-</u><br><u>phylla</u> | bosque templado húme-<br>do de pino-encino ,<br>y en lugares altamente<br>perturbados como<br>taludes de camino,<br>canteras, deshechos<br>de mina. | + | + | + |
| <u>Cowania mexicana</u>  | matorral xerófilo   | - |   | + |
| <u>Myrica cerifera</u>   | bosque de pino en de-<br>rrames de lava basál-<br>tica.   | + |   | + |
| <u>Rubus liebmanii</u>   | bosques templados,<br>favorecido en áreas<br>altamente perturbadas.   | - |   | + |

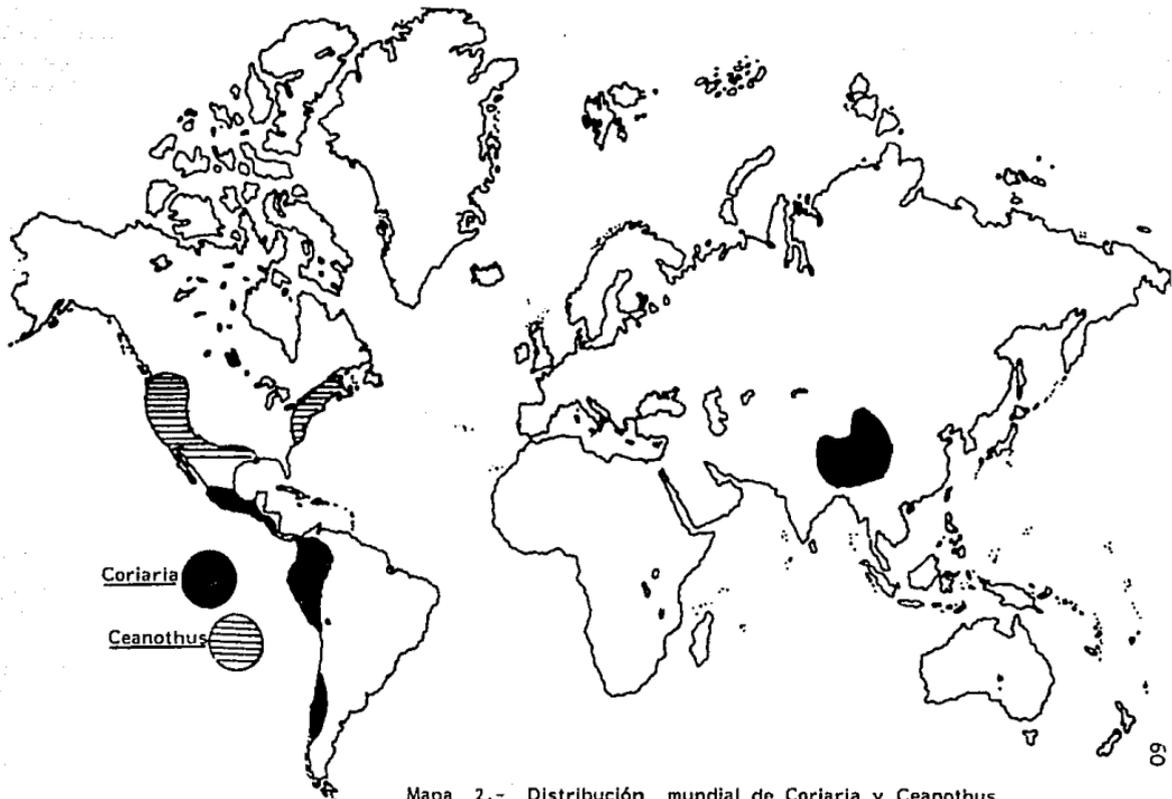
+ = nódulos presentes en casi todos los ejemplares examinados

\* = nódulos presentes en pocos de los ejemplares examinados

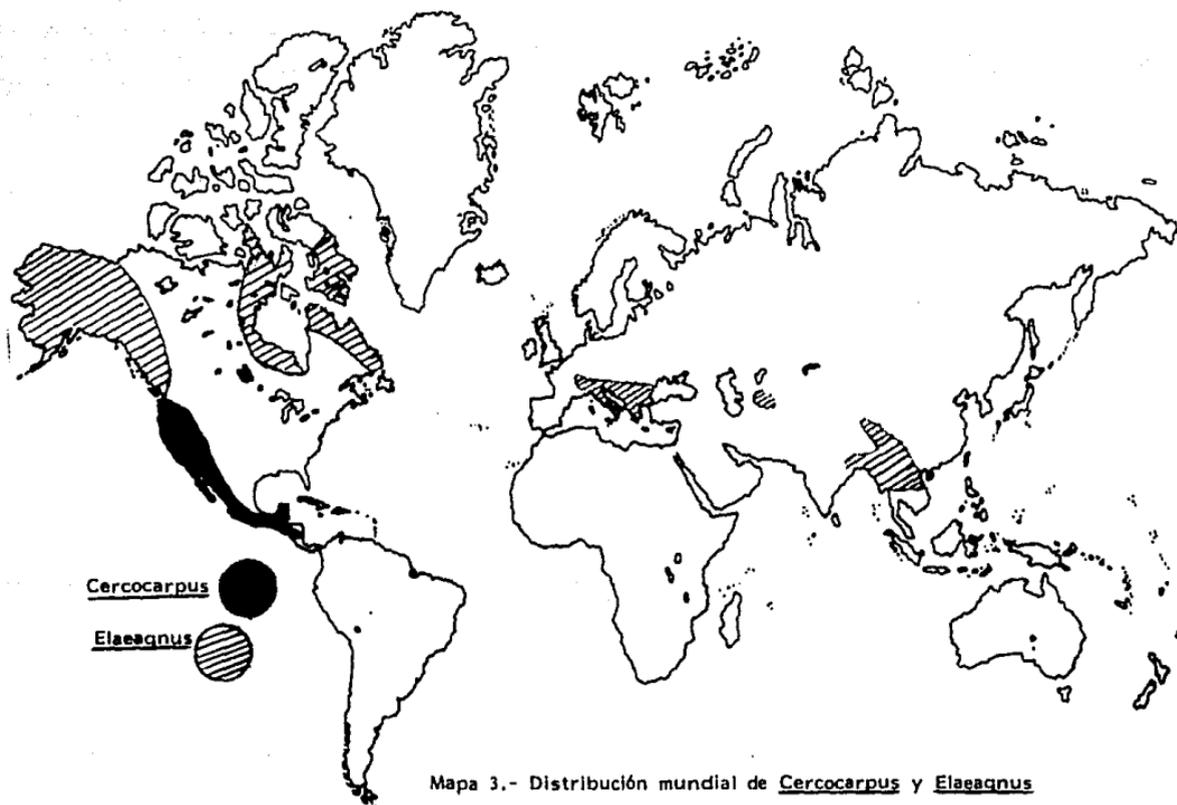
- = nódulos ausentes en todos los ejemplares examinados.

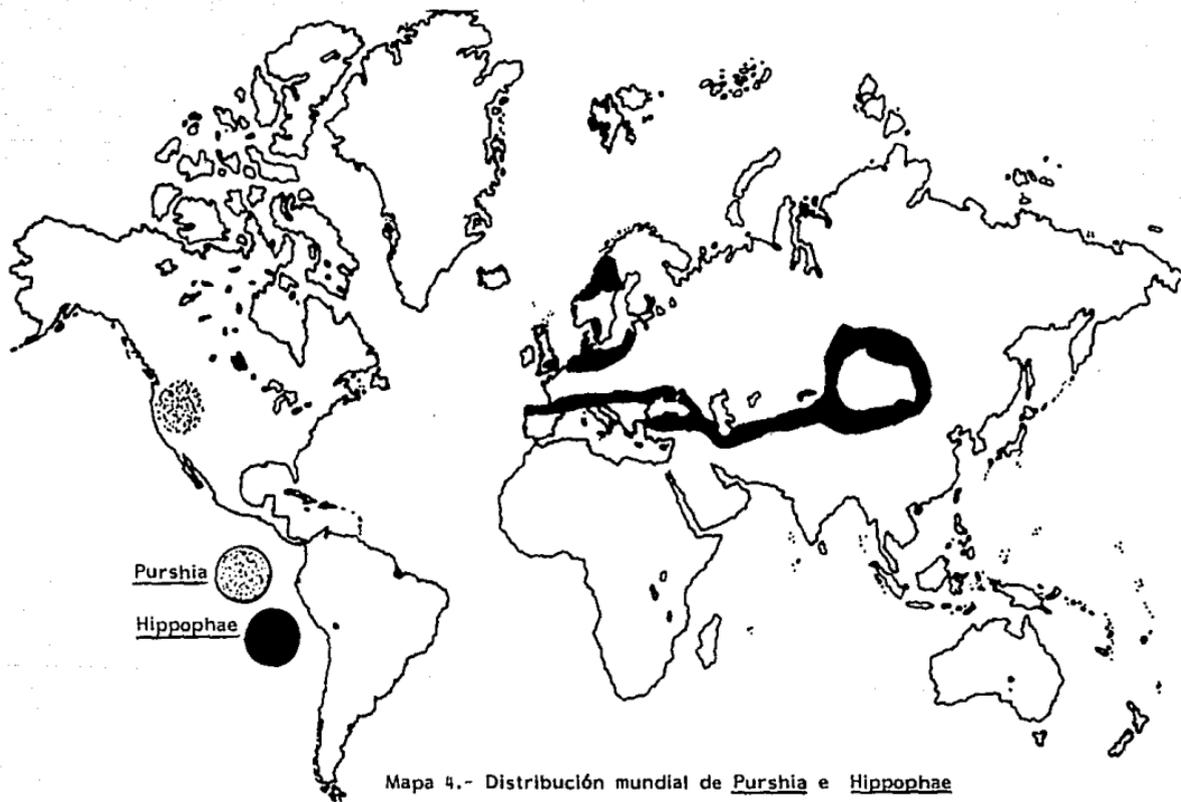


Mapa 1.- Distribución mundial de *Alnus* y *Casuarina*

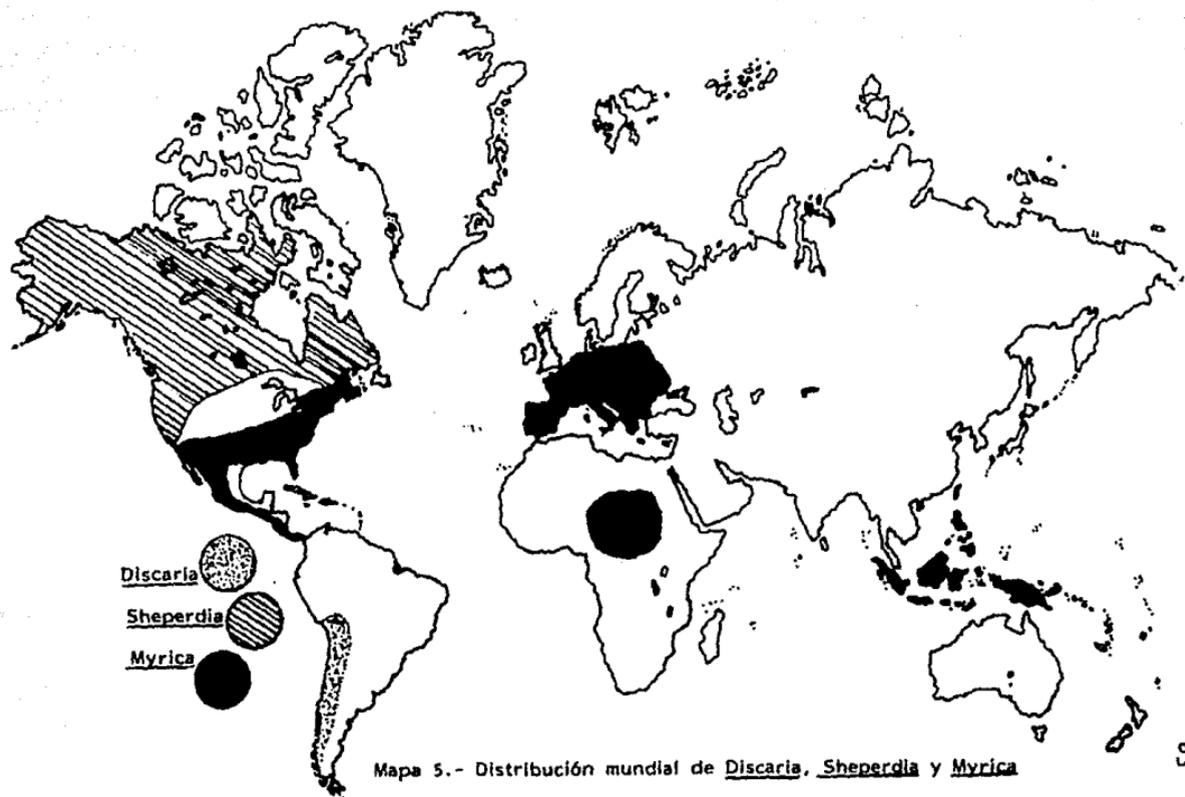


Mapa 2.- Distribución mundial de Coriaria y Ceanothus





Mapa 4.- Distribución mundial de Purshia e Hippophae



La distribución de las plantas actinorrhizas en el Valle de México está fuertemente influida por las actividades humanas que modifican el habitat restringiendo o favoreciendo la presencia de los mismos.

Algunos géneros apenas resisten la desforestación del Valle de México, por lo que su presencia está confinada a pequeñas fracciones de bosque perturbado y se encuentran en número limitado, tal es el caso de Alnus lorullensis, A acuminata y las dos especies de Ceanothus.

A acuminata ha sido favorecida por la construcción de canales de riego y Coriaria prospera abundantemente en lugares donde el suelo ha sido removido como en los taludes, de carreteras y canteras.

Los nódulos reportados varían en su morfología pudiendo ser redondos, coraloides o en abanico. Su tamaño oscila de 0.5 a 16 cm de diámetro. Registrándose la mayor nodulación en A a argieta y la menor en Adolphia ( 33 )

## 2.8. Utilización de los vegetales actinorrhizos.

La mayor contribución es proporcionada por las especies de Alnus y en particular A. rubra (aliso rojo) la cual aparece sobre la costa del pacífico en norte América. En análisis

recientes es estimada una cantidad arriba del 60% de toda la madera dura comerciable de Oregon, Washington y Columbia British. A rubra en contraste a las coníferas ocupa sitios pobres y Aluvial. Sobre sitios equivalentes, A rubra puede producir de 50 a 75% tanto como las coníferas, los árboles alcanzan de 30-35 m en 50 años con un diámetro de 0.6 m y son usados para fabricación de muebles, como madera de construcción y revestimiento, el mayor uso sin embargo es como pulpa de madera donde comunmente es mezclado con pulpa de coníferas para la producción de tejido de alta calidad.

Casuarina es la otra especie que crece en cantidades suficientemente grandes para producir madera de construcción, siendo excepcionalmente fuerte y durable. Es ampliamente usada en el sudeste de Asia para estacas y vigas, por ejem: C. sumatrana y C. rumphiana son usadas para ruedas y mástil. Casuarina es también conocida por ser la mejor leña del mundo, con un contenido de energía de 19.6 KJ/g. C. equisetifolia es nativa de la costa de la India y ha sido planta da tierra adentro en cantidades comerciales desde 1868 para proveer combustible a las aldeas locales. La velocidad de crecimiento es excelente sobre suelos pobres, pedregosos o arenosos tanto cerca de la costa como tierra adentro en Ceylon, donde Holme registra una altura media de 4.5 m des pues de 2 años y una producción total de 70 m / ha despues de 8 años.

El valor nutricional de plantas no leguminosas es bajo sin embargo se ha reportado para uso tanto humano como para ganado. Las frutas de Hippophae tienen un alto contenido de aceite y vitamina "C", han sido usadas para suplementar la dieta humana y un programa de crianza esta en marcha en el norte de Europa. Similarmente las frutas de Shepherdia, Arctostaphylos y Elaeagnus son comidas por muchas tribus indigenas. Las frutas de Cycas y Macrozamia son venenosas pero despues de remojarse en agua se vuelven comestibles. El tallo de Cycas produce sagu comestible en cantidades comerciales.

Phursia es la unica comida natural capaz de sostener a un venado enjaulado por largos periodos.

Coriaria y Cycas son de interés ya que son venenosas y han sido responsables de la pérdida de ganado, en Cycas el principio activo es el glucósido tóxico pakoenin.

Algunos géneros tales como Ceanothus, Alnus, Arctostaphylos y Myrica son empleados en diferentes regiones como astringentes, eméticos, estimulantes e hipnóticos. Otros usos incluyen producción de cera de muchas especies de Myrica. ( 5 )

2.9. Metodología para el aislamiento, propagación, conservación e inoculación de Frankia y aislamiento de vesículas.

#### 2.9.1. Aislamiento de Frankia

A partir de los resultados obtenidos por el grupo de Torrey en 1978, quienes lograron aislar por primera vez a Frankia y cultivarla in vitro, la información sobre estos aspectos se ha incrementado.

La dificultad que presenta su aislamiento fué atribuida a la presencia de compuestos fenólicos en las células del hospedero, los que en el momento de efectuar la maceración de los nódulos eran vertidos al exterior de las células y al quedar en la suspensión ejercían su acción bactericida sobre el endófito. Este problema fué resuelto mediante la adición de polivinil piruvato. (18 )

La metodología para efectuar el aislamiento involucra:

- Recolección de nódulos sanos
- Lavado con agua abundante y posterior secado mediante su colocación sobre papel filtro.
- Desinfección superficial de los mismos mediante tratamientos con cloramina T al 1% (Diem y colaboradores

1982) o hipoclorito de sodio al 30% (Benson 1982).

- Eliminación de agentes desinfectantes mediante lavado con abundante agua estéril.
- Liberación del endófito para lo cual en condiciones asepticas se secciona el nódulo y se toma con el asa una muestra de la parte interna transfiriendose al medio de cultivo.

Una forma más frecuente corresponde a la maceración de los nódulos, los que se mezclan con arena estéril, se trituran en mortero, se diluyen en agua y se homogenizan. Las partículas gruesas se eliminan mediante la utilización de filtros con poros de diámetro conocido y el filtrado puede ser conservado por congelación o inoculando en diferentes medios de cultivo ( 27 y 24 )

Otra modalidad corresponde a la inoculación directa del nódulo íntegro y previamente desinfectado en un caldo nutritivo y despues de confirmar la ausencia de desarrollo de contaminantes se procede a la maceración del nódulo en el mismo caldo para la propagación del actinomiceto.

#### 2.9.2. Propagación de Frankia

Para la propagación de Frankia el medio de cultivo más empleado es el descrito por Murry y colaboradores 1984 al que se conoce como BAP, este contiene 10mM de piruvato de

sodio y 5mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . ( 37 y 38 ). Se han obtenido buenos resultados sustituyendo la fuente de carbono por propionato, succinato, manitol o fructosa. Estas variaciones se han hecho en función de las diferentes cepas empleadas por ejemplo: Frankia NPI 0136010 utiliza como fuente de carbono propionato o acetato y es incapaz de usar hexosas, pentosas disacáridos y trisacáridos ( 23 ) . Así mismo se introducen modificaciones a los medios de cultivo dependiendo del objetivo del estudio.

Tisa y Ensign que utilizaron un medio de crecimiento basal que contiene 20 mM MOPS (ác. morfolino propanol sulfónico) y 10 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Buffer MP), pH 6.5, los constituyentes siguientes fueron esterilizados por separado y añadidos al Buffer MP a las concentraciones finales indicadas: 10 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 2.0 mM  $\text{MgSO}_4$ , 20  $\mu\text{M}$  de  $\text{FeCl}_3$  disueltos en 100  $\mu\text{M}$  de ácido nitrilo acético y 1.0 mM de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 1 ml de muestra de la mezcla de trazas de sal fue añadida por litro de medio, ésta mezcla contiene (en gramos por litro): 5.0  $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.25  $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 0.2  $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ , 0.5  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 1.0  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  y 10.0  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ .

Para determinar la formación de vesículas y actividad de la nitrogenasa se recomienda el medio B (Murry y colaboradoras) que es idéntico al medio BAP pero carente de nitrógeno combinado. ( 31 )

Un aspecto de interés es el referente a que el extracto de levadura dificulta el aislamiento de Frankia ( 37 )

Las condiciones de cultivo varían para cepas aisladas de diferentes hospederos, fluctuando, la temperatura de 25° a 33° C y el pH de 6.0 a 7.0. Este organismo se desarrolla en condiciones estáticas y de agitación ( 3 )

Lo anterior indica que el aislamiento de Frankia de diferente origen implica la utilización de medios y condiciones de cultivo variables. Cuando se cultiva a Frankia en un medio BAP, en periodos tempranos se observa crecimiento filamentoso y excelentes velocidades de crecimiento; estas fueron mejoradas al usar volúmenes grandes de cultivo, agitación y aireación. Las condiciones óptimas son pH 6.3 y 33° C con los que se registró el máximo desarrollo a las 24 h.

Cuando las células de Frankia se transfieren al medio B se observa la aparición de vesículas en pocos días las cuales aumentan en número progresivamente. En el medio B la cepa HFPCcI<sub>3</sub> da lugar a la formación de abundantes esporangios y a la formación de vesículas.

Experimentos para determinar las condiciones más favorables de cultivo para crecimiento de Frankia HFPCcI<sub>3</sub> fueron con-

ducidos en cultivos en Batch, primero con un medio complejo y después con un medio definido, ensayos tempranos con dichos medios como M6B (Baker y Torrey 1979), QMOD (Lalonde y Calvert 1979) y un medio complejo similar (cf. Baker y Torrey 1980) fallaron para producir un rápido crecimiento y el crecimiento vegetativo filamentososo fué frecuentemente anormal.

Zhang y Torrey (1985) usaron el medio QMOD, un medio que contiene componentes orgánicos nitrogenados y lípidos. (37, 14, 38 y 32).

### 2.9.3. Conservación de Frankia

Para la conservación de Frankia CpI<sub>1</sub> aislada de Comptonia peregrina, Noridge recomienda la propagación en medio líquido con la siguiente composición: (por litro de agua deionizada): 5g de succinato de sodio, 0.1g de CaCl<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O, 0.2g de MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.43g de NH<sub>4</sub>Cl, 6.8g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 0.5 ml de solución de fierro-EDTA consistente en 10 mg de FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O (por ml); 2 mg de EDTA y 0.15mg de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> y pH de 6.5. 200 ml de cultivo en matraces Erlenmeyer de 500 ml, incubación durante 3 días a 30° C con movimiento rotatorio a 200 rpm, cosechar las células y colocarlas en un homogenizador de tejidos tipo Dounce para dispersar los agregados de hifas, que se usarán en otros experimentos o para establecer nuevos cultivos.

Para un almacenamiento prolongado de cultivos, las células de Frankia se cosechan en la fase exponencial y se suspenden en glicerol ajustando la concentración final a 10 % (peso/vol). La suspensión se enfría en un baño de hielo por 15 min y en tubos estériles se concentran las células por centrifugación, se congelan a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 2 a 4 h para después almacenar a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Bajo estas condiciones las células permanecen viables por más de 1 año ( 17 )

#### 2.9.4. Inoculación de Frankia

La inoculación se efectúa en plántulos cultivados en invernadero bajo condiciones controladas. Los soportes que se emplean para el desarrollo de los diferentes hospederos pueden ser: Vermiculita, Agrolita, Perlita y arena de río; la solución nutritiva más frecuentemente reportada corresponde a la solución de Crone's ( 31 ) . Cuando las plántulas tienen un tamaño aproximado de 12.5 cm y suficiente raíz, ésta se inocula mediante la adición de un volumen conocido en la parte superior del sistema radicular de cada planta, los arbolillos o plántulas infectados son entonces empleados para evaluar el efecto del inoculante por diferentes métodos o bien se emplean directamente en prácticas de reforestación.

El inóculo se prepara a partir de un macerado fresco de nodulos o bien se emplea un cultivo masivo joven o bien de

un concentrado de células conservadas en refrigeración en este último caso las células se suspenden en una dilución 1:100. La concentración del inóculo es difícil de estandarizar debido a que se trabaja con microorganismos filamentosos por lo que la proporción de células por ml de inóculo es variable. ( 7, 26 y 27 )

En el caso de inóculo procedente de macerados la cantidad de inóculo se expresa como gramos de nódulo por ml de la suspensión a ser empleada como inóculo.

#### 2.9.5. Metodología para el aislamiento de vesículas

En virtud de que la actividad de la nitrogenasa se ha detectado en las vesículas a continuación se exponen los métodos descritos para efectuar el aislamiento de vesículas a partir de nódulos, la inducción de vesículas in vitro y la metodología para su aislamiento y evaluación de la nitrogenasa.

Grupos de vesículas de Frankia fueron aislados de nódulos de raíces de diversas plantas no leguminosas.

- Inducción de vesículas.- Para inducir el desarrollo de vesículas y la actividad de nitrogenasa, las células fueron cosechadas después de 14 días de crecimiento en un medio que contiene 5.0 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y fueron lavadas 3 veces con un Buffer que contiene 20 mM de ácido morfolinopropanosul-

fonico (MOFS) y 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a un pH 6.8. Las células lavadas fueron inoculadas dentro del medio de crecimiento carente de una fuente de nitrógeno combinado e incubadas por 4 días a 25° C. El medio de crecimiento contiene 20mM de fructosa o succinato como fuente de carbono.

Para aislar las vesículas es necesario hacerlo en un medio anaerobio, para esto los viales fueron sellados con tapones de neopreno y los tubos de centrifuga fueron sellados con una tapa de goma. Los tubos, Buffers y soluciones fueron regados con nitrógeno gaseoso por 15 min antes de sellarse. El recipiente sellado fué vaciado y regasificado con argón varias veces. Los gases usados fueron purificados pasando-los sobre un catalizador de cobre calentado a 180° C y en algunos casos al Buffer y a otras soluciones se les agregó anaerobicamente 1.0 mM de ditionato de sodio asegurando con esto protección contra la exposición a oxígeno. Para transferir las soluciones se utilizaron jeringas que fueron previamente regadas varias veces con argón o enjuagadas con un Buffer anaeróbico conteniendo ditionato de sodio. ( 32 )

#### 2.9.5.1. Método de presión de French.

Después de una cosecha de células frescas o congeladas se situaron bajo una atmósfera de argón lavandose dos veces con 25 mM de tris Cloruro de hidrógeno- manitol 0.5M-10 mM de Buffer ditionato de sodio, pH 7.4 (Buffer TMD), a 20° C.

Las células se pasaron a través de una presión de células de French de 10 000 a 12 000 lb/in<sup>2</sup> a 4° C, bajo una atmósfera de argón. La examinación microscópica revela separación casi completa del micelio, sin un daño aparente a las vesículas. La suspensión celular con vesículas fué centrifugada a 6000 x g por 5 min a 20° C. La fracción sedimentada contiene todas las vesículas y algunos residuos celulares por lo que con varias lavadas las vesículas estarán completamente libres de residuos celulares y micelio. ( 32 )

#### 2.9.5.2. Método de digestión con lisosima.

Después de una cosecha de células se lavan dos veces bajo condiciones anaeróbicas con Buffer TMD, se resuspenden en el mismo Buffer con 125 µg de lisosima por ml, incubándose en un cuarto de temperatura por 3 h.

#### 2.9.5.3. Método de separación sónica

Las células fueron lavadas dos veces en condiciones anaeróbicas con Buffer TMD y separadas por sonicación por 3 a 5 min bajo una corriente constante de gas nitrógeno, se utilizó un Sonifer modelo Braun 350. ( 32 )

#### 2.9.5.4. Método de densidad de centrifugación en un paso de gradiente con sacarosa.

La solución de sacarosa fué hecha en medio (pH 6.5) conteniendo por litro: 5g de succinato de sodio, 0.1g de CaCl<sub>2</sub>

0.2g de  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ , 5 mg de  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1 mg de EDTA, 0.075 mg de  $Na_2MoO_4$  y 1.36g de  $KH_2PO_4$ .

Las células se colectaron sobre papel filtro por filtración en vacío, fueron removidas y colectadas en tubos de centrifuga de 50 ml. Las células fueron suspendidas en 20ml de 50% (peso/vol) de sacarosa y homogenizadas por 5 min con un homogenizador de tejidos Polytron, para liberar las vesículas de las hifas. Las muestras fueron removidas periódicamente y examinadas microscópicamente hasta que la mayoría de las vesículas estuvieran libres de las hifas. Esta suspensión fue transferida a tubos de ultracentrifuga, agregándose 10 ml de sacarosa 50%, esta suspensión celular fue dispersada con varillas de vidrio. Se sobreponen 5 ml de sacarosa 40% (peso/vol), los tubos fueron centrifugados a 100 000 x g a 20° C por 1 h. La banda de vesículas fue removida con pipeta Pasteur y después se transfiere en un medio de nitrógeno libre sin sacarosa, las vesículas se lavaron 3 veces con 15 ml de medio de nitrógeno libre por centrifugación a 20 000 x g por 10 min para remover el exceso de sacarosa. ( 17 )

Un método similar al anterior fue utilizado para separar grupos de vesículas de preparados de nódulos de raíces de A. incana, el procedimiento es de filtración-homogenización sin sacarosa, en este estudio se concluye que las vesículas

de Frankia aisladas por este método están suficientemente puras para ser usadas en los estudios de metabolismo de Frankia ( 10 ) . Las vesículas fueron contadas usando una cámara Petroff-Hausser con un microscopio de contraste de fase con una amplificación de 400 x. ( 38 y 32 )

De los métodos usados para aislar vesículas los mejores resultados fueron obtenidos por el método de presión celular de French con el cual se logra una separación completa de las vesículas sin presentar ningún daño.

## 2.10 Perspectivas de la inoculación con Frankia

Con objeto de potencializar la fijación de nitrógeno que se presenta en las plantas actinorrhizas, se han realizado diversos estudios en los que se pretende seleccionar a las cepas que establezcan simbiosis más eficientes con los diferentes vegetales. Los criterios adoptados corresponden a: especificidad. En relación a esta característica se han inoculado cepas aisladas de Alnus en hospederos de diferentes géneros observándose una mejor respuesta con la inoculación de cepas homólogas lo que ha conducido al establecimiento de dos grupos hospederos.

Reddell y Bowen en 1985 para demostrar la especificidad huesped-Frankia realizaron un estudio en el que emplearon

a Casuarina, Allocasuarina y Gymnostoma como hospederos y los inocularon con 38 cepas de Frankia aisladas de diferentes hospederos, sus resultados indican que se forma un mayor número de nódulos cuando las cepas procedían del aislamiento de hospederos del mismo género y que con cepas heterólogas se presentó en la minoría de los casos lo que confirma la especificidad intergenérica en la familia Casuarinaceae.

Otra observación corresponde a que algunas cepas de Frankia tienen un rango mas amplio de plantas huésped en tanto que otras solo son capaces de nodular en especies de un solo género. Esto último indica la necesidad de mayor investigación para elucidar la naturaleza de la especificidad ( 24 )

Otro aspecto de interés corresponde a las características de las cepas relacionadas con su capacidad para formar o no esporas, en este sentido la eficiencia para fijar nitrógeno ha sido correlacionada al tipo de esporulación de cepas (  $sp^+$  o  $sp^-$  ), siendo el tipo  $sp^-$  el mas eficiente (Normand y Lalonde 1982, Vandonbosch y Torrey 1984). Esto ha sido explicado como que la energía utilizada para la formación de esporas y propagación de la especie disminuye la eficiencia en la fijación de nitrógeno. Sin embargo se requiere de mas investigación en este aspecto debido a que

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

algunas cepas de Frankia que no esporulan en el interior de los nódulos al ser aisladas esporulan in vitro sin haberse determinado las causas que impiden la esporulación en la asociación.

Weber en 1986 estudio la distribución de nódulos sp (+) y sp (-) en A. incana y A. glutinosa, el muestreo lo realizo en diferentes ecosistemas de Finlandia, observando que A. glutinosa se distribuye predominantemente en suelos con alta humedad y en ella detectaron nódulos sp (-) en tanto que A. incana que se distribuye en suelos secos presenta nódulos sp (+) y concluye que el status del suelo o habitat de las 2 plantas hospederas determinan la infección por diferentes tipos de Frankia. Estos resultados coinciden con lo reportado para Alnus rugosa y M. gale que relacionan la cantidad de nódulos sp (+) y con pH ácido del suelo.

Redellt y Bowen indican al fósforo como un factor del suelo que limita no solo el desarrollo de las plantas si no tambien la nodulación y la fijación de nitrógeno en la familia Casuarinaceae, éste factor parece afectar más al género Casuarina que a Allocasuarina en donde la nodulación es mas irregular bajo las mismas características de suelo.

Rodriguez y colaboradores en 1988 indican que las cepas sp (+) no necesariamente forman esporas dentro de los nódulos

si no que ésta característica es influida por el huésped y las condiciones ambientales por tanto la característica de cepas que no esporulan no debe ser empleada como criterios de selección y consideran que para aclarar lo referente a compatibilidad o especificidad es necesario mejorar las técnicas de aislamiento y medios de propagación a fin de aclarar las siguientes dudas: 1.- ¿ Porqué una cepa que esporula en cultivo puro, no lo hace en asociación ?.

2.- ¿ Porque una cepa aislada de un género, es incapaz de reinfectar al mismo hospedero?.

3.- ¿ Como se explica la presencia de más de una cepa en el mismo nódulo o en la misma planta?.

Otra característica corresponde a la posibilidad de producir o no a la enzima hidrogenasa, reportándose cepas Hup<sup>+</sup> y Hup<sup>-</sup>. En relación a esto Sellested y colaboradores en 1984 indican que la captación de hidrógeno por las cepas Hup<sup>+</sup> puede ser también una característica importante en la eficiencia de la simbiosis.

Es importante mencionar que los factores ambientales influyen en la nodulación y fijación de nitrógeno, el nitrógeno ha recibido mayor atención debido a su capacidad para limitar la fijación de nitrógeno: altas concentraciones de nitrógeno combinado inhiben localmente la nodulación y afectan el metabolismo de toda la planta además de retardar su no-

dulación (Pizelle, 1966, Pizelle, 1984).

Sin embargo Mac Kay y colaboradores en 1987, establecieron un experimento con A. glutinosa, en él probaron una serie de arbolillos no inoculados a los que se adicionaron dosis crecientes de nitrógeno mineral (0, 2, 5, 10, 25 y 100% ), una segunda serie inoculada y a la que se le dió los mismos tratamientos de nitrógeno, los resultados indican que el crecimiento de plantas no inoculadas depende directamente del nitrógeno que se le suministró. Observándose que entre los 62 y 69 días despues de iniciar el experimento las plantas sin nitrógeno y no inoculadas mostraron un desarrollo escaso y una apariencia clorótica en tanto que el crecimiento de las plantas en los otros tratamientos fué directamente proporcional al nitrógeno añadido. Por otra parte en las plantas inoculadas se observó que en los tratamientos sin nitrógeno la actividad de la nitrogenasa evaluada por reducción de acetileno se inicio entre los 44 y 77 días y aumentó progresivamente hasta los 126 días. Respecto a los tratamientos con nitrógeno se observó una actividad de la nitrogenasa mayor y ésta fué detectada después de los 44 días observándose una estimulación por efecto de las dosis crecientes de nitrógeno mineral excepto en el tratamiento 100% en donde la actividad fué nula.

Los resultados demuestran que la adición de nitrógeno com-

binado acelera el establecimiento de fijación de nitrógeno en la simbiosis Alnus-Frankia.

Una conclusión más de este estudio corresponde a que las cepas de Frankia sp (-) son más eficientes que las cepas sp (+) lo que confirma los resultados expuestos por otros autores, (Normand y Lalonde, 1982; Sellstedt y colaboradores, 1986; Vandenbosch y Torrey, 1984; Vandenbosch y Torrey 1985). ( 6, 9, 34 )

## RESUMEN

La fijación biológica del nitrógeno llevada a cabo por microorganismos colonizadores de la Rizosfera es importante por contribuir a enriquecer el suelo de compuestos nitrogenados indispensables para las plantas, los cuales los necesitan para su crecimiento. Estos microorganismos pueden ser de vida libre o encontrarse asociados simbióticamente con plantas superiores, de éstos los más importantes son los segundos por contribuir con mayor cantidad de nitrógeno al suelo.

El microorganismo Frankia es una bacteria filamentosa del suelo que penetra, infecta y nodula plantas arbóreas no leguminosas conocidas como actinorrhizas (actino, por actinomycetos y rhizos, raíz), estas plantas son importantes por tener múltiples usos, tales como combustible de madera, madera de construcción, además de que algunas de ellas son frutales y otras son usadas como medicinales.

Este trabajo es una recopilación bibliográfica de 1986 a 1989 sobre la asociación de Frankia con las plantas actinorrhizas abarcando los aspectos morfológicos del microorganismo, el proceso de infección y metodología para llevar a cabo su aislamiento.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- 1.- La información consultada confirma la importancia del estudio y aplicación de esta simbiosis, la que repercute en la incorporación de nitrógeno atmosférico a formas asimilables y especialmente por la amplia distribución climática de los vegetales actinorríficos y debido a que tienen la capacidad de prosperar en condiciones adversas.
- 2.- Se requiere de mayor investigación sobre ésta asociación para establecer él o los mecanismos de reconocimiento e infección, así como de las condiciones en que se lleva a cabo el proceso de fijación de nitrógeno.
- 3.- El uso de inoculantes con Frankia ofrece una alternativa a mediano y largo plazo para recuperar suelos degradados. Para ello es necesario aclarar aspectos referentes a especificidad de los simbiosiontes así como de las condiciones que limitan o favorecen el establecimiento de la simbiosis.
- 4.- México cuenta con una gran variedad de climas y suelos, pero existe poca información sobre la distribución de plantas actinorríficas, las que probablemente existen en abundancia.
- 5.- Con base en lo anterior y de que en la República Mexicana

na se reporta la pérdida y degradación de grandes superficies de suelo, es recomendable hacer un inventario de la distribución de vegetales actinorríficos, investigar si éstos presentan nodulación y aplicar los resultados de otros países para efectuar el aislamiento e inoculación con cepas nativas a fin de fortalecer el potencial natural que ofrecen estos vegetales en el mantenimiento de la fertilidad y recuperación de suelos.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Burgess D. and R.L. Peterson. DEVELOPMENT OF Alnus japonica ROOT NODULES AFTER INOCULATION WITH Frankia STRAIN HFFAR<sub>13</sub>. Can J. Bot. 65(8): 1647-1657, 1987.
  
- 2.- Dommergues Y., B. Dreyfus, Hoan y Gia Diem y E. Duhoux FIJACION DE NITROGENO Y AGRICULTURA TROPICAL. Mundo científico. 5(45), Marzo. 1985.
  
- 3.- Edmands Janet, Nancy A. Noridge and David R. Benson. THE ACTINORHIZAL ROOT-NODULE SYMBIONT Frankia sp. STRAIN CpI<sub>1</sub> HAS TWO GLUTAMINE SYNTHETASES. Proc. Natl Acad Sci USA: 84(17): 6126-6130, 1987. Resumen Biol. Abst. 84(11) ref. 112187, December 1987.
  
- 4.- Gardes Monique, Jean Bousquet and Maurice Lalonde. ISOZIME VARIATION AMONG 40 Frankia STRAINS. Appl Environ Microbiol. 53(7): 1596-1603, 1987. Resumen Biol. Abst. 84(1) ref 72164, Oct. 1987.
  
- 5.- Hardy R.W.F, A.H. Gibson. A TREATISE ON DINITROGEN FIJACION. Section IV: Agronomy and Ecology. 141-171.
  
- 6.- Holman, Rosanne M and Christa R Schwintzer. DISTRIBUTION OF SPORE POSITIVE AND SPORE NEGATIVE NODULE OF Alnus

Incana ssp. Rugosa IN MAINE USA. Plant Soil. 104(1): 103-112, 1987.

7.- Huss-Danell, Kerstin. NITROGEN IN SHOOT LITTER, ROOT LITTER AND ROOT EXUDATES FROM NITROGEN-FIXING Alnus incana. Plant Soil 91(1): 43-50, 1986.

8.- Iqbal, M. MF Chaudhary and H. Chaudhary. ISOLATION OF FIVE Frankia STRAINS FROM ACTINORHIZAL NODULES OF casuarina glauca. Pak J. Bot. 18(2): 341.346, 1986. Resumen Biol. Abst. 84(1) ref. 10272 july 1987.

9.- Kashanskii, Catherine R and Christa R. Schwintzer. DISTRIBUTION OF SPORE POSITIVE AND SPORE NEGATIVE NODULE OF Myrica gale IN MAINE USA. Plant Soil. 104(11): 113-120, 1987.

10.- Kerstin Huss-Danell. PURITY OF Frankia PREPARATIONS FROM ROOT NODULES OF Alnus incana. Physiol Plant. 71(4) : 489-494, 1987.

11.- Kosuge, T y Nester E.W. (editores). CELLULAR ASPECTS OF ROOT NODULE ESTABLISHMENT IN Frankia SYMBIOSES. Molecular and Genetic Perspectives. 2: 194-213, 1987.

12.- Lancelle, Susan A, J.G Torrey, P.K. Hepler and D.A. Callahan. ULTRASTRUCTURE OF FREEZE SUBSTITUED Frankia STRA

IN  $HFFGcI_3$ , THE ACTINOMYCETE ISOLATED FROM ROOT NODULE OF Casuarina cunninghamiana. Protoplasma. 127(1/2): 74-72, 1985. Resumen Biol. Abst, 8(1) ref. 7492 January 1986.

13.- Laurent S.T., L.J. Bousquet. L. Simon and M. Lalonde SEPARATION OF VARIOUS Frankia STRAINS IN THE Alnus y Elaeagnus HOST SPECIFICITY GROUPS USING SUGAR ANALYSIS. Can J. Microbiol. 33(9) 764-772, 1987.

14.- Ligon James M and James P. Nakas. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF Frankia sp STRAIN PaC<sub>1</sub> GENE INVOLVED IN NITROGEN FIXATION. Appl. Environ. Microbiol. 53(10): 2321-2327, 1987.

15.- López Mary, F. Marcia. A. Murry and John G. Torrey. EFFECT OF OXIGEN ON SUBSTRATE UTILIZATION FOR NITROGEN FIXATION AND GROWTH IN Frankia sp. Arch Microbiol. 145(3): 209-214, 1986. Resumen Biol. Abst. 83(1) ref. 7492 January 1987.

16.- Margheri, M.C., L Vagnoli, F. Pacilli and Sili. MORPHOPHYSIOLOGICAL PROPERTIES OF Frankia STRAIN BanII57 ISOLATED FROM Elaeagnus angustifolia AND CAPABLE OF INFECTING Alnus glutinosa. Ann Microbiol Enzimol. 35(0): 143-154 (recd 1986). Resumen Biol. Abst 83(8) ref. 81118 April 1987.

- 17.- Noridge Nancy A. and David R Benson. ISOLATION AND NITROGEN-FIXING ACTIVITY OF Frankia sp. STRAINS. CpI<sub>1</sub>. VESICLES. J Bacteriol. 166(1): 301-305, 1986.
- 18.- Okon Y. Azospirillum AS A POTENTIAL INOCULANT FOR AGRICULTURE. Trend in Biotechnology. 3(9): 223-228, 1985.
- 19.- Prin Yves and Mireille Rougier. CYTOLOGICAL AND HISTOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF THE AXENIC ROOT SURFACE OF Alnus glutinosa. Can J Bot. 64(10): 2216-2226, 1986.
- 20.- Reddell Paul and G.D. Bowen. DO SINGLE NODULES OF Casuarinaceae CONTAIN MORE THAN ONE Frankia STRAINS. Plant Soil. 88(2): 275-280, 1985.
- 21.- Reddell Paul and G.D. Bowen. HOST-Frankia SPECIFICITY WITHIN THE Casuarinaceae. Plant Soil. 93(2): 293-298, 1986.
- 22.- Reddell Paul and G.D. Bowen and A.D. Robson. NODULATION OF Casuarinaceae IN RELATION TO HOST SPECIES AND SOIL PROPERTIES. Aust. J. Bot. 34(4): 435-444, 1986.
- 23.- Reddell Paul, R.C. Foster and C.D. Bowen. EFFECTS OF SODIUM CHLORIDE ON GROWTH AND NITROGEN FIXATION IN Casuarina obesa. New Phytol. 102(3): 397-408, 1986.

- 24.- Rodriguez C-Barrueco, F. Sevillano and T.M. Nebreda. EFFECTIVE NODULATION OF Coriaria myrtifolia L. INDUCED BY Frankia STRAINS FROM Alnus glutinosa L. (Gaertn). Plant Soil 110. 167-176, 1988.
- 25.- Sellstedt Anita. NITROGEN AND CARBON UTILIZATION IN Alnus incana FIXING NITROGEN OR SUPPLIED WITH NITRATE OF THE SAME RATE. J Exp Bot. 37(179): 786-797, 1986. resumen Biol Abst. 82(8) ref. 77158 Oct 1986.
- 26.- Sellstedt Anita. NITROGENASE ACTIVITY, HIDROGEN EVOLUTION AND BIOMASS PRODUCTION IN DIFERENT Casuarina SYMBIOSES Plant Soil. 105(1): 33-40, 1988.
- 27.- Sellstedt Anita, Kerstin Huss-Danell. NITROGEN FIXATION AND BIOMASS PRODUCTION IN SYMBIOSIS BETWEEN Alnus incana AND Frankia STRAINS WITH DIFFERENT HYDROGEN METABOLISM. Physiol Plant. 66(1): 99-107, 1986.
- 28.- Stephen Safo-Sampah and John G. Torrey. POLYSACCHARIDE-HYDROLYZING ENZYMES OF Frankia (ACTINOMYCETALES). Plant and Soil 112. 89-97, 1988.
- 29.- Steele D. Bernie and Mark D Stowers. SUPEROXIDE DISMUTASE AND CATALASE IN Frankia. Can J. Micorbiol. 32(5): 409-413, 1986.

- 30.- Stowers M.D, R.K. Kulkarni and D.B. Steele. INTERMEDIARY CARBON METABOLISM IN Frankia. Arch Microbiol 143(4): 319-324, 1986. Resumen Biol. Abst. 81(11) ref. 105423 June 1986.
- 31.- Tisa Louis A. and J.C. Ensing. FORMATION AND REGENERATION OF PROTOPLASTS OF THE ACTINORRHIZAL NITROGEN-FIXING ACTINOMYCETE Frankia. Appl Enviroment Microbiol. 53(1): 53-56, 1987.
- 32.- Tisa L.S. and J.C. Ensing. ISOLATION AND NITROGENASE ACTIVITY OF VESICLE FROM Frankia sp. STRAINS BAN1pec. J Bacteriol. 169(11). 5054-5059, 1987.
- 33.- Valdéz M. ASPECTOS ECOLOGICOS DE PLANTAS ACTINORRIZICAS MEXICANAS. Resumenes conferencias magistrales II congreso nacional de la fijación biológica del nitrógeno. Escuela de Biología UAG Guadalajara Jalisco. 7-9, 1989.
- 34.- Weber ASSI. DISTRIBUTION OF SPORE-POSITIVE AND SPORE-NEGATIVE NODULES IN STANDS OF Alnus glutinosa AND Alnus incana IN FINLAND. Plant Soil. 96(2): 205-214, 1986.
- 35.- Wu Yang and Ding Jian. STUDIES ON BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF Frankia sp. FROM Hippophae rhamnoides. Acta Microbiol. 27(3): 227-232, 1987. Resumen Biol. Abst. 85(6)

ref. 63422. March 1988.

36.- Yang, Changfangi. STUDIES ON ISOLATION AND CULTURAL CONDITIONS OF ENDOPHYTE FROM NODULES OF Alnus sibirica. Acta Microbiol Sin. 27(1): 64-68 1987. Resumen Biol. Abst. 84(8) ref. 82561. Oct 1987.

37.- Zhongze, Zhang and John G. Torrey. BIOLOGICAL AND CULTURAL CHARACTERISTICS OF THE EFFECTIVE Frankia STRAIN. HPP CcI<sub>3</sub> (ACTINOMYCETALES) FROM Casuarina cunninghamiana (Casuarinaceae). Ann Bot (lond). 367-378, 1985.

38.- Zhongze, Zhang, Marcia A. Murry and John G. Torrey. CULTURE CONDITIONS INFLUENCING GROWTH AND NITROGEN-FIXATION IN Frankia sp. HPPCcI<sub>3</sub> ISOLATED FROM Casuarina cunninghamiana. Plant Soil 91(1): 3-16, 1986.

39.- Zhou Hongbin Yvan Chang Fang. Hao Jiaqui and Gong Bin. STUDIES ON NITROGEN FIXATION OF Frankia sp. AsI<sub>1</sub> AND BaI 827 STRAINS. Acta Microbiol Sin 27(1): 69-72, 1987. Resumen Biol. Abst. 84(8) ref. 82562 Oct 1987.