

ESTUDIO MORFOLÓGICO, HISTOLÓGICO Y ULTRAESTRUCTURAL DE LA NODULACIÓN DE *Frankia - Morella pubescens* H. & B. *ex Willdenow*, (Myricaceae) “*in situ*”

MORPHOLOGIC, HISTOLOGIC AND ULTRASTRUCTURAL STUDY OF THE NODULATION OF *Frankia-Morella pubescens* H. y B. *ex Willdenow*, (Myricaceae) “*in situ*”

GERARDO ANDRÉS TORRES RODRÍGUEZ¹, JAIRO A MURCIA VELASCO²

PALABRAS CLAVE:

Actinorriza, ultraestructura, simbiosis, actinomiceto.

KEYWORDS:

Actinorhizal plants, ultrastructure, symbiosis, actinomycete

RESUMEN

Las raíces de Morella pubescens H. & B. *ex Willdenow*, se encuentran en simbiosis con el actinomiceto del género *Frankia*, conocido como actinorriza. La simbiosis le permite a la planta fijar dinitrogeno y al actinomiceto adquirir fuentes de carbono. Se conocen aproximadamente 270 especies de plantas que presentan este mismo tipo de simbiosis. Este trabajo tiene como objetivo caracterizar las estructuras y proceso infectivo en la asociación simbiótica de *Frankia* sp en las raíces de *Morella pubescens*. Los nódulos se colectaron se describieron en su morfología externa y se procesaron para Microscopia óptica de alta resolución, Electrónica de Transmisión y tinciones de histoquímica. Los resultados mostraron un patrón de infección muy organizado y las estructuras típicas de la invasión por parte de *Frankia* sp en el tejido radicular de la planta observándose claramente la ultraestructura de las hifas y vesículas fijadoras de nitrógeno.

ABSTRACT

Morella pubescens H. y B. *ex Willdenow* is a plant that carries out a symbiosis with an actinomicet of the species *Frankia* over the radical tissue of certain plants, which makes it known as actinorrize, of which 270 species are found and by which dinitrogen, contained in an unavailable form in the atmosphere can be fixed symbiotically to organic nitrogen: nitrates and ammonia. The work has as its objective to characterize the structures and

Recibido para evaluación: Abril 7 de 2008. Aprobado para publicación: Julio 10 de 2008

1 Universidad del Cauca – Unidad de Microscopia Electrónica.

2 Universidad del Cauca – Biólogo Programa de Biología.

infective process in the symbiotic association of Frankia sp in the roots of Morella pubescens. The nodes were collected, their external morphology was described and they were processed for high resolution optic Microscopy, Electronic Transmission and tinctures of histo-chemistry. The results showed a very organized infection pattern and structures typical of invasion by Frankia sp in the radical tissue of the plant, clearly observed in the ultra structure of the hiphas and fixed vesiculars of nitrogen.

INTRODUCCIÓN

Morella pubescens H. & B. ex Willdenow (Myricaceae) es una planta que realiza una relación de simbiosis con un actinomiceto del género *Frankia* sobre el tejido radicular de algunas plantas, por lo cual se conocen como actinorriza [1] y entre las que se encuentran 270 especies [2] pertenecientes a 25 géneros [3] y 8 familias [4], a través de esta asociación pueden fijar simbióticamente el dinitrógeno, contenido en la atmósfera de una forma no disponible, a nitrógeno orgánico: nitratos y amonio [5].

Una parte del nitrógeno es utilizado para el metabolismo de la planta, la cual le da a la bacteria una fuente de carbono [6] [7], y el excedente es agregado al suelo para ser utilizado por otros organismos, principalmente plantas y bacterias [8].

Frankia es un género de bacterias grampositivas filamentosas que utilizan nitrógeno atmosférico para crecer. En medio de cultivo estas bacterias se caracterizan por desarrollar estructuras como hifas, vesículas y esporangios, sin embargo, cuando forma asociaciones no siempre desarrolla esporangios y vesículas, depende de la planta hospedera, en esta investigación se muestra las estructuras más evidentes y típicas de esas asociaciones.

En Colombia *Morella pubescens* es conocida con el nombre de "laurel de cera" u "Olivo de cera", en razón a que sus frutos producen una gran cantidad de cera [9]. Esta planta vinculada a la familia Myricaceae [10], promisoría para la recuperación de suelos degradados y cuencas hidrográficas [11] [12]; es utilizada para mejorar el campo de pastoreo [11] y como fuente de obtención de cera [13].

Los árboles y arbustos fijadores de nitrógeno pueden asociarse con cultivos agrícolas, también como bancos forrajeros y como cercas vivas.

El Laurel de Cera tiene gran variedad de productos y usos como: obtención de cera, leña, carbón, made-

ra, productos medicina-les e industriales, sombra, división de lotes y demarcación de linderos, barreras rompevientos, control de erosión, refugio de avifauna silvestre, reciclaje de nutrientes [14]. Por otra parte esta especie incrementa el nivel de nitrógeno al suelo a través de materia orgánica suministrada por hojas, flores y raíces muertas.

A pesar de la importancia ecológica que tiene para el suelo esta especie no se ha realizado un estudio macroscópico (nódulos), histológico y ultraestructural de la simbiosis y sus células infectadas. Este trabajo tiene como objetivo caracterizar las estructuras y proceso infectivo en la asociación simbiótica de *Frankia sp* en las raíces de *Morella pubescens*

METODOLOGÍA

Se tomaron 10 plantas adultas de las cuales se seleccionaron igual número de nódulos, estas se colectaron en la vereda La Esperanza (2200 m.s.n.m), municipio de Sotará y kilómetro 3 vía Popayán Coconuco.

Las muestras transportadas al laboratorio debidamente refrigeradas, fueron sometidas a un proceso de limpieza para registro fotográfico y medición de nódulos, se seleccionaron tres de estos al azar por cada planta los cuales se fijaron en glutaraldehído al 2% en buffer de fosfato (BP) 0.2M pH 7.4. y conservadas a 4°C hasta su procesamiento.

Microscopia Óptica de Alta Resolución (MOAR)

Las muestras, fijadas con glutaraldehído, fueron lavadas en BP 0.2M pH 7.4 y posfijadas en OsO₃ 2% en BP 0.2M pH 7.4, deshidratadas en alcoholes ascendentes y acetona, infiltradas en resina spurr, y finalmente orientadas en moldes de inclusión [15], para las obtención de cortes de espesor de 1 a 5 μm en ultramicrotomo Leica Ultracut. Los tejidos teñidos con azul de toluidina fueron observados en microscopio de alta resolución Microphot Nikon.

Histoquímica

Las muestras fijadas con glutaraldehído y cacodilato de sodio 0.2M pH 7.2 fueron deshidratadas en alcoholes ascendentes, posteriormente se infiltraron en Xiloparafina y posteriormente se orientaron en moldes con parafina 52° C. El material se cortó en Microtomo a un espesor de 6 a 7µm, se tiñeron con azul mercúrico de bromofenol (AMB), verde rápido – safranina (VR–S), y Lugol, previamente desparafinados con xilol. La preparación de los reactivos se hizo de acuerdo a Jensen (1962)[16]. El tejido fue observado en microscopio de campo claro Nikon Microphot.

Las muestras para MOAR e histoquímica se procesaron en el Sistema de Análisis de Imágenes Leica Qwin 550

Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

A partir de los bloques procesados para MOAR se obtuvieron cortes de 60 a 90nm los cuales se recogieron en rejillas y se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo para su observación al Microscopio Electrónico de Transmisión Jeol 1200 EX

RESULTADOS

Morfología Externa

Los nódulos de *Morella* se encontraron en suelos arenosos y con poca materia orgánica. Estos se originan vía infección pelo radicular de un punto de infección para formar uno, o varios primordios lobulares que crecen por expansión de la punta distal del lóbulo y se ramifican por la división del meristemo, presentan raicillas nodulares son perennes y sus nódulos no se compactan entre ellos. Presentan una coloración café y un tamaño intermedio de 2 a 3 cm², con una extensión lobular de 0.3 cm², (Figura 1).

Microscópica Óptica de Alta Resolución

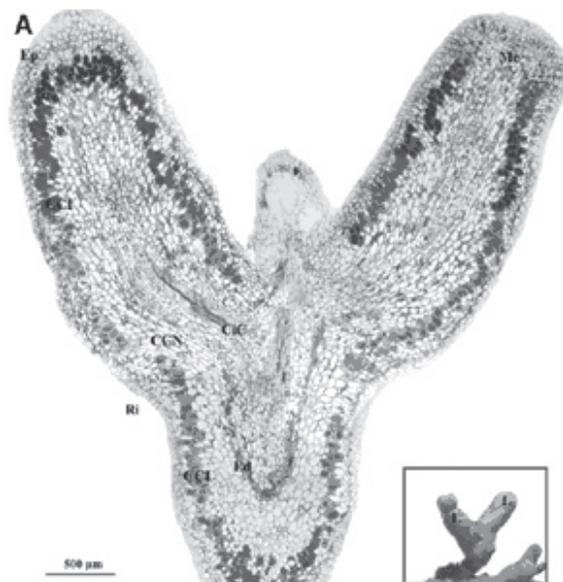
Para los análisis de MOAR se tomaron diferentes bloques observándose características histológicas así como el patrón de infección sin diferencias significativas entre estos. La bacteria *Frankia sp* se distribuye en la parte media del córtex formando un anillo entre el cilindro central y la epidermis. En la figura 2 se puede

observar claramente el cilindro central con floema y un xilema de paredes celulares engrosadas, el endodermo caracterizado por el engrosamiento de la pared celular y su notable tinción. Se hace muy evidente la presencia de células corticales infectadas y las no infectadas, determinándose un patrón de infección muy organizado.

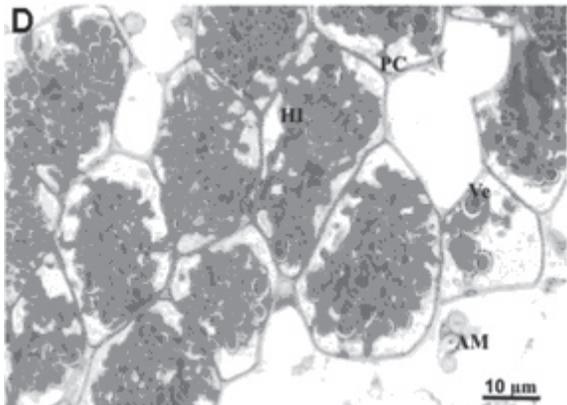
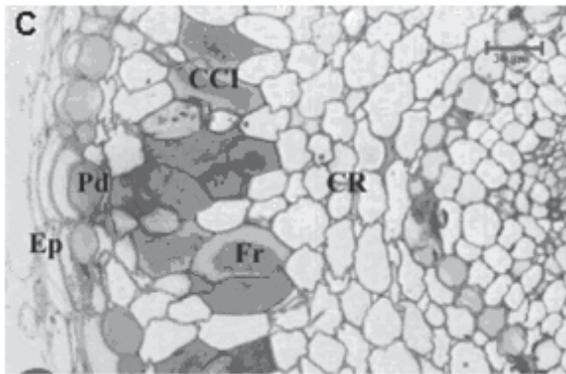
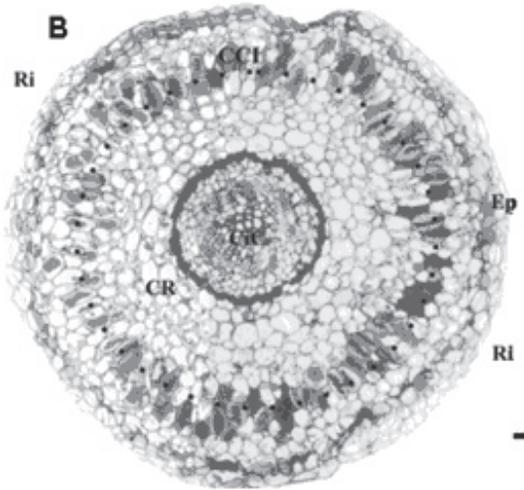
Figura 1. Nódulos radiculares de *Morella pubescens*. Se muestra los nódulos (No) con los lóbulos (Lo) y la raíz nodular (RN).



Figura 2. A) Corte longitudinal de un nódulo de *M. pubescens*. Se observan la infección por todo el borde del nódulo y claramente definidos dos estratos celulares de células infectadas CCI y no infectadas CCN; EP: epidermis; Ed: endodermis; CiC: Cilindro Central; L: Lobulo; Me: Meristemo.



Figuras 2 B) Corte transversal de un lóbulo, los puntos muestran la distribución de las células corticales infectadas CCI, corteza radicular CR; cilindro central CiC. Aumento 4X **C)** Detalle del cortex radicular y la epidermis CR corteza radicular Ep epidermis Pd peridermis; Ri Rizosfera Fr. Frankia. **D)** Detalle de la infección celular se observa las hifas en el interior HI: hifas, PC: pared celular, Ve: Vesículas, AM: Amiloplastos. Fotomicrografías de MAOR . Tinción azul de toluidina.



Pruebas de Histoquímica

La prueba de Azul Mercúrico de Bromofenol muestra la alta actividad de división celular y metabólica evidenciada por la tinción de las proteínas, Figura 3A). Los mismos resultados se observaron con la prueba con Verde Rápido – Safranina la cual evidencio el alto contenido de material de replicación característico de la alta actividad de división celular. La tinción con lugol mostró el alto contenido de amiloplastos en las células del parénquima alrededor del anillo de infección, esto se debe a los altos requerimientos de carbón por parte de la bacteria (Figura 3B)

Microscopia Electrónica de Transmisión

Las observaciones muestran las estructuras del proceso infectivo de *Frankia como hifas* y vesículas, características en la simbiosis del género *Morella*. La figura 4A) muestra diferentes tipos de vesículas entre estas las maduras que se caracterizan por la septación interna. Igualmente se hace muy evidente una gran cantidad de vesículas maduras con espacios vacíos que indican, la efectividad de la fijación de nitrógeno y el aislamiento de la vesícula para proteger la nitrogenasa del oxígeno, Figura 4B). La figura 4C) muestra la forma de infección intracelular de una hifa invasiva septada la cual rompe la pared celular de las células de la planta.

Figura 3. Pruebas histoquímicas de azul mercúrico de bromofenol del lóbulo de nódulo de *M. pubescens* **A)** se observa el alto contenido de proteínas (color Azul) en células corticales infectadas CCI contrariamente ausencia del colorante en las no infectadas CCN.

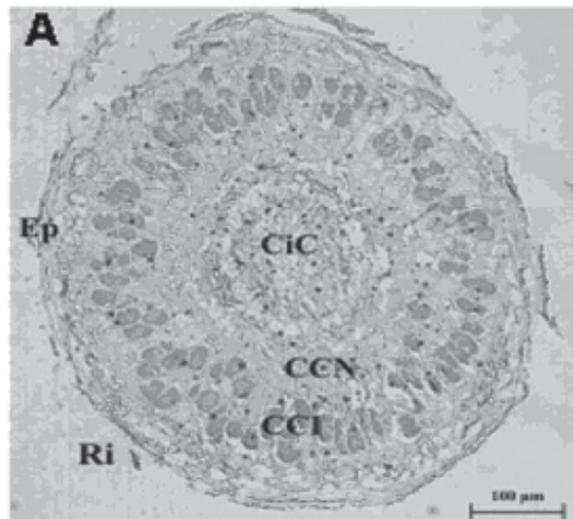


Figura 3 B) prueba histoquímica de Lugol se aprecia la gran cantidad de amilo-plastos, Am, color marrón alrededor de las células infectadas. Ep: epidermis; Pd: peri-dermis; Ri: rizosfera.

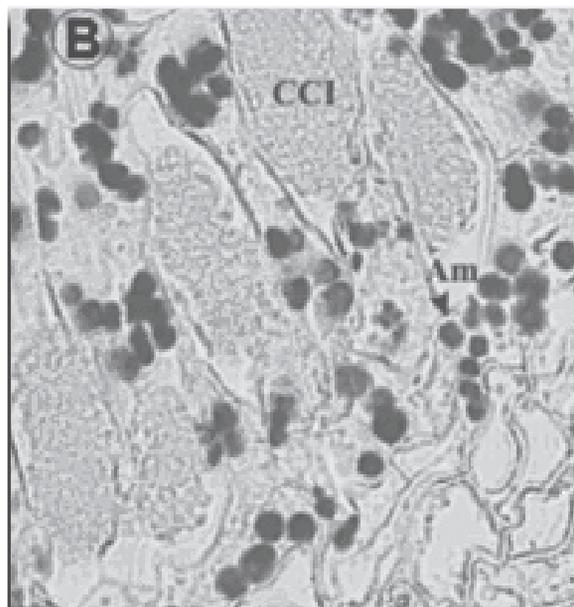


Figura 4. Fotomicrografías Electrónicas de células corticales de *Morella pubescens* H. & B. ex *Willdenow*, infectadas por el actinomiceto *Frankia*. **A.** Presencia de Vesículas (VE), Hifa Invasiva (HI), Hifa Vegetativa (HV) y Pared Celular del Hospedero (PC).

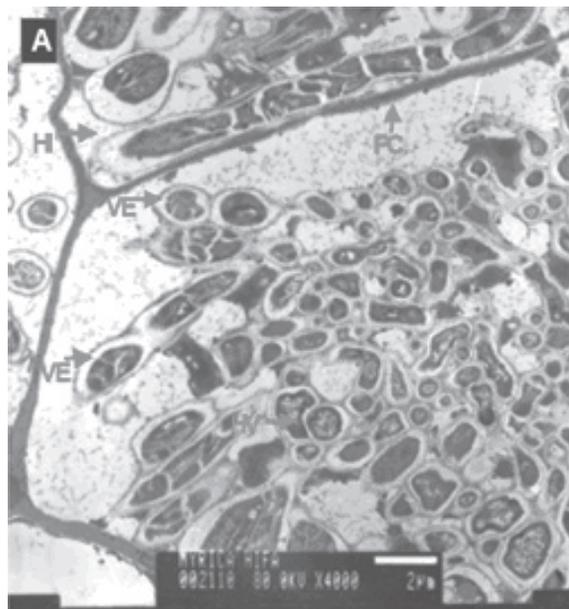


Figura 4 B. Célula Cortical infectada que presenta vesículas maduras. Se observa la Membrana Vesicular Externa (MEV), Membrana Vesicular Interna (MIV), Espacio de Aire (EA), Citoplasma de la célula Cortical Infectada (CCC) y Vesículas (VE).

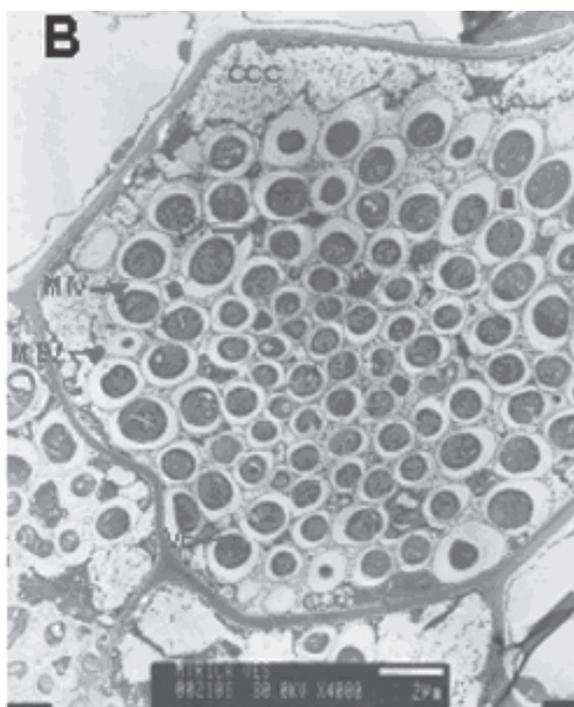
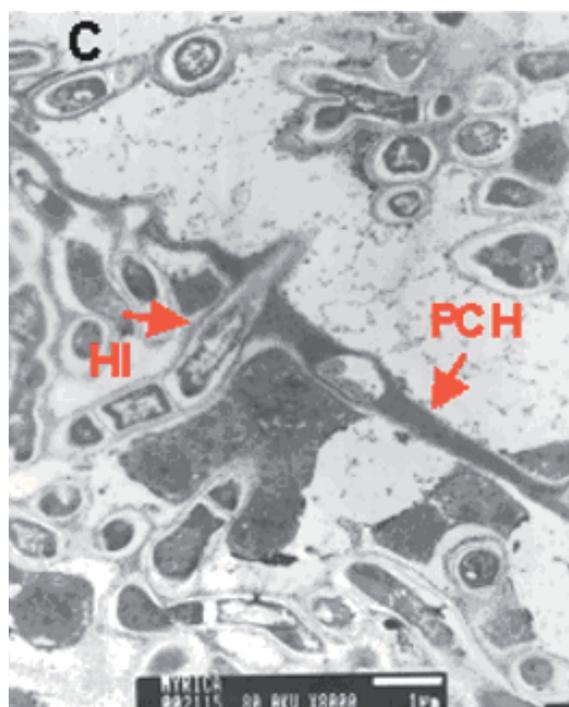


Figura 4 C. Célula Cortical infectada. Se observa una hifa invasiva (HI) que atraviesa la pared celular del hospedero (PCH).



CONCLUSIONES

Los nódulos de la simbiosis *Frankia* – *Morella pubescens* presentan el patrón de desarrollo y crecimiento de los nódulos tipo *Morella* caracterizado por un tipo de infección vía pelo radicular a partir de un punto que origina uno o más primordios lobulares que crecen por expansión de la punta distal del lóbulo y se ramifica por la división del meristemo con raicillas nodulares perennes y nódulos no compactados

La zona de infección de *Frankia* en los lóbulos nodulares de *Morella pubescens* tiene la forma de un anillo que se encuentra en la zona media del córtex entre el cilindro central y la epidermis ya que estas células corticales son excretoras con alto contenido de retículo endoplasmático, aparato de golgi y ribosomas, lo que le asegura a la bacteria los altos requerimientos proteínicos para la formación de sus estructuras.

En las células corticales de los lóbulos nodulares de *Morella pubescens*, *Frankia* desarrolla sus estructuras características: hifas y vesículas fijadoras de nitrógeno, sin observarse los esporangios posiblemente debido a que la bacteria no se encontraba en etapa de esporulación.

Un gran número de amiloplastos alrededor de la zona de infección muestra los altos requerimientos de carbono por parte de la bacteria.

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

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la colaboración prestada por el profesor Nelson Rojas docente de la Universidad del Cauca- Departamento de Biología quien aportó su asesoría en las pruebas histoquímicas mostradas en este trabajo.

REFERENCIAS

[1] BERRY, A. M; MCINTYRE, L y MCCULLY M. E. Fine-structure of root hair infection leading to nodulation in the *Frankia-Alnus* symbiosis. En

- Canadian Journal of Botany. Vol. 64, 1986. p. 292-305.
- [2] SWENSEN, Susan and MULLIN, Beth. Phylogenetic relationships among actinorhizal plants. The impact of molecular systematics and implications for the evolution of actinorhizal symbioses. En: *Physiologia Plantarum*. Vol. 99, 1997. p. 565 – 573.
- [3] HUSS DANELL, K. Actinorhizal symbiosis and their N₂ fixation. *New Phytol*. Vol. 136, 1997. p. 375 – 405.
- [4] McEWAN, Neil y GATHERER, Derek. Codon indices as a predictor of gene functionality in *Frankia* operon. *Canadian Journal of Botany*. Vol. 77, No. 9; Septiembre, 1999. p. 1287 – 1292.
- [5] SALOMÓN, Eldra Peral et al. *Biología de Ville: Ecología*. 3ed. Santafé de Bogotá: McGraw – Hill, 1998. p. 1083. ISBN 968 – 25 – 2393 – 6.
- [6] NEWCOMB, William; BAKER, Dwight y TORREY, John. Ontogeny and structure of effective root nodules of the autumn olive (*Elaeagnus umbellata*). *Canadian Journal of Botanic*. Vol. 65, 1987. p. 80 – 94.
- [7] NEWCOMB, William and WOOD, Susan. Morphogenesis and fine structure of *Frankia* (Actinomycetales): The microsymbiont of nitrogen – fixing actinorhizal root nodules. *International Review of Cytology*. Vol. 109, 1987. p.1 – 88.
- [8] TORREY, John G. Nitrogen fixation by actinomycete – nodulated angiosperms. *BioScience*. Vol. 28, No. 9. Septiembre, 1978. p. 586 – 592.
- [9] PARRA, C. Taxonomía del género *Morella* (Morellaceae) en Colombia. Santafé de Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana, 1998. p. 195.
- [10] PARRA, C. Revisión Taxonómica de la Familia Myricaceae en Colombia *Caldasia* 2003. 25(1) : 23-64.
- [11] GONZAGA, L. Obtención de marcadores moleculares para la caracterización del germoplasma de Aliso Cerezo (*Alnus acuminata* H.B.K) de dos cuencas hidrográficas en los departamentos de Risaralda y Quindío. *Ciencia et Técnica*. Vol. 55, No. 16; Agosto, 2001. p. 145 – 149.
- [12] BENSON, D y SILVESTER, W. Biology of *Frankia* Strains, Actinomycete Symbionts of Actinorhizal Plants. *Microbiology Review*. Vol. 57, No. 2, June, 1993. p. 293 – 319.
- [13] ROBELLO, N y TITUANA, S. Producción técnica y comercial de cera de laurel en el municipio de la Cruz Nariño. Trabajo de Grado – Universidad del Cauca, 2000.

- [14] BOTERO, Raúl y RUSSO, Ricardo. Utilización de árboles y arbustos fijadores de nitrógeno en sistemas sostenibles de producción animal en suelos ácidos tropicales. *Agroforestería para la producción animal*. Febrero, 1997. p. 121 – 143.
- [15] GONZÁLES SANTANDER, R. Técnicas de Microscopía Electrónica en Biología. 1977 .p 48 – 60.
- [16] JENSEN, William. *Botanical Histochemistry* . Freeman & Co. 1962.