

NODULOS RADICALES EN *DISCARIA* Y *COLLETIA* (*RAMNACEAS*)¹

POR DIEGO MEDAN² Y ROBERTO D. TORTOSA²

ABSTRACT

The presence of root nodules in six species of *Rhamnaceae* (*Discaria americana* Gill. et Hook., *D. serratifolia* (Vent.) Benth. et Hook., *D. trinervis* (Gill.) Reiche, *D. nana* (Clos) Weberb., *Colletia paradoxa* (Spreng.) Escal. y *C. spinosissima* Gmel.) is reported. The morphology of the nodules is described, and its affinity with those of *Betulaceae*, *Eleagnaceae*, etc., is shown. Nodulation could be induced to *Discaria* seedlings grown in water culture, adding a suspension of crushed nodules to their root system.

INTRODUCCION

En el presente trabajo se señala la presencia de nódulos habitados por un microorganismo, en las raíces de 4 especies sudamericanas de *Discaria*: *D. americana* Gill. et Hook., *D. serratifolia* (Vent.) Benth. et Hook., *D. trinervis* (Gill.) Reiche y *D. nana* (Clos) Weberb., y de las dos especies argentinas de *Colletia*, *C. paradoxa* (Spreng.) Escal. y *C. spinosissima* Gmel.

En la Argentina viven 5 especies de *Discaria*, para las cuales no existían datos acerca de la presencia de nódulos radicales. Tuvimos oportunidad de estudiar 4 de dichas especies en su medio natural, y hallamos nódulos en *D. serratifolia*, en ejemplares que crecen en las costas pedregosas de los lagos Huechulafquen (provincia de Neuquén) y Puelo (provincia de Chubut), y en las laderas del cerro Tronador (provincia de Río Negro); en *D. trinervis*, en un ejemplar que vive en la costa del lago Huechulafquen; y en *D. americana* en los ejemplares que habitan los médanos costeros de La Lucila del Mar y Mar de Ajó (provincia de Buenos Aires).

Exploramos las raíces de varios ejemplares de *D. articulata* (Phil.) Miers que viven en las laderas pedregosas sobre el lago Huechulafquen

¹ Trabajo presentado en las XIV Jornadas de Botánica, San Salvador de Jujuy, en noviembre de 1974.

² Jefe de Trabajos Prácticos, Cátedra de Botánica, Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires.

y en una meseta árida en las proximidades de Leleque (provincia de Chubut), y en ningún caso hallamos nódulos.

De la especie restante, *D. nana*, pudimos examinar las raíces noduladas de un ejemplar de herbario procedente de Santa Cruz (O. Boelcke 16118, BAA y BAB).

También encontramos nódulos en plantas jóvenes de *D. serratifolia*, *D. trinervis* y *D. americana*, cultivadas a partir de semillas en el Jardín Botánico de la Facultad de Agronomía de Buenos Aires.

Dada la estrecha afinidad que existe entre los géneros *Discaria* y *Colletia*, investigamos las raíces de ejemplares de *C. paradoxa* y *C. spinosissima* que se hallan cultivados en el Jardín Botánico mencionado, y en ambas especies encontramos nódulos. También los hallamos posteriormente en ejemplares de *C. paradoxa* que viven en las sierras de Balcarce (provincia de Buenos Aires), y de *C. spinosissima* que crecen en las laderas sobre el lago Huechulafquen. Sin embargo, no nos fue posible encontrarlos en las raíces de los ejemplares de esta última especie que viven en los bancos de conchilla en los alrededores de Punta Indio (provincia de Buenos Aires).

Estudiamos la morfología externa e interna de los nódulos hallados en las diferentes especies, y llevamos a cabo una experiencia para conocer la posibilidad de obtener plantas noduladas, mediante la inoculación de ejemplares estériles cultivados en solución nutritiva, con una suspensión de macerado de nódulos.

En experiencias preliminares realizadas en el Centro de Radiobiología de la Facultad de Agronomía (U.B.A.), pudo comprobarse siguiendo el método de la reducción del acetileno (Carpio, 1973), la capacidad fijadora de nitrógeno libre que poseen los nódulos de *D. serratifolia*, *D. trinervis*, *C. spinosissima* y *C. paradoxa* (Merzari y Carpio, 1976).

ANTECEDENTES

La existencia de nódulos radicales en dicotiledóneas "no-Leguminosas" se conoce desde 1829, año en que Meyen los señaló en el aliso (*Alnus glutinosa* Gaertn.). Desde entonces, se ha acumulado una extensa bibliografía en torno a este tema, y se hallaron nódulos en no menos de 12 géneros de dicotiledóneas leñosas, distribuidos entre las familias Casuarináceas, Miricáceas, Betuláceas, Eleagnáceas, Ramnáceas, Coriariáceas y Rosáceas.

Se ha puesto especial interés en la investigación del endófito, al cual se lo interpretó sucesivamente como hongo filamentoso, bacteria, miembro de las *Plasmodiophorales* y miembro de las *Actinomycetales* (Hawker & Fraymouth, 1951: 379). La última interpretación prevalece en la actualidad (Becking, 1970 b).

En los últimos años, el tema ha sido objeto de exhaustivas revisiones, en las que se tomaron en cuenta aspectos morfológicos, fisiológicos, bio-

químicos, ecológicos y utilitarios (Allen & Allen, 1958; Bond, 1963, 1967 y 1976; Becking, 1966, 1968, 1970 a y 1975). La capacidad de fijar nitrógeno por acción simbiótica entre el endófito y el huésped, ha sido investigada y probada en todos los géneros en que los nódulos ocurren.

En las Ramnáceas la existencia de nódulos se conoce en numerosas especies de *Ceanothus*, y fue señalada en la especie neocelandesa de *Discaria*, *D. toumatou* Raoul, por Morrison & Harris (1958). Morrison, tres años más tarde, demostró la habilidad de los mismos para fijar nitrógeno.

Respecto a las especies indígenas de la Argentina, los antecedentes se reducen al trabajo de Castellanos (1944), quien describió nódulos radicales en ejemplares de *Alnus jorullensis* H. B. K. var. *spachii* Regel de Salta y Tucumán. Schnack y Covas (1946) hacen referencia a la presencia de nódulos en *Larrea divaricata* Cav. en Mendoza, pero no describen su estructura interna, por lo que resulta incierta su identidad.

En lo relativo a nódulos en plantas exóticas, L. R. Parodi los observó y coleccionó en un ejemplar de *Casuarina* sp. cultivado en el Jardín Botánico de la Facultad de Agronomía de Buenos Aires (material conservado n° 3084, en BAA). También A. Burkart observó nódulos en varias ocasiones en ejemplares de *Casuarina* cultivados en el delta del Paraná (comunicación personal); Rossi (1964) trabajó con nódulos de *Alnus glutinosa* Gaertn. provenientes del río Capitán, delta del Paraná y, por último, los autores del presente trabajo observaron recientemente nódulos en las raíces de un ejemplar de *Eleagnus pungens* Thunb., cultivado en el Jardín Botánico mencionado (BAA 6668, m.c. 3085).

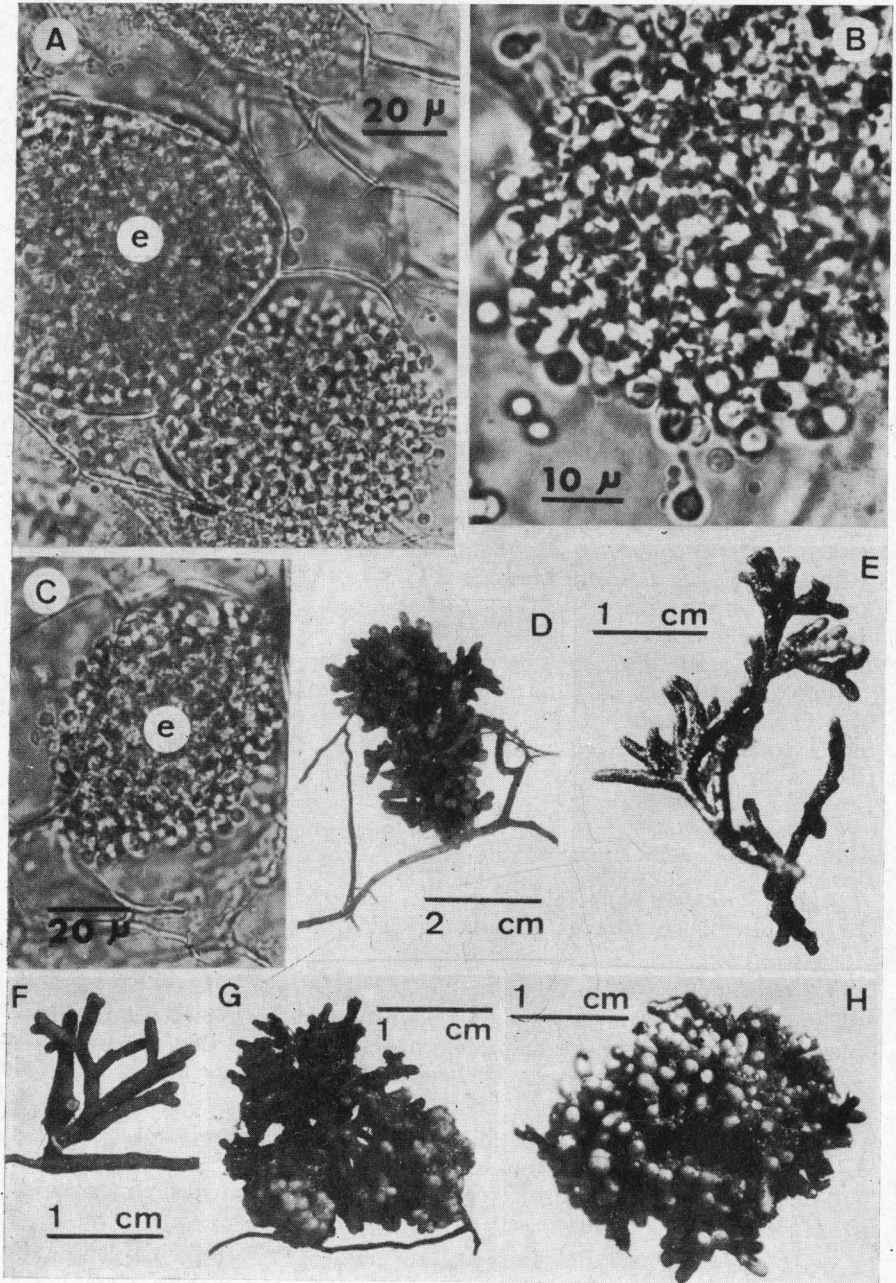
MATERIAL Y METODOS

Fueron confeccionados ejemplares de herbario de los individuos cuyas raíces presentaban nódulos, y se conservaron además raíces noduladas en fijador FAA.

La morfología externa e interna de los nódulos se estudió empleando dicho material, al que se sumaron nódulos frescos provenientes de ejemplares cultivados en el Jardín Botánico de la Facultad de Agronomía de Buenos Aires. En el caso de *D. nana* se dispuso solamente de material de herbario.

Se incluyeron trozos de nódulos en parafina, y se efectuaron cortes seriados que se colorearon con safranina y fast-green. Se realizaron también secciones a mano libre, que fueron montadas en agua o en lactofenol de Amman a fin de observar el endófito.

Para diafanizar nódulos íntegros, se empleó el método de Dizeo de Strittmatter (1973). Los dibujos se realizaron con cámara clara y las microfotografías se tomaron con un equipo Wild.



El material de herbario, el material fijado y los preparados microscópicos, se hallan depositados en el herbario "Gaspar Xuárez" de la Facultad de Agronomía de Buenos Aires (BAA).

Para el ensayo de inoculación fueron utilizadas semillas procedentes de: *D. americana*, Buenos Aires, pdo. de Gral. Lavalle, La Lucila del Mar (BAA 14388); *D. serratifolia*: Neuquén, dpto. Huiliches, lago Huechulafquen (BAA 10710) y Chubut, dpto. Cushamen, lago Puelo (BAA 10774); *D. trinervis*: Neuquén, dpto. Huiliches, lago Huechulafquen (BAA 14677).

Las semillas fueron puestas a germinar en cajas de Petri, sobre papel de filtro, en una cámara de germinación que fue mantenida a 26° C. Las plántulas obtenidas fueron trasplantadas a recipientes con arena esterilizada en autoclave, y recibieron luz artificial proveniente de una lámpara Philips HPLR de 400 W, durante 12 horas diarias.

Cuando las plantas alcanzaron a formar, en promedio, el quinto par de hojas, fueron trasladadas a frascos color caramelo con solución nutritiva de Machils y Torrey (1956: 44) a 1/4 de su concentración normal y con PH 5,5. La solución nutritiva se cambió semanalmente, y se realizó burbujeo constante de aire. El fotoperíodo se llevó a 16 hs.

Para preparar el inóculo se utilizaron nódulos provenientes de ejemplares cultivados en el Jardín Botánico (*D. americana*, BAA 15057, *D. serratifolia*, BAA 14384). Dichos nódulos fueron lavados con detergente comercial y macerados en mortero. El macerado obtenido se suspendió en agua destilada, añadiéndose varias gotas de dicha suspensión en cada uno de los frascos con plantas a inocular.

RESULTADOS

I. MORFOLOGÍA EXTERNA DE LOS NÓDULOS

En plántulas de *Discaria americana*, *D. trinervis* y *D. serratifolia*, cultivadas en solución nutritiva e inoculadas con una suspensión de nódulos macerados, se observó la formación de nódulos en raíces jóvenes, las que medían aproximadamente 0,5 mm de diámetro.

Lám. I. — A y C, *Colletia spinosissima* Gmel.: corte transversal del nódulo radical, mostrando células hipertrofiadas de la corteza interna (e) hospedando al endófito. Este presenta numerosas terminaciones esféricas en sus hifas (BAA 6683, montado en lactofenol de Amman sin coloración previa); B, *Discaria americana* Gill. et Hook.: igual que A, aumentado (BAA 15057); D, *Colletia spinosissima* Gmel.: nódulo radical completo (BAA 6683); E, *C. paradoxa* (Spreng.) Escal.: igual que D (BAA 3067); F y G, *Discaria americana* Gill. et Hook.: igual que D (BAA 14388); H, *D. serratifolia* (Vent.) Benth. et Hook.: igual que D (BAA 14348).

Al principio se advirtieron leves hinchamientos en la superficie de las raíces, que aumentaron hasta producirse el desgarramiento de la corteza y la emergencia de pequeñas masas globosas. Estos nódulos jóvenes crecieron hasta alcanzar 1 mm de diámetro, luego de lo cual algunos sufrieron una bifurcación que originó dos ramas nodulares de aproximadamente 1 mm de diámetro, mientras que otros se alargaron de 2 a 3 mm antes de sufrir dicha bifurcación.

Pasadas 4 semanas, todos los nódulos presentaban de 1 a 3 bifurcaciones en, por lo menos, una de sus ramas, exhibiendo ya el aspecto coraloide que caracteriza a los nódulos de varios años de edad. Los mismos, estudiados en ejemplares adultos de *Discaria americana*, *D. serratifolia*, *D. trinervis*, *D. nana*, *Colletia paradoxa* y *C. spinosissima*, se presentan generalmente agrupados en la zona del cuello de la raíz, en forma de masas globosas de hasta 4 cm de diámetro. Dichas masas están constituidas por numerosas ramas nodulares estrechamente reunidas (lám. 1: D, G y H), observándose también formas laxas e intermedias (lám. 1: E y F). Todas ellas provienen de bifurcaciones sucesivas, ocasionalmente reemplazadas por divisiones triples.

Los ápices de las ramas nodulares presentan color blanquecino o rosado. Las ramas se oscurecen al envejecer y su corteza se va desintegrando, quedando así al descubierto el cilindro central, que se torna leñoso. Todo parece indicar que estos nódulos viven varios años.

II. MORFOLOGÍA INTERNA³

Examinando un corte longitudinal de un nódulo recientemente formado (fig. 1: B), se observa su conexión con el cilindro central de la raíz madre, que aparece en corte transversal.

El nódulo, que al emerger ha aplastado y desgarrado la corteza radical, se compone de un cilindro central vascularizado, con una zona pericíclica rica en contenidos probablemente tánicos, y de una zona cortical. En esta última se distinguen: una región interna que posee células grandes, vacuoladas, con numerosos idioblastos conteniendo drusas, y una región externa compuesta por células menores, comprimidas tangencialmente, y provistas de contenidos semejantes a los presentes en el periciclo.

Protegido por la corteza externa, y coronando el cilindro central, se observa el meristema apical, en el cual no se advierte diferenciación zonal alguna.

En la zona proximal de la corteza interna se observan células sensiblemente mayores que las circundantes, que contienen una fina red de filamentos. Estos, en las células de mayor tamaño, presentan diminutas cabezas esféricas en sus extremos.

³ Las observaciones siguientes se refieren a los nódulos de todas las especies estudiadas, entre los que no se han advertido diferencias significativas.

La raíz madre, que ya ha comenzado a experimentar crecimiento secundario, presenta xilema y floema secundarios y una capa de súber en formación. La zona interna de la corteza radical se encuentra ya aplastada.

La estructura de un nódulo adulto, observada en corte longitudinal (fig. 2: A), no difiere mayormente de la descrita más arriba. Sin embargo, la corteza externa es comparativamente más delgada, y es mayor el número de células que contienen al endófito filamentoso.

En células cercanas al ápice, el endófito se presenta como una red de hifas de $0,5 \mu$ de diámetro. En células más proximales, dichas hifas poseen terminaciones esféricas de $3-4 \mu$ de diámetro⁴ (lám. 1: A, B y C). En las células más viejas, las esferas se ven aplastadas, y finalmente se confunden con las hifas y con el citoplasma de la célula hospedante, formando un coágulo denso.

Un corte transversal de una rama nodular, efectuado a 1 mm del ápice (fig. 1: A), permite observar la estructura del cilindro central. Este posee 3-5 haces xilemáticos, confluentes en el centro al concluir su maduración, y otros tantos floemáticos. La endodermis presenta bandas de Caspary, y en la corteza interna existen abundantes granos de almidón compuestos.

En cortes efectuados en ramas nodulares viejas, se aprecia la desintegración de la corteza y la ocurrencia de crecimiento secundario en el cilindro central.

Estudiando cortes transversales seriados, así como nódulos diafanizados (fig. 2: B y C), se observa que las bifurcaciones, características de este tipo de nódulos, originan simultáneamente ramas iguales, no existiendo subordinación alguna entre ellas.

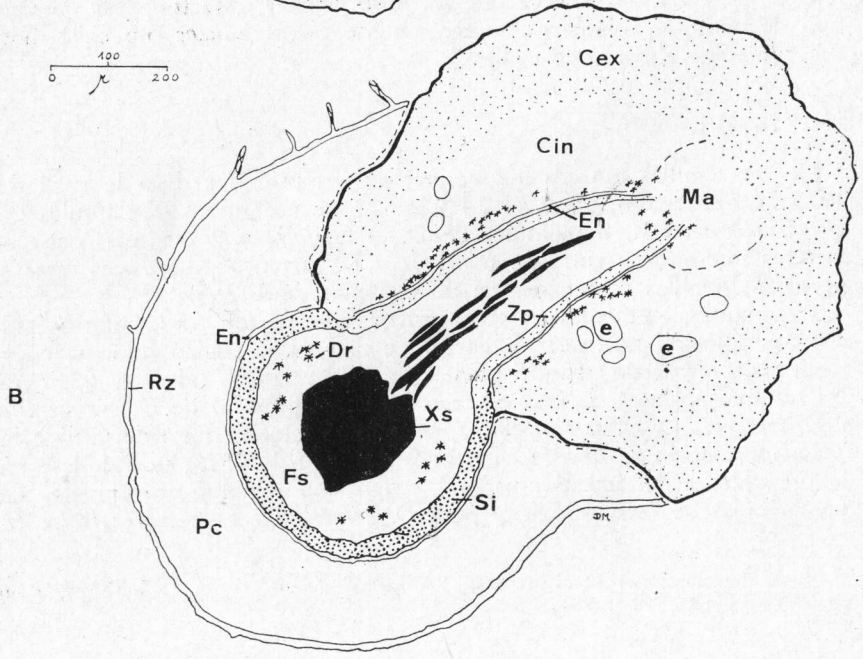
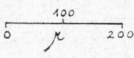
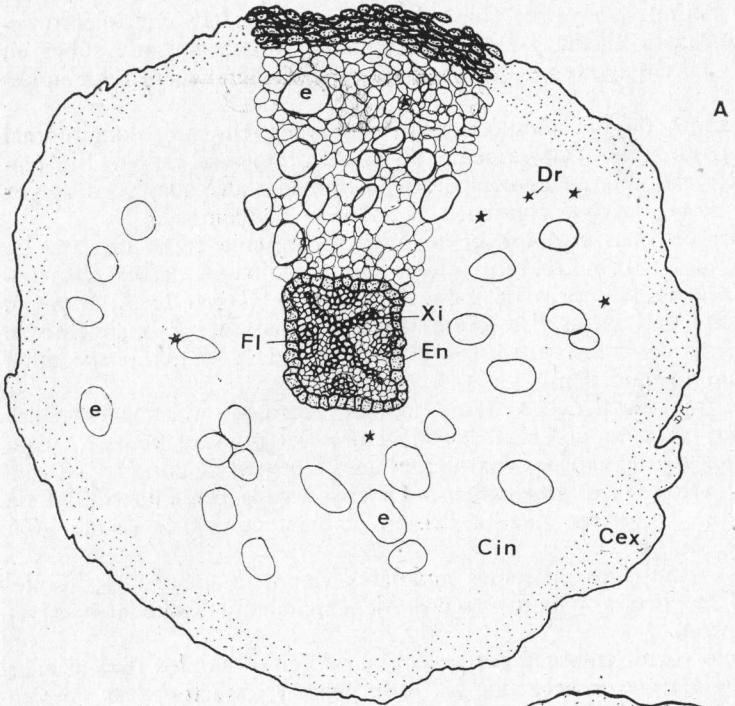
III. INOCULACIÓN

De las semillas puestas a germinar en los primeros días de abril de 1975 se obtuvieron, entre el 14 y el 25 de ese mes, 20 plántulas de *Discaria americana*, 8 plántulas de *D. serratifolia* y 9 plántulas con caracteres intermedios entre *D. trinervis* y *D. serratifolia*, logradas éstas a partir de semillas cosechadas de un ejemplar de *D. trinervis*.

Las plantas, cultivadas en arena esterilizada, fueron trasladadas a frascos con solución nutritiva el día 30 de mayo. Se utilizó solución completa (con nitrógeno) para 5 plantas de *D. americana*, mientras que para las restantes plantas de esta especie, así como para las de *D. serratifolia* y *D. trinervis* (x *D. serratifolia*?), se empleó solución libre de nitrógeno.

La inoculación se llevó a cabo el 9 de junio de 1975, utilizándose en la preparación del inóculo, para *D. americana*, nódulos provenientes de un ejemplar de esta especie, y para *D. serratifolia* y *D. trinervis* (x *D.*

⁴Estas terminaciones se denominan "vesículas" (*vesicles*) en la bibliografía en inglés (Becking, 1970 b: 205).



CUADRO 1

Resultados de la experiencia de inoculación de especies de *Discaria*

Especie	Tratamiento	Solución	Número de plantas	Número de plantas noduladas	Número de nódulos por planta
<i>D. americana</i>	Plantas inoculadas	con N	5	0	
		sin N	9	9	30, 30, 25, 16, 15, 15, 12, 10, 3 ($\bar{x}=17$)
	Testigos	sin N	6	0	
<i>D. serratifolia</i>	Plantas inoculadas	sin N	5	5	9, 9, 5, 3, 2 ($\bar{x} = 6$)
	Testigos		3	0	
<i>D. trinervis</i> (x <i>D. serratifolia</i> ?)	Plantas inoculadas	sin N	6	6	20, 17, 10, 4, 2, 1 ($\bar{x} = 9$)
	Testigos		3	0	

serratifolia?) nódulos provenientes de ejemplares de *D. serratifolia*. Se dejaron sin inocular en solución sin nitrógeno, 6 plantas de *D. americana* y 3 de cada una de las restantes especies, como testigos.

Entre los días 21 y 23 de junio comenzaron a hacerse visibles los nódulos en todos los individuos inoculados, con excepción de los de *D. americana* que contaron con una provisión normal de nitrógeno, los que no nodularon.

Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 1.

A partir de la segunda semana de julio, comenzaron a desaparecer los síntomas de deficiencia de nitrógeno en las plantas noduladas, mientras que los testigos, cuyo crecimiento era escaso, habían perdido en ese momento la mayor parte de sus hojas. Las plantas de *D. americana* cultivadas en solución con nitrógeno, carecían de nódulos y mostraban buen crecimiento.

Fig. 1. — A, *Colletia spinosissima* Gmel.: sección transversal de una rama nodular (BAA 6683); B, *Discaria serratifolia* (Vent.) Benth. et Hook.: sección longitudinal de un nódulo radical en formación (BAA 14682). Cex, corteza externa; Cin, corteza interna; Dr, drusas; e, células hospedantes del endófito; En, endodermis; Fl, floema; Fs, floema secundario; Pe, parénquima cortical; Rz, rizodermis; Si, súber incipiente; Xi, xilema; Xs, xilema secundario; Zp, zona periclélica.

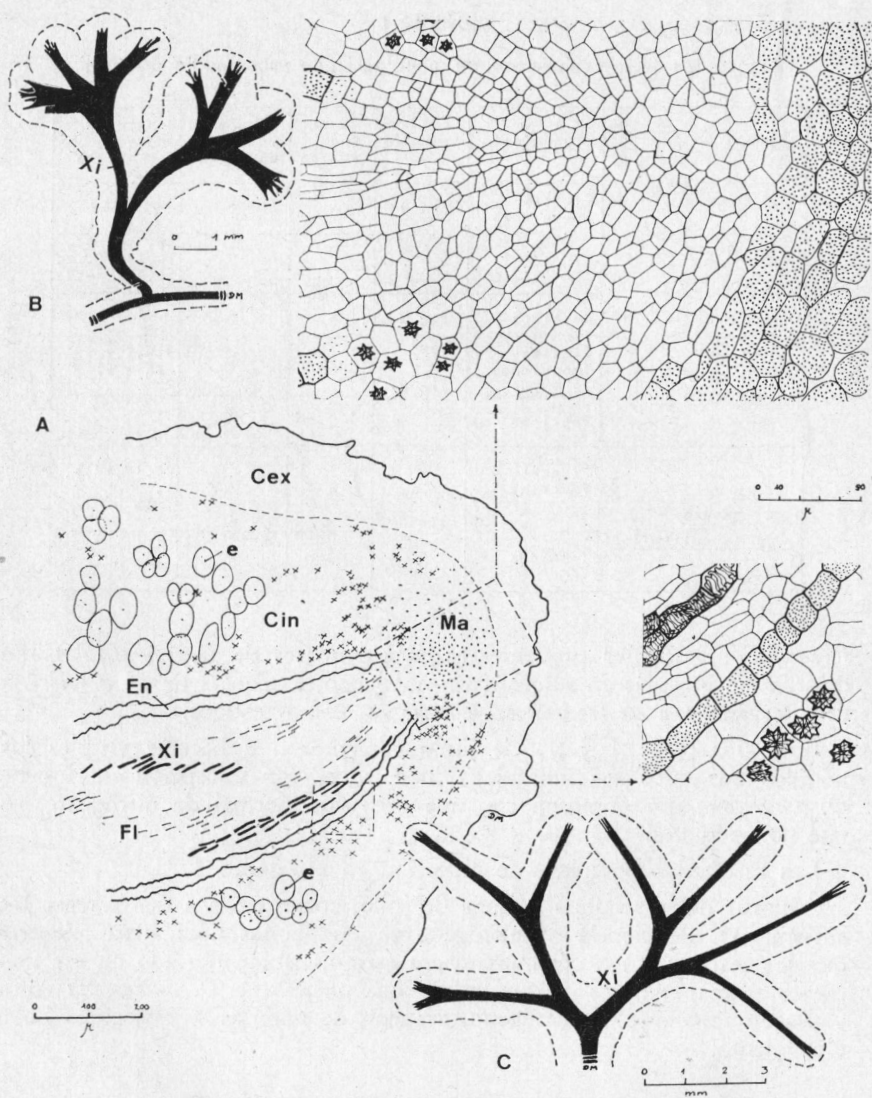


Fig. 2. — A, *Discaria serratifolia* (Vent.) Benth. et Hook.: sección longitudinal de una rama nodular, con detalles ampliados (BAA 14384); B, *D. serratifolia*: nódulo diafanizado (BAA 10897); C, *Colletia spinosissima* Gmel.: fragmento de nódulo radical diafanizado (BAA 6683). Cex, corteza externa; Cin, corteza interna; e, células hospedantes del endófito; En, endodermis; Fl, floema; Xi, xilema.

La mayor parte de las plantas de *D. americana* y algunas de las restantes especies formaron numerosos nódulos pequeños, repartidos en todo el sistema radical.

DISCUSION DE LOS RESULTADOS

Teniendo en cuenta su origen y estructura, los nódulos radicales de *Discaria serratifolia*, *D. trinervis*, *D. americana*, *D. nana*, *Colletia paradoxa* y *C. spinosissima* se interpretan como raíces laterales que presentan las siguientes modificaciones con respecto a las raíces normales: ramificación dicotómica, crecimiento restringido, presencia de células hipertrofiadas que hospedan un microorganismo, ausencia de rizodermis y ausencia de caliptra. Los dos últimos caracteres, de acuerdo a la bibliografía consultada, no habían sido explícitamente señalados previamente.

Dichos nódulos presentan caracteres semejantes, en todas las especies estudiadas, correspondiendo al tipo presente en las Betuláceas, Eleagnáceas, Coriariáceas, Rosáceas (Allen & Allen, 1958: 48; Becking, 1970 a: 639) y dentro de las Ramnáceas, en *Ceanothus* (Bottomley, 1915: 606-8) y en *Discaria toumatou* Raoul (Morrison & Harris, 1958: 1746).

El organismo presente en los nódulos resulta semejante al observado por Morrison & Harris (loc. cit.) en *D. toumatou*. Becking (1970 b: 210) denominó al mismo *Frankia discariae*, ubicándolo entre las Frankiáceas, familia de *Actinomycetales* en que dicho autor ha reunido los organismos hallados en los nódulos de "no-Leguminosas".

Debe mencionarse que, en coincidencia con lo observado en *Ceanothus* spp. y en *D. toumatou*, no se han hallado las denominadas "polyhedral cells" o "bacteroids", que constituyen una fase del ciclo vital del endófito en las Betuláceas, Eleagnáceas, etc.

Becking (1970 b: 206) señala que en aquellas especies en las cuales dichas células poliédricas no han podido ser observadas, no se ha logrado la formación de nódulos cuando, cultivadas en solución nutritiva, fueron inoculadas con una suspensión de macerado de nódulos. Sin embargo, en la experiencia llevada a cabo en especies de *Discaria*, se produjeron nódulos en todas las plantas tratadas cuando fueron cultivadas en solución libre de N. El tiempo entre la inoculación y la aparición de los nódulos, aproximadamente 2 semanas, fue el mismo que el señalado para especies de otros géneros en los cuales las células poliédricas están presentes.

Los nódulos numerosos y pequeños, repartidos en el sistema radical, como los formados en la experiencia realizada en *D. americana* y en algunos individuos de las restantes especies, son considerados por Bond (1967: 66) como una manifestación de incompatibilidad entre endófito y huésped.

Resultaría conveniente confirmar y cuantificar la fijación de nitrógeno atmosférico en las especies estudiadas de *Discaria* y *Colletia*, y sería

interesante que fuesen investigadas las raíces de las restantes especies de la tribu Colletieas presentes en nuestro país, *Kerthrohamnus weddellianus* (Miers) Johnst. y *Trevoa patagonica* Speg.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al personal del Centro de Radiobiología de la Facultad de Agronomía de Buenos Aires la colaboración prestada, y en particular al Director, Ing. Agr. Aníbal H. Merzari, su guía y valiosos consejos. Asimismo deseamos agradecer a la Dra. Susana Rossi, de la Cátedra de Fisiología Vegetal de esta Facultad, el facilitarnos el acceso a sus trabajos inéditos sobre este tema.

Material examinado:

D. serratifolia (Vent.) Benth. et Hook.: Neuquén, dpto. Huiliches, lago Huechulafquen (BAA 14682, 14683, 14684, m.c. 2253). Río Negro, dpto. Bariloche, Cerro Tronador (BAA 10897, m.c. 3044). Chubut, dpto. Cushamen, lago Puelo (BAA 14685, 14686). Capital Federal, cult. Hort. Bot. Fac. Agr. n° 74/2 (BAA 14385, m.c. 3062), proveniente de semilla del ejemplar: Río Negro, dpto. Bariloche, S. C. de Bariloche (BAA 10750); cult. Hort. Bot. Fac. Agr. n° 74/1 (BAA 14384, m.c. 3061), proveniente de semilla del ejemplar: Chubut, dpto. Cushamen, lago Puelo (BAA 10776).

D. trinervis (Gill.) Reiche: Neuquén, dpto. Huiliches, lago Huechulafquen (BAA 14674, m.c. 2250). Capital Federal, cult. Hort. Bot. Fac. Agr. n° 74/3 (BAA 14386, m.c. 3063), proveniente de semilla del ejemplar: Río Negro, dpto. Bariloche, río Limay (BAA 10744).

D. nana (Clos) Weberb.: Santa Cruz, dpto. Lago Buenos Aires, R. P. 1101, a 79 km N.O. de Perito Moreno, O. Boelcke 16118 (BAA y BAB).

D. americana Gill. et Hook.: Buenos Aires, pdo. Gral. Lavalle: La Lucila del Mar (BAA 14388, m.c. 3064); Mar de Ajó (BAA 14389, m.c. 3066). Capital Federal, cult. Hort. Bot. Fac. Agr. (BAA 15057).

C. paradoxa (Spreng.) Escal.: Buenos Aires, pdo. Balcarce, próximo a la Estación Terrena (BAA 14390, m.c. 3069). Capital Federal, cult. Hort. Bot. Fac. Agr. n° 74/4 (BAA 14387, m.c. 3067).

C. spinosissima Gmel.: Neuquén, dpto. Huiliches, lago Huechulafquen (BAA 14676, m.c. 2251). Capital Federal, cult. Hort. Bot. Fac. Agr. n° 0/607 (BAA 9717, 2743, 6683, m.c. 3070).

BIBLIOGRAFIA

- ALLEN, E. K. and ALLEN, O. N., 1958. Biological aspects of symbiotic nitrogen fixation. *Enc. Pl. Phys.* 8: 48-118.
- BECKING, J. H., BOER, W. E. DE and HOUWINK, A. L., 1964. Electron microscopy of the endophyte of *Alnus glutinosa*. *Antonie van Leeuwenhoek (J. Microbiol. Seriol.)* 30: 343-376.
- BECKING, J. H., 1966. Rapport général. Interactions nutritionnelles plantes-actinomycetes. *Ann. Inst. Pasteur* 111 (suppl. au n° 3): 211-246.
- 1968. Nitrogen fixation by non-leguminous plants. *Stikstof* 12: 47-74.
- 1970 a. Plant-endophyte symbiosis in non-leguminous plants. *Plant and Soil* 32: 611-654.
- 1970 b. *Frankiaceae*, fam. nov. (*Actinomycetales*) with one new combination and six new species of the genus *Frankia* Brunchorst 1886, 174. *Int. J. Syst. Bact.* 20: 201-220.
- 1975. Root nodules in non-legumes. In Torrey, J. G. and Clarkson, D. T. (eds.), The development and function of roots. 3rd. Cabot Symposium, 1974. Academic Press, London, 620 p.
- BOND, G., FLETCHER, W. W. and FERGUSON, T. P., 1954. The development and function of the nodules of *Alnus*, *Myrica* and *Hippophaë*. *Plant and Soil* 5 (4): 309-323.
- BOND, G., 1957. The development and significance of the root nodules of *Casuarina*. *Ann. Bot.* 21: 373-380.
- BOND, G. and GARDNER, I. C., 1957. Nitrogen fixation in non-legume root nodule plants. *Nature (London)* 179: 680-681.
- BOND, G., 1963. Root nodules of non-leguminous Angiosperms. In Nutman, P. S. and Mosse, B. (eds.), Symbiotic associations. 13th. Symposium Soc. Gen. Microbiol.: 72-91. London, 365 p.
- 1967. Fixation of nitrogen by higher plants other than legumes. *Ann. Rev. Pl. Physiol.* 18: 107-126.
- 1976. The results of the IBP survey of root-nodule formation in non-leguminous angiosperms. In Nutman, P. S. (edit.), Symbiotic nitrogen fixation in plants (IBP vol. 7): 443-474.
- BOTTOMLEY, W. B., 1911. The structure and physiological significance of the root nodules of *Myrica gale*. *Proc. roy. Soc. B*, 84: 215-216.
- 1912. The root nodules of *Myrica gale*. *Ann. Bot. (London)* 26: 111-117.
- 1915. The root nodules of *Ceanothus americanus*. *Ann. Bot. (London)* 29: 605-610.
- CARPIO, D., 1973. El método del acetileno-etileno para la determinación de la fijación del nitrógeno atmosférico por vía biológica. *IDIA Suplemento* 24: 10-13.
- CASTELLANOS, A., 1944. Los tubérculos radiculares del aliso (*Alnus jorullensis* H. B. K. var. *spachii* Regel). *Lilloa* 10: 413-416.
- DALTON, D. A. and NAYLOR, A. W., 1975. Studies in N-fixation by *Alnus crispa*. *Am. J. Bot.* 62 (1): 76-80.
- DELWICHE, C. C., ZINKE, P. J. and JOHNSON, C. M., 1965. Nitrogen fixation by *Ceanothus*. *Plant Physiology (Lancaster)* 40: 1045-1047.
- FERGUSON, T. P. and BOND, G., 1953. Observations on the formation and function of the root nodules of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. *Ann. Bot.* 17: 175-188.
- GARDNER, I. C., 1958. Nitrogen fixation in *Elaeagnus* root nodules. *Nature (London)* 181: 717-718.
- HARRIS, G. P. and MORRISON, T. M., 1958. Fixation of Nitrogen-15 by excised nodules of *Coriaria arborea* Lindsay. *Nature (London)* 182: 1812.

- HAWKER, L. E. and FRAYMOUTH, J., 1951. A re-investigation of the root-nodules of species of *Eleagnus*, *Hippophaë*, *Alnus*, and *Myrica*, with special reference to the morphology and life histories of the causative organism. *J. Gen. Microbiol.* 5: 369-386.
- MACHILS, L. and TORREY, J., 1956. *Plants in action*. Freeman, San Francisco.
- MERZARI, A. H. y CARPIO, D., 1976. Las posibilidades que ofrece el método del acetileno-etileno para el estudio de la fijación biológica del nitrógeno. Centro de Radiobiología, Facultad de Agronomía, U.B.A. 9 p.
- MEYEN, J., 1829. Über das Herauswachsen parasitischer Gewächse aus den Wurzeln anderer Pflanzen. *Flora* (Jena) 12: 49-64.
- MORRISON, T. M. and HARRIS, G. P. 1958. Root nodules in *Discaria toumatou* Raoul. *Nature* (London) 182: 1746-1747.
- MORRISON, T. M., 1961. Fixation of Nitrogen-15 by excised nodules of *Discaria toumatou*. *Nature* (London) 189: 945.
- QUISPEL, A., 1961. Some aspects of root-nodule symbiosis in non-leguminous plants. *Rec. Adv. in Bot.* 1: 593-596.
- RODRIGUEZ-BARRUECO, C., 1966. Fixation of Nitrogen in root nodules of *Alnus jorullensis* H. B. and K. *Phyton* (Bs. As.) 23: 103-110.
- 1969. The occurrence of nitrogen-fixing nodules on non-leguminous plants. *Bot. J. Linn. Soc.* 62: 77-84.
- ROSSI, S., 1964. Propagation dans le sol de l'organisme causant des nodosités dans les racines d'aune (*Alnus glutinosa*). *Ann. Inst. Pasteur* 106: 505-510.
- SCHNACK, B. y COVAS, G., 1946. Nódulos radicales en *Larrea divaricata* Cav. *Rev. Arg. Agron.* 13: 236-237.
- SILVER, W. S., 1964. Root nodule symbiosis. I. Endophyte of *Myrica cerifera* L. *J. of Bacteriology* 87 (2): 416-421.
- SPRATT, E. R., 1912. The morphology of the root tubercles of *Alnus* and *Elaeagnus*, and the polymorphism of the organism causing their formation. *Ann. Bot.* (London) 26: 119-128.
- STRAND, R. and LAETSCH, W. M., 1974. Ultrastructure of the root nodule endophyte of *Ceanothus integerrimus* H. et A. *Amer. J. Bot.* 61 (5, suppl.).