

**DOS PLANTAS ACTINORRIZICAS Y SU RESPUESTA A LA INOCULACIÓN  
MICORRIZICA Y FRANKIA**

por Laura Leticia Barrera Necha y \*  
Francisco Javier García Suárez \*

**TWO ACTINORRHIZAL PLANTS AND THEIR RESPONSE TO MYCORRHIZAL AND  
FRANKIA INOCULATION**

**SUMMARY**

Two actinorrhizal plants inoculated with three vesicular arbuscular mycorrhizal fungi were tested for their ability to infect the roots and increase the growth of *Casuarina equisetifolia* and *Alnus accuminata* ssp. *glabrata*. The fungus used produced different effects according to the host plant. There was no correlation between the percentage of root infection and the stimulation of growth in *C. equisetifolia*, whereas a correlation existed in *Alnus accuminata* ssp. *glabrata*. No fungal specificity of the endophyte for the host plant was observed. *A. accuminata* ssp. *glabrata* and *C. equisetifolia* seedlings were successfully inoculated with *Glomus intraradix* and isolates of *Frankia* (AvsI3, CcI3) simultaneously. The effects of the inoculation treatment on the growth performance of the seedlings were evaluated under controlled conditions. The highest growth performance and mycorrhizal infection occurred when the seedlings were inoculated simultaneously with *Glomus intraradix* and *Frankia*.

**RESUMEN**

Dos plantas actinorrizicas fueron inoculadas con tres hongos micorrizicos vesículo arbusculares para evaluar su capacidad de infectar las raíces e incrementar el crecimiento de *Casuarina equisetifolia* y *Alnus accuminata* ssp. *glabrata*. Los hongos usados inducen diferentes efectos de acuerdo con la planta hospedera. No hay una correlación entre el porcentaje de infección radicular y la estimulación del crecimiento en el caso de *C. equisetifolia*. Por el contrario, existió una correlación en el caso de *A. accuminata* ssp. *glabrata*. No se observó una especificidad fúngica del endófito por la planta hospedera.

\* Becarios de COFFA. Laboratorio de Biotecnología. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Instituto Politécnico Nacional. Apdo. Postal No. 24, Yautepec, Mor., C.P. 62773.

Plántulas de *A. acuminata* ssp. *glabrata* y *C. equisetifolia* fueron inoculadas exitosamente con *Glomus intraradix* y aislamientos de *Frankia* (AvsI3, CcI3) simultáneamente. Los efectos de la inoculación sobre el crecimiento de las plántulas fue evaluado bajo condiciones controladas. El mayor crecimiento e infección micorrízica ocurrió cuando las plántulas fueron inoculadas simultáneamente con *G. intraradix* y *Frankia*.

#### INTRODUCCIÓN

Las plantas no leguminosas fijadoras de nitrógeno molecular en simbiosis con la bacteria filamentosa *Frankia*, pertenecen a diferentes familias; muchas de ellas nativas de las regiones montañosas de México. Un rasgo ecológico común de estas plantas actinorrízicas es que predominan en regiones templadas, son perennes y generalmente son especies pioneras, ya que son las primeras plantas que colonizan ecosistemas nuevos o altamente perturbados, por lo que representan una alternativa para reforestar zonas erosionadas (Cruz-Cisneros y Valdés, 1990). Entre las plantas actinorrízicas de regiones tropicales la familia Casuarinaceae ha sido ampliamente estudiada, aislándose el endófito específico de *C. equisetifolia* (Diem et al., 1982), del cual su fisiología *in vitro* ha sido estudiada por diferentes científicos (Diem y Gauthier, 1982; Diem et al., 1982; Gauthier et al., 1981). Como muchas plantas, la *C. equisetifolia*, también es capaz de formar micorriza vesículo arbuscular (MVA) y ectomicorriza; se ha comprobado que esta simbiosis es un auxiliar importante en la fijación de nitrógeno, y que la inoculación con *Glomus mosseae* incrementa la nodulación y el crecimiento de *C. equisetifolia* (Diem y Gauthier, 1982). *Alnus incana* (Granhall, 1982) también es una especie actinorrízica importante en regiones frías y templadas y es una fuente energética prometedora en tales climas. El crecimiento de esta planta actinorrízica fue óptimo sin un suministro de nitrógeno y fósforo cuando se inoculó con *Frankia* y *G. mosseae* (Chatarpaul et al., 1989). En este trabajo se reporta la capacidad de diferentes hongos micorrízicos vesículo arbusculares (MVA) para infectar las raíces e incrementar el crecimiento de plántulas actinorrízicas, así como el efecto de la inoculación sencilla y doble de *C. equisetifolia* y *Alnus acuminata* ssp. *glabrata* con *Glomus intraradix* y *Frankia* sobre el crecimiento vegetal.

#### MATERIALES Y MÉTODOS

Las semillas de *Casuarina equisetifolia* y *Alnus acuminata* ssp. *glabrata* fueron esterilizadas superficialmente con agua oxigenada al 30 % por 10 minutos (Menge et al., 1978) y germinadas en arena estéril. Seis semanas más tarde, plántulas de tamaño

uniforme fueron trasplantadas a macetas de 15 cm de diámetro, las cuales, se llenaron con suelo y arena en una proporción de 1:1. La arena previamente fue esterilizada a 180 °C durante tres horas y el suelo deficiente en fósforo con una textura areno-migajosa y pH de 7.2 fue esterilizado por calor húmedo.

**Inoculación Micorrízica:** Se utilizaron los siguientes hongos MVA; *Glomus intraradix* y *Glomus vesiculiferum*, como inoculantes con 100 a 200 esporas por g de turba molida (proporcionados por Susan Parent de Premiere Ste. Foy, Québec, Canadá), *Glomus versiforme* como inóculo de raíces infectadas (proporcionado por el Dr. Valentín Furlan, Canadá, con un 80 % de micorrización) y esporas (20 a 50/g de suelo) de una población mixta de hongos micorrízicos VA de una zona forestal, extraídas mediante la técnica de tamizado y decantación de Gerdemann y Nicholson (1963). El grupo testigo de plántulas no recibió inoculación.

**Inoculación de Frankia:** Las cepas usadas fueron AvsI3 para *Alnus incana* y la cepa CcI3 para *Casuarina equisetifolia* las cuales fueron proporcionadas por el Dr. Dwight Baker de la Universidad de Yale, U.S.A. Estas cepas se hicieron crecer durante tres semanas en medio de propionato (DPM), se recolectaron y resuspendieron en agua destilada estéril y posteriormente se centrifugaron. El inóculo fue diluido (1:50) con agua estéril y se aplicó alrededor de la base de cada planta (0.5 ml/planta).

**Inoculación Doble:** Esporas del hongo endomicorrízico *G. intraradix* contenidas en turba molida fueron inoculadas a una profundidad de 5 cm de la superficie de la maceta y 0.5 ml/planta de una suspensión de *Frankia* fue adicionada en la zona radicular de las plántulas.

**Cosecha:** Después de ocho meses se evaluó la micorrización por el método de Giovannetti y Mosse (1980), se determinó el peso seco foliar, volumen de la planta y peso seco de nódulos. Los ensayos se condujeron bajo el diseño experimental de bloques al azar con 3 ó 5 repeticiones por tratamiento. Se aplicó un análisis de varianza y las medias de los tratamientos fueron analizadas usando el Examen de Intervalos Múltiple de Duncan (Steel y Torrie, 1988).

## RESULTADOS

**INFECTIVIDAD ENTRE LOS HONGOS MVA.** Existieron diferencias altamente significativas en la formación de micorriza por los diferentes hongos MVA usados (Fig. 1). Los porcentajes de micorrización obtenidos por *G. versiforme* y los hongos endomicorrízicos nativos fueron los más bajos con *Casuarina* (3%) y con *Alnus* (4%). Esta pobre infectividad puede asociarse con la fase de desarrollo del hongo; en el caso del inóculo de raíces una baja

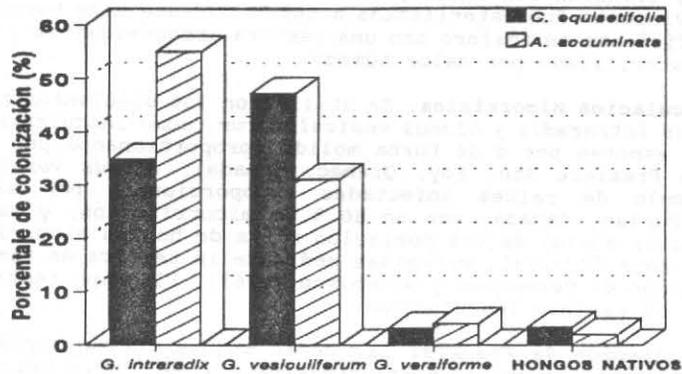


Fig. 1. Micorrización de *Casuarina equisetifolia* y *Alnus accuminata* ssp. *glabrata* inoculados con diferentes hongos micorrizicos vesículo arbusculares.

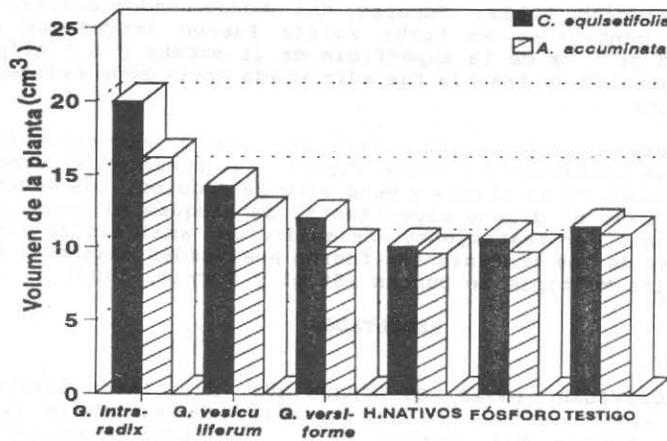


Fig. 2. Efecto de hongos micorrizicos vesículo arbusculares sobre el volumen de la planta de *C. equisetifolia* y *Alnus accuminata* ssp. *glabrata*.

producción de esporas por gramo de raíz infectada o bien una menor sobrevivencia de hifas infectivas (Abbott y Robson, 1981). La baja infectividad del inóculo de hongos nativos puede asociarse con una menor germinación de esporas lo cual afecta la velocidad de infección (Abbott y Robson, 1978), *G. intraradix* presentó un nivel intermedio de micorrización con *Casuarina* (34%) y los mayores porcentajes de micorrización con *Alnus* (55%). Sin embargo, *G. vesiculiferum* presentó los mayores porcentajes de micorrización con *Casuarina* (47%) y un nivel intermedio de micorrización con *Alnus* (31%), lo cual pone de manifiesto los diferentes potenciales de infectividad de los hongos endomicorrízicos usados bajo las mismas condiciones experimentales.

**RESPUESTA DE *Casuarina* y *Alnus* A LA INOCULACIÓN CON MVA.** Las plantas micorrízicas crecen más rápido que las plantas no micorrízicas, debido a que los hongos MVA incrementan la absorción de nutrimentos esenciales para el crecimiento (Menge et al., 1975). El incremento del crecimiento de *Casuarina equisetifolia* sólo se manifestó con *G. intraradix*, aumentó significativamente el volumen de la planta hasta un 60 % con relación al testigo; también se observó un incremento del 20 % en peso seco aéreo. Las plantas de *Alnus acuminata* no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, sin embargo, se observó un incremento del 50 % en el volumen de la planta y 15 % en el peso seco aéreo cuando fue inoculada con *G. intraradix*, en comparación con los testigos (Fig. 2). La efectividad de *G. intraradix* en términos de incremento de volumen de la planta y peso seco no se relaciona directamente con la infectividad del hongo. Mientras que la efectividad de *G. intraradix* sobre *Alnus acuminata* está relacionada directamente con la infectividad (Figs. 1 y 2); la estimulación del crecimiento no está necesariamente relacionado con la intensidad de la colonización (Daft y Okusanya, 1973).

**EFFECTO DE LA INOCULACIÓN BIPARTITA SOBRE *Casuarina* y *Alnus*.** Analizando los promedios del crecimiento alcanzado y la infección por los hongos endomicorrízicos, se observó que el peso seco, el volumen de la planta, el peso seco de nódulos y el porcentaje de infección micorrízica (Tabla 1) fueron significativamente más altos cuando las plántulas fueron inoculadas en combinación con hongos endomicorrízicos y *Frankia*, en comparación con la inoculación sencilla. Tanto con *Alnus* como con *Casuarina* la infección producida por *G. intraradix* se incrementó cuando las plantas crecieron junto con *Frankia*. El peso seco de nódulos se incrementó cuando *Frankia* y los hongos MVA fueron inoculados juntos en comparación con la inoculación sencilla de *Frankia*. Estos resultados coinciden con los reportados por otros autores (Chatarpaul et al., 1989, Mejstrik y Benecke, 1969) y apoyan la hipótesis de sinergismo positivo de los hongos MVA y la nodulación de estas plantas actinorrízicas (Figs. 3 y 4).

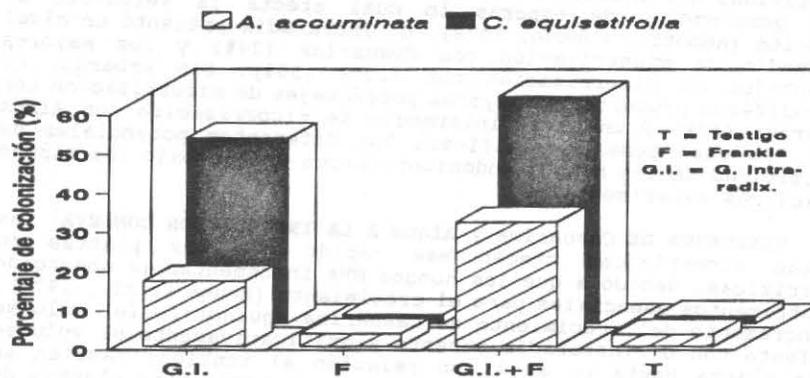


Fig. 3. Efecto de la inoculación bipartita sobre el porcentaje de micorrización.

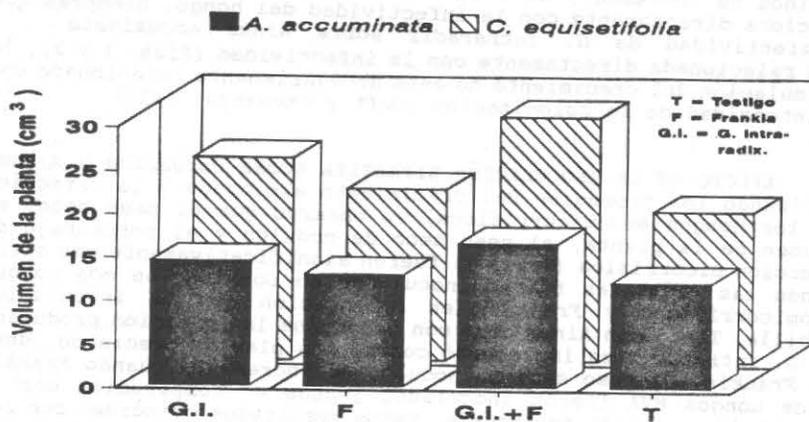


Fig. 4. Efecto de la inoculación bipartita sobre el volumen de la planta.

**TABLA 1. Simbiosis bipartita (endomycorriza y Frankia) sobre el crecimiento de Casuarina equisetifolia y Alnus accuminata ssp. glabrata.**

	<i>G. intraradix</i>	<i>Frankia</i>	G.I. + F	Testigo
<b>C. equisetifolia</b>				
Volumen	23.21 b	19.70 ab	27.97 c	17.21 a
Peso seco foliar	3.39 b	2.95 ab	4.31 c	2.87 a
Peso seco nódulos	0.00 a	8.30 b	9.50 c	0.00 a
Micorrización (%)	47.28 b	2.30 ab	58.00 c	1.92 a
<b>A. acuminata</b>				
Volumen	14.25 b	12.82 ab	16.38 c	11.94 a
Peso seco foliar	3.54 b	2.68 ab	4.86 c	1.94 a
Peso seco nódulos	0.00 a	1.60 b	6.30 c	0.00 a
Micorrización (%)	16.66 b	3.30 a	31.66 c	3.10 a

Volumen = 2 (diámetro) x altura.  
 Los valores son las medias de 5 repeticiones. La media seguida por la misma letra no es diferente significativamente una a otra (p=0.05).

#### DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este ensayo son preliminares y muestran que las plantas actinorrízicas no responden de igual forma a los hongos MVA y que, además, dichos hongos varían en su capacidad para estimular el crecimiento de la planta, lo cual coincide con lo reportado por otros autores (Menge y Johnson, 1978). Asimismo, se demuestra la presencia de una simbiosis bipartita, la cual, tiene beneficios adicionales para las plantas actinorrízicas debido a la posible existencia de un sinergismo positivo entre el sistema micorrízico y el sistema actinorrízico. La simbiosis bipartita de *Alnus* y *Casuarina* es probablemente una estrategia que permite crecer a estas plantas bajo condiciones ambientales extremas, puesto que les permiten absorber más nutrientes y agua; favorece la sobrevivencia en condiciones edáficas adversas tales como pH bajo y temperaturas altas (Harley y Smith, 1983). Las implicaciones prácticas de esta simbiosis bipartita puede ser la inoculación de plantas en los viveros para la obtención de especímenes saludables, que crezcan mucho más rápido y que se puedan trasplantar en sitios pobres en nitrógeno y fósforo.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores de este trabajo agradecen el apoyo financiero para la realización de esta investigación al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Clave D112-904629. Asimismo se agradece a los M. en C. Lucía Varela y Arturo Estrada-Torres las sugerencias hechas al manuscrito.

#### LITERATURA CITADA

- Abbott, L.K. y A.D. Robson, 1978. Growth of subterranean clover in relation to the formation of endomycorrhizas by introduced and indigenous fungi in a field soil. *New Phytol.* 81: 575-587.
- Abbott, L.K. y A.D. Robson, 1981. Infectivity and effectiveness of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi: Effect of inoculum type. *Aust. J. Agric. Res.* 32: 631-639.
- Cruz-Cisneros, R. y M. Valdés, 1990. Ecological aspects of the actinorrhizal plants growing in the Basin of Mexico. *Nitrogen Fixing Trees Rep.* 8: 4.
- Chatarpaul, L., P. Chakravarty y P. Subramaniam, 1989. Studies in tetrapartite symbioses. 1. Role of ecto and endomycorrhizal fungi and *Frankia* on the growth performance of *Alnus incana*. *Plant and Soil* 118: 145-150.

- Daft, M.J. y B.O. Okusanya, 1973. Effect of Endogone mycorrhiza on plant growth. VI. Influence of injection on the anatomy and reproductive development in four hosts. *New Phytol.* 72: 1333-1339.
- Diagne, O. y F. Le tacon, 1982. Les mycorrhizes biologie et utilization. *Coll. I N R A* 13. 199-206.
- Diem, H.G. y D. Gauthier, 1982. Isolement et culture *in vitro* d'une souche infective et effective de *Frankia* isolee de nodules de *Casuarina* sp. *C.R. Hebd Seantes Acad. Sci. Paris. Sér, C.* 295, 759-763.
- Diem, H.G., D. Gauthier y Y.R. Dommergues, 1982. Isolation of *Frankia* from nodules of *Casuarina equisetifolia*. *Can. J. Microbiol.* 28: 526-530.
- Gautier, D.L., M.G. Diem y Y.D. Dommergues, 1981. *In vitro* nitrogen fixation by two actinomycets strains isolated from *Casuarina* nodules. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 306-308.
- Granhall, V. 1982. The use of *Alnus* in energy forestry. *Proc. of the 2nd National Symposium on Nitrogen Fixation.* The Finish National Found for Research and Developement.
- Gerdemann, J.W. y T.H. Nicholson, 1963. Spores of mycorrhizal endogone species extracted form soil by wet sieving and decanting. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 46: 235-244.
- Giovannetti, M. y B. Mosee, 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New. Phytol.* 84: 489-500.
- Harley, J.L. y S.E. Smith, 1983. *Mycorrhizal Symbiosis.* Acad. Press, Londres.
- Mejstrik, V. y B. Benecke, 1969. The ectotrophic mycorrhizae of *Alnus viridis* (Chaix) D.C. and their significance in respect to phosphorous uptake. *New Phytol.* 69: 141-149.
- Menge, J.A., J.W. Gerdemann y H.W. Lembright, 1975. Mycorrhizal fungi and citrus. *The Citrus Industry* 61: 16-18.
- Menge, J.A. y E.L.V. Johnson, 1978. Commercial production of mycorrhizal inoculum may benefit citrus groves. *Citrograph* 63: 139-143.
- Menge, J.A., E.L.V. Johnson y E.G. Platt, 1978. Mycorrhizal dependency of several citrus cultivars under three nutrient regimes. *New Phytol.* 81: 553-559.
- Neal, J.L., J.M. Trappe, K.C. Lu y W.B. Bollen, 1967. Sterilization of red alder seedcoats with hydrogen peroxide. *For. Sci.* 13: 104-105.
- Pilet, P.E. y G. Collet, 1962. *Méthodes d'analyse du catabolisme auxinique.* Zwahlen, Lausanne.
- Steel R.G.D. y J.H. Torrie, 1988. *Principles and Procedures of Statistics,* 2a. ed. McGraw-Hill, Nueva York.