

## MICORRIZAS ARBUSCULARES EN PLANTINES DE *ALNUS ACUMINATA* (BETULACEAE) INOCULADOS CON *GLOMUS INTRARADICES* (GLOMACEAE)

ALEJANDRA BECERRA<sup>1</sup> y MARTA CABELLO<sup>2</sup>

**Summary:** Arbuscular mycorrhizas in *Alnus acuminata* (Betulaceae) seedlings inoculated with *Glomus intraradices* (Glomaceae). This work described for the first time the arbuscular mycorrhiza (AM) development in *A. acuminata* Kunth «andean alder» with *G. intraradices* Schenk & Smith. Seedlings of *A. acuminata* were inoculated with root fragments of *Medicago sativa* L. colonized by *G. intraradices* in a greenhouse. The *Arum*-type and AM colonization are described in *A. acuminata* seedlings. The presence of arbuscules in *A. acuminata* cortical cells define a functional symbiosis.

**Key words:** *Alnus*, *Glomus intraradices*, arbuscular mycorrhiza, inoculation, *Arum*-type colonization.

**Resumen:** En este trabajo se cita y describe por primera vez la asociación de *Alnus acuminata* Kunth «aliso del cerro» con el hongo formador de micorrizas arbusculares (MA) *Glomus intraradices* Schenk & Smith. En un bioensayo en invernadero, se inocularon plantines de *A. acuminata* con fragmentos radicales de *Medicago sativa* L. colonizados por *G. intraradices*. Se describe la colonización MA y el tipo anatómico *Arum*. Se establece la funcionalidad de la simbiosis por la presencia de arbuscúlos en las células corticales de la raíz.

**Palabras clave:** *Alnus*, *Glomus intraradices*, micorrizas arbusculares, inoculación, colonización tipo *Arum*.

### INTRODUCCIÓN

Los hongos del suelo pertenecientes a los Glomeromycota (Schüßler *et al.*, 2001) forman una relación simbiótica con la mayoría de las especies de plantas llamada micorrizas arbusculares (MA) (Smith & Read, 1997). En la colonización MA se reconocen dos tipos anatómicos principales: *Arum* y *Paris* descritos por Gallaud (1905). En el tipo *Arum*, las hifas crecen intercelularmente en la corteza radical y forman arbuscúlos finos y altamente ramificados dentro de las células. En el tipo *Paris*, las hifas forman circunvoluciones intraradicales y, ocasionalmente, se forman estructuras semejantes a arbuscúlos e hifas arbusculares (Karandashov & Bucher, 2005).

*Alnus acuminata* Kunth (Betulaceae) («aliso del cerro») presenta en sus raíces una simbiosis tripartita con un actinomicete del género *Frankia*, y con especies de hongos micorrícicos formando

ectomicorrizas y MA (Carú *et al.*, 2000; Becerra *et al.*, 2005). Una simbiosis dual entre las raíces de plantas y microorganismos como los hongos micorrícico-arbusculares (HMA) y *Frankia*, ocurre en las diferentes especies de *Alnus*; esto permite que las plantas sean capaces de fijar di-nitrógeno y absorber P, representando una ventaja para su crecimiento y desarrollo con mayor tolerancia al estrés medioambiental (Berliner & Torrey, 1989) si se lo compara con el efecto de un único simbiote (Oliveira *et al.*, 2005).

La presencia de MA en raíces del género *Alnus* es controvertida (Molina *et al.*, 1994). Rose (1980) reportó el desarrollo de MA en *A. rubra*, mientras que Miller *et al.* (1992) no detectaron MA en el mismo hospedante. Hall *et al.* (1979), Rose (1980) y Beddiar (1984) describieron asociación con endomicorrizas arbusculares en *A. glutinosa*, sin embargo Pritsch *et al.* (1997) no la observaron en esta especie. La presencia de MA también ha sido citada en *A. crispa* (Daft, 1983), en *A. incana* (Chatarpaul *et al.*, 1989, Averby & Ulf, 1998) y en *A. japonica* (Chatarpaul *et al.*, 1989).

<sup>1</sup>Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV)-CONICET, UNC. C.C.495. 5000 Córdoba.

E-mail: abecerra@efn.uncor.edu

<sup>2</sup>Instituto Spigazzini. Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Avenida 53, N° 477. 1900 La Plata.

Los antecedentes sobre las MA en *A. acuminata* sólo se remiten a la colonización (Becerra, 2002), desconociéndose si esta simbiosis es funcional. No existen estudios sobre el tipo anatómico de colonización que se desarrolla en esta especie. Por estas razones, se plantearon como objetivos de este trabajo, establecer si la simbiosis MA en *A. acuminata* es funcional y determinar el tipo anatómico de su colonización.

## MATERIAL Y MÉTODO

Se utilizó *Glomus intraradices* Schenk & Smith [La Plata, Spagazzini Herbarium (LPS), cultivo TF28] como cepa de hongo micorrízico arbuscular. El inóculo consistió en segmentos de raíces de *Medicago sativa* L. colonizadas. Además, las plántulas fueron inoculadas con nódulos radicales frescos del Actinomycete *Frankia*. Estos nódulos fueron esterilizados con lavandina al 30% y posteriormente macerados.

Se esterilizaron semillas de *A. acuminata* en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %) durante 10 minutos, se enjuagaron con agua destilada y se colocaron para su germinación sobre un papel de filtro húmedo dentro de cápsulas de Petri esterilizadas. Se prepararon 10 tubetes (20 cm de largo x 4 cm de ancho) con vermiculita y perlita (1:1) esterilizadas en autoclave (60 min. a 2 atm. de presión). En cada uno de los tubetes se colocaron 2 g. de segmentos de raíces de *Medicago sativa* L. colonizados por *G. intraradices* y 3 ml del homogeneizado de nódulos de *Frankia* cerca de la base del plantín.

Una vez emergidos los cotiledones se transplantaron 3 plántulas a los tubetes, previa inoculación y se hicieron crecer en invernadero (10 hs. luz, temperatura 13-24° C) durante 8 semanas. Al final del ensayo se extrajo el sistema radical completo de cada plántula y se analizó su colonización siguiendo la técnica de Phillips & Hayman (1970). La colonización MA -hifas, puntos de entrada, circunvoluciones, vesículas, arbusculos- fue observada bajo microscopio óptico Kyowa 4-100X y fotografiada con microscopio Zeiss Axiophot 20-100X, utilizando película blanco y negro (Agfa).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los plantines de *A. acuminata* resultaron

micorrizados con *G. intraradices* (Fig. 1) observándose que en el aliso del cerro se forman las estructuras típicas de los HMA.

La colonización micorrízica en *A. acuminata* corresponde al tipo anatómico *Arum* (hifas y vesículas intra- e inter-celulares, arbusculos terminales). En las raíces de *A. acuminata* se observaron puntos de entrada (Fig. 1A), circunvoluciones (Fig. 1B), hifas intra e intercelulares (Fig. 1C, D), de 2,4-5 µm diámetro, ramificadas, de paredes delgadas y vesículas ovales a alargadas (Fig. 1 E, F), de 24-41 µm diámetro, de paredes delgadas. Existen pocos antecedentes sobre el tipo anatómico que adopta la colonización MA en la Familia Betulaceae. En *A. acuminata* se observó el tipo anatómico *Arum*. Resultados similares fueron observados por Maremmani *et al.* (2003) en raíces de *Alnus glutinosa* (L.) Gaetrn. en dos reservas naturales de Italia.

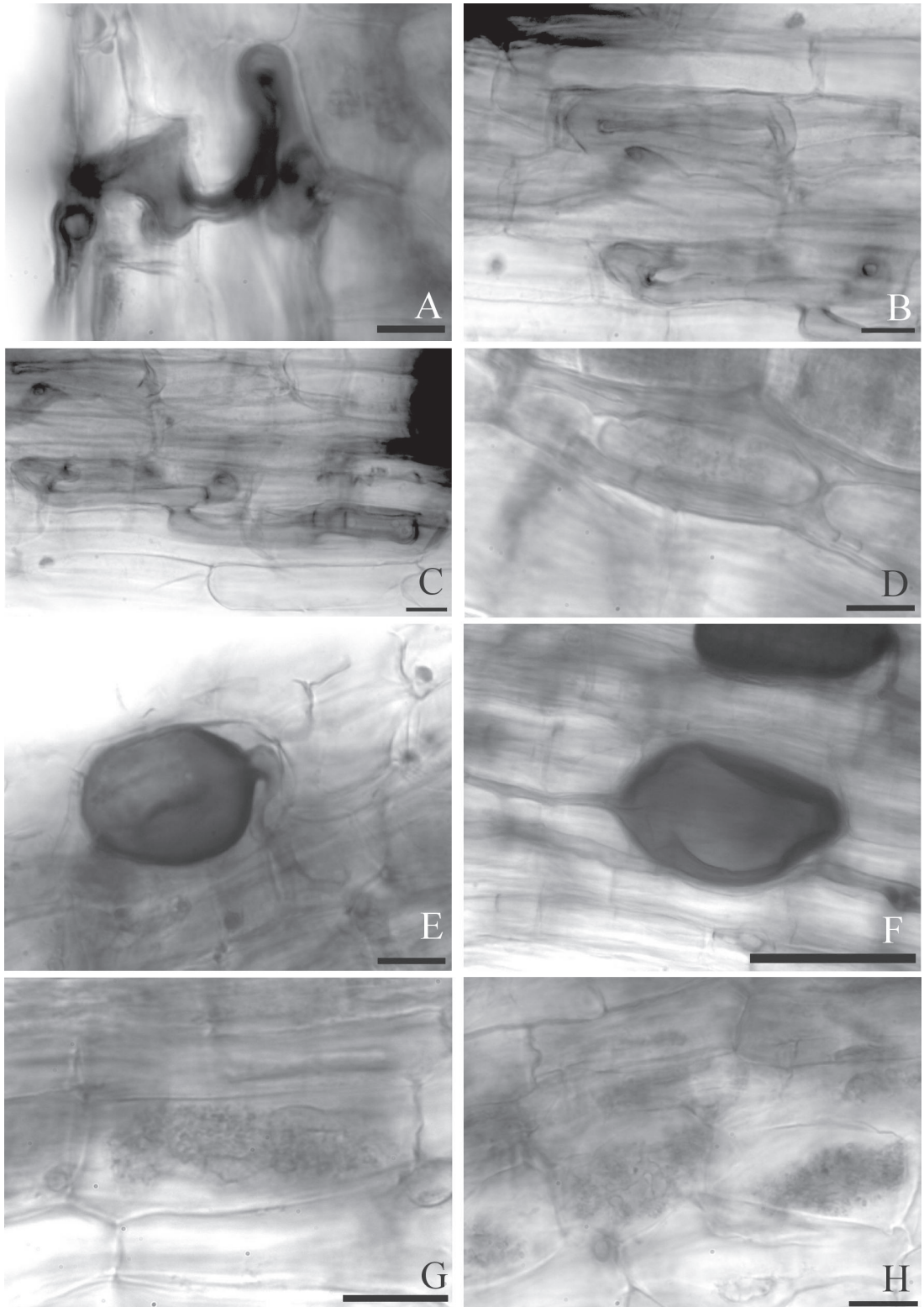
Giovannetti *et al.* (1994) establecieron que la presencia de arbusculos define la funcionalidad de la simbiosis. En este bioensayo se observaron arbusculos simples y terminales (Fig. 1 G, H) que confirman que *A. acuminata* se asocia a hongos arbusculares estableciendo una simbiosis funcional.

En este trabajo se cita por primera vez la inoculación de *A. acuminata* con fragmentos radicales colonizados con *G. intraradices*. Otras inoculaciones de *Alnus* con esporas de la misma especie de hongo arbuscular, fueron realizadas por Smith *et al.* (1998) y Oliveira *et al.* (2005). El empleo de raíces colonizadas se corresponde con la situación que se da en las comunidades boscosas deciduas, donde la mayor fuente de inóculo de MA son los fragmentos radicales (Read *et al.*, 1976).

Este bioensayo realizado pone de manifiesto la micotrofia de *Alnus acuminata*. *Glomus intraradices* se asocia a esta especie forestal y su tipo anatómico corresponde a *Arum*. Se establece una simbiosis funcional por la proliferación de arbusculos en las células corticales de plántulas de 8 semanas.

## AGRADECIMIENTOS

A. Becerra es becaria Postdoctoral del CONICET. M. Cabello es miembro de la Carrera del Investigador CIC Prov. Bs. As.



**Fig. 1:** Micorrizas arbusculares en *Alnus acuminata*. **A:** Puntos de entrada. **B:** Circunvoluciones. **C:** Hifas intracelulares. **D:** Hifas intercelulares. **E:** Vesícula intracelular. **F:** Vesícula intercelular. **G-H:** Arbúsculos. Escala A-E, G: 10 µm, F: 50 µm.

## BIBLIOGRAFÍA

- AVERBY, A. S. & G. ULF. 1998. Occurrence and succession of mycorrhizas in *Alnus incana*. *Swed. J. Agric. Res.* 28: 117-127.
- BECERRA, A. G. 2002. Influencia de los Suelos Ustorthentes sobre las ectomicorrizas y endomicorrizas de *Alnus acuminata* H.B.K. Tesis de Maestría, UBA, Argentina.
- BECERRA, A., M. R. ZAK, T. HORTON & J. MICOLINI. 2005. Ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal colonization of *Alnus acuminata* from Calilegua National Park (Argentina). *Mycorrhiza* 15: 525-531.
- BEDDIAR, A. 1984. Les possibilites d' associations symbiotiques de l' aulne glutineux (*Alnus glutinosa* L. Gaertn.) dans divers soils de l' est de la France. D.E. A. de Biologie et Physiologie végétales. Université de Nancy I. Institut national de la recherche agronomique.
- BERLINER, R. & J. G. TORREY. 1989. On tripartite *Frankia*-mycorrhizal associations in the Myricaceae. *Canad. J. Bot.* 67: 1708-1712.
- CARÚ M., A. BECERRA, D. SEPÚLVEDA & A. CABELLO. 2000. Isolation of infective and effective *Frankia* strains from root nodules of *Alnus acuminata* (Betulaceae). *World J. Microbiol. Biotech.* 16: 647-651.
- CHATARPAUL, L., P. CHAKRAVARTY & P. SUBRAMANIAM. 1989. Studies in tetrapartite symbioses. I. Role of ecto- and endomycorrhizal fungi and *Frankia* on growth performance of *Alnus incana*. *Plant Soil* 118: 145-150.
- DAFT, M. J. 1983. The influence of mixed inocula on endomycorrhizal development. *Plant Soil* 73: 331-337.
- GALLAUD, I. 1905. Etudes sur les mycorrhizes endotrophes. *Revue Gen. Botanique* 17: 5-48, 66-85, 123-136, 223-239, 313-325, 423-433, 479-500.
- GIOVANNETTI, M., C. SBRANA & C. LOGI. 1994. Early processes involved in host recognition by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 127: 703-709.
- HALL, R. B., H. S. McNABB, C. A. MAYNARD & T. L. GREEN. 1979. Toward development of optimal *Alnus glutinosa* symbioses. *Bot. Gazzette* 140: 120-126.
- KARANDASHOV, V. & M. BUCHER. 2005. Symbiotic phosphate transport in arbuscular mycorrhizas. *Trends Plant Sci.* 10: 22-29.
- MAREMMANI, A., S. BEDINI, I. MATOŠEVIC, I., P. E. TOMEI & M. GIOVANNETTI. 2003. Type of mycorrhizal associations in two coastal nature reserves of the Mediterranean basin. *Mycorrhiza* 13: 33-40.
- MILLER, S. L., C. D. KOO & R. MOLINA. 1992. Early colonization of red alder and Douglas-fir by ectomycorrhizal fungi and *Frankia* in soils from the Oregon coast range. *Mycorrhiza* 2: 53-61.
- MOLINA, R., D. MYROLD & C. Y. LI. 1994. Root symbioses of Red Alder: Technological opportunities for enhanced regeneration and soil improvement. In: HIBBS, D. E., D. S. DE BELL & R. F. TARRANT (eds.) *The Biology and management of red alder*. Oregon State University Press, Ore.
- OLIVEIRA, R. S., P. M. L. CASTRO, J. C. DODD & M. VOSÁTKA. 2005. Synergistic effect of *Glomus intraradices* and *Frankia* spp. on the growth and stress recovery of *Alnus glutinosa* in an alkaline antropogenic sediment. *Chemosphere* 60: 1462-1470.
- PHILLIPS, J. M. & D. S. HAYMAN. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 55: 158-161.
- PRITSCH, K., J. C. MUNCH & F. BUSCOT. 1997. Morphological and anatomical characterisation of black alder *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. ectomycorrhizas. *Mycorrhiza* 7: 201-216.
- READ, D. J., H. K. KOUCHEKI & J. HODGSON. 1976. Vesicular-arbuscular mycorrhiza in natural vegetation systems. I. The occurrence of infection. *New Phytol.* 77: 641-653.
- ROSE, S. L. 1980. Mycorrhizal associations of some actinomycete nodulated nitrogen-fixing plants. *Canad. J. Bot.* 58: 1449-1454.
- SCHÜßLER, A., D. SCHWAARZOTT & C. WALKER. 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol. Res.* 105: 1413-1421.
- SMITH, J. E., K. A. JOHNSON & E. CÁZARES. 1998. Vesicular mycorrhizal colonization of seedlings of Pinaceae and Betulaceae after spore inoculation with *Glomus intraradices*. *Mycorrhiza* 7: 279-285.
- SMITH, S. E. & D. J. READ. 1997. *Mycorrhizal Symbiosis*, 2<sup>nd</sup> Edition, Academic Press, London.

Recibido el 16 de Noviembre de 2006, aceptado el 16 de Junio de 2007.