



El efecto de la interacción *Frankia* - micorrizas - micronutrientes en el establecimiento de árboles Aliso (*Alnus acuminata*) en sistemas silvopastoriles

Revista
Colombiana de
Ciencias
Pecuarias

Mauricio Molina L¹, Zoot, Esp., Marisol Medina S², IA, MSc, Hernando Orozco P³, IA, MSc.

¹ Asp. Maestría en Ciencias Animales Universidad de Antioquia, Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural de Antioquia, ² Grupo GRICA Universidad de Antioquia, Facultad de Ciencias Agrarias, ³ Consultor particular.
maumolina243@yahoo.es

(Recibido: 26 mayo, 2005; aceptado: 30 enero, 2006)

Resumen

Frankia es un género de microorganismos llamados actinomicetos capaces de inducir la formación de nódulos radiculares fijadores de nitrógeno atmosférico en algunas angiospermas no leguminosas, denominadas plantas actinorrízicas. El desarrollo de fijación de Nitrógeno (N) simbiótico envuelve múltiples procesos que se llevan a cabo en compartimentos subcelulares endosimbióticos donde *Frankia* produce los nódulos de la raíz que convierten el N₂ en forma combinada. La simbiosis micorriza y nódulo es generalmente sinérgica, promueve el crecimiento vegetal, la multiplicación de las micorrizas propicia un ambiente de mayor competencia, no favorable para los agentes patógenos. A lo anterior se debe sumar la participación de microelementos como el molibdeno (Mo), el cual es constituyente de la nitrogenasa y cuya deficiencia en el medio causa un efecto directo y negativo en la fijación del N; con el boro (B) donde su deficiencia produce una desestabilización de la cubierta protectora contra el oxígeno, afectando considerablemente la nodulación de la planta y con el cobalto (Co), forman un componente estructural de la coenzima de la vitamina B12 en el proceso de fijación de N. Sin embargo, muchos aspectos relacionados de estos microelementos en la interrelación y de la simbiosis micorriza y *Frankia* se desconocen. Por lo anterior, es importante determinar sus efectos sobre los microorganismos del suelo y el desarrollo de los nódulos; para interpretar una óptima manifestación, sin embargo su complejidad hace que su efecto no sea predecible bajo todas las condiciones ni para todas las especies. Por lo tanto, es importante incentivar la investigación al respecto, así como profundizar en el conocimiento de sus principios de funcionamiento, interacciones y mostrar los resultados encontrados en su uso en árboles promisorios para sistemas silvopastoriles trópico alto como el aliso (*Alnus acuminata*), especie forestal útil en la solución de problemas de degradación de suelos y deforestación.

Palabras clave: boro, cobalto, molibdeno, fijación de nitrógeno, plantas actinorrízicas, simbiosis.

Introducción

El nitrógeno (N), junto con el agua, es el nutriente mineral que más frecuentemente limita la producción de plantas. Aunque la atmósfera contiene casi el 80 por ciento de N, su fijación biológica representa la clave para incrementar las fuentes de N, puesto que, la mayoría de los seres vivos son incapaces de aprovecharlo en la forma en que se encuentra allí como, N₂, sólo algunos organismos procarióticos pueden

reducirlo a amonio, en un proceso conocido como fijación biológica de nitrógeno (3, 14, 29).

De otro lado, la simbiosis es una estrategia biológica de cooperación entre dos o más organismos vivos integrados dentro de un sistema orgánico, donde su interacción puede ser de mutualismo, comensalismo o parasitismo. Las asociaciones simbióticas que se

forman entre los microorganismos y plantas son caracterizados por la penetración de las células vivas de la planta por un simbiote microbiano, seguido por un período durante el cual la vida del simbiote se encuentra parcialmente o enteramente dentro de las células de la planta y son importantes debido a sus efectos sobre la morfogénesis, la nutrición, la protección contra enfermedades infecciosas y la adaptación a condiciones ambientales extremas, desempeñando un papel significativo en agricultura y ecosistemas naturales (7, 27, 30).

Se pueden encontrar tres tipos de simbiosis con plantas leguminosas y no leguminosas, de acuerdo al tipo de microorganismo simbiote que fije el nitrógeno: *Frankia*, *Rhizobium*, *Cyanobacterium*. Solo *Frankia*, tiene relaciones simbióticas con numerosas familias de plantas y es responsable del 15% del nitrógeno biológico fijado en el mundo (18, 28, 31).

La asociación de *Frankia* con plantas leñosas, como el aliso, se constituye en una de las simbiosis más representativas que tiene este actinomiceto fijador; distintos autores reportan en varias especies de *Alnus* efectos favorables de la luz y la aireación sobre la nodulación y la fijación del nitrógeno. Este proceso biológico es influido por varios factores ambientales tales como el pH y la aireación, así como el N₂ que participa en la combinación (28, 34).

Es de singular importancia los requerimientos de micronutrientes para todos estos procesos en leguminosas y en actinorrizas; el desarrollo nodular y la fijación requieren de micronutrientes como Co, B, Mo, cobre (Cu), hierro (Fe) y níquel (Ni); los tres primeros pueden limitar la fijación de nitrógeno en el campo. Las limitaciones de micronutrientes en plantas actinorrizadas han sido menos estudiadas, en especial Mo, como componente esencial de la enzima nitrogenasa, el B como estabilizador de las cubiertas del heterocisto en la membrana, principal barrera protectora para la nitrogenasa y el Co en formación de coenzimas de la vitamina B12 dentro de los endófitos de los nódulos radiculares en algunas especies (19).

La interacción *frankia*-micorriza-aliso es una relación tripartita sinérgica que beneficia a todo el sistema, aportando nutrientes y un ambiente favorable para todo el sistema silvopastoril. Así mismo, el lograr un adecuado nivel de micronutrientes en el suelo permite el aprovechamiento pleno de estas relaciones simbióticas mutualistas, que contribuyen a la

sostenibilidad del sistema; sin embargo su aplicabilidad en nuestro medio es aún incipiente y poco utilizada. Este tipo de interacciones sinérgicas, podrían ser una estrategia para el establecimiento de sistemas silvopastoriles que busquen preservar los recursos naturales y conservar el medio ambiente.

***Frankia* y las plantas actinorrízicas**

Frankia es un género de microorganismos llamado bacteria filamentososa o actinomiceto capaz de inducir la formación de nódulos radiculares fijadores de nitrógeno atmosférico en algunas angiospermas no leguminosas, denominadas plantas actinorrízicas. Estas se comportan como pioneras en el desarrollo sucesional de comunidades vegetales en suelos pobres en nitrógeno, suelos degradados y erosionados, suelos de baja fertilidad o en suelos disturbados (como erupciones volcánicas e incendios); además, pueden contribuir a aumentar los niveles de nitrógeno en los sistemas agroforestales (3, 26, 25).

Las plantas actinorrízicas se adaptan a muy diversos ecosistemas y a condiciones ambientales extremas como suelos salinos, áridos, terrenos pantanosos, son de alta resistencia a medios hostiles y es así que en los períodos glacial y post-glacial fueron muy abundantes en América del Norte y en Europa donde colonizaron los depósitos glaciales pobres en nitrógeno y aceleraron el desarrollo del suelo con incorporación de materia orgánica rica en N. Así mismo, se han encontrado evidencias fósiles del Pleistoceno del árbol aliso cuyos nódulos albergaban actinomicetos en su interior. Sin embargo no fue sino hasta 1978 que se logró aislar y cultivar el actinomiceto *Frankia* y se designó a estas plantas como actinorrízicas (1,16, 32).

Frankia es una bacteria microaerofílica y dentro de las vesículas, en los nódulos que forma, se encuentra la nitrogenasa, enzima responsable de la transformación de N₂ de la atmósfera en NH₃ asimilable por las plantas. La *Frankia* se torna aerobia cuando se le proporciona nitrógeno combinado (NH₃) en el medio de cultivo (4, 9, 36).

La cantidad de N fijado anualmente en el aliso (*Alnus sp.*) en simbiosis con *Frankia* varía de manera importante según las especies, el clima y las técnicas aplicadas por los investigadores, pero puede ubicarse en un promedio de 60 a 320kg de N/ha/año y en algunos casos a llegado a los 780kg de N en un período

de cinco años en condiciones de campo, esta capacidad varía con las condiciones climáticas (9, 10, 17).

Definición, taxonomía y funcionamiento del actinomiceto *Frankia*

La taxonomía del género se debe a Becking, quien propuso que el nombre *Frankia* resurgiera en honor del microbiólogo suizo A. B. Frank, quien acuñó el término simbiosis; así mismo, colocó al género en la familia *Frankiaceae*. Actualmente no se han definido claramente las especies (36).

La simbiosis formada por la bacteria *Frankia* y el nódulo radical de la planta se conoce con el término de actinorriza. Se han descrito en la actualidad alrededor de 200 especies de angiospermas, distribuidas en ocho familias botánicas y 25 géneros que pertenecen a estas familias de angiospermas y que tienen simbiosis con *Frankia*. Estas familias son: *Betulaceae* (un género: *Alnus*), *Casuarinaceae* (4), *Coriariaceae* (1), *Dasticaceae* (1), *Elaeagnaceae* (3), *Myricaceae* (2), *Rhamnaceae* (7) y *Rosaceae* (6). Existen plantas actinorrizas en todos los continentes, excepto en la Antártida, que son portadoras de nódulos radicales fijadores de N₂ formados por *Frankia*. Este hecho muestra una de las grandes diferencias que existen entre *Frankia* y la bacteria simbiótica fijadora de N₂, *Rhizobium*, cuyos géneros hospederos pertenecen en su mayoría a la familia de las leguminosas (7, 12, 14).

Frankia es un procarionte gram-positivo con hifas o filamentos septados, con una composición de su ADN de 70% de guanina más citosina. En cuanto a su morfología, es un organismo complejo, presenta un crecimiento pleomórfico; es decir, crecen en forma de filamentos y como la mayoría de los actinomicetos, las hifas se diferencian en esporangios. Estos contienen en su interior gran cantidad de esporas en estado latente que germinan para formar hifas cuando encuentran condiciones ambientales adecuadas (16, 34, 35).

Las hifas también pueden diferenciarse para formar una estructura que constituye un rasgo sobresaliente, la vesícula. Esta estructura está especializada en la fijación de N₂ atmosférico y se desarrolla como un hinchamiento de las hifas ramificadas lateralmente, es redonda y de pared gruesa; la función de la vesícula, es proteger a la nitrogenasa del efecto negativo del O₂. A mayor concentración de oxígeno en el medio, el

grosor de la pared envolvente (formada por capas de lípidos) también aumenta y las vesículas se observan con mayor refringencia al microscopio. En la *Frankia* de la Casuarina, se presenta la hidrogenasa, tanto en cultivo como en simbiosis. Esta hidrogenasa recicla el hidrógeno que produce la nitrogenasa al reducir los protones, incrementando la eficiencia de la nitrogenasa. Dicha enzima, requiere de níquel para el funcionamiento; cuando se agrega níquel al medio de cultivo, se incrementa la toma de H₂, pero no su desprendimiento (34, 36).

En la simbiosis, *Frankia* provee a la planta una fuente de N, y la planta provee al *Frankia* una fuente de carbono. El costo energético de la fijación biológica de N₂ se puede estimar de la utilización del carbohidrato de la planta, los cálculos demuestran que una planta consume 12g de carbono (C) orgánico por gramo de N₂ fijado, donde las fuentes de C utilizadas por *Frankia* para su crecimiento y desarrollo generalmente son diversas incluyendo los ácidos grasos de cadena corta tales como el propionato y el acetato; ácidos grasos derivados del tween, intermediarios del ciclo del ácido cítrico tales como el succinato y el malato y algunos ácidos orgánicos como el piruvato. La reducción enzimática del N₂ por parte de la nitrogenasa requiere una inversión grande de energía para la asimilación del amonio, producto de la fijación del N₂ que se lleva a cabo por el sistema glutamino sintetasa (15, 26, 36).

Fijación de N₂ atmosférico por *Frankia* en simbiosis

El desarrollo de fijación de N₂ simbiótico envuelve múltiples procesos que se encuentran en los compartimentos subcelulares endosimbióticos. Los niveles de la fijación dependen de una fuente continua de carbohidratos suministrados a los nódulos de la raíz; sin embargo, la baja disponibilidad de cualquier elemento esencial reduce drásticamente el vigor de la planta y al mismo tiempo reducirá los niveles de fijación de N₂. Hay muchos factores limitantes de la simbiosis, pero presumiblemente los más importantes son los tipos de suelo, la luz, la temperatura, el agua, los elementos minerales. Además, la simbiosis tiene otro papel ecológico, incrementa la productividad de muchas comunidades vegetales vecinas al incorporar N al suelo a través de la hojarasca que cae al mismo, transfiere parte del N₂ que ellas fijan hacia las plantas vecinas a través de la red subterránea de hifas de los hongos micorrizógenos que van de unas plantas a otras (7, 9, 28).

La infección de las raíces por parte del *Frankia* se hace por vía pelos radiculares, alterando su estructura, donde entra en las células corticales causando la formación de nódulos que se originan en el periciclo. Los nódulos formados tienen una anatomía interna similar a la de raíces laterales con un cilindro cortical del tejido fino vascular, presentan hifas filamentosas, ramificadas y septadas. Estos son estructuras coraloides con muchos lóbulos; cada lóbulo es una raíz lateral modificada y el tamaño varía con la planta de la que se trate y es muy común encontrar en el campo nódulos de 3 a 5cm de diámetro y pueden llegar a 8cm de diámetro, crecen en simbiosis radicular y a poca profundidad del suelo, indicando su carácter aeróbico (1, 34, 36).

Franklin *et al* (17) estudiaron el desarrollo de nódulos y la fijación de N_2 en el *Alnus glutinosa* bajo condiciones *in vitro* y en campo y aplicaron N a diferentes niveles. La presencia de nódulos se considera evidencia del proceso. Este estudio encontró que los nódulos pueden aparecer entre la segunda y la tercera semana posterior a la germinación; donde se encontró que adiciones de 15-30 ppm de nitrato a la solución nutriente nitrato- N de las plantas experimentales, tuvo un efecto estimulante y aumentó en el peso del nódulo mientras que con 50-100 ppm, alta concentración de N, deprimió la nodulación y se redujo el número de nódulos. Se concluye, que la eficiencia en la fijación en los *Alnus glutinosa* nodulados se puede afectar por una alta presencia de materia orgánica y/o la aplicación de N.

Por otro lado, el genotipo del anfitrión controla la morfología del nódulo. La planta puede afectar este control regulando los pasos dominantes del desarrollo del nódulo a través de los siguientes mecanismos en simbiosis: 1) reconocimiento del *Frankia* específico al momento de la infección, 2) supresión selectiva de los genes de defensa del anfitrión, 3) disposición de un ambiente protector para el funcionamiento de la nitrogenasa, 4) control del metabolismo del nódulo especialmente al regular los niveles de la glutamina sintasa, controlando la exportación del amoníaco o controlando los niveles del ATP requeridos para la fijación de nitrógeno, y 5) regulando la síntesis de los compuestos del carbón para la utilización por el microsimbionte (20, 24, 28).

Es así como, el patrón del nódulo en el sistema de la raíz es controlado por un proceso autoregulatorio que se induce rápidamente después de la inoculación

con *Frankia*. La nodulación se inicia en la raíz cerca de la primera semana después de la inoculación, y la anatomía madura del nódulo se alcanza en cerca de dos semanas después de la inoculación. El número final de nódulos y la biomasa del nódulo, son modulados por un segundo mecanismo que está relacionado con el estado de N en la planta. La fijación del N_2 se puede detectar (como actividad de la reducción del acetileno) la tercera semana después de la inoculación, donde el desarrollo del nódulo en el sistema entero de la raíz se regula, hasta cuando la concentración de N es máxima (24, 28).

Por otro lado, Gentili y Huss-Danell (20), estudiaron los efectos del nitrato de amonio, del fosfato y de sus interacciones en la nodulación de actinorriza infectados intercelularmente en plantas de la familia *Rhamnaceae*. Se aplicaron diversas concentraciones de N y de P en las plantas, para determinar si los efectos de N y de P eran locales o sistémicos. De 6 a 10 semanas después de la inoculación con *Frankia*, los resultados mostraron que un alto nivel de P tenía un estímulo sistémico en el número de nódulos y su biomasa. Se concluyó que la nodulación es regulada por nutrientes como el nitrógeno y el fósforo.

Interacción *Frankia* - micorrizas

La simbiosis realizada por los hongos micorrizógenos es mucho más antigua que la fijación de N_2 , algunas líneas de evidencia sugieren que estos se originaron 400-500 millones de años atrás. Estos son característicos de la gran mayoría de plantas terrestres contemporáneas y extintas, abarca un grupo monofilético que (según lo deducido de divergencia del rDNA 16S) se originó en el mismo período que las plantas terrestres. La simbiosis de leguminosa-*Rhizobium* y el actinorriza se originaron 60 - 70 millones de años en el Cretáceo cuando divergieron las familias principales de la angiosperma y los suelos eran pobres en N (7).

Los análisis de hongos micorrizógenos y nódulos fijadores de N_2 sugieren que las plantas tienen un sistema universal para monitorear sus afinidades microbianas que pueden ser sinérgicas, mutuas o antagónicas; además dependiente de las condiciones ambientales y las características genéticas individuales de organismos en interacción. Estas asociaciones fueron importantes para la evolución en beneficio de interacciones microbianas que contribuyen en grandes

proporciones al potencial adaptativo de las plantas terrestres. Asimismo, en la simbiosis micorriza y nódulo (es decir *Frankia*, *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*) se obtiene fósforo para la planta por parte del hongo micorrizógeno, además de beneficios para el sistema nitrogenasa en la fijación de N_2 del otro simbionte, dando por resultado niveles altos de fijación y por lo tanto un aumento de N de la planta, promoviendo así, el crecimiento vegetal, el desarrollo micorrizal y un ambiente más competitivo para los patógenos (11, 14, 23).

Los resultados de una investigación sobre el efecto de interacciones de las especies *Casuarina cunninghamiana*, *C. equisetifolia*, *C. glauca*, y *C. junghuniana*, con *Frankia* y el hongo micorrizógeno *Glomus fasciculatum* bajo condiciones deficientes de N, mostraron que la inoculación de las cuatro especies de *Casuarina* con *Frankia* dió pocas diferencias significativas en el crecimiento mientras esas diferencias que fueron observadas por la presencia o la ausencia de *Glomus*. Los efectos sobre el crecimiento en biomasa vegetal y la colonización de las raíces fueron mayores para las especies de *Casuarina* inoculadas con *Frankia* y *Glomus fasciculatum*. La efectividad de la fijación de nitrógeno era similar para las plantas inoculadas con *Frankia*, sólo, donde sobresalió la *C. equisetifolia*, siendo tres veces más efectiva en la fijación de N. Sin embargo, esta efectividad más alta no fue reflejada en el mayor crecimiento de la *C. equisetifolia* porque un peso más pequeño de nódulos fue producido por la planta (22).

La relación simbiótica entre la planta, la micorriza y *Frankia* se llama una relación tripartita y es una comunidad compleja, de varias cepas de organismos que protegen y se apoyan. Barbas *et al* (2), estudiaron la función de los nódulos de *Frankia* en la raíz de varios *Alnus* en la fijación de nitrógeno y su papel positivo en el crecimiento de la planta en el laboratorio y en el campo; como resultado se obtuvo que la simbiosis de *A. glutinosa*, y de *A. incana* hacen interrelación tripartita EM (hongo ectomicorrizógeno), AM (hongo endomicorrizógeno) y *Frankia*. Así mismo, una investigación sobre el papel de las asociaciones tripartitas entre el *Frankia*, *Alpova diplophloeus* (hongo ectomicorrizógeno) y el *Alnus tenuifolia* en crecimiento, fijación de N_2 , formación ectomicorrizal y la adquisición mineral del *A. tenuifolia*, reporta que las plantas del semillero que crecieron en los potes con una mezcla de suelo basal con perlita después de la inoculación dual con

el *Frankia* y del *A. tenuifolia* tenían los nódulos más pesados de la raíz en peso seco, y demostraron la capacidad fijación de N_2 más grande medida por la reducción del acetileno. La *Alpova diplophloeus* cuando se inoculó junto con *Frankia* contribuyó al mayor crecimiento del *Alnus tenuifolia* (2, 8, 33).

Otro estudio examina el efecto de *Frankia*, macronutrientes, micronutrientes, hongos micorrizógeno, y *Pseudomonas sp.* fluorescentes, durante el sembrado-crecimiento-germinación, en la biomasa total, peso nodular, y fijación de N_2 del aliso rojo (*Alnus rubra* Familia *Betulaceae*) y el laurel pegajoso (*Ceanothus velutinus* Familia *Rhamnaceae*) bajo condiciones de invernadero. Las semillas de aliso rojo que tuvieron *Frankia* y macronutrientes produjeron mayor biomasa y mayor fijación de N_2 que las semillas crecieron sin adiciones; agregando el hongo ectomicorrizógeno (EM), *Alpova diplophloeus*, incrementó la fijación de N_2 en un 33% más que el obtenido con *Frankia* y macronutrientes. *Frankia*, macronutrientes, y hongos micorrizógenos juntos incrementaron la fijación de N_2 en un 136% por encima del control. Adicionando sólo micronutrientes a *Frankia* y macronutrientes; se redujo la fijación de N_2 a la mitad. La presencia de hongos micorrizógenos permitió amortiguar este efecto negativo (33).

Interacción *Frankia* - Molibdeno (Mo)

Los minerales del suelo se clasifican de acuerdo a criterios cuantitativos y se dividen en tres grupos. En el primer grupo carbón (C), oxígeno (O), hidrógeno (H), nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg) y el azufre (S) son asignados como macronutrientes, por ser necesarios en cantidades más altas; mientras que hierro (Fe), manganeso (Mn), zinc (Zn), cobre (Cu), níquel (Ni), boro (B), molibdeno (Mo) y cloro (Cl) son asignados como micronutrientes. El sodio (Na), silicio (Si) y cobalto (Co) son asignados como elementos beneficiosos porque estimulan el crecimiento de algunas plantas, no siendo esenciales, o porque son esenciales solamente para una cierta especie vegetal (9).

Los micronutrientes aniónicos son el B, el Mo y el Cl. El Mo es parte importante para el funcionamiento de las enzimas del metabolismo del N y del ajuste del N_2 atmosférico para el *Rhizobium* y actinorrizas. La deficiencia del Mo puede aparecer en suelos ácidos. En leguminosas para fijar nitrógeno y el desarrollo

nodular requiere de micronutrientes como Co, B, Mo, Cu, Fe y Ni, tanto como macronutrientes; los primeros tres pueden limitar la fijación de N en el campo (9, 33).

El Mo es un constituyente de la nitrogenasa, así que una deficiencia de Mo en el medio causa un efecto directo y negativo en la fijación del N₂. Sin embargo, el Fe (que también es un elemento constituyente de la nitrogenasa) no tiene un efecto directo sobre la fijación del nitrógeno cuando este escasea en el medio. El complejo de la enzima nitrogenasa se puede separar en dos componentes, la proteína ferredoxina y el complejo proteico Molibdoferato (MoFe) (15, 31).

En la investigación referenciada anteriormente de Rojas *et al* (33), se encontró que la actividad de la nitrogenasa en semillas de aliso rojo fue influenciada por interacciones entre macronutrientes y el hongo micorrizal (*Alpova*). Contrario a las expectativas, adicionando micronutrientes a la combinación de *Frankia* y macronutrientes esencialmente, se eliminó el efecto benéfico de esas adiciones. El efecto negativo de micronutrientes en la actividad de la nitrogenasa fue inesperado; Co, Cu, Fe, B, Mo y Ni se sabe que son importantes en la formación nodular y la actividad de la nitrogenasa de leguminosas, se asumió que esa fertilización con micronutrientes pudo ser sustituida al menos en parte por hongos micorrizógenos y *Pseudomonas*. No es claro porque ocurrió lo opuesto. Los micronutrientes fueron adicionados en medidas recomendadas para *Alnus spp*, pero cantidades recomendadas de fertilización son a menudo considerablemente superiores que aquellas que ocurren naturalmente y pueden resultar en respuestas negativas por toxicidad, es posible que la concentración relativamente amplia adicionada como fertilizante induzca un desbalance biológico en semillas en la rizosfera, a lo mejor favoreciendo el crecimiento competitivo de microorganismos patógenos. El efecto amortiguante aparente de *Alpova* puede ser debido a la habilidad de los hongos para proteger la planta por incrementar esa tolerancia a toxinas y a patógenos del suelo (33).

Interacción *Frankia* - Boro (B)

El Boro (B) es un microelemento esencial para el desarrollo de plantas, diatomeas y una cierta especie de algas; se absorbe en la forma ácido bórico y es

importante para el metabolismo y el transporte de los glúcidos, metabolismo de ácidos nucleicos y la lignificación de las paredes celulares. Es deficiente en los suelos de lixiviación intensa y de baja calidad. El B posee varias funciones importantes en la estructura de la pared de la célula, membranas y reacciones, reproducción, crecimiento del tubo del polen, y germinación del polen, fijación de N₂, asociados-membrana, entre otros (4, 5, 10).

La fijación biológica del nitrógeno es una reacción basada en la acción de la enzima nitrogenasa, la cual es altamente sensible al oxígeno, por lo cual el mantenimiento de las estructuras que la protegen del oxígeno es crucial para el proceso. Es así, que en una investigación realizada en cianobacterias *heterocystous* requieren B cuando están desarrolladas bajo condiciones de fijación de N₂, como estabilizador de las cubiertas del heterocisto, principal barrera protectora para la nitrogenasa, donde controla el acceso del oxígeno. Así, en cianobacterias se pudo comprobar que el B es necesario para el crecimiento de las mismas cuando se las cultiva en ausencia de nitrógeno combinado (o sin otra fuente de nitrógeno que el N₂ atmosférico), detectándose en esos casos, una inhibición de la actividad nitrogenasa tan sólo dos horas después de retirar el B del medio de cultivo, este efecto está originado por la desestabilización de una de las cubiertas del heterocisto. A diferencia de *Rhizobium*, pero de forma análoga a las cianobacterias, bacterias *Frankia* poseen como diferencia las vesículas, estructuras esféricas multicelulares especializadas rodeadas de una cápsula que consiguen resistir hasta una concentración de oxígeno del 80%, ya que presentan una cubierta multilaminar de naturaleza lipídica, similar a la de los heterocistos, concretamente lámina de glucolípidos, principal barrera contra la difusión oxígeno, susceptible de interactuar con B (4, 5, 6).

En la simbiosis *Rhizobium*-leguminosas, la relación B-Ca²⁺, el Ca²⁺ juega un papel preponderante en los procesos de iniciación del nódulo; sin embargo, principalmente en el ambiente endofítico. Si bien el B no parece esencial para la bacteria, la estructura del nódulo y las interacciones planta-bacteria; si se ha encontrado que durante varias etapas del desarrollo del nódulo de la raíz de la leguminosa, como son la formación de la pared celular del nódulo y estructura de la membrana, el desarrollo del hilo de rosca de la infección e invasión del nódulo y desarrollo simbiosoma; son procesos que pueden llegar a

suprimirse debido a la deficiencia de B en la planta del anfitrión (4, 6).

En un estudio realizado por Bolaños *et al* (4) sobre el papel del B en cultivos de *Frankia* crecidos con y en ausencia de B, los resultados al microscopio óptico muestran que los cultivos crecidos en presencia de B presentan unas hifas de longitud considerablemente mayor que las de aquellos crecidos en ausencia de B, que son más cortas y de aspecto más frágil, las vesículas y los esporangios aparecen con una estructura totalmente desorganizada; además, el número de vesículas diferenciadas parece menor en estos últimos. Así, en tanto que las hifas en presencia de B presentan un citoplasma y una septación normal, las hifas de los cultivos crecidos en ausencia de B carecen de septos definidos así como aparentemente, de citoplasma. Además, posiblemente la ausencia de B disminuye la estabilidad de la pared celular al no poder generarse los enlaces ester entre el borato y los grupos cis-diol de las moléculas constitutivas de la pared celular. También debe de influir en la diferenciación y funcionalidad de las vesículas, ya que en condiciones de fijación y ausencia de B la cantidad de proteínas no se incrementa respecto al valor inicial, lo que indica que hay una menor disponibilidad de nitrógeno reducido, el cual ha de ser proporcionado por las vesículas. Dicha funcionalidad, posiblemente se vea alterada debido a una desestabilización de la cubierta protectora contra el oxígeno, lo que determina, una vez más, un papel estructural para el B (4).

Plantas de los *Discaria trinervis* (Familia *Rhamnaceae*) fueron inoculadas con *Frankia* BCU110501 que había sido cultivado previamente libre de B o con B y con N₂ o con amonio (+N) como fuente del N. Dos meses después de la inoculación, el índice más alto de infección fue el obtenido en las plantas cultivadas con B e inoculadas con *Frankia*. La tasa de nodulación fue reducida en plantas deficientes de B, además des ser estos nódulos no funcionales. Por otra parte, la fluorescencia de los cultivos positivos a naranja de acridina, indicó que la deficiencia de B provocó cambios en las células. Estos resultados demuestran la necesidad que se tiene del B, no solamente para establecer una relación simbiótica *Discaria* con *Frankia* BCU110501, sino para la capacidad vegetativa del crecimiento y de la infección de *Frankia*; además el B es esencial cuando las bacterias se cultivan limitando el N (4, 6).

Interacción *Frankia* - Cobalto (Co)

El Cobalto (Co) es necesario para los microorganismos de los procarióticos capaces de fijar el nitrógeno atmosférico, beneficiando al crecimiento y a la producción de plantas con procesos de fijación de N₂. Es así, en investigación realizada con ensayos enzimáticos se identificaron coenzimas B12 en nódulos de *Alnus rubra*; *Ceanothus velutinus* y un variedad de especies leguminosas, donde es muy probable que el papel esencial del Co en la nutrición de organismos fijadores de N₂ se relacione al menos en parte con el papel de la coenzima(s) de la vitamina B12 las que contienen Co como un componente esencial de su estructura (9, 17).

Franklin *et al* (17) realizaron una investigación acerca de los efectos del aumento de las concentraciones de Ni, Fe y Mn sobre el crecimiento y sobre el contenido de la clorofila, N, vitamina B12 y Co de *Alnus rubra* en presencia y ausencia de 50 ppm de Co en el medio nutritivo. Los efectos del Mn, Fe y Ni sobre el crecimiento tanto en presencia y ausencia de Co no fueron estadísticamente significativos. A la primera cosecha a los 144 días, los efectos del tratamiento con Co sobre el peso fresco y seco de los copos de las plantas, en el contenido de clorofila de las hojas y el contenido de N en las ramas superiores fueron altamente significativos. Las diferencias en muchos casos fueron muy notables. El efecto del Co sobre el crecimiento de las plantas fue consistente en todas las replicas. Además, se encontró que los arbustos que crecieron sin cobalto desarrollaron clorosis aguda y características de deficiencia de nitrógeno.

Debido a que el papel conocido del Co es asociado como constituyente de la coenzima de la vitamina B12 en el actinomiceto *Frankia*, se estudio determinar si la concentración de ciertos elementos traza con propiedades químicas similares al Co puede interferir con la biosíntesis de compuestos que contienen vitamina B12, la cual actúa como catalizador del proceso, en nódulos de *Alnus rubra*. Parece lógico postular que metales como Mn, Fe y Ni a altas concentraciones pueden competir con el Co en la incorporación de este elemento dentro de los compuestos B12. Esto podría llevar a un una disminución de la concentración de vitamina B12 y a un antagonismo entre las concentraciones excesivas de elementos traza y Co (17).

El efecto del incremento de las concentraciones de Ni fue más pronunciado, los nódulos de las plantas

crecieron sin Ni y con 0.05 ppm de Co, conteniendo cerca de 130 microgramos de vitamina B12 por gramo de nódulos frescos. Los resultados sugieren que la adición de Co en los suelos como nutriente artificial interviene en la fijación de N₂ simbiótico, no sólo por la cantidad de Co disponible para las plantas sino también por la concentración de elementos de transición en el crecimiento que pueden competir con el Co en los procesos metabólicos donde el Co participa (17).

Simbiosis *Alnus* - *Frankia* sp.

En los alisos de América Latina, el primer reporte sobre la existencia de nódulos en las raíces fue efectuado por Castellanos (1944). Más tarde, Holdridge (1951) mencionaba el excelente crecimiento del pasto bajo la sombra de alisos, en razón de estos organismos fijadores de nitrógeno. Budowski (1957), confirmaba esta apreciación utilizando ya el nombre de actinomicetos para definirlos. Los nódulos de *Alnus acuminata* están concentrados en los primeros 5 cm del perfil del suelo, pueden medir hasta 6 cm de diámetro y forman grupos (2, 32).

A pesar de las probables diferencias genéticas entre los endófitos de los alisos europeos y norteamericanos, los nódulos inducidos a partir de la inoculación de *Frankia* (cepas aisladas, nódulos macerados y suelos de la rizósfera) de varias especies norteamericanas producen nódulos capaces de fijar nitrógeno en *Alnus glutinosa*. El *Alnus acuminata* ha demostrado que juega un importante papel en el incremento de los niveles de nitrógeno en los suelos tropicales a través de nódulos, estos fijan el nitrógeno atmosférico como lo hacen los nódulos de las especies de *Alnus* europeos, en plántulas de *Alnus acuminata* inoculadas con algunos nódulos macerados de esta misma especie aumentaron su crecimiento aéreo y radical y su número de hojas en comparación con los testigos sin inocular; algunas plántulas germinadas en suelos estériles murieron diez días después de la germinación, esto demuestra que esta especie tiene necesidad del actinomiceto *Frankia alni*. Sin embargo, muchos suelos forestales y agroforestales parecen estar desprovistos del inóculo de *Frankia* (26, 32, 34).

El género *Alnus* está igualmente asociado con micorrizas, esta interacción de organismos aparentemente cumplen un importante papel en la absorción de nutrientes, fijación de nitrógeno y en la minimización de enfermedades radicales. En *Alnus acuminata*, se encontró que la

presencia de nódulos de *Frankia* sp reduce el efecto patogénico de los hongos *Fusarium oxysporum* y *Pythium sylvaticum* (12, 18, 32).

Chavarriga (14) encontró en un estudio sobre la interrelación micorriza y *Frankia* sobre la acción del patógeno *Fusarium*, la presencia de ambos ejercen un efecto obstáculo al crear un medio ambiente más competitivo al patógeno. Además, dentro de los nódulos de la raíz se releva la presencia de P para la planta, lo cual tiene beneficios para el sistema de la fijación N₂, dando por resultado niveles altos de N en la planta lo que promueve el crecimiento vegetal y también el desarrollo micorrizal.

Así mismo, Oliveira *et al* (29) encontró en *alnus* negro (*Alnus glutinosa*) un efecto superior en desarrollo de los árboles por la inoculación conjunta de *Glomus intrarradices* con *Frankia spp.* que cuando se emplearon cada uno de los microorganismos por separado e igualmente esta doble inoculación favoreció el contenido de nitrógeno y fósforo en las hojas en suelos degradados con pH alto. Resultados similares presentó Orozco *et al* (30) en *Alnus acuminata* var *acuminata*, al emplear conjuntamente el actinomiceto *Frankia spp.* y hongos micorrizógenos.

Consideraciones finales

La información bibliográfica encontrada sobre el aliso (*Alnus acuminata*) demuestra que es una especie con un gran potencial para el mejoramiento del suelo y una alternativa en los sistemas silvopastoriles en trópico alto andino.

Los estudios demuestran que la asociación simbiótica de la relación del aliso con microorganismos del suelo sería una opción para el mejoramiento de suelos erosionados y/o degradados que predominan en condiciones tropicales por el sobrepastoreo y los monocultivos.

Así mismo, la revisión indica, que la interrelación de microelementos como el B, Co y Mo; con esta relación tripartita, de acuerdo a investigaciones científicas en otros países y de condiciones diferentes, han demostrado su importancia en su funcionalidad, sin embargo en los suelos ácidos tropicales predominantes en la región, se desconoce su efecto en lo referente a aspectos básicos de su biología, funcionamiento y desarrollo, por lo cual es necesario realizar estudios básicos y aplicados.

Summary

The effects of the interaction Frankia - mycorrhizal fungi - microelements in the establishment of Alder trees (Alnus acuminata) in tree grass systems

Frankia is a genus of microorganisms called actinomycetes able to induce the formation of radicular nodules that fix atmospheric nitrogen in some non-legumes angiosperms, denominated actinorrhizal plants. The development of symbiotic fixing of N involves multiple processes that are carried out in endosymbiotic subcellular compartments in which Frankia produces the nodules of the root which turn the N₂ in combined form. The mycorrhizal symbiosis and the nodules are generally synergistic. They promote the vegetal growth, the multiplication of mycorrhizae producing a more competitive atmosphere for the pathogens. It is important to consider the participation of micronutrients like molibdenum, which is a component of the nitrogenase, since its deficiency in the medium causes a direct and negative effect in the fixing of the N₂. The boron deficiency produces a destabilization of the protecting cover against oxygen, which considerably affects the nodulation of the plant. Cobalt is a structural component of the coenzyme of the B12 vitamin in the process of the fixing of the N. Nevertheless, many aspects related to these micronutrients in the interactions and the mycorrhizal-Frankia symbiosis is unknown. It is important to determine the effects on the microorganisms and the development of the nodules; for determining an optimum development, however its complexity makes its effect to be unpredictable under all conditions and for all species. Therefore, it is important to stimulate the investigation on the matter, as well as to research on more information on the principles of the functioning, interactions, and show results found on the use of promissory trees for tree grass systems in high tropic as the Aliso (Alnus acuminata), a forestal species useful for solving the degradation problems of the soil and deforestation.

Key words: boron, cobalt, molibdenum, fixing of N₂, actinorrhizal plants, symbiosis.

Referencias

1. Arango C, Lepineux W. Inoculación de Aliso (*Alnus acuminata*) con *Frankia Alni*. Tesis de grado, Facultad de Agronomía, Universidad de Caldas, Manizales, Colombia, 1994, 65 p.
2. Barbas V, Papaioannou A, Orfanoudakis M. Preliminary studies in *Alnus glutinosa* root symbiosis in the field. Laboratory of Forest Genetics, Department of Forestry and Natural environment, Aristotle University of Thessaloniki, Greece, 2001; 200 p.
3. Benson D, Silvester W. Biology of *Frankia* strains, actinomycete symbionts of actinorrhizal plants. *Microbiological Review* 1993; 57 (2): 293-319. .
4. Bolaños L, Bonilla I, Redondo M, Orellana M, Wall LG. Papel del boro en el desarrollo de *Frankia*. incidencia sobre la fijación biológica del nitrógeno en vida libre. Seminario Perspectivas de la Fijación Biológica de Nitrógeno en el Umbral del Siglo XXI 2.000, Facultad de Ciencias. UAM. Madrid, 2000
5. Bolaños L, Bonilla I, Redondo-Nieto M. Relación B-Ca²⁺ en la fijación biológica del nitrógeno. URL:<http://www.uam.es/personal-pdi/bolarios/Investigación/B-CafijN.htm>. 2003. Visitada por última vez Octubre 5 de 2.004
6. Bolaños L, Bonilla I, Redondo M; Wallb L. Boron requirement in the *Discaria trinervis* (*Rhamnaceae*) and *Frankia* symbiotic relationship *Physiologia Plantarum* 2002; 115: 563-570.
7. Bosirov L, Provorov N, Tikhonovich I. Development Genetics and evolution of simbiotic structures in nitrogen-fixing nodules and arbuscular mycorrhiza. *Russia research Institute for Agricultural Microbiology. Journal Theor. Biology* 2002; 214: 215-232.
8. Bormann BT, Okabe H, Yamanaka T. Tripartite associations in an alder: effects of *Frankia* and *Alpova diplophloeus* on the growth, nitrogen fixation and mineral acquisition of *Alnus tenuifolia*. *Plant and Soil* July 2003; 254: 179-186.
9. Brown Kevin. Mineral nutrition and fertilization of deciduous broadleaved tree species in British Columbia. Ministry of Forests Research Program Canadian. Forestry Division Services Branch 1999; pp.42 – 60
10. Brozek S, Wanic T. Impact of forest litter of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn, *Alnus incana* (L.) Moench, *Alnus viridis* (Chaix) Lam. Et Dc, *Abies alba* Mill., and *Fagus sylvatica* L. on chosen soil properties. Department of Forest Soil Science, Agricultural University of Cracow, Poland. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities* 2002; 5 (1).
11. Burns T, Morton J, Redecker D. Ancestral Lineages of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (*Glomales*). *Journal Molecular Phylogenetics and Evolution* 2000; 14 (2): 276-284.
12. Carlson PJ, Dawson, JO. Soil nitrogen changes, early growth, and response to soil internal drainage of a plantation of *Alnus jorullensis* in the Colombian highlands. *Turrialba* 1985; 35 (2): 141-150.

13. Carú M, Schwencke J. Advances in Actinorhizal Symbiosis: Host Plant-*Frankia* Interactions, Biology, and Applications in Arid Land Arid Land Research and Management Issue 2001; 15 (4): 285 – 327.
14. Chavarriaga H. Didier Mauricio. Biological control of *Fusarium* spp and other soil-borne pathogens on tree seedlings. University of Aberdeen. Tesis Doctor. Aberdeen, Scotland UK, 2003, 400 p.
15. Dixon R, Wheeler CT. Nitrogen Fixation in Plants. Chapter 12: Assimilation of Mineral Nutrients. Chapman and Hall, New York, 1986
16. Eppard M, Koch C, Krumbein W, Rhiel E., Stackebrandt E, Staley J. Morphological, physiological, and molecular characterization of actinomycetes isolated from dry soil, rocks, and monument surfaces. Arch Microbiol, Germany, 1996; 166:12 – 22.
17. Franklin JF, Tarrant RF, Trappe JM Biology of Alder - Efecto de la materia orgánica y nitrógeno en la nodulación y fijación del nitrógeno en el marrubio (*Alnus rubra*). Edited Forests service, USA Department of Agriculture. Portland, Oregon. 1968; 292 p.
18. Franklin JF, Tarrant RF, Trappe JM. Biology of Alder - El efecto del cobalto y algunos otros metales traza sobre el crecimiento y contenido de vitamina B12 de *Alnus rubra*. Edited Forests service, USA Department of Agriculture. Portland, Oregon. 1968; 292 p.
19. Ganio LM, Li CY, Perry DA, Rojas NS. Interactions among soil biology, nutrition, and performance of actinorhizal plant species in the H.J. Andrews Experimental forest of Oregon. Rev. Applied Soil Ecology 2002; 19: 13 – 26.
20. Gentili F., Huss-Danell Kerstin. The biology of *Frankia* and actinorhizal plants. San Diego, CA, USA: Academic Press, pp. 61-81 URL: www.blackwell-synergy.com/links/2001Visitada Octubre 5 de 2005
21. Gesheva Victoria. Rhizosphere microflora of some citrus as a source of antagonistic actinomycetes. Institute of Microbiology, Bulgarian Academy of Sciences, European Journal of Soil Biology 2002; 38: 85 - 88.
22. Handley L, Hooker JE, Scrimgeour CM, Tilak M, Wheeler C. Effects of symbiosis with *Frankia* and arbuscular mycorrhizal fungus on the natural abundance of ^{15}N in four species of Casuarina. Journal of Experimental Botany, 2000; 51(343): 87-297.
23. Hodge Angela Microbial ecology of the arbuscular mycorrhiza. Department of Biology, The University of York, FEMS Microbiology Ecology 2000; 32: 91-96.
24. Huss-Danell K, Valverde K; Wal L.G. Regulation of nodulation in the absence of N_2 is different in actinorhizal plants with different infection pathways. Journal of Experimental Botany, 2003; 54 (385): 1253-1258.
25. Huss-Danell Kerstin. Actinorhizal symbioses and their N_2 fixation The New Phytologist 1997; 136 (3): 375.
26. McEwan, Neil R. Autofluorescence as a tool for monitoring the interaction between alders and *Frankia*. Botany Department, Glasgow University, Escocia, published on Internet Sep. 7, 1997
27. McEwan NR, Wheeler CT. An improved method for screening *Frankia* viability in strain CcI3. Exp. Biol. Online 1997; 2: 13.
28. Misra Arvind K, Verghese Susamma. *Frankia*-actinorhizal symbiosis with special reference to host-microsymbiont relationship. Department of Botany, North-Eastern Hill University, India. Current Science, 2002; 83 (4): 25.
29. Oliveira R S Castro P M Dodd J C Vosátka M. Synergistic effect of *Glomus intraradices* and *Frankia* spp. On the growth and stress recovery of *Alnus glutinosa* in an alkalines antropogenic sediment. United Kingdom. Chemosphere, 2005; 60(10): 1462 – 1470.
30. Orozco H Medina M Sarria P. Aislamiento y evaluación de microorganismos endófitos de Aliso (*Alnus acuminata* var. *Acuminata*). Livestock Research for Rural Development; 17(1), 2005; URL: <http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd17/1/cont1701.htm>
31. Pérez S, Torralba A. La fijación del Nitrógeno por los seres vivos: simbiosis de microorganismos fijadores con plantas no leguminosas. Seminario Fisiología Vegetal. Facultad Biología Oviedo, España, 1997, 21 pp.
32. Restrepo U Guillermo. Inefectividad y efectividad de los actinomicetos del género *Frankia* asociados con *Alnus acuminata* ssp. *acuminata* en Colombia. Cronica Forestal y del Medio Ambiente, Universidad Nacional de Colombia, 1997; 12 (1): 1 - 10.
33. Rojas NS, Perry DA, Li CY, Ganio L. Interacciones entre biología, la nutrición, y el funcionamiento del suelo de la especie actinorhizal de la planta en el bosque Experimental de H.J. Andrews de Oregon. Ecología Aplicada Del Suelo 2002; 19(1):13-26.
34. Sellstedt Anita. *Frankia alni*. A symbiotic nitrogen-fixing actinobacterium. Center for microbial ecology at University of Lyon 2003
35. URL: http://www.genoscope.cns.fr/externe/organisme_HF.html Página visitada Octubre 15 de 2005
36. Valdés María. La bacteria filamentosa *Frankia*. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, Prolongación de Carpio y Plan de Ayala, México DF, 2002, 15 p.