

## **Aislamiento y evaluación de microorganismos endófitos de aliso (*Alnus acuminata* var. *Acuminata*)**

**F H Orozco, M Medina\* y P Sarria\*\***

*Universidad Nacional, Facultad de Ciencias, Colombia*

*\*Universidad de Antioquia, Facultad de Ciencias Agrarias, Colombia*

*\*\*Universidad Nacional, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Colombia*

[solmedina@agronica.udea.edu.co](mailto:solmedina@agronica.udea.edu.co)

### **Resumen**

Se aislaron diferentes microorganismos colonizadores de raíces de árboles "élite" de la especie *Alnus acuminata* var. *Acuminata* provenientes de la finca Cien años de Soledad y de la Estación experimental de San Pablo de la Universidad Nacional de Medellín localizadas en Rionegro (Antioquia). Los aislados bacteriales obtenidos correspondieron al actinomiceto *Frankia* y se denominaron F1, F2 y F3 (códigos CUNMS501, CUNMS502 y CUNMS503, respectivamente); los aislados de hongos micorrizógenos obtenidos de suelo rizosférico se denominaron Mn1, Mn2, y Mn3 (códigos MICUNMS31 MICUNMS32 y MICUNMS33, respectivamente). Se realizó un ensayo en la Estación experimental de San Pablo para evaluar la efectividad de los aislados nativos obtenidos frente a cepas conocidas de hongos endomicorrizógenos (*Entrophospora colombiana*, *Glomus manihotis*, *G. fistulosum* y *G. intraradices*) en plántulas de aliso en suelo estéril y se empleó un diseño completamente aleatorizado con 37 tratamientos por seis repeticiones. Se midieron las variables biomasa seca de la parte aérea y de nódulos, % de infección en raíces y acumulación de N y de P.

Las funciones canónicas derivadas del análisis multivariado de la varianza (MANOVA) permitieron probar las diferencias entre los efectos promedios de los tratamientos ( $P < 0.05$ ), encontrándose que los tratamientos que presentan los aislados de *Frankia* (F2 ó F3) o el aislado de micorriza nativa (Mn2) mejoran significativamente la respuesta de la planta con respecto a las variables analizadas. El tratamiento Mn2F2 tuvo un comportamiento similar al tratamiento con N. La cepa de *G. fistulosum* presentó respuesta positiva cuando se asoció con los aislados nativos de *Frankia* F1 y F2.

**Palabras clave:** *Alnus* spp., andisol, endomicorrizas, *Frankia* sp.

## **Isolation and evaluation of endophyte microorganisms associated with alder (*Alnus acuminata* var. *Acuminata*)**

**F H Orozco, M Medina\* and P Sarria\*\***

### **Abstract**

Several micro organisms were isolated from roots of trees with special characteristics of *Alnus acuminata* var. *Acuminata*. They were obtained from Cien años de Soledad farm and San Pablo experimental

station of the Universidad Nacional in Rionegro (Antioquia). The first group of micro organisms was composed of bacterial strains which belong to the *Frankia* actinomycete and (these) were called F1, F2 and F3 (codes CUNMS501, CUNMS502 and CUNMS503, respectively). The second group was of endomycorrhizal fungi, which were called Mn1, Mn2, and Mn3 (codes MICUNMS31 MICUNMS32 and MICUNMS33, respectively). The experiment was done in the San Pablo station and aimed to evaluate the effectiveness of wild strains against known endomycorrhizal fungi strains (*Entrophospora colombiana*, *Glomus manihotis*, *G. fistulosum* and *G. intrarradices*) in *Alnus acuminata*. The soil was sterilized. A completely randomized design was employed with 37 treatments and six repetitions. The plant shoot, the nodule dry weight, the percentage of infection by fungi in roots and the shoot nitrogen and phosphorus content, were the evaluated variables.

*Frankia* (F2 or F3) and wild mycorrhizal fungus (Mn2) treatments were the best in respect of the variables analysed. The Mn2F2 treatment was similar to treatment with applied N. The *G. fistulosum* had a positive effect when it was associated with *Frankia* F1 and F2 wild strains.

**Key words:** *Alnus* spp., andisol, endomycorrhizal fungi, *Frankia* sp.

## Introducción

El aliso (*Alnus acuminata* var. *acuminata*), reportado antiguamente por algunos autores como *Alnus jurullensis*, es una especie única en su género en los Andes Suramericanos; en Colombia se encuentra esencialmente en suelos andinos de laderas del Departamento de Caldas, tanto en bosques abiertos como cerrados (Restrepo y Bellefleur 1996).

Después de los años 60 comenzó a aparecer abundante literatura sobre estudios básicos de la bacteria *Frankia* spp., un actinomiceto asociado simbióticamente con esta especie, debido a lo cual se le asignó la especie *alni*. Las principales dificultades para su estudio fueron inicialmente su multiplicación y mantenimiento *in vitro*. Se han realizado varios estudios sobre la especificidad del hospedero, muchos de los cuales reportan una relación entre las bacterias esporulantes sp(+) y no esporulantes sp(-) dentro de los nódulos, siendo menos específicos las sp(-) (Weber 1990; Kurdali et al 1990) y se requiere cientos de veces mayor cantidad de inóculo cuando se hace la inoculación con macerado de nódulos de sp(-) con respecto a la inoculación con las sp(+) (Houwens y Akkermans 1981). Estos mismos autores, sostienen que las zonas donde no ha existido aliso, son muy bajas en propágulos infectivos de *Frankia* y allí las plantas responden positivamente a la inoculación, pero se ha encontrado mayor efectividad por las sp(-) en cuanto a fijación de nitrógeno con respecto a las sp(+); sin embargo ésta última domina naturalmente en el sistema radicular (Kurdali et al 1990). Lo anterior implica que en condiciones naturales donde tiene mayor posibilidad de sobrevivencia la sp(+), se debe adecuar las condiciones ambientales para que de alguna forma se favorezca la inoculación con cepas sp(-).

El principal inconveniente que se presenta para una adecuada infección y fijación de nitrógeno en andisoles es la carencia de fósforo debido a la alta fijación del anión en esos suelos. Russo et al (1989) encontraron que la inoculación conjunta de *Frankia*, el hongo micorrizal *Glomus intrarradices* y concentraciones de P tan bajas como 10 ppm, presentó 50% más de reducción de acetileno que los demás tratamientos con 50 y 100 ppm de P y 87% más con respecto al tratamiento con *Frankia* únicamente.

Dentro de las especies de uso actual en los sistemas agrosilvopastoriles, aquellas del género *Alnus* se consideran como unas de las más promisorias por su rápido crecimiento, la alta calidad de su madera y su capacidad de fijar nitrógeno del aire. Este último aspecto beneficia positivamente a las especies acompañantes al aportarles nitrógeno y contribuye a un manejo adecuado de los suelos de ladera de la región alto-andina bajo esos sistemas de producción. Sin embargo, el poco conocimiento y la falta de materiales biológicos como hongos micorrizógenos y de algunas especies efectivas de *Frankia* nativas de los principales suelos de esta eco-región que garanticen el aprovechamiento de las posibilidades que ofrece la especie vegetal justifican el presente trabajo.

Se aislaron y caracterizaron especies de hongos micorrizógenos arbusculares y de *Frankia*, presentes en la rizosfera de árboles élitos de una plantación establecida y evaluados solos y mezclados en el desarrollo de plántulas creciendo sobre un sustrato que contenía suelo de la misma región (suelo ándico de ladera).

## **Materiales y métodos**

### **Sustrato**

Se preparó una mezcla del suelo andisol (Tabla 1), proveniente de una ladera de la Estación experimental de San Pablo de la Universidad Nacional de Medellín localizada en Rionegro (Antioquia), con viruta de varias especies (cedro, pino, abarco) en proporción de 2 kg/100kg de suelo. Se empleó un desinfectante a base de Dazomet (3,5-dimetil-(2H)-tetrahydro-1,3,5-tiadiazina-2-tiona al 98%) 80 g/m<sup>2</sup> durante ocho días y se dejó airear durante quince días antes de proceder al llenado de bolsas, cada una con capacidad de 2 kg y con 30 cm de profundidad por 10 cm de diámetro.

---

**Tabla 1.** Análisis microbiológico y químico del suelo andisol empleado en el ensayo

---

*Medio NFB (fijadores libres de nitrógeno) evaluación a las 96 horas*

---

Tipo de bacteria	Descripción de la colonia				Descripción microorganismos			Nro. X10 <sup>4</sup>
	Tamaño mm	Forma	Color	Aspecto	Forma 100x	Reacción gram	otra característica	
1	puntiforme	redonda	transparente	gomosa	Bacilo	(+)		41
2	3 mm	irregular	blanca	cremosa	Bacilo	(+)	esporulado, agrupado en cadena	24
3	5 mm	redonda	blanca	reticular	Bacilo	(+)	esporulado	1
<b>TOTAL</b>								<b>66X10<sup>4</sup></b>

Medio AN (agar nutritivo) evaluación a las 48 horas

Tipo de bacteria	Descripción de la colonia				Descripción microorganismos			Nro. X10 <sup>5</sup>
	Tamaño mm	Forma	Color	Aspecto	Forma 100x	Reacción gram	otra característica	
1	puntiforme	redonda	amarillo transparente	brillante	Bacilo	(+)	bacilos muy largos	3
2	puntiforme	redonda	transparente	gomosa	Bacilo	(+)	esporulado	13
3	2 mm	redonda	transparente	punteada	Bacilo	(+)	esporulado, agrupado en cadena	7
4	5-7 mm	bordes irregulares	crema	irregular	Bacilo	gram variable	con espora terminal	2
5	4-5 mm	redonda	crema	uniforme cremosa	Bacilo	(+)	esporulado	62
6	2 mm	redonda	blanca	uniforme cremosa	Bacilo	(+)	esporulado, agrupado en cadena	19
<b>TOTAL</b>								<b>11X10<sup>6</sup></b>

Análisis químico

Tipo de muestra	Tipo de determinación														
	PH	M.O %	CIC	Al	Ca	Mg	K	P	Fe	Mn	Cu	Zn	B	NO <sub>3</sub>	NH <sub>4</sub>
			(meq/100g suelo)						(ppm)						
Suelo estéril	5.3	31.0	7.5	1.6	4.6	0.9	0.36	17	119	3	2	9	0.3	3	ND
Suelo no estéril	5.6	32.4	7.8	-	6.0	1.3	0.52	24	126	3	4	21	0.2	13	1
SustMicl*	5.1	31.6	6.7	1.8	3.8	0.9	0.23	21	130	3	3	9	ND**	2	ND

\*sustrato micorriza inoculante \*\*ND no detectable

## Aislamiento y purificación de microorganismos

### *Frankia sp.*

Se realizaron varios aislamientos a partir de nódulos colectados en diferentes fechas de árboles élite de una plantación existente en la finca Cien años de Soledad de la vereda El Tablazo (Rionegro) y de árboles de la Estación experimental San Pablo de la Universidad. Para el aislamiento, los nódulos se lavaron con agua destilada estéril, alcohol 96%, hipoclorito de sodio y tween 80; posteriormente se maceraron en solución salina al 0.85% y se sembraron en los medios de agar-caseína, propuesto por el Laboratorio de Microbiología de Suelos de la Universidad Nacional, y de agar-triptona (Burgraaf 1984). Los cultivos se incubaron a 33°C y en la oscuridad hasta la aparición de colonias.

### *Hongos micorrizógenos*

De los mismos árboles muestreados para aislar *Frankia* sp. se obtuvo suelo rizosférico en el cual se evaluó la presencia de esporas de hongos micorrizógenos mediante el método de adhesión-flotación en suspensión en solución con 50% de glucosa, se seleccionaron algunos aislados con base en algunas características morfológicas y se evaluaron en el presente trabajo. Se emplearon además cepas de especies conocidas en suelos tropicales como *Glomus manihotis* y *Entrophospora colombiana* procedentes de suelos ácidos colombianos, *G. fistolosum* aislada de suelos de la zona cafetera del departamento de Caldas y *G. intrarradices* usada de rutina como inoculante en otros países como Canadá.

### *Plántulas de aliso*

Se emplearon plántulas de aliso de nueve semanas, suministradas por el vivero de Empresas Públicas de Medellín localizado en la vereda Piedras Blancas y sembradas mediante el siguiente protocolo: germinación al aire libre en arena-suelo en relación 1:1, desinfectado con Dazomet (80g/m<sup>2</sup>) posteriormente transplantadas a bolsas pequeñas de media libra sin fondo con una mezcla arena-suelo gallinaza en relación 1:1:1, la cual también se desinfectó con el mismo producto.

### **Tratamientos**

<b>Descripción de los tratamientos</b>			
<b>Tratamiento</b>	<b>Descripción</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Descripción</b>
F1	Aislados bacteriales del género <i>Frankia</i> de nódulos de árboles élites de <i>Alnus acuminata</i>	Mn1F2	Tratamientos combinados de aislados nativos de hongos micorrizógenos y <i>Frankia</i> sp.
F2		Mn2F1	
F2		Mn2F2	
Mn1	Mn2F3		
Mn2	Mn3F1		
Mn3	Mn3F2		
E.c *	cepas de especies de hongos endomicorrizógenos conocidas.	EcF1	Tratamientos combinados de cepas de hongos micorrizógenos conocidas y aislados de <i>Frankia</i> sp.
G.f *		EcF2	
G.i. *		GfF1	
G.m *		GfF2	
Tsin N	Testigos sin y con nitrógeno	GiF1	Tratamientos combinados de cepas de hongos micorrizógenos conocidas y aislados de <i>Frankia</i> sp.
TconN 60K N/ha		GiF2	
Tno estéril		G1F3	
TF	Testigos para evaluar el efecto de los sustratos de cada uno de los aislados y cepas evaluadas	GmF2	Tratamientos combinados en mezcla de los microorganismos evaluados
TMn	MMn		
TMi	MMi		
T.E.c.	MF1,2,3		
TMn + F	MMn + MMi		
		MMn + F1,2,3	

\* E.c.: *Entrophospora colombiana* G.f.: *Glomus fistulosum* G.i.: *Glomus intraradices* G.m.: *Glomus manihotis*

## **Diseño experimental**

Se empleó un diseño completamente aleatorizado con 37 tratamientos (cinco de los cuales corresponden a testigos para evaluar el efecto de los sustratos empleados) por seis repeticiones. Las variables medidas correspondieron a biomasa seca de la parte aérea y de nódulos, % de infección en raíces y acumulación de N y de P en la parte aérea.

El análisis estadístico: se realizó según un análisis MANOVA para comparar el efecto promedio o de variabilidad de todos los tratamientos; con el fin de discernir mediante contrastes canónicos entre qué tratamientos está la diferencia, para así probar el efecto de los tratamientos en conjunto.

## **Condiciones del ensayo**

Las unidades experimentales del ensayo se dispusieron en un arreglo totalmente aleatorizado en la Estación experimental de San Pablo de la Universidad Nacional de Medellín localizada en Rionegro (Antioquia) a 6° 9' LN y 75° 23' LO, expuestas a las condiciones ambientales y suplementadas con riego cuando las condiciones lo exigieron. El ensayo se cosechó a los 4 meses después del transplante. Se cosechó la parte aérea y se secó a 60 °C hasta obtener peso seco constante para la evaluación de la biomasa seca y la determinación del contenido de nitrógeno y de fósforo. Las raíces fueron guardadas en refrigeración para el posterior análisis de infección y de nódulos. Igualmente de cada unidad, se tomó una muestra de suelo para el conteo de esporas de hongos endomicorrizógenos.

## **Resultados y discusión**

### **Aislamientos nativos**

*Frankia* sp.

Los aislamientos de la bacteria *Frankia* solo se obtuvieron en el medio agar-caseína a partir de diez días de incubación. El aislamiento *in vitro* no es común, en ocasiones puede tardar de uno a seis meses para crecer; muy pocas cepas de *Frankia* son cultivables y las que se pueden cultivar son generalmente las más saprofíticas o las menos exigentes entre las que se encuentran las que se asocian con la familia *betulaceae* como el género *Alnus*. Los aislados obtenidos se

codificaron y se encuentran en la colección de bacterias del Laboratorio de Microbiología de suelos de la Universidad Nacional, Sede Medellín (Tabla 2).

**Tabla 2.** Aislados nativos del género *Frankia* obtenidos en medio agar-caseína a partir de árboles de *Alnus acuminata* de un suelo andisol (Rionegro, Ant.)

Código - procedencia	Descripción de la colonia					Descripción del microorganismo		
	Tamaño mm	Forma	Color	Aspecto	T*	Forma 100x	Reacción gram	otra característica
CUNMS 501 Vereda el Tablazo (Rionegro, Ant.)	2-3 mm	redonda	amarillo	Adheridas al medio, producen taninos	10	micelias	(+)	forma vesículas
CUNMS 502 Estación experimental San Pablo U. Nacional (Rionegro, Ant.)	puntiforme	redonda	blanco-crema	Adheridas al medio	17	micelias	(+)	
CUNMS 503 Estación experimental San Pablo U. Nacional (Rionegro, Ant.)	3 mm	redonda	blanca	Adheridas al medio	15	micelias	(+)	forma vesículas

T\* tiempo de incubación en días

Weber (1990) y Kurdali et al (1990) reportan que la diferencia entre cepas en cuanto a la esporulación en nódulos (sp+) o no esporulación (sp-), puede hacer relación con el comportamiento funcional concluyendo que las cepas sp- presentaban mejor capacidad de fijación de nitrógeno con varias especies de *Alnus*. Las sp+ solamente fueron efectivas con la misma especie vegetal de donde provenían, aplicados como macerados de nódulos; ya que *Frankia* sp+ no puede cultivarse. Lo anterior permite suponer que los aislados del presente trabajo fueron tipo sp-, lo que tendría que confirmarse.

### Hongos micorrizógenos

Se seleccionaron algunos aislados de las más representativos para evaluarlos en el presente trabajo y se denominaron inicialmente como Mn1 (micorriza nativa 1) código MICUNMS31, Mn2 (micorriza nativa 2) código MICUNMS32 y Mn3 (micorriza nativa 3) código MICUNMS33. Estos se encuentran en la colección de micorrizas del Laboratorio de Microbiología de suelos de la Universidad Nacional, Sede Medellín y presentan las siguientes características (Tabla 3).

**Tabla 3.** Aislados nativos de hongos endomicorrizógenos obtenidos de árboles de *Alnus acuminata* de un suelo andisol (Rionegro, Ant.)

Código	Descripción				Identificación
	Color (INVAM)	Tamaño (µ)	Forma	Otra	
MICUNMS 31	0/0/20/0 (blanco-crema)	120-100	redonda	superficie grabada	<i>Glomus</i> sp.
MICUNMS 32	0/30/70/10 (naranja-miel)	80-100	redonda	superficie grabada con apariencia de "malla"	<i>Acaulospora</i> sp.
MICUNMS 33	20/60/70/10 (café-vinotinto)	90-110 x 100-140	redonda y ovalada	superficie grabada	<i>Glomus</i> sp.

## Efecto de tratamientos

El análisis descriptivo permitió establecer que los tratamientos de mejor comportamiento en cuanto a promedio y variabilidad para la variable biomasa aérea fueron Mn2F2, GfF2, GfF1, F3 y MMnF123. En cuanto a la variable biomasa de nódulos, los mejores tratamientos correspondieron a F3, Mn2F3, T no estéril, Mn1F2 y Mn3. Con respecto a la acumulación de N por la planta los mejores tratamientos fueron Mn2F2, T no estéril, MMnF123, Mn2F1, GfF2 y GfF1. Para la acumulación de P se tiene Mn2F2, Mn2F3, GfF1, MMnF123 y MMnMMi.

Al efectuar el análisis multivariado de la varianza se encontró que existen diferencias altamente significativas en el efecto promedio de los distintos tratamientos, de acuerdo a las pruebas de lambda Wilks, Pillai's, Hotelling y Roy (Tabla 4).

**Tabla 4.** Valor crítico para probar la significancia del análisis multivariado de la varianza.

Prueba	valor	F	Gl	D Gl	valor P
$\lambda$ Wilks	0.04640815	3.8271	180	804.0798	0.0001
Pillai's	2.14017949	3.4300	180	825	0.0001
Hotelling	4.79407770	4.2454	180	797	0.0001
Roy	2.14098953	9.8175	36	165	0.0001

Mediante la prueba de máxima verosimilitud se estableció que las comparaciones entre los diferentes tratamientos se deben efectuar en una cuarta dimensión (Tabla 5).

**Tabla 5.** Función máxima verosímil mediante la cual se establece la dimensionalidad en la cual se comparan los tratamientos.

Radio máximo verosímil	F aproximado	G.l.	D.G.l.	valor P
1	0.04640815	3.8271	180	0.0001
2	0.14581393	2.8770	140	0.0001
3	0.31178456	2.2811	102	0.0001
4	0.59710803	1.4617	66	0.0174
5	0.84549406	0.9423	32	0.5612

Las funciones canónicas derivadas del análisis multivariado de la varianza (MANOVA) permitieron probar las diferencias entre los efectos promedios de los tratamientos para esclarecer entre cuales existe la divergencia.

En general, las funciones canónicas (Tabla 6) han permitido establecer que los tratamientos que presentan los aislados de *Frankia* (F2 ó F3) o el aislado de micorriza nativa (Mn2) mejoran significativamente la respuesta de la planta con

respecto a las variables analizadas. En la cuarta función canónica el tratamiento en el que se combinan dos de esos aislados (Mn2F3) marca una diferencia contundente con respecto a todos los demás tratamientos analizados.

**Tabla 6.** Análisis del efecto de algunos tratamientos en el desarrollo del Aliso (*Alnus sp.*) mediante funciones canónicas.

Tratamiento	Tukey (1 <sup>ra</sup> función canónica)
Mn2F2	A
Tnpester	Ab
GfF2	Abc
MMnF123	Abcd
EcF2	Abcde
GfF1	abcdef
Mn2F1	abcdefg
TsmN	bcdefgh
F3	cdefghij
TconN	cdefghij
Mn2	defghij
GfF3	defghij
Mn2F3	ghijk
Gi	hijk
Mn3	k

Tratamiento	Tukey (2 <sup>da</sup> función canónica)
TconN	a
GiF3	ab
Mn2F3	abc
Mn2F1	abc
Mn2	abc
GfF2	bc
GfF1	bc
Gi	bc
Mn2F2	bc
Mn3	bc
EcF2	cd
MMnF123	cd
TsmN	cd
F3	cd
Tnpester	d

Tratamiento	Tukey (3 <sup>ra</sup> función canónica)
F3	A
Gf	Ab
Mn2F3	Abc
EcF2	Abcd
TconN	Abcd
Mn2F2	Abcde
GfF1	Abcde
GfF2	Abcde
Mn2F1	Bcde
GiF3	Bcde
MMnF123	Bcde
TsmN	Bcde
Mn3	Cde
Gi	De
Tnpester	E

Tratamiento	Tukey (4 <sup>ta</sup> función canónica)
Mn2F3	a
GfF1	ab
F3	ab
Mn2F2	ab
TconN	ab
TsmN	ab
EcF2	B
Letras comunes no hay diferencia significativas	

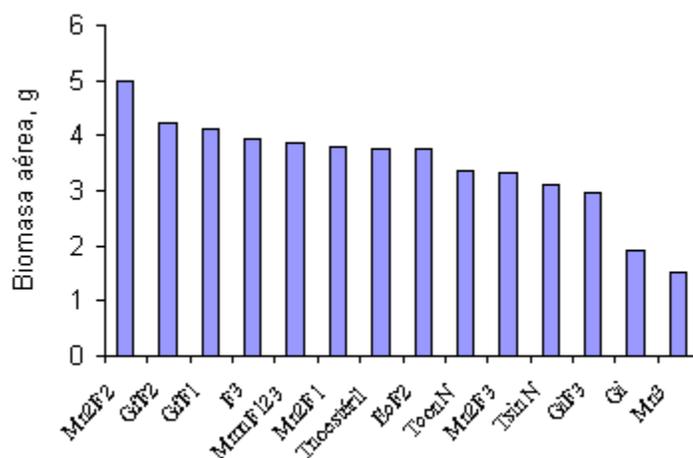
Los tratamientos con cepas nativas de *Glomus sp.* no presentaron respuesta positiva con respecto a otros tratamientos; Valdés y Sánchez-Francia (1996), quienes evaluaron cepas nativas de *Glomus sp.* y otros tratamientos en la misma especie vegetal en suelos de México; reportan que las especies de *Glomus sp.* nativas de esos suelos no inducen respuesta positiva en el crecimiento del aliso.

Con respecto al tratamiento combinado de *G. fistulosum* (Gf) con los aislados nativos de *Frankia* (F1 y F2) (Tabla 6) se obtuvo un efecto positivo en algunas variables de respuesta de la planta, lo que posiblemente se deba a que la cepa analizada de esa especie (obtenida de suelos de la zona cafetera del Departamento de Caldas donde pudo haber estado asociada efectivamente a árboles de aliso frecuentes en esa zona), facilitó la colonización con *Frankia*, según lo reportado por Fraga-Baddiar (1987) quien afirma que la colonización inicial con algunos hongos micorrizógenos en plántulas de aliso es una condición previa a la colonización por *Frankia*. Para las variables medidas, los mejores

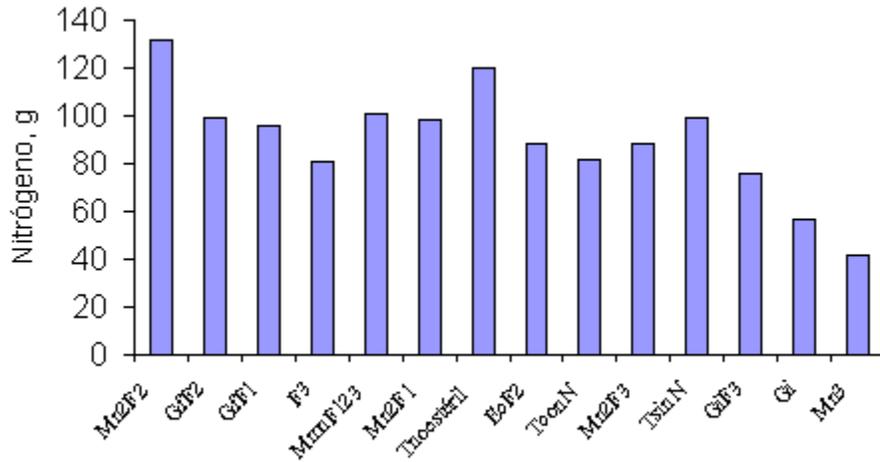
resultados se obtuvieron siempre con la mezcla *Frankia*-micorriza, la mezcla de cepas de hongos micorrizógenos conocidos presentaron efecto depresivo significativo en el crecimiento cuando se comparan con los testigos.

En un ensayo exploratorio, usando un suelo como inóculo con presencia de esporas de hongos MA sin aislar, Botero et al (2001) encontraron una relación positiva entre la inoculación con estos suelos y la infección de las raíces y de ésta con el desarrollo de las plantas. Russo et al (1989) en un trabajo similar en *A. acuminata* con doble inoculación encontraron que la inoculación con *G. intrarradices* y una cepa de *Frankia* ArI3 produjeron la más alta reducción de acetileno a niveles bajos de aplicación de P (10 ppm); lo que no ocurrió en este trabajo, excepto para el tratamiento en el cual se asoció *G. intrarradices* con F3; el cual estuvo a la altura del tratamiento con N, según el análisis mediante la segunda función canónica (Tabla 6). Confirmando una relativa especificidad entre los endófitos, lo que concuerda con los resultados de este trabajo, aunque no haya sido con los mismos endófitos.

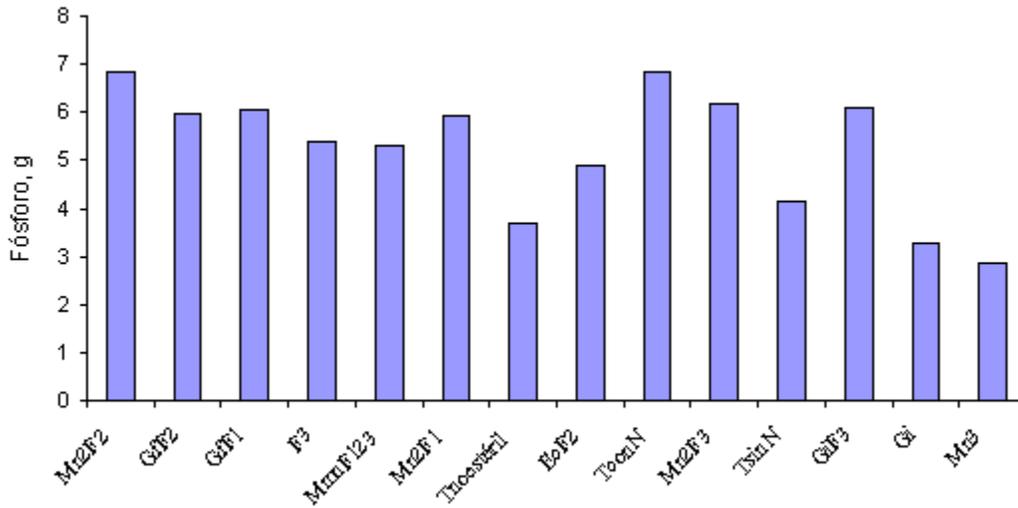
Al realizar el análisis univariado mediante la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ) para la comparación de efectos promedios (Figura 1); se encontró que para las variables biomasa seca de la parte aérea y acumulación de N, el tratamiento Mn2F2 obtuvo el más alto promedio presentando diferencias estadísticamente significativas con respecto a todos los demás tratamientos. Con respecto a las otras variables analizadas (biomasa seca de nódulos y % de infección en raíces), no se encontró una respuesta contundente a este tratamiento; sin embargo en la figura 1 se resalta el efecto causado en la infección micorrizal por el tratamiento con *Frankia* (F3).



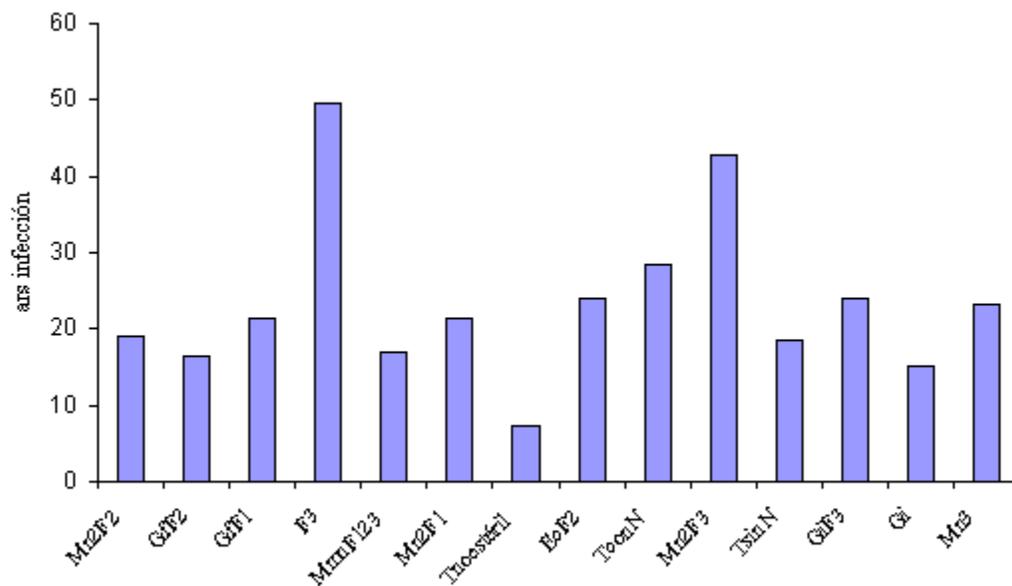
**Figura 1a.** Comparación de promedios de la variable biomasa aérea de la especie *Alnus acuminata* var. *Acuminata* en un andisol con diferentes tratamientos de *Frankia* y hongos MA.



**Figura 1b.** Comparación de promedios de la variable de acumulación de N en la parte aérea de la especie *Alnus acuminata* var. *Acuminata* en un andisol con diferentes tratamientos de *Frankia* y hongos MA



**Figura 1c.** Comparación de promedios de la variable acumulación de P en la parte aérea de la especie *Alnus acuminata* var. *Acuminata* en un andisol con diferentes tratamientos de *Frankia* y hongos MA.



**Figura 1d.** Comparación de promedios de la variable % de infección en raíces de la especie *Alnus acuminata* var. *Acuminata* en un andisol con diferentes tratamientos de *Frankia* y hongos MA.

El tratamiento con nitrógeno igualó al tratamiento Mn2F2 en cuanto a acumulación de P en el tejido aéreo de las plantas; sin embargo cuando se analizaron las demás variables, su efecto no fue significativo.

## Conclusiones

- Con este trabajo se concluye que la especie de aliso (*Alnus acuminata* var. *Acuminata*) en suelos andisoles del oriente antioqueño, responde positivamente a la inoculación con ambos tipos de endófitos en forma combinada.
- El tratamiento combinado de cepas nativas del género *Frankia* y hongos endomicorrizógenos (Mn2F2) presenta las mejores perspectivas en cuanto a la producción de biomasa y acumulación de nitrógeno equivalente a la aplicación de 60 kg N/ha.
- De las especies probadas de hongos micorrizógenos, *G. fistulosum* fue la única que muestra un efecto positivo cuando se combinó con cepas nativas de *Frankia*.

## Agradecimientos

Los Autores expresan sus agradecimientos a la Dirección de Investigaciones de la Universidad Nacional Sede Medellín (DIME) por la financiación del proyecto, a EPM por el suministro de las plántulas, al profesor Fernando Restrepo B. de la Universidad de Antioquia por la asesoría estadística, a la Bacterióloga Sandra Viviana González y a la estudiante Elizabeth Hernández del programa de Microbiología y Bioanálisis de la Universidad de Antioquia por su gran colaboración durante todas las etapas del desarrollo del proyecto.

## Referencias

**Botero C y Dussán J 2001** La micorrización del aliso *Alnus acuminata* H.B.K. subsp. *acuminata* con suelos nativos y su influencia sobre el crecimiento. *Actualidades Biológicas* 23(75):33-40

**Burgraaf A J P 1984** Isolation, cultivation and characterization of Frankia strains from actinorhizal root nodules. Alblasserdam: Offsetdrukkerij Kanters B.V. 179p.

**Houwers A and Akkermans A D L 1981** Influence of inoculation on yield of *Alnus glutinosa* in the Netherlands. *Plant and Soil*. 61:189-202

**Fraga-Baddiar A 1987** Interactions entre les symbionts mycorrhiziens et les symbiontes fixateurs d'azote chez l'aulne glutineux (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn). Thèse de Docteur de 3e. cycle. Université de Nancy I, Francia.

**Kurdali F, Rinaudo G, Moiroud A and Domenach A M 1990** Competition for nodulation and  $^{15}\text{N}_2$ -fixation between a Sp+ and a Sp- *Frankia* strain in *Alnus incana*. *Soil Biology and Biochemistry*. 22(1): 57-64

**Restrepo U, Bellefleur P 1996** L'aulne des Andes de Colombie: Écologie et identification. *Bois et Forêts des Tropiques*. 247:53-68

**Russo R O, Winship L J and Benson D R 1989** Evaluating alder-endophyte (*Alnus acuminata*-*Frankia*-mycorrhizae) interactions I. Acetylene reduction in seedlings inoculated with *Frankia* strain Ar13 and *Glomus intraradices*, under three phosphorus levels. *Plant and Soil*. 118(1-2): 151-155

**Valdés M y Sánchez-Francia D 1996** La respuesta de alnus y casuarina a la inoculación endomicorrízica. *Revista mexicana de Micología*. 12:65-77

**Weber A 1990** Host specificity and efficiency of nitrogenase activity of *Frankia* strains from *Alnus incana* and *Alnus glutinosa*. *Symbiosis-Rehovot*. 8 (1): 47-60