

**¿SIMBIOSIS ENTRE HONGOS FORMADORES DE MICORRIZAS Y  
PLÁNTULAS DE *Coffea arabica*, ES ESTIMULADA POR LA  
FORMONONETINA?**

**SANDRA MILENA LATORRE ÁLVAREZ**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS PURAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA  
BUCARAMANGA  
2007**

**¿SIMBIOSIS ENTRE HONGOS FORMADORES DE MICORRIZAS Y  
PLÁNTULAS DE *Coffea arabica*, ES ESTIMULADA POR LA  
FORMONONETINA?**

**SANDRA MILENA LATORRE ÁLVAREZ**

**Trabajo de grado para optar  
al título de Biólogo**

**Director:  
PAULA ADRIANA ROJAS ORTIZ  
Microbióloga Industrial  
Laboratorio de Micorrizas. Suppra Ltda.**

**Codirector:  
NELSON RODRÍGUEZ LÓPEZ  
M.Sc. Fisiología Vegetal  
Profesor de T.C Universidad Industrial de Santander**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS PURAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA  
BUCARAMANGA  
2007**

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, a quien todo le debo y por quien existo.

A mi familia, en especial a mi Padre, Rafael Latorre Bayona, por brindarme su amor, apoyo y comprensión necesarios en la realización de una de mis metas.

A la empresa Suppra Ltda. por la oportunidad que me brindaron para el desarrollo de este trabajo de investigación con ellos y por el apoyo financiero que le brindaron al mismo.

Al Servicio Nacional de Aprendizaje-SENA, por su apoyo económico para la realización de este proyecto.

A la Microbióloga Paula Adriana Rojas Ortiz, directora de este proyecto, por su amistad, enseñanzas, colaboración y apoyo prestado para la realización y satisfactoria entrega de este proyecto.

Al Fisiólogo Vegetal Nelson Rodríguez, codirector de este trabajo, por sus enseñanzas, colaboración y apoyo prestado para la realización y satisfactoria entrega de este proyecto.

A la profesora Tulia Rivera de la Escuela de Matemáticas de la Universidad Industrial de Santander y al biólogo Iván Camargo Rodríguez por su valiosa colaboración y asesoría del componente estadístico del proyecto.

A la Familia Rodríguez por su inmensa colaboración y apoyo en la realización de esta investigación.

A mis amigos del Movimiento estudiantil Alfa y Omega por su colaboración y apoyo espiritual brindado durante el transcurso de mi carrera.

## TABLA DE CONTENIDO

	Pag
INTRODUCCIÓN	1
1. MATERIALES Y MÉTODOS	3
1.1 Ubicación del Experimento	3
1.2 Material Vegetal	3
1.3 Desarrollo del experimento	4
1.4 Análisis estadístico	5
2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	6
2.1 Hongos nativos aislados	6
2.2 Porcentaje de colonización.	7
2.3 Densidad de esporas	9
2.4 Crecimiento y acumulación de biomasa en las plantas	10
2.5 Tasa de Crecimiento Relativo (RGR)	12
2.6 Distribución de biomasa mediante la estimación de las fracciones secas de los órganos	13
3. CONCLUSIONES	15
4. RECOMENDACIONES	15
LITERATURA CITADA	16

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Distribución de las fracciones de biomasa seca (%) en las plántulas de café.	14

## LISTA DE TABLAS

	Pag.
<b>Tabla 1.</b> Efecto de la formononetina sobre el porcentaje de colonización de los inóculos de HFMA en el sistema radicular de las plántulas de Café.	8
<b>Tabla 2.</b> Efecto de la formononetina sobre la densidad de esporas (g/ss) de los inóculos de HFMA en las plántulas de Café.	10
<b>Tabla 3.</b> Efecto de la formononetina sobre los inóculos de HFMA en la Acumulación de biomasa seca de las plántulas de Café.	12
<b>Tabla 4.</b> Tasa de crecimiento relativa, RGR, ( $\text{mg/g}^{-1}$ ) de las plántulas de Café en los ocho tratamientos durante los tres intervalos de tiempo.	13

**TITULO:** ¿SIMBIOSIS ENTRE HONGOS FORMADORES DE MICORRIZAS Y PLÁNTULAS DE CAFÉ ES ESTIMULADA POR LA FORMONONETINA? \*

**AUTOR:** LATORRE ÁLVAREZ Sandra Milena \*\*

## **RESUMEN**

Los flavonoides juegan un papel importante en los diferentes procesos de regulación de la simbiosis micorrícica. Entre ellos la formononetina, que puede inhibir o estimular la esporulación, la colonización radical y el crecimiento micelial de los hongos micorrícicos arbusculares. En este estudio evaluamos el efecto de la formononetina sobre la simbiosis de Hongos Formadores de Micorrizas Arbusculares (HFMA) en las raíces de plántulas de *Coffea arabica* en condiciones de vivero. Se utilizó una mezcla de inóculos nativos (N), una mezcla de inóculos comerciales o foráneos (C) y la combinación de los mismos (M), con y sin aplicación de formononetina (F), para un total de seis tratamientos. Se analizaron el porcentaje de colonización radicular, la densidad de esporas/g de suelo, la acumulación de biomasa seca total, la distribución de las fracciones de biomasa y la tasa de crecimiento relativo. La aplicación de formononetina al sustrato inhibió el porcentaje de colonización y la acumulación de biomasa seca en los tratamientos con HFMA comerciales y estimuló la densidad de esporas del tratamiento con HFMA nativos (N+F), pero la inhibió en el tratamiento mixto (M+F). Los resultados indican, que probablemente, el efecto de la formononetina sobre los diferentes tratamientos pudo estar influenciado por las especies de HFMA presentes y por la concentración de la formononetina ( $0.5\text{g.L}^{-1}$ ) empleada en este estudio.

### **Palabras claves:**

Endomicorrizas, *Coffea arabica*, isoflavonoide, crecimiento.

\* Proyecto de Grado

\*\* Facultad de Ciencias. Escuela de Biología, Director: Paula Adriana Rojas Ortiz.

**TITLE:** ¿SYMBIOSIS BETWEEN MYCORRHIZAL FUNGUS AND SEEDLINGS OF COFFEA IS STIMULATED BY THE FORMONONETIN? \*

**AUTHOR:** LATORRE ÁLVAREZ Sandra Milena \*\*

### **ABSTRACT**

The flavonoides play an important role in the different processes from regulation of the micorrhizal symbiosis. Among them the formononetin, can inhibit or stimulate the esporulation, the root colonization and the mycelia growth of the Arbuscular Micorrizicos Fungi (AMF). In this study, the formononetina effect on the symbiosis between AMF and the *Coffea arabica* roots seedlings under greenhouse conditions was determined. A mixture of indigenous inocules (N), a mixture of commercials or foreign inocules (C) and the combination of such was used (M), with and without application of formononetina (F), for a total of six treatments. The percentage of roots colonization, the density of ground spores/g and the dry biomass, as well as the accumulation and fractions of biomass distribution and the rate of relative growth, was analyzer. The application of formononetin to the ground inhibit the percentage of colonization and the accumulation dry biomass in the treatments with foreigners AMF and stimulate the density of ground spores/g of the treatments with indigenous AMF (N+F), but the inhibit in the treatment mixed (M+F). This results indicate that probably, the effect of the formononetin over the different treatments could be influence by the type de AMF and by the formononetin ( $0.5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) concentration employed in this study.

**Key words:**

Arbuscular mycorrhiza, *Coffea arabica*, isoflavonoid, growth.

\* Grade Work

\*\* Ciencias's Faculty.Biologia's, Director's school: Paula Adriana Rojas Ortiz.

## INTRODUCCIÓN

Las micorrizas arbusculares son asociaciones simbióticas mutualistas entre determinados hongos del orden Glomerales y la mayoría de las raíces de las plantas superiores. Los Hongos Formadores de Micorriza Arbuscular (HFMA), permite a las plántulas el mayor aprovechamiento de los nutrientes del suelo, el incremento en la acumulación de biomasa y en la tasa de crecimiento relativo, sobre todo, en fase de vivero (Agudelo y Casierra-Posada, 2004; Jaramillo *et al.*, 2004; Aguirre y Kohashi-Shibata, 2002). Además, esta asociación simbiótica brinda una mayor tolerancia a las plantas frente al estrés hídrico y al ataque por patógenos (Castro-Toro y Rivillas, 2002; Escalona, 2002).

De otro lado, resultados experimentales demuestran que el café es una especie considerada como micotrófica obligada (López, 1983; Rivillas, 1995 citados por Bolaños *et al.*, 2000). En estudios realizados por Bolaños *et al.*, (2000) y Estrada y Sánchez, (1995), observaron que la asociación del café (var. Colombia) con los HFMA no es afectada por la concentración de P presente en el suelo y es mayor en suelos esterilizados o perturbados.

Así mismo, se ha reportado que la simbiosis entre HFMA y las plantas de café favoreció el aumento de la masa seca total de las plantas, proporcionó un mayor sistema radicular, incrementó la absorción de nutrientes y brindó mayor resistencia a patógenos, entre otros (Castro-Toro y Rivillas, 2002; Bolaños *et al.*, 2000; Arango, 1992; Parra *et al.*, 1990).

Adicionalmente, el establecimiento de la simbiosis micorrícica es favorecida por algunos exudados que emiten las raíces y que son conocidos como flavonoides.

Estas sustancias están implicadas en los diferentes procesos de regulación de la simbiosis y su papel puede variar según la etapa en la que se encuentre e inclusive pueden afectar el estado preinfectivo de los hongos micorrícicos (Scervino *et al.*, 2005; Larose *et al.*, 2002; Akiyama *et al.*, 2000). Sin embargo, en algunos casos, este efecto puede ser negativo (Baptista y Siquiera, 1994).

Uno de los flavonoides que emiten las raíces de algunas plantas es la formononetina (7'-hydroxy, 4'- methoxyisoflavona). Según se ha reportado por varios investigadores la formononetina favorece la germinación de esporas, el crecimiento hifal de algunos géneros de HFMA, el aumento en el porcentaje de colonización y de los puntos de entrada de acuerdo con la concentración aplicada al suelo (Nair *et al.*, 1991; Da Silva-Junior y Siqueira, 1997). Además, incrementa la formación de hifas extraradicales, la densidad de esporas en el suelo y la efectividad de los HFMA nativos (Davies *et al.*, 2005 a y b). Sin embargo, en algunos estudios se ha reportado su ineficacia en la colonización (Volpin *et al.*, 1994). Por lo tanto, la acción y efecto de este isoflavonoide es aún materia de controversia.

Considerando que, el uso de HFMA adaptados a los suelos de cada región productora del trópico constituye una valiosa herramienta biotecnológica que asociada a otras, como el uso de isoflavonoides sintéticos, p.e. formononetina, pueden solucionar problemas de propagación y nutrición de los cultivos, especialmente, en aquellos de interés económico para nuestro país, como el café; en el presente trabajo se planteó la siguiente hipótesis: La aplicación del isoflavonoide formononetina incrementará la simbiosis entre HFMA tanto nativos

como foráneos, favoreciendo el crecimiento y la acumulación de biomasa en plántulas de café (*Coffea arabica* cv. Colombia). Para corroborar ésta hipótesis, se estableció el siguiente objetivo general: Evaluar el efecto de la aplicación del isoflavonoide formononetina sobre la asociación simbiótica entre HFMA, tanto nativos como foráneos, y las plántulas de *Coffea arabica* en condiciones de vivero.

## **1. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1.1 Ubicación del Experimento**

El estudio se realizó en el vivero de las instalaciones de Suppra y Cia Ltda., ubicada en la granja experimental Guatiguará de la Universidad Industrial de Santander, en el municipio de Piedecuesta, Santander Colombia.

### **1.2 Material Vegetal**

Para el desarrollo del experimento se emplearon 90 plántulas de café, *Coffea arabica* var. Colombia. Las plántulas de 15 días de germinadas, se trasplantaron a bolsas de polietileno negras con 10 Kg. de suelo, previamente esterilizado con Basamid a la dosis recomendada (60 g/m<sup>2</sup>). Las propiedades físico-químicas del suelo utilizado fueron: textura: Franco-Arenosa, pH: 6,8; M.O.: 1.9%; P: 59 ppm; N: 0,095% y con K, Ca y Mg de 0,32, 11,7 y 1,2 meq/100g de suelo respectivamente.

Las plántulas se ubicaron bajo una malla polisombra que disminuyó en un 70% la radiación fotosintéticamente activa (PAR), que incidió sobre las plántulas durante el experimento. Las plántulas recibieron la aplicación de solución nutritiva de Hoagland No 2, modificada en la concentración de P a media fuerza cada 10 días.

La temperatura máxima y mínima promedio que se registro fue de 32° C y 17° C, respectivamente.

Para el experimento se utilizaron inóculos nativos y foráneos (comercial), conformados por fragmentos de raíces colonizadas, hifas y esporas. Para el primer caso, una mezcla de inóculos de HFMA nativos, aislados de la rizósfera de las plantaciones de café de los municipios productores del departamento de Santander (Bucaramanga, Piedecuesta, Floridablanca, San Gil, San Vicente, Pinchote, Palmas de Socorro, Los Santos, Socorro, Río Negro) y multiplicados en materos, usando el pasto *Brachiaria decumbes*, como planta trampa, debido a su caracterización micotrófica. En el segundo caso, se uso una mezcla de inóculos de HFMA foráneos (*Glomus manihotis*, *Acaulospora mellea* y *Entroposphora colombiana*).

Los inóculos foráneos o comerciales utilizados fueron suministrados por la empresa Fungifert Oriente Colombiano S.A. producto Fungifert . Además, se utilizó una mezcla de inóculos nativos e inóculos comerciales. Los tratamientos fueron los siguientes: Inóculo nativo (**N**); inóculo foráneo (**C**); Inóculo nativo + Inóculo foráneo (mixto: **M**); Inóculo nativo + formononetina (**N+F**); inóculo foráneo +formononetina (**C+F**) y la mezcla de inóculo nativo+ inóculo foráneo + Formononetina (**M+F**). Cada tratamiento estaba constituido por 15 plántulas útiles o unidades experimentales.

### **1.3 Desarrollo del experimento**

En el momento del transplante y según el tratamiento, se aplicó alrededor de las raicillas de las chapolas 25 g de la mezcla de los inóculos; el nativo y el comercial

con 32 y el 34 esporas/g de suelo seco (esp/gss), respectivamente. Para el inóculo mixto se utilizó 12.5g de los inóculos antes mencionados. Los tratamientos con formononetina, recibieron dos aplicaciones de 100 ml de una forma soluble en agua, conocida comercialmente como Myconate ( $0,5\text{gL}^{-1}$ ), (VAM Tech. L.L.C., Lasing, MI, USA), a los ocho y 30 días después del trasplante (ddt). Se realizaron tres muestreos destructivos a los 42, 90 y 135 días después del trasplante (ddt), tomando cinco plántulas por tratamiento. Para cada unidad experimental se determinó el porcentaje de colonización (% de colonización) según el método descrito por Phillips y Hayman (1970) y la densidad de esporas/g de suelo por el método descrito por Genderman y Nicholson (1963) (Sieverding, 1991). El material vegetal se secó en una estufa de ventilación forzada a  $80^{\circ}\text{C}$  por 72h y luego se pesó cada uno de sus órganos por separado. También se estimó la tasa de crecimiento relativo (RGR:) para el intervalo de muestreo 42 a 90 de 90 a 135 y de 42 a 135 ddt.

#### **1.4 Análisis Estadístico**

Mediante el programa SPSS versión 12.0 (2003), se analizaron los datos de biomasa, porcentaje de colonización y densidad de esporas/g de suelo seco, comparando cada inóculo micorrícico+Formononetina con su respectivo testigo (N vs N+F; C vs C+F y M vs M+F). Para cada variable se realizaron pruebas de normalidad (Kolmogorov -Smirnof), seguida de una prueba de comparación de medias, el test de t-Student para datos normales y el test Mann -Whitney (prueba de U) para datos no normales ( $P<0.05$ ). Para calcular las medias del RGR en los rangos de tiempo se utilizó el método de la aproximación clásica propuesta por

Hunt *et al.* (2002) en cada tratamiento, seguida t- Student ó el test Mann -Whitney, según correspondió, para determinar así, las diferencias estadísticas.

## 2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.1 Hongos nativos aislados

Se identificaron 11 especies de HFMA asociados a la rizósfera de las plantas provenientes de las diferentes zonas productoras del departamento de Santander:

*Glomus geosporum*; *Glomus. geosporum-like*, *Glomus rubiformis*, *Glomus ice*, *Glomus Greenish*, *Glomus clarum* *Acaulospora mellea*, *Acaulospora delicata-like*, *Acaulospora morrowiae*, *Acaulospora scrobiculata*, *Acaulospora miniscrobiculata*.

Entre estas especies *Glomus geosporum-like*, *G. rubiformis*, *G. Ice*, *G. greenish*, *G. clarum*, *A. delicata-like* y *A. miniscrobiculata*, no habían sido reportadas anteriormente asociadas a este cultivo en Colombia, mientras que, *Glomus geosporum*, *Acaulospora mellea*, *A. morrowiae* y *A. scrobiculata* fueron reportadas por Bolaños *et al.*, (2000) y Parra *et al.*, (1990) asociadas a las plantaciones de la zona cafetera central Colombiana.

Otros estudios en Brasil y Perú, también indican que *A. scrobiculata* y *A. mellea* se encuentran asociadas a los cultivos de café (Colozzi y Nogueira, 2000; Shenck y Pérez, 1990; López, 1988, 1983; Caldeira *et al.*, 1983). Lo anterior indica que, probablemente, existe una alta diversidad de HFMA, especialmente, pertenecientes al genero *Glomus* sp. y *Acaullospora* sp., en las diferentes zonas productoras que pueden favorecer la productividad de las plantaciones de café en Santander.

## 2.2 Porcentaje de colonización.

En el primer muestreo (42ddt), se evidenció colonización micorrícica en las raíces de las plántulas, sin embargo, no se observaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos (tabla 1). Los valores más altos para este parámetro, fueron exhibidos en los tratamientos de M+F y M, respectivamente. Los resultados evidencian que hay un establecimiento de la simbiosis en etapas tempranas del desarrollo de las plántulas de café. Resultados similares fueron reportados por Parra *et al.* (1990) en plántulas de café, donde la colonización se observó a partir de los 8 días después de ser inoculadas y llega a su máximo valor a los 90 ddt.

En el segundo muestreo (Tabla 1), se observaron diferencias estadísticas significativas sólo entre los tratamientos C y C+F ( $p < 0.007$ ), donde el mayor porcentaje de colonización se observó en el tratamiento C. Además, se registró un incremento, aunque no significativo, en el porcentaje de colonización en el tratamiento N+F comparado con su testigo. En el último muestreo (135ddt), no se observaron diferencias estadísticas entre los tratamientos. No obstante, los mayores valores fueron evidenciados en los tratamientos M+F y M, respectivamente (Tabla 1). Nuestros resultados coinciden con los resultados reportados por Davies *et al.*, (2005a). Estos autores observaron que, la formononetina no estimuló la colonización de HFMA en plantas de *Solanum tuberosum* lo que contrasta, con los reportes realizados por otros investigadores, en donde la formononetina promovió la colonización por los HFMA en raíces de trébol (*Trifolium repens*) “*in Vitro*” (Nair *et al.*, 1991) y en raíces de soya (*Glycine*

*max*) y maíz (*Zea mays* L.) el estímulo fue evidente usando diferentes concentraciones del mismo (Da Silva-Júnior y Siqueira,1997). Así mismo, la formononetina, en etapas tempranas de desarrollo radicular, estimuló la colonización en plántulas de *Theobroma cacao* c.v. IMC-67 y ejerció un papel regulador de la misma posteriormente (Blanco, 2006). Es importante destacar que aunque la formononetina no ejerció un efecto estimulante sobre la simbiosis, si mostró un efecto inhibitorio sobre el tratamiento C+F aunque solo en el segundo muestreo.

**Tabla 1.** Efecto de la formononetina sobre el porcentaje de colonización de los inóculos de HFMA en el sistema radicular de las plántulas de café (Media y  $\pm$  SD., n = 5).

<b>Tratamiento</b>	<b>42ddt</b>	<b>90ddt</b>	<b>135ddt</b>
<b>Nativo (N)</b>	2.595 $\pm$ 0.282	42.80 $\pm$ 26.395	2.512 $\pm$ 1.167
<b>N+F</b>	1.769 $\pm$ 1.259	64.40 $\pm$ 19.781	2.045 $\pm$ 1.010
<b>Comercial (C)</b>	3.212 $\pm$ 0.597	78.20 $\pm$ 8.438*	2.479 $\pm$ 1.438
<b>C+F</b>	2.691 $\pm$ 1.095	61.20 $\pm$ 6.419*	2.175 $\pm$ 0.913
<b>Mixto (M)</b>	3.952 $\pm$ 0.990	60.60 $\pm$ 18.582	2.833 $\pm$ 1.105
<b>M+F</b>	3.902 $\pm$ 1.403	44.20 $\pm$ 18.404	2.860 $\pm$ 1.334

(\* )Diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ )

Los resultados de este trabajo corroboran que la respuesta de los HFMA a los isoflavonoides está influenciada por diversos factores, ya que la acción de éstos sobre la simbiosis depende principalmente del tipo de flavonoide, de su concentración, del tipo de HFMA y del papel autorregulador que se le confiere a estas sustancias (Baptista y Siqueira, 1994; Da Silva-Junior y Siquiera, 1997; Larose *et al.*, 2002; Scervino *et al.*, 2005). Lo anterior, indica que, la concentración de formononetina utilizada en este experimento, probablemente, no fue la mas indicada para estimular la colonización micorrícica en una especie como café, la cual es una especie leñosa y perenne, que posee un sistema radical con

características muy diferentes a las especies de ciclo corto, en donde se ha reportado que la formononetina en una concentración específica estimula la colonización de los HFMA.

### **2.3 Densidad de esporas**

La densidad de esporas/g de suelo seco (esp/gss) se presentan en la tabla 2. Tanto en el primer como en el segundo muestreo, la esp/gss no presentó diferencias estadísticas entre los tratamientos. La mayor densidad de esporas/g de suelo seco (esp/gss) se alcanzó a los 135 ddt y se observaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos N y N + F ( $p < 0.014$ ) y entre M y M + F ( $p < 0.010$ ). En el tratamiento M se registró el mayor número de esporas (56 esp/gss). Al analizar los resultados obtenidos sobre el efecto de la formononetina durante el último muestreo, se puede evidenciar que esta sustancia presentó un efecto variable, pues estimuló el inóculo nativo, aumentando su esporulación, pero inhibió el inóculo mixto y sobre el inóculo comercial no ejerció ningún efecto. Al comparar estos resultados con los obtenidos por Davies *et al.*, (2005b), quienes reportaron un efecto significativo de la formononetina sobre la esporulación de los HFMA nativos comparado con los HFMA foráneos, (aunque a concentraciones menores ( $0.015\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) a la empleada en este experimento ( $0.5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )), nos permite deducir que tanto la concentración como el tipo de HFMA son factores importantes en la acción de los flavonoides sobre la simbiosis, lo que puede en parte, explicar el efecto variable de la formononetina sobre nuestros resultados.

De otro lado, la mayor esporulación al final del experimento coincide con los resultados obtenidos por Parra *et al*, (1990), quienes encontraron que luego de 100 ddt se observa la mayor densidad de esporas en la rizósfera de las plántulas de café. Lo anterior sugiere, que el establecimiento de la simbiosis requiere de un tiempo que permita la adaptación de los HFMA, a factores inherentes a la planta y al sustrato, en las distintas fases de la misma y que dan a lugar a este comportamiento.

**Tabla 2.** Efecto de la formononetina sobre la densidad de esporas (g/ss) de los inóculos de HFMA en las plántulas de café (Media y  $\pm$  SD., n = 5).

<b>Tratamiento</b>	<b>42ddt</b>	<b>90ddt</b>	<b>135ddt</b>
<b>Nativo (N)</b>	13.60 $\pm$ 4.56	15.00 $\pm$ 2.91	27.40 $\pm$ 6.58*
<b>N+F</b>	14.40 $\pm$ 1.94	19.80 $\pm$ 4.43	40.00 $\pm$ 6.20*
<b>Comercial (C)</b>	15.00 $\pm$ 2.91	21.00 $\pm$ 3.80	41.40 $\pm$ 13.72
<b>C+F</b>	19.80 $\pm$ 4.43	25.20 $\pm$ 7.19	44.80 $\pm$ 9.78
<b>Mixto(M)</b>	18.60 $\pm$ 7.60	20.80 $\pm$ 5.49	55.40 $\pm$ 6.46*
<b>M+F</b>	23.60 $\pm$ 11.78	21.40 $\pm$ 1.94	40.20 $\pm$ 7.85*

(\*) La presencia del asterisco significa que existe diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ )

## 2.4 Crecimiento y acumulación de biomasa en las plantas

Los resultados sobre la acumulación biomasa seca se presentan en la tabla 3. A los 42 días después del transplante (ddt), no se presentaron diferencias estadísticas. En el segundo muestreo (90 ddt), se presentaron diferencias estadísticas entre los tratamientos C y C+F ( $p < 0.012$ ), al igual que en el último muestreo con una  $p < 0.001$ . De acuerdo a estos resultados, la formononetina no ejerció ningún efecto sobre los tratamientos N+F y M+F, pero sí un efecto inhibitorio sobre el inóculo comercial. En contraste, Davies *et al.*, (2005a) y Blanco (2006) observaron que la formononetina estimuló la producción de biomasa seca

en plantas de *Solanum tuberosum* y *Theobroma cacao*, respectivamente. Mientras que, Da Silva- Junior y Siqueira (1997) observaron un efecto variable de la formononetina en plantas de maíz y de soya, ya que solo ejerció un efecto estimulante en las plantas de soya, pero a ciertas concentraciones (5-10 mg.L<sup>-1</sup>). Por lo tanto, los resultados de este trabajo indican que, probablemente, la concentración de formononetina utilizada no fue la más indicada para que provocara una mayor acumulación de biomasa seca de las plántulas de café.

Adicionalmente, estudios realizados en Colombia sin el uso de la formononetina, Arango *et al.* (1992), Estrada y Sánchez de P. (1995) y Parra *et al.* (1990), reportaron que los HFMA estimularon la producción de biomasa seca en plántulas de café, a los 100 días después de la inoculación, lo cual coincide con los resultados obtenidos en nuestro experimento. Este comportamiento está relacionado con la fase de establecimiento de la simbiosis (fase inicial), ya que en ella el gasto energético por parte de la planta hospedante se incrementa debido a que parte de los carbohidratos y la energía de la respiración, son requeridos para la construcción nuevos tejidos en los hongos, pero decrece cuando la asociación madura (Graham y Eissenstat, 1994, citado por Bryla y Eissenstat, 2005) Lo anterior, explica el incremento de la biomasa en la etapa final del estudio. Por tal razón, el efecto de los HFMA sobre esta variable es visible solo después que la simbiosis se haya establecido.

**Tabla 3.** Efecto de la formononetina sobre los inóculos de HFMA en la acumulación de biomasa seca de las plántulas de café (Media y  $\pm$  SD., n = 5).

Tratamiento	42ddt	90ddt	135ddt
<b>Nativo (N)</b>	- 0,552 $\pm$ 0,060	0,140 $\pm$ 0,079	4,361 $\pm$ 0,992
<b>N+F</b>	- 0,597 $\pm$ 0,033	0,275 $\pm$ 0,277	4,183 $\pm$ 0,828
<b>Comercial(C)</b>	- 0,552 $\pm$ 0,039	0,252 $\pm$ 0,050 *	4,986 $\pm$ 0,480*
<b>C+F</b>	- 0,511 $\pm$ 0,082	0,080 $\pm$ 0,108 *	2,236 $\pm$ 1,069*
<b>Mixto (M)</b>	- 0,513 $\pm$ 0,086	0,106 $\pm$ 0,088	3,618 $\pm$ 1,337
<b>M+F</b>	- 0,560 $\pm$ 0,867	0,111 $\pm$ 0,090	3,621 $\pm$ 0,575

(\*) La presencia del asterisco significa que existe diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ )

## 2.5 Tasa de Crecimiento Relativo (RGR)

Los valores para la RGR son presentadas en la tabla 4. En el primer intervalo (42-90 ddt), la RGR presento diferencias estadísticas ente los tratamientos C y C+F ( $p < 0,010$ ). En el intervalo 90-135 ddt, no se observaron diferencias estadísticas entre los tratamientos, mientras que para el tercer intervalo (42-135), se evidencio un comportamiento similar al primero, en donde los tratamientos C y C+F ( $p < 0,010$ ) se diferenciaron estadísticamente, presentándose la mayor tasa de crecimiento en el tratamiento C (0.0309). Sin embargo, al comparar las medias de los tratamientos a través del tiempo, se observó que no hubo aumento en la RGR. En general, la RGR no tuvo un incremento a lo largo del experimento. Según los resultados, la formononetina presentó un efecto inhibitorio en la RGR para el tratamiento C en el primer y tercer intervalo de tiempo, efecto similar al observado en la variable acumulación de biomasa seca. Esos resultados indican que, aunque las plántulas crecían, su tasa de acumulación de masa seca no aumentaba. Estos resultados, se explican en parte, a que los intervalos de tiempo fueron demasiado cortos e insuficientes para este análisis, teniendo en cuenta que el café es una

planta arbustiva y de ciclo de vida perenne. Además, es importante considerar que otros factores edáficos y fisiológicos, que influyen en la acumulación de masa seca en un intervalo de tiempo, que no fueron medidos este estudio, podrían afectar la RGR.

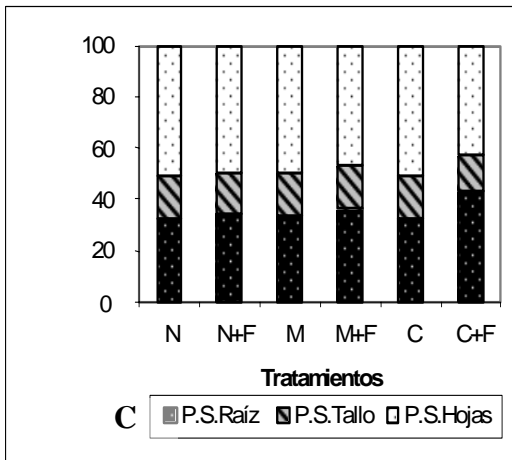
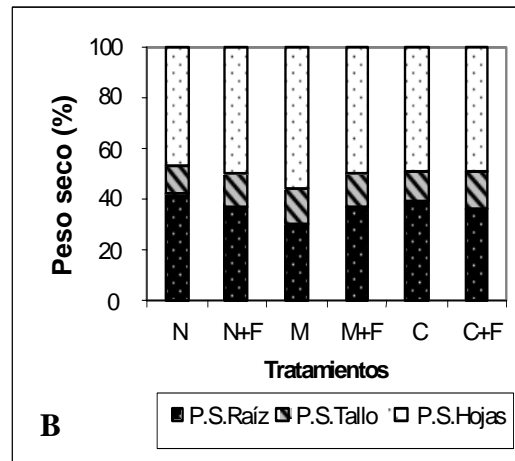
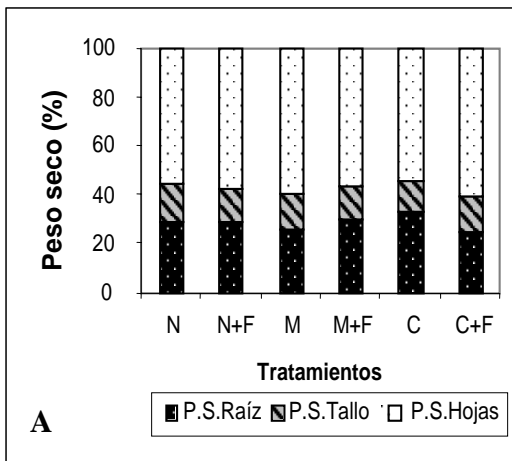
**Tabla 4.** Tasa de crecimiento relativa, RGR, ( $\text{mg/g}^{-1}$ ) de las plántulas de *Coffea arabica* en los ocho tratamientos durante los tres intervalos de tiempo.

Tratamientos	42-90 días ( $\text{mg/g}^{-1}$ )	90-135 días ( $\text{mg/g}^{-1}$ )	42- 135 días ( $\text{mg/g}^{-1}$ )
<b>Nativo (N)</b>	0.033 $\pm$ 0.005	0.027 $\pm$ 0.007	0.0292 $\pm$ 0.003
<b>N+F</b>	0.036 $\pm$ 0.005	0.023 $\pm$ 0.006	0.0297 $\pm$ 0.002
<b>Comercial</b>	0.039 $\pm$ 0.003*	0.023 $\pm$ 0.003	0.0309 $\pm$ 0.001*
<b>C+F</b>	0.028 $\pm$ 0.006*	0.011 $\pm$ 0.015	0.0199 $\pm$ 0.007*
<b>Mixto (M)</b>	0.029 $\pm$ 0.006	0.022 $\pm$ 0.001	0.0258 $\pm$ 0.005
<b>M+z</b>	0.032 $\pm$ 0.006	0.023 $\pm$ 0.006	0.0280 $\pm$ 0.003

(\*) La presencia del asterisco significa que existe diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0.05$ )

## 2.6 Distribución de biomasa mediante la estimación de las fracciones secas de los órganos.

En el primer muestreo (figura 1), no se observaron diferencias estadísticas entre los tratamientos para la fracción de masa seca de tallos, hojas y raíces entre los tratamientos. En el segundo muestreo, se observaron diferencias significativas en la biomasa seca acumuladas de los diferentes órganos de las plantas entre los tratamientos C y C+F, especialmente, para la biomasa seca acumulada de hojas ( $p < 0.024$ ) y la biomasa seca de raíces ( $p < 0.028$ ). Al finalizar el experimento, último muestreo, se observaron diferencias significativas entre los tratamientos C y C+F para la biomasa seca de tallo ( $p < 0.000$ ), hojas ( $p < 0.000$ ) y raíces ( $p < 0.018$ ). En general, se pudo observar que el mayor aporte de biomasa seca durante el experimento fue realizado hacia la parte aérea de las plántulas. Lo anterior, es una



**Figura 4.** Distribución de las fracciones de biomasa seca (%) en las plántulas de café. **A.** 42 ddt **B.** 90 ddt y **C.** 135 ddt. en los diferentes tratamientos.

causa de la micorrización que mejora la capacidad exploratoria de las raíces lo que se traduce en una menor asignación de biomasa hacia ese órgano (Flores y Cuenca, 2004). Sin embargo, durante los dos últimos muestreos se observó un incremento en la biomasa seca de raíces,

siendo mayor para el segundo muestreo, que coincidió con el mayor porcentaje de colonización. Por lo tanto, los resultados sugieren que el aumento de biomasa de las raíces para este periodo, está relacionado con el aumento de masa seca del hongo, debido al establecimiento de la simbiosis, en donde el costo energético de la planta aumenta en ese órgano para la construcción del nuevo tejido fúngico (Bryla y Eissenstat, 2005)

### **3. CONCLUSIONES**

Bajo las condiciones experimentales de este trabajo, la formononetina inhibió el porcentaje de colonización y la acumulación de biomasa de las plántulas en los tratamientos en donde se utilizaron HFMA comerciales, sin tener efectos significativos en los otros tratamientos. Por otra parte, la densidad de esporas del inóculo nativo si fue estimulada por la acción de la formononetina, contrario a lo observado en el inóculo mixto, sobre el cual presentó un efecto inhibitorio.

### **4. RECOMENDACIONES**

Para próximos estudios, se recomienda repetir el experimento mínimo dos veces mas, de este modo se podrá corroborar los resultados obtenidos. Además, se sugiere evaluar distintas concentraciones de formononetina para el cultivo de *Coffea arábica*; así como utilizar inóculos puros en lugar de mezclas de inóculos. Para lograr una buena estimación de la RGR en especies de ciclo de vida larga, como el café, se recomienda evaluar más intervalos de tiempo.

## LITERATURA CITADA

AGUDELO, M.Y., CASIERRA-POSADA, F. 2004. Efecto de la micorriza y gallinaza sobre la producción y calidad de cebolla cabezona (*Allium cepa* L. 'Yellow Granex'). Rev. Fac. Agr. Medellín 57(1), 2189-2202.

AGUIRRE, J.S., KOHASHI-SHIBATA, J. 2002. Dinámica de la colonización micorrícica y su efecto sobre los componentes del rendimiento y contenido de fósforo en frijol común. Agric. Técnica en México. 28 (1): 23-33.

AKIYAMA, K., MATSUOKA, H., HAYASHI, H. 2002. Isolation and identification of a phosphate deficiency - induced C-Glycosylflavonoid that stimulates Arbuscular micorriza formation in melon roots. Molecular Plant -Microbe Interactions 15: 334-340.

ARANGO, C., ROBLEDO, A., OCHOA, G. 1992 Efecto de la Micorriza vesículo arbuscular en la producción de café cv Colombia con dos niveles de fertilizantes. Fitopatología Colombiana. 16(1-2):120-133.

ARIAS -TENORIO, F., BLANCO -ROJAS, F. A., VARGAS -VARGAS, R. 1999 Evaluación de la Infectividad de micorriza arbuscular en plantas micropropagadas de banano, *Musa* AAA, cv "Valery", durante fases de invernadero y vivero. Corbana 26 (52): 173-188.

BAPTISTA, M. J., SIQUIERA, J. O. 1994. Efeito de Flavonóides na germinação de esporos e no crescimento assimbiótico do fungo micorrízico arbuscular *Gigaspora gigantea*. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal 6 (2): 127 -134.

BLANCO, D. 2006. Asociación simbiótica entre hongos formadores de micorrizas y plántulas de *Theobroma cacao*, estimulada con la aplicación del isoflavonoide. Tesis de pregrado. Universidad Industrial de Santander. Santander, Colombia,

BOLAÑOS, M. M., RIVILLAS, C. A., SUÁREZ, S. 2000. Identificación de micorrizas arbusculares en suelos de la zona cafetera colombiana. Cenicafé 51(4):245-262.

BRYLA, D. R., EISSENSTAT, D.M. 2005. Capitulo 12: Respiratory Costs of Mycorrhizal Associations (207-220) En: Hans Lambers and Miquel Ribas - Carbo (eds). Plant Respiration. Illinois, USA.

CASTRO - TORO, A., M. RIVILLAS, C. A. 2002. *Entrophospora colombiana*, *Glomus manihotis* y *Burkholderia cepacia* en el Control de *Rosellina bunodes*, agente causante de la llaga Negra del Cafeto. Cenicafé 53(3): 193-218. 2002.

CHACÓN A. M., CUENCA, G. 1998. Efecto de las micorrizas arbusculares y de la fertilización con fósforo, sobre el crecimiento de la guayaba en condiciones de vivero. Agronomía Tropical 48 (4): 425-440.

COLOZZI – FILHO, A., CARDOSO E.J.B.N. 2000 Detecção de fungos micorrízicos arbusculares em raízes de Cafeeiro e de Crotalaria cultivada na entrelinha. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, 35 (10): 2033-2042.

DA SILVA-JÚNIOR, J. P., SIQUIERA, J. O. 1997 Aplicação de formononetina sintética ao solo como estimulante da formação de micorriza no milho e na soja. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 9 (1): 33-39.

DAVIES, JR. F.T., CALDERÓN, C., HUAMAN, Z. 2005a. Influence of arbuscular micorriza indigenous to Peru and a flavonoid on growth, yield and leaf elemental concentration of 'Yungay' potatoes (*Solanum tuberosum* L.). *HortScience* 40 (2): 381-385

DAVIES, JR. F. T., CALDERÓN, C., HUAMAN, Z., GÓMEZ. R. 2005b. Influence of a Flavonoid (formononetin) on mycorrhizal activity and potato crop productivity in the highlands of Perú. *Scientia Horticulturae* 106: 318-329.

ESCALONA, M. A. 2002. Interacción de Plantas de café fertilizadas con P e inoculadas con hongos Formadores de micorrizas arbusculares y *Phoma costarricensis* Ehandi. Tesis Doctorado. Universidad de Colima. México D.C.

ESTRADA, M.G., SÁNCHEZ DE P, M. 1995. Dependencia del café (*Coffea arabica*) L. Var Colombia por Micorriza Vesículo Arbuscular. *Acta agronómica* 45(1): 95-98.

FLORES, C., CUENCA, G. 2004. Crecimiento y dependencia micorrízica de la especie pionera y polenectarífera *Oyedaea verbesinoides* (Tara Amarilla), Asteraceae. <http://www.Scielo.org>. ve/cielo.php?script=sci\_arttext&pid= S0378-18442004001100007 &lng=es&nrm=iso> 15-10-2006.

HUNT, R., CAUSTON, D. R., SHIPLEY, B., ASKEW, A. P. 2002. A modern tool for classical Plant Growth análisis. *Annals of Botany* 90: 485-488.

International Culture Collection of (vesicular) Arbuscular Micorrhizal Fungi (INVAM)  
Classification of Glomeromycota. <http://invam.caf.wvu.edu/>. 27- 07- 2006.

JARAMILLO, S., SILVA, J. M., OSORIO, N. 2004. Potencial simbiótico y efectividad de hongos micorrízico - arbusculares de tres suelos sometidos a diferentes usos. *Rev. Fac. Nat. Ag. Medellín* 57 (1): 2203-2214.

LAROSE, G., CHENEVERT, R., MOUTOGLIS, P., GAGNÉ, G., PICHÉ, Y., VIERHEILIG, H. 2002. Flavonoid and levels in roots of *Medicago sativa* are modulated by developmental stage of the symbiosis the root colonizing arbuscular mycorrhizal fungus *Plant Physiol.* 159: 1329–1339.

NAIR, M.G., SAFIR, G., SIQUIERA, J. O., (1991) Isolation and identification of Vesicular-Arbuscular Micorriza - Stimulatory Compounds from Clover (*Trifolium repens*) Roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(2): 434-439.

PARRA, M., SÁNCHEZ, DE P, M., SIEVERDING, E 1990. Efecto de Micorriza Vesículo Arbuscular en Café, *Coffea arábica* L. Variedad Colombia en almácigo. Acta agronómica. 40(1–2):88-99.

SÁNCHEZ, DE P. M. 1999. Endomicorrizas en agroecosistemas colombianos. Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira.

SCERVINO, J.M., PONCE, M. A., ERRA - BASSELLS, R., VIERHEILIG, H., OCAMPO J. A., GODEAS A. 2005. Arbuscular mycorrhizal colonization of tomato by *Gigaspora* and *Glomus* species in the presence of root flavonoids. Journal of plant physiology 162: 625-633.

SIEVERDING, E. 1991. Vesicular - Arbuscular Mycorrhiza Management in tropical agrosystems. Technical cooperation, Federal Republic of Germany, Eschborn GTZ.

VOLPIN, H., ELKIND, Y., OKON Y., KALPUNIK, Y.A. (1994) Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus(*Glomus intraradix*) induces a defense response in alfalfa roots. Plant physiol 104:683-689.