

**ASOCIACION SIMBIOTICA ENTRE HONGOS MICORRIZICOS
ARBUSCULARES Y EL SISTEMA RADICULAR DE PLANTULAS DE
CACAO (*Theobroma cacao*): EFECTO DE LA FORMONONETINA Y LA
DISPONIBILIDAD DE FOSFORO EN EL SUELO**

**SYMBIOTIC PARTNERSHIP BETWEEN ARBUSCULAR MYCORRHIZAL
FUNGI AND THE ROOT SYSTEM OF SEEDLINGS OF COCOA (*Theobroma
cacao*): FORMONONETIN EFFECT AND THE AVAILABILITY OF
PHOSPHORUS IN THE SOIL**

GUILLERMO ANDRES CUADROS GOMEZ

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGIA**

2009

**ASOCIACION SIMBIOTICA ENTRE HONGOS MICORRIZICOS
ARBUSCULARES Y EL SISTEMA RADICULAR DE PLANTULAS DE
CACAO (*Theobroma cacao*): EFECTO DE LA FORMONONETINA Y LA
DISPONIBILIDAD DE FOSFORO EN EL SUELO**

**SYMBIOTIC PARTNERSHIP BETWEEN ARBUSCULAR MYCORRHIZAL
FUNGI AND THE ROOT SYSTEM OF SEEDLINGS OF COCOA (*Theobroma
cacao*): FORMONONETIN EFFECT AND THE AVAILABILITY OF
PHOSPHORUS IN THE SOIL**

GUILLERMO ANDRES CUADROS GOMEZ

Proyecto de grado para optar al titulo de Biólogo

Director

RAUL GOMEZ SANTOS

Ing. Agrónomo

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGIA

2009

AGRADECIMIENTOS

Al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural - Unión Temporal Cacao de Colombia 3 (FEDECACAO-CORPOICA), por la financiación del proyecto. A CORPOICA (Estación experimental La Suiza), por la ejecución del proyecto, a Andrés Alejandro Camargo Parra (GIEFIVET) y Paula Rojas, por sus valiosos aportes.

Dedico este trabajo especialmente a Dios, a mis padres por su cariño y apoyo, a mis amigos que siempre me han acompañado y a Lina Marcela Angulo por su valiosa influencia y por ser tan importante en mi vida.

CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCION	1
2. METODOLOGIA	2
2.1 Mediciones Morfológicas de Asignación de Biomasa	5
2.2 Análisis Estadístico	5
3. RESULTADOS Y DISCUSION	5
3.1 Caracteres morfológicos (Arquitecturales y Longitud de la raíz)	5
3.2 Caracteres de asignación de biomasa (Biomasa total y Fracción masa de la raíz)	7
3.3 Porcentaje de colonización y número de esporas	8
4. CONCLUSION	9
5. BIBLIOGRAFIA CITADA	10

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1. Los factores que determinan la máxima respuesta a la infección micorrízica son aquellos que determinan el déficit de fósforo. El suministro de fósforo y la demanda de fósforo determinan el déficit de este elemento (Koide, 1991)	15
FIGURA 2. Caracteres morfológicos y de asignación de biomasa para los tratamientos con aplicación de isoflavonoide formononetina en las tres épocas de muestreo. C: Control, IN: Inoculo nativo, F: Isoflavonoide formononetina	16
FIGURA 3. Caracteres morfológicos y de asignación de biomasa para los tratamientos sin aplicación de isoflavonoide formononetina en las tres épocas de muestreo. C: Control, IN: Inoculo nativo	17

LISTA DE TABLAS

	Pág.
TABLA 1. Especies de HMA del Inoculo Nativo utilizados en esta Investigación	18
TABLA 2. Tratamientos utilizados en esta investigación. Inoculo nativo de HMA (IN), variables de disponibilidad de fósforo en partes por millón (ppm) y presencia o ausencia de isoflavonoide formononetina (F)	18
TABLA 3. Análisis de varianza para los caracteres morfológicos y de asignación de biomasa en los tratamientos con aplicación de isoflavonoide formononetina. ***: Diferencias altamente significativas (P<0,01), **: Diferencias significativas (P<0,05), NS: Diferencias no significativas	19
TABLA 4. Análisis de varianza para los caracteres morfológicos y de asignación de biomasa en los tratamientos sin aplicación de isoflavonoide formononetina. ***: Diferencias altamente significativas (P<0,01), **: Diferencias significativas (P<0,05), NS: Diferencias no significativas	19

RESUMEN

TITULO: ASOCIACION SIMBIOTICA ENTRE HONGOS MICORRIZICOS ARBUSCULARES Y EL SISTEMA RADICULAR DE PLANTULAS DE CACAO (*Theobroma cacao*): EFECTO DE LA FORMONONETINA Y LA DISPONIBILIDAD DE FOSFORO EN EL SUELO.

AUTOR: GUILLERMO ANDRES CUADROS GOMEZ.**

PALABRAS CLAVES: *Theobroma cacao*, hongos micorrízicos arbusculares, isoflavonoide formononetina, inóculo nativo, caracteres arquitecturales.

RESUMEN:

La simbiosis entre plantas de *Theobroma cacao* y hongos micorrízicos arbusculares (HMA) confiere beneficios nutricionales y competitivos a la planta, especialmente en condiciones de baja disponibilidad de nutrientes. En esta investigación se evaluó los efectos de la aplicación del isoflavonoide formononetina sobre la simbiosis micorrízica arbuscular y el crecimiento de plántulas de *T. cacao*, en diferentes concentraciones en partes por millón de fósforo (P) (baja, óptima, media y alta). Siete tratamientos en total fueron evaluados con la variable de ausencia y presencia en la aplicación de formononetina, inoculados con HMA nativos, excepto el tratamiento control. Los resultados demuestran que caracteres morfológicos arquitecturales de la planta, no presentaron respuesta de forma diferencial a la disponibilidad del isoflavonoide durante las tres épocas de muestreo; la longitud radicular presentó diferencias significativas en las diferentes épocas de muestreo (a los 70, 110 y 150 días de inoculación), siendo esta una tendencia conservativa y una respuesta adaptativa a la disponibilidad de P y a la interacción planta-micorriza. La asignación de biomasa total no mostró diferencias significativas. El porcentaje de colonización no demuestra un estímulo a una alta y rápida colonización en el tratamiento donde se aplicó el isoflavonoide, pero el número de esporas presentó respuestas diferenciales a la aplicación de formononetina, mostrando un rápido estímulo en el establecimiento de la relación simbiótica, proceso de esporulación y formación de estructuras fúngicas.

* Proyecto de grado

** Facultad de Ciencias, Escuela de Biología. Director: IA. Raúl Gómez Santos. Codirector: MSc. Nelson Rodríguez López.

ABSTRACT

TITLE: SYMBIOTIC PARTNERSHIP BETWEEN ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI AND THE ROOT SYSTEM OF SEEDLINGS OF COCOA (*Theobroma cacao*): FORMONONETIN EFFECT AND THE AVAILABILITY OF PHOSPHORUS IN THE SOIL.*

AUTHOR: GUILLERMO ANDRES CUADROS GOMEZ.**

KEYWORDS: *Theobroma cacao*, arbuscular mycorrhizal fungi, isoflavonoid formononetin, indigenous inoculum, architecture traits.

ABSTRACT:

The plant symbiosis between *Theobroma cacao* and the arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), confers a major nutrient absorption, this nutritional advantage is more significant in poor-nutrient soils. The effects of the external application of the isoflavonoid formononetin on arbuscular mycorrhizal symbiosis in *T. cacao* seedlings is assessed in this research, three different concentrations were measured in parts per million of phosphorus (P) (low, optimal, medium and high). Seven treatments were evaluated in total, inoculated with indigenous AMF, excluding the treatment control, the variable of application of formononetin was scored as absence or presence. The architecture traits did not show a differential response to the availability of isoflavonoid during the three periods of sampling; in contrast significant differences in root length at different times of sampling were observed (at 70, 110 and 150 days of inoculation), an increase in root length is expected as an adaptive response to the availability of (P) and mycorrhiza-plant interaction. The allocation of total biomass showed not significant differences. The percentage of colonization does not increase when Formononetin is added, but the number of spores exhibited differential responses to the application of formononetin, thus increasing the ability to associate rapidly, sporulation process and the hyphae development.

* Degree proyect

** Faculty of Science, Biology School, Advisors: IA. Raúl Gómez Santos, MSc. Nelson Rodríguez López.

1. INTROUCCION

Las micorrizas arbusculares son asociaciones de tipo mutualista entre plantas y una gran variedad de hongos (Cuenca *et al.*, 2007; Lambers *et al.*, 2008). Una de las formas de asociación simbiótica mutualista es la establecida entre las raíces de las plantas y hongos micorrízicos arbusculares (HMA), esta asociación confiere un efecto benéfico en la planta, incrementando longevidad, tamaño y biomasa de la raíz, características que permiten un aumento en la absorción y retención de nutrientes, principalmente en habitats con baja disponibilidad de nutrientes o infértiles (Chapín, 1980); al mismo tiempo dicha asociación desempeña un papel importante sobre las características físicas del suelo, al incrementar la agregación de partículas y la estabilidad del suelo (Khan, 2006). El fósforo (P) es uno de los nutrientes limitantes en el suelo, debido a su disponibilidad en forma inorgánica ya que presenta una baja tasa de movilidad entre los macro nutrientes (Souchie *et al.*, 2006). La absorción de P en plantas se realiza a través de iones diácido o monoácido del sustrato, debido a la baja solubilidad de los compuestos fosfatados se presenta una tendencia de desplazamiento del equilibrio hacia la fase sólida, por lo que la concentración de P en solución en un tiempo específico puede llegar a ser muy baja (Rossi *et al.*, 2006). Estas características han permitido el desarrollo en plantas de distintos mecanismos fisiológicos (*i.e.*, acumulación de carbohidratos en la raíz) y bioquímicos (*i.e.*, exudados radiculares), para aumentar la adquisición de nutrientes, especialmente el P mediante la formación de la asociación simbiótica con HMA (Kramer y Green, 2000).

La asociación simbiótica planta-hongo se ve afectada por una baja o elevada concentración de P en el sustrato (Douds *et al.*, 1998) (Figura 1), presentándose una correlación inversamente proporcional entre el porcentaje de colonización y la absorción de fósforo, es decir, a medida que se disminuye la concentración de P disponible en el sustrato, el porcentaje de colonización incrementa (Saggin-Junior y Siqueira, 1995). En plantas en donde la disponibilidad de P en el suelo es baja, exudados provenientes de la raíz como el isoflavonoide formononetina estimulan la germinación de esporas, aumentado el crecimiento y colonización de la raíz por HMA (Nair *et al.*, 1991;

Koide, 1991; Cornwell *et al.*, 2001). La formononetina estimula la colonización micorrízica, debido a la formación de un mayor número de apresorios y/o de puntos de entrada en la raíz (Da Silva-Junior y Siqueira, 1997). Sin embargo existe una amplia discusión acerca del papel de los exudados radiculares como la formononetina y de cómo se regulan las señales para que la raíz suprima la respuesta inicial de defensa dada al momento del contacto con los HMA y se haga susceptible a éstos (Scervino *et al.*, 2005).

Theobroma cacao (Sterculiaceae), es una especie neotropical, que posee una gran diversidad genética, con una amplia capacidad de interacción biológica por su capacidad de establecer una simbiosis obligada (facultativa) o de dependencia con HMA. Estos hongos al ser inoculados en etapa de vivero confieren a plantas de *T. cacao* ventajas competitivas al momento de ser trasplantadas en suelos con bajos aportes de nutrientes (Azizah -Chulan y Martin, 1992). El fósforo es el principal elemento nutricional limitante en el crecimiento en plantas de *T. cacao*, estableciendo que las respuestas a fertilizantes fosfatados es baja, cuando la disponibilidad de fósforo es mayor a 5 ppm, con una tendencia a incrementar la tasa de crecimiento relativo bajo concentraciones mayores o iguales a 15 ppm (Uribe *et al.*, 1998). En la actualidad en Colombia el cultivo de *T. cacao* se realiza en suelos con diferentes características biológicas y físico-químicas; sin embargo, las investigaciones acerca de los procesos de asociación simbiótica y aplicaciones de isoflavonoides en diversos clones (*i.e.*, materiales genéticos) y HMA han sido pocas, a pesar de los beneficios que se le atribuyen a esta asociación. Por lo tanto, el presente trabajo evaluó si la aplicación del isoflavonoide formononetina en tres concentraciones distintas de fósforo disponible en el sustrato, favorece la simbiosis micorrízica arbuscular y el crecimiento de *Theobroma cacao* en condiciones de vivero.

2. METODOLOGIA

La investigación se realizó en la biofábrica de la Estación Experimental La Suiza (Santander, Colombia), perteneciente a CORPOICA. La estación experimental se encuentra ubicada en el municipio de Rionegro (07° 22' 173" N,

073° 10' 551" W, altitud de 617msnm), con temperatura anual promedio de 27 °C, precipitación anual de 2.000 mm, y humedad relativa del 78 %. Se utilizó como sustrato de crecimiento, una mezcla de tierra y arena, en proporción (3:1). El análisis de suelo inicial presentó como resultado un sustrato con textura franco arenosa (Bouyucos), pH de 7,6 (agua, 1:1, V/V), materia orgánica 0.40 % (Walkley y Black), P 5 ppm (Bray II), Ca, Mg, Na y K, 7,9, 1,5, 0,13 y 0,24 meq respectivamente (acetato de amonio) y Al 0 meq (KCl). El sustrato se esterilizó por siete días con Basamid® G.R. (60 g/m²), y posteriormente fue transferido a bolsas de polietileno negras de 3 kg de capacidad.

La propagación se realizó por medio de semillas del material genético para patrón de *T. cacao* IMC-67 suministradas por la Estación Experimental La Suiza (CORPOICA). Las semillas fueron lavadas, desinfectadas y pregerminadas por tres días en ambiente húmedo para posteriormente ser sembrada una semilla por bolsa. El material vegetal fue propagado en condiciones de vivero bajo polisombra del 70 % de reducción de la radiación solar.

Se utilizó un inóculo nativo de micorriza, compuesto de suelo con fragmentos de raíces, hifas y esporas (Tabla 1). Este inóculo presenta un 94 % de inoculación.† Se adicionó 20 gr de inóculo nativo (32 esporas/gr) alrededor de cada una de las semillas en el momento de la siembra, todos los tratamientos fueron inoculados, excepto el tratamiento control.

El sustrato de los tratamientos de P óptimo (Mejía, 2000), P medio y P alto fue fertilizado con 112, 160, 320 mg L⁻¹ de solución de superfosfato triple (SFT), cada siete días por dos meses. Después de la época de fertilización y en base a un nuevo análisis de suelo, las concentraciones de P para los tratamientos de P óptimo (Control), bajo, medio y alto fueron: 14, 5, 20 y 40 ppm respectivamente, cada tratamiento fue irrigado de SFT en solución (500ml) cada tres días.

† Suministrado por: Fungifert Suppra & Cia. S. en C.A., Bucaramanga, Colombia.

En los tratamientos con presencia de la aplicación de isoflavonoide formononetina, se realizaron dos aplicaciones en solución de 150 ml del isoflavonoide formononetina (Myconate)[‡] a los 30 y 45 días posteriores a la fecha de siembra por unidad experimental. La solución fue preparada con una concentración de 50 mg L⁻¹, la cual fue disuelta en un volumen de metanol igual al 1% del volumen final y posteriormente diluida en agua destilada (Da Silva-Junior y Siqueira, 1997).

El material vegetal fue distribuido aleatoriamente en siete tratamientos (Tabla 2), con dos factores de variación, la disponibilidad de P en el suelo y la ausencia o presencia de aplicación de isoflavonoide formononetina. Cada tratamiento se conformó con 40 unidades experimentales, para un total de 280 plantas. Se realizaron tres muestreos destructivos de siete individuos, con intervalos de 40 días de la siguiente forma, el primer muestreo a los 70 días, el segundo muestreo a los 110 días y el tercer muestreo a los 150 días posteriores a la siembra.

A partir de los muestreos realizados, fueron separados los distintos órganos de la planta, (hojas, tallo y raíz) y fueron secados durante 72 horas a una temperatura constante de 80 °C, para obtener los diferentes valores de masa seca en cada uno de los órganos de la planta.

Para determinar el porcentaje de colonización micorrízica se tomó una muestra fresca de raíz de cada una de las unidades experimentales en cada tratamiento, la cual fue clarificada en KOH al 10 % y coloreada con azul de tripán 0,05 %, según la metodología de Phillips y Hayman (1970). Las observaciones microscópicas se realizaron en diez segmentos de raíz, con longitud de 1 cm y menores a 3 mm de diámetro, observando diez campos por segmentos, para el reconocimiento de estructuras, hifas, esporas, arbuscúlos y vesículas.

El porcentaje de colonización se calculó del número de campos positivos (presencia de hifas, esporas, arbuscúlos y vesículas), sobre el número de campos visuales totales multiplicados por cien (Azizah -Chulan y Ragu, 1986).

[‡] El Myconate (VAMTech.® L.L.C., Lansing, MI, USA) es una forma soluble del isoflavonoide formononetina (7-Hidroxi 4-Metoxi-isoflavona), inocua para el ambiente.

Para determinar el número de esporas se tomó 10 gr de sustrato en contacto directo con la raíz de cada unidad experimental por tratamiento, aislando las esporas de cada una de las muestra mediante la metodología de tamizado (500 μm y 38 μm) y centrifugación con sacarosa de Gerderman y Nicolson (1963). La cuantificación del número de esporas se realizó por medio de un estereoscopio.

2.1 MEDICIONES MORFOLOGICAS DE ASIGNACION DE BIOMASA

Durante los muestreos realizados se cuantificaron tanto caracteres morfológicos y de asignación de biomasa. Entre los caracteres morfológicos cuantificados están, altura apical (AP), número de hojas (NH), longitud de la raíz (LR), porcentaje de colonización y número de esporas. A partir de los datos de masa seca en cada uno de los diferentes órganos de la planta se cuantifico la fracción masa hojas (FMH), la fracción masa tallos (FMT), la fracción masa raíz (FMR) y la biomasa total seca (BTs).

2.2 ANALISIS ESTADISTICO

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para caracteres morfológicos y de asignación de biomasa en cada uno de los diferentes tratamientos, para observar las diferentes respuestas en función de la disponibilidad de fósforo (P) en presencia o ausencia de la aplicación del isoflavonoide formononetina. Un efecto significativo para el factor tratamiento indica una respuesta diferencial a la disponibilidad de fósforo en el suelo en presencia o ausencia de la aplicación de isoflavonoide. Para los caracteres de asignación de biomasa, fue necesario realizar una transformación a logaritmo natural (Ln) y $\text{Ln} + 1$, para cumplir la asunción de normalidad y homogeneidad de varianza. Los análisis por épocas de muestreos y aplicación de isoflavonoide se realizaron por separado.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracteres morfológicos (Arquitecturales y Longitud de la raíz)

Los caracteres asociados a la captación de luz como, AP y FMH muestran diferencias significativas durante las tres épocas de muestreo, sin aplicación del isoflavonoide formononetina (Tabla 4) y diferencias significativas para la FMH durante los tres muestreos en los tratamientos con aplicación de formononetina (Tabla 3). Los caracteres NH, FMT y AP no muestran diferencias significativas durante las dos primeras épocas de muestreo, en ausencia y presencia de la aplicación de formononetina. Estas tendencias en ausencia y presencia de la aplicación de formononetina demuestran un comportamiento similar, soportado por el análisis estadístico y la expresión de los diferentes caracteres a lo largo de los muestreos (Figura 2 y 3); indicando que dichos caracteres no responden de forma diferencial a la aplicación de formononetina (Vierheilig *et al.*, 1996). Según Mosse (1988) y Giovannetti *et al.* (1996) los exudados radiculares como isoflavonoides, afectan de forma directa caracteres asociados a la raíz (*i.e.*, porcentaje de colonización).

Los resultados observados para la LR muestran diferencias significativas durante las diferentes épocas de muestreo (Tabla 3 y 4). Esta respuesta es soportada tanto por el análisis estadístico como por su expresión durante las tres distintas épocas de muestreo, manifestando tendencias conservativas y una respuesta adaptativa a la disponibilidad de recursos (*i.e.*, disponibilidad de fósforo) e interacción planta-micorriza y no una expresión diferencial a la aplicación del isoflavonoide formononetina (*i.e.*, ausencia o presencia). Según Chapín (1980), un incremento en la proporción de raíces permite una exploración a capas bajas del suelo, esta respuesta se traduce en un mejor desempeño en ambientes con baja disponibilidad de nutrientes; esta misma tendencia ha sido reportada por Koide (1991), quien argumenta que en condición de baja disponibilidad de fósforo existe una predisposición a la interacción planta-micorriza que permite un incremento de la longitud de la raíz, respuesta que permite un mejor desempeño en ambientes infértiles.

Parámetros como la longitud, el diámetro, área de superficie y la densidad de vellosidades de la raíz, son importantes para aumentar los nutrientes asimilados por la planta, por lo que las alteraciones morfológicas como consecuencia de la interacción raíz hongo permiten una mayor ramificación y elongación que constituyen un mecanismo adicional que permiten la absorción de fósforo (Miyasaka y Habte, 2001). Según Bolan (1991) estas repuestas

deben considerarse adaptativas, ya que el incremento en la absorción de fósforo por plantas micorrizadas se da por un incremento en la exploración física del suelo, aumento en la movilización del nutriente dentro de la hifa, incremento en su almacenamiento, eficiencia en la transferencia hacia las raíces de la planta y utilización dentro de esta.

3.2 Caracteres de asignación de biomasa (Biomasa total y Fracción masa de la raíz)

La biomasa total no presenta diferencias significativas tanto para los tratamientos con aplicación y sin aplicación de formononetina (Tabla 3 y 4). Estos resultados evidencian que no hay relación entre la biomasa total y la aplicación de formononetina, como también con la disponibilidad de fósforo; lo que podría sugerir un efecto de dilución de este elemento en toda la planta, el cual es requerido para aumentar la masa de la raíz (González y Osorio, 2008). Además, los carbohidratos demandados por los HMA, limitan la producción de biomasa en la planta, ya que los hongos requieren de carbohidratos para la formación del micelo, hifas y demás estructuras (Salamanca y Silva, 1998). El costo energético para mantener la relación simbiótica es alto e ineludible para la planta huésped (Brundrett, 2002).

La FMR durante las tres épocas de muestreo en los tratamientos sin aplicación de formononetina, presenta diferencias significativas, contrario a los resultados obtenidos con aplicación de formononetina, donde en la segunda época de muestreo no se presentan diferencias significativas (Tabla 3). Estos resultados al igual que los asociados con la longitud de la raíz demuestran una respuesta adaptativa a la disponibilidad de recursos e interacción planta-micorriza y no una expresión diferencial a la disponibilidad del isoflavonoide; en función de la disponibilidad de recursos, demuestran respuestas adaptativas a la baja disponibilidad de P, con aplicación o sin aplicación de formononetina. Este comportamiento sugiere una mayor asignación de biomasa hacia la raíz para una mejor exploración radicular en busca de nutrientes (Chapín, 1980; Gedroc *et al.*, 1996; Coleman y McConnaughay, 1995). Dichas tendencias son coherentes con la teoría de partición óptima que establece una mayor asignación de biomasa a un órgano específico de la planta para la búsqueda de recursos (*i.e.*, nutrientes, agua, luz) (Coleman y McConnaughay, 1995).

3.3 Porcentaje de colonización y número de esporas

El porcentaje de colonización mostró diferencias significativas en las tres épocas de muestreo tanto para los tratamientos con aplicación y sin aplicación de formononetina (Tabla 3 y 4). El comportamiento de estos resultados demuestra respuestas conservativas al igual que los caracteres asociados con la raíz, soportados en el porcentaje de colonización ya que este responde en función a la disponibilidad de recursos y no a la estimulación del isoflavonoide. Para ambas condiciones ausencia y presencia en la aplicación del isoflavonoide, durante las diferentes épocas de muestreo, los porcentajes de colonización demuestran una mayor expresión en los tratamientos con baja disponibilidad de fósforo (Fig. 2 y 3). Estos resultados concuerdan con Azizah-Chulan y Ragu (1986), quienes reportaron que en plantas de *T. cacao*, la aplicación de P afecta considerablemente el desarrollo de HMA en respuesta a la baja disponibilidad de P. Contrario a los resultados en condiciones de alta disponibilidad de P, donde se observó una reducción en el porcentaje de colonización.

(Azizah-Chulan y Ragu, 1986) han postulado que en plantas de *T. cacao* existe una dependencia a la simbiosis micorrízica, presentando una respuesta positiva a la inoculación con HMA. Lo cual indicaría que la presencia o ausencia de la aplicación de isoflavonoide, en cada uno de los niveles de disponibilidades de P, no afecta de forma directa el porcentaje de colonización, ya que dicho carácter responde de forma similar (Figura 2 y 3). Adicionalmente, Zandavalli *et al.* (2004), reportan que el porcentaje de colonización micorrízica es controlado por el nivel de P en el tejido hospedero, o la disponibilidad de fósforo en cada uno de los órganos de la planta, contrario a la alta disponibilidad de P en el suelo donde el porcentaje de colonización en la raíz por HMA es bajo. Con base a esta condición una posible estrategia de la planta es reducir el intercambio de carbono o de fotoasimilados hacia el hongo en condiciones de alta disponibilidad de P (González y Osorio, 2008).

El número de esporas observadas durante los diferentes tratamientos en las épocas de muestreo, presenta diferencias significativas para los días 110 y 150 en presencia y ausencia del isoflavonoide, contrario a los resultados observados en el día 70 que muestran ausencia de significancia en función a la aplicación del isoflavonoide (Tabla 3 y 4).

Estos resultados según Lambers *et al.* (2008) y Scervino (2005), sugieren que la formononetina puede estimular un mayor proceso de esporulación en etapas tempranas de la interacción planta- HMA, respuesta que estaría asociada a una supresión en la defensa inicial desplegada por la planta. Este resultado estaría soportado en las diferencias significativas observadas para el segundo muestreo en presencia del isoflavonoide (día 110) para el carácter número de esporas, y que sugiere una condición óptima para la esporulación del hongo durante un corto periodo de tiempo; contrario a los resultados observados en ausencia de la aplicación del isoflavonoide, lo cual no ejerce un efecto significativo hasta el día 150, lo que podría demostrar una mayor respuesta de defensa al proceso de colonización por parte de la planta. Con base a esto, el isoflavonoide formononetina puede llegar a estimular el proceso de esporulación para una rápida interacción raíz micorriza; sin dejar de lado que estas respuestas para estos caracteres responden de forma funcional a la disponibilidad de nutrientes en el suelo (Koide, 1991) (Figura 1).

Los tratamientos con aplicación de formononetina y mayor disponibilidad de fósforo (media y alta) presentaron un mayor número de esporas (Figura 2); contrario a reportes que señalan que a mayor fertilidad, menor es la abundancia de esporas (Hayman *et al.* 1975; Egerton-Warburton y Allen 2000); sin embargo, según Guerrero (1996), un posible déficit en el suministro de agua puede crear una situación adversa, estimulando la producción de esporas durante la época seca, conduciendo esto a la adaptación de los HMA a esa condición de estrés hídrico. Al mismo tiempo, también se ha reportado que una alta esporulación es una respuesta de los HMA a condiciones climáticas adversas y a la disponibilidad de nutrientes. Debido a esta discrepancia, se menciona que no existe un estímulo y condición única para la producción de esporas, especialmente en plantas asociadas a sistemas tropicales y que presentan un crecimiento asiduo del sistema radicular (Sieverding, 1991).

4. CONCLUSION

Esta investigación no mostró una evidencia sólida que soporte una mejora en el proceso de inoculación micorrízica, establecimiento de la simbiosis, desarrollo de caracteres morfológicos y de asignación de biomasa. Todas las repuestas

observadas en función de la aplicación del isoflavonoide formononetina y la interacción planta-HMA, son claras respuesta funcionales a la disponibilidad de un recurso particular, en este caso el fósforo, debido a respuestas similares o conservativas en ausencia o presencia de la aplicación de formononetina. Los comportamientos observados en las dos condiciones son estrategias ecofisiológicas adaptativas en especies vegetales con interacciones fúngicas mutualistas. Adicionalmente se esperaba que el isoflavonoide formononetina estimulara un rápido proceso de colonización, esporulación y un mayor proceso infectivo en la planta, el cual permitiría ventajas en la adquisición de recursos y un efecto directo sobre el desarrollo de caracteres morfológicos, de asignación de biomasa y principalmente los asociados a la raíz; sin embargo los resultados encontrados demuestran respuestas asociadas a la disponibilidad del recurso y la interacción planta-HMA y no un efecto directo por la aplicación del isoflavonoide formononetina.

5. BIBLIOGRAFÍA CITADA

Azizah –Chulan H, Martin K. 1992. The vesicular-arbuscular (VA) mycorrhiza and its effects on growth of vegetatively propagated *Theobroma cacao* L. *Plant and Soil*, 144: 227-233.

Azizah -Chulan H, Ragu P. 1986. Growth response of *Theobroma cacao* L. seedlings to inoculation with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*, 96: 279-285.

Bolan NS. 1991. A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. *Journal Plant and soil*, 134: 189-207.

Brundrett MC. 2002. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist*, 154: 275–304.

Chapín FSIII. 1980. The mineral nutrition of wild plants. *Ann Rev. Ecol. Syst.*, 11: 233-260.

Coleman JS, McConnaughay KDM. 1995. A non-functional interpretation of a classical optimal-partitioning example. *Funct Ecol.*, 9: 951-954.

Cornwell WK, Bedford BL, Chapin CT. 2001. Occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi in a phosphorus poor-wetland and mycorrhizal response to phosphorus fertilization. *American Journal of Botany*, 88: 1824-1829.

Cuenca G, Cáceres A, Oirdobro G, Hasmy Z, Urdaneta C. 2007. Las micorrizas arbusculares como alternativas para una agricultura sustentable en áreas tropicales. *Interciencia*, 32(1): 23-29.

Da Silva-Junior JP, Siqueira JO. 1997. Aplicação de formononetina sintética ao solo como estimulante da formação de micorriza no milho e na soja. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 9: 33-39.

Douds DDJr, Galvez L, Bécard G, Kapulnik Y. 1998. Regulation of arbuscular mycorrhizal development by plant host and fungus species in alfalfa. *New Phytol.*, 138: 27-35.

Egerton-Warburton LM, Allen EB. 2000. Shifts in arbuscular mycorrhizal communities along an anthropogenic nitrogen deposition gradient. *Ecol. Appl.*, 10: 484-496.

Gedroc JJ, McConnaughay KDM, Coleman JS. 1996. Plasticity in root/shoot partitioning: Optimal, ontogenetic, or both? *Funct Ecol.*, 10: 44-50.

Gerdemann JL, Nicolson TH. 1963. Spore of mycorrhiza *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decating. *Transactions of the British Mycological Society*, 46(2): 235-44.

Giovannetti M, Sbrana C, Citernesi AS, Avio L. 1996. Analysis of factors involved in fungal recognition responses to host-derived signals by arbuscular mycorrhizal. *New Phytol.*, 133: 65-77.

González O, Osorio W. 2008. Determinación de la dependencia micorrizal del lulo. *Acta biol. Colomb.*, 13: 163-174.

Guerrero FE. 1996. Fundamentos biológicos y estados del arte. En: Guerrero FE. *Micorrizas recurso biológico del suelo*. Bogotá, Fondo Fen Colombia, p. 3-46.

Hayman DS, Johnson AM, Ruddlesdin I. 1975. The influence of phosphate and crop species on *Endogone* spores and vesicular-arbuscular mycorrhiza under field conditions. *Plant Soil*, 43: 489-495.

Khan AG. 2006. Mycorrhizoremediation an enhanced form of phytoremediation. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 7(7): 503-514.

Koide RT. 1991. Nutrient supply, nutrient demand and plant response to mycorrhizal infection. *New Phytol.*, 117: 365-386.

Kramer S, Green DM. 2000. Acid and alkaline phosphatase dynamics and their relationship to soil microclimate in a semiarid woodland. *Soil Biology & Biochemistry*, 32: 179-188.

Lambers H, Chapin FSIII, Pons TL. 2008. *Plant Physiological Ecology*. 2nd ed. New York, Springer Science + Business Media, 591 p.

Mejía LA. 2000. Nutrición del cacao, relación suelo, planta y agua. pp. 33-35. En: Mejía LA, Arguello OC. *Tecnología para el mejoramiento del sistema de producción de cacao*. Corpoica Regional Siete. Bucaramanga, 144 p.

Miyasaka S, Habte M. 2001. Plant mechanisms and mycorrhizal symbiosis to increase phosphorus uptake efficiency. *Soil Science Plant Anal.*, 32: 1101-1147.

Mosse B. 1988. Some studies relating to "independent" growth of vesicular-arbuscular endophytes. *Can. J. Bot.*, 66: 2533-2540.

Nair MG, Safir GR, Siqueira JO. 1991. Isolation and identification of vesicular-arbuscular micorrhiza-stimulatory compounds from clover (*Trifolium repens*) roots. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 434-439.

Phillips JM, Hayman DS. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, 55: 158-161.

Rossi SMM, Rollán AA, Bachmeier OA. 2006. Biodisponibilidad de fósforo en un suelo del sur de Santa Fe (Argentina). Efectos de dos fuentes fosfatadas y sus mezclas con urea. *Agriscientia*, 23(2): 91-97.

Saggin-Junior OJ, Siqueira JO. 1995. Avaliação da eficiência simbiótica de fungos endomicorrizicos para o cafeeiro. *Revista Brasileira do Ciencia do Solo*, 20: 222-228.

Salamanca CR, Silva MR. 1998. Las micorrizas como alternativa para el manejo sostenible de los agroecosistemas tropicales. *Boletín Técnico*, 12. Corpoica, 26p.

Scervino JM, Ponce MA, Erra-Bassells R, Vierheiling H, Ocampo JA, 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. Germany. *GTZ*, 370 p.

Souchie EL, Azcón R, Barea JM, Saggin-Júnior OJ, Da Silva EMR. 2006. Phosphate solubilization and synergism between P-solubilizing and arbuscular mycorrhizal fungi. *Pesq. agropec. Bras.*, 41(9): 1405-1411.

Uribe A, Méndez H, Mantilla J. 1998. Efecto de niveles de nitrógeno, fósforo y potasio sobre la producción de cacao en suelos del departamento de Santander. *Suelos Ecuatoriales*, 28: 31-36.

Vierheilig H, Iseli B, Alt M, Raikhel N, Wiemken A, Boiler T. 1996. Resistance of *Urtica dioica* to mycorrhizal colonization: a possible involvement of *Urtica dioica* agglutinin. *Plant and Soil*, 183: 131-1376.

Zandavalli RB, Dillenburg LRD, De Souza PV. 2004. Growth responses of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) to inoculation with the mycorrhizal fungus *Glomus clarum*. *Appl. Soil Ecol.*, 25:245-255.

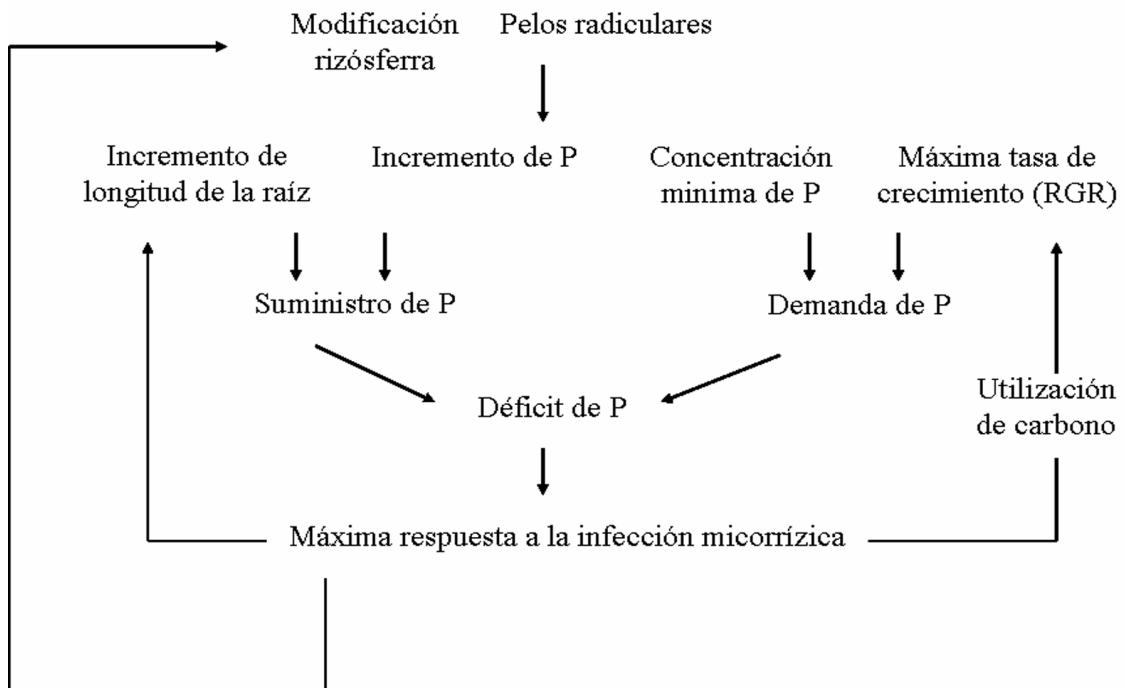


FIGURA 1. Los factores que determinan la máxima respuesta a la infección micorrízica son aquellos que determinan el déficit de fósforo. El suministro de fósforo y la demanda de fósforo determinan el déficit de este elemento (Koide, 1991).

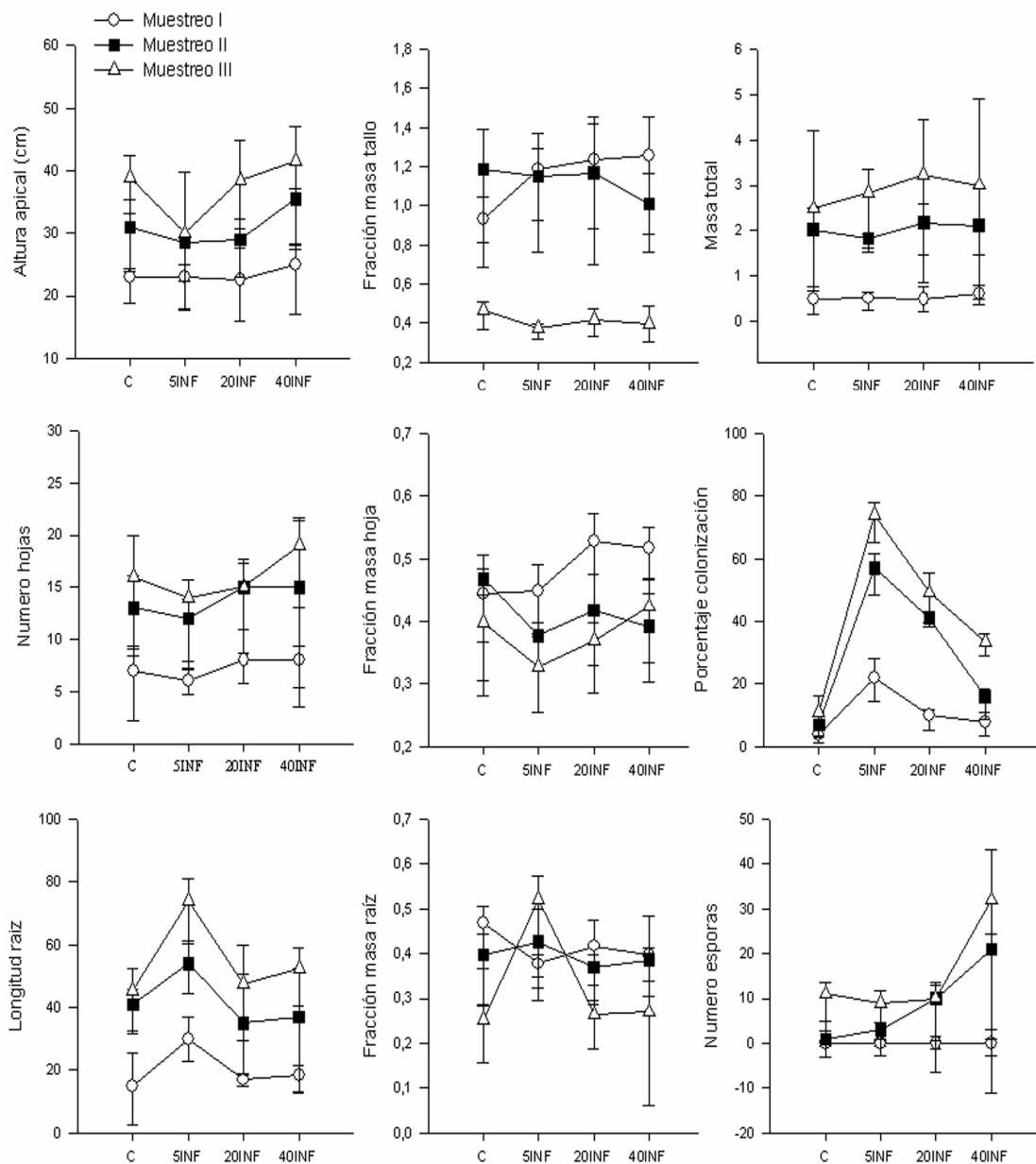


FIGURA 2. Caracteres morfológicos y de asignación de biomasa para los tratamientos con aplicación de isoflavonoide formononetina en las tres épocas de muestreo. C: Control, IN: Inoculo nativo, F: Isoflavonoide formononetina.

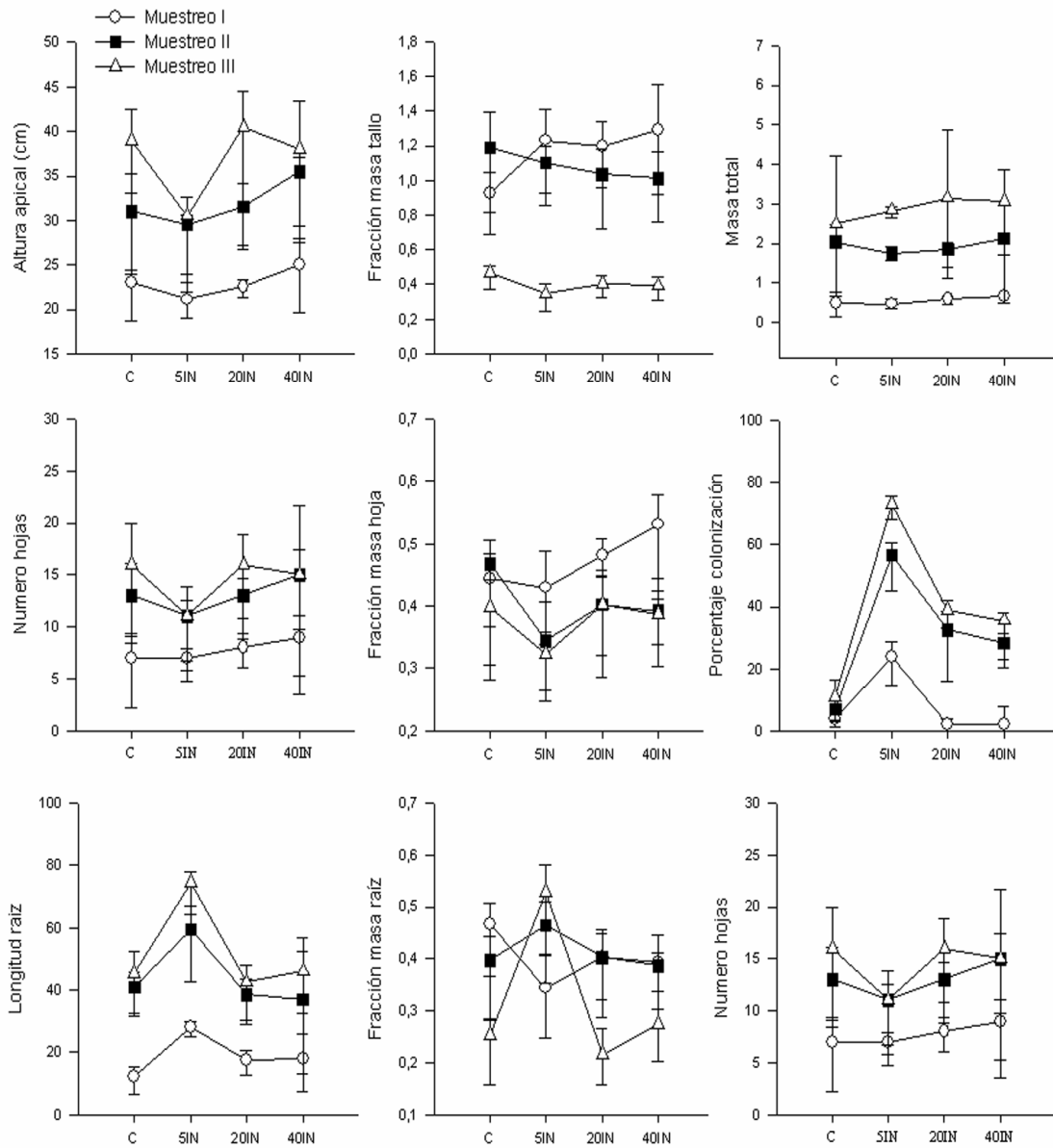


FIGURA 3. Caracteres morfológicos y de asignación de biomasa para los tratamientos sin aplicación de isoflavonoide formononetina en las tres épocas de muestreo. C: Control, IN: Inoculo nativo.

Inoculo Nativo

Glomus aggregatum Shenck & Smith
Glomus clarum Nicol. & Schenck
Glomus etunicatum yellow Becker & Gerderman
Glomus geosporium (Nicol. & Gerd.) Walker
Glomus rubiformis (Gerd. & Trappe) Almeida & Schenck
Glomus sp.1 Tulasne & Tulasne
Glomus sp.2 Tulasne & Tulasne
Glomus sp.3 Tulasne & Tulasne
Glomus sp.4 Tulasne & Tulasne
Acaulospora mellea Spain & Schenck
Acaulospora morrowiae Spainn & Schenck
Acaulospora scrobiculata Trappe
Acaulospora spinosa Walker & Trappe
Acaulospora sp.1 Gerd. & Trappe emend. Berch
Acaulospora sp.2 Gerd. & Trappe emend. Berch
Acaulospora sp.3 Gerd. & Trappe emend. Berch
Acaulospora sp.4 Gerd. & Trappe emend. Berch
Paraglomus occultum (Walker) Morton & Redecker

TABLA 1. Especies de HMA del Inoculo Nativo utilizados en esta Investigación.

Disponibilidad de P (ppm)	Inoculo nativo (IN)	Formononetina (F)
Control (14)	Ausente	Ausente
Bajo (5)	Presente	Presente
Bajo (5)	Presente	Ausente
Medio (20)	Presente	Presente
Medio (20)	Presente	Ausente
Alto (40)	Presente	Presente
Alto (40)	Presente	Ausente

TABLA 2. Tratamientos utilizados en esta investigación. Inoculo nativo de HMA (IN), variables de disponibilidad de fósforo en partes por millón (ppm) y presencia o ausencia de isoflavonoide formononetina (F).

Muestreo	AP		LR		NH		FMH		FMT		FMR		Colonizacion		MsT		Esporas		
	gl	F	Sig	F	Sig	F	Sig	F	Sig	F	Sig	F	Sig	F	Sig	F	Sig	F	Sig
Dia 70																			
Tratamiento	3	0,69	NS	14,68	***	0,909	NS	8,564	***	6,41	**	4,245	**	84,211	***	1,371	NS	0,873	NS
Dia 110																			
Tratamiento	3	6,454	***	5,061	***	1,468	NS	5,497	**	1,267	NS	2,487	NS	14,516	***	0,44	NS	3,142	**
Dia 150																			
Tratamiento	3	3,357	**	19,44	***	4,83	**	4,628	**	7,254	**	18,63	***	22,456	***	1,322	NS	11,78	***

TABLA 3. Análisis de varianza para los caracteres morfológicos y de asignación de biomasa en los tratamientos con aplicación de isoflavonoide formononetina. ***: Diferencias altamente significativas ($P<0,01$), **: Diferencias significativas ($P<0,05$), NS: Diferencias no significativas.

Muestreo	AP		LR		NH		FMH		FMT		FMR		Colonizacion		MsT		Esporas		
	gl	F	Sig	F	Sig	F	Sig	F	Sig	F	Sig	F	Sig	F	Sig	F	Sig	F	Sig
Dia 70																			
Tratamiento	3	6,75	**	6,269	**	2,807	NS	6,814	**	8,842	**	5,872	**	104,67	***	2,423	NS	1,193	NS
Dia 110																			
Tratamiento	3	4,698	**	9,234	***	1,757	NS	5,872	**	1,958	NS	3,21	**	12,805	***	0,608	NS	2,378	NS
Dia 150																			
Tratamiento	3	7,439	***	34,01	***	6,64	**	3,982	**	6,62	**	71,69	***	14,272	***	0,908	NS	21,78	***

TABLA 4. Análisis de varianza para los caracteres morfológicos y de asignación de biomasa en los tratamientos sin aplicación de isoflavonoide formononetina. ***: Diferencias altamente significativas ($P<0,01$), **: Diferencias significativas ($P<0,05$), NS: Diferencias no significativas.