

**ASOCIACIÓN SIMBIÓTICA ENTRE HONGOS FORMADORES DE  
MICORRIZAS Y PLÁNTULAS DE *Theobroma cacao* ESTIMULADA CON  
LA APLICACIÓN DEL ISOFLAVONOIDE FORMONONETINA.**

**DIANA GICELA BLANCO VEGA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA  
BUCARAMANGA  
2006**

**ASOCIACIÓN SIMBIÓTICA ENTRE HONGOS FORMADORES DE  
MICORRIZAS Y PLÁNTULAS DE *Theobroma cacao* ESTIMULADA CON  
LA APLICACIÓN DEL ISOFLAVONOIDE FORMONONETINA.**

**DIANA GICELA BLANCO VEGA**

**Trabajo de grado presentado para optar al título de Bióloga**

**Director**

**NELSON RODRÍGUEZ LÓPEZ**

**MSc. Fisiología Vegetal**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**BUCARAMANGA**

**2006**

## DEDICATORIA

*Nada de lo que haces tiene sentido sino tienes con quien  
compartirlo por esto dedico mi trabajo  
a mis Padres por su amor y apoyo.*

*A mi hermana por su cariño.*

*A Jaime Alberto por ser mi cómplice.*

*A Dalía Carolina por su amistad incondicional.*

*y a mis amigos de siempre.*

## CONTENIDO

### Parte 1. DIVERSIDAD DE HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES ASOCIADOS A PLANTACIONES DE *Theobroma cacao* EN SANTANDER, COLOMBIA.

	Pág.
INTRODUCCIÓN	12
1. MATERIALES Y MÉTODOS	14
2. RESULTADOS	17
3. DISCUSIÓN	19
4. AGRADECIMIENTOS	24
LITERATURA CITADA	25

### Parte 2. EFECTO DE LA FORMONONETINA SOBRE LA SIMBIOSIS MICORRÍZICA Y EL CRECIMIENTO DE *Theobroma cacao* EN FASE DE VIVERO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	39
1. MATERIALES Y MÉTODOS	41
2. RESULTADOS	45
3. DISCUSIÓN	47
4. AGRADECIMIENTOS	51
LITERATURA CITADA	52

## LISTA DE TABLAS

### Parte 1. DIVERSIDAD DE HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES ASOCIADOS A PLANTACIONES DE *Theobroma cacao* EN SANTANDER, COLOMBIA.

	Pág.	
Tabla 1	Municipios cacaoteros del departamento de Santander muestreados en este trabajo.	30
Tabla 2	Análisis químico del suelo de las plantaciones de <i>T. cacao</i> .	31
Tabla 3	Especies de HMA asociadas a cultivos de <i>T. cacao</i> en el departamento de Santander, Colombia.	32
Tabla 4	Riqueza, diversidad ( <i>sensu</i> Whittaker, 1977), índice de Shannon-Wiener, índice de Simpson, porcentaje de colonización y densidad de esporas de la comunidad de HMA asociadas a plantaciones de <i>T. cacao</i> en Santander.	33
Tabla 5	Correlación de Spearman entre la riqueza, índices de diversidad, porcentaje de colonización micorrízica, densidad de esporas de HMA y las condiciones edáficas de plantaciones de <i>T. cacao</i> .	34

**Parte 2. EFECTO DE LA FORMONONETINA SOBRE LA SIMBIOSIS MICORRÍZICA Y EL CRECIMIENTO DE *Theobroma cacao* EN FASE DE VIVERO.**

	<b>Pág.</b>
Tabla 1	Especies de HMA utilizadas en este experimento. 57
Tabla 2	Valores de la tasa de crecimiento relativa ( $\text{mg g}^{-1} \text{ día}^{-1}$ ) y la tasa de asimilación neta ( $\text{mg cm}^{-2} \text{ día}^{-1}$ ) del intervalo uno y el intervalo dos de muestreo de plántulas de <i>T. cacao</i> . P: valores de probabilidad de la prueba de t de Student entre los dos intervalos. (C: control; N: inóculo nativo, F: inóculo foráneo, M: inóculo mixto, Fm+N: formononetina + inóculo nativo, Fm+F: formononetina + inóculo foráneo, Fm+M: formononetina + inóculo mixto, Fm: formononetina). 58
Tabla 3	Análisis de las condiciones químicas del suelo al final del experimento. 59

## LISTA DE FIGURAS

### Parte 1. DIVERSIDAD DE HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES ASOCIADOS A PLANTACIONES DE *Theobroma cacao* EN SANTANDER, COLOMBIA.

	<b>Pág.</b>
Figura 1 Abundancia de HMA asociados a cultivos de <i>T. cacao</i> .	35
Figura 2 Frecuencia de HMA asociados a cultivos de <i>T. cacao</i> .	36

**Parte 2. EFECTO DE LA FORMONONETINA SOBRE LA SIMBIOSIS MICORRÍZICA Y EL CRECIMIENTO DE *Theobroma cacao* EN FASE DE VIVERO.**

	<b>Pág.</b>	
Figura 1	Biomasa total de plántulas de <i>T. cacao</i> a los 20 días después del trasplante (ddt) (A), 65 ddt (B) y 103 ddt (C). (C: control; N: inóculo nativo, F: inóculo foráneo, M: inóculo mixto, Fm+N: formononetina + inóculo nativo, Fm+F: formononetina + inóculo foráneo, Fm+M: formononetina + inóculo mixto, Fm: formononetina). Los tratamientos con la misma letra no difieren estadísticamente ( $p < 0.05$ ).	60
Figura 2	Porcentaje de colonización y densidad de esporas de HMA en plántulas de <i>T. cacao</i> a los 20 días después del trasplante (ddt) (A,D), 65 ddt (B,E) y 103 ddt (C,F). (C control, N inóculo nativo, F inóculo foráneo, M inóculo mixto, Fm+N formononetina + inóculo nativo, Fm+F formononetina + inóculo foráneo, Fm+M formononetina + inóculo mixto, Fm formononetina). Los tratamientos con la misma letra no difieren estadísticamente ( $p < 0.05$ ).	61

## RESUMEN

**TITULO:** ASOCIACIÓN SIMBIÓTICA ENTRE HONGOS FORMADORES DE MICORRIZAS Y PLÁNTULAS DE *Theobroma cacao* ESTIMULADA CON LA APLICACIÓN DEL ISOFLAVONOIDE FORMONONETINA. PRIMERA PARTE: DIVERSIDAD DE HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES ASOCIADOS A PLANTACIONES DE *Theobroma cacao* EN SANTANDER, COLOMBIA\*

**AUTOR:** DIANA GICELA BLANCO VEGA \*\*

**PALABRAS CLAVES:** Hongos micorrízicos arbusculares (HMA), *Theobroma cacao*, diversidad, manejo agronómico.

### DESCRIPCIÓN:

El objetivo de este trabajo fue determinar la diversidad de hongos micorrízicos arbusculares asociados a cultivos de *Theobroma cacao* con manejo agrícola convencional en el departamento de Santander, Colombia. Esporas de dieciocho especies de HMA fueron encontradas asociadas a la rizósfera de *T. cacao*. Nueve especies pertenecientes al género *Glomus*, ocho al género *Acaulospora* y una especie al género *Paraglomus*. La riqueza, el índice de diversidad (*sensu* Whittaker), el índice de Shannon-Wiener y el índice de Simpson no presentaron diferencias estadísticas entre los municipios estudiados. El porcentaje de colonización encontrado en los municipios de Rionegro, El Playón y San Vicente de Chucurí semeja el porcentaje de colonización observado en sistemas naturales, mientras que el porcentaje de colonización encontrado en los municipios de Landázuri y el Carmen semejan el porcentaje de colonización presente en sistemas agrícolas. Un alto porcentaje de colonización fue encontrado en raíces de *T. cacao* aún con alto nivel de fósforo en el suelo, lo cual sugiere que *T. cacao* puede ser una especie altamente dependiente de los HMA. Sin embargo esta condición puede implicar una relación parasítica entre los HMA y las raíces de *T. cacao*. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la riqueza y la diversidad de los HMA asociados a las plantaciones de *T. cacao*, así como el mantenimiento de una relación mutualista en las zonas productoras de Santander, dependen del grado de fertilidad del suelo y el manejo agronómico de los cultivos.

---

\* Trabajo de Grado

\*\* Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Director Nelson Rodríguez López.

## ABSTRACT

**TITLE:** SYMBIOTIC ASSOCIATION BETWEEN MYCORRHIZAL FUNGI AND PLANTS OF *Theobroma cacao* ESTIMULATED WITH ISOFLAVONOIDE FORMONONETIN. FIRST PART: DIVERSITY OF ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI ASSOCIATED TO *Theobroma cacao* IN SANTANDER, COLOMBIA

**AUTHOR:** DIANA GICELA BLANCO VEGA \*\*

**KEY WORDS:** Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), *Theobroma cacao*, diversity, agronomic handling.

### DESCRIPTION

The aim of this work was to determine the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi associated to plantations of *Theobroma cacao* with conventional agricultural handling in the department of Santander, Colombia. Spores of species eighteen of HMA were found associated to the rhizosphere *T. cacao*. Nine species belonging to the genus *Glomus*, eight species belonging to the genus *Acaulospora* and one specie belonging to the genus *Paraglomus*. The spore densities, richness, the index of diversity (sensu Whittaker) and the Shannon-Wiener and Simpson indexes did not show statistical differences among the locations studied. The colonization percentage of Rionegro, El Playón and San Vicente de Chucurí resemble the colonization porcentaje in natural systems. While the colonization percentage of Landázuri and El Carmen resemble to agricultural systems. A high colonization percentage was found in roots of *T. cacao* with high level of fosphoro in the soil that suggests that *T. cacao* can be a highly dependent species of the HMA. However, this condition can imply a parasitic relation between the HMA and roots of *T. cacao*. The results obtained in this work indicate that the richness and the diversity of the HMA associated to the plantations of *T. cacao*, as well as the maintenance of a mutual relationship in the producers areas of Santander, they depend on the degree of fertility of the soil and the agronomic handling of the cultivations.

---

\* Work of Degree

\*\* Faculty of Sciences, Biology School, Director, Nelson Rodríguez López.

# **Parte 1. DIVERSIDAD DE HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES ASOCIADOS A PLANTACIONES DE *Theobroma cacao* EN SANTANDER, COLOMBIA.**

## **INTRODUCCIÓN**

Los Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA) forman una asociación simbiótica con la raíz de las plantas. Se ha reportado que los HMA benefician a la planta con un aumento en la toma de nutrientes (Cornwell *et al.* 2001), resistencia a estrés hídrico (Augé *et al.* 2001, Davies *et al.* 2002a), resistencia a patógenos del suelo (García-Garrido & Ocampo 2002) e inmovilización de metales pesados en sitios con moderada contaminación (Del Val *et al.* 1999, Davies *et al.* 2002b, Bi *et al.* 2003).

El grado de dependencia de las plantas hacia los HMA, ha revelado que la simbiosis micorrízica puede influir en la composición y diversidad de las especies vegetales (van der Heijden *et al.* 1998a, Harnett & Wilson 1999). Como consecuencia, una alteración en la comunidad de HMA afectará la productividad y diversidad del ecosistema (van der Heijden *et al.* 1998b).

Las prácticas de manejo convencionales de los suelos agrícolas, tales como, la fertilización y la aplicación de fungicidas, representan el principal tipo de intervención antrópica que conduce a una disminución en la diversidad de los HMA (Cairney & Meharg 1999). Oehl *et al.* (2003) y Eom *et al.* (2004) han reportado que los sistemas agrícolas tienen una menor diversidad de HMA comparada con sistemas naturales. En contraste, Jansa *et al.* (2002) reportaron que el manejo agrícola no tiene un efecto significativo sobre la diversidad de HMA. Sin embargo, se debe hacer énfasis en que las prácticas agronómicas deben ser cuidadosamente seleccionadas con el fin de causar

el menor impacto posible sobre la comunidad fúngica del suelo (Pande & Tarafdar 2004).

En la actualidad, es poca la información disponible acerca de la riqueza y diversidad de HMA en sistemas agrícolas del neotrópico (Cuenca & Meneses 1996). En tanto que, un amplio estudio se ha realizado en diversos ecosistemas de La Gran Sabana, Venezuela (Cuenca *et al.* 1998a b, Cuenca *et al.* 2002).

*Theobroma cacao* L. 1753, es una especie tropical de la familia Sterculiaceae, su cultivo es de importancia económica y amplio desarrollo en Colombia. Sin embargo, la baja disponibilidad de nutrientes característica de los suelos del trópico, ha conducido a la aplicación de fertilizantes y a la contaminación química de los suelos. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar la diversidad de hongos micorrízicos arbusculares asociados a cultivos de *Theobroma cacao* con diferente manejo agrícola en el departamento de Santander (Colombia).

## 1. MATERIALES Y MÉTODOS

### Área de estudio

Las muestras de suelo fueron colectadas en los municipios de El Carmen, El Playón, Landázuri, Ríonegro y San Vicente de Chucurí en el departamento de Santander, Colombia; municipios que son importantes productores de *T. cacao* (Tabla 1).

### Muestreo de suelos en las zonas cacaoteras

Para cada municipio las muestras de suelo fueron colectadas seleccionando cuatro veredas y en cada una de ellas cuatro fincas. En cada finca se tomaron muestras de suelo a una distancia de 1 y 1.5 m desde el tallo de cinco árboles de *T. cacao* mayores a cinco años, tomando el perfil de profundidad desde la superficie hasta los 30 cm con un barreno o palín. Para un total de 160 muestras por municipio.

### Análisis de suelos

Los métodos utilizados para el análisis físico-químico de los suelos fueron los siguientes: El pH del suelo de la rizósfera fue medido después de dilución con agua destilada (1:1 v/v). La materia orgánica fue determinada por el método colorimétrico de Walkley Black  $K_2Cr_2O_7-H_2SO_4$  (Jackson 1976). El fósforo disponible fue determinado por el método de Bray II. HCL 0.1 N-NH<sub>4</sub>F 0.03 N. Los cationes intercambiables (K, Ca, Mg, Na) fueron extraídos con acetato de amonio (Thomas 1982) y determinados mediante espectrofotometría de absorción atómica. El aluminio intercambiable mediante extracción con KCl y la textura fue determinada por el método de Bouyoucous (Day 1965).

### Colonización micorrízica

Raicillas de *T. cacao* fueron separadas de las muestras de suelo, clareadas con KOH al 10% y coloreadas con azul de tripán siguiendo la metodología de Phillips & Hayman (1970). Diez segmentos de raíz (< 3 mm de diámetro) de 1 cm de longitud por planta fueron montados sobre placa portaobjetos. Luego, diez campos por segmento fueron observados al microscopio (10X), para el reconocimiento de estructuras de HMA. El porcentaje de colonización se obtuvo del número de campos positivos (presencia de arbusculos, vesículas, esporas o hifas) sobre el número de campos totales multiplicado por cien.

#### Densidad de esporas

De cada una de las fincas se tomaron 10 g de suelo que fueron procesados para el aislamiento de esporas siguiendo el método de tamizaje (500 $\mu$  y 38 $\mu$ ) y centrifugación con sacarosa descrito por Gerdermann & Nicolson (1963). Las esporas fueron cuantificadas bajo microscopio estereoscopio y agrupadas de acuerdo a características morfológicas. Posteriormente, las esporas fueron montadas en alcohol polivinil-lacto-glicerol (PVLG) o en PVLG + reactivo de Melzer (1:1 v:v). Sólo las esporas viables y sin ataque microbiano fueron determinadas mediante la clave de Morton (Morton 1988) a nivel de género y cuando fue posible a nivel de especie.

#### Riqueza e índices de diversidad

Con los datos obtenidos se calculó: la riqueza: R= número de especies de HMA encontradas en cada vereda; la diversidad (*sensu* Whittaker, 1977),  $D = S/\text{Log}N$ , donde S es el número total de especies de HMA en la muestra y N el número total de esporas en la muestra; el índice de diversidad de Shannon-Wiener,  $H' = -\sum(p_i \ln p_i)$  y el índice de Simpson (1-D),  $D = \sum (p_i)^2$ , donde  $p_i$  es la proporción de individuos de la especie i con respecto al total (Magurran 1989).

### Análisis estadístico

La riqueza e índices de diversidad fueron comparados entre los municipios mediante análisis de varianza de una vía ANOVA (Zar 1999). Además, fue realizada una correlación de Spearman entre la riqueza, índices de diversidad, porcentaje de colonización, densidad de esporas y las condiciones químicas del suelo de las localidades muestreadas.

## 2. RESULTADOS

Las características edáficas de las plantaciones de *T. cacao* del departamento de Santander encontradas en este trabajo, muestra suelos con un pH ácido, un nivel medio de materia orgánica y bajo contenido de K. El contenido de P es bajo, excepto en el municipio de Landázuri en donde se ha tenido un manejo químico de los suelos, con NPK (15. 15: 15) y fosfato diamonio (8:46:0) (Tabla 2).

En todas las localidades muestreadas fueron encontradas esporas de dieciocho especies de HMA asociadas a plantaciones de *T. cacao*. Nueve especies pertenecientes al género *Glomus*, ocho al género *Acaulospora* y una especie del género *Paraglomus* (Tabla 3). *Glomus rubiformis* fue la especie más abundante (33.7%) seguida por *Glomus* sp. 1 (31.5%) y *Acaulospora mellea* (9.8%) (Gráfica 1). Además, *G. rubiformis* estuvo presente en todas las localidades muestreadas (Gráfica 2).

Los índices de riqueza, diversidad (*sensu* Whittaker), índice de Shannon-Wiener e índice de Simpson no difieren estadísticamente entre los municipios estudiados (Tabla 4). Sin embargo, la riqueza de HMA tiende a ser mayor en El Playón, mientras que los índices de diversidad evaluados tienden a ser más altos en San Vicente de Chucurí, en donde ha sido escaso el uso de fertilizantes químicos. La riqueza y los índices de diversidad se correlacionaron positivamente con la materia orgánica del suelo (Tabla 5).

Arbúsculos, vesículas, hifas y esporas de HMA fueron observadas en raíces de *T. cacao*. La diferencia en el porcentaje de colonización entre los municipios fue significativa ( $p=0.02$ ). Una alta colonización fue observada en El Playón, Rionegro y San Vicente (media 50.2%), mientras que en El

Carmen y Landázuri se observó una menor colonización (Media 34.1%) (Tabla 4).

La densidad de esporas fue similar en los municipios estudiados ( $p=0.46$ ) y no presentó correlación con ninguna de las condiciones edáficas presentes en las plantaciones de *T. cacao*.

### 3. DISCUSIÓN

En este estudio fueron encontradas 18 especies de HMA asociadas a plantaciones de *T. cacao*. Resultados similares, con menos de 20 especies de HMA, han sido encontrados en campos de monocultivo con agricultura convencional y aún en aquellos con rotación de cultivos (Jansa *et al.* 2002, Oehl *et al.* 2003, Eom *et al.* 2004).

La riqueza de HMA asociada a plantaciones de *T. cacao* en Santander, Colombia fue similar a la reportada en Venezuela por Cuenca & Meneses (1996), quienes encontraron quince especies de HMA asociadas a la rizósfera de *T. cacao*. Sin embargo, sólo tres de las especies observadas en este trabajo, *Acaulospora mellea*, *A. morrowiae* y *A. scrobiculata*, coinciden con lo reportado por esos autores. La presencia del género *Glomus* en todas las localidades muestreadas en este trabajo, es un índice de la posible resistencia de estas especies a las diferentes perturbaciones que han sido causadas al suelo.

En ninguna de las localidades muestreadas en este trabajo, fue encontrado el género *Scutellospora*, coincidiendo con lo reportado por Cuenca & Meneses (1996) y Jansa *et al.* (2002) en sistemas agrícolas. Tampoco fue observado el género *Gigaspora*, reportado por Eom *et al.* (2004) como ausente en suelos cultivados. Los géneros *Scutellospora* y *Gigaspora* han sido reportados como ausentes en sitios intervenidos y en proceso de recuperación (Cuenca *et al.* 1998a).

La riqueza y la diversidad de HMA asociados a cultivos de *T. cacao* no varió de forma significativa entre los municipios estudiados. La diversidad (*sensu* Wittaker) y el índice de Simpson fueron similares a lo reportado por Cuenca

& Meneses (1996). Sin embargo, el índice de Shannon-Wiener fue mayor en este trabajo. Las diferencias pueden surgir del manejo agronómico, ya que la riqueza y diversidad han sido reportadas como bajas en sitios severamente intervenidos (Beena *et al.* 2000).

De otro lado, las especies vegetales utilizadas para el sombrío de los cultivos de *T. cacao* en este trabajo, tales como *Cedrela odorata* L., *Ceiba pentandra* L., *Cordia alliodora* Ruiz & Pav. , *Erythrina fusca* Lour. , *Persea americana* Mill. , *Anacardium excelsum* (Kunth) Skeels, entre otras, pueden dar lugar a diferencias en la diversidad de HMA.

Jansa *et al.* (2002), encontraron que los suelos agrícolas no afectan de forma significativa la diversidad de HMA; lo cual puede ser atribuido al hecho de que los índices de diversidad no reflejan de forma apropiada la estructura del ecosistema. Teniendo en cuenta, las diferentes tasas de esporulación de los HMA y las dificultades en la determinación de las especies muestreadas en campo, los resultados de diversidad deben ser observados cuidadosamente.

La correlación positiva encontrada entre la materia orgánica y la riqueza y diversidad de HMA, también fue observada por Cuenca & Meneses (1996) y Pande & Tarafdar (2004). En este trabajo, los resultados pueden estar influenciados por la frecuente aplicación de abono orgánico (gallinaza, bovinaza y compost). No obstante, se requiere de mayor información y estudio para establecer el por qué de esta relación.

El porcentaje de colonización micorrízica fue significativamente diferente entre los municipios estudiados. Esta diferencia podría atribuirse a que los suelos de las zonas cacaoteras del departamento de Santander presentan variación en los niveles de P, debido al manejo agronómico de los cultivos. En suelos con bajo nivel de P (<15 ppm) como en El Playón, una elevada

colonización micorrízica le puede permitir a la planta acceder a los beneficios de la asociación. Por el contrario, en suelos con alto nivel de P (>40 ppm) como en Landázuri es poco significativa la toma de P que puede ser ejercida por la micorriza.

Contrario a los reportes donde el porcentaje de colonización de HMA disminuyó con la aplicación de fertilizantes (Chacón & Cuenca 1998, Cuenca *et al.* 1998b, Davies *et al.* 2005); en este trabajo, las plantaciones de Landázuri, las cuales han sido fertilizadas, presentaron una media de 32.7% de colonización, coincidiendo con lo observado en suelos agrícolas por Eom *et al.* (2004). Mientras que el porcentaje de colonización en plantaciones con muy baja o nula entrada de fertilizantes fue del 46.5%, semejando la colonización presente en condiciones naturales (Eom *et al.* 2004). Sin embargo, no existen reportes acerca del porcentaje de colonización en sistemas naturales cercanos al área de estudio que puedan ser comparados.

Es posible que *T. cacao* sea una especie altamente dependiente de los HMA y que el alto porcentaje de colonización (40%) aún con un nivel de P de 59 ppm, sea el resultado de la alta capacidad de inmovilización de P de los suelos tropicales (Schroeder & Janos 2005). Sin embargo, debido a un aumento en la disponibilidad de un recurso antes limitante, la planta también estaría corriendo el riesgo de una relación parasítica, al no regular los exudados para evitar la colonización (Vierheilig 2004). Esta debería ser la respuesta esperada con el fin de evitar los costos que implica la simbiosis sin un beneficio nutricional. Además, se ha planteado que la asociación micorrízica puede moverse entre mutualismo y parasitismo y que la posición de los HMA en uno u otro tipo de relación, puede estar determinada por las condiciones ambientales y la abundancia de nutrientes en el suelo (Johnson *et al.* 1997).

La disponibilidad de nutrientes y la demanda de carbono (4 a 20%) por parte del hongo (Bago *et al.* 2000), sugieren que, el tejido fúngico podría estar liberando señales que alteran los exudados en la raíz, lo cual le puede permitir al hongo beneficiarse de la relación. Esta situación podría establecer el punto en la transición mutualismo-parasitismo. Si la colonización no es eliminada, es posible que los costos que representa el drenaje de carbono hacia el hongo cause una disminución en el crecimiento de la planta (Cornwell *et al.* 2004, Sena *et al.* 2004). Además, las diferentes estrategias de colonización de las especies de HMA (Klironomos 2000, Hart & Reader 2002), también influye en los beneficios para la planta. Sin embargo, más datos en condiciones de campo son necesarios para esclarecer el tipo de relación parasítica entre los HMA y la raíz de las plantas.

Por otra parte, la densidad de esporas en la rizósfera de *T. cacao* (media 10.7 esporas/ g de suelo seco) coincide con lo observado por Cuenca & Meneses (1996). La densidad de esporas puede estar ligada a las diferentes estrategias ecológicas de los HMA (Hart & Reader 2002), que les permiten la permanencia en suelos que han sido sometidos a algún tipo de disturbio. Además, la tasa de esporulación también está influenciada por las condiciones climáticas y las prácticas culturales en el manejo de los campos (Pande & Tarafdar 2004). En efecto, la densidad de esporas no se correlacionó con el porcentaje de colonización, por lo tanto, el número de esporas presente en la rizósfera no debe ser tomado como un indicador del efecto de la micorriza sobre la planta, resultados similares fueron observados por Cuenca *et al.* (2003).

La presencia de una comunidad de HMA adaptada a las condiciones locales representa una alternativa a implementar en sistemas agrícolas con baja fertilización química (Klironomos 2003, Davies *et al.* 2005). Teniendo en cuenta que las plantas se benefician en diferente grado según el HMA

presente en el suelo (van der Heijden *et al.* 1998a); la composición y diversidad de HMA pueden promover la diversidad de especies vegetales (Klironomos 2000, 2003). Por lo tanto, es indispensable conocer la respuesta de *T. cacao* a una especie de hongo en particular, con el fin de observar cuál especie fúngica es la que está beneficiando a la planta. De igual forma, es importante determinar la influencia de los árboles utilizados como sombrío en los cultivos y su comunidad fúngica asociada, ya que se ha reportado una interacción del P disponible y la densidad vegetal en los efectos benéficos de la micorriza sobre el crecimiento de las plantas ( Schroeder & Janos 2005).

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, podemos concluir que la riqueza y la diversidad de HMA asociados a plantaciones de *T. cacao*, así como el mantenimiento de una relación mutualista balanceada en las zonas productoras de cacao en Santander, dependen en gran medida del grado de fertilidad del suelo y el manejo agronómico de los cultivos.

#### **4. AGRADECIMIENTOS**

Agradecemos a Fungifert Oriente Colombiano Ltda. y al Servicio Nacional de Aprendizaje (SENA) por el soporte económico de este trabajo. A la Escuela de Biología de la Universidad Industrial de Santander. Al señor Sydney Stürmer de la Universidad de Blumenau, Brasil. A la Federación Nacional de Cacaoteros (FEDECACAO). A Milena Hernández y Libia Gutiérrez por su colaboración y apoyo técnico.

## LITERATURA CITADA

- AUGÉ, R.M., E. KUBIKOVA & J.L. MOORE. 2001. Foliar dehydration tolerance of mycorrhizal cowpea, soybean and bush bean. *New Phytologist* 151: 535-541.
- BAGO, B., P.E. PFEFFER & Y. SHACHAR-HILL. 2000. Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiology* 124: 949-957.
- BEENA, K.R., N.S. RAVIRAJA, A.B. ARUN & K.R. SRIDHAR. 2000. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi on the coastal sand dunes of the west coast of India. *Current Science* 79: 1459-1466.
- BI, Y.L., X.L. LI & P. CHRISTIE. 2003. Influence of early stages of arbuscular mycorrhiza on uptake of zinc and phosphorus by red clover from a low-phosphorus soil amended with zinc and phosphorus. *Chemosphere* 50: 831-837.
- CAIRNEY, J.W.G. & A.A. MEHARG. 1999. Influences of anthropogenic pollution on mycorrhizal fungal communities. *Environmental Pollution* 106: 169-182.
- CHACÓN, A.M. & G. CUENCA. 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: 425-440.
- CORNWELL, W.K., B.L. BEDFORD & C.T. CHAPIN. 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., E. MENESES. 1996. Diversity patterns of arbuscular mycorrhizal fungi associated with cacao in Venezuela. *Plant and Soil* 183: 315-322.
- CUENCA, G., Z. DE ANDRADE & G. ESCALANTE. 1998a. Diversity of Glomalean spores from natural, disturbed and revegetated communities growing on nutrient-poor tropical soils. *Soil Biology & Biochemistry* 0: 1-9.

- CUENCA, G., Z. DE ANDRADE & G. ESCALANTE. 1998b. Arbuscular mycorrhizae in the rehabilitation of fragile degraded tropical lands. *Biology and Fertility of Soils* 26: 107-111.
- CUENCA, G., Z. DE ANDRADE, M. LOVERA, L. FAJARDO, E. MENESES, M. MÁRQUEZ & R. MACHUCA. 2002. El uso de arbustos nativos micorrizados para la rehabilitación de áreas degradadas de La Gran Sabana, Estado Bolívar, Venezuela. *Interciencia* 27: 165-172.
- CUENCA, G., Z. DE ANDRADE, M. LOVERA, L. FAJARDO, E. MENESES, M. MÁRQUEZ & R. MACHUCA. 2003. Pre-selección de plantas nativas y producción de inóculos de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) de relevancia en la rehabilitación de áreas degradadas de La Gran Sabana, Estado Bolívar, Venezuela. *Ecotropicos* 16: 27-40.
- DAVIES JR., F.T., V. OLALDE-PORTUGAL, L. AGUILERA-GÓMEZ, M.J. ALVARADO, R.C. FERRERA-CERRRATO & T.W. BOUTTON. 2002a. Alleviation of drought stress of chile ancho pepper (*Capsicum annum* L. cv. San Luis) with arbuscular mycorrhiza indigenous to México. *Scientia Horticulturae* 92: 347-359.
- DAVIES JR., F.T., J.D. PURYEAR, R.J. NEWTON, J.N. EGILLA & J.A. SARAIVA-GROSSI. 2002b. Mycorrhizal fungi increase chromium uptake by sunflower plants: Influence on tissue mineral concentration, growth, and gas exchange. *Journal of Plant Nutrition* 25: 2389-2407.
- DAVIES JR., F.T., C.M. CALDERÓN & Z. HUAMAN. 2005. Influence of arbuscular mycorrhizae indigenous to peru and a flavonoid on growth, yield, and leaf elemental concentration of “yungay” potatoes. *HortScience* 40: 381-385.
- DAY, P.R. 1965. Particle fractionation and particle size analysis. Págs.45-78 en: *Black CA (Ed.) Methods of Soil Analysis*. Part 1. Agronomy. ASA-SSSA. Madison. Wisconsin. USA.
- DEL VAL, D., J.M. BAREA & C. AZCÓN-AGUILAR. 1999. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungus populations in heavy-metal-contaminated soils. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 718-723.

- EOM, A.H., M.S. TAE & J.K. LEE. 2004. Diversity of arbuscular fungi in arable and natural soils in Korea. *Korean Journal of Ecology*. 27: 179-184.
- GARCÍA-GARRIDO, J.M. & J.A. OCAMPO. 2002. Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Journal of Experimental Botany* 53: 1377-1386.
- GERDERMANN, J.W. & T.H. NICOLSON. 1963. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society*. 46: 235-244.
- HARNETT, D.C. & G.W.T. WILSON. 1999. Mycorrhizae influence plant community structure and diversity in tallgrass prairie. *Ecology* 80: 1187-1195.
- HART, M.M. & R.J. READER. 2002. Taxonomic basis for variation in the colonization strategy of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 153: 335-344.
- JACKSON, M.L. 1976. *Análisis Químico del Suelo*. Editorial Omega, Barcelona.
- JANSA, J., A. MOZAFAR, T. ANKEN, R. RUH, I.R. SANDERS & E. FROSSARD. 2002. Diversity and structure of AMF communities as affected by tillage in a temperate soil. *Mycorrhiza* 12: 225-234
- JOHNSON, N.C., J.H. GRAHAM & F.A. SMITH. 1997. Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytologist* 135: 575-585.
- KLIRONOMOS, J.N., J. MCCUNE, M. HART & J. NEVILLE. 2000. The influence of arbuscular mycorrhizae on the relationship between plant diversity and productivity. *Ecology Letters* 3: 137-141.
- KLIRONOMOS, J.N. 2003. Variation in plant response to native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecology* 84: 2292-2301.
- MAGURRAN, A.E. 1989. *Diversidad ecológica y su medición*. Ediciones Vedra. Barcelona.
- MORTON, J.B. 1988. Taxonomy of VA mycorrhizal fungi: classification, nomenclature, and identification. *Mycotaxon* 32: 267-324.

- OEHL, F., E. SIEVERDING, K. INEICHEN, P. MÄDER, T. BOLLER & A. WIEMKEN. 2003. Impact of land use intensity on the species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems of Central Europe. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 2816–2824.
- PANDE, M. & J.C. TARAFDAR. 2004. Arbuscular mycorrhizal fungal diversity in neem-based agroforestry systems in Rajasthan. *Applied Soil Ecology* 26: 233-241.
- PIOTROWSKI, J.S., T. DENICH, J.N. KLIRONOMOS, J.M. GRAHAM & M.C. RILLIG. 2004. The effects of arbuscular mycorrhizas on soil aggregation depend on the interaction between plant and fungal species. *New Phytologist* 164: 365–373.
- PHILLIPS, J.M. & D.S. HAYMAN. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55: 158-161.
- SENA, J.O.A., C.A. LABATE & E.J.B.N. CARDOSO. 2004. Caracterização fisiológica da redução de crescimento de mudas de citros micorrizadas em altas doses de fósforo. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo* 28: 827-832.
- SCHROEDER, M.S. & D.P. JANOS. 2005. Plant growth, phosphorus nutrition, and root morphological responses to arbuscular mycorrhizas, phosphorus fertilization, and intraspecific density. *Mycorrhiza* 15: 203-216.
- THOMAS, G.W. 1982. Exchangeable cations. Págs. 159-165 en *Methods of Soil Analysis*. Part 2. Chemical and Microbiological Properties. Agronomy Monograph No. 9. 2nd Edition.
- VAN DER HEIJDEN, M.G.A., T. BOLLER, A. WIEMKEN & I.R. SANDERS. 1998a. Different arbuscular mycorrhizal fungal species are potential determinants of plant community structure. *Ecology* 79: 2082-2091.
- VAN DER HEIJDEN, M.G.A., J.N. KLIRONOMOS, M. URSIC, P. MOUTOGLIS, R. STREITWOLF-ENGEL, T. BOLLER, A. WIEMKEN & I.R. SANDERS. 1998b. Mycorrhizal fungal

diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396: 69-72.

VIERHEILIG, H. 2004. Regulatory mechanisms during the plant-arbuscular mycorrhizal fungus interaction. *Canadian Journal of Botany* 82: 1166-1176.

ZAR, J.H. 1999. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, New Jersey.

Tabla 1.

Municipio	Latitud y Longitud		Precipitación*	T*	Humedad Relativa*
	Altura				
El Carmen	6°41'N; 73°30'W	815	2339,3	24,1	85
El Playón	7°28'N; 73°12'W	500	1959,4	21,2	81
Landázuri	6°14'N; 73°48'W	1085	3074,6	22,8	88
Ríonegro	7°19'N; 73°10'W	800	2146,6	21,3	82
San Vicente de chucurí	6°50'N; 73°29'W	964	1842,2	21,4	83

\*Media Anual

Fuente: Autor

Tabla 2.

Municipio	Vereda	pH	M.O. (%)	P (ppm)	K (meq /100 g suelo)	Ca	Mg	Al	Textura
El									
Carmen	La Fortuna	4.8	3.9	3	0.14	1.8	0.8	0.8	Franco-arenoso
	El Toboso	4.7	4.0	1	0.21	1.3	0.9	0.7	Franco-arenoso
	El Quinal	4.5	3.0	21	0.12	1.3	0.3	1.8	Franco-arenoso
	Quinal Alto	4.5	4.3	4	0.21	1.6	0.8	1.3	Franco
El Playón	Río Blanco	5.4	3.3	10	0.14	1.8	2.4	0.0	Franco-arenoso
	Planadas	4.6	3.5	2	0.13	0.5	0.3	0.9	Franco-arenoso
	San Pedro	4.5	3.7	5	0.23	0.6	0.4	1.0	Franco
	San Agustín	5.4	3.5	3	0.22	1.6	2.7	0.0	Franco-arenoso
Landázuri	Pedrigales	6.6	3.8	59	0.16	4.5	1.5	0.0	Franco-arenoso
	Km-15	7.0	3.4	22	0.10	4.2	0.7	0.0	Franco-arenoso
	Quebrada								
	Negra	6.6	3.0	54	0.17	3.9	1.7	0.0	Franco-arenoso
	Popayán	4.5	2.8	3	0.29	0.6	0.9	3.0	Franco-arenoso
Ríonegro	Portachuelo	5	3.2	5	0.28	0.8	1.0	0.0	Franco-arenoso
	La Ceiba	5.2	2.8	10	0.27	1.0	1.1	0.0	Franco-arenoso
	Galápagos	4.8	4.1	20	0.33	1.3	0.6	0.4	Franco-arenoso
	Honduras	6.5	3.7	33	0.47	2.3	1.7	0.0	Franco-arenoso
San									
Vicente de chucurí	Santa Inés	4.4	4.1	4	0.13	1.2	0.5	2.4	Franco
	Mérida	4.9	4.9	4	0.14	2.5	0.7	0.1	Franco-arenoso
	Centro-Germania	6.2	4.9	5	0.19	2.9	1.2	0.0	Franco-arenoso
	Campo Hermoso	5.6	4.9	4	0.15	3.1	1.1	0.0	Franco-arenoso

Fuente: Autor

Tabla 3.

---

**Glomaceae** Pirozynski & Dalpé

*Glomus aggregatum* Schenck & Smith

*Glomus clarum* Nicol. & Schenck

*Glomus etunicatum yellow* Becker & Gerdemann

*Glomus geosporum* (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

**Acaulosporaceae** Morton & Benny

*Acaulospora mellea* Spain & Schenck

*Acaulospora morrowiae* Spain & 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

**Paraglomaceae** Morton & Redecker

*Paraglomus occultum* (Walker) Morton & Redecker

---

Fuente: Autor

Tabla 4.

Municipio	Riqueza	Diversidad	Índices de Diversidad		%CM	No.Esporas/g
			Shannon- Wiener	Simpson		
El Carmen	3.75±0.95 <sup>z</sup> a <sup>y</sup>	4.12±1.0 a	1.12±0.3 a	0.61±0.1 a	35.5 ±4.7 a	9.2±2.7 a
El Playón	6.0 ±2.58 a	5.03±1.3 a	1.36±0.3 a	0.65±0.1 a	50.1 ±9.2 b	19.7±13.7 a
Landázuri	4.50±1.29 a	3.41±1.2 a	1.13±0.2 a	0.63±0.1 a	32.7±13.5 a	9.0±1.9 a
Ríonegro	5.75±1.26 a	5.04±1.4 a	1.52±0.3 a	0.74±0.1 a	51.3 ±3.7 b	7.0±6.4 a
San Vicente	5.75±1.50 a	5.51±0.1 a	1.65±0.3 a	0.79±0.05 a	49.3 ±3.9 b	7.7±5.6 a
Media ±S.D.	5.15±1.69	4.62±1.3	1.36±0.3	0.68±0.1	44.9 ±10.3	10.7±8.5

<sup>z</sup> Media (±S.D.)

<sup>y</sup> Letras iguales dentro de la misma columna no difieren significativamente(p<0.05).

Fuente: Autor

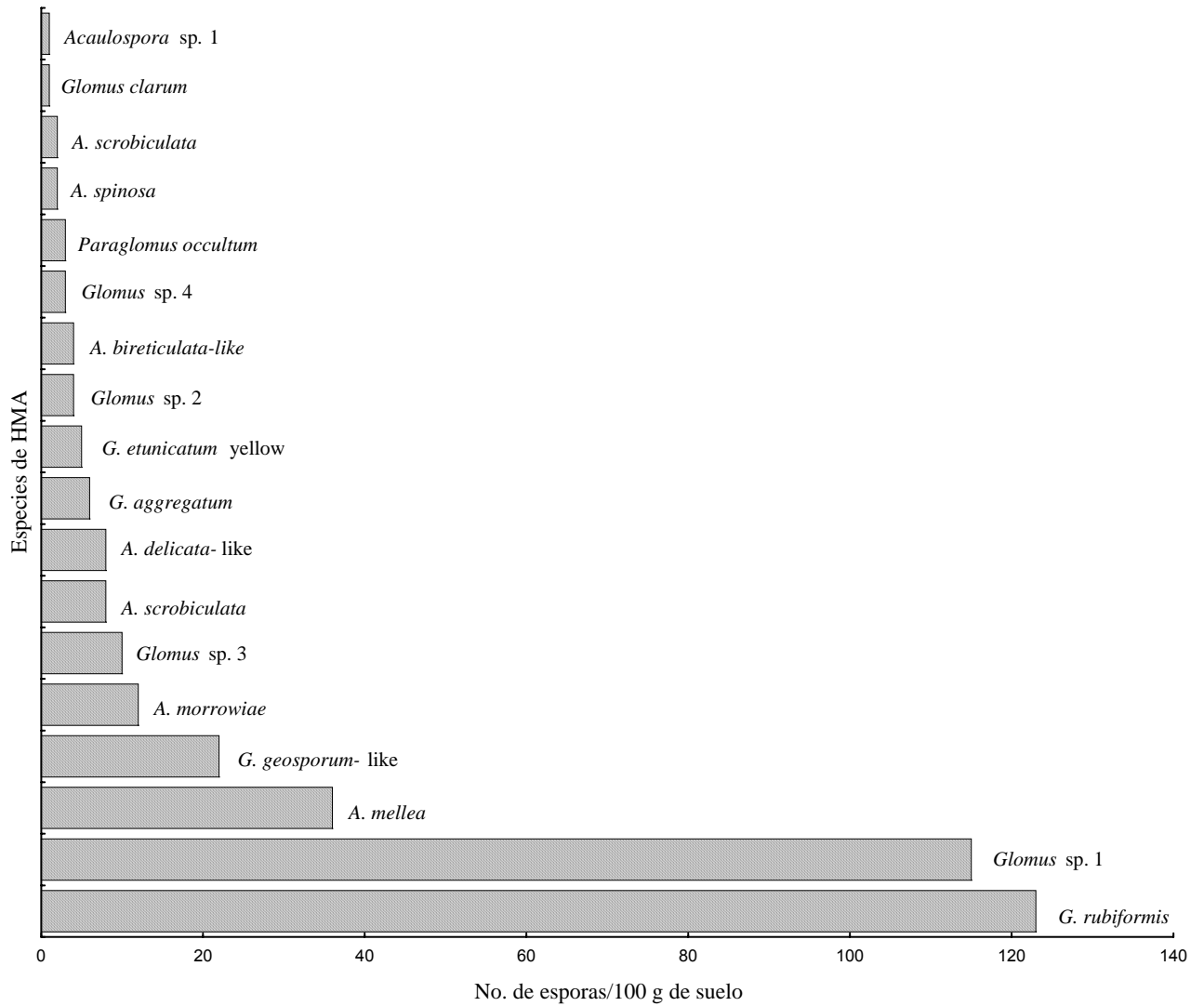
Tabla 5.

<b>Factores</b>	<b>pH</b>	<b>M.O.</b>	<b>P</b>	<b>K</b>	<b>Ca</b>	<b>Mg</b>	<b>Al</b>
Riqueza	-0.11	0.46*	-0.24	0.16	-0.07	-0.14	0.03
Diversidad ( <i>sensu</i> Whitaker)	0.07	0.60*	-0.04	-0.007	0.37	-0.03	0.08
Shannon-Wiener	-0.05	0.73*	-0.09	0.097	0.19	-0.17	0.11
Simpson	-0.07	0.75*	-0.07	0.14	0.18	-0.18	0.12
% Colonización Micorrízica	-0.37	0.16	-0.23	0.27	-0.61	-0.37	0.18
No. de Esporas/g de suelo	-0.12	0.08	0.00	-0.05	-0.04	0.19	0.27

\* Significativo a  $p < 0.05$

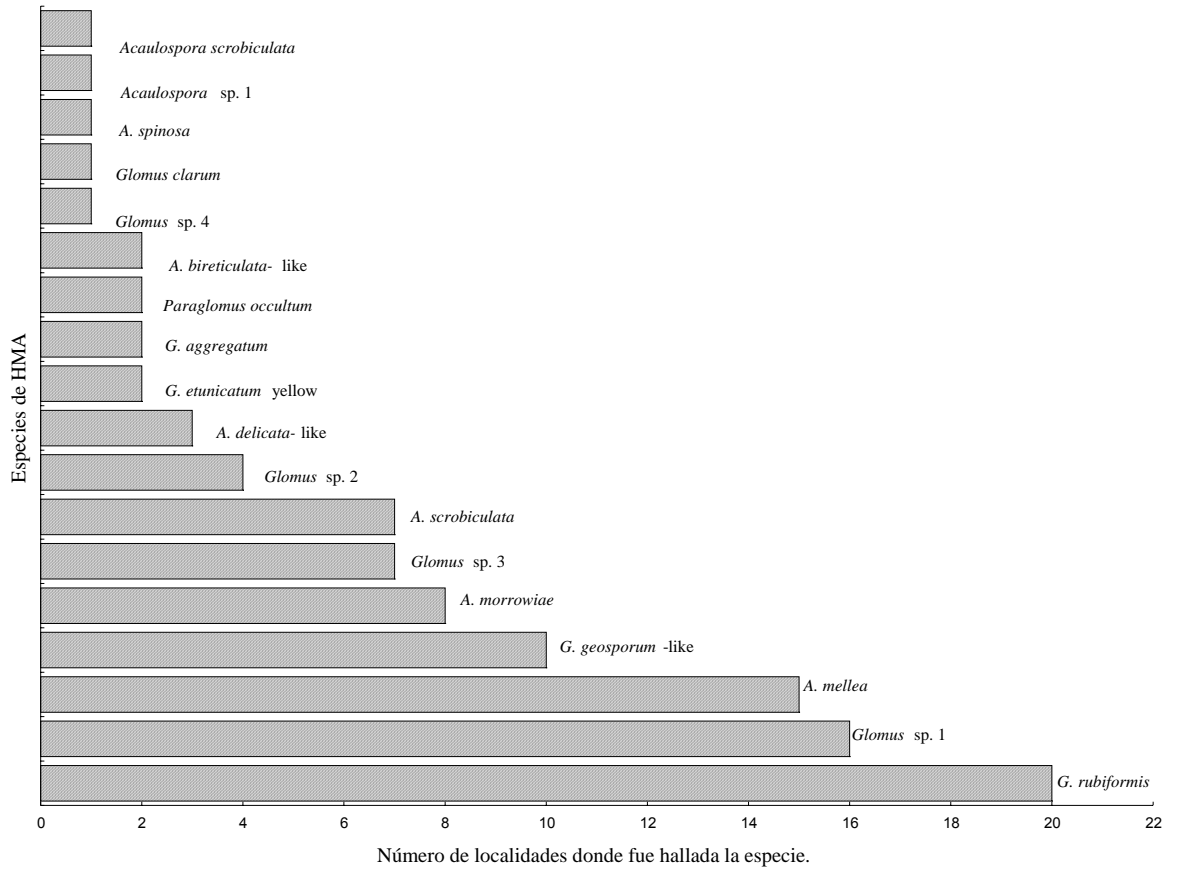
Fuente: Autor

Figura 1.



Fuente: Autor

Figura 2.



Fuente: Autor

## RESUMEN

**TITULO:** ASOCIACIÓN SIMBIÓTICA ENTRE HONGOS FORMADORES DE MICORRIZAS Y PLÁNTULAS DE *Theobroma cacao* ESTIMULADA CON LA APLICACIÓN DEL ISOFLAVONOIDE FORMONONETINA. SEGUNDA PARTE: EFECTO DE LA FORMONONETINA SOBRE LA SIMBIOSIS MICORRÍZICA Y EL CRECIMIENTO DE *Theobroma cacao* EN FASE DE VIVERO\*

**AUTOR:** DIANA GICELA BLANCO VEGA\*\*

**PALABRAS CLAVES:** Hongos micorrízicos arbusculares (HMA), *Theobroma cacao*, isoflavonoide, formononetina, nativo.

### DESCRIPCIÓN:

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del isoflavonoide formononetina sobre la simbiosis micorrízica y el crecimiento de *Theobroma cacao* en fase de vivero. En el experimento se utilizó un inóculo nativo, un inóculo foráneo y un inóculo mixto, la mezcla del inóculo nativo y el foráneo, con y sin aplicación del isoflavonoide formononetina. Se realizaron tres muestreos destructivos a los 20, 65 y 103 días después del trasplante. La formononetina estimuló levemente el porcentaje de colonización de HMA nativos en la etapa temprana del proceso de colonización. La biomasa total acumulada por las plantas de *T. cacao* no fue afectada por la aplicación del isoflavonoide. Al final del experimento, la formononetina presentó una tendencia mantener el nivel de colonización en raíces ya micorrizadas, sugiriendo un papel de este isoflavonoide en la regulación de la simbiosis que favorece los beneficios netos para la planta. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la efectividad de un inóculo micorrízico y el establecimiento de la simbiosis se da en respuesta a las estrategias ecológicas de las especies fúngicas que componen el inóculo, al nivel de nutrientes del suelo y posiblemente al intercambio de señales entre el hongo y su hospedero.

---

\* Trabajo de Grado

\*\* Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Director Nelson Rodríguez López.

## ABSTRACT

**TITLE:** SYMBIOTIC ASSOCIATION BETWEEN MYCORRHIZAL FUNGI AND PLANTS OF *Theobroma cacao* ESTIMULATED WITH ISOFLAVONOIDE FORMONONETIN. SECOND PART: EFFECT OF THE FORMONONETIN ON MYCORRHIZAL SYMBIOSIS AND THE GROWTH OF *Theobroma cacao* UNDER NURSERY CONDITIONS\*

**AUTHOR:** DIANA GICELA BLANCO VEGA \*\*

**KEY WORDS:** Arbuscular mycorrhizal fungi, *Theobroma cacao*, flavonoid, formononetin, indigenous

### DESCRIPTION

The aim of this work was to determine the effect of the isoflavonoid formononetin in the establishment of the symbiosis between HMA and plants of *Theobroma cacao* under nursery conditions. In the experiment an indigenous inoculum was used with species of the genus *Glomus*, *Acaulospora* and *Paraglomus* isolated to the rhizosphere *T. cacao*. A foreign inoculum and the mixed inoculum, combination of indigenous inoculum and foreign inoculum with and without application of the isoflavonoid formononetin. They were carried out three destructive samplings to the 20, 65 and 103 days after inoculation. The colonization percentage was observed and it was determined the dry biomass of the organs and the total biomass of the plant. The formononetin stimulated the percentage of colonization of indigenous HMA slightly in early stage of the colonization process. The total biomass accumulated by the plants of *T. cacao* was not affected by the application of the isoflavonoid. At the end of the experiment, the formononetin showed a tendency to maintain the colonization level in roots with mycorrhizal, this suggested a role of this isoflavonoid in the regulation of the symbiosis that favors the net profits for the plant. The results obtained in this work indicate that the effectiveness of the mycorrhizal inoculum and the establishment of the symbiosis is given as an answer to the ecological strategies of the fungical species that compose the inoculum, to the nutrients concentration of the soil. This also could be possible to the exchange of signs between the fungi and its host.

---

\* Work of Degree

\*\* Faculty of Sciences, Biology School, Director, Nelson Rodríguez López.

## **Parte 2. EFECTO DE LA FORMONONETINA SOBRE LA SIMBIOSIS MICORRÍZICA Y EL CRECIMIENTO DE *Theobroma cacao* EN FASE DE VIVERO**

### **INTRODUCCIÓN**

Las micorrizas son asociaciones simbióticas que se establecen entre las raíces de la mayoría de las plantas y hongos del orden Glomales. Una mejora en el nivel nutricional tanto del hongo como de la planta es el principal fundamento de esta relación; no obstante, otros beneficios que la micorriza le reporta a la planta han sido ampliamente estudiados (Quilambo 2003).

De otro lado, los exudados de la raíz juegan un papel como mensajeros en la comunidad de microorganismos que habita la rizósfera (Whipps 2001, Dakora & Phillips 2002, Walker *et al.* 2003). El contacto de los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) con la raíz despliega una respuesta de defensa inicial. Sin embargo, esta respuesta parece ser suprimida para dar lugar a la formación de la micorriza, sugiriendo procesos coevolutivos en el desarrollo de la simbiosis (Gadkar 2001). Por consiguiente, el establecimiento de la asociación es el resultado de un proceso de múltiples pasos que incluyen un intercambio de moléculas estimulantes entre el hongo y su hospedero (Larose *et al.* 2002, Vierheilig 2004a).

En plantas con bajo nivel de P, diferentes tipos de exudados provenientes de la raíz han estimulado la germinación de esporas y el crecimiento hifal de algunas especies de HMA en experimentos *in vitro* (Elias & Safir 1987, Tsai & Phillips 1991, Nair *et al.* 1991). Por el contrario, cuando el nivel de P aumenta se ha observado una inhibición de la colonización fúngica (Elias & Safir 1987, Tawaraya *et al.* 1998, Cornwell *et al.* 2001).

Una de las moléculas presente en los exudados de la raíz es el isoflavonoide formononetina (7-Hidroxi 4'-Metoxi-isoflavona) aislado de raíces de trébol sometidas a estrés por baja disponibilidad de P en el suelo. Esa molécula aumentó el crecimiento y colonización de la raíz por HMA en experimentos *in vitro* (Nair *et al.* 1991). Volpin *et al.* (1995), observaron un incremento de los isoflavonoides formononetina y biochanina A en raíces de alfalfa micorrizadas con *Glomus intraradices*. Por esta razón, se ha sugerido que la formononetina puede facilitar la interacción hongo-planta, aumentando los puntos de entrada de los HMA en la raíz (Da Silva-Junior & Siqueira 1997). Sin embargo, Davies *et al.* (2005) indicaron que la formononetina no afectó la colonización en raíces de *Solanum tuberosum* L. Por consiguiente, existe amplia discusión acerca del papel de este isoflavonoide y de cómo se regulan las señales, para que la raíz suprima la respuesta de defensa y se haga susceptible a los HMA (Volpin *et al.* 1995, Gadkar *et al.* 2001, Scervino *et al.* 2005a).

Los HMA tienen el potencial para afectar la biomasa de las plantas e influir en la diversidad del ecosistema (van der Heijden *et al.* 1998a, Klironomos 2000). Teniendo en cuenta que *Theobroma cacao* L. (Sterculiaceae) es una especie de importancia económica y amplio desarrollo en Colombia, el uso de HMA como biofertilizante constituye una alternativa para reducir la aplicación de fertilizantes.

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del isoflavonoide formononetina en el establecimiento de la simbiosis micorrízica arbuscular y el crecimiento de *T. cacao* en condiciones de vivero.

## 1. MATERIALES Y MÉTODOS

### Localización del experimento

Este trabajo se llevó a cabo en la granja experimental Guatiguará de la Universidad Industrial de Santander, ubicada en el municipio de Piedecuesta, Santander Colombia.

### Material vegetal y fúngico

La especie vegetal utilizada en este trabajo fue *Theobroma cacao* material genético IMC-67. Las semillas de *T. cacao* fueron germinadas en semillero y luego de 20 días fueron transplantadas a bolsas de polietileno negro de 4 Kg de capacidad. El suelo utilizado fue previamente esterilizado con Basamid a la dosis recomendada ( $60 \text{ g/m}^2$ ).

Se utilizaron dos inóculos de micorrizas compuestos de suelo con fragmentos de raíces, hifas y esporas (Tabla 1). El inóculo nativo fue aislado de las principales zonas cacaoteras del departamento de Santander (El Carmen, El Playón, Landázuri, Ríonegro y San Vicente de Chucurí) (Blanco-Vega *et al.* com. pers.) y el inóculo foráneo fue suministrado por Fungifert Oriente Colombiano Ltda.<sup>®</sup>

### Análisis de suelos

Los métodos utilizados para el análisis físico-químico de los suelos, tanto al inicio como al final del experimento, fueron los siguientes: El pH del suelo de la rizósfera fue medido después de dilución con agua destilada (1:1 v/v). La materia orgánica fue determinada por el método colorimétrico de Walkley Black  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7\text{-H}_2\text{SO}_4$  (Jackson 1976). El fósforo disponible fue determinado por el método de Bray II. HCL 0.1 N-NH<sub>4</sub>F 0.03 N. Los cationes intercambiables (K, Ca, Mg, Na) fueron extraídos con acetato de amonio

(Thomas 1982) y determinados mediante espectrofotometría de absorción atómica. El aluminio intercambiable mediante extracción con KCl y la textura fue determinada por el método de Bouyoucous (Day 1965). El suelo utilizado para este trabajo contenía un pH de 6.5; 1.32% de materia orgánica, 19 ppm de P; 0.12, 2.2 y 0.46 meq/100 g de suelo de K, Ca y Mg respectivamente y 0% de Al. El suelo presentaba una textura franco-arenosa.

#### Diseño experimental

Los tratamientos fueron los siguientes: C: control, N: inóculo nativo, F: inóculo foráneo, M: inóculo mixto (inóculo nativo + inóculo foráneo), Fm+N: formononetina + inóculo nativo, Fm+F: formononetina + inóculo foráneo, Fm+M: formononetina + inóculo mixto y Fm: formononetina. Cada tratamiento consistió de quince unidades experimentales para un total de 120 plantas.

#### Inoculación y aplicación de formononetina

En el momento del trasplante y según el tratamiento correspondiente se colocó alrededor de las raicillas de cada plántula, 25 g de inóculo nativo (32 esporas/g), 25 g de inóculo foráneo (34 esporas/g) y 12.5 g de cada uno para el inóculo mixto. Los tratamientos con formononetina recibieron dos aplicaciones de 100 ml de Myconate ( $0.5\text{gL}^{-1}$ ) cada una, a los ocho y 30 días después del trasplante. El Myconate (VAMTech.<sup>®</sup> L.L.C., Lansing, MI, USA) es una forma soluble en agua del isoflavonoide formononetina (7-Hidroxi 4'-Metoxi-isoflavona), inocua para el ambiente. Las plántulas fueron ubicadas bajo polisombra del 70% de reducción de la radiación solar de acuerdo a los requerimientos de esta especie en esta etapa de su ciclo vegetativo. La temperatura bajo polisombra fue registrada. La temperatura máxima y mínima promedio fue de 32° y 17° C respectivamente. Las plantas fueron fertilizadas cada diez días con solución nutritiva de Hoagland modificada, el P fue reducido a media fuerza.

### Muestreos y variables medidas

Se realizaron tres muestreos destructivos, a los 20, 65 y 103 días después del transplante (ddt), tomando cinco plántulas por tratamiento. El área foliar fue estimada con el software Compu Eye, Leaf & Symptom Area (Bakr 2005). El material vegetal fue secado en estufa de ventilación forzada a 80°C por 72 h y luego se pesó para determinar la biomasa de cada uno de los órganos. Con los datos de biomasa de cada uno de los órganos y el área foliar se estimó la tasa de crecimiento relativa (RGR) y la tasa de asimilación neta (TAN) para el intervalo de muestreo 20 a 65 ddt y para el intervalo 65 a 103 ddt (Evans 1972).

### Colonización micorrízica

Antes del secado, se tomó una submuestra de raíz por planta, la cual fue clareada con KOH al 10% y coloreada con azul de tripán siguiendo la metodología de Phillips & Hayman (1970). Diez segmentos de raíz (< 3 mm de diámetro) de 1 cm de longitud por planta fueron montados sobre placa portaobjetos, luego diez campos por segmento fueron observados al microscopio, para el reconocimiento de estructuras de HMA. El porcentaje de colonización se obtuvo del número de campos positivos (presencia de arbusculos, vesículas, esporas o hifas) sobre el número de campos totales multiplicado por cien.

### Aislamiento de esporas

Al momento del muestreo, se tomaron 10 g del suelo que se encontraba en contacto con la raíz para cada una de las plantas. Las muestras fueron procesadas para el aislamiento de esporas siguiendo el método de tamizaje (500 $\mu$  y 38 $\mu$ ) y centrifugación con sacarosa descrito por Gerdermann & Nicolson (1963). Las esporas fueron cuantificadas usando microscopio estereoscopio.

### Análisis estadístico

Los datos de biomasa total, colonización micorrízica y número de esporas de HMA fueron analizados para cada muestreo de forma independiente, mediante una prueba de varianzas de una vía ANOVA seguida por el test de Duncan ( $P < 0.05$ ) o en su defecto, con una prueba de Kruskal-Wallis seguida por una comparación múltiple no-paramétrica (Zar 1999). Se realizó una prueba de t de Student, tanto para el RGR como para el TAN, entre el intervalo uno y el intervalo dos de los muestreos.

## 2. RESULTADOS

El isoflavonoide formononetina estimuló el establecimiento de la simbiosis micorrízica después de 20 días de realizada la inoculación con HMA nativos, sin embargo, las diferencias entre los tratamientos no fueron significativas.

La acumulación de biomasa total (Figura 1a) y el porcentaje de colonización micorrízica (Figura 2a) de las plántulas de *T. cacao* en el primer muestreo, no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos. No obstante, independiente del inóculo de HMA utilizado, los tratamientos con adición de formononetina presentaron los valores más altos tanto para la acumulación de biomasa total como para el porcentaje de colonización. El número de esporas aisladas del suelo fue diferente estadísticamente en los tratamientos F y Fm +M con respecto al tratamiento control (Figura 2d).

En el segundo muestreo, se observó que el tratamiento Fm + N tuvo un aumento significativo en biomasa (Figura 1b). El porcentaje de colonización fue diferente estadísticamente en los tratamientos N y Fm + N con respecto al control (Figura 2b). Por otra parte, el número de esporas de HMA aisladas del suelo fue variable, siendo los tratamientos Fm + F y Fm + M los que presentaron los valores más altos (Figura 2e).

No se observaron diferencias significativas de biomasa al final del experimento, sin embargo, los valores fueron más altos comparados con el tratamiento control (Figura 1c). El porcentaje de colonización aumentó en todos los tratamientos con respecto a los muestreos anteriores y las plantas de *T. cacao* sometidas a tratamiento con inóculo nativo alcanzaron hasta un 100% de colonización (Figura 2c). Un alto número de esporas fueron aisladas en los tratamientos F, Fm + M y C con respecto al segundo muestreo,

mientras que en los demás tratamientos disminuyó el número de esporas (Figura 2f).

Con respecto al crecimiento de *T. cacao* en el primer intervalo de tiempo (20-65 ddt), se observó que tanto el RGR como el TAN de los tratamientos N y Fm + N aumentaron con respecto al control; mientras que en el segundo intervalo (65-103 ddt) estos mismos tratamientos presentaron valores más bajos comparados con el tratamiento control (Tabla 2). Al comparar los dos intervalos de tiempo para cada uno de los tratamientos, el RGR fue diferente estadísticamente en los tratamientos F ( $p=0.01$ ), Fm + F ( $p=0.02$ ) y Fm + M ( $p=0.03$ ), mientras que el TAN solo fue diferente estadísticamente en el tratamiento F ( $p=0.04$ ).

El análisis de suelo realizado al final del experimento se reporta en la tabla 3.

### 3. DISCUSIÓN

La leve tendencia de la formononetina a estimular la colonización micorrízica total de HMA nativos, en el primer muestreo, puede ser el resultado de un efecto de este isoflavonoide sobre el crecimiento hifal y la esporulación de las especies nativas, las cuales se encuentran adaptadas a las condiciones presentes en la rizósfera de *T. cacao*. Estos resultados indican cierta especificidad del flavonoide y el género o especie de HMA (Scervino *et al.* 2005b,c).

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren, que la formononetina puede estimular el proceso de colonización con HMA nativos en etapas tempranas, en donde puede estar asociada a la supresión de la respuesta de defensa desplegada por la planta. Resultados similares han sido reportados por Fries *et al.* (1996), Da Silva-Junior & Siqueira (1997) y Larose *et al.* (2002). Por lo tanto, los resultados de este trabajo se suman a reportes en los cuales se ha observado que el papel de un determinado flavonoide varía según la etapa en que se encuentre el proceso de simbiosis (Akiyama *et al.* 2002, Larose *et al.* 2002, Scervino *et al.* 2005c).

Es posible que la concentración utilizada del isoflavonoide haya sido insuficiente para disparar un efecto significativo sobre la colonización. A pesar de que en este trabajo se utilizó una concentración de Myconate mayor a la utilizada por Davies *et al.* (2005) a plantas *Solanum tuberosum* L. Por su parte, el nivel de P presente en el suelo también pudo haber influido en un menor grado de estimulación de la formononetina, coincidiendo con los reportes de Da Silva-Junior & Siqueira (1997) y Vierheilig (2004a).

Por otra parte, la formononetina presentó una tendencia a mantener el nivel de colonización en raíces ya micorrizadas en el último muestreo. Esto coincide con el papel autorregulador que se le ha atribuido a este isoflavonoide (Pinior *et al.* 1999, Larose *et al.* 2002, Flores-Aylas *et al.* 2003, Vierheilig 2004b); sugiriendo que la planta mediante sus exudados, puede controlar en algún grado la colonización de la raíz (Cornwell *et al.* 2001). Cuando la simbiosis no está siendo regulada, es posible que el tejido fúngico libere señales que varíen el patrón de acumulación de flavonoides en la raíz de la planta; esto tiene gran impacto en el crecimiento de la misma, debido a que el aumento en la colonización, también representa un aumento en el drenaje de carbono desde el hospedero.

La formononetina no afectó la biomasa de las plantas de *T. cacao* coincidiendo con lo reportado por Da Silva-Junior & Siqueira (1997) y Flores-Aylas *et al.* (2003). En condiciones de vivero, las estrategias ecológicas desplegadas tanto por las especies del inóculo nativo como por las del inóculo foráneo, pueden influir en los beneficios netos que la asociación le reporta a la planta (Hart & Reader 2002); debido a que la demanda de carbono (4 a 20%) por parte de los colonizadores lentos en el establecimiento de la simbiosis, se mantiene por un tiempo mayor ((Bago *et al.* 2000, Klironomos 2000), lo cual causa una depresión en el crecimiento y una disminución en la biomasa de la planta (Dunham *et al.* 2003).

Resultados similares a los observados en este trabajo, han sido encontrados en condiciones de invernadero, en donde la respuesta de las plantas a la colonización por HMA se acerca al parasitismo, con una disminución en el crecimiento y la biomasa seca (Dunham *et al.* 2003, Klironomos 2003, Sena *et al.* 2004). La falta de un aumento significativo en la biomasa de la planta, puede estar ligada a las condiciones que se presentan cuando un estudio se hace a escala espacial y temporal reducida, en donde las interacciones

típicamente mutualistas se presentan como comensales o parasíticas (Johnson *et al.* 1997). Sin embargo, se observó colonización micorrízica en plantas de *T. cacao* creciendo en suelos con alta disponibilidad de nutrientes en condiciones de campo (Blanco *et al.* com. per.), lo cual plantea que una relación parasítica no sólo se observa en fase de vivero, sino que también puede ser frecuente en suelos agrícolas que han sido fertilizados.

Los resultados observados en los análisis de RGR y TAN reflejan las diferentes estrategias de colonización y los costos que implica el establecimiento de la simbiosis, coincidiendo con Schroeder & Janos (2004), quienes reportaron una disminución del RGR después de un mes de la inoculación con micorrizas arbusculares y un incremento del RGR en el segundo mes.

Por otra parte, las plantas de *T. cacao* presentaron una respuesta diferente según el inóculo utilizado, coincidiendo con lo reportado por Kiers *et al.* (2000), sugiriendo que el efecto de la micorriza en el crecimiento de la planta, está influenciado por el genotipo de la planta con la cual está asociada (Klironomos 2003). Con el inóculo nativo se observó un establecimiento más temprano de la simbiosis y un alto porcentaje de colonización de las raíces, mientras que la simbiosis con hongos foráneos fue tardía. Aunque los inóculos mixtos se han reportado como efectivos para ecosistemas agrícolas por producir respuestas aditivas (Davies *et al.* 2005), el uso de un inóculo mixto en este trabajo no representó ventajas debido posiblemente a competencia interespecífica por el acceso a la fuente de carbono.

Teniendo en cuenta que una planta hospedera puede beneficiarse en diferentes grados según la especie de HMA presente en el suelo (van der Heijden *et al.* 1998a b, Cornwell *et al.* 2001), el uso de un inóculo nativo parece una mejor alternativa que el manejo de un inóculo foráneo o comercial,

debido a que la comunidad de hongos aislada de plantaciones de *T. cacao* se encuentra adaptada a las condiciones presentes en la rizósfera, lo cual indica algún grado de especificidad entre la planta y los HMA, resultados similares también han sido reportados por Stürmer (2004).

La densidad de esporas aisladas del suelo fue variable entre los tratamientos y a lo largo del tiempo, al igual que lo observado por Cuenca *et al.* (2003). Contrario a lo reportado por Davies *et al.* (2005), la formononetina no influyó en la tasa de esporulación, sin embargo, las diferencias pueden ser atribuidas a las especies de HMA que componen cada tipo de inóculo y al material genético de la planta hospedera.

De acuerdo con los resultados obtenidos de la asociación entre HMA y las raíces de *T. cacao* material genético IMC-67, podemos concluir que la efectividad de un inóculo micorrízico y el establecimiento de la simbiosis se da en respuesta a las estrategias ecológicas de las especies fúngicas que componen el inóculo, el nivel de nutrientes del suelo y posiblemente al complejo intercambio de señales entre el hongo y su hospedero, que permiten la regulación del proceso.

Se hace necesario determinar la respuesta de diferentes materiales genéticos de *T. cacao* a diferentes especies de HMA, con el fin de conocer cuáles especies pueden generar los mayores beneficios, así como evaluar, mediante técnicas moleculares, el papel de la formononetina en el establecimiento de la simbiosis micorrízica arbuscular.

#### **4. AGRADECIMIENTOS**

Agradecemos a Fungifert Oriente Colombiano Ltda. y al Servicio Nacional de Aprendizaje (SENA) por el soporte económico de este trabajo. A la Escuela de Biología de la Universidad Industrial de Santander. A la Federación Nacional de Cacaoteros (FEDECACAO). Al Laboratorio Químico de Suelos de la Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural del Departamento de Santander. A Milena Hernández y Libia Gutiérrez por su colaboración técnica.

## LITERATURA CITADA

- AKIYAMA, K., H. MATSUOKA & H. HAYASHI. 2002. Isolation and identification of a phosphate deficiency-induced C-Glycosylflavonoid that stimulates arbuscular mycorrhiza formation in melon roots. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15: 334-340.
- BAGO, B., P.E. PFEFFER & Y. SHACHAR-HILL. 2000. Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiology* 124: 949-957.
- BARK, E.M. 2005. A new software for measuring leaf area, and area damaged by *Tetranychus urticae* Koch. *Journal of Applied Entomology* 129: 173-175.
- BAPTISTA, M.J. & J.O. SIQUEIRA. 1994. Efeito de flavonóides na germinação de esporos e no crescimento assimbiótico do fungo micorrízico arbuscular *Gigaspora gigantea*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 6: 127-134.
- CORNWELL, W.K., B.L. BEDFORD & C.T. CHAPIN. 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., Z. DE ANDRADE, M. LOVERA, L. FAJARDO, E. MENESES, M. MÁRQUEZ & R. MACHUCA. 2003. Pre-selección de plantas nativas y producción de inóculos de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) de relevancia en la rehabilitación de áreas degradadas de La Gran Sabana, Estado Bolívar, Venezuela. *Ecotropicos* 16: 27-40.
- DA SILVA-JUNIOR, J.P. & J.O. SIQUEIRA. 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.
- DAKORA, F.D. & D.A. PHILLIPS. 2002. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant and Soil* 245: 35-47.
- DAVIES JR., F.T., C.M. CALDERÓN, Z. HUAMAN & R. GÓMEZ. 2005. Influence of a flavonoid (formononetin) on mycorrhizal activity and potato crop productivity in the highlands of Peru. *Scientia Horticulturae* 106: 318-329.

- DAY, P.R. 1965. Particle fractionation and particle size analysis. Págs.45-78 en: *Black CA (Ed.) Methods of Soil Analysis*. Part 1. Agronomy. ASA-SSSA. Madison. Wisconsin. USA.
- DUNHAM, R.M., A.M. RAY & R.S. INOUE. 2003. Growth, physiology, and chemistry of mycorrhizal and nonmycorrhizal *Typha latifolia* seedlings. *Wetlands* 23: 890–896.
- ELIAS, K.S. & G.R. SAFIR. 1987. Hyphal Elongation of *Glomus fasciculatus* in response to root exudates. *Applied and Environmental Microbiology* 53: 1928-1933.
- EVANS, G. 1972. The quantitative analysis of plant growth. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 237-254.
- FLORES-AYLAS, W.W., O.J. SAGGIN-JÚNIOR, J.O. SIQUEIRA & A.C. DAVIDE. 2003. Efeito de *Glomus etunicatum* e fósforo no crescimento inicial de espécies arbóreas em semeadura direta. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 38: 257-266.
- FRIES, L.L.M., R.S. PACOVSKY & G.R. SAFIR. 1996. Expression of isoenzymes altered by both *Glomus intraradices* colonization and formononetin application in corn (*Zea mays* L.) roots. *Soil Biology & Biochemistry* 28: 981-988.
- GADKAR, V., R. DAVID-SCHWARTZ, T. KUNIK & Y. KAPULNIK. 2001. Arbuscular mycorrhizal fungal colonization. Factors involved in host recognition. *Plant Physiology* 127: 1493-1499.
- GARCÍA-GARRIDO, J.M. & J.A. OCAMPO. 2002. Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Journal of Experimental Botany* 53: 1377-1386.
- GERDERMANN, J.W. & T.H. NICOLSON. 1963. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society*. 46: 235-244.

- HART, M.M. & R.J. READER. 2002. Taxonomic basis for variation in the colonization strategy of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 153: 335-344.
- JACKSON, M.L. 1976. *Análisis Químico del Suelo*. Editorial Omega, Barcelona.
- JOHNSON, N.C., J.H. GRAHAM & F.A. SMITH. 1997. Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytologist* 135: 575-585.
- KIERS, E.T., C.E. LOVELOCK, E.L. KRUEGER & E.A. HERRE. 2000. Differential effects of tropical arbuscular mycorrhizal fungal inocula on root colonization and tree seedling growth: Implications for tropical forest diversity. *Ecology Letters* 3: 106-113.
- KLIRONOMOS, J.N., J. MCCUNE, M. HART & J. NEVILLE. 2000. The influence of arbuscular mycorrhizae on the relationship between plant diversity and productivity. *Ecology Letters* 3: 137-141.
- KLIRONOMOS, J.N. 2003. Variation in plant response to native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecology* 84: 2292-2301.
- LAROSE, G., R. CHÉNEVERT, P. MOUTOGLIS, S. GAGNÉ, Y. PICHÉ & H. VIERHEILIG. 2002. Flavonoid levels in roots of *Medicago sativa* are modulated by the developmental stage of the symbiosis and the root colonizing arbuscular mycorrhizal fungus. *Journal of Plant Physiology* 159: 1329-1339.
- NAIR, M.G., G.R. SAFIR & J.O. SIQUEIRA. 1991. Isolation and identification of vesicular-arbuscular mycorrhiza-stimulatory compounds from clover (*Trifolium repens*) roots. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 434-439.
- PHILLIPS, J.M. & D.S. HAYMAN. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55: 158-161.

- PINIOR, A., U. WYSS, Y. PICHÉ & H. VIERHEILIG. 1999. Plants colonized by AM fungi regulate further root colonization by AM fungi through altered root exudation. *Canadian Journal of Botany* 77: 891-897.
- QUILAMBO, O.A. 2003. The vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *African Journal of Biotechnology* 2: 539-546.
- SCERVINO, J.M., M.A. PONCE, R. ERRA-BASSELLS, H. VIERHEILIG, J.A. OCAMPO & A. GODEAS. 2005a. Arbuscular mycorrhizal colonization of tomato by *Gigaspora* and *Glomus* species in the presence of root flavonoids. *Journal of Plant Physiology* 162: 625-633.
- SCERVINO, J.M., M.A. PONCE, R. ERRA-BASSELLS, H. VIERHEILIG, J.A. OCAMPO, & A. GODEAS. 2005b. Flavonoids exhibit fungal species and genus specific effects on the presymbiotic growth of *Gigaspora* and *Glomus*. *Mycological Research* 109: 789-794.
- SCERVINO, J.M., M.A. PONCE, R. ERRA-BASSELLS, H. VIERHEILIG, J.A. OCAMPO, & A. GODEAS. 2005c. Flavonoids exclusively present in mycorrhizal roots of white clover exhibit a different effect on arbuscular mycorrhizal fungi than flavonoids exclusively present in non-mycorrhizal roots of white clover. *Journal of Plant Interactions* 1: 15-22.
- SCHROEDER, M.S. & D.P. JANOS. 2004. Phosphorus and intraspecific density alter plant responses to arbuscular mycorrhizas. *Plant and Soil* 264: 335-348.
- SENA, J.O.A., C.A. LABATE & E.J.B.N. CARDOSO. 2004. Caracterização fisiológica da redução de crescimento de mudas de citros micorrizadas em altas doses de fósforo. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo* 28: 827-832.
- STÜRMER, S.L. 2004. Efeito de diferentes isolados fúngicos de mesma comunidade micorrízica no crescimento e absorção de fósforo em soja e trevo vermelho. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo* 28: 611-622.
- TAWARAYA, K., K. HASHIMOTO & T. WAGATSUMA. 1998. Effect of root exudate fractions from P-deficient and P-sufficient onion plants on root colonisation by the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *Mycorrhiza* 8: 67-70.

- TSAI S.M. & D.A.PHILLIPS. 1991. Flavonoids released naturally from alfalfa promote development of symbiosis *Glomus* spores in vitro. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 1485-1488.
- THOMAS, G.W. 1982. Exchangeable cations. Págs. 159-165 en *Methods of Soil Analysis*. Part 2. Chemical and Microbiological Properties. Agronomy Monograph No. 9. 2nd Edition.
- VAN DER HEIJDEN, M.G.A., T. BOLLER, A. WIEMKEN & I.R. SANDERS. 1998a. Different arbuscular mycorrhizal fungal species are potential determinants of plant community structure. *Ecology* 79: 2082-2091.
- VAN DER HEIJDEN, M.G.A., J.N. KLIRONOMOS, M. URSIC, P. MOUTOGLIS, R. STREITWOLF-ENGEL, T. BOLLER, A. WIEMKEN & I.R. SANDERS. 1998b. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396: 69-72.
- VIERHEILIG, H. 2004a. Regulatory mechanisms during the plant-arbuscular mycorrhizal fungus interaction. *Canadian Journal of Botany* 82: 1166-1176.
- VIERHEILIG, H. 2004b. Further root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi in already mycorrhizal plants is suppressed after a critical level of root colonization. *Journal of Plant Physiology* 161: 339-341.
- VOLPIN, H., D.A. PHILLIPS, Y. OKON & Y. KAPULNIK. 1995. Suppression of an isoflavonoid phytoalexin defense response in mycorrhizal alfalfa roots. *Plant Physiology* 108: 1449-1454.
- WALKER, T.S., H.P. BAIS, E. GROTEWOLD & J.M. VIVANCO. 2003. Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiology* 132: 44-51.
- WHIPPS, J.M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 52: 487-511.
- ZAR, J.H. 1999. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, New Jersey.

Tabla 1.

---

Inóculo Nativo

---

1. *Glomus aggregatum* Schenck & Smith
2. *Glomus clarum* Nicol. & Schenck
3. *Glomus etunicatum yellow* Becker & Gerdemann
4. *Glomus geosporum*(Nicol. & Gerd.) Walker
5. *Glomus rubiformis* (Gerd. & Trappe) Almeida & Schenck
6. *Glomus* sp1 Tulasne & Tulasne
7. *Glomus* sp.2 Tulasne & Tulasne
8. *Glomus* sp.3 Tulasne & Tulasne
9. *Glomus* sp.4 Tulasne & Tulasne
10. *Acaulospora mellea* Spain & Schenck
11. *Acaulospora morrowiae* Spain & Schenck
12. *Acaulospora scrobiculata* Trappe
13. *Acaulospora spinosa* Walker & Trappe
12. *Acaulospora* sp.1 Gerd. & Trappe emend. Berch
13. *Acaulospora* sp.2 Gerd. & Trappe emend. Berch
14. *Acaulospora* sp.3 Gerd. & Trappe emend. Berch
15. *Acaulospora* sp.4 Gerd. & Trappe emend. Berch
16. *Paraglomus occultum* (Walker) Morton & Redecker

Inóculo Foráneo

1. *Glomus manihotis* Howeler, Sieverding & Schenck
  2. *Acaulospora mellea* Spain & Schenck
  3. *Entrophospora colombiana* Spain & Schenck
- 

Fuente: Autor

Tabla 2.

Tratamiento	RGR			TAN		
	Día 20-65	Día 65-103	<i>P</i>	Día 20-65	Día 65-103	<i>P</i>
C	20±7 <sup>z</sup>	25±7	0.25	0.7±0.2 <sup>z</sup>	0.7±0.2	0.88
N	25±6	24±7	0.91	1±0.6	0.7±0.2	0.30
F	17±7	31±6	0.01*	0.7±0.2	1±0.2	0.04*
M	22±7	29±5	0.11	0.8±0.2	0.8±0.2	0.93
Fm+N	23±2	20±8	0.40	0.9±0.3	0.6±0.3	0.17
Fm+F	17±6	28±5	0.02*	0.7±0.4	0.7±0.1	0.78
Fm+M	19±6	30±7	0.03*	0.7±0.2	0.9±0.3	0.28
Fm	24±6	20±4	0.15	0.9±0.3	0.6±0.1	0.13

<sup>z</sup>Media (±S.D.)n =5.

\* Significativo a  
P<0.05

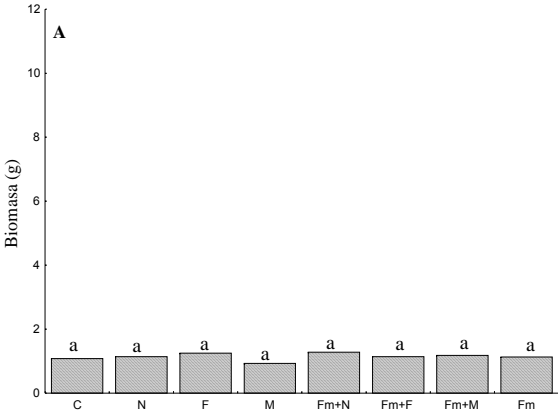
Fuente: Autor

Tabla 3.

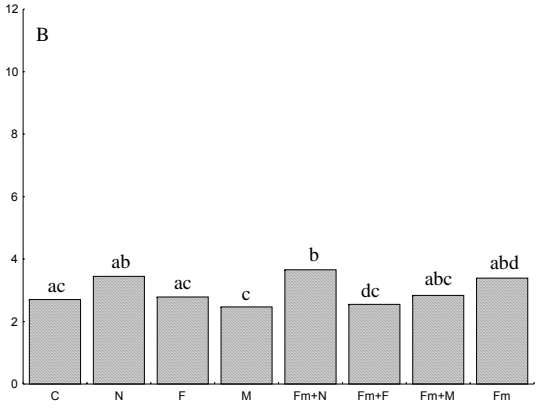
Tratamiento	pH	M.O. (%)	P (ppm)	g de			Textura
				K (meq /100	Ca	Mg suelo)	
C	7.9	1.79	7	0.15	2.2	0.67	Franco-arenoso
N	7.2	1.27	8	0.15	2.34	0.91	Franco-arenoso
F	7.6	1.74	7	0.16	2.31	0.69	Franco-arenoso
M	7.7	1.27	9	0.12	2.2	0.65	Franco-arenoso
Fm + N	7.9	1.05	7	0.13	2.18	0.78	Franco-arenoso
Fm + F	7.6	1.82	9	0.14	2.56	0.86	Franco-arenoso
Fm + M	7.7	1.37	7	0.12	2.33	0.9	Franco-arenoso
Fm	7.8	1.05	9	0.16	2.21	0.93	Franco-arenoso

Fuente: Autor

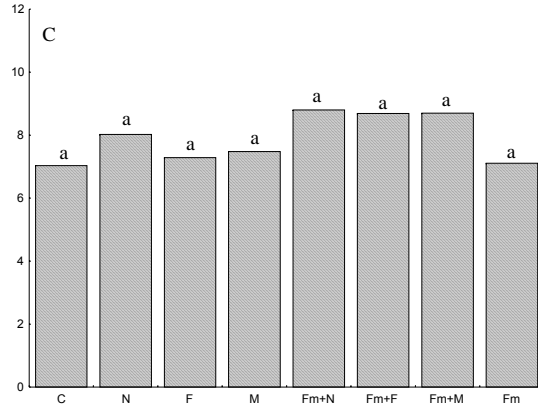
Figura 1.



Fuente: Autor

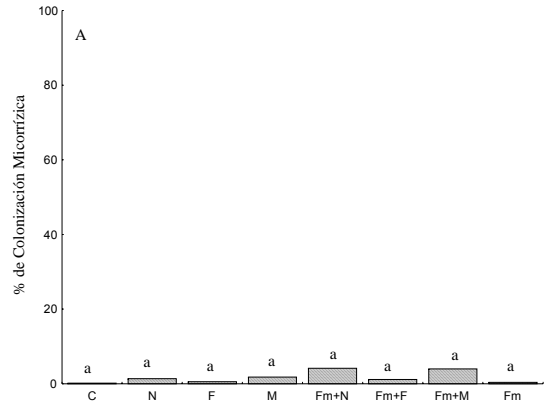


Fuente: Autor

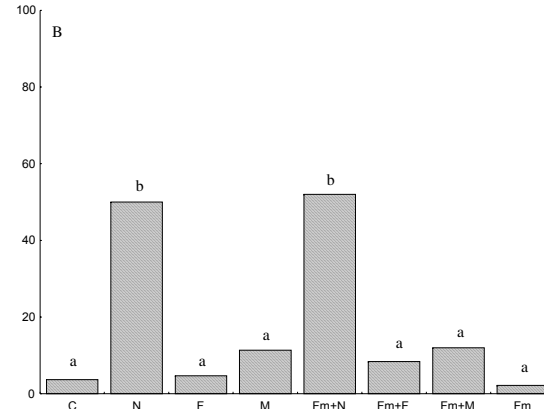


Fuente: Autor

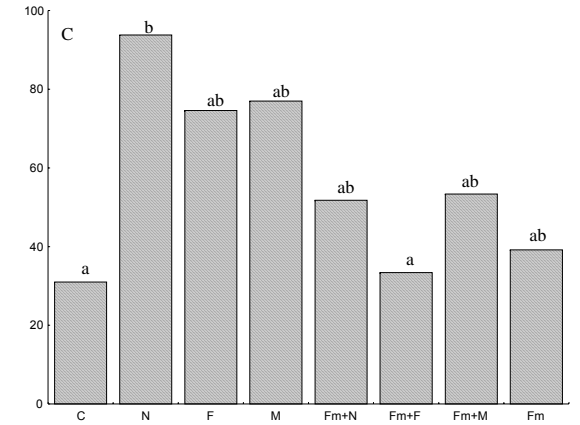
Figura 2



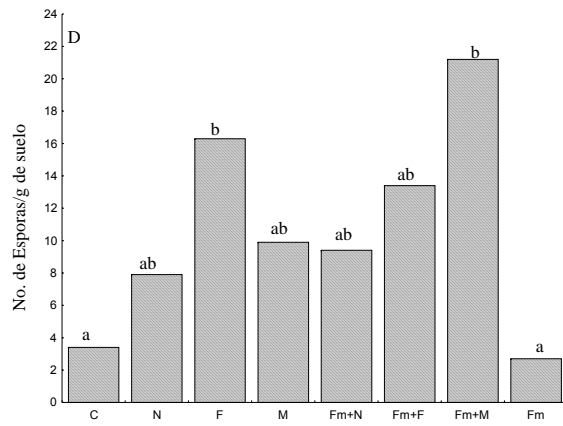
Fuente: Autor



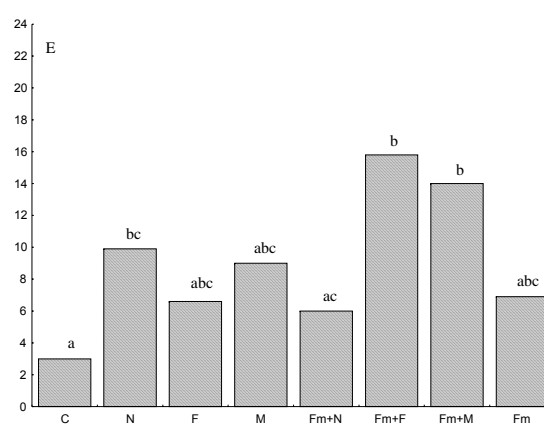
Fuente: Autor



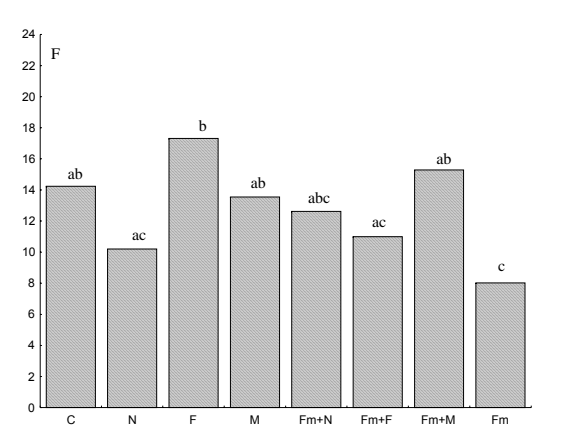
Fuente: Autor



Fuente: Autor



Fuente: Autor



Fuente: Autor

