

ARTÍCULO CIENTÍFICO

Symbiotic association of arbuscular mycorrhizal fungi and the root system of cocoa (*Theobroma cacao* L.) seedlings: effect of formononetin and phosphorus availability at soil level

Asociación simbiótica entre hongos micorrízicos arbusculares y el sistema radicular de plántulas de cacao (*Theobroma cacao* L.): efecto de la formononetina y la disponibilidad de fósforo en el suelo

Guillermo Andrés Cuadros G.¹, Raúl Gómez S.²,
Nelson Facundo Rodríguez L.¹

ABSTRACT

The symbiosis established between cacao plants and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) adds nutritional and competitive benefits for the plant, especially in conditions with a low availability of nutrients. We evaluated three levels of phosphorus (5, 20 and 40 ppm) and the presence or absence of isoflavone formononetin. A Phosphorus level of 14 ppm, without isoflavone or inoculation was the control. All treatments were inoculated with HFMA with the exception of the control. A completely randomized design was used. The morphological characters of the plant at 70, 110 and 150 days after inoculation were determined. The results showed no difference in the response to the morphological characters of the plant with the varied availability of isoflavone during the three sampling.

The root length showed significant differences in the different sampling times (70, 110 and 150 days of inoculation), this response being dependent on the availability of P and plant-mycorrhizal interactions. The number of spores demonstrated differences between the samples of 110 and 150 days of inoculation in the presence and absence of isoflavone, suggesting an early stimulation in the establishment of the symbiotic relationship of formononetin in the process of germination and formation of fungal structures.

Keywords: formononetina isoflavonoid, inoculum, architectural character.

RESUMEN

La simbiosis entre plantas de cacao y hongos micorrízicos arbusculares (HFMA) confiere beneficios nutricionales y competitivos a la planta, especialmente en condiciones de baja disponibilidad de nutrientes. Se evaluó tres niveles de fósforo (5, 20 y 40 ppm) y la presencia o ausencia de isoflavonoide formononetina. El nivel 14 ppm de P sin el isoflavonoide fue el tratamiento testigo. Todos los tratamientos fueron inoculados con HFMA a excepción del tratamiento control. Se utilizó un diseño completamente al azar y se determinaron caracteres morfológicos de la planta a los 70, 110 y 150 días después de la inoculación. Los resultados no mostraron respuesta diferencial a los caracteres morfológicos de la planta por la disponibilidad del isoflavonoide durante los tres muestreos. La longitud radicular presentó diferencias significativas en los muestreo (70, 110 y 150 días de inoculación), siendo esta respuesta dependiente de la disponibilidad de P y la interacción planta-micorriza. El número de esporas mostró diferencias entre los muestreos de 110 y 150 días de inoculación en presencia y ausencia del isoflavonoide, sugiriendo una rápida estimulación en el establecimiento de la relación simbiótica por la formononetina en el proceso de germinación y formación de estructuras fúngicas.

Palabras clave: isoflavonoide formononetina, inóculo, caracteres arquitecturales.

INTRODUCCIÓN

Las micorrizas arbusculares son asociaciones del tipo mutualistas 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 formadores de micorrizas arbusculares (HFMA), 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 hábitat 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 estabilidad del suelo (Khan, 2006). El fósforo (P) es uno de los nutrientes limitantes en el suelo, debido a su disponibilidad en forma inorgánica y por presentar una baja tasa de movilidad entre los macro nutrientes (Souchie *et al.*, 2006). La absorción de P en plantas se

Fecha de recepción 2010-09-30
Fecha de aceptación 2010-10-13

¹ Grupo Nacional de Investigación en Ecofisiología y Metabolismo Vegetal Tropic, Universidad Industrial de Santander - UIS. Bucaramanga (Colombia). fisionel@ciencias.uis.edu.co

² Estación Experimental La Suiza, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - Corpoica. Rionegro (Colombia). rgomez@corpoica.org.co

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 HFMA (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 se 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 HFMA (Nair *et al.*, 1991; Koide, 1991; Cornwell *et al.*, 2001). La formononetina estimula la colonización micorrízica, dicho estímulo resulta de la formación del 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 HFMA y se haga susceptible a estos, permitiendo el ingreso del hongo a las células de la epidermis y de la corteza (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 HFMA. 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 los 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 HFMA ha sido escasas, 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 bajo tres concentraciones distintas de fósforo disponible en el sustrato, favorece la simbiosis micorrízica arbuscular y el crecimiento de *Theobroma cacao* en condiciones de vivero.

METODOLOGÍA

La investigación se realizó en la biofábrica de la Estación Experimental La Suiza (Santander, Colombia), perteneciente a Corpoica, localizada en el municipio de Rionegro a 07° 22' 173" N, y 73° 10' 551" W, altitud de 500 msnm, 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, respectivamente. 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 7 días con Basamid®G.R. (60 g m⁻²), 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).

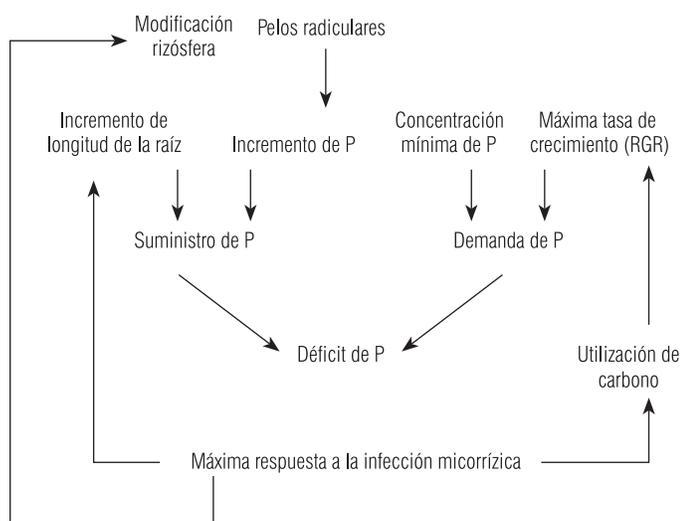


Figura 1. Los factores que determinan la máxima respuesta a la infección micorrízica son aquellos que determinan el déficit de fósforo. El suministro de fósforo y la demanda de fósforo determinan el déficit de este elemento (Koide, 1991).

Las semillas fueron lavadas, desinfectadas y pregerminadas por 3 días en ambiente húmedo para posteriormente sembrar una semilla por bolsa. El material vegetal fue propagado en condiciones de vivero bajo polisombra del 70% de reducción de la radiación solar.

Las variables experimentales o independientes la constituyeron los niveles de fósforo y la ausencia o presencia de isoflavonoides, para conformar siete tratamientos como aparecen en la Tabla 1. Los tratamientos se ubicaron siguiendo el diseño experimental completamente al azar.

Se utilizó un inóculo de micorriza, compuesto de suelo con fragmentos de raíces, hifas y esporas. Se adicionaron 20 g de inóculo con aislamientos nativos (32 esporas/g de sustrato) alrededor de cada una de las semillas en el momento de la siembra; todos los tratamientos fueron inoculados, excepto el tratamiento control o sea la aplicación de un nivel de fósforo de 14 ppm como óptimo según Mejía (2000).

Las especies de HFMA inóculas estuvo comprendida por:

- Glomus aggregatum* Shenck & Smith emend. Koske
- Glomus clarum* Nicol. & Schenck
- Glomus etunicatum* Becker & Gerd.
- 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
- Acaulospora mellea* Spain & Schenck
- Acaulospora morrowiae* Spain & Schenck
- Acaulospora scrobiculata* 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

Los niveles de fósforo evaluados fueron óptimo (14 ppm), medio (20 ppm) bajo (5 ppm) y alto (40 ppm). Cada tratamiento fue irrigado de SFT en solución (500 mL) cada 3 días. En los tratamientos con presencia de la aplicación de isoflavonoide formononetina, se realizaron dos aplicaciones en solución de 150 mL del isoflavonoide formononetina (Myconate)¹ a los 30 y 45 días posteriores a la fecha de

¹ El Myconate (VAMTech, L.L.C., Lansing, MI, USA) es una forma soluble del isoflavonoide formononetina (7-Hidroxí 4-Metoxi-isoflavona), inoculada para el ambiente.

Tabla 1. Tratamientos utilizados. Inóculo nativo de HMA (IN), variables de disponibilidad de fósforo en partes por millón (ppm) y presencia o ausencia de isoflavonoide formononetina (F).

Disponibilidad de P (ppm)	Inóculo 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

siembra por unidad experimental. La solución fue preparada con una concentración de 50 mg, la cual fue disuelta en un volumen de metanol igual al 1% del volumen final y posteriormente diluida en agua destilada.

El material vegetal fue distribuido aleatoriamente en 7 tratamientos (Tabla 1), 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, con intervalos de 40 días, a los 70, 110 y 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 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 10 segmentos de raíz, con longitud de 1 cm y menores a 3 mm de diámetro, observando 10 campos por segmentos, para el reconocimiento de estructuras, hifas, esporas, arbusculos y vesículas.

El porcentaje de colonización se calculó a partir del número de campos positivos (presencia de hifas, esporas, arbusculos y vesículas), sobre el número de campos visuales totales multiplicados por 100 (Azizah-Chulan y Ragu, 1986). Para determinar el número de esporas se tomaron 10 g 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 μ y 38 μ) y centrifugación con sacarosa de Gerdemann y Nicolson (1963). La cuantificación del número de esporas se realizó utilizando un estereoscopio.

Tabla 2. Diferencias estadísticas según ANAVA para parámetros de crecimiento y producción de biomasa en los tratamientos con aplicación de isoflavonoide formononetina.

Días después de la siembra	gl	AP	LR	NH	FMH	FMT	FMR	Colonización	BTs	Esporas
70	3	0,69 NS	14,68 ***	0,90 NS	8,56 ***	6,41 **	4,24 **	84,21 ***	1,37 NS	0,87 NS
110	3	6,45 ***	5,06 ***	1,46 NS	5,49 **	1,26 NS	2,48 NS	14,576 ***	0,44 NS	3,14 **
150	3	3,35 **	19,44 ***	4,83 **	4,62 **	7,25 **	18,63 ***	22,45 ***	1,32 NS	11,78 ***

Altura apical (AP), número de hojas (NH), longitud de la raíz (LR), la fracción masa de las hojas (FMH), fracción masa de los tallos (FMT), fracción masa de la raíz (FMR), biomasa total seca (BTs). Diferencias altamente significativas*** ($P \leq 0,01$), Diferencias significativas** ($P \leq 0,05$), Diferencias no significativas (NS).

Tabla 3. Diferencias estadísticas según ANAVA para parámetros de crecimiento y de producción de biomasa en los tratamientos sin aplicación de isoflavonoide formononetina.

Días después de la siembra	gl	AP	LR	NH	FMH	FMT	FMR	Colonización	BTs	Esporas
70	3	6,75 **	6,26 **	2,80 NS	6,81 **	8,84 **	5,87 **	104,67 ***	2,42 NS	1,19 NS
110	3	4,69 **	9,23 ***	1,75 NS	5,87 **	1,95 NS	3,21 **	12,80 ***	0,60 NS	2,37 NS
150	3	7,43 ***	34,01 ***	6,64 **	3,98 **	6,62 **	71,69 ***	14,27 ***	0,90 NS	21,78 ***

Altura apical (AP), número de hojas (NH), longitud de la raíz (LR), la fracción masa de las hojas (FMH), fracción masa de los tallos (FMT), fracción masa de la raíz (FMR), biomasa total seca (BTs). Diferencias altamente significativas*** ($P \leq 0,01$), Diferencias significativas** ($P \leq 0,05$), Diferencias no significativas (NS).

Mediciones morfológicas de asignación de biomasa

Durante los muestreos realizados se cuantificaron 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 cuantificó, la fracción masa de las hojas (FMH), fracción masa de los tallos (FMT), fracción masa de la raíz (FMR) y biomasa total seca (BTs).

Análisis estadístico

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 Ln + 1, para cumplir las condiciones de normalidad y homogeneidad de varianza. Los análisis por épocas de muestreos y aplicación de isoflavonoide se realizaron por separado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

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 (Figuras 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) 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 los diferentes puntos de muestreo (Tablas 2 y 3). 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 - HFMA que permite un incremento de la longitud de la raíz, respuesta que permite un mejor desempeño en suelos de baja fertilidad. 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 produce por mecanismos que permiten el 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.

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 (Tablas 2 y 3). Estos resultados evidencian la no 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 HFMA, limitan la producción de biomasa en la planta, ya que los hongos requieren de carbohidratos para la formación del micelio, hifas y demás estructuras (Salamanca y Silva, 1998). El costo energético para mantener la relación simbiótica es alto e ineludible para la planta huésped (Brunnett, 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 2). 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).

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 (Tablas 3 y 4). El comportamiento de estos resultados muestra 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 (Figuras 1 y 3). Estos resultados concuerdan con Azizah-Chulan y Ragu (1986), quienes reportaron que en plantas de *T. cacao*, la aplicación de P afecta positivamente el desarrollo de HFMA 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 HFMA. 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, pues la respuesta depende en alta medida a los niveles de fósforo como se expuso anteriormente (Figuras 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 HFMA es bajo. Los niveles de fósforo en el suelo son fundamentales desde el punto de vista nutricional, el mayor beneficio que las plantas derivan de la micorriza en un

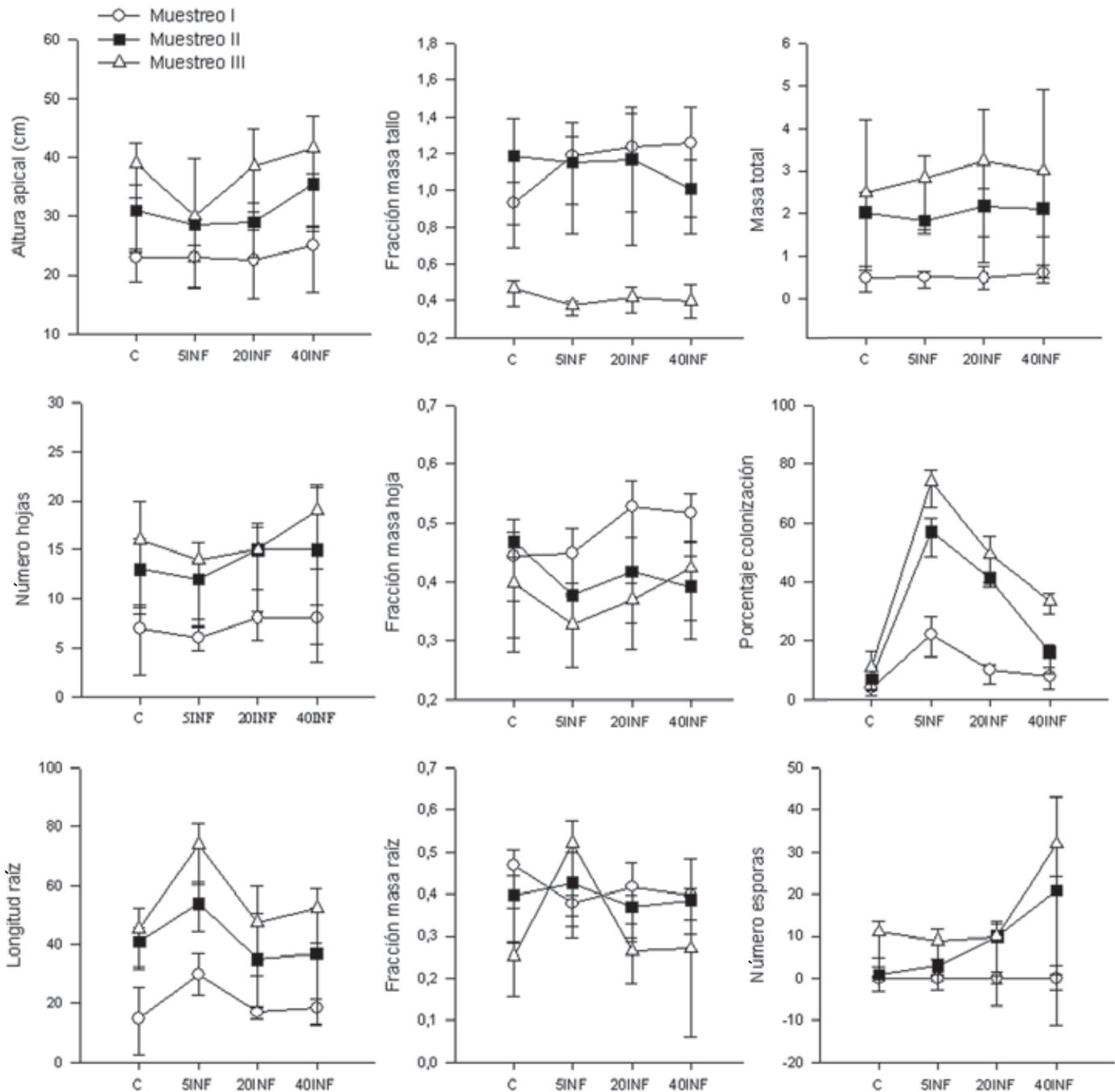


Figura 2. Variables de crecimiento, producción de biomasa, colonización micorrízica y formación de esporas para los tratamientos con aplicación de isoflavonoide formononetina en las tres épocas de muestreo de plántulas de cacao. C: control, IN: inóculo, F: isoflavonoide formononetina.

mayor crecimiento debido a un incremento en la absorción de fósforo cuando este elemento es limitante, hasta el punto que la excreción de Isoflavonoides es estimulada por los niveles bajos de fósforo en el suelo. Teniendo la mayor parte de los suelos tropicales poca disponibilidad de fósforo para las plantas, la utilidad de las micorrizas en estas condiciones es obvia, y cuando el fósforo no es limitante, el beneficio puede ser nulo o reducido. En base a

esta condición una posible estrategia de la planta es reducir el intercambio de carbono o de fotoasimilados hacia el hongo bajo 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

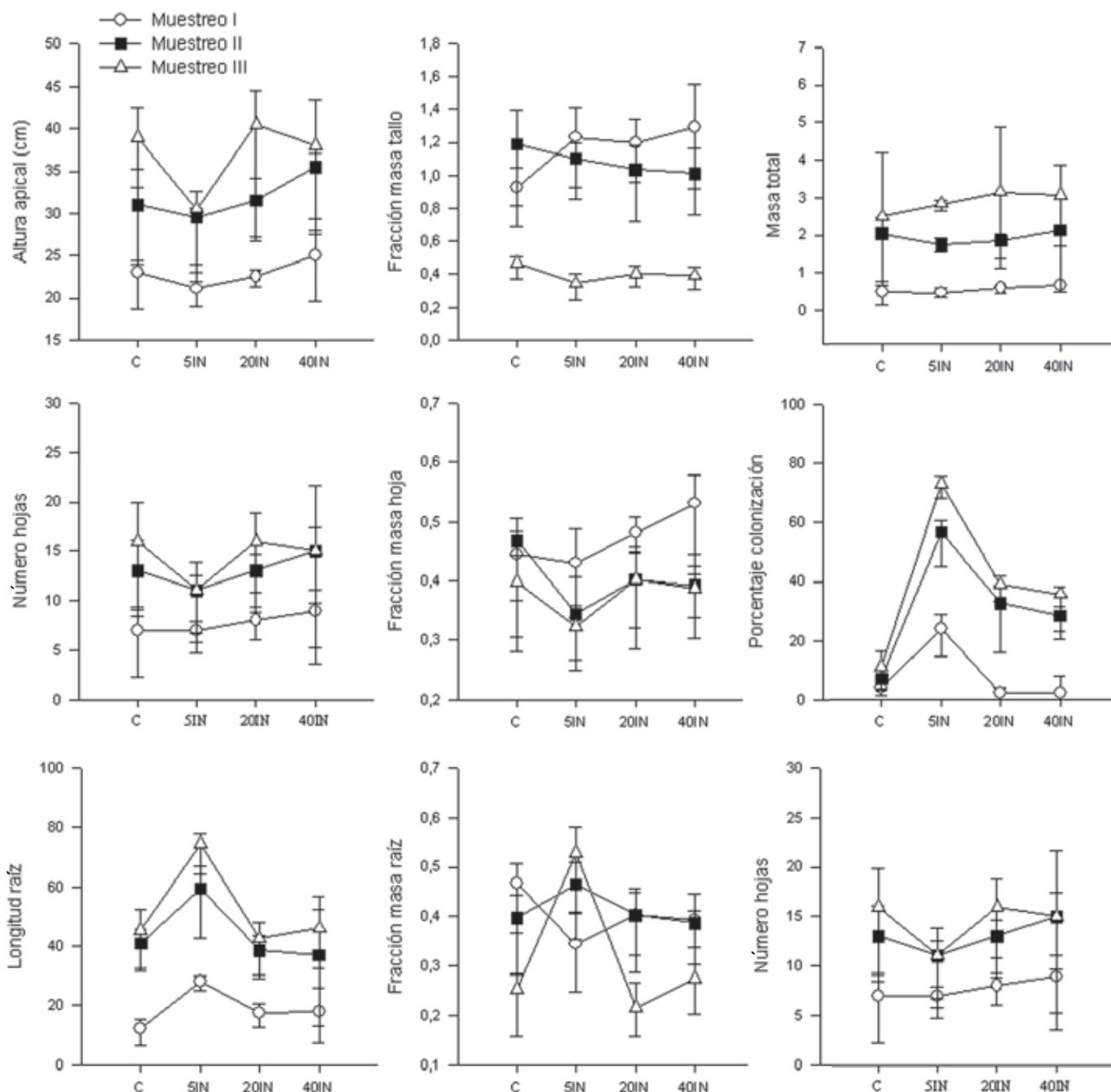


Figura 3. Variables de crecimiento, producción de biomasa y colonización micorrizica para los tratamientos sin aplicación de isoflavonoide formononetina en las tres épocas de muestreo de plántulas de cacao. C: control, IN: inóculo.

ausencia del isoflavonoide, contrario a los resultados observados en el día 70 que demuestra ausencia de significancia en ambos tratamientos en función a la aplicación del isoflavonoide (Tablas 2 y 3).

Estos resultados según Lambers *et al.* (2008) y Scervino *et al.* (2005), sugieren que la formononetina puede estimular un mayor proceso de esporulación en etapas tempranas

de la interacción planta-HFMA, 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 de la aplicación del isoflavonoide (día 110) para el carácter número de esporas, y que sugiere una condición óptima para la germinación del hongo durante un corto periodo de tiempo; contrario a los resultados

observados en ausencia de la aplicación del isoflavonoide, el 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 germinación 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); 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 HFMA a esa condición de estrés hídrico. Al mismo tiempo, también se ha reportado que una alta esporulación es una respuesta de los HFMA a condiciones climáticas adversas y 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).

CONCLUSIÓN

Los resultados de la investigación no mostraron 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-HFMA, 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 infeccioso 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-HFMA y no un efecto directo por la aplicación del isoflavonoide formononetina.

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.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Azizah-Chulan H, Martin K. 1992. The vesicular-arbuscular (VA) mycorrhiza and its effects on growth of vegetatively propagated *Theobroma cacao* L. *Plant 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 Soil* 96:279-285.
- Bolan NS. 1991. A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. *Plant Soil* 134:189-207.
- Brundrett MC. 2002. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytol* 154:275-304.
- Chapín FSIII. 1980. The mineral nutrition of wild plants. *Annu 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. *Am J Bot* 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. *Rev Bras Fisiol Veg* 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*. 138:7-35.
- 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. *Trans Br Mycol Soc* 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, Azcón C, Barea JM, Moyersoen B, Orozco C, Cano C, Mejía D, Mayer J, Rivillas C, Rivera de BEL, editor. *Micorrizas: recurso biológico del suelo*. Bogotá: Fondo FEN. pp. 3-46.
- Khan AG. 2006. Mycorrhizoremediation an enhanced form of phytoremediation. *J Zhejiang Univ Sci 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 Biol Biochem* 32:179-188.
- Lambers H, Chapin FSIII, Pons TL. 2008. *Plant physiological ecology*. 2a ed. New York: Springer Science + Business Media. 591 p.
- Mejía LA. 2000. Nutrición del cacao, relación suelo, planta y agua. En: Mejía LA, Arguello OC, editores. *Tecnología para el mejoramiento del sistema de producción de cacao*. Bucaramanga: Corpoica. pp. 33-35.
- Miyasaka S, Habte M. 2001. Plant mechanisms and mycorrhizal symbiosis to increase phosphorus uptake efficiency. *Comm Soil Sci 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. *Appl Environ Microbiol* 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. *Trans Br Mycol Soc* 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 eficiencia simbiótica de fungos endomicorrízicos para o cafeeiro. *Rev Bras Ciênc Solo* 20:222-228.
- Salamanca CR, Silva MR. 1998. Las micorrizas como alternativa para el manejo sostenible de los agroecosistemas tropicales. *Boletín Técnico* 12. Villavicencio: Corpoica, 26 p.
- 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. *J Plant Physiol* 162:625-633.
- Sieverding E. 1991. Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. Eschborn, Alemania: Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit-GTZ. 370 p.
- Souchie EL, Azcón R, Barea JM, Saggin-Junior 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 Ecuat* 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 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.