

ARTÍCULO CIENTÍFICO

Ana María Serralde O.¹
María Margarita Ramírez G.¹

ABSTRACT

Title: Mycorrhiza populations analysis in corn (*Zea mays*) cultivated in acid soils under different agronomic treatments

A study was carried out to evaluate the populations of native arbuscular mycorrhizas (AM) fungi on established crops on acid soils of the Colombian Eastern Plains, for a period of five years (1997-2001). Fungi spores were isolated from the crop-fungi association of two maize cultivars: ICA-Sikuani V-110 and the regional cultivar Clavito. The mycorrhizal behavior was evaluated under six different organic fertilization treatments, which included green manure (cowpea), chicken manure and a control treatment (no application). From a total of 7924 spores, 24 different types of mycorrhiza were characterized using morphological and molecular analysis. The relation between soil conditions (pH, organic matter contents, P, K, Al⁺⁺⁺ and % Al saturation) and AM fungi populations was analysed using a Stepwise Multiple Regression model. According to the regression coefficients obtained ($P \leq 0.001$ and $R^2 \geq 0.83$), soil pH and organic matter content were the independent variables that explained most of the variation observed in AM populations. The molecular methodology was based on the Polymerase Chain Reaction (PCR) and the use of specific primers allowed to identify spores from *Glomus*, *Entrophospora* and *Gigaspora*. This methodology also provided the identification of fungi from the *Glomus* genera in highly colonized maize roots.

Key words: acid soils, arbuscular mycorrhiza, Cowpea, chicken manure, specific primers, *Zea mays*, PCR.

1. Investigadoras del Programa Nacional de Recursos Biofísicos. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. Centro de Investigación Tibaitatá, Km 14 vía Mosquera. Colombia. Mail to: mramirez@corpoica.org.co

Análisis de poblaciones de micorrizas en maíz (*Zea mays*) cultivado en suelos ácidos bajo diferentes tratamientos agronómicos

RESUMEN

Mediante el seguimiento de cultivos experimentales en suelos ácidos de los Llanos Orientales, durante un periodo de cinco años consecutivos (1997-2001), se evaluaron las poblaciones nativas de hongos micorrícicos arbusculares (MA) asociados con dos variedades de maíz: ICA- Sikuani V-110 y la variedad regional criolla Clavito, analizando su comportamiento bajo distintos tratamientos con abono orgánico (gallinaza), abono verde (Caupí) y testigo sin aplicación de materiales orgánicos, para un total de seis tratamientos. De 7.924 esporas analizadas se aislaron veinticuatro morfotipos identificados morfológica y molecularmente. Se determinó la relación de las condiciones del suelo (pH, los contenidos de materia orgánica, P, K, Al⁺⁺⁺ y % saturación Al) con el comportamiento de las poblaciones de MA. Con la aplicación del Análisis de Regresión Múltiple (Stepwise), se obtuvieron coeficientes significativos ($P \leq 0.001$ y $R^2 \geq 83$) para todas las variables y se seleccionaron como variables predictivas principales el pH y la materia orgánica del suelo, que presentaron coeficientes significativos para cinco y cuatro de los siete modelos establecidos, respectivamente. La técnica molecular empleada basada en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), con el uso de primers específicos, permitió la identificación confirmatoria de las esporas aisladas de los géneros *Glomus*, *Entrophospora* y *Gigaspora*. Además, mediante el uso de esta metodología se logró identificar la presencia del género *Glomus* en raíces de maíz altamente colonizadas.

Palabras clave: suelos ácidos, micorriza arbuscular, Caupí, gallinaza, primers específicos, *Zea mays*, PCR.

INTRODUCCIÓN

LOS HONGOS MICORRÍCICOS arbusculares (MA) interactúan simbióticamente con cerca del 90% de las plantas terrestres formando diferentes tipos de asociaciones micorrícicas y, aunque el número total de hongos del suelo involucrados en esta simbiosis es desconocido, han beneficiado muchas especies importantes en agricultura, como el maíz, al incrementar su adaptación a diferentes ambientes y con efectos positivos sobre la productividad del sistema (Lanfranco *et al.*, 1995). La relación simbiótica entre hongos MA y raíces de la mayoría de las plantas es benéfica ya que el hongo coloniza la corteza de la raíz para obtener carbono a partir de la planta hospedera, mientras le ayuda a la planta a tomar fósforo y otros nutrientes minerales del suelo (Harrison y Van Buuren, 1995).

Por los beneficios propios de esta asociación simbiótica mutualista (hongo-planta) en los últimos años se han rea-

lizado investigaciones para determinar el efecto de aislamientos de hongos MA sobre sistemas de producción agrícola, con el fin de lograr sistemas de producción sostenibles y competitivos. Sin embargo, el conocimiento acerca de la ecología de poblaciones nativas y el papel de las condiciones edáficas y climáticas en el establecimiento y efectividad de esta asociación es limitado.

Por esta razón es necesario realizar el análisis de poblaciones nativas en relación con los ambientes edáficos en los que se desarrollan. La información obtenida de este tipo de evaluaciones puede conducir a un uso adecuado de estos microorganismos como biofertilizantes, optimizando los resultados en cuanto a producción en sistemas agrícolas y recuperación de ambientes degradados.

El conocimiento de las interacciones de hongos MA y las condiciones edáficas puede llevar al establecimiento de pobla-

ciones mejor adaptadas y más efectivas que garanticen los beneficios de la asociación simbiótica, ya que aunque la asociación micorrícica arbuscular ha sido definida generalmente como inespecífica, se ha determinado que el comportamiento de las poblaciones de MA es modulado por diversos factores ambientales pueden afectar su comportamiento y existe evidencia de que estas asociaciones presentan "especificidad ecológica", la cual consiste en la posibilidad de encontrar en un inóculo mixto o bajo condiciones nativas un tipo particular de MA que colonice preferentemente a un hospedero (McGonigle y Fitter, 1990).

En este trabajo se analiza el comportamiento de poblaciones de MA asociadas al cultivo de maíz (*Zea mays*) en suelos del Piedemonte llanero con aplicación de materiales orgánicos (Caupí y gallinaza) con el fin de determinar los factores edáficos que influyen en las poblaciones nativas de MA.

Se seleccionó esta zona del país por su gran potencial para la producción agrícola, aunque es conocido que la extensa zona del Piedemonte llanero presenta problemas de acidez, toxicidad por aluminio y, por consiguiente, baja fertilidad. Algunas estrategias convencionales, como el uso de cal y otras alternativas, como el uso de abonos verdes y orgánicos, han sido evaluadas con resultados promisorios aplicado como enmiendas en este tipo de suelos (Rojas *et al.*, 1998; 2000; 2001; Baquero and Rojas, 2001).

Adicionalmente, en algunas evaluaciones se ha establecido el efecto benéfico de la asociación MA sobre la productividad del maíz en condiciones controladas; por esto, el uso adecuado de hongos MA como biofertilizante es una herramienta biotecnológica que puede mejorar la producción a través del establecimiento de sistemas de producción sostenibles y competitivos (Roveda *et al.*, 1998; Urdaneta y Roveda, 1999).

Se realizó el seguimiento de poblaciones de MA nativas durante un periodo de cinco años (1997-2001) para lo cual, las esporas MA fueron aisladas e identificadas a nivel de género, con el fin de establecer los cambios poblacionales en función de la modificación de las propiedades del suelo que puedan tener un efecto modelador sobre las poblaciones de hongos MA.

La dificultad que presenta la identificación taxonómica de micorrizas arbusculares por los métodos convencionales permite plantear el uso de una técnica

molecular basada en PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) que permita la identificación rápida y efectiva de esporas nativas, para confirmar la taxonomía tradicional basada en las características morfológicas de las esporas encontradas en el suelo.

Con base en la información tomada durante los cinco años de evaluación en cuanto a los parámetros de suelo y el comportamiento de poblaciones de MA, se calcularon modelos matemáticos de regresión múltiple que permiten explicar las interacciones entre estas variables. De esta forma se busca identificar qué tipo (o tipos) de hongo MA puede ser empleado en esta zona de forma efectiva, gracias a su adaptabilidad ante las condiciones ambientales predominantes y a los cambios ocasionados a consecuencia de las enmiendas aplicadas para solucionar los problemas de acidez y toxicidad por aluminio en esta zona.

Como primer paso para conocer y evaluar la biodiversidad de hongos MA es necesario hacer la identificación a nivel de especies y aislamientos. Sin embargo, no es un trabajo simple, debido a que la identificación convencional se basa fundamentalmente en características morfológicas de las esporas presentes en el suelo y estas estructuras pueden variar debido a que están sujetas a alteraciones durante su formación.

Las técnicas moleculares basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) permiten la caracterización de ácidos nucleicos amplificados a partir de pequeñas cantidades de muestra fúngica. La PCR es la técnica más promisoría para estudios ecológicos de caracterización y evaluación de la biodiversidad de hongos MA (Clapp *et al.*, 1995).

Materiales y métodos

Diseño experimental. El estudio se realizó en parcelas experimentales de maíz, con un diseño estadístico de Bloques Completos al Azar, con tres repeticiones y seis tratamientos consistentes en dos variedades de maíz (ICA- Sikuaní V-110 y la variedad regional Clavito) y tres fuentes de materiales orgánicos (sin aplicación; aplicación de 5 t/ha de Caupí, y 5 t/ha de gallinaza), en parcelas de 6 x 6 m, con una distancia de siembra de 20 cm entre plantas y de 1m entre surcos. En el año 2001 no se aplicaron los tratamientos señalados para determinar su efecto residual.

Además de la materia orgánica, se realizó la fertilización básica del cultivo

aplicando: 100 kg/ha de N (úrea) fraccionados a los 15, 20 y 35 días después de la siembra; 75 kg/ha de potasio (KCl), 10 kg/ha de $MnSO_4$, ZnO, $CuSO_4$, 12 kg/ha de $MgSO_4$ y 60 kg/ha de Calcio ($CaSO_4$). Para el segundo semestre de 2001 se utilizó la mitad de la dosis de fertilizantes.

El cultivo se desarrolló en el piedemonte llanero (Centro de Investigación La Libertad - CORPOICA, Villavicencio, Meta) haciendo un seguimiento de las poblaciones de micorrizas arbusculares (MA) y las propiedades del suelo para el segundo semestre de un periodo de cinco años consecutivos (1997-2001). El suelo sobre el cual se realizó la evaluación está clasificado como *Typic Hapludox* y presenta en promedio alto contenido de aluminio (1 a 2 $cmol^+/kg$), un porcentaje de saturación de aluminio del 73% y bajo fósforo disponible (<10 mg/kg).

Muestreo de raíces. El muestreo de raíces se realizó en la etapa de antesis, aproximadamente 60 días después de la siembra (dds), para las condiciones del Piedemonte llanero. Se analizaron para este trabajo las raíces de maíz bajo cada tratamiento en los años 1999 y 2000, que fueron evaluadas como un indicador preliminar de la presencia de asociación bajo las condiciones evaluadas. El muestreo fue de tipo destructivo, seleccionando plantas al azar de cada repetición. Las raíces de las plantas seleccionadas se lavaron con agua corriente y se almacenaron a 4° C para su posterior tinción y evaluación.

Muestreo de suelo. Las muestras de suelo (1 kg) se tomaron simultáneamente con las raíces 60 dds (antesis), durante los cinco años (1997 - 2001), tomando muestras de la rizósfera de la planta, a una profundidad entre 0-20 cm; fueron secadas a temperatura ambiente y almacenadas para su posterior evaluación. Cada muestra de suelo fue procesada para aislar las esporas nativas y fue sometida al análisis químico para determinar el pH y los contenidos de fósforo, aluminio, potasio y materia orgánica (Laboratorio de Química de Suelos, CORPOICA, C.I. Tibaitatá).

Aislamiento y cuantificación de esporas. El método utilizado para el aislamiento y cuantificación de esporas es una combinación del método de tamizado y decantación propuesto por Gerdemann y Nicholson en 1963 y el método de centrifugación en sacarosa de Jenkins, 1964

(Sieverding, 1984). El método de tamizado y decantación en húmedo permite la extracción de esporas en alto porcentaje y el método de centrifugación en gradiente de sacarosa mejora la separación de las esporas del suelo y del material orgánico para facilitar el aislamiento y la identificación.

Tinción de raíces y determinación del porcentaje de colonización. El método utilizado es una modificación del propuesto por Phillips y Hayman (1970) (Sieverding, 1984), que requiere el montaje de raíces teñidas en portaobjetos para ser evaluadas en microscopio óptico. La tinción de raíces se realiza a través de los siguientes pasos: a) clareo, b) blanqueo, c) acidificación, d) tinción y e) decoloración. El porcentaje de colonización se midió a partir de 10 fragmentos de raíz teñida de aproximadamente 1 cm de longitud, seleccionados al azar, registrando la presencia de estructuras propias del hongo MA por cada campo óptico de observación microscópica, con un aumento equivalente a 400X. Los reactivos empleados en la tinción fueron: hidróxido de potasio (10%); peróxido de hidrógeno (10%); ácido clorhídrico (1N); lacto-glicerol y azul de Tripan (0.05%). El porcentaje de colonización se determina a partir de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Colon.} = \frac{(n \text{ intersecc. micorrizadas})}{(n \text{ intersecc. observadas})} \times 100$$

El número mínimo de intersecciones observadas debe ser 100 (Giovannetti and Mosse, 1980).

Evaluación morfológica de las poblaciones de micorrizas. Las esporas totales aisladas de 10 gramos de suelo seco, fueron evaluadas y agrupadas por morfotipos para cada muestreo, para su posterior clasificación a partir de características morfológicas a nivel de género, usando la clave taxonómica de Shenk y Pérez (1990) y la tabla de colores publicada por el INVAM¹ (International Culture Coleccion of Arbuscular and Vesicular Mycorrhizal Fungi). Para esto se hicieron placas de cada uno de los morfotipos, usando como medio de montaje PVLG y reactivo de Melzer. La observación microscópica se realizó con objetivos de 40X e inmersión 100X. Para las medidas se

empleó una regla micrométrica con 100 divisiones adaptada al ocular.

Evaluación molecular de las poblaciones de micorrizas. La evaluación del DNA obtenido a partir de esporas, se llevó a cabo usando una variación de la técnica propuesta por Clapp *et al.* (1995), que incluye a amplificación por PCR anidada. La pre-amplificación se realiza con el par de primers NS21 y VANS1 (Clapp, *et al.*, 1995; Simon *et al.*, 1993). Los primers específicos para género (VAGIGA, VAGLO, VAACAU) fueron usados en combinación con VANS1 (Simon *et al.*, 1993). Las reacciones de amplificación por PCR se realizaron en el termociclador programable, modelo PTC 100® de MJ Research, Inc.

En la Figura 1 se ilustra la posición del conjunto de primers que han sido usados para discriminar entre los cinco géneros. Los resultados de la amplificación fueron examinados por electroforesis en geles de agarosa al 1.5%, en buffer TAE 0.5X, usando la cámara de electroforesis horizontal Bio-Rad (wide mini-sub® CellGT), y la fuente de poder programable Bio-Rad, modelo 1000/500® a 120 voltios por aproximadamente una hora.

Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio, visualizados bajo luz UV y analizados usando el documentador de imágenes Syngene® y el Software GeneSnap®.

Reactivos y condiciones de reacción del PCR. Para un volumen final de 25 µl : buffer de PCR (1X); MgCl₂ (1.5 mM); dNTP's (200 µM); TaqDNApol (1 U); Primers (1 µM). Con un ciclo inicial: 95°C - 3 min.; 60° C -1 min.; 72° C - 1 min.

y 35 ciclos: 95° C - 1 min.; 60° C - 1 min.; 72° C -1 min.; 4° C.

Extracción de DNA a partir de raíces colonizadas. El tejido vegetal colonizado por MA fue macerado sobre nitrógeno líquido, usando buffer de extracción CTAB 2X precalentado a 65° C y un volumen de fenol:cloroformo:alcohol-isoamílico (24:1:1). Después de centrifugar a 4.000 g por 5 minutos a temperatura ambiente se adiciona al sobrenadante un volumen de cloroformo:alcohol-isoamílico y se centrifuga nuevamente. Finalmente, se precipita a -20° C se seca el pellet y se resuspende en 50 µl de TE (1:10). Una vez obtenido y purificado el DNA (libre de DNA proveniente de tejido vegetal) se sigue el mismo procedimiento empleado para esporas.

Análisis de la información. Los análisis estadísticos se realizaron usando el programa STATGRAPHICS®, versión 5.0 y SAS® versión 8.0; las variables medidas fueron evaluadas mediante el análisis de varianza (ANOVA) y los contrastes por tratamiento y año se realizaron por el método de Tukey, con un nivel de confiabilidad de 95%, cuando no se encontraron interacciones entre genotipo y materiales orgánicos.

Con la información de los conteos de esporas por morfotipo y por género, se calculó la abundancia relativa, mediante la relación del número de esporas de una categoría particular (morfotipo o género) sobre el total de esporas aisladas.

A partir de la cantidad de esporas de cada género se calculó la diversidad mediante el índice de Shannon-Wiener, usando el programa PAST®, versión 6.03 (<http://folk.uio.no/ohammer/past>, sep-

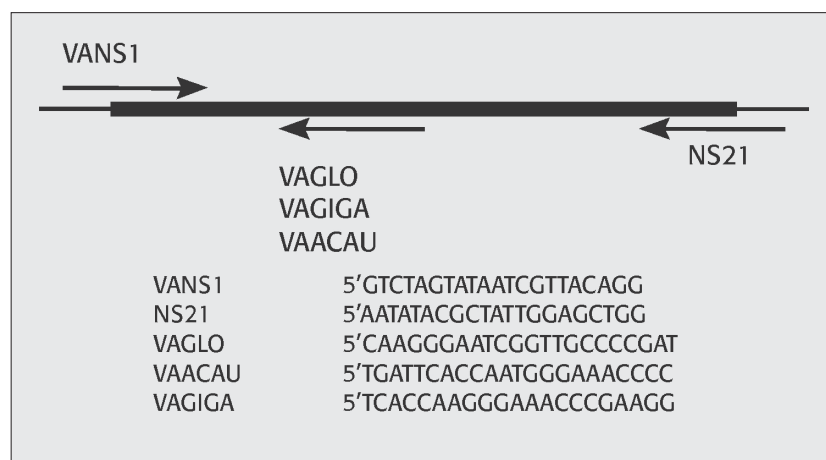


Figura 1. Diagrama de la localización de los primers usados y su respectiva secuencia (tomados de Simon *et al.*, 1993).

¹ www.invam.caf.wvu.edu (2001).

tiembre de 2001). Este índice tiene en cuenta el número de individuos así como el número de grupos taxonómicos (géneros). Varía desde 0, para comunidades con sólo un grupo taxonómico, a valores superiores para aquellas comunidades con varios grupos taxonómicos, mediante la fórmula:

$$H = -\sum n_i/n [\ln(n_i/n)]$$

Donde H es la diversidad genética, n_i es el número de individuos del taxón i y n es el total de individuos.

A partir de las variables dependientes e independientes que se describen a continuación, se desarrollaron modelos de regresión para determinar la relación entre las condiciones edáficas y la composición de las poblaciones de hongos micorrízicos arbusculares (Statgraphics®, versión 5.0). Se utilizó el método de Regresión Múltiple Stepwise que permite seleccionar el modelo mejor ajustado, y que selecciona aquellas variables que permiten predecir el comportamiento de cada una de las variables dependientes.

Resultados y discusión

Poblaciones totales. En la Figura 2 se presentan los conteos totales de esporas correspondientes a 1 gramo de suelo seco. Para esta variable no se encontraron diferencias significativas en el análisis de varianza ($P \geq 0.05$) para ninguno de los dos factores evaluados (tratamientos y años).

En términos generales el número de esporas por gramo (4-18) no es bajo para condiciones nativas, si tenemos en cuenta los datos reportados por Collins *et al.* (1991) quienes encontraron entre 0 y 49 esporas en 25 gramos de suelo en un experimento en el que se evaluaron poblaciones MA asociadas con cultivos de maíz y soya de cinco años. Además, Howeler *et al.* (1987) registraron conteos de esporas nativas asociadas a *Brachiaria decumbens*, que no superan las 10 esporas por gramo de suelo seco. Igualmente Douds *et al.* (1995) encontraron entre 1 y 43 esporas por 50 cm³ (aproximadamente 50 g) de suelo en cultivos de maíz, soya y trigo en sistemas con labranza convencional y mínima. Aunque en condiciones controladas se pueden obtener poblaciones más abundantes, bajo condiciones nativas los valores encontrados nos indican un buen establecimiento de las poblaciones de MA, en condiciones de acidez y aluminio tóxico.

En la evaluación de esporas por gramo de suelo no se presentan efectos significativos de las aplicaciones de materia orgánica (abono verde y orgánico) ni de la variedad de maíz sobre las poblaciones globales de MA. Esta situación se observa, tanto al realizar las evaluaciones cada año, como en las evaluaciones a través de los cinco años.

Morfotipos. Se encontraron 24 morfotipos agrupados según su homogeneidad respecto de la forma, el color, la apariencia de la pared externa, el tamaño de la espора y la presencia, forma y coloración

de la conexión hifal. En la Figura 3 se presenta la composición de la población de MA a nivel de los morfotipos encontrados por 10 g/suelo para los seis tratamientos y durante cinco años. El número de morfotipos varía de 4 a 12 para cada condición específica; estos valores son similares a los reportados por diversos autores citados por Brundrett (1991), ya que para condiciones de cultivos en campo han encontrado entre 3 y 15 especies nativas de MA. Sin embargo, es interesante observar que el total de morfotipos (24), es bastante alto comparado con los reportes mencionados.

Géneros. A partir del análisis morfológico de las esporas aisladas, se encontraron cinco de los géneros conocidos (*Glomus*, *Acaulospora*, *Entrophospora*, *Gigaspora* y *Scutellospora*), siendo el más común el género *Glomus* al cual pertenecen 12 morfotipos, seguido por el género *Acaulospora* al que pertenecen 6 de los morfotipos encontrados. Por el contrario, los géneros menos frecuentes son *Entrophospora* y *Scutellospora*, en los que sólo se identificó un morfotipo. El género *Gigaspora* se encuentra representado por 4 morfotipos y no se encontraron esporas características del género *Sclerocystis*.

Para cada uno de los géneros encontrados se realizó el análisis molecular empleando los *primers* específicos, con el fin de emplear una técnica relativamente rápida para identificar las esporas de MA y que permita confirmar una primera clasificación morfológica de los morfotipos encontrados.

Para el manejo del material biológico (esporas), se evaluaron diversas metodologías usando micromaceradores para tubos de 1.5 ml y con cantidades diferentes de esporas que variaron entre 10 y 1.000; sin embargo, no se obtuvieron buenos resultados al ensayar diversos protocolos de extracción y purificación de DNA (Zezé *et al.*, 1998; Van Tuinen, 1998); por esto, se emplearon las metodologías propuestas por Sanders *et al.* (1995), Redecker *et al.* (1997), y Van Tuinen *et al.* (1998) en las que la amplificación por PCR se realiza directamente sobre el material total de esporas trituradas (de 10 a 20, dependiendo del tamaño de la espора) usando maceradores directamente sobre los tubos de PCR. Para lograrlo fue necesario hacer una modificación ya que los resultados obtenidos fueron mejores al realizar la trituración de las esporas sobre un volu-

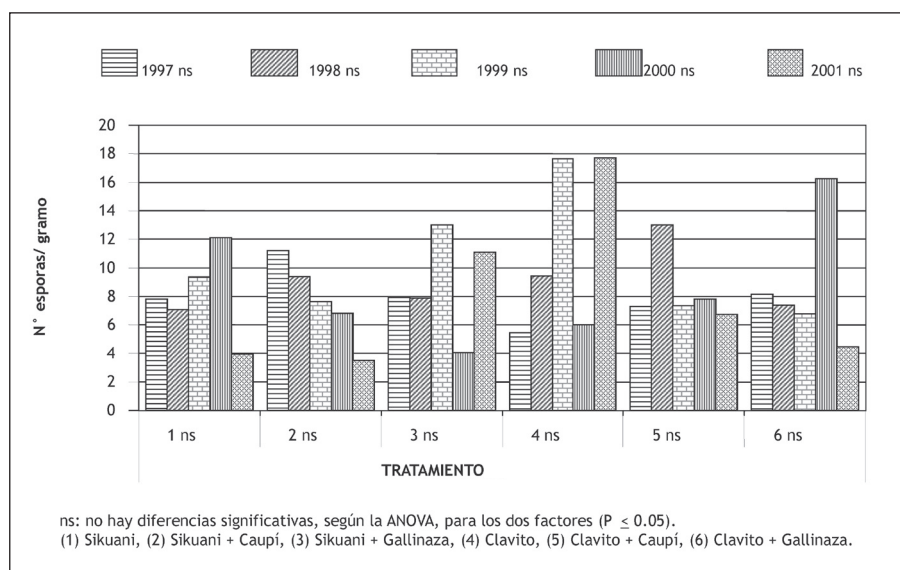


Figura 2. Esporas totales encontradas bajo cada tratamiento durante los cinco años del ensayo. El valor corresponde a esporas/gramo de suelo seco.

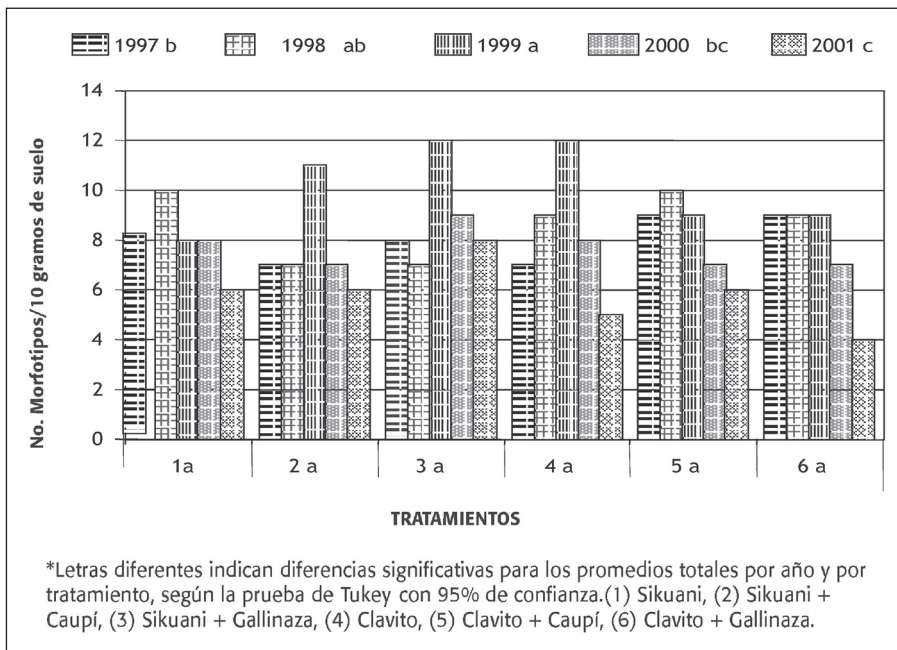


Figura 3. Número de morfotipos encontrados bajo cada tratamiento (1997-2001).

men de agua de 10µl y haciendo presión con dos láminas portaobjetos cubiertas con Sigmacote®, inmediatamente antes de realizar la amplificación.

Al realizar este ajuste metodológico, los resultados de la pre-amplificación con los *primers* VANS1 y NS21 no fueron fácilmente observables al realizar la electroforesis en gel de agarosa, debido posiblemente a la baja cantidad de DNA molde y a que el producto de la amplificación fue muy bajo para ser evidenciado en el gel. Teniendo en cuenta esto se realizó la PCR anidada directamente sobre el producto de la primera amplificación, usando los *primers* específicos para cada género en combinación con VANS1.

Los ciclos de amplificaciones fueron realizados siguiendo las recomendaciones para amplificación de Simon *et al.* (1993) ya que, aunque se evaluaron otros ciclos de amplificación, aquel fue el que presentó los resultados que se pueden observar en la Figura 4, al aumentar el tiempo de alineamiento de los *primers* de 45 segundos a 1 minuto.

Con la metodología empleada en este trabajo se logró obtener amplificaciones polimórficas para tres de los cinco géneros encontrados, obteniendo productos de amplificación reproducibles (Figuras 4 B y C). Para *Gigaspora*, se obtienen dos productos de 198 y 392 pb aproximadamente, que son reproducibles y consistentes para el género; en este caso, el fragmento de menor tamaño ha sido reportado al usar la com-

binación de primer VANS1 y VAGIGA (Simon *et al.*, 1993; Clapp *et al.*, 1995). En el caso del género *Glomus* sólo se obtuvo un producto de amplificación de aproximadamente 190 pb (Figuras 4 A y B); este tamaño se aproxima al encontrado por Simon *et al.* (1993), quienes

obtuvieron fragmentos de 188 pb para tres especies de *Glomus* (*G. mosseae*, *G. intraradices* y *G. vesiculiferum*). Para el género *Entrophospora* se obtuvieron tres productos de amplificación (Figura 4 B y D), aunque no en todos los casos se presentan los fragmentos de mayor tamaño (Figura 4 A), el producto de menor tamaño ha sido encontrado para la combinación de los *primers* VANS1 y VAACAU (Simon *et al.*, 1993).

Con los *primers* seleccionados en este trabajo se ha reportado la producción de un único producto específico; sin embargo, con los resultados obtenidos se puede observar la aparición de más de una banda para los géneros *Gigaspora* y *Entrophospora*, lo que puede ser el resultado de una mayor variabilidad para los morfotipos encontrados bajo las condiciones de los Llanos Orientales, que no han sido evaluadas previamente. Aunque la metodología empleada se estandarizó con buenos resultados, no se lograron productos de amplificación por PCR para los géneros *Acaulospora* y *Scutellospora*. Por esta razón es necesario evaluar otros *primers* específicos que permitan la identificación de estos dos géneros.

Al analizar la colonización de las raíces de maíz para los años 1999 y

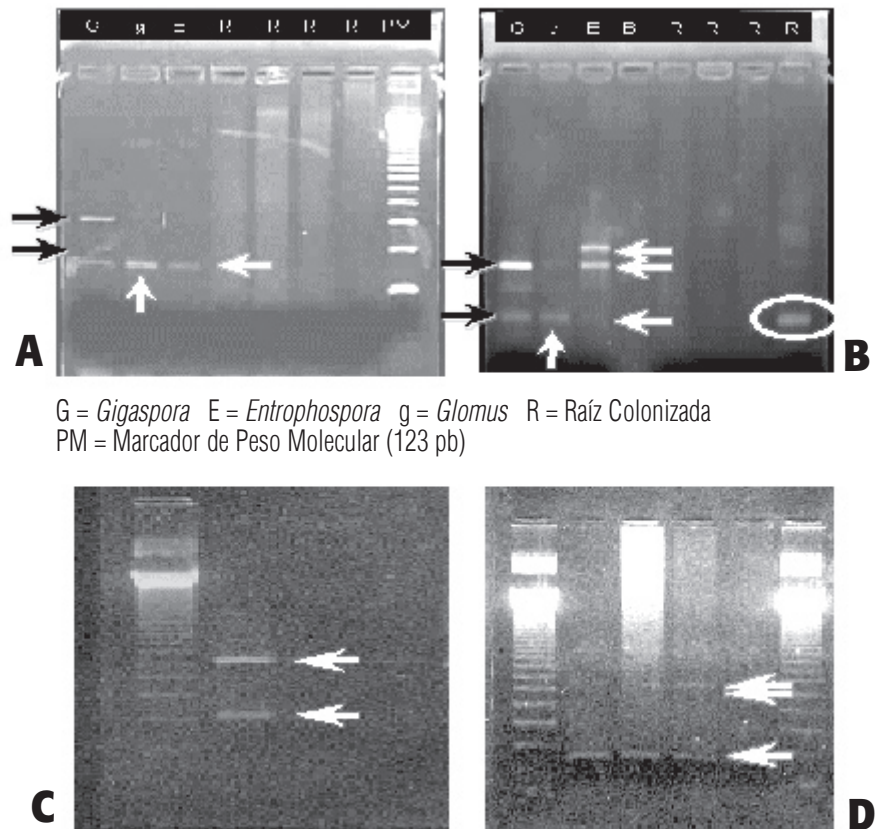


Figura 4. Resultado de la amplificación por PCR anidado usando los *primers* específicos para género (Simon *et al.*, 1993). A y B: *Glomus*; C: *Gigaspora*; D: *Entrophospora*.

Tabla 1. Porcentaje de colonización encontrado bajo cada tratamiento. Promedio de tres repeticiones por tratamiento y dos años (1999 y 2000).

Tratamiento	% Colonización
Sikuani sin materia orgánica	87.77
Sikuani + Caupí	92.42
Sikuani + Gallinaza	83.28
Clavitosin materia orgánica	86.11
Clavito + Caupí	94.00
Clavito + Gallinaza	94.69

2000, se encuentra una alta actividad micorrícica (>83% de colonización) de acuerdo con los valores presentados en la Tabla 1, sin observarse diferencias significativas entre tratamientos, lo cual puede ser el resultado del establecimiento de poblaciones MA adaptadas a las condiciones propias de los suelos analizados. Teniendo en cuenta que, en algunos casos, se ha reportado relación entre las esporas libres en el suelo y el porcentaje de colonización (Howeler *et al.*, 1987; Douds *et al.*, 1990), se puede inferir que para este caso la abundancia de esporas es producto de un alto nivel de colonización.

Por esta condición de colonización alta, se realizaron pruebas moleculares a partir de raíces colonizadas usando las mismas condiciones de amplificación empleadas para esporas MA, con el fin de tratar de establecer una metodología que permitiera identificar cuál de los géneros presentes en el suelo es el (los) que se encuentra(n) en simbiosis activa.

Para la extracción de DNA de las raíces se emplearon protocolos diseñados para la extracción de DNA de tejidos vegetales de maíz (*Zea mays*), papa (*Solanum tuberosum*) y yuca (*Manihot esculenta*), aplicados y estandarizados por el Laboratorio de Recursos Genéticos y Biotecnología Vegetal de CORPOICA en el C.I. Tibaitatá, obteniendo los resultados que se presentan en la Figura 4B, donde se observa el resultado de una prueba realizada a partir de DNA obtenido de la raíz de maíz colonizada, en el que se puede apreciar una banda que coincide con el patrón obtenido para las esporas de *Glomus*. Este resultado podría confirmar lo encontrado a partir del análisis de la comunidad de MA con relación a la abundancia relativa de esporas por género, ya que como se comentó antes, éste es el género dominante en la población y es posible que se encuentre en

simbiosis activa en mayor proporción que los demás.

Estos resultados son promisorios, ya que es posible emplear las metodologías para esporas aquí señaladas, con el fin de identificar géneros a partir de raíces colonizadas; sin embargo, como se trata de una técnica que está en proceso de desarrollo y estandarización, y no se ha aplicado de manera generalizada para identificar hongos en condiciones nativas, es necesario seguir realizando ensayos, primero bajo condiciones de simbiosis controladas sobre raíces jóvenes y con inóculos puros para poder validarlas con asociaciones naturales.

Por la presencia de cada uno de los géneros bajo la mayoría de las situaciones estudiadas, es importante evaluar estas poblaciones en términos de la diversidad que representan bajo cada tratamiento y año, por medio del índice de Shannon-Wiener (Tabla 2).

La diversidad calculada por medio del índice de Shannon-Wiener, que toma en cuenta dos componentes: el número

de grupos taxonómicos y la homogeneidad en la distribución de individuos dentro de cada grupo, no presenta diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, resulta interesante observar los cambios temporales y por tratamientos. El índice de diversidad se calculó a partir de los conteos por género, donde la variación temporal de la diversidad presenta un valor máximo para el año 2001, mientras permaneció casi constante durante el período 1997-1999, con un valor mínimo para el año 2000 (Tabla 2).

Bajo las condiciones evaluadas se observa una diversidad media y estable, si se tienen en cuenta los resultados reportados para poblaciones MA en diversos agroecosistemas. Collins *et al.* (1991) reportan valores de diversidad por el índice de Shannon-Wiener que varían entre 0.42 y 1.59, para dos localidades con cultivos de maíz y soya. Además, An *et al.* (1993) reportan fluctuaciones en el valor de este índice para poblaciones de MA, que varían entre 0.55 y 2, como resultado del análisis mensual de este parámetro en un cultivo de soya.

Con los resultados obtenidos para el análisis de la población global se observa de forma consistente que no hay un efecto de los tratamientos sobre las poblaciones de MA a nivel de género.

Aunque no en todos los casos, la evaluación de la abundancia de esporas y el porcentaje de colonización han sido correlacionados (Howeler *et al.*, 1987; Douds *et al.*, 1990; Black *et al.*, 1979), encontraron una correlación de 0.94 en un ensayo con trigo, de forma tal que se encuentra un

Tabla 2. Promedio del índice de diversidad Shannon-Wiener (\pm desviación estándar, n=18 para el año; n=15 para el tratamiento).

TRATAMIENTOS	Índice Shannon-Wiener	
	Promedio	Desv. Estand.
Sikuani Sin M.O	0,914	0,271
Sikuani Caupí	0,893	0,281
Sikuani Gallinaza	0,887	0,289
Clavito Sin M.O.	0,908	0,212
Clavito Caupí	0,829	0,301
Clavito Gallinaza	0,782	0,316
AÑOS		
1997	0,870	0,232
1998	0,882	0,253
1999	0,803	0,286
2000	0,781	0,344
2001	1,010	0,219
TOTAL	0.868 \pm 0.29	

mayor número de esporas a mayor porcentaje de colonización de la raíz, para un tipo particular de micorrizas. Esta correlación se explica porque las esporas de MA contienen grandes cantidades de lípidos, por lo que su producción requiere altas cantidades de C; en consecuencia, una raíz altamente colonizada presenta más conexiones hifales hacia la fuente de carbono para la producción de esporas (Douds *et al.*, 1990). Se puede inferir en este análisis que las poblaciones dominantes están en simbiosis activa bajo las condiciones evaluadas; teniendo en cuenta lo anterior, los géneros dominantes bajo las condiciones edáficas son en su orden: *Glomus*, *Acaulospora*, *Entrophospora*, *Gigaspora* y *Scutellospora*.

Efecto de las condiciones edáficas sobre las poblaciones de micorrizas. Aunque el análisis anterior no permitió detectar efectos significativos de los tratamientos evaluados en el comportamiento de poblaciones de MA, diversos ensayos han reportado que las variables químicas del suelo pueden incidir sobre las poblaciones de micorrizas arbusculares (MA) como es el caso del pH (Habte y Sodearjo, 1995; Skipper y Smith, 1979; Noyd *et al.*, 1996), el potasio (Howeler *et al.*, 1987; Ouimet *et al.*, 1996), el fósforo (Menge, 1977; Menge *et al.*, 1978; Yost y Fox, 1979; Amijje *et al.*, 1989; Ratnayake *et al.*, 1978; De Miranda *et al.*, 1989; Habte y Aziz, 1991) y las prácticas agropecuarias (Evans y Miller, 1990; Gavito y Miller, 1998; Nurlaeny *et al.*, 1996; Dodd *et al.*, 1990; Collins *et al.*, 1991; Howeler *et al.*, 1987).

Es necesario tener en cuenta la baja especificidad de las asociaciones micorrícicas con el hospedero, lo cual lleva a que éste no sea un factor determinante para el establecimiento de las asociaciones. Además, se ha demostrado que la especificidad ecológica puede ser aplicada por lo menos a algunas de las asociaciones micorrícicas en términos de su habilidad para colonizar las raíces, la cual puede verse afectada por las condiciones edáficas (McGonigle y Fitter, 1990). Los resultados del análisis de esporas indican una mejor adaptación a las condiciones del suelo para los morfotipos pertenecientes al género *Glomus*, reflejada en su mayor abundancia. Sin embargo, el efecto del hospedero sobre el establecimiento de poblaciones nativas de MA puede variar de acuerdo a la dependencia micorrícica del cultivo (Manjunath y Habte, 1991) sobre el cual se esté realizando la asociación, en com-

binación con las condiciones edáficas (Howeler *et al.*, 1987).

La "dependencia micorrícica" se define como el grado en el cual una planta es dependiente de su condición micorrícica para producir su máximo crecimiento bajo una condición de fertilidad dada, (Gerdemann, 1975, citado por Harley y Smith, 1983); en otras palabras, es la relación en producción de materia seca entre una planta no micorrizada y una micorrizada con niveles mínimos de fósforo (Sanders *et al.*, 1999). Howeler *et al.* (1987) encontraron que en maíz, usando niveles controlados de fósforo (0, 100 y 500 kg/ha), la dependencia es baja (26%) en comparación con otras especies vegetales que pueden presentar hasta un 95%; esta baja dependencia del maíz se debe principalmente a que presenta un sistema radical delgado y ramificado. Para las variedades de maíz utilizadas, Sikvani y Clavito, no se determinó la dependencia micorrícica pero los valores obtenidos para el porcentaje de colonización indican que la simbiosis es altamente activa (> 83%).

Por esto, a continuación se realiza el análisis de las correlaciones estadísticas entre los parámetros de suelo y la composición de la población de hongos MA, en términos de la abundancia relativa de los géneros encontrados.

Se seleccionaron aquellos parámetros de suelo que, de acuerdo con la revisión de literatura, podrían influir directa o indirectamente sobre el comportamiento de las poblaciones de MA. La información fue analizada teniendo en cuenta el

efecto de los tratamientos sobre las características del suelo (promedio 5 años) y las variaciones de éstas a través del tiempo (Tabla 3). Se hallaron diferencias altamente significativas para todos los parámetros seleccionados entre años de evaluación, de acuerdo con el análisis de varianza ($p \leq 0.001$) y la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Este análisis no mostró efecto de significativo los tratamientos en ninguno de los parámetros seleccionados.

Para determinar la relación entre estos parámetros y la composición de las poblaciones de MA, se realizó un análisis de regresión múltiple (Tabla 4); a partir de los valores promedio de las tres repeticiones de los parámetros de suelo seleccionados se realizaron los modelos ajustados por regresión múltiple (Stepwise), evaluando su significancia como posibles variables para predecir la abundancia de esporas por género.

Ya que los resultados obtenidos indican que hay variaciones temporales significativas, los análisis están encaminados a evaluar los cambios en la composición de la población en función del tiempo, con relación a los cambios en las condiciones edáficas. Para este análisis se seleccionaron como variables dependientes la abundancia de cada género, el índice de diversidad de Shannon-Wiener y el total de esporas, mientras los parámetros de suelo se trabajaron como variables independientes, para las regresiones que se discuten a continuación.

Los modelos de regresión múltiple presentaron coeficientes altamente significativos ($P \leq 0.001$ y $R^2 \geq 83.4$) (Tabla 4) para las

Tabla 3. Promedio del los resultados del análisis químico de suelo: pH, materia orgánica (MO), fósforo (P), aluminio (Al), potasio (K) y porcentaje de saturación de aluminio (%Al).

Tratamiento	pH	MO %	P (ppm)	Al ^{***} (cmol/kg)	K (cmol/kg)	Saturación (%Al)
ANAVA	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Sikvani	5,11	2,49	22,0	0,90	0,20	29,33
Sikvani + Caupí	4,86	2,16	19,5	0,75	0,14	32,37
Sikvani + Gallinaza	4,88	2,35	25,5	0,56	0,18	25,17
Clavito	5,08	1,99	17,2	0,99	0,16	34,80
Clavito + Caupí	5,30	2,21	22,8	0,95	0,17	35,26
Clavito + Gallinaza	5,02	2,11	21,6	0,56	0,21	25,03
Año						
ANAVA	**	**	**	**	**	**
1997	4,85 ab	1,71 c	12,0 d	1,54 a	0,19 ab	54,68 a
1998	5,07 ab	2,62 a	22,1 b	0,79 b	0,25 a	22,72 bc
1999	5,23 a	1,93 bc	19,4 bc	0,58 bc	0,16 ab	27,98 b
2000	5,24 a	2,42 ab	14,2 b	0,23 c	0,14 b	11,87 c
2001	4,82 b	2,42 ab	39,6 a	0,77 b	0,14 b	34,38 b

(**) Diferencias significativas según el análisis de varianza ($P \leq 0.001$); (NS) no hay diferencias significativas. Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($P \leq 0.001$).

Tabla 4. Coeficientes para los modelos de regresión (*Stepwise*), para predecir la abundancia de esporas de géneros de hongos MA bajo seis tratamientos y durante cinco años.

	R ²	PH	Variables independientes				
			MO	P	Al ⁺⁺⁺	K	% Al
Glomus	98.97	+ 0.1668	- 0.0788	----	----	----	----
Acaulospora	83.92	----	+ 0.0393	----	----	----	+ 0.001
Entrophospora	92.84	- 0.6721	+ 0.6951	----	----	- 3.9628	----
Gigaspora	94.78	- 0.6793	----	+ 0.0272	----	----	----
Scutellospora	83.40	----	+ 0.0964	----	----	----	----
Índice Shannon	96.40	----	+ 0.2937	----	----	----	+ 0.070
Total esporas	98.91	+ 0.8680	----	----	----	----	----

*Todos los coeficientes de correlación son altamente significativos ($P \leq 0.001$).

abundancias relativas de cada género, el total de esporas y el índice de diversidad, en función de algunos de los parámetros de suelo antes mencionados (Tabla 3). Los coeficientes de regresión presentan diferencias en cuanto a las variables predictivas para cada variable dependiente, lo que indica diferencias en cuanto a la adaptabilidad de cada género evaluado.

Debido a que el principal problema para el establecimiento de sistemas de producción en la zona evaluada es el bajo pH de los suelos, es importante evaluar su comportamiento con relación a otros parámetros que han sido correlacionados con las condiciones de acidez. Por ejemplo, para los años 1999 y 2000, en los que el pH aumentó alcanzando valores > 5.2 , los contenidos de aluminio intercambiable (Al⁺⁺⁺) presentaron los menores valores; este tipo de correlación negativa señala el efecto acumulativo de los tratamientos con materia orgánica, ya que para el año 2001, en el que no se realizó aplicación de Caupí o gallinaza, el pH disminuyó nuevamente alcanzando un valor de 4.8, mientras el contenido de aluminio aumentó. Lo mismo ocurrió con la saturación de aluminio (%Al), aunque es menos evidente, ya que este valor depende de otros elementos menores presentes en el suelo.

Este tipo de relación negativa, también se presenta entre el contenido de aluminio y fósforo, ya que a medida que aumenta el contenido de aluminio, disminuye la cantidad de fósforo disponible. Se observa un aumento del P disponible con respecto al año de inicio del ensayo, para los años en los que el aluminio disminuye (1999 y 2000), pero la correlación negativa que se espera para estos dos parámetros no es clara en este caso.

En cuanto a las poblaciones de hongos MA, el fósforo puede llegar a ser un componente importante ya que varios

autores han reportado un efecto directo de este elemento sobre el desarrollo y la efectividad de la colonización. Sin embargo, bajo las condiciones evaluadas, en las que el contenido de fósforo permanece relativamente bajo, no es un factor determinante para el desarrollo micorrízico, ya que no alcanza valores que puedan inhibir la asociación micorrízica. Algunos ejemplos de las relaciones encontradas, se encuentran representados en función del tiempo en la Figura 5.

El contenido de materia orgánica, resultó ser la mejor variable para predecir la composición de la comunidad, afectando cinco de las siete variables dependientes evaluadas. Este parámetro presenta coeficientes positivos para la abundancia relativa de *Acaulospora*, *Entrophospora*, *Scutellospora* (Figura 5A) y el índice de diversidad calculado y un coeficiente negativo para la abundancia relativa del género *Glomus*.

De la misma forma el pH se encuentra como variable predictiva de la abundancia de *Entrophospora* (Figura 5B), *Gigaspora*, *Glomus* (Figura 5D), y el total de esporas (Tabla 4), con coeficientes positivos para las dos primeras y negativos para las dos últimas mencionadas.

Por otro lado, las variables correspondientes al contenido de fósforo y potasio en el suelo son significativas para predecir las abundancias relativas de los géneros *Gigaspora* (Figura 5C) y *Entrophospora*, respectivamente (Tabla 4).

La concentración de aluminio intercambiable en el suelo (Al) no es significativa en ninguno de los modelos de regresión múltiple encontrados. Esto se explica por la gran correlación que existe entre esta variable y el pH del suelo; sin embargo, por el interés particular que representa el aluminio intercambiable para este trabajo, su efecto –aunque no

es significativo en los análisis de regresión múltiple– indicaría que las variaciones en este tipo de suelos modelan algunos de los parámetros poblacionales evaluados.

El género *Acaulospora* parece sensible a los cambios edáficos que incluyen aumento de pH; esto coincide con lo reportado por Wilson *et al.* (1987), quienes aislaron esporas de *Acaulospora mellea* a partir de suelos ácidos con un valor de pH de 4.4. Otros investigadores (Siquiera *et al.*, 1984) han reportado que especies de este género presentan preferencias exclusivamente por pH bajos.

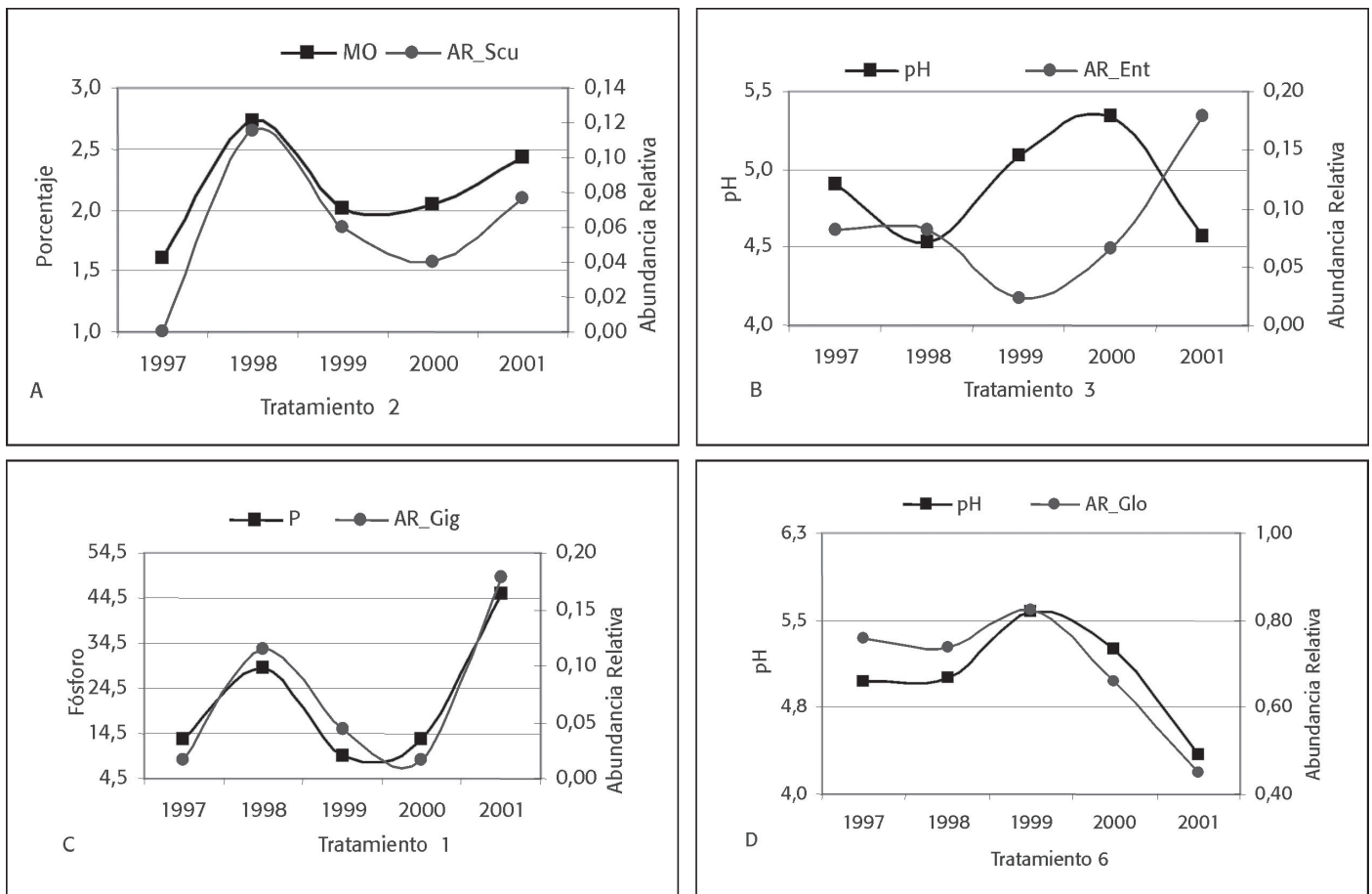
El contenido de aluminio intercambiable en el suelo presentó una disminución continua desde el inicio de ensayo (1997) hasta el año 2000, seguida por un marcado aumento en el 2001, bajo todos los tratamientos, incluso en los que no hay aplicación de materia orgánica. Estas diferencias son significativamente mayores para todos los tratamientos en el primer año y la reducción es consecuente con lo encontrado para la variable fósforo, ya que a medida que disminuye el Al⁺⁺⁺, el contenido de fósforo disponible aumenta (Tabla 3).

Conclusiones

El estudio del comportamiento de las poblaciones de MA en el Piedemonte llanero, C.I. La Libertad, permite concluir que bajo las condiciones del presente trabajo se observan niveles relativamente altos de esporas nativas en el suelo. Estas poblaciones presentan una diversidad media-alta (según géneros) de acuerdo con el índice de Shannon-Wiener, al compararla con otros sistemas de producción agrícola reportados en la literatura. El comportamiento de esta población fue estable en el tiempo y no se vio afectado ni por las aplicaciones de materia orgánica, ni por el hospedero evaluado.

El género micorrízico predominante con mayor abundancia relativa dentro de la población fue *Glomus*, mostrando a su vez una mayor diversidad (12 morfotipos), seguido por *Acaulospora* (6 morfotipos), *Gigaspora* (4 morfotipos) y *Entrophospora* y *Scutellospora* (con un solo morfotipo cada uno).

El género *Glomus* mostró una mayor persistencia a través del tiempo, lo que refleja su capacidad de adaptación a las condiciones edáficas del Piedemonte llanero y, por lo tanto, ofrece un alto potencial para su uso como biofertilizante.



MO: materia orgánica del suelo (%).
AR_Scu: abundancia relativa *Scutellospora*.
AR_Ent: abundancia relativa *Entrophospora*.

AR_Gig: abundancia relativa *Gigaspora*.
AR_Glo: Abundancia relativa *Glomus*.

Figura 5. Representación gráfica de algunas de las relaciones entre variables, encontradas mediante con los modelos de regresión múltiple (*Stepwise*).

Se pudo establecer que las condiciones edáficas modelan la composición de las poblaciones de MA dentro de las cuales el pH del suelo y los contenidos de materia orgánica pueden ser empleados como indicadores del comportamiento de las MA. Sin embargo, las aplicaciones de materia orgánica (Caupí y gallinaza) no tuvieron un efecto determinante sobre las poblaciones posiblemente debido a las altas tasas de mineralización bajo las condiciones del experimento.

En los suelos del Piedemonte llanero existe una estrecha relación (de tipo inverso) entre el pH y el contenido de Al^{+++} , que se refleja en las poblaciones de hongos MA, mostrándose un efecto del contenido de aluminio intercambiable inverso al presentado por el pH del suelo.

El contenido de materia orgánica bajo las condiciones evaluadas resulta ser altamente determinante para el establecimiento de poblaciones MA y muestra una correlación positiva con las abundancias relativas de *Acaulospora*,

Entrophospora y *Scutellospora* y, por lo tanto, con el índice de diversidad de Shannon-Wiener. Además, se presenta una relación negativa con el género *Glomus*.

Los contenidos de fósforo en el suelo registrados se mantienen durante todo el periodo de evaluación con valores de aproximadamente 40 ppm, sin alcanzar en ningún momento valores que inhiban el desarrollo de micorrizas arbusculares. Por esto, a pesar de los cambios que presenta este parámetro, sólo tiene incidencia sobre las poblaciones de *Gigaspora*, en este caso con un coeficiente positivo.

Esta investigación permitió estandarizar metodologías para el manejo del material biológico (esporas) y el uso de técnicas moleculares (PCR) a partir de una cantidad mínima de material fúngico (esporas y/o raíces colonizadas). La herramienta ofrece un gran potencial para solucionar los problemas de identificación y caracterización de esporas por

los métodos convencionales y, además, para determinar los simbiontes activos en los procesos de micorrización, lo cual permite profundizar en el entendimiento de la dinámica de las poblaciones de MA y de sus interacciones con el hospedero y con el ambiente.

Los coeficientes de regresión encontrados son diferentes para cada género evaluado, indicando diferencias adaptativas entre éstos. Por ello, los estudios de poblaciones de hongos MA y su relación con el suelo permiten seleccionar aislamientos efectivos (rendimiento) y que se establezcan de forma estable (adaptados a condiciones bióticas y abióticas).

BIBLIOGRAFÍA

- Amijje F, Tinker P.B. and Stribley D.P. 1989. The development of endomycorrhizal root systems. *New Phytol* 111: 435-446.
An Z. Q., Hendrix J.W., Ferriss R.S. and Henson G.T. 1993. The influence of crop

rotation and soil fumigation a mycorrhizal fungal community associated with soybean. *Mycorrhiza* 3: 171-182.

Baquero J.E. and Rojas L. 2001. Interaction effects of organic materials and lime on grain yield and nutrient acquisition of three maize varieties grown in an oxisol of the Colombian Eastern Plains. XIV International Colloquium of Plant Nutrition. Hannover, Alemania. *Plant Nutrition - Food Security and Sustainability of agro-ecosystems through basic and applied research.* W.J. Horst *et al.* Edit Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 982-983.

Black R. and Tinker P.P. 1979. The development of endomycorrhizal root system. *New Phytol* 112: 401-413.

Brundrett, M. 1991. Micorrizas in natural ecosystems. *Adv Ecology Research* 21: 171-313.

Clapp, J., Young, J., Merryweather, J. and Fitter, A. 1995. Diversity of fungal symbionts in arbuscular mycorrhizas from natural community. *New Phytol* 130: 259-265.

Collins, N., Pflieger, F., Crookston, R., Simmons, S. and Coipeland, P. 1991.

Vesicular-Arbuscular mycorrhizas respond to corn and soybean cropping history. *New Phytol* 117: 657-663.

Dodd J.C., Arias Y., Koomen Y. and Hayman D.S. 1990. The management of populations of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in acid-infertile of savanna ecosystem. *Plant and Soil* 122: 229-240.

Douds D.D. Jr., Galvez L., Janke R.R. and Wagoner P. 1995. Effect of tillage and farming system upon populations and distribution of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 52: 111-118.

Douds D.D., Jr., Galvez L., Bécard G. and Kapulnik Y. 1990. Regulation of arbuscular mycorrhizal development by plant host and fungus species in alfalfa. *New Phytol* 138: 27-35.

Evans D.G. and Miller M.H. 1990. The role of the external mycelial network in the effect of soil disturbance upon vesicular-arbuscular mycorrhizal colonization of maize. *New Phytol* 114: 65-71.

Gavito M.E. and Miller M.H. 1998. Changes in mycorrhiza development in maize induced by crop management practices. *Plant and soil* 198: 185-192.

Giovannetti M. and Mosse B. 1980. An evaluation of technique for measuring vesicular - arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol* 84: 489-500.

Habte M. and Aziz T. 1991. Relative importance of Ca, N, and P in enhancing mycorrhizal activity in *Leucaena Leucocephala* ground in oxisol, subjected to simulated erosion. *Journal of Plant Nutrition* 14(5): 429-442.

Habte M. and Soedarjo M. 1995. Mycorrhizal inoculation effect in *Acacia mangium* grown in an acid oxisol amended with gypsum. *Journal of plant nutrition* 18(10): 2059-2073.

Harley, J.L. and Smith, S.E. 1983. *Mycorrhizal Symbiosis.* Ed. Academic Press, Londres.

Harrison, M. and Van Buuren, M. 1995. A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature* 378(7): 626-629.

Howeler R.H., Sieverding E. and Saif S. 1987. Practical aspects of mycorrhizal tech-

nology in some tropical crops and pastures. *Plant and Soil* 100: 249-283.

Lanfranco, L., Wyss, P. Marzachi, C. and Bonfante, P. 1995. Generation of RADP-PCR primers for the identification of isolates of *Glomus mosseae*, an arbuscular mycorrhizal fungus. *Mol. Ecol.* 4: 61-68.

Manjunath A. and Habte M. 1991. Relationship between mycorrhizal dependency and rate variable associated with P uptake, utilization and growth. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 22(13 -14): 1423-1437.

Mcgonigle T. and Fitter A. 1990. Ecological specificity of vesicular mycorrhizal associations. *Mycological Research* 94(1): 120-122.

Menge J.A., Steirle D., Bagyaraj D.J., Johnson E.L.V. and Leonard R.T. 1978. Phosphorus concentrations in plants responsible for inhibition of mycorrhizal infection. *New Phytol* 80: 575-578.

de Miranda J.C.C., Harris P.J. and Wild A. 1989. Effects of soil and plant phosphorus concentrations on vesicular-arbuscular mycorrhiza in sorghum plants. *New Phytol* 112: 405-410.

Noyd R.K., Pflieger F.L. and Norland M.R., 1996. Field responses to added organic matter, arbuscular mycorrhizal fungi, and fertilizer in reclamation of taconita iron ore tailing. *Plant and Soil* 179: 89-97.

Nurlaeny N., Marschner H., and George E. 1996. Effects of liming and mycorrhizal colonization on soil phosphate depletion and phosphate uptake by maize (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.) grown in two tropical acid soils. *Plant and Soil* 181: 275-285.

Ouimet R., Camiré C. and Furlan V. 1996. Effect of soil K, Ca and Mg saturation and endomycorrhization on growth and nutrient uptake of sugar maple seedlings. *Plant and Soil* 179: 207-216.

Phillips J.M. and Hayman D.S. 1970. Improved procedures for clearing and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 55: 158-161.

Ratnayake M., Leonard R.T. and Menge J.A. 1978. Root exudation in relation to supply of phosphorus and its possible relevance to mycorrhizal formation. *New Phytol:* 81:543-552.

Redecker, D., Thierfelder, H., Walker, C. and Werner, D. 1997. Restriction Analysis of PCR-amplified Internal Transcribed Spacers of Ribosomal DNA as a tool for Species Identification in Different Genera of the Order Glomales. *Appl. Environ. Microbiol* 63(5): 1756-1761.

Rojas L.A., Lozano A. y Rodríguez F. 1998. Assessment of aluminium dynamics as affected by adding organic materials in a Colombian Oxisol. Montpellier, France. 16^o World Congress of Soil Science. Scientific Registration 2203. Symposium 40.

Rojas L.A., Melo G. y Lozano A. 2000. Efecto de la aplicación de materiales orgánicos en la dinámica del fósforo en un oxisol de Colombia. X Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo. Medellín, Colombia. Octubre 11-13, p. 26.

Rojas L.A.; Baquero J.E., Ramírez M., Rodríguez F. y Roveda G. 2001. Organic matter and its relation to Maize crops on acid soils of Colombia. XIV International Colloquium of Plant Nutrition. Hannover, Alemania. *Plant Nutrition - Food Security and Sustainability of agro - ecosystems through*

basic and applied research. W.J. Horst *et al.* Edit Kluwer Academic Publishers. Netherlands, pp. 980-981.

Roveda G., Rojas A., Ramírez M., Alegría E., Corredor G., 1998. Efecto de la asociación arbuscular con plantas de maíz bajo condiciones de suelos de los Llanos Orientales de Colombia. *Memorias IX Congreso Colombiano de la Ciencia del Suelo.* Paipa, Boyacá. Octubre 21-24, pp. 211-215.

Urdaneta P. y Roveda G. 1999. Efecto de las prácticas agronómicas (adición de P y micorrizas arbusculares) en plantas de maíz (*Zea mays* L.) en suelos ácidos de Colombia. Tesis. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias Básicas. Biología. Octubre 1999.

Sanders, I., Alt, M., Groppe, K., Boller, T. and Wiemken, A. 1995. Identification of ribosomal DNA polymorphisms among and within spores of Glomales: application to studies on the genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *New Phytol* 130: 419-427.

Sanders, I.R., Koide, R.T. and Shumway, D.L. 1999. Diversity and structure in natural communities: The role of Mycorrhizal symbiosis. En: *Mycorrhiza, Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology*, Second edition, Springer-Berlin.

Shenk, N.C. and Perez, Y. 1990. Manual for the identification of VA Mycorrhizal Fungi. Synergistic Publications, Gainesville - USA.

Sieverding, E. 1984. Curso Nacional sobre Micorrizas; Aspectos básicos de la investigación en micorrizas vesicular-arbusculares. Universidad Nacional de Palmira.

Simon, L., Lévesque, R. and Lalonde, M. 1993. Identification of Endomycorrhizal Fungi Colonizing Roots by Fluorescent Single-Strand Conformation Polymorphism-Polymerase Chain Reaction. *Appl. Environ. Microbiol* 59(12): 4211-4215.

Siqueira, J.O., Hubbel, D.H. and Mahmud, A.W. 1984. Effects of liming on spore germination, germ tube growth and root colonization by vesicular - arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 76: 115-124.

Skipper H.D. and Smith G.W. 1979. Influence of soil pH on the soybean-endomycorrhizal symbiosis, *New Phytol* 53: 559-563.

Van Tuinen, D., Jacquot, E., Zhao, B., Gollotte, A. and Gianinazzi-Pearson, V. 1998. Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 25S rDNA-targeted nested PCR. *Molec. Ecol.* 7: 879-887.

Wilson, D.O. 1987. Differential plant response to inoculation with two VA mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 110: 69-75.

Yost R.S. and Fox R.L. 1979. Contribution of mycorrhiza to P nutrition of crops growing on an oxisol. Hawaii Agric. Exp. Stn. Univ. of Hawaii. *Journal Series* 2384:903-908.

Zeze, A., Ophel-Kellr, K. and Smith, S. 1998. DNA isolation and development of molecular tools for identification and detection of VA Mycorrhizal fungi. En: *Mycorrhizal Manual*, Ajit Varma (Ed), Springer, New York.