

**CARACTERIZACIÓN DE HONGOS MICORRÍVICOS ARBÚSCULARES ASOCIADOS
A TRES CLONES DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) EN EL YOPAL (CASANARE),
COLOMBIA**

**ÁNGELA DANIELA HERNÁNDEZ BELTRÁN
MAYTE MONROY DÍAZ**

**UNIVERSIDAD DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA
FACATATIVÁ**

2017

**CARACTERIZACIÓN DE HONGOS MICORRÍMICOS ARBÚSCULARES ASOCIADOS
A TRES CLONES DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) EN EL YOPAL (CASANARE),
COLOMBIA**

**ÁNGELA DANIELA HERNÁNDEZ BELTRÁN
MAYTE MONROY DIAZ**

**Tesis de grado presentada (o) como requisito parcial para optar al título de:
Ingeniero Agrónomo**

Director:

DANNY DANIEL CUBILLOS PEDRAZA

Microbiólogo Agrícola y Veterinario

M. Sc. Desarrollo rural

**UNIVERSIDAD DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA
FACATATIVÁ**

2017

**CARACTERIZACIÓN DE HONGOS MICORRÍDICOS ARBÚSCULARES ASOCIADOS
A TRES CLONES DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) EN EL YOPAL (CASANARE),
COLOMBIA**

**ÁNGELA DANIELA HERNÁNDEZ BELTRÁN
MAYTE MONROY DIAZ**

APROBADO

Vilma Moreno Melo

Zootecnista Ph. D.

Decana Académica

Liz Karen Ruiz Bohórquez

Ingeniera Agrónoma

Coordinadora del Programa Académico

**CARACTERIZACIÓN DE HONGOS MICORRÍMICOS ARBÚSCULARES ASOCIADOS
A TRES CLONES DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) EN EL YOPAL (CASANARE),
COLOMBIA**

**ÁNGELA DANIELA HERNÁNDEZ BELTRÁN
MAYTE MONROY DIAZ**

APROBADO

Danny Daniel Cubillos Pedraza
Microbiólogo Agrícola y Veterinario
M. Sc. Desarrollo rural
Director

Carlos A. Gómez
Qco. MSc. Ciencias Agrarias
Docente Programa de Ing. Agronómica
Jurado

Liz Karen Ruíz Bohórquez
I. A. MSc. Biología
Coordinadora del Programa Académico
Jurado

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de Colombia, por permitirnos utilizar sus espacios y facilitarnos los procesos.

A Deissy Juyó por abrirnos un lugar en el laboratorio de Biotecnología, direccionar y apoyar este trabajo.

A Julián Cárdenas, quién nos vinculó a su tesis y confió en nosotras para llevar a cabo este proyecto.

A don Jesús, por prestarnos gran disposición y compartir sus conocimientos con nosotras.

Al profesor Jairo Cuervo, por la asesoría que nos prestó desinteresadamente y acogernos como alumnas suyas.

A nuestros padres, Martha Lucía Beltrán, Hernando Monroy y María Teresa Díaz, por su apoyo incondicional y acompañamiento durante todo este proceso.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
JUSTIFICACIÓN	2
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
1. OBJETIVOS	4
1.1. Objetivo General	4
1.2. Objetivos Específicos	4
2. MARCO TEÓRICO	5
2.1. Simbiosis planta- Hongos Micorrícicos	5
2.2. Micorriza	5
2.2.1. División de las Micorrizas	5
2.3. Hongos Micorrícicos Arbusculares (HMA)	5
2.3.1. Clasificación de los HMA	6
2.3.2. Distribución de los Hongos micorrícicos	7
2.3.3. Fisiología y anatomía de la colonización Micorrízica arbuscular	7
2.3.4. Esporas de HMA	7
2.3.5. Germinación de esporas de HMA	8
2.3.6. Colonización de HMA	8
2.4. El cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) y su relación con HMA	8
2.4.1. Material Vegetal (Clones CCN 51, FSA 12 e ICS 95)	9
2.4.2. Importancia del cacao	10
2.5. Área de estudio	10
2.5.1. Paisajes	10
2.5.2. Uso del suelo	10
2.6. Metodologías para tinción de raíces y extracción de esporas	11
2.6.1. Tinción de raíces (Phillips & Hayman, 1970)	11
2.6.2. Determinación de porcentaje de colonización (método de intersección de la grilla, (Tennant, 1975))	11
2.6.3. Establecimiento cultivo trampa (Sieverding, 1991)	11
2.6.4. Extracción de esporas a partir del suelo de cultivos trampa (Gerdemann & Nicolson, 1963) con modificaciones de INVAM (West Virginia University, 2014)	12
3. MATERIALES Y MÉTODOS	13

3.1. Área de estudio	13
3.2. Muestreo de suelo rizosférico y raíces de cacao	14
3.3. Análisis físico químico de Suelo	15
3.4. Colonización de HMA en raíces de cacao	15
3.4.1. Tinción de raíces	15
3.4.2. Determinación de porcentaje de colonización (Método de intersección de la grilla)	15
3.5. Identificación de HMA por morfología de esporas	15
3.5.1. Establecimiento de cultivo trampa	15
3.5.2. Extracción de esporas a partir del suelo de cultivos trampa	16
3.5.3. Identificación de morfo-tipos a géneros	16
3.6. Diseño Experimental y análisis estadístico	17
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
4.1. Colonización micorrícica	18
4.1.1. Porcentaje de colonización	18
4.1.2. Aspectos anatómicos de la colonización micorrícica	21
4.2. Recuento de esporas	22
4.3. Identificación de HMA	25
4.3.1. Análisis morfológico	25
4.3.2. Descripción de morfotipos de HMA de los géneros Identificados	25
4.3.3. Morfotipos identificados en el clon CCN 51	28
4.3.4. Morfotipos identificados en el clon FSA 12	30
4.3.5. Morfotipos identificados en el clon ICS 95	30
4.4. Análisis físico químico del suelo	34
4.4.1. Porcentaje de colonización y su relación con pH y porcentaje de materia orgánica del suelo	34
4.4.2. Porcentaje de colonización y su relación con el contenido de P disponible en el suelo	35
4.4.3. Porcentaje de colonización y su relación con la acidez intercambiable del suelo	36
4.4.4. Simbiosis de HMA y su relación con la Textura del suelo	37
5. CONCLUSIONES	39
6. RECOMENDACIONES	40
7. BIBLIOGRAFÍA	41

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Clasificación taxonómica de los hongos micorrícicos arbusculares	7
Figura 2. Metodología general del estudio	13
Figura 3. Lugares muestreados en el cultivo de cacao	14
Figura 4. Porcentaje de colonización total de HMA en raíces de tres clones de cacao	19
Figura 5. Distribución del porcentaje de colonización entre los clones Evaluados	20
Figura 6. Estructura de los hongos micorrícicos arbusculares (HMA)	21
Figura 7. Recuento de esporas de HMA en suelo rizosférico de tres clones de cacao	23
Figura 8. Distribución del número de esporas entre los clones evaluados	24
Figura 9. Morfotipos de esporas de Hongos Micorrícicos Arbusculares identificados en el clon CCN 51 del género <i>Glomus</i> .	26
Figura 10. Morfotipo de espора del Hongo Micorrícico Arbusculares identificado en el clon CCN 51 del género <i>Acaulospora</i>	26
Figura 11. Morfotipos de esporas de Hongos Micorrícicos Arbusculares identificados en el clon FSA 12 del género <i>Glomus</i> .	27
Figura 12. Morfotipos de esporas de Hongos Micorrícicos Arbusculares identificados en el clon ICS 95 del género <i>Glomus</i> y del género <i>Acaulospora</i> .	27
Figura 13. Promedio de porcentaje de colonización, pH y porcentaje de M.O.	35
Figura 14. Promedio porcentaje de colonización y concentración de fósforo	36
Figura 15. Porcentaje de colonización y su relación con el porcentaje de saturación de aluminio	38

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Características por clon	10
Tabla 2. Porcentaje de colonización de HMA en raíces de cacao	18
Tabla 3. Análisis de varianza porcentaje de colonización	19
Tabla 4. Prueba de comparación de medias de Tukey	21
Tabla 5. Recuento de esporas a partir de 10 g de suelo	22
Tabla 6. Análisis de varianza conteo de esporas	23
Tabla 7. Prueba de comparación de medias para el conteo de esporas entre Clones	25
Tabla 8. Morfotipos encontrados en los clones CCN 51, FSA 12 e ICS 95 de Cacao	25
Tabla 9. Recuento de esporas en 100 g de suelo seco de cada morfotipo identificado en los tres clones de cacao	31
Tabla 10. Análisis de varianza de verosimilitud máxima para los morfotipos asociados a los clones de cacao	33

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Análisis fisicoquímico del suelo	50
Anexo 2. Protocolo de Phillips y Hayman para tinción de raíces	50
Anexo 3. Método de intersección de la grilla, Tennant 1975	52
Anexo 4. Protocolo de Sieverding para montaje de cultivos trampa	52
Anexo 5. Protocolo de Gerdermann y Nicolson con modificaciones del INVAM para extracción de esporas	54
Anexo 6. Análisis de varianza para el porcentaje de colonización entre clones	55
Anexo 7. Prueba de comparación de medias de Tukey	56
Anexo 8. Análisis de varianza conteo de esporas	56
Anexo 9. Prueba de comparación de medias para el conteo de esporas entre clones	57
Anexo 10. Análisis de varianza de verosimilitud máxima entre clones y morfotipos identificados	58

CARACTERIZACIÓN DE HONGOS MICORRÍCICOS ARBÚSCULARES ASOCIADOS A TRES CLONES DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) EN EL YOPAL (CASANARE), COLOMBIA

RESUMEN

Se caracterizó la población de Hongos Micorrícicos Arbusculares (HMA) asociada a tres clones de cacao en el municipio de El Yopal – Casanare. La colonización se evaluó según los métodos de Phillips & Hayman (1970) y Tennant (1975). La extracción de esporas se realiza con la técnica de Gerdermann & Nicolson (1963) modificada con INVAM (2014). La asignación de géneros se realizó a partir de la descripción morfológica de esporas. Los tres clones evaluados mostraron simbiosis con HMA, presentando porcentaje de colonización en rangos medios a altos pero la abundancia de esporas fue baja. Las características físicas y químicas del suelo incidieron en la simbiosis HMA – Planta. Se identificaron once morfotipos, clasificados en los géneros *Glomus* y *Acaulospora*; siendo *Glomus* el de mayor abundancia.

Palabras clave: Hongos Micorrícicos Arbusculares, colonización, morfotipos

**CHARACTERIZATION OF FUNGI MYCORRHIZAL ARBUSCULAR ASSOCIATES TO
THREE CLONES OF COCOA (*Theobroma cacao* L.) IN YOPAL (CASANARE),
COLOMBIA**

ABSTRACT

The population of Arbuscular mycorrhizal fungi associated to three cocoa clones in the municipality of Yopal - Casanare was characterized. Colonization was evaluated by the methods of Phillips & Hayman (1970) and Tennant (1975). Spore extraction by the Gerdermann & Nicolson technique (1963) modified with INVAM (2014). Genotyping was performed from of the morphological description of spores. The three clones evaluated showed symbiosis with HMA, presenting percentage of colonization in medium to high ranges but the abundance of spores was low. The physical and chemical characteristics of the soil influenced symbiosis HMA - plant. Eleven morphotypes were identified, classified in the genus *Glomus* and *Acaulospora*; being *Glomus* the one of greater occurrence.

Keywords: Arbuscular mycorrhizal fungi, colonization, morphotypes

INTRODUCCIÓN

En los suelos de la Orinoquia colombiana, sólo el 8,3% son aptos para la agricultura comercial e intensiva (Riveros, 2003). Estos se caracterizan por ser en su mayoría ácidos, lo que dificulta la disponibilidad de algunos nutrientes y limita el desarrollo de las plantas. Esto implica la utilización de significativas cantidades de fertilizantes y correctores de acidez que influyen directamente en la biología del suelo (Corpes Orinoquia, 2004).

Dentro de los recursos bióticos del suelo, los microorganismos juegan un papel muy importante en los sistemas productivos debido a su intervención en procesos de descomposición de la materia orgánica, mineralización y reciclaje de nutrientes, así como facilitar su disponibilidad (Rojas, 2010).

Se ha reportado que los hongos micorrícicos arbusculares (HMA), proporcionan efectos benéficos como: i) aumento en la capacidad de absorción de las raíces; ii) aumento en la movilización y transferencia de elementos del suelo a la planta; iii) fomentan el desarrollo de microorganismos solubilizadores de P en la micorrizósfera (Ordoñez *et al.*, 2016), y iv) asociaciones mutualistas con otras especies de bacterias y hongos, por tanto, esta sinergia puede contribuir en el control biológico de fitopatógenos y en la estimulación del crecimiento vegetal (Cano, 2011; King, 2011).

Los factores que influyen en la distribución del inóculo de HMA (micelio externo y esporas) son diversos. Entre ellos se encuentran, la especie vegetal predominante, el pH, humedad del suelo, conductividad, contenido de fósforo, nutrientes y metales pesados (Posada *et al.*, 2012).

El cacao es considerado un cultivo promisorio y rentable en la región de la Orinoquia (Benavides, 2013). La dinámica actual en el mercado regional lo ha convertido en el producto con potencial de crecimiento y apoyo institucional (Benavides, 2013). El proyecto desarrollado encuentra vinculado a la tesis de Maestría, Efecto de la simbiosis de Hongos Micorrícicos Arbusculares con plántulas de cacao (*Theobroma cacao* L.) en el tizón de plántulas (*Phytophthora palmivora*).

Por lo anterior, y teniendo en cuenta que no se encuentra información detallada con respecto a los géneros de HMA asociados al cultivo de cacao en esta región, se caracterizó los hongos micorrícicos arbusculares asociados a tres clones de cacao ((*Theobroma cacao* L.), (Clones CCN 51, FSA 12 e ICS 95)) en El Yopal (Casanare), Colombia.

JUSTIFICACIÓN

Los Hongos Micorrícicos Arbusculares (HMA) confieren a la planta efectos benéficos. Entre ellos, la resistencia inducida a algunos fitopatógenos (Jung *et al.*, 2012) que afectan los índices de producción en el cultivo de cacao. Por tanto, para estudiar el Efecto de la simbiosis de Hongos Micorrícicos Arbusculares en plántulas de cacao (*Theobroma cacao* L.) en el tizón de plántulas (*Phytophthora palmivora*) se debe caracterizar los HMA con el fin de identificar los géneros asociados al cultivo, específicamente a los clones CCN 51, FSA 12 e ICS 95, siendo este el objetivo general de este trabajo, y a partir de los resultados obtenidos estudiar la simbiosis existente, y su efecto en la relación planta – Género de HMA – Patógeno.

El cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) es altamente dependiente de HMA en suelos poco fértiles como los de la Orinoquia Colombiana (Corpes Orinoquia, 2004; Schroeder *et al.*, 2005). Esto hace que el conocimiento de la diversidad de estos hongos, así como la simbiosis que establecen con las plantas de cacao y su relación con los factores fisicoquímicos del suelo sea de gran importancia en el contexto de nutrición del cultivo. Además, es necesario aportar a los inventarios de micorrizas arbusculares ya que el conocimiento de la diversidad de estos hongos en la región es limitado, y tener esta información contribuirá al desarrollo de futuras investigaciones que incluyan propagación, inoculación y formulación de productos de HMA asociados al cultivo de cacao, específicamente a los clones CCN 51, FSA 12 e ICS 95.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Patógenos como *Phytophthora palmivora* pueden ocasionar daños considerables en el cultivo de cacao (Pérez *et al.*, 2010), razón por la cual se hace necesario estudiar técnicas que minimicen estos daños y su impacto ambiental. Los Hongos micorrícicos arbusculares son una alternativa a dichas técnicas, así, el objetivo macro de este trabajo es “Evaluar el efecto de la simbiosis de Hongos Micorrícicos Arbusculares con plántulas de cacao (*Theobroma cacao* L.) en el tizón de plántulas (*Phytophthora palmivora*)”.

La alta acidez y baja fertilidad química de suelos de la Orinoquía Colombiana es el principal limitante en la producción agrícola de la región (Benavides, 2013; Corpes Orinoquia, 2004), donde cantidades significativas de fertilizantes y enmiendas de síntesis química son incorporadas al suelo (Gómez *et al.*, 2007). Esta práctica impacta la comunidad de microorganismos edáficos que contribuyen a la eficiencia de la nutrición en plantas, en este caso el cacao (Martínez *et al.*, 2009).

La información de inventarios de HMA en suelos cacaoteros de la región es reducida, limitando el conocimiento de la diversidad de estos hongos simbioses que podrían estar siendo afectados y a su vez, beneficiando este sistema productivo. En este contexto, es preciso establecer información base de carácter cualitativo que contribuya al conocimiento de los recursos de HMA asociados a la rizósfera del cacao. Finalmente se plantea la siguiente pregunta de investigación:

¿Es posible caracterizar los HMA asociados a tres clones de cacao?

1. OBJETIVOS

1.1. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar hongos micorrícicos arbusculares asociados a tres clones de cacao (*Theobroma cacao* L.) en El Yopal (Casanare), Colombia.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el porcentaje de colonización radicular y conteo de esporas de HMA asociados a tres clones de cacao en El Yopal – Casanare.
- Identificar a nivel de género, HMA asociados a la rizósfera de tres clones de cacao en El Yopal – Casanare, estudiando caracteres morfológicos de esporas.
- Establecer la relación encontrada con el porcentaje de colonización y las propiedades fisicoquímicas del suelo.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. SIMBIOSIS PLANTA- HONGOS MICORRÍCICOS

Esta relación simbiótica, inició hace cerca de 500 millones de años. Se estima que el 95% de las plantas vasculares poseen micorrizas (Villarreal *et al.*, 2009). Los hongos en las micorrizas obtienen de la planta material hidrocarbonado para su nutrición en forma de exudados de raíz. La hifas de los hongos sirven de pelos radiculares a las plantas, lo que les permite absorber material nitrogenado y minerales del suelo (Trappe *et al.*, 2009).

2.2. MICORRIZA

La asociación simbiótica, se denomina micorriza, nombre que significa hongo de la raíz, del griego myces: hongo y rhiza: raíz (Rojas, 2010). En esta asociación, la planta le proporciona al hongo carbohidratos (azúcares, producto de su fotosíntesis) y un microhábitat para completar su ciclo de vida, así el hongo, le permite a la planta una mejor captación de agua y nutrimentos minerales con baja disponibilidad en el suelo (principalmente fósforo), y defensas a patógenos (Camargo, 2002).

Según Bidwel (1980) y Brown (1982), hay una coincidencia casi general en la simbiosis para formar micorrizas, se produce en tres etapas o pasos: a) Se produce una identificación mutua planta hongo / hongo-planta, en la rizósfera, o en regiones próximas a las raíces nutricias o pelos radicales y existe un crecimiento del micelio; b) Consiste en el acercamiento y acoplamiento progresivo y gradual del micelio y la raicilla produciéndose el contacto intercelular, al formarse una estructura que amarra y ata ambas biomasas y c) Se realiza la colonización produciéndose cambios morfológicos y estructurales tanto en los tejidos colonizados por el hongo, como en la organización de la pared celular de la raíz. Posteriormente se produce la integración fisiológica de ambos simbioses (hongo-raíz).

2.2.1. División de las Micorrizas

Según Read (1999), se pueden distinguir tres grupos fundamentales según la estructura de la micorriza formada: Ectomicorrizas o formadoras de manto; Ectendomicorrizas, que incluye Arbutoides y Monotropoides; y las Endomicorrizas, que se caracterizan por la colonización intracelular del hongo, que a su vez se subdivide en Ericoides, Orquidoides y arbusculares.

2.3. MICORRIZAS ARBÚSCULARES

Los Hongos Micorrícicos Arbusculares (HMA) constituyen parte de la riqueza biológica. Establecen relaciones mutualistas con un gran número de plantas, contribuyendo a una

mayor y más eficiente toma de nutrientes, especialmente de fósforo, cuando su disponibilidad es deficiente. Así mismo forman parte esencial de la microbiota natural del suelo; su éxito depende de los factores edáficos y las prácticas culturales que son determinantes en la distribución, desarrollo, actividad y supervivencia de dichos hongos (Sieverding, 1991).

Los Glomales abarcan el grupo de hongos capaces de desarrollar la simbiosis micorriza arbuscular en las raíces de las plantas. Inicialmente fueron clasificados como Endogonales (phylum Zygomycota). Su clasificación más reciente basada en el análisis molecular de las secuencias SSU del ARNr, indican que los Glomales tienen un origen monofilético y comparten ancestros con Basidiomycota y Ascomycota pero no con Zygomycota, por lo que son considerados dentro de un nuevo phylum denominándose Glomeromycota (Schüssler *et al.*, 2001).

La abundancia de estos hongos en el suelo es dependiente de las características físicas y químicas del mismo. En este aspecto, la supervivencia de estos endófitos, está limitada por la profundidad del suelo y se señala que en los primeros 20 a 30 cm del perfil del suelo son más abundantes: es decir, el número de esporas y el grado de colonización radicular es menor conforme la profundidad es mayor (Abbott *et al.*, 1991).

2.3.1. Clasificación de los HMA

Los estudios taxonómicos de los hongos micorrícicos arbusculares se realizan a partir de una observación microscópica, clasificándolos según la morfología de las esporas analizando características como: forma de la hifa de sostén, tamaño y forma de la espora (Morton *et al.*, 2001). Actualmente se llevan a cabo técnicas moleculares basadas en ADN a partir de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para la posterior clasificación e identificación de los HMA (Rodríguez *et al.*, 2009).

Los HMA se encuentran clasificados dentro del Phylum Glomeromycota (Figura 1), y se caracterizan por formar uniones dependientes, internas y simbióticas con las plantas, esta clasificación fue realizada a partir de genes de ARN ribosómico (Redecker *et al.*, 2013).

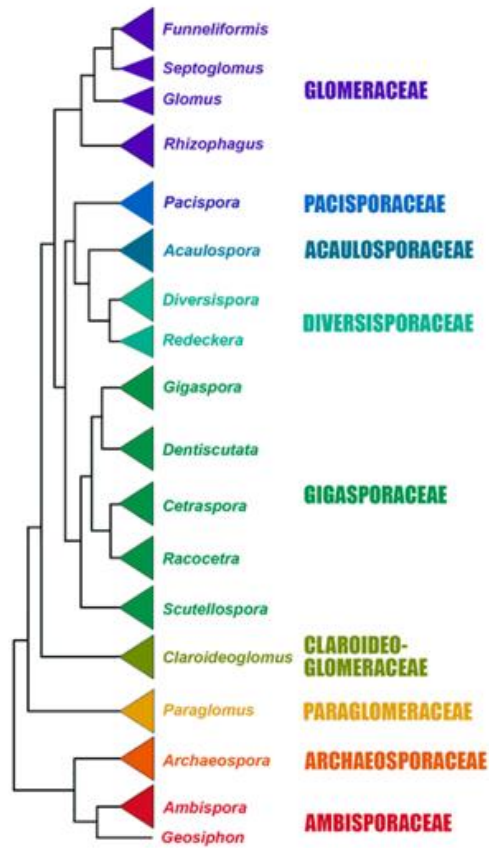


Figura 1. Clasificación taxonómica de los hongos micorrícicos arbusculares. Tomado de INVAM, 2013.

2.3.2. Distribución

Esta asociación se presenta en aproximadamente el 90% de las plantas, en diferentes gradientes latitudinales. Además, es importante destacar que existen hongos que pueden encontrarse en varios tipos de suelo y climas, teniendo un patrón de distribución mundial. Adaptados a diversos hábitats, no obstante los factores físicos y químicos del suelo pueden restringir su distribución (Read, 1991; Finlay, 2008), por lo que las asociaciones micorrícicas pueden considerarse cosmopolitas y generalistas. Sin embargo, dependiendo del ambiente y las especies interactuantes, los participantes pueden ser facultativos u obligados (Finlay, 2008).

2.3.3. Fisiología y anatomía de la colonización micorrícica arbuscular

Las estructuras que forman los HMA son: esporas, arbusculos, vesículas e hifas (Abbott *et al.*, 1991).

2.3.4. Esporas de HMA

Los hongos micorrícicos arbusculares forman un micelio externo que se extiende varios

centímetros alrededor de la raíz, incrementado el volumen del suelo y la capacidad de captación de agua y nutrientes como el fósforo. Este micelio forma estructuras microscópicas denominadas esporas, que favorecen la propagación de los hongos, estas pueden encontrarse de manera individual o en grupo (Faber *et al.*, 1991, Sánchez *et al.*, 1994). La principal función de las esporas es llevar la información genética a nuevos hábitats y generar nuevos individuos, que posteriormente desarrollará nuevas esporas (Morton *et al.*, 1994). Las esporas son la única parte del organismo del hongo que puede utilizarse para delimitar las especies. Estas se extraen del suelo mediante un tamizado húmedo (Gerdemann y Nicolson, 1963), seguido por centrifugación en un gradiente de sacarosa.

2.3.5. Germinación de Esporas

La germinación de las esporas es uno de los procesos más importantes durante el ciclo de vida de los HMA ya que representa la iniciación de la etapa vegetativa del crecimiento y el proceso de simbiosis puede depender de este ciclo (Walker, 1983).

2.3.6. Colonización de HMA

Los hongos micorrícicos arbusculares, presentan un crecimiento intra e intercelular en la corteza de la raíz y desarrollan dos tipos estructuras; arbusculos y vesículas. Los arbusculos son hifas que tienen un periodo corto de vida, las vesículas son estructuras de almacenamiento que se encuentran en la parte terminal de las hifas. Existen tres tipos de hifas externas: i) infectivas que inician los puntos de colonización ya sea en una o varias raíces; ii) absorbentes que tienen la función de explorar el suelo y absorber los nutrientes y iii) fértiles que llevan las esporas (Quilambo, 2003, Barker *et al.*, 1998, INVAM).

Existen dos tipos de colonización y se distinguen a partir de la morfología: “Arum”, en este tipo las hifas presentan un crecimiento intercelular y los arbusculos se encuentran dentro de las células corticales de la raíz y el tipo “paris” las hifas presentan crecimiento intracelular y forman enrollamientos dentro de la célula (Barker *et al.*, 1998, Cavagnaro *et al.*, 2001, Peterson *et al.*, 2004.).

2.4. EL CACAO (*Theobroma cacao* L.) Y SU RELACIÓN CON HMA

El género *Theobroma* es originario de América Tropical, específicamente de la cuenca alta del río Amazonas. El género posee algunas especies de gran relevancia económica en los trópicos, principalmente *Theobroma cacao* y en mucho menor grado *T. grandiflorum* y *T. bicolor*. Las semillas de *T. cacao* se han empleado a lo largo de la historia para la preparación de bebidas y alimentos. Esta especie se encuentra actualmente distribuida en regiones lluviosas del trópico, desde los 20° de latitud norte hasta los 20° de latitud sur (Organización Internacional del Cacao, ICCO 2003). Esta especie es altamente dependiente de los HMA y del alto porcentaje de colonización (40%), aun con nivel de P de 59 ppm, por inmovilización de P de los suelos tropicales

(Schroeder *et al.*, 2005).

Rojas, 2010 en el estudio realizado en la Región de San Martín-Perú, encontró predominancia de los géneros *Glomus* y *Acaulospora* asociados a cacao. En Colombia, departamento de Guaviare, Ochoa en 1997, en el estudio de determinaciones de hongos micorrícicos asociados al género *Theobroma* en el municipio de San José de Guaviare, reporta también géneros *Glomus* y *Acaulospora* como predominantes. Salamanca y Silvia (1998), reportaron para el mismo municipio a *Glomus* como el género más abundante, ocupando el 54.5% del total de la muestra compuesta, el segundo género en abundancia fue *Acaulospora* ocupando el 27.3% de la muestra. Para el departamento de Amazonas Arcos, 2003, reporta la dominancia del género *Glomus* en la composición micorrícicos del trapecio Amazónico y la presencia de *Acaulospora* asociados a suelos más ácidos.

2.4.1. Material Vegetal

El Comité Técnico Nacional recomendó los clones de cacao que se deben sembrar en los proyectos de desarrollo cacaotero. Entre estos, se encuentran los clones CCN 51 (Colección Castro Naranjal 51), FSA 12 (Federación Saravena 12) e ICS 95 (Imperial College Selection 95) (Sáenz, 2010). Para la producción de clones en Colombia se debe garantizar el uso de yemas que provengan de clones con alta productividad y calidad, donde haya abundante cantidad de mazorcas sanas y granos con características deseables. Todos estos individuos presentan condiciones similares en la apariencia física (tamaño, color, vigor, dimensión de frutos, etc.) (ICA, 2012).

El clon CCN 51 se caracteriza por ser cosmopolita, se adapta a casi todas las zonas tropicales desde el nivel del mar hasta los 1.000 m.s.n.m (Sáenz, 2010). Se destaca por su alta productividad que llega a superar los 5.000 Kg por hectárea, lo que lo hace muy cotizado por las industrias (Paredes, 2003). El clon ICS 95 es autocompatible y se caracteriza por ser frondoso y robusto (Sáenz, 2010) y se adapta desde 100 a 1.200 m.s.n.m. (Corpoica, 2010). Por otro lado en clon FSA 12, es de origen colombiano, autocompatible y produce 1.300 Kg/ ha /año (MinCIT, 2013) (Tabla 1).

En el Yopal- Casanare la principal zona agroecológica es el Bosque Húmedo Tropical (BHT), los tres clones descritos se adaptan de manera óptima en esta zona lo que favorece su crecimiento y desarrollo (Mejía, 2010. Conecta rural, 2013). Los clones utilizados para el estudio se caracterizan por:

Tabla 1. Características por clon.

Clon	Kg/ha /año	Frutos/árbol/año	pH	% Grasa
CCN 51	1.400	21	4,9	54
FSA 12	1.300	26	4,8	54,63
ICS 95	1.937	38	5	55

Fuente: Federación nacional de cacaoteros, 2015. Martínez, 2016.

2.4.2. Importancia del cacao

En la industria del grano de cacao se producen varios productos intermedios como, manteca de cacao, pulpa de cacao, polvo de cacao, pasta o licos de cacao, entre otros (Ruiz, 2014). En Colombia la producción de cacao para el año 2016 alcanzó las 56.785 toneladas, de las cuales el departamento de Casanare produjo 56 toneladas. En el año 2016 se registraron 173.016 hectáreas de cacao sembradas a nivel nacional y en el departamento de Casanare hubo 390 hectáreas sembradas (Federación Nacional de Cacaoteros, 2017).

2.5. ÁREA DE ESTUDIO

2.5.1. Paisaje

El Departamento del Casanare se encuentra ubicado en el Oriente de Colombia, en la región de la Orinoquia (Matiz, 2013), este cuenta con un complejo de ecosistemas de montaña (10%), piedemonte (20%) y llanura (70%). El municipio de El Yopal, se encuentra ubicado al noreste del Departamento de Casanare, su rango de altitudes varían desde 2.000 m.s.n.m en inmediaciones de la cordillera Oriental, hasta los 150 m.s.n.m en la llanura aluvial (Mejía, 2010). Los valores de la temperatura fluctúan entre 22,4°C y 28,4°C, presentando poca variación. El período húmedo es el más fresco ya que las temperaturas descienden en más de dos grados, mientras que el período seco es el más caluroso con valores que superan los 28°C (Mejía, 2010. Matiz, 2013). En los meses de abril, mayo, junio y julio, la precipitación se incrementa considerablemente hasta mayor a 500 mm, por otro lado los meses de diciembre, enero, febrero y marzo son los más secos de todo el año (Mejía, 2010. Matiz, 2013). La humedad relativa media se mantiene en general por encima del 80% en los meses lluviosos; y en el período seco disminuye hasta un 69% (Mejía, 2010; Matiz, 2013).

2.5.2. Uso de suelo

Yopal es un municipio con una vocación de uso ganadero orientado al pastoreo extensivo (40%); le sigue en importancia la vocación de uso forestal y para la conservación de recursos hídricos e hidrobiológicos que ocupan un 30% del municipio. Por último están las áreas con vocación agrícola con un 19% destinada al establecimiento de cultivos transitorios semi intensivos (IGAC, 2008).

2.6. METODOLOGÍAS PARA TINCIÓN DE RAÍCES Y EXTRACCIÓN DE ESPORAS

2.6.1. Tinción de raíces (Phillips & Hayman, 1970)

Para la realización de estudios de las asociaciones micorrícicas es necesario usar un método de tinción de raíces que nos permita observar adecuadamente esta simbiosis; actualmente el método más usado es el propuesto por Phillips & Hayman (1970) del cual se han derivado la mayoría de métodos de tinción convencionales (Valencia, 2015). Este método permite determinar el porcentaje de infección y la densidad visual de MA, a través de la tinción con azul de Tripán, el cual tiñe específicamente el tejido fúngico, diferenciándose de las células vegetales (Nardini *et al.*, 2011).

2.6.2. Determinación de porcentaje de colonización (método de intersección de la grilla, (Tennant, 1975)

Este método radica en una relación matemática entre el largo de raíz y la frecuencia con la cual, los segmentos de raíces arregladas al azar interceptan un grilla de líneas preestablecidas (Santana, 2007). La relación ha sido adaptada para la cuantificación visual de pruebas de la raíz usando un sistema cuadrículado de rayado (Garzón, 2004). Actualmente existen programas de medición computacional como el WhinRhizo que permite calcular el largo y el diámetro radical como una función del área y es, por este motivo que se puede crear un algoritmo que permite disminuir los errores producto del traslape entre raíces contiguas ya que no se basa en la determinación matemática, sino en contar el número efectivos de píxeles ocupados por la masa de raíces (Garzón, 2004).

El método de Tennant, 1975, ha sido validado por el INVAM (Colección Internacional de Hongos Micorrizógenos Arbusculares, West Virginia University), siendo este el mayor referente de la investigación de dichos hongos.

2.6.3. Establecimiento cultivo trampa (Sieverding, 1991)

Cuando la cantidad de esporas presentes en una muestra de suelo proveniente del campo es muy reducida, se recomienda reproducir los hongos en condiciones controladas empleando plantas micotróficas y sustratos estériles. Este sistema, conocido como cultivo en planta trampa, permite lograr dos cosas: multiplicar hongos nativos colectados en el campo aumentando así la cantidad de esporas del hongo o promover la esporulación de hongos "escondidos" en la muestra (Garcia *et al.*, 2000). El protocolo desarrollado por Sieverding, 1991 es el más utilizado cuando se establece un

cultivo trampa para el estudio de HMA.

2.6.4. Extracción de esporas a partir del suelo de cultivos trampa (Gerdemann & Nicolson, 1963) con modificaciones de INVAM (West Virginia University, 2014)

Es un método de tamizado húmedo y decantación para el aislamiento de esporas (Gerdemann & Nicolson, 1963). Es el único protocolo que ha sido usado en las investigaciones de MA, sin embargo el INVAM ha realizado ciertas modificaciones para que la extracción de esporas se realice de manera óptima.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ÁREA DE ESTUDIO

Las muestras de suelo rizosférico fueron colectadas en un cultivo de cacao ubicado en la finca “Mate Pantano” de la Universidad de La Salle, en zona rural del municipio de El Yopal (Casanare). La temperatura y precipitación promedio en la zona corresponde a 26 °C y 2.000 mm respectivamente y con coordenadas geográficas de 5°19’31”N y 72°17’48” W. El cultivo se encontró compuesto por tres clones genéticos como copa de cuatro años de edad: CCN 51, ICS 95 y FSA 12. El material genético patrón para todos los árboles correspondió al clon IMC 67. Estos fueron sembrados intercaladamente en el lote, cada dos surcos por clon a una distancia de 3 x 3 metros entre plantas.

La metodología se resume en la Figura 2.

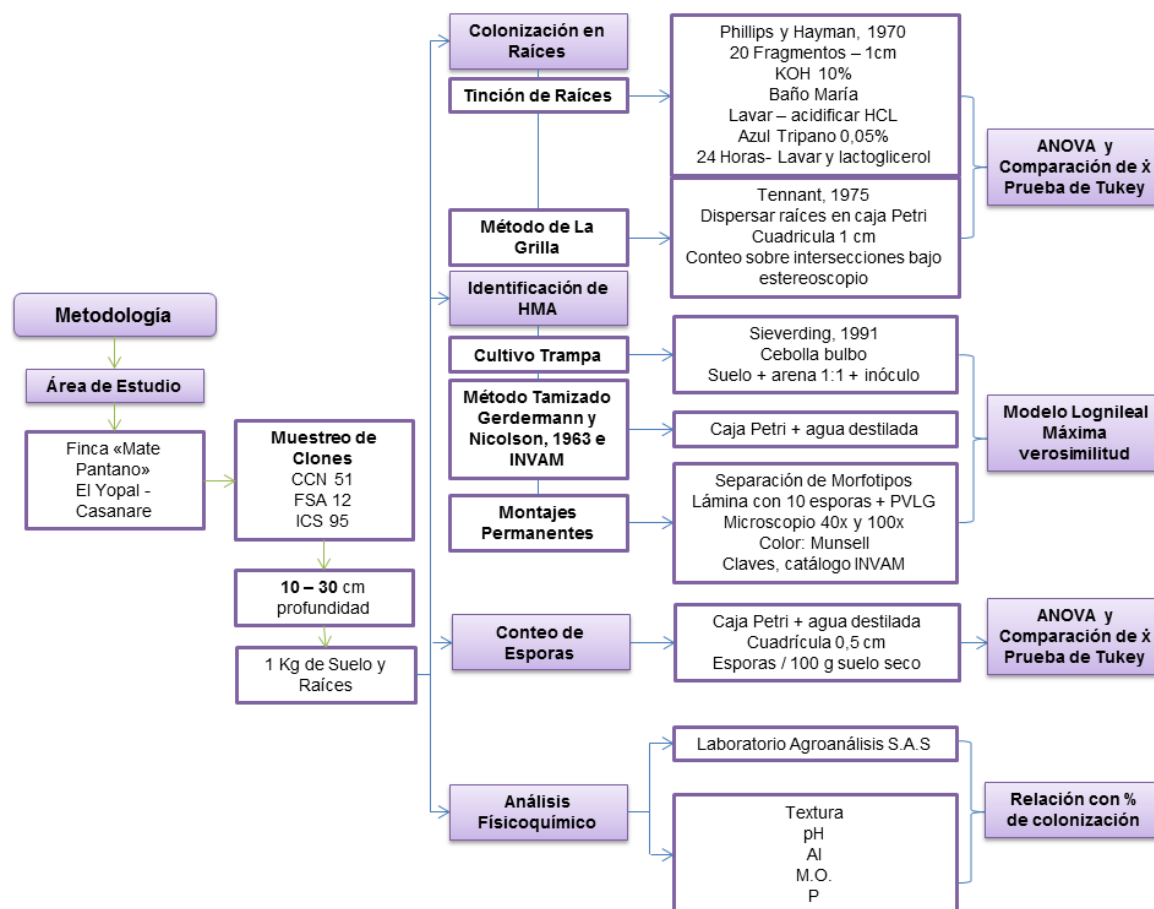


Figura 2. Metodología general del estudio.

Fuente: Hernández & Monroy, 2017.

3.2. MUESTREO DE SUELO RIZOSFÉRICO Y RAÍCES DE CACAO

El muestreo se realizó en mayo de 2016, época de invierno en la región. Se colectaron muestras de suelo rizosférico de tres clones genéticos de cacao (CCN 51, FSA 12 e ICS 95) presentes en el cultivo. 12 muestras en total fueron colectadas, 4 submuestras a partir de cuatro árboles de cada clon distribuidos en el lote. Las plantas se seleccionaron aleatoriamente teniendo en cuenta una distancia mínima de 50 metros entre puntos de muestreo (Figura 2). Cada submuestra se tomó a una profundidad entre 10 y 30 cm, en el punto de proyección de la altura de la copa de la planta, en las direcciones norte, sur, este y oeste respectivamente. Se colectó 1 Kg de muestra entre suelo y raíces aproximadamente en cada punto y posteriormente las muestras se almacenaron a 4°C hasta su procesamiento. Las muestras de suelo fueron secadas a temperatura ambiente durante 72 horas. Posteriormente se dividió la muestra para identificación de esporas de HMA a partir de los cultivos trampa y análisis físico-químico.

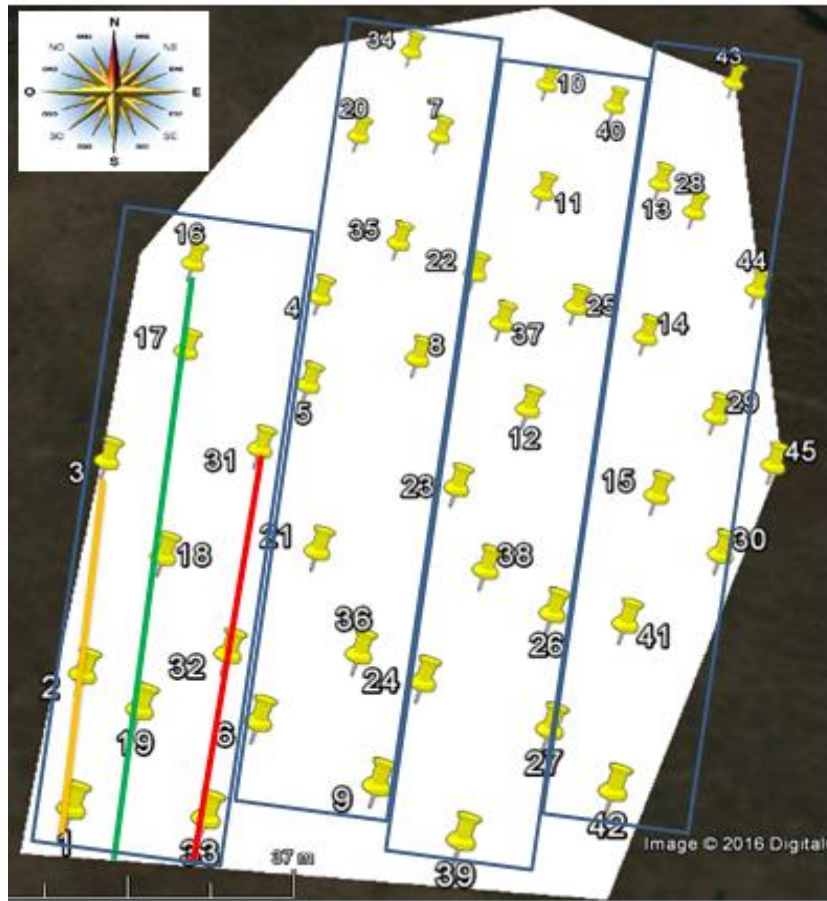


Figura 3. Lugares muestreados. La línea de color amarillo indica el surco del clon CCN 51, la línea verde indica el surco del clon FSA 12 y la línea roja indica el surco del clon ICS 95.

Fuente: Hernández & Monroy, 2017.

3.3. ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO DEL SUELO

Los análisis físico-químicos de suelo se realizaron en el laboratorio Agroanálisis S.A.S. Este análisis comprende: Textura por Bouyoucos; pH 1:1 en agua potenciométrico; Aluminio (acidez) extracción con Cloruro de Potasio 1N; Carbono orgánico digestión en vía húmeda (Walkley-Black); Fósforo Bray II; Capacidad de intercambio catiónico acetato de amonio 1N (Anexo 1).

3.4. COLONIZACIÓN DE HMA EN RAÍCES DE CACAO

3.4.1. Tinción de raíces (Phillips & Hayman, 1970)

Se tomaron 20 fragmentos de raíces sanas y frescas de 1 cm de largo por cada clon de cacao y se sumergieron en KOH al 10%, se calentaron en baño maría a 80°C por 15 minutos. Se lavaron con abundante agua tres veces y posteriormente se acidificaron con HCL 1% por 10 minutos. Se realizó la tinción con azul de tripano al 0.05% y se dejó actuar por 24 horas a temperatura ambiente. Se Retiró el colorante, se lavó nuevamente con agua y se sumergieron en lactoglicerol 40% (Anexo 2).

3.4.2. Determinación de porcentaje de colonización (método de intersección de la grilla, (Tennant, 1975)

Se dispersaron homogéneamente las raíces teñidas sobre una caja de Petri con cuadrícula de 1 cm. Se realizó la lectura bajo microscopio estereoscópico, realizando cuatro repeticiones por clon, contando sobre las intersecciones las raíces colonizadas y las raíces totales verticales y horizontalmente (Anexo 3).

3.5. IDENTIFICACIÓN DE HMA POR MORFOLOGÍA DE ESPORAS

3.5.1. Establecimiento de cultivo trampa

Se estableció un cultivo trampa en el invernadero del departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia, con el fin de propagar y multiplicar esporas de HMA presentes en las muestras de suelo rizosférico colectadas. Para esto se emplearon plantas de cebolla bulbo (*Allium cepa* L.) como hospederos de los HMA, sembradas en materos de 3 kg de capacidad.

Cada maceta se ensambló usando una capa del sustrato (Suelo + arena), otra capa de inóculo correspondiente a la muestra de campo que contiene suelo rizosférico de cacao y una última capa del sustrato, siendo esta última donde se sembraron las plántulas de cebolla, según la metodología utilizada por Sieverding, 1991 (Anexo 4). El sustrato consistió de una mezcla suelo – arena en proporción 1:1, esterilizado previamente mediante autoclave en cuatro ciclos con intermitencia de 24 horas. Se establecieron 24 macetas en total para la siembra de las plantas trampa, lo que corresponde a 8 repeticiones por clon.

3.5.2. Extracción de esporas a partir del suelo de cultivos trampa (Gerdermann & Nicolson, 1963) con modificaciones de INVAM (West Virginia University, 2014)

Se pesaron 10 g de suelo proveniente del cultivo trampa y se licuaron con agua destilada por 15 segundos a máxima velocidad, vertiendo la solución sobre el set de tamices de mayor a menor tamaño de poro (250, 125, 45, 32 μm). Se colectó la fracción obtenida en el tamiz de menor tamaño de poro (32 μm) y el tamiz intermedio (45 μm) en los tubos Falcon de 50 ml y se adicionó el Tween + sacarosa en el fondo del tubo con la ayuda de una jeringa y con movimientos circulares. Se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos y se vertió el sobrenadante sobre el tamiz más fino para luego lavar con abundante agua con el fin de retirar la sacarosa. Se puso lo colectado en el tamiz en una caja de Petri con agua destilada y se realizó el conteo utilizando hojas de papel marcadas con una cuadrícula de 0.5 cm. El resultado se da a razón de esporas de HMA/ 100 g de suelo seco. Posteriormente se realizó la separación de morfotipos y montajes permanentes para la identificación. Lo anterior se realizó según la metodología de Gerdermann & Nicolson, 1963 modificada con INVAM (Anexo 5).

$$\text{Número de esporas en 100g de suelo seco} = \frac{\text{\# De esporas contadas (100 g de suelo seco)}}{100 \text{ g de suelo}}$$

3.5.3. Identificación de morfo-tipos a Géneros

Se separaron los morfotipos encontrados en los aislamientos a partir de los parámetros morfológicos. Cada morfotipo identificado se montó en láminas permanentes utilizando PVLG (polivinil- lactoglicerol). Se adicionaron 2 gotas en cada lámina, poniendo 10 esporas de cada morfotipo. Se cubrió cada gota con una laminilla cubreobjetos presionando con suavidad y dejando secar para su posterior identificación en microscopio bajo aumento de 40x y 100x. El color fue determinado utilizando la tabla de color para suelos de Munsell. Para la evaluación de características morfológicas se utilizó el Catálogo ilustrado de Micorrizas Arbusculares de la amazonia Colombiana (Peña *et al.*, 2006; González, 1993; Sieverding, 1984), la Colección Internacional de Cultivos de Hongos Arbusculares Micorrícicos Vesiculares (INVAM, 2014) y las claves propuestas por Sánchez *et al.*, (2010) en las metodologías básicas para el trabajo con micorriza arbuscular y hongos formadores de micorrizas arbusculares.

3.6. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la ejecución de los montajes de las plantas trampa, se utilizó un diseño completamente al azar con 8 repeticiones por cada clon. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA y comparación de medias con la prueba de Tukey aplicados al porcentaje de colonización entre los clones evaluados y recuento de esporas, y el modelo log lineal de máxima verosimilitud para los morfotipos asociados a los tres clones. Para estos análisis se utilizó el programa estadístico SAS®.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1. COLONIZACIÓN MICORRÍCICA

4.1.1. Porcentaje de colonización

Se determinó el porcentaje de colonización total a partir del método de intersección de la grilla descrito por Tennant (1975). Se realizaron cuatro repeticiones de evaluación por cada clon. Los resultados se ilustran en la tabla 2.

Tabla 2. Porcentaje de colonización de HMA en raíces de cacao

Clon	Promedio de recuentos (%)
CCN 51	67,15
FSA 12	73,68
ICS 95	43,80

Fuente: Hernández & Monroy, 2017.

Todas las raíces de los clones presentaron colonización por HMA. El clon que presentó mayor porcentaje de colonización fue el FSA 12 (73,68%), seguido de CCN 51 (67,15%) y por último ICS 95 (43,80%). Se evidenció la presencia de hifas, vesículas y arbuscúlos en la colonización radicular de los tres clones (Figura 4).

Se evidenció mayor presencia de vesículas en la colonización radicular. Estos órganos funcionan para el almacenamiento temporal y en ocasiones funcionan como propágulos cuando están aisladas de la raíz. Su formación depende de la etapa de infección y en este caso indica que la infección ha madurado (Biermann *et al.*, 1983). Los tres clones presentaron porcentajes de colonización con valores que van de rangos medios a altos (Tabla 2).

Rojas, (2010) afirma que la colonización por HMA se presenta en mayor porcentaje en época húmeda en plantas de cacao. De igual manera, Oliveira *et al.*, 1998, en un estudio realizado al género *Theobroma*, evidenció el aumento de la colonización micorrícica en época húmeda. Varios autores relacionan tales características a la mayor actividad de la raíz en esa época del año en la mayoría de las especies estudiadas (Allen *et al.*, 1998). Por otra parte, los tres clones presentan la misma edad (4 años). Es importante tener en cuenta la edad del cultivo, ya que de acuerdo con esto se puede o no encontrar establecido el HMA, ya que requieren de un tiempo determinado que varía de acuerdo a la especie y unas condiciones para que se realice el establecimiento y se presente la colonización (León, 2006).

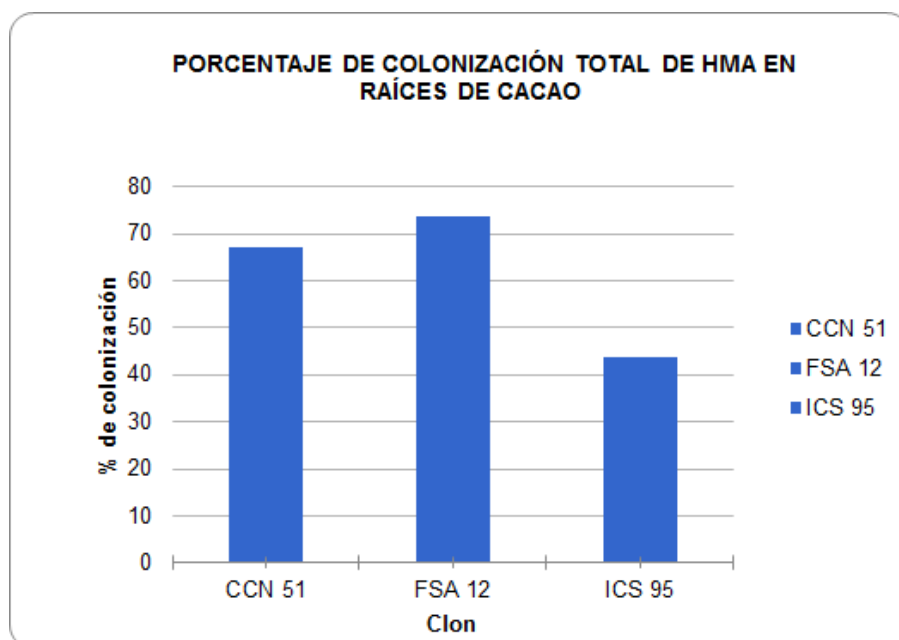


Figura 4. Porcentaje de colonización total de HMA en raíces de tres clones de cacao.
Fuente: Hernández & Monroy, 2017.

Tabla 3. Análisis de varianza porcentaje de colonización

Variable dependiente: COLONIZACIÓN					
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	2.311.420.833	462.284.167	2.49	0.1484
Error	6	1.112.248.333	185.374.722		
Total corregido	11	3.423.669.167			
R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	COLONIZACIÓN Media		
0.675130	2.212.361	1.361.524	6.154.167		

Fuente: Hernández & Monroy, 2017.

Los resultados de los análisis de varianza (Tabla 3) para el porcentaje de colonización

entre los clones, señalan que no hubo diferencias significativas entre los valores del porcentaje total de colonización entre los clones CCN 51, FSA 12 e ICS 95. Además se realizó una prueba de comparación de medias de Tukey. La figura 5, muestra la variabilidad de cada uno de los clones para el porcentaje de colonización.

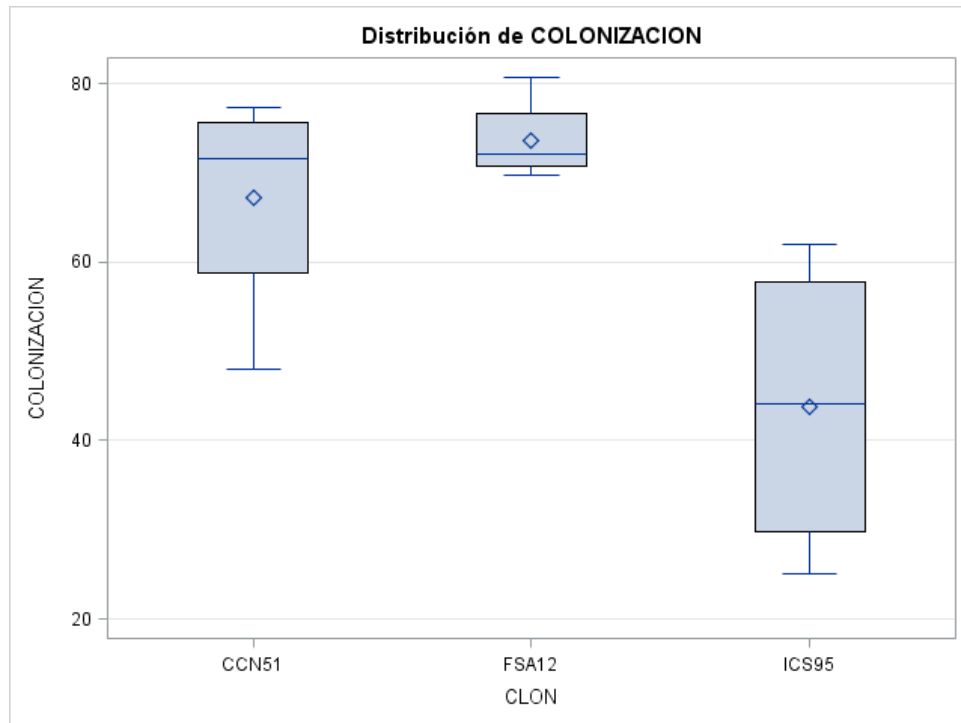


Figura 5. Distribución del porcentaje de colonización entre los clones evaluados

Fuente: Hernández & Monroy, 2017.

El ANOVA para porcentajes de colonización de micorrizas arbusculares en raíces de cacao, señala diferencias poco significativas ($P= 0.1484$) entre los clones evaluados, con un $R^2: 0.675130$, lo que indica que un alto porcentaje de datos se ajustan al modelo utilizado, con una dispersión de datos menor con un coeficiente de variación de 22.12 (Anexo 6). Los resultados de la prueba de Tukey (Tabla 4), muestra que el clon ICS 95 presenta promedios menores para porcentaje de colonización; mientras que, los clones FSA 12 y CCN 51 presentan los mayores porcentajes de colonización (Figura 5) (Anexo 7). Se evidencia además, una diferencia significativa en el porcentaje de colonización entre los clones FSA 12 e ICS 95, siendo el primero el que presenta mayor porcentaje de colonización y el segundo, el de menor porcentaje de colonización. Sin embargo, para los dos clones hubo pocos morfotipos asociados (Tabla 8), lo que evidencia el hecho de que la relación de estas dos variables no es directamente proporcional y está influenciada por diversos factores como la especie, la época y condiciones del muestreo, así como la capacidad que tiene el hongo de formar o no esporas para su reproducción (Peña *et al.*, 2006).

Tabla 4. Prueba de comparación de medias para el porcentaje de colonización entre clones.

Tukey Agrupamiento		Media	N	CLON
	A	73.675	4	FSA 12
	A			
B	A	67.150	4	CCN 51
B				
B		43.800	4	ICS 95

Fuente: Hernández & Monroy, 2017.

4.1.2. Aspectos anatómicos de la colonización micorrícica en cacao

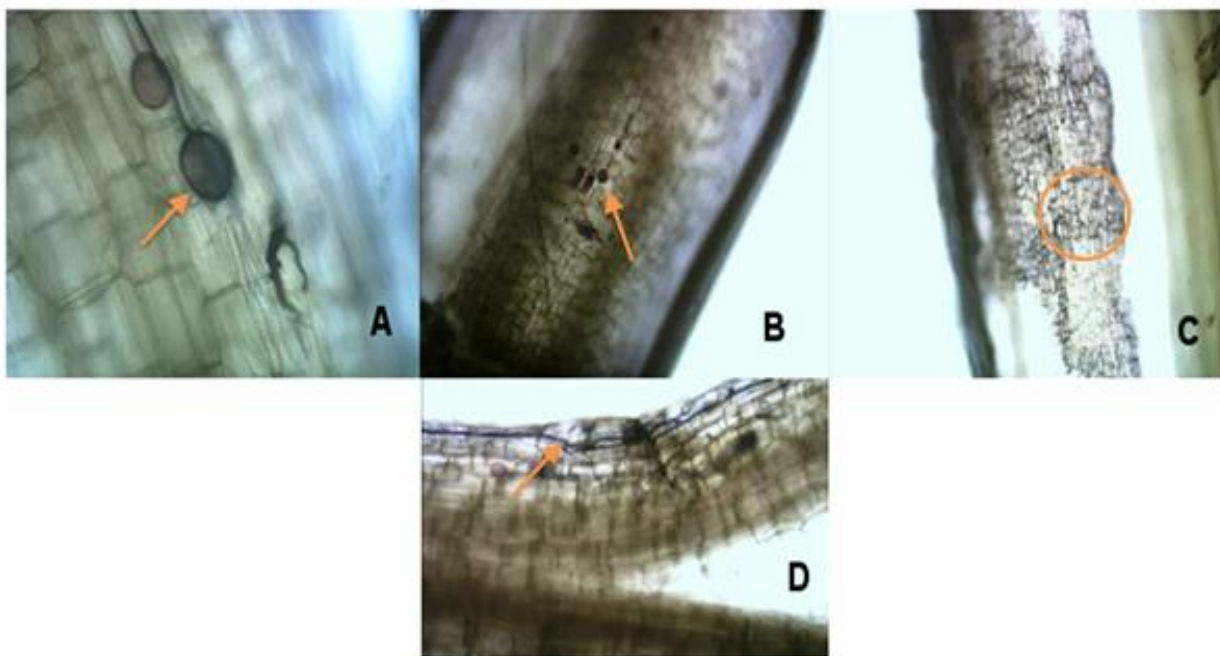


Figura 6. Estructura de los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) **A)** Formación de vesículas en el clon ICS 95. **B)** Formación de vesículas en el clon FSA 12. **C)** Formación de arbusculos en el clon CCN 51 **D)** Detalle de hifas intra-radicales en el clon ICS 95.

Fuente: Hernández & Monroy, 2017.

La colonización se presentó de tipo “Arum”, ya que las hifas mostraron crecimiento intercelular (Figura 6D) extendiéndose y ramificándose, dándole lugar a los arbusculos que se encuentran en las células corticales de la raíz (Figura 6C).

4.2. RECUESTO DE ESPORAS

Se realizaron 8 repeticiones de conteo consecutivos de esporas a partir de 100 g de suelo de cada muestra. Los resultados se encuentran en la Tabla 5.

Tabla 5. Número de esporas de HMA a partir de 100 g de suelo.

Clon	Promedio de Recuentos (esporas/ 100 g de suelo seco)
ICS 95	139
FSA 12	220
CCN 51	169

Fuente: Hernández & Monroy, 2017.

Todas las muestras de suelo asociado a los tres clones presentaron presencia de esporas de HMA. La muestra que reportó el número más alto fue la que corresponde al clon FSA 12 con 220 esporas / 100 g de suelo, seguida del clon CCN 51 con 169 esporas / 100 g de suelo y por último la que corresponde al clon ICS 95 con 139 esporas / 100 g de suelo (Figura 7). No todas las especies de hongos formadores de micorriza arbuscular tienen la misma capacidad de formar esporas. Muchos de los HMA no esporulan (Sanders *et al.*, 1996) o la producción de esporas está condicionada a los cambios edáficos del suelo, al estudiar las esporas de HMA puede no ser un reflejo fiel de la comunidad de estos hongos (Peña *et al.*, 2006).

Entre los factores que pueden afectar la estimación de la abundancia y riqueza de hongos formadores de micorriza arbuscular (HMA), a partir del aislamiento de sus esporas está la capacidad natural de cada especie para producir esporas, la época y las condiciones del muestreo (Peña *et al.*, 2006). En este caso, la recolección de muestras se hizo en época de invierno, lo que pudo haber inferido directamente en los resultados. Además del clima, es importante la forma como se colectan las muestras de suelo para el aislamiento de las esporas de HMA. El número de esporas en los 20cm superficiales del suelo puede ser hasta 4 veces mayor que el número de esporas recobrada a unos centímetros más de profundidad (Peña *et al.*, 2003).

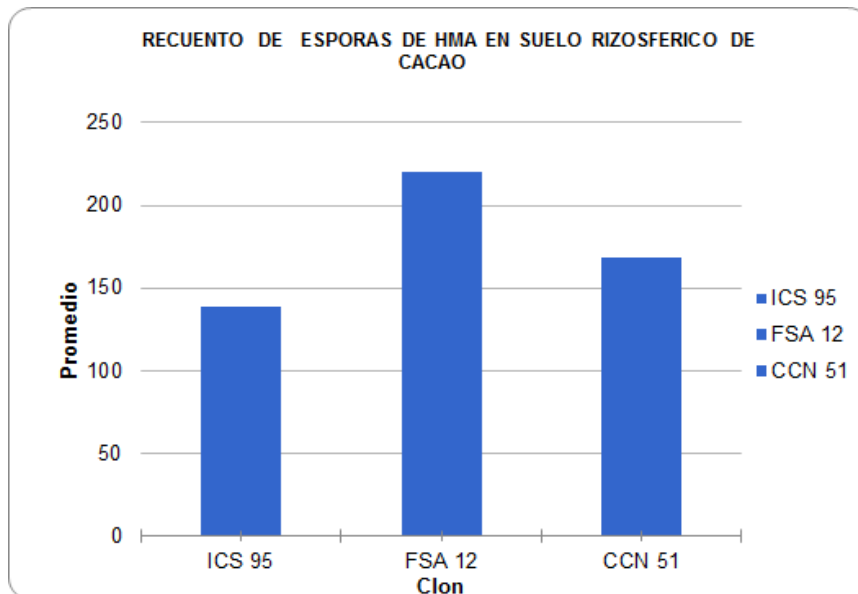


Figura 7. Recuento de esporas de HMA en suelo rizosférico de tres clones de cacao.
Fuente: Hernández & Monroy, 2017.

Los resultados de los análisis de varianza (Tabla 6) (Anexo 8) para el conteo de esporas entre los clones, señalan que en los clones CCN 51, FSA 12 e ICS 95, el número de esporas es independiente a estos. Además se realizó una prueba de comparación de medias de Tukey (Anexo 9). La figura 8, muestra la variabilidad de cada uno de los clones para el conteo de esporas.

Tabla 6. Análisis de varianza conteo de esporas

Variable dependiente: CONTEO					
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	9	74120,5833	8235,6204	1.11	0.4135
Error	14	103570,75	7397,9107		
Total corregido	23	177691,3333			
R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	CONTEO Media		
0.417131	48,91627	86,01111	175,8333		

Fuente: Hernández & Monroy, 2017.

Prueba de Tukey para recuento de esporas

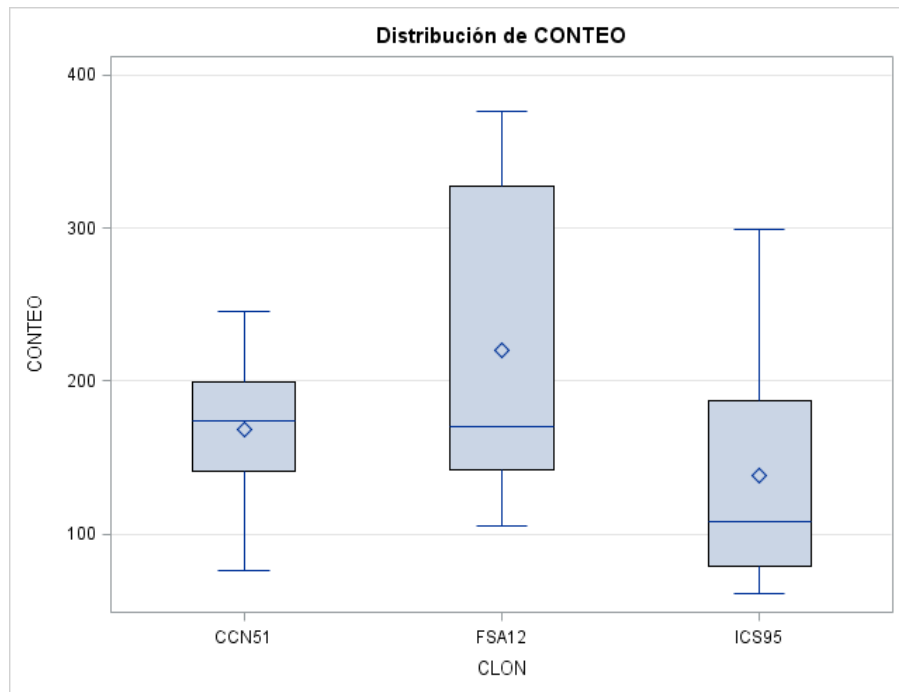


Figura 8. Distribución del número de esporas entre los clones evaluados

Fuente: Hernández & Monroy, 2017.

El ANOVA para el conteo de esporas de micorrizas arbusculares en cacao, señala diferencias poco significativas ($P= 0.4135$) entre los clones evaluados, con un R^2 : 0.4171, lo que indica que un bajo porcentaje de datos se ajustan al modelo utilizado, con una dispersión de datos mayor con un coeficiente de variación de 48.91. Los resultados de la prueba de Tukey, muestra que el clon FSA 12 presenta mayor número de esporas; aun así, no existe una diferencia significativa entre los clones evaluados (Tabla 7).

Según Peña *et al.*, 2006, el promedio de esporas recuperadas de potreros, bosques o rastrojos es de aproximadamente 2000 esporas / 100 g de suelo, mientras que en los cultivos es de 1000 esporas / 100 g de suelo. El clon FSA 12 fue el que presentó mayor número de esporas en el recuento (220 esporas / 100 g de suelo) y sin embargo, se encuentra muy por debajo del promedio reportado por Peña *et al.* (2006). La presencia de esporas de HMA en el suelo depende de diversos factores, por lo que hablar de su abundancia con los datos obtenidos sería impreciso.

Tabla 7. Prueba de comparación de medias para el conteo de esporas entre clones.

Tukey Agrupamiento	Media	N	CLON
A	220.00	8	FSA 12
A			
A	168.88	8	CCN 51
A			
A	138.63	8	ICS 95

Fuente: Hernández & Monroy, 2017.

4.3. IDENTIFICACIÓN DE HMA

4.3.1. Análisis Morfológico

Se evaluaron características morfológicas de las esporas tales como forma, tamaño, diámetro, color, número de paredes, estructura de la pared y conexión hifal. Los morfotipos asociados a cada clon, se encuentran en la tabla 8.

Tabla 8. Morfotipos encontrados en los clones CCN 51, FSA 12 e ICS 95 de cacao.

Clon	Género	N° de morfotipos	Total morfotipos
CCN 51	<i>Glomus</i>	7	8
	<i>Acaulospora</i>	1	
FSA 12	<i>Glomus</i>	4	4
ICS 95	<i>Glomus</i>	2	3
	<i>Acaulospora</i>	1	

Fuente: Hernández & Monroy, 2017.

En la muestra del clon CCN 51 se identificaron 8 morfotipos, de los cuales 7 pertenecen al género *Glomus* y 1 al género *Acaulospora* (Figura 9 y Figura 10).

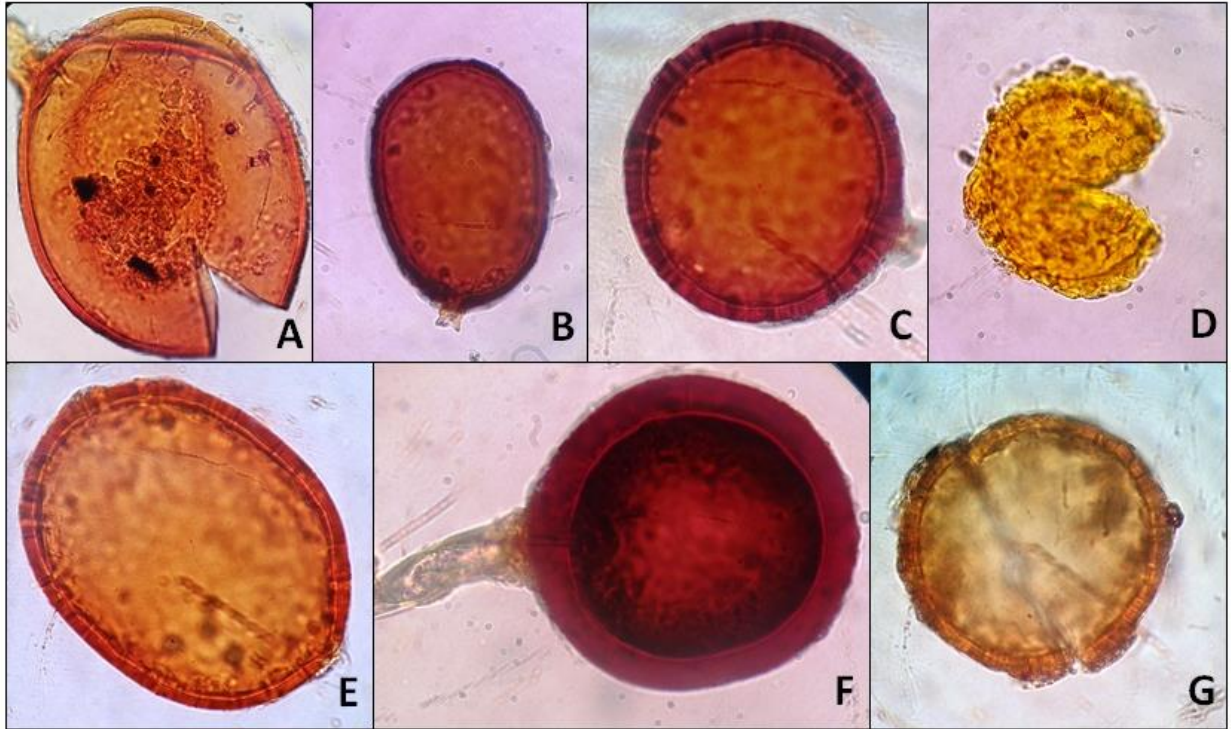


Figura 9. Morfotipos de esporas de Hongos Micorrícicos Arbusculares identificados en el clon CCN 51 del género *Glomus* **A).** Morfotipo 1, **B).** Morfotipo 2, **C).** Morfotipo 03, **D).** Morfotipo 4, **E).** Morfotipo 5, **F).** Morfotipo 6, **G).** Morfotipo 7.
Fuente: Hernández & Monroy, 2017.



Figura 10. Morfotipo de espora del Hongo Micorrícico Arbuscular identificado en el clon CCN 51 del género *Acaulospora* **H).** Morfotipo 1.
Fuente: Hernández & Monroy, 2017.

En la muestra del clon FSA 12 se identificaron 4 morfotipos pertenecientes al género *Glomus* (Figura 11).

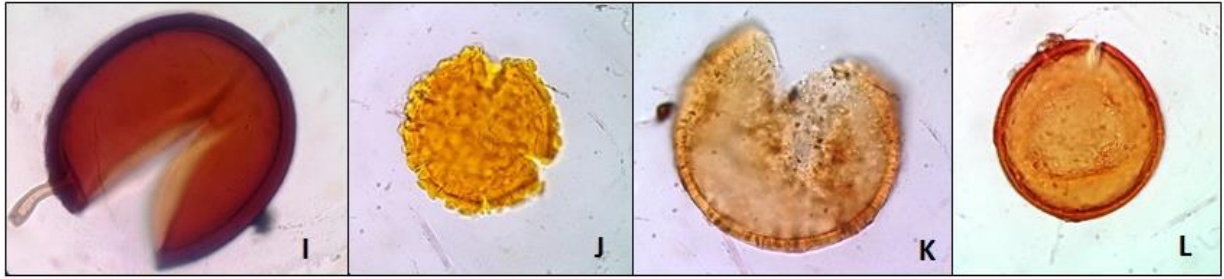


Figura 11. Morfotipos de esporas de Hongos Micorrícicos Arbusculares identificados en el clon FSA 12 del género *Glomus* **I)**. Morfotipo 1, **J)**. Morfotipo 2, **K)**. Morfotipo 3, y **L)**. Morfotipo 4.

Fuente: Hernández & Monroy, 2017.

En la muestra del clon ICS 95 se identificaron 3 morfotipos, de los cuales 2 pertenecen al género *Glomus* y uno al género *Acaulospora* (Figura 12).

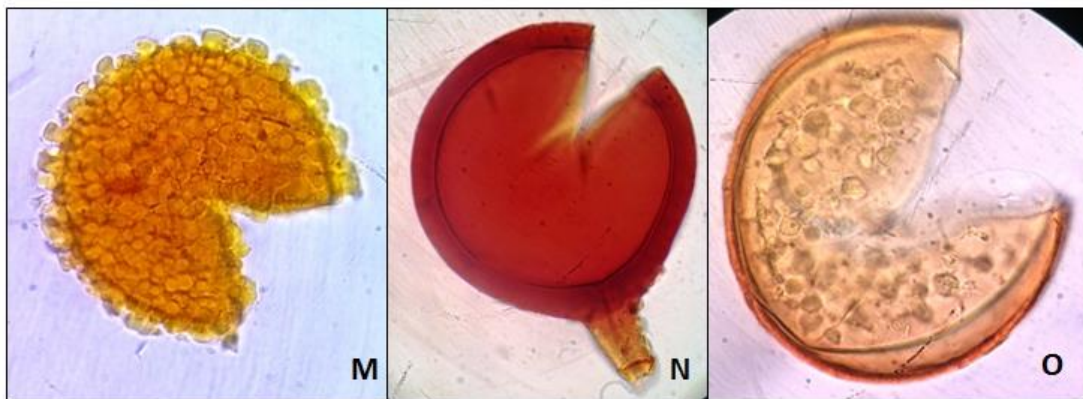


Figura 12. Morfotipos de esporas de Hongos Micorrícicos Arbusculares identificados en el clon ICS 95 del género *Glomus* **M)**. Morfotipo 1, **N)**. Morfotipo 2 y del género *Acaulospora* **O)**. Morfotipo 1.

Fuente: Hernández & Monroy, 2017.

4.3.2. Descripción de Morfotipos de Hongos Micorrícicos Arbúsculares de los géneros identificados.

Género *Glomus*: Esporas Glomoides, producidas en o cerca de la superficie del suelo, en esporocarpos (INVAM). En este género, las esporas se producen en el ápice de las hifas o intercaladas en el micelio. Las esporas maduras conservan restos del micelio que les dió origen en forma de una “hifa de sostén” que en el punto de unión con la espora es recta o cónica. Las esporas pueden poseer pared estructural y paredes internas o solo estructural (Hernández *et al.*, 2003). Las esporas en el género *Glomus*,

oscilan entre los 18 - 370 micras de diámetro (Sánchez *et al.*, 2010).

Este género está representado por más de 100 especies de HMA y, por lo tanto, es el que tiene mayor número de especies en el grupo de los HMA (Hernández *et al.*, 2003). El Género *Glomus* tiene una diferenciación en grupos A y B de acuerdo a Schüssler *et al.*, 2001 y Schwarzott, 2004. La separación en grupos dentro del grupo A (verdaderos *Glomus*), está propuesta de acuerdo a la página de Schüssler, 2001; donde dentro de los Glomerales se observan claramente los grupos Aa y Ab y una línea que se puede nombrar Ac pero no ha sido oficialmente publicado.

Glomus Grupo Aa: Esporas solitarias e hifa de soporte del mismo color de la espora. Hifa de conexión tipo glomoide, pero no en pico de pájaro, bate, colita de marrano o bulbo.

Glomus Grupo Ab: Esporas agregadas y desarregladas.

Glomus Grupo Ac: Esporas agregadas alrededor de un punto central. Característico en *Glomus taiwanense*.

Glomus Grupo B: Hifa de conexión en forma de pico de pájaro, con cambio abrupto de color respecto a la espora.

4.3.3. Morfotipos identificados en el clon CCN 51

Morfotipos identificados del género *Glomus* en el Clon CCN 51

Morfotipo 1. Espora solitaria, de forma globosa a subglobosa, grandes, de 120 - 180 a 180 - 200 micras de diámetro. Son de color café amarillento, se distinguen dos paredes, una externa gruesa y una pared más interna que se desprende fácilmente de la pared externa. La hifa se observa como la prolongación de la pared interna de apariencia transparente y delgada (Figura 9A).

Morfotipo 2. Esporas subglobosas de 60-110 / 80-130 micras de diámetro, de color café rojizo. Se muestran con mucílago adherido pero la estructura de la pared se observa lisa. Se diferencian tres paredes: la primera más oscura que las dos más internas que son de color claro a transparente. La conexión hifal es difícilmente observable, se aíslan generalmente sin esta. Es transparente, aparentemente la continuación de la pared más interna (Figura 9B).

Morfotipo 3. Esporas solitarias, de globosas a subglobosas de 80 a 120 micras de color café rojizo, con superficie de la pared limpia y lisa. Se distinguen dos paredes: la pared externa puede presentar presencia de mucílago y la pared interna puede presentar canales que van desde la pared interna hacia la externa. La conexión hifal es del mismo color de la pared laminada (Figura 9C).

Morfotipo 4. Espora solitaria, globosa de 70 a 110 micras de diámetro, color amarillo oliva. La mayoría de veces, tiende a estar rodeada de detritos, dándole una apariencia de suciedad. Se pueden distinguir tres paredes: las dos primeras paredes tienden a ser mucilaginosas y desaparecen cuando madura la espora. La pared más interna se forma por varias capas sobrepuestas por lo que da una apariencia de arrugada a la espora. La conexión hifal es difícil de observar pues suele estar cubierta de detritos (Figura 9D).

Morfotipo 5. Espora subglobosa de 80 a 110 micras de diámetro de color naranja. La superficie de la pared se observa limpia y lisa. Se distinguen dos paredes, donde la más interna presenta canales hacia el exterior. No se observa la conexión hifal, ya que se aíslan sin ésta (Figura 9E).

Morfotipo 6. Esporas globosas a Subglobosas de 60 - 70 / 70 - 90 micras de diámetro de color café rojizo oscuro. Posee dos paredes: una externa de 6 micras de espesor y una interna más delgada de color claro. La conexión hifal es de color amarillo claro, gruesa en el inicio y luego se adelgaza, sin septo (Figura 9F).

Morfotipo 7. Espora de forma globosa de 60 a 100 micras de diámetro, de color amarillo pálido. Se distinguen tres paredes de color claro y la conexión hifal es difícil de observar (Figura 9G).

Género *Acaulospora*: Este género se definió originalmente por esporas llevadas lateralmente desde el cuello de un "sáculo esporífero" pre-diferenciado. Sin embargo, las especies en *Entrophospora* que muestran relación genética con especies de *Acaulospora* están incluidas en este género porque el fenotipo de las esporas es un rasgo convergente (INVAM). En las esporas maduras se pierda la totalidad de la hifa de sostén y a cambio se queda en la pared estructural de la espora una cicatriz. Pueden poseer paredes estructurales e internas o sólo estructurales. Presenta la estructura conocida como "orbe de germinación", de este género se conocen alrededor de 30 especies en el mundo (Hernández *et al.*, 2003).

Morfotipos identificados del género *Acaulospora* en el Clon CCN 51

Morfotipo 1. Espora globosa de 70 a 100 micras de diámetro, de color amarillo oliva a amarillo pálido. Se distinguen dos grupos de paredes: la más externa es laminada y más gruesa que la interna. El segundo grupo de paredes está formada por una corácea, transparente y delgada. Se observa la cicatriz de la hifa de sostén por lo que se asume que es una espora madura (Figura 10H).

4.3.4. Morfotipos identificados en el clon FSA 12

Morfotipos identificados del género *Glomus* en el Clon FSA 12

Morfotipo 1. Esporas globosas a Subglobosas de 60 - 70 / 70 - 90 micras de diámetro de color café rojizo. Posee dos paredes: una externa gruesa y una interna más delgada de color claro. La conexión hifal es de color claro, delgada y sin septo (Figura 11I).

Morfotipo 2. Espora solitaria, globosa de 70 a 110 micras de diámetro, color amarillo oliva. La mayoría de veces, tiende a estar rodeada de detritos, dándole una apariencia de suciedad. Se pueden distinguir tres paredes: las dos primeras paredes tienden a ser mucilaginosas y desaparecen cuando madura la espora. La pared más interna se forma por varias capas sobrepuestas por lo que da una apariencia de arrugada a la espora. La conexión hifal es difícil de observar pues suele estar cubierta de detritos (Figura 11J).

Morfotipo 3. Espora de forma globosa de 60 a 100 micras de diámetro, de color amarillo pálido. Se distinguen tres paredes de color claro y la conexión hifal es difícil de observar (Figura 11K).

Morfotipo 4. Espora globosa a subglobosa de 80 a 100 micras de diámetro, de color naranja. Se distinguen dos paredes, una externa gruesa y una pared más interna que se desprende fácilmente de la pared externa con estructura lisa. No es observable la conexión hifal (Figura 11L).

4.3.5. Morfotipos identificados en el clon ICS 95

Morfotipos identificados del género *Glomus* en el Clon ICS 95

Morfotipo 1. Espora solitaria, globosa de 70 a 110 micras de diámetro, color amarillo oliva. La mayoría de veces, tiende a estar rodeada de detritos, dándole una apariencia de suciedad. Se pueden distinguir tres paredes: las dos primeras paredes tienden a ser mucilaginosas y desaparecen cuando madura la espora. La pared más interna se forma por varias capas sobrepuestas por lo que da una apariencia de arrugada a la espora. La conexión hifal es difícil de observar pues suele estar cubierta de detritos (Figura 12M).

Morfotipo 2. Esporas solitarias, globosas de 70 a 100 micras de diámetro, color café rojizo claro. La superficie se muestra lisa y limpia. Se distinguen dos paredes: La más externa es gruesa y la interna es más clara y delgada. La conexión hifal es gruesa, la pared de la hifa es la continuación de la pared interna de la espora. Es recta y de color amarillo claro (Figura 12N).

Morfotipos identificados del género *Acaulospora* en el Clon ICS 95

Morfotipo 1. Espora globosa de 70 a 100 micras de diámetro, de color amarillo oliva a amarillo pálido. Se distinguen dos grupos de paredes: la más externa es laminada y más gruesa que la interna. El segundo grupo de paredes está formada por una corácea y una transparente, delgada. Se observa la cicatriz de la hifa de sostén por lo que se asume que es una espora madura (Figura 12O).

En total se identificaron 11 morfotipos, 10 pertenecientes al género *Glomus* y 1 al género *Acaulospora*. El clon CCN 51 fue el que reportó mayor número de morfotipos asociados (7 del género *Glomus* y 1 del género *Acaulospora*), seguido del clon FSA 12 (4 del género *Glomus*) y por último el clon ICS 95 (2 del género *Glomus* y 1 del género *Acaulospora*). En la Figura 9D - Morfotipo 4 del clon CCN 51, se observa que se trata del mismo morfotipo de la Figura 11J del clon FSA 12 y Figura 12M del clon ICS 95. De igual manera, el morfotipo 7 del clon CCN 51 (Fig. 9G), es el mismo de la Figura 11K del clon FSA 12, todos del género *Glomus*. El morfotipo identificado del género *Acaulospora* es el mismo para los dos clones. En la tabla 9 se resume el total de morfotipos identificados y el recuento de esporas asociadas a cada uno en los tres clones.

Tabla 9. Recuento de esporas en 100 g de suelo seco de cada morfotipo identificado en los tres clones de cacao

Morfotipos	Clon CCN 51	Clon FSA 12	Clon ICS 95	Figura	Género
1	19			9 A	<i>Glomus</i>
2	33			9 B	<i>Glomus</i>
3	35			9 C	<i>Glomus</i>
4	12	29	25	9D – 11J – 12 M	<i>Glomus</i>
5	18			9 E	<i>Glomus</i>
6	28			9 F	<i>Glomus</i>
7	7	28		9 G - 11 K	<i>Glomus</i>
8		133		11 I	<i>Glomus</i>
9			88	12 N	<i>Glomus</i>

10		30		11 L	<i>Glomus</i>
11	17		26	10 H – 12 O	<i>Acaulospora</i>
Total	169	220	139		

Fuente: Hernández & Monroy, 2017.

Rojas, 2010 en el estudio realizado en la Región de San Martín, Perú, encontró predominancia de los géneros *Glomus* y *Acaulospora* asociados a *Theobroma cacao* L. En Colombia, departamento de Guaviare, Ochoa 1997, en el estudio de determinaciones de hongos micorrícicos asociados al género *Theobroma* en el municipio de San José de Guaviare, reportó también a los géneros *Glomus* y *Acaulospora* como predominantes. Salamanca y Silvia (1998) reportaron para el mismo municipio a *Glomus* como el género más abundante, ocupando el 54.5% del total de la muestra compuesta, el segundo género en abundancia fue *Acaulospora* ocupando el 27.3% de la muestra. Para el departamento de Amazonas Arcos, 2003, reportó la dominancia del género *Glomus* en la composición micorrícicos del trapecio Amazónico y la presencia de *Acaulospora* asociados a suelos más ácidos.

En los morfotipos identificados se reportó mayor número de esporas de color café tal como se observa en la tabla 9. Se ha especulado que las esporas de HMA podrían ser muy susceptibles al ataque de otros organismos, dada su composición rica en lípidos. Las esporas oscuras, muy melanizadas parecen ser menos susceptibles al ataque de otros organismos (Daniels *et al.*, 1980). Koske, 1984, reportó la tendencia que tienen algunas especies de albergar esporas de otros HMA para su germinación. Los géneros que con mayor frecuencia invaden otras esporas son *Glomus*, *Acaulospora* y *Archaeospora*, respectivamente.

Es interesante anotar que aun cuando las esporas de *Archaeospora leptoticha* y *Acaulospora foveata* son de gran tamaño, estas no presentan con frecuencia hiperparasitismo. Pero esporas de *Glomus* y *Acaulospora* de menor tamaño y superficie lisa, si (Peña *et al.*, 2006).

El suborden Gramineae utiliza como forma de propagación principal el micelio extraradical, pero igualmente producen un número abundante de esporas, lo que les confiere una ventaja sobre los hongos del suborden Gigasporaceae que podría, en alguna medida, estar relacionada con la abundancia de los géneros *Glomus* y *Acaulospora* en los suelos (Peña *et al.*, 2006).

Se pudo evidenciar que tanto en el porcentaje de colonización como en el recuento de esporas, el clon FSA 12 fue el que obtuvo mayores resultados (73,68% y 220 esporas / 100 g de suelo seco, respectivamente). Sin embargo, el clon CCN 51 fue el que tuvo

mayor número de morfotipos asociados. No necesariamente tiene que existir una relación directa entre colonización y esporulación. Recientes reportes encontraron que la falta de esporulación no necesariamente significa ausencia de micorriza en el lugar. Por ejemplo, el micelio de algunos HMA fue detectado en raíces de plantas, pero las esporas no fueron encontradas en ninguna de las muestras de suelo (León, 2006). La presencia de esporas de HMA en el suelo depende de diversos factores, por lo que hablar de riqueza de morfotipos con los datos obtenidos sería impreciso.

Tabla 10. Análisis de varianza de verosimilitud máxima para los morfotipos asociados a los clones de cacao

Análisis de varianza de verosimilitud máxima			
Fuente	DF	Chi-cuadrado	Pr > ChiSq
Sp	10	200.66	<.0001
Clon	2	19.23	<.0001
Ratio de verosimilitud	2	1.95	0.3765

Fuente: Hernández & Monroy, 2017.

El análisis de varianza de verosimilitud máxima realizado (Tabla 10) (Anexo 10), determinó que hay una independencia entre el número de morfotipos y los clones evaluados, sin embargo en la distribución de estos se observó que cinco morfotipos mostraron especificidad por el clon CCN 51, un morfotipo por el clon FSA 12 y uno para el clon ICS 95 (Tabla 9); todos estos caracterizados como pertenecientes al género *Glomus*.

Aparentemente no existe una especificidad estricta en la asociación de micorrizas arbusculares (Harley *et al.*, 1983), es decir, cualquier planta hospedera puede establecer simbiosis con cualquiera de las especies de HMA presentes (Cuenca *et al.*, 2007). Sin embargo, investigaciones más recientes muestran que la diversidad de HMA en plantas de similares características puede presentar variación (Vandenkoornhuyse *et al.*, 2002; Santos, 2007; Sykorova *et al.*, 2007). En este estudio se comprobó que el número de morfotipos depende de los clones evaluados y a su vez estos hospedan diferentes comunidades de hongos micorrícicos arbusculares, lo que corrobora la información de dichos estudios.

Esta cierta especificidad entre HMA y la planta, puede deberse a varias razones, como que la planta proporciona de manera preferencial fotosintatos a los hongos que más la benefician (Bever *et al.*, 2009), las condiciones del suelo, metabolismo de las plantas,

la arquitectura de la raíz y las estrategias ecológicas de los hongos (Öpik, 2006). Otros estudios coinciden en que estos hongos son relativamente de dispersión limitada comparándolos con otros grupos de hongos (Kivlin *et al.*, 2014; Chaudhard *et al.*, 2014; Egan *et al.*, 2014).

Estudios realizados por Beltrán *et al.*, (2012) acerca del comportamiento ecofisiológico de cuatro clones de cacao injertados sobre patrones de IMC 67, demuestran que el clon CCN 51 es el que presenta los mayores promedios para las variables morfo fisiológicas evaluadas, lo que demuestra la alta afinidad y compatibilidad que existe entre patrón – injerto. Dicha compatibilidad puede influenciar directamente la formación radicular de la planta, debido al intercambio nutricional existente entre patrón y copa, lo que posiblemente explica el hecho de que el clon CCN 51 tenga mayor número de morfotipos asociados.

4.4. ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO DEL SUELO

Se tomaron los resultados de los factores que influyen en el desarrollo de HMA.

El análisis de suelo realizado a los tres clones de cacao arrojó los siguientes resultados:

Textura: Franco arenoso, pH: 4.4, Al (acidez) m.e./100g: 3, materia orgánica M.O. %: 2.88, Capacidad de intercambio catiónico: 30.16 m.e./100g, Fósforo: 46 ppm (Anexo 1).

Clasificación de los resultados (IGAC, 2015)

- El pH de 4.4 se considera como extremadamente ácido (Espinosa *et al.*, 1999), siendo tóxico para la mayoría de las plantas (Casierra *et al.*, 2007).
- Contenido medio de materia orgánica 2.88%.
- Alto contenido de aluminio 3 meq/100g.
- Alto contenido de fósforo 46 ppm.

4.4.1. Porcentaje de colonización total y su relación con el pH y porcentaje de materia orgánica del suelo

La colonización micorrícica se puede ver controlada de manera positiva o negativa por ciertas características físicas y químicas del suelo, como el pH, la humedad y la disponibilidad de nutrientes (Khana *et al.*, 2006. Entry *et al.*, 2002).

En la figura 13 se observa que en suelos con un pH fuertemente ácido, se puede desarrollar de manera óptima la colonización por HMA. Paul & Clark, (1996) determinaron que los hongos micorrícicos arbusculares son considerados como hongos sensibles a la acidez pero su adaptación depende de especies y ecotipos presentes en cada región, por otro lado Sieverding, (2005) determinó que especies de *Glomus* se

adaptan a casi cualquier tipo de suelo y condiciones edafoclimáticas.

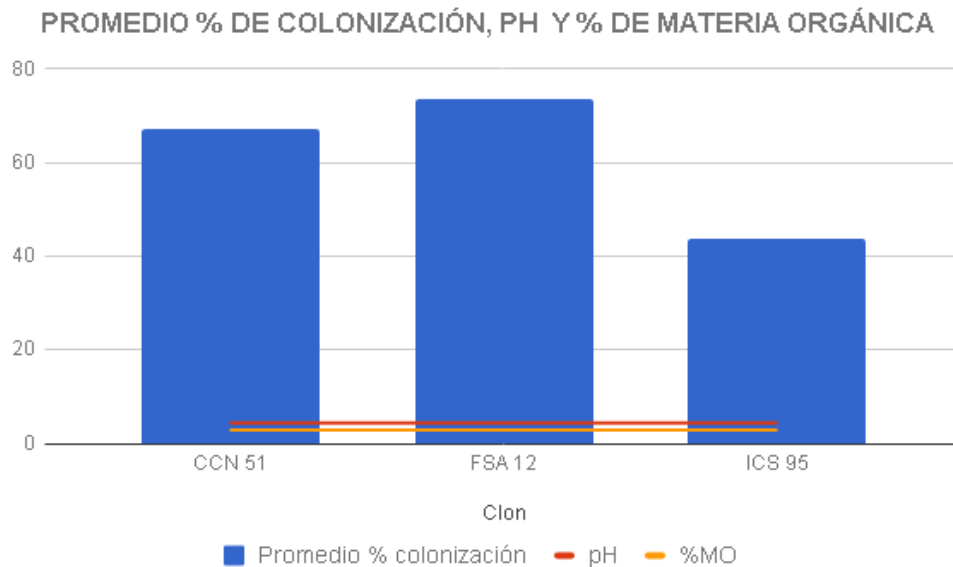


Figura 13. Promedio de porcentaje de colonización, pH y porcentaje de materia orgánica

Fuente: Hernández & Monroy, 2017.

Por otra parte, un bajo contenido de materia orgánica y la pérdida de ésta, constituye en un factor que afecta el mantenimiento y la distribución de HMA (Beare *et al.*, 1997, Preger *et al.*, 2007, Lozano *et al.*, 2015). En la figura 13, se detecta que hay una relación directa entre el porcentaje de materia orgánica y el porcentaje de colonización por HMA, en este caso con un contenido medio de materia orgánica existe un alto porcentaje de colonización micorrícica.

4.4.2. Porcentaje de colonización total y su relación con el contenido de fósforo disponible en el suelo

Se observó que en los clones CCN 51 y FSA 12, hay una relación inversa entre el porcentaje de colonización micorrícica y el contenido de fósforo disponible en el suelo, en el clon ICS 95 se observó que el alto contenido de fósforo pudo haber inhibido el porcentaje de colonización micorrícica (Figura 14).

Se ha reportado que según las concentraciones de fósforo, se pueden generar simbiosis con mayor o menor grado de efectividad (Douds & Schenck, 1990; Johnson, 1993, Arcos, 2003), esta genera una correlación inversamente proporcional entre el porcentaje de colonización y la absorción de fósforo, a menor concentración de P en el suelo, el porcentaje de colonización incrementa, esto puede explicar el comportamiento

del clon ICS 95. Kahiluoto (2001), también establece que cuando el nivel de P es muy alto y hay colonización micorrícica, se dice que la planta es dependiente de los HMA y se puede dar una interacción mutualismo/ parasitismo, en la que el hongo puede estar absorbiendo el P del suelo y no hay un incremento de este en la planta (Jones *et al.*, 2004, Klironomos, 2003).

La disponibilidad de nutrientes en el suelo en forma natural o inducida por el uso excesivo de fertilizantes, especialmente fosforados y nitrogenados, también son factores a tener en cuenta (Sánchez *et al.*, 2010). Se puede concluir que prácticas que busquen un aumento de fósforo en el suelo a niveles superiores a 10 ppm como el uso de roca fosfórica o fertilizantes fosfatados, pueden ser contraproducentes para el desarrollo de la simbiosis MA en los suelos. Se deben asegurar niveles bajos de fósforo que puedan ser eficientemente movilizados por la simbiosis MA hacia la planta, alcanzando en ella niveles equivalentes a si recibe una fertilización fosfatada (Peña *et al.*, 2006).

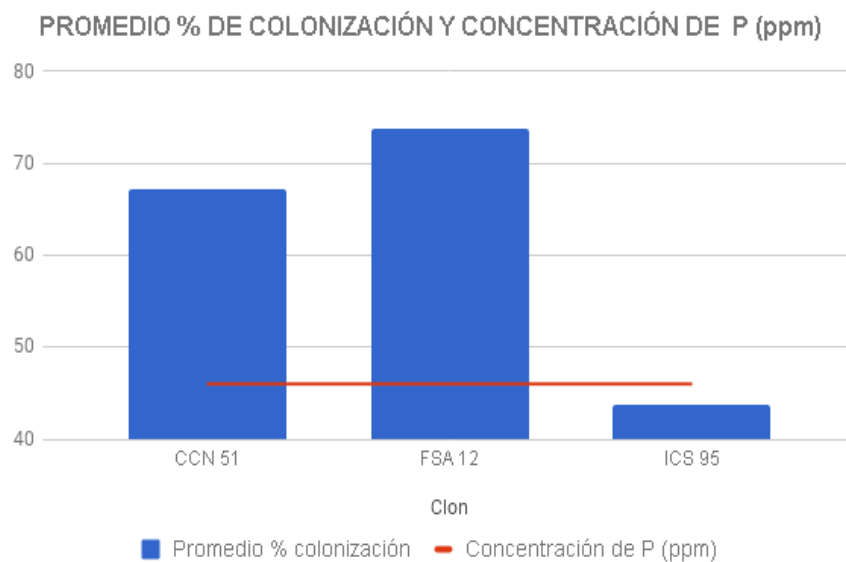


Figura 14. Promedio porcentaje de colonización y concentración de fósforo (ppm).
Fuente: Hernández & Monroy, 2017.

4.4.3. Porcentaje de colonización micorrícica y su relación con porcentaje de saturación de Aluminio

Al tratarse de un suelo ácido hay un alto contenido de Al (acidez), lo que representa una limitación para el crecimiento y desarrollo de las plantas (Camacho *et al.*, 2008). En condiciones de suelos ácidos los iones aluminio (Al^{3+}) se solubilizan y pueden penetrar células radiculares, lo cual inhibe el crecimiento de las raíces y dificulta la absorción de

agua y nutrientes esenciales como fósforo y calcio (Kochian *et al.*, 2005). Los HMA contribuyen a la inmovilización de los metales pesados dentro del suelo (fitoestabilización) (Hall *et al.*, 2003). En el caso específico del aluminio, las micorrizas arbusculares favorecen mecanismos de exclusión de este en la raíz al modificar el patrón de exudación de ácidos orgánicos quelantes de aluminio o modificando la capacidad de intercambio catiónico de la pared celular, movilizándolo hasta la parte aérea (Sánchez, 1999).

En la figura 15 se observa una relación inversa entre el porcentaje de colonización y el contenido de Al (acidez), sin embargo se puede evidenciar que el alto contenido de aluminio no afectó la respuesta favorable en cuanto a colonización micorrícica. Gaur y Adholeya (2004) reportan que, el resultado de la eficiencia de colonización micorrícica depende de la combinación de la planta/ hongo/ metal pesado y de su influencia en las condiciones del suelo, por lo que podemos asumir que existe una combinación positiva entre los clones de cacao y los géneros hallados de HMA.

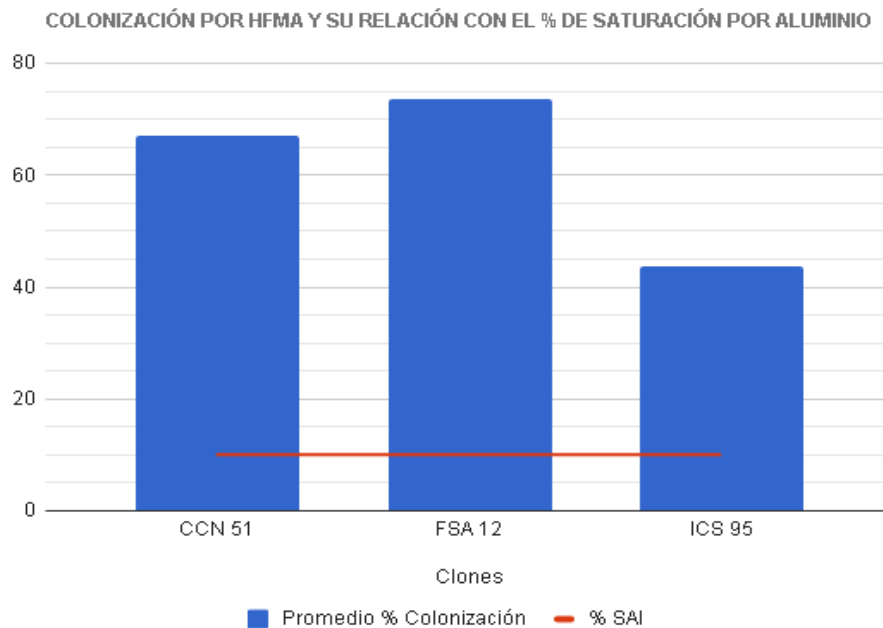


Figura 15. Porcentaje de colonización y su relación con el porcentaje de saturación de aluminio

Fuente: Hernández & Monroy, 2017.

4.4.4. Simbiosis de HMA y su relación con la Textura del suelo

Según estudios realizados por Peña *et al.*, (2006) a cerca de la caracterización de HMA en la Amazonía colombiana, concluye que la textura es la única variable fisicoquímica del suelo que influye directamente en la distribución de géneros de HMA en el suelo,

posiblemente por la disponibilidad de oxígeno y la capacidad de infiltración natural del suelo con relación al volumen de la espora. En general, los géneros sensibles a la textura prefieren los suelos francos, entre ellos los géneros *Glomus* y *Acaulospora*, no se encuentran comúnmente en suelos arcillosos debido a la poca disponibilidad de oxígeno y bajo drenaje de estos suelos, que promueven la formación de microhábitats anaeróbicos en el suelo y afectaría la viabilidad de los propágulos (Peña *et al.*, 2006). En este caso, el análisis de suelo dio como resultado un suelo Franco Arenoso, que puede ofrecer a los géneros *Glomus* y *Acaulospora* el ambiente propicio para su óptimo desarrollo.

5. CONCLUSIONES

Los tres clones evaluados mostraron simbiosis con HMA, ya que se evidenciaron propágulos infectivos y colonización radicular en las muestras estudiadas. Sin embargo, la riqueza de morfotipos fue baja, identificándose 10 pertenecientes al género *Glomus* y 1 al género *Acaulospora*.

Los tres clones evaluados presentaron porcentaje de colonización en rangos medios a altos pero la abundancia de esporas fue baja, lo que indica que la relación de estos dos factores no es directamente proporcional y se encuentra influenciada por la especie, la época y condiciones del muestreo, entre otras.

Los resultados de los análisis de varianza para el porcentaje de colonización, señalan que no hubo diferencias significativas entre los valores del porcentaje total de colonización entre los clones CCN 51, FSA 12 e ICS 95. Los resultados de la prueba de Tukey, muestra que el clon ICS 95 presenta promedios menores para porcentaje de colonización; mientras que, los clones FSA 12 y CCN 51 presentan los mayores porcentajes de colonización.

Los resultados de los análisis de varianza para el conteo de esporas, señalan que en los clones CCN 51, FSA 12 e ICS 95, el número de esporas es independiente a estos. Los resultados de la prueba de Tukey muestra que el clon FSA 12 presenta mayor número de esporas; aun así, no existe una diferencia significativa entre los clones evaluados.

El análisis de varianza de verosimilitud máxima realizado, determinó que hay una independencia entre el número de morfotipos y los clones evaluados, sin embargo en la distribución de estos se observó que cinco morfotipos mostraron especificidad por el clon CCN 51, un morfotipo por el clon FSA 12 y uno para el clon ICS 95; todos estos caracterizados como pertenecientes al género *Glomus*.

La colonización radicular estuvo directamente relacionada con el pH y el porcentaje de materia orgánica del suelo, tuvo una relación inversamente proporcional con el Fósforo disponible del suelo, una relación inversamente proporcional con la acidez intercambiable y hubo una influencia directa en la distribución de los géneros dada por la textura.

El estudio morfológico de los HMA no basta para su identificación hasta especie debido a la inexistencia de claves actualizadas o completas. Para generar resultados con mayor precisión, se requiere de estudios moleculares para la identificación de especies.

6. RECOMENDACIONES

Hacer uso de herramientas moleculares combinadas con estudios morfológicos para identificación de especies de HMA asociadas a cacao (*Theobroma cacao* L.) y generar inventarios en la Región de la Orinoquia.

Realizar la caracterización de HMA en épocas contrastantes para determinar el comportamiento de la colonización o establecimiento de la población.

A partir de esta investigación se puede generar posteriores trabajos que incluyan propagación, inoculación y formulación de productos de HMA asociados al cultivo de cacao, específicamente a los clones CCN 51, FSA 12 e ICS 95.

Relacionar el porcentaje de colonización radicular con otros factores fisicoquímicos del suelo como Humedad, cobertura y elementos menores.

7. BIBLIOGRAFÍA

ABBOTT, L. Y ROBSON A. 1991. Factors influencing the occurrence of vesicular arbuscular mycorrhizas Agric. Ecosystems Environ.

ALLEN, E., RINCON, E., ALLEN, M., PÉREZ, A., HUANTE, P. 1998. Disturbance and seasonal dynamics of mycorrhizae in a tropical deciduous forest in Mexico. México.

ARCOS, A. 2003. Distribución de la asociación micorrízico arbuscular en ecosistemas naturales e intervenidos. En: Aspectos ambientales para el ordenamiento territorial del Trapecio Amazónico. Instituto Geográfico Agustín Codazzi - IGAC

BARKER, S., TAGU, D., DELP G. 1998. Regulation of root and fungal morphogenesis in mycorrhizal symbiosis. Plant Physiology, 116: 1201-1207

BEARE, M., HU, S., COLEMAN, D., HENDRIX, P. 1997. Influences of mycelial fungi on soil aggregation and organic matter storage in conventional and no tillage soils. *Applied Soil Ecology*, 1997, vol. 5, p. 211-219.

BELTRÁN, J., CÓRDOBA, R. 2012. Comportamiento ecofisiológico de cuatro clones de cacao (*Theobroma cacao* L.) propagados mediante tres métodos de injertación en el Curdn en Armero- Guayabal, Tolima. Tesis de pregrado, Universidad del Tolima. Colombia.

BENAVIDES, J. 2013. El desarrollo económico de la Orinoquia Como aprendizaje y construcción de instituciones. Fedesarrollo. Corporación Andina de Fomento (CAF).

BEVER, J. RICHARDSON, S. LAWRENCE, B. HOLMES, J. & WATSON, M. 2009. Preferential allocation to beneficial symbiont with spatial structure maintains mycorrhizal mutualism. *Ecology Letters*, 13-21.

BIERMANN, B. LINDERMAN, R. 1983. Use of vesicular arbuscular mycorrhizal roots, intraradical vesicles and extraradical vesicles as inoculum. *New Phytologist*.

BIDWEL, R. 1980. Fisiología Vegetal. México, A.G.T., 674-676 p.7.

BROWN, M. Y KING, E. 1982. "Morphology and histology of vesicular arbuscular mycorrhizae. A. Anatomy and cytology. En methods and principles of micorrhizal research. USA, the American Phytopathological Society, 15-21.

CAMACHO J., LUENGAS C. & LEIVA F. 2008. Effect of agricultural intervention on the spatial variability of some soils chemical properties in the eastern plains of Colombia. *Chilean Journal of Agricultural Research* 68 (1): 42-55.

- CAMARGO, S. 2002. Dispersal, distribution and establishment of arbuscular mycorrhizal fungi: a review. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 71: 33-44.
- CANO, M. 2011. Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. Una revisión. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*.
- CASIERRA, F. AGUILAR, O. 2007. Estrés por aluminio en plantas: reacciones en el suelo, síntomas en vegetales y posibilidades de corrección. Una revisión.
- CAVAGNARO, T., VASQUEZ, F. 2001. Morphology of arbuscular mycorrhizas is influenced by fungal identity. *New Phytologist*, 151: 469-475.
- CONECTA RURAL. 2013. Cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.). Clones recomendados por zona agroecológica. República de Colombia.
- CORPES ORINOQUIA. 2004. La Orinoquia Colombiana, visión monográfica. Suelos.
- CORPOICA. La Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. 2010. Tecnología para el mejoramiento del sistema de producción de cacao.
- CUENCA, G., CÁCERES, A., OIRDOBRO, G., HASMY, Z., Y URDANETA, C. 2007. Las micorrizas arbusculares como alternativa para una agricultura sustentable en áreas tropicales. *Interciencia* 32(1):23-29.
- CHAUDHARD, V., O'DELL, T., RILLIG, M., JOHNSON, N., 2014. Multiscale patterns of arbuscular mycorrhizal fungal abundance and diversity in semiarid shrublands. *Fungal Ecology*.
- DANIELS, B., MENGE, J. 1980. Hiperparasitization of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Phytopathology* 70: 584-590.
- DOUDS, D. SCHENCK, N. 1990. Relationship of Colonization and Sporulation by VA Mycorrhizal Fungi to Plant Nutrient and Carbohydrate Contents. *New Phytol.* 1990;116:621-627.
- EGAN, C., LI, D., KLIRONOMOS, J., 2014. Detection of arbuscular mycorrhizal fungal spores in the air across different biomes and ecoregions. *Fungal Ecology*.
- ENTRY J., RYGIIEWICZ P., WATRUD L. AND DONNELLY P. 2002. Influence of adverse soil conditions on the formation and function of Arbuscular mycorrhizas. *Advances in Environmental Research*. 7: 123-138
- ESPINOSA, J. MOLINA, E. 1999. Acidez y encalado de los suelos. International plant Nutrition Institute.
- FABER, B., ZASOKI, R., MUNNS, D., & SHACKEL, K. 1991. A method of measuring

- hyphal nutrient and water uptake in mycorrhizal plants. *Can. J. Bot.* 69:87-94.
- FEDERACIÓN NACIONAL DE CACAOTEROS, 2015. Avances en Investigación. Arauca, Colombia.
- FEDERACIÓN NACIONAL DE CACAOTEROS. 2017. Economía Nacional.
- FINLAY, R. 2008. Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. *Journal of Experimental Botany*, 59:1115-1126.
- GARCIA, C. FRANCO, M. QUINTERO, J. 2000. Catálogo de cepas de micorrizas arbusculares. Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- GARZÓN, F. 2004. Determinación de las variaciones de la densidad radical a través del tiempo de tres distintos cultivos, representantes de distintos niveles de densidad radical, creciendo bajo distintos niveles de fósforo. Métodos para el estudio de la longitud radical. Chile.
- GERDERMANN, J., NICOLSON, T. 1963. Spores of mycorrhizal endogone species extracted by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycology Society*, vol. 46, p. 235-244.
- GAUR, A. Y ADHOLEYA, A. 2004. Prospects of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Current Science* 86: 528-534.
- GONZÁLEZ, M. 1993. La endomicorriza vesículo-arbuscular. Pp 53-91. En: Ferrera C., R.; González Ch., M.C. y Rodríguez M., M.N. Manual de Agromicrobiología. Editorial Trillas, México. 144 p.
- GÓMEZ, M.; CASTRO, H.; MUNÉVAR, O. 2007. Diagnóstico y control de la acidez en suelos sulfatados ácidos mediante pruebas de incubación. *Agr. Col.* 24(1):123-130.
- HALL, L., WILLIAMS, L. 2003. Transition metal transporters in plants. *J. Exp. Bot.* 54: 2601–2613.
- HARLEY, J Y SMITH, S. 1983. Mycorrhizal symbiosis. Academic Press, London, New York.
- HERNÁNDEZ, L. CASTILLO, S. GUADARRAMA, P. MARTÍNEZ, Y. ROMERO, M. SÁNCHEZ, I. 2003. Hongos micorrizógenos Arbusculares del Pedregal de San Angel. México.
- INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO (ICA). 2012. Manejo fitosanitario del cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) Medidas para la temporada invernal, 2012.
- ICCO. (Organización Internacional del Cacao). 2003. Resumen Estadístico. (Boletín del Cacao GB 21).

INSTITUTO GEOGRÁFICO AGUSTÍN CODAZZI. 2008. Descripción del uso del suelo en Yopal- Casanare.

INSTITUTO GEOGRÁFICO AGUSTÍN CODAZZI. 2015. Consideraciones generales para interpretar análisis químicos de suelos. Subdirección de agrología. Laboratorio Nacional de suelos.

INVAM (International Culture Collection of Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi. Classification of Glomeromycota. Disponible en línea. Revisado en abril 2017

JONES, M. Y SMITH, S. 2004. Exploring functional definitions mycorrhizas: are mycorrhizas always mutualismo. *Canadian Journal of Botany*, 82:1089-1109.

JOHNSON, N. C. 1993. Can fertilization of soil select less mutualistic micorrizas. *Ecological application* 3: 749-757.

JUNG, S., MARTINEZ, A., LÓPEZ, J., POZO, M. 2012. Mycorrhiza-Induced Resistance and Priming of Plant Defenses

KAHILUOTO, H. 2001. Promotion of AM utilization through reduced P fertilization. 2. Field studies. *Plant Soil*, 231: 65-79.

KHANA, M., DELOWARA, S. 2006. Effect of edaphic factor son root colonization and spore population of arbuscular mycorrhizal fungi. *Bulletin Institute Tropical Agriculture*, 29: 97-104.

KING, A. 2011. Nutrient Losses in Agriculture: the Role of Biochar and Fungal. *The Journal of Undergraduate Research*.

KLIRONOMOS, J., 2003. Variation in plant response to native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecology*, 84(9): 2292-2301.

KIVLIN, S., WINSTON, G., GOULDEN, M., TRESEDER, K. 2014. Environmental filtering affects soil fungal community composition more than dispersal limitation at regional scales. *Fungal Ecology*.

KOCHIAN L., PINEROS M., HOEKENGA O. 2005. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. *Plant Soil* 274 175–195
10.1007/s11104-004-1158-7

KOSKE, R. 1984. Spores of VAM fungi inside spores of VAM fungi. *Mycologia* 76 (5): 853-862.

LEÓN, D. 2006. Evaluación y caracterización de micorrizas arbusculares asociadas a

yuca (*Manihot esculenta* sp.) en dos regiones de la Amazonia colombiana. Tesis de grado, Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

LOZANO, J. ARMBRECHT, I. MONTOYA, J. 2015. Hongos formadores de micorrizas arbusculares y su efecto sobre la estructura de los suelos en fincas con manejos agroecológicos e intensivos. *Acta Agronómica*, Vol. 64, Núm. 4

MARTINEZ, L. PUGNAIRE, F. 2009. Interacciones entre las comunidades de hongos formadores de micorrizas arbusculares y de plantas. Algunos ejemplos en los ecosistemas semiáridos. España.

MARTINEZ, N. 2016. Evaluación de componentes físicos, químicos, organolépticos y del rendimiento de clones universales y regionales de cacao (*Theobroma cacao* L.) en las zonas productoras de Santander, Arauca y Huila.

MATIZ, A. 2013. Sistema de Información geográfica municipal 2013. Ministerio de agricultura y desarrollo rural.

MEJIA, S. 2010. Potencialidades para la implementación de cultivos de caucho (*Hevea Brasiliensis*) en el municipio de Yopal- Casanare. Universidad Nacional de Colombia.

MINISTERIO DE COMERCIO, INDUSTRIA Y TURISMO DE COLOMBIA. MinCIT. 2013. Proyecto de caracterización del sector agropecuario.

MORTON, J., & REDECKER, D. 2001. Two new families of Glomales, Archaeosporaceae and Paraglomaceae, with two new genera Archaeospora and Paraglomus, based on concordant molecular and morphological characters. *Mycologia* 93(1): 181-195.

MORTON, J., & BENTIVENGA, S. 1994. Levels of diversity in endomycorrhizal fungi (Glomales, Zygomycetes) and their role in defining taxonomic and non taxonomic groups. *Plant and Soil* 159:47-59.

NARDINI, C., DI SALVO, L., Y GARCIA, I. 2011. Micorrizas arbusculares: asociaciones simbióticas e indicadores de calidad ambiental en sistemas de cultivos extensivos. *Rev. argent. microbiol.* [online]. 2011, vol.43, n.4.

OCHOA, O. 1997. Reconocimiento de hongos formadores de micorriza vesículo-arbuscular (MVA) en cacao (*Theobroma cacao*), Maraco (*T. bicolor*) y copoazu (*T. grandiflorum*), en condiciones de campo en San José del Guaviare - Colombia. Departamento de Biología. Universidad Nacional de Colombia. Tesis de Pregrado. 96p.

OLIVEIRA, A., OLIVEIRA, L., OLIVEIRA, F. 1998. Micorrizas arbusculares en cupuacu e guarana de un sistema agroforestal de terra firme no municipio de Manaus. Caxambu, Brasil.

ÖPIK, M., MOORA, M., LIIRA, J., ZOBEL, M., 2006. Composition of root-colonizing

arbuscular mycorrhizal fungal communities in different ecosystems around the globe. *Journal of Ecology* 94, 778e790.

ORDOÑEZ, Y., CAMARGO, S. 2016. Bacteria with Phosphate Solubilizing Capacity Alter Mycorrhizal Fungal Growth Both Inside and Outside the Root and in the Presence of Native Microbial Communities.

PAREDES, M. 2003. *Manuel de Cultivo del Cacao*. Ministerio de Agricultura. Programa para el Desarrollo de la Amazonía PROAMAZONIA. Perú.

PAUL, E. CLARK, F. 1996. *Soil Microbiology and Biochemistry*. San Diego, CA, USA: Academic Press: 2nd Edition.

PÉREZ, M., PEÑARANDA, M., HERAZO, M. 2010. Impacto, Manejo y control de enfermedades causadas por *Phytophthora palmivora* en diferentes cultivos. Universidad de Pamplona.

PEÑA, C., CARDONA, G., MAZORRA A., ARGÜELLES J., ARCOS A. 2006. *Micorrizas arbusculares de la amazonía colombiana*. Catálogo Ilustrado. Instituto Amazónico de investigaciones científicas SINCHI.

PEÑA, C., CARDONA, G., ARGÜELLES, J., ARCOS, A. 2003. *Micorrizas arbusculares del sur de la Amazonia colombiana y su relación con algunos factores fisicoquímicos y biológicos del suelo*. Acta Amazónica

PETERSON, R., MASSICOTE, H., & MELVILLE, L. 2004. *Mycorrhizas: Anatomy and cell biology*. NRC Research Press. Ottawa. 173 pp

PREGER, A., RILLIG, M., JOHN, A., DU PREEZ, C. Y AMELUNG, I. 2007. Losses of glomalin-related soil protein under prolonged arable cropping: A chronosequence study in sandy soils of the South African Highveld. *Soil Biology & Biochemistry*, 2007, vol. 397, p. 445-453

PHILLIPS, J.; HAYMAN, D. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesiculararbuscular mycorrhizal fungi for rapid assesment of infection. *Transactions British Mycol. Soc.* 55:158-161

POSADA, R., MADRIÑAN, S. Y RIVERA, E. 2012. Relationships between the litter colonization by saprotrophic and arbuscular mycorrhizal fungi with depth in a tropical forest. *Fungal Biology*, 116(7), 747-755.

QUILAMBO, O. 2003. The vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *African Journal*

Biotechnology, 2(12): 539-546.

READ, D. 1991. Mycorrhizas in ecosystems. *Experientia*, 47:376-391.

READ, D. 1999. The state of the art. En: Mycorrhiza 2nd. (A. Varma y B. Hock, eds.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. Pag. 3-34.

REDECKER, D., SCHÜßLER, A., STOCKINGER, H., STÜRMER, S., MORTON, J. AND WALKER, C. 2013. An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomeromycota*).

RIVEROS, S. 2003. Sociedad geográfica de Colombia. Academia de ciencias geográficas

RODRÍGUEZ, Y., VAN TUINEN D., FERNÁNDEZ, K. 2009. Reclasificación taxonómica de dos cepas de hongos micorrízicos arbusculares. *Cultivos Tropicales*, vol. 30, no. 1, p. 31-35.

ROJAS, J. 2010. Hongos micorrízicos arbusculares en la rizósfera de genotipos promisorios de cacao (*Theobroma cacao* L.) bajo los sistemas tradicional y bajo bosque en la región San Martín. Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto. Perú.

RUIZ, J. 2014. Cacao y su aporte al desarrollo Colombiano. Universidad Militar Nueva Granada.

SÁENZ, F. 2010. Clones para cacao en Colombia. Consejo Nacional Cacaotero. Acuerdo 003.

SALAMANCA, C., SILVA, M. 1998. Las micorrizas como alternativa para el manejo sostenible de los agroecosistemas tropicales. *Boletín Técnico* No. 12. CORPOICA. 26p

SÁNCHEZ, M., & HONRUBIA, M. 1994. Water relations and alleviation of drought in mycorrhizal plants. pp. 167-178. In: Gianinazzi, S y H Shüepf (eds.), *Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems*, Birkhäuser Verlag, Basel.

SÁNCHEZ, M. 1999. Endomicorrizas en agroecosistemas colombianos. Universidad Nacional de Colombia, Palmira. 227 p.

SÁNCHEZ, M. POSADA, R. VELÁSQUEZ, D. NARVÁEZ, M. 2010. Metodologías básicas para el trabajo con micorriza arbuscular y hongos formadores de micorrizas arbuscular. Universidad Nacional De Colombia. Sede Palmira.

SANDERS, I., MONICA, A., GROPE, K., BOLLER, T., WIEMKEN, A. 1996. Identification of ribosomal DNA polymorphism among and within spores of the glomales. *New Phytol.*

- SANTANA, J. 2007. Determinación de las variaciones de la densidad radical en tres cultivos, bajo distintos niveles de fósforo. Chile.
- SANTOS, J. 2007. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in grasslands and arable fields. Ecological factors related to community composition and dynamics. Thesis. In Faculty of natural resources and agricultural sciences Uppsala Suecia. Swedish University of Agricultural sciences.
- SCHWARZOTT, D., WALKER, C., SCHUBLER, A. 2004. *Glomus*, the largest genus of the arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales), is nonmonophyletic. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 21 (2): 190-197.
- SCHROEDER, M., JANOS D. 2005. Plant growth, phosphorus nutrition and root morphological responses to arbuscular mycorrhizas, phosphorus fertilization, and intraspecific density. *Mycorrhiza* 15: 203- 216.
- SCHÜSSLER, A. SCHWARZOTT, D. WALKER, C. 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol.*
- SIEVERDING, E. 1991. Vesicular Arbuscular Mycorrhiza in Tropical Agrosystem. Deutsche Gesellschaft für technische Zusammenarbeit (GTZ) GMBH, federal Republic of Germany. 371 p.
- SIEVERDING, E. 1984. Manual de Métodos para la investigación de la micorriza vesículo - arbuscular. Palmira, CIAT. s. p.
- SIEVERDING, E. 2005. *Glomus badium*, a new sporocarpic mycorrhizal fungal species from European grassland with higher soil pH.
- SYKOROVÁ, Z., WIEMKEN, A. & REDECKER, D. 2007. Cooccurring *Gentiana verna* and *Gentiana acaulis* and their neighboring plants in two swiss upper montane meadows harbor distinct arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Appl Environ Microbiol.* 5426- 5434.
- TRAPPE, J., MOLINA, R., LUOMA, D., CÁZARES, E., PILZ, D., SMITH, J., CASTELLANO, M., MILLER, S. Y TRAPPE, M. 2009. Diversity, ecology, and conservation of truffle fungi in forests of the Pacific Northwest. 61 Gen. Tech. Rep. PNW-GTR-772. Portland, OR: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Research Station.
- TENNAT, D. 1975. A test of a modified line intersect method of estimating root length. *J. ecol.* 63, 995-1001.
- VALENCIA, C. 2015. Análisis de la presencia natural de micorrizas en cultivos de algodón (*Gossypium barbadense* L.) inoculados con *Bacillus megaterium* Y/O *Bradyrhizobium yuanmingense*.



VANDENKOORNHUYSE, P., HUSBAND, R., DANIELL, T., WATSON, I., DUCK, J., FITTER, A., & YOUNG, J. 2002. Arbuscular mycorrhizal community composition associated with two plants species in a grassland ecosystem. *Mol Ecol* 11. 1555- 1564.

VILLARREAL, L. Y NERI-LUNA, C. 2009. Hacia una valoración de los hongos y micorrizas como recurso genético microbiano. Simposio: Los hongos y micorrizas como recurso genético microbiano. Memoria del X Congreso Nacional de Micología. Guadalajara, Jalisco, septiembre 20-24. p. 36.

WALKER, C. 1983. Taxonomic concepts in the Endogonaceae: spore wall characteristics in species descriptions. *Mycotaxon* 18 (2): 443-455.

ANEXOS

Anexo 1. Resultados análisis de suelos de la Finca “Mate Pantano” de la Universidad de La Salle, en zona rural del municipio de El Yopal (Casanare).

 Laboratorio Agroanálisis S.A.S.	
REMITENTE	DANIELA HERNANDEZ
PROCEDENCIA	FINCA LA SALLE YOPAL-CASANARE
DIRECCIÓN DEL CLIENTE	TELÉFONO
	TIPO
RESULTADOS DE ANÁLISIS DE SUELOS	
Número de laboratorio	55823
Identificación	
Lote	N.L.
Parti	
Profundidad (cm)	
Textura	FA
Arenas-A (%)	55
Limos-L (%)	30
Arcillas-Ár (%)	14
pH 1:1	4.40
Al (ácidos) m.e./100g	3.00
C. Eléctrica microsiemens ps/cm*	-
Carbonatos cualitativos	-
Materia Orgánica M.O. (%)	2.88
Nitrógeno total -N (%)	0.14
Fósforo (Bray II) -P p.p.m.	48
Calcio -Ca p.p.m.	972
Magnesio -Mg p.p.m.	242
Potasio -K p.p.m.	270
Hierro -Fe p.p.m.	-
Cobre -Cu p.p.m.	-
Manganeso -Mn p.p.m.	-
Zinc -Zn p.p.m.	-
Boro -B p.p.m.	-
Capacidad -C.L.C. m.e./100g	30.16
Calcio -Ca m.e./100g	4.86
Magnesio -Mg m.e./100g	2.02
Potasio -K m.e./100g	0.69
Sodio -Na m.e./100g	0.93
Suma de bases m.e./100g	8.50
Porcentaje saturación	
Saturación total (%)	28.18
Saturación de -Ca (%)	16.11
Saturación de -Mg (%)	6.70
Saturación de -K (%)	2.29
Relación -Ca/Mg (%)	2.41
METODOLOGÍA	Textura por Bouyoucos; pH 1:1 en agua potenciométrica; Aluminio (ácido) extracción con Cloruro de Potasio 1N; Carbono orgánico digestión en vía húmeda (Walkley-Black); Nitrógeno total Kjeldahl modificado; Fósforo Bray II; Bases intercambiables Ca, Mg, K y Na absorción atómica; Capacidad de intercambio catiónico acetato de amonio 1N.
OBSERVACIONES	
APROBADO POR: GERENTE GENERAL AGRONÁLISIS S.A.S.	 EDUARDO PALACIO

Anexo 2. Protocolo de Phillips y Hayman (1970) para tinción de raíces.

Esta metodología permite hacer una tinción diferencial con azul de tripan de las hifas, esporas, vesículas y arbuscúlos de HMA que se encuentran colonizando la raíz de la planta, para evaluación de simbiosis hongo-planta, con base en la metodología de **Phillips J.M. and Hayman D.S (1970) Improve Procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhiza fungi for rapid assessment of infection. Trans. British Mycological Society 55: 158-161**

MATERIALES Y EQUIPOS

- KOH 10%
- Lactoglicerol
- Azul de tripan 0.05%
- Material vegetal

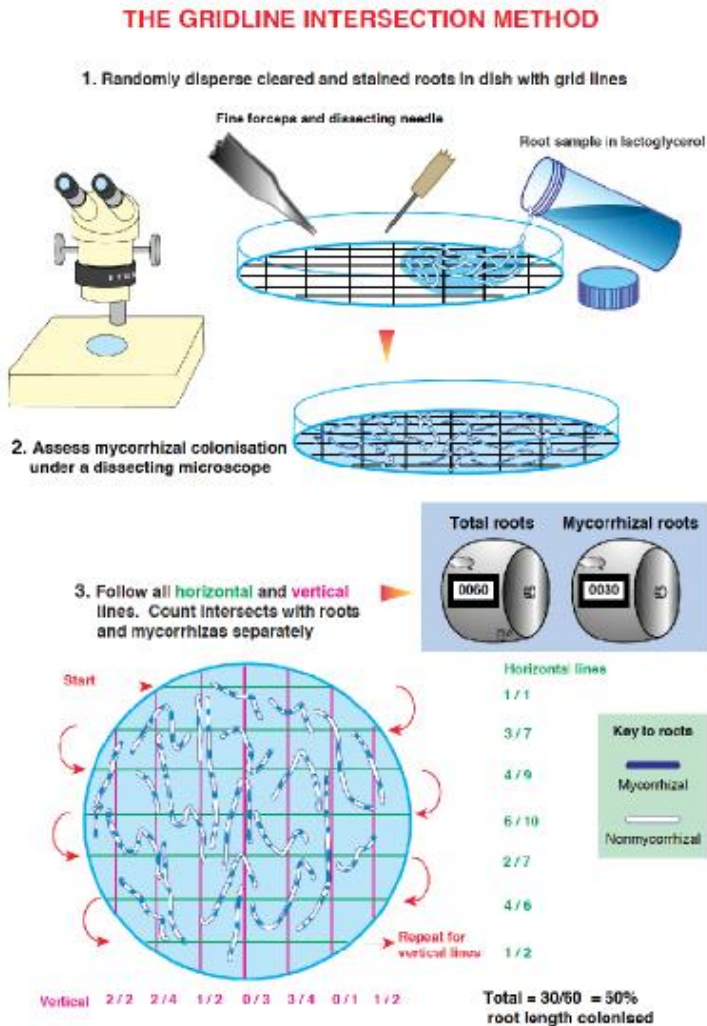
- Tubos eppendorff 2ml
- Gradilla para tubos
- Laminas portaobjetos
- Laminas cubreobjetos
- Pinzas finas
- Tijeras o bisturi
- Pipetas pasteur plásticas
- Guantes de latex
- Balanza
- Microscopio-estereoscopio
- Baño María

METODOLOGÍA

Antes de empezar tenga en cuenta que: Los tiempos en los que se expongan las raíces a cada uno de los reactivos, va a depender de la calidad de las mismas, hay raíces con un alto contenido de taninos que requieren un mayor tiempo de exposición, igual ocurre con las raíces que son demasiado gruesas. En este protocolo se dan valores de tiempo promedio

- Procesar únicamente raíces frescas y en buenas condiciones
- Lavar raíces con suficiente agua
- Sumergir las raíces en KOH al 10% p/v (Clareo)
- Calentar al baño maria (90°C) durante 1 hora y media. Para verificar si la muestra está lista para retirar el reactivo, este debe estar de un color café oscuro o rojizo fuerte.
- Lavar KOH con abundante agua destilada tres veces. Tenga en cuenta que debe tener especial cuidado en no perder parte de la muestra (usar pipetas pasteur para retirar el liquido o usar un tamiz).
- Adicionar H₂O₂ al 3% y dejar reposar 1 hora y media
- Lavar con abundante agua destilada
- Adicionar tinta Sheffer al 5% (en ácido acético al 5%)
- Retirar el colorante, lavar con agua y sumergir en lactoglicerol 40%. Guardar en nevera hasta el momento del análisis.
- Dejar reposar 20 horas a temperatura ambiente.
- Leer en estereoscópio

Anexo 3. Método de intersección de la grilla, Tennant 1975.



Anexo 4. Protocolo de Sieverding para el montaje de cultivos trampa.

Para el establecimiento de bancos de HMA nativos o introducidos se utilizan cultivos trampa, con fines de: a) conservación de este recurso biológico, b) permitir la expresión de algunos HMA esporulados y estimular la de otros que no lo están, c) producción posterior de inoculantes para el campo, d) investigaciones en laboratorio, invernaderos y campo. Para cumplir con este objetivo se requiere: a) sustrato adecuado, b) disponer de una planta hospedera, c) una fuente de inóculo de HMA y d) proveer las condiciones de suelo (sustrato) y manejo de la planta hospedera.

Reactivos:

- Desinfectantes aprobados por la legislación.
- Hipoclorito de sodio al 1 y 10%

Material de laboratorio:

- Suelo tamizado a 1 cm.
- Arena cuarcítica y de río.
- Mezcla de suelo y arena: proporción 2:1 y 1:1 (v/v).
- Materos sellados con papel kraft para autoclave. • Materos de 2 a 5 kg.
- Plástico negro.
- Palas.
- Vasitos de 4 y 9 onzas.
- Semillas.
- Esporas y micelio de HMA identificado o por identificar, raíces micorrizadas ó una mezcla de suelo + raíces + esporas de HMA.
- Micropipeta o pipeta Pasteur.

Equipos:

- Autoclave
- Zaranda, tamiz o malla con apertura de 7/16 ó 3/8 de pulgada.

El sustrato se prepara en proporción (v/v) 2:1 o 1:1 (suelo, arena). Se hace el día que se va a utilizar el sustrato, en mesas cubiertas con papel kraft y previamente desinfectadas, o en el sitio donde se desinfectó el suelo, aprovechando el plástico negro. El sustrato se puede envasar en recipientes de polietileno de baja densidad (icopor) de 4 onzas (125 g) o de 9 onzas (280 g), los cuales deben tener orificios para drenaje. El sustrato se conserva a 60% de capacidad de campo. Para calcular capacidad de campo se puede utilizar el método gravimétrico, el cual consiste en aplicar agua destilada estéril al sustrato previamente pesado, se deja drenar completamente hasta cuando ya no salga agua, se pesa nuevamente y se establece de esta manera, el peso y volumen de agua necesarios para lograr el porcentaje de capacidad de campo determinado.

Como planta hospedera para los HMA, se puede utilizar cualquiera que forme MA. Sin embargo, una serie de características en las plantas seleccionadas, pueden llevar a que el cultivo trampa sea exitoso, algunas de ellas son: a) que sea altamente micotrófica y compatible con diferentes HMA, b) sistemas radicales fibrosos y ampliamente extendidos, que aseguren la posibilidad de diferentes sitios de colonización por los HMA, c) períodos de germinación rápidos y emergencia, que asegure que la planta pronto estará fotosintetizando, de manera que se cubran las necesidades de carbono y de hábitat del micosimbionte 3 , d) que sea resistente a sequía, combinada con alta capacidad fotosintética (plantas C-4), e) que se adapte a las condiciones ambientales en las cuales se propague y f) el hecho que se pueda podar y sea perenne son dos

características más a tener en cuenta dentro de la selección.

Cuando se utiliza como inoculante suelo + raíces + esporas, se puede proceder de diferentes formas: una de ellas, es llenar el vaso o matero con el sustrato, colocar una capa del inoculante de HMA, colocar la semilla pregerminada y luego terminar de llenar el vaso con el sustrato preparado. Otra forma, es hacer un pequeño orificio donde se va a depositar la semilla, llenarlo con la mitad del inoculante, colocar la semilla y cubrir las paredes del hueco con el inoculante. En ambos casos, hacer un poco de presión con el instrumento de siembra sobre la base de la plántula. Cuando se usan raíces como inoculantes, estas se seleccionan en trozos pequeños de aproximadamente 1 mm, se ahoya el sitio de siembra y estos trocitos se pueden colocar debajo, a los lados y/o sobre la semilla pregerminada. Igualmente se hace presión para que la plántula quede firme. Cuando el inoculante son esporas y trozos de micelio de HMA, estos se suspenden en muy poco líquido, se recogen al microscopio con una micropipeta o pipeta Pasteur, se ahoya superficialmente, se deposita la semilla pregerminada y el inoculante se descarga directamente sobre la semilla cuidando que queden sobre el sitio donde empiezan a emerger las raicillas. Se cubre con el sustrato y hace presión para que la plántula quede firme.

Anexo 5. Protocolo de Gerdermann y Nicolson con modificaciones del INVAM para extracción de esporas de HMA.

Pesar 10 g de suelo.

La muestra se coloca en agua destilada en una licuadora y se mezcla a alta velocidad durante aproximadamente cinco segundos. El propósito de este paso es romper fragmentos de raíz y liberar esporas y también separar esporas de agregados de hifas unidos a raíces o en el suelo (especialmente aquellos de especies con hifas de paredes gruesas). Los tiempos de mezclado más largos no afectan a las esporas, pero pueden romper las raíces en la medida en que más detritus orgánicos finos probablemente acompañarán a las esporas en la preparación final de la extracción.

El material mezclado se vierte inmediatamente a través de los tamices. La mayoría de la arena permanece en la licuadora. El tamiz inferior tiene aberturas de 38, 45, o 53 μm (cualquiera de estos tres trabajos bien para la mayoría de las especies, aunque hay algunas pequeñas glomoides hialinas que requieren el tamiz de 38 μm). Captura la mayoría de las esporas.

El tamiz superior tiene generalmente aberturas de 500 μm . Captura raíces, grandes escombros y esporas o esporocarpos realmente grandes. A pesar de la cantidad de material orgánico que podría estar presente, las esporas son lo suficientemente grandes para ser fácilmente detectados después de que el material de este tamiz se transfiere a una placa de Petri.

Generalmente, no procesamos el material en el tamiz superior a través de un paso de

centrifugación debido a la cantidad de detritus orgánicos. Se lava, se transfiere a una placa grande de Petri, y se ve a través de un estereomicroscopio sólo para verificar que no hay esporas presentes. El material en el tamiz inferior se recoge en un vaso de precipitados de 50 ml con una manguera de caucho y luego se transfiere a tubos de 50 ml que contienen un gradiente de 20 a 60% de azúcar de mesa y agua. Estos tubos se centrifugan (aproximadamente 3000 rpm) durante 10 minutos.

El material recogido en estos tamices más pequeños se lava durante 1-2 minutos bajo agua del grifo y se transfiere a una placa de Petri.

Una vez hecho esto, pueden almacenarse a 4°C por hasta 30 días (verificando semanalmente las esporas parasitadas que luego se eliminan inmediatamente).

Anexo 6. Análisis de varianza para el porcentaje de colonización entre clones

Sistema SAS

		Procedimiento GLM										
		Información de nivel de clase										
Clase	Niveles	Valores										
		s										
CLON	3	CCN51 FSA12 ICS95										
REPETICION	4	1 2 3 4										
COLONIZACION	12	25	34.7	48	53.6	61.9	69.4	69.8	71.7	72.5	73.9	77.3
N		80.7										

Sistema SAS

Procedimiento GLM						
Variable dependiente: COLONIZACIÓN						
Fuente	D	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F	
Modelo	5	2311.420833	462.284167	2.49	0.1484	
Error	6	1112.248333	185.374722			
Total corregido	11	3423.669167				
		R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	COLONIZACIÓN Media	
		0.675130	22.1236	13.61524	61.54167	
		1				
Fuente	D	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F	
CLON	2	1973.75166	986.875833	5.32	0.0468	
REPETICIÓN	3	337.669167	112.556389	0.61	0.634	

Anexo 7. Prueba de comparación de medias de Tukey

Sistema SAS

Procedimiento GLM

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para COLONIZACIÓN

Note: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Grados de libertad	6
Error de cuadrado medio	185.374
	7
Valor crítico del rango estudentizado	4.33917
Diferencia significativa mínima	29.539

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	CLON
A	73.675	4	FSA12
A			
B	67.150	4	CCN51
B			
B	43.800	4	ICS95

Anexo 8. Análisis de varianza conteo de esporas

Sistema SAS

Procedimiento GLM

Información de nivel de clase

Clase	Niveles	Valores
CLON	3	CCN51 FSA12 ICS95
REPETICION	8	1 2 3 4 5 6 7 8
CONTEO	23	61 72 76 86 105 112 114 142 143 146 152 168 171 178 188 191 207 228 246 282 299 372 376

Número de observaciones leídas 2

4

Número de observaciones 2

Sistema SAS

Procedimiento GLM

Variable dependiente: CONTEO

Fuente	D	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	9	74120.5833	8235.6204	1.11	0.4135
Error	14	103570.7500	7397.9107		
Total corregido	23	177691.3333			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	CONTEO Media
0.417131	48.91627	86.01111	175.8333

Fuente	D	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
CLON	2	27068.58333	13534.29167	1.83	0.1969
REPETICION	7	47052.00000	6721.71429	0.91	0.5272
N		0			

Anexo 9. Prueba de comparación de medias para el conteo de esporas entre clones.

Sistema SAS

Procedimiento GLM

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para CONTEO

Note: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Grados de error de libertad	14
Error de cuadrado medio	7397.91
Valor crítico del rango estudentizado	3.70128
Diferencia significativa mínima	112.55

Medias con la misma letra no

son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Mediana	N	CLO
A	220.00	8	FSA12
A	168.88	8	CCN51
A	138.63	8	ICS95

Anexo 10. Análisis de varianza de verosimilitud máxima entre clones y morfotipos identificados.

Sistema SAS

Procedimiento CATMOD			
Resumen de datos			
Respuesta	sp*clon	Niveles de respuesta	15
Variable de peso	esporas	Poblaciones	1
Conjunto de datos	MORFOTIPO	Frecuencia total	52
	S		8
Frecuencia de valores ausentes	0	Observaciones	15

Perfiles de población	
Muestra	Tamaño muestral
1	528

Perfiles de respuesta		
Respuesta	sp	clon
1	sp1	CCN5 1
2	sp1	FSA1 0 2
3	sp1	CCN5 1 1
4	sp1	ICS95 1
5	sp2	CCN5 1
6	sp3	CCN5

		1
7	sp4	CCN5
		1
8	sp4	FSA1
		2
9	sp4	ICS95
10	sp5	CCN5
		1
11	sp6	CCN5
		1
12	sp7	CCN5
		1
13	sp7	FSA1
		2
14	sp8	FSA1
		2
15	sp9	ICS95

Análisis de máxima verosimilitud
Cálculos de verosimilitud máxima con
convergencia.

Análisis de varianza de verosimilitud máxima

Fuente	D	Chi- cuadrado	Pr > ChiS q
sp	10	200.66	<.0001
clon	2	19.23	<.0001
Ratio de verosimilitud	2	1.95	0.3765