

INTERACCIÓN MICORRIZAS ARBUSCULARES- *Trichoderma harzianum* (Moniliaceae) Y EFECTOS SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Brachiaria decumbens* (Poaceae)

Arbuscular Mycorrhizae-*Trichoderma harzianum* (Moniliaceae) Interaction and Effects on *Brachiaria decumbens* (Poaceae)'s Growth

TIFFANY SOSA RODRÍGUEZ¹, JIMENA SÁNCHEZ NIEVES¹,
ESPERANZA MORALES GUTIÉRREZ², FERNANDO CRUZ CORTÉS²

¹Departamento de Biología, Facultad de Ciencias,
Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

²Live Systems Technology S.A., Bogotá, Colombia.

Presentado agosto 22 de 2005, aceptado septiembre 15 de 2005, correcciones diciembre 2 de 2005.

RESUMEN

Se efectuó un ensayo en condiciones controladas utilizando hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) nativos, provenientes de un suelo rizosférico de *Pennisetum clandestinum* de la Universidad Nacional de Colombia (Bogotá), manteniéndolos en plantas de *Brachiaria decumbens* creciendo sobre sustrato arenoso suplementado con solución nutritiva. Se evaluaron diferentes tratamientos: plantas con inóculo de HFMA, plantas con *Trichoderma harzianum*, plantas con HFMA+*T. harzianum* y plantas control no inoculadas, con el fin de determinar las posibles interacciones entre dichos microorganismos, así como su efecto sobre el crecimiento de *B. decumbens*. La presencia de *T. harzianum* disminuyó la colonización radicular por HFMA, aunque no afectó la cantidad de esporas de HFMA/g suelo seco, en tanto que la población de *T. harzianum* (UFC/g suelo seco) disminuyó significativamente en presencia de HFMA. Estos resultados mostraron que existen interacciones entre HFMA y *T. harzianum* que afectan tanto el desarrollo de HFMA como la densidad poblacional de *T. harzianum*. Los valores obtenidos para los parámetros del crecimiento de la planta evaluados sugieren que el efecto de la interacción entre los microorganismos sobre la planta hospedera es de tipo neutral.

Palabras clave: hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA), *Trichoderma harzianum*, rizósfera, interacción.

ABSTRACT

The laboratory trial was made using native's Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) sampled in *Pennisetum clandestinum*'s rhizospheric soil obtained from Universidad Nacional de Colombia (Bogotá). *Brachiaria decumbens* was used as the host plant, growing in draining pots of steamed sandy soil supplemented with a complete nutritive solution.

Four different treatments were tested to determine the kind of interaction between Arbuscular Mycorrhizal Fungi and *Trichoderma harzianum* and the effect of AMF plus *T. harzianum* on *B. decumbens* growth: plants with AMF inoculum, plants with *T. harzianum*, plants with AMF plus *T. harzianum* and uninoculated controls. Root colonization was decreased by *T. harzianum*, although AMF spores/g dry soil quantity was unaffected by this fungi. On the other hand, *T. harzianum*'s population level (CFU /g dry soil) decreased in presence of AMF. These results shows an interaction between AMF and *T. harzianum* and this interaction affects as AMF development as population density of *T. harzianum*. Based in the values of the plant growth parameters studied, is possible to conclude the AMF-*T. harzianum* interaction has a neutral effect on *B. decumbens*'s growth.

Key words: Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF), *Trichoderma harzianum*, rizosphere, interaction.

INTRODUCCIÓN

Se conoce con el nombre de micorriza (del griego *mykes*-hongo, *rhiza*-raíz) a la asociación mutualista existente entre algunos hongos del suelo y las raíces de la mayoría de las plantas. Los registros fósiles más antiguos indican que dicha asociación tiene unos 400 millones de años, lo que ha llevado a considerar la compleja coevolución entre las plantas y sus hongos asociados, que se manifiesta en la amplia distribución del fenómeno (se ha estimado que el 90% de las plantas terrestres están micorrizadas) y en la diversidad de mecanismos morfológicos, fisiológicos y ecológicos implicados (Simon *et al.*, 1993). Durante la simbiosis, la planta hospedera recibe nutrientes minerales del suelo tomados por el hongo (principalmente fósforo), mientras que éste obtiene compuestos de carbono derivados de la fotosíntesis (Brundrett *et al.*, 1996). Los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) constituyen micorrizas que colonizan el tejido intraradical de la planta hospedera, donde desarrollan estructuras características de la simbiosis (arbuscúlos y vesículas), así como micelio extraradical, el cuál interactúa con el ecosistema de la rizósfera y es el encargado de la toma de nutrientes del suelo.

Es importante tener en cuenta que las micorrizas constituyen una asociación multifuncional con las plantas, cuyos beneficios van más allá de los aspectos nutricionales. Los HFMA son considerados como un recurso biológico multipropósito cuyo manejo, además de los efectos sobre la productividad vegetal, genera beneficios ambientales al mejorar las condiciones físico-químicas y biológicas del suelo (Guerrero *et al.*, 1996). Los beneficios desde el punto de vista biológico, se derivan de su interacción con los diversos grupos de macro y microorganismos de la rizósfera. Tal es el caso de aquellos que están implicados en el ciclaje de nutrientes como las bacterias fijadoras de nitrógeno y los microorganismos solubilizadores de fosfato (Azcón y Barea, 1996; Kim *et al.*, 1998; Hodge, 2002). Así mismo, dichos hongos interactúan con microorganismos implicados en el control biológico de patógenos presentes en el suelo, demostrando que existen diferentes tipos de interacción con HFMA. Algunos estudios sugieren que determinadas especies empleadas en control biológico pueden ser compatibles con las mico-

rizas y en consecuencia pueden ser aplicadas conjuntamente en el mismo inóculo, con la finalidad de incrementar el crecimiento vegetal en términos de rendimiento y sanidad. Por ejemplo, no se han encontrado efectos negativos de *Gliocladium virens* sobre HFMA, a pesar del notable efecto deletéreo que éste ejerce sobre hongos fitopatógenos (Paulitz y Linderman, 1991). Para el caso de *Trichoderma* sp., se ha demostrado que diferentes especies pueden mejorar el desarrollo del simbionte micorrícico y que esta interacción tiene influencia sobre el crecimiento de la planta hospedera (Calvet *et al.*, 1993; Godeas *et al.*, 1999). Trabajos realizados en diversas partes del mundo y con varios modelos, han combinado inóculos de HFMA con cepas de distintas especies de *Trichoderma* sp. e incluso con otros microorganismos como fitopatógenos o promotores del crecimiento vegetal (Srinath *et al.*, 2003). La existencia de interacciones semejantes es una muestra más de la complejidad de los HFMA, que además de haberse adaptado a una simbiosis completa con las plantas superiores, parecen interactuar de forma permanente y muchas veces sinérgica con la microflora del suelo. Las implicaciones evolutivas de tales interacciones y las adaptaciones especiales que están involucradas, son todo un universo dispuesto a ser estudiado y aprovechado de manera sostenible. Teniendo en cuenta la importancia que ha cobrado en la actualidad la utilización de productos biológicos (controladores biológicos y biofertilizantes) como complementos de las actividades agrícolas, resulta fundamental ampliar el conocimiento que se tiene hasta el momento de los efectos de la inoculación con micorrizas arbusculares, haciendo énfasis en la relación de estos con otros microorganismos del suelo y de la rizósfera, en especial con aquellos que son utilizados comercialmente. En este contexto, el objetivo del presente estudio es determinar las posibles interacciones entre HFMA y el controlador biológico *Trichoderma harzianum*, así como el efecto de dichas interacciones sobre el crecimiento de plantas de *Brachiaria decumbens*, un pasto comúnmente usado en América tropical para el mantenimiento de ganado para la producción de carne. Dicha planta tiene exigencia moderada en el riego, sus semillas son fáciles de manipular, su follaje tiene una cobertura mínima (mayor densidad de plantas por unidad de área), tolera podas y es perenne; adicionalmente, es compatible con un amplio rango de HFMA y desarrolla un sistema radical amplio, características que debe tener una planta para que sea fácilmente micorrizada (Ferrera *et al.*, 1993).

MATERIALES Y MÉTODOS

OBTENCIÓN DEL INÓCULO DE HFMA

El muestreo se realizó en un terreno cubierto de *Pennisetum clandestinum* dedicado al pastoreo de ganado bovino ubicado dentro del *campus* de la Universidad Nacional de Colombia (Bogotá). En el terreno se delimitó una parcela de 9 m² escogida al azar, donde se ubicaron cinco puntos de muestreo. En cada punto se tomó una muestra de suelo rizosférico de los primeros 10-15 cm de profundidad (cada una con 50 g), para conformar una muestra integrada que fue depositada en bolsa plástica estéril (Modificado a partir de Valero, 2003). Posteriormente, el suelo colectado fue colocado en materos con plantas de *B. decumbens* para favorecer el mantenimiento en condiciones controladas de los HFMA nativos presentes en la muestra. Transcurridos dos meses, se realizó la extracción de las esporas presentes en el sustrato de los materos

de acuerdo con los procedimientos implementados, que fueron modificados por Sieverding (1983) para obtener el *pool* de micorrizas arbusculares que sería utilizado posteriormente. Los diferentes morfotipos de HFMA que constituyeron dicho *pool* se determinaron a nivel de género, mediante la observación microscópica de características morfológicas de las esporas realizando montajes permanentes con polivinil lactoglicerol (Brundrett *et al.*, 1996), utilizando las claves de Schenck y Pérez (1990), en un microscopio óptico Olympus BH-2-UCD (400 X).

PLANTAS Y CONDICIONES DE CULTIVO

El bioensayo se estableció durante los meses de febrero a mayo en condiciones de laboratorio, en un cuarto de cultivo con un área de 6 m², con fotoperíodo natural y temperatura y humedad relativa promedio diarias de 18° C y 55% respectivamente, ubicado en las instalaciones de la empresa colombiana Live Systems Technology S.A. (Bogotá) utilizando *B. decumbens* como planta hospedera. El montaje del bioensayo se realizó en bandejas germinadoras rectangulares de 5 x 10 cavidades (50 x 25 cm) con drenaje. Al momento de la siembra se colocaron en cada cavidad (o réplica) 40 g de sustrato estéril (autoclavado 1 hora a 121° C, dos días consecutivos), cuatro semillas de *B. decumbens* (Semicol®) desinfectadas superficialmente con hipoclorito de sodio (2,8%, 5 min) y 20 esporas de HFMA. El sustrato se preparó mezclando arena de río y suelo en proporción 1:1 (w/w) y se le adicionó al momento de la siembra una solución nutritiva que favorecería el mantenimiento de los HFMA (Brundrett *et al.*, 1996) y posteriormente una vez al mes. Las plantas fueron regadas cada dos días con 10 mL por réplica de agua filtrada y el muestreo final se realizó 76 días después de iniciado el montaje.

TRATAMIENTOS

Como se describió anteriormente, la inoculación con HFMA se realizó al momento de montar el bioensayo. Por su parte, la inoculación con *T. harzianum* se realizó dos semanas después (Green *et al.*, 1999; Martínez *et al.*, 2004). La cepa de *T. harzianum* utilizada es el ingrediente activo del producto comercial AgroGuard®, elaborado por la empresa Live Systems Technology S.A. para el control biológico de fitopatógenos nativos del suelo, el cual tiene una presentación de gránulo dispersable que garantiza una concentración de 5 x 10⁸ conidias/g y que fue diluida en agua estéril para obtener una concentración final de inóculo de 1 x 10⁶ conidias/ml. Se aplicaron 5 ml de suspensión por réplica sembrada. Para el estudio de la interacción entre HFMA y *T. harzianum* se establecieron los siguientes tratamientos en el bioensayo: plantas con inóculo de HFMA (HFMA-0), plantas con *T. harzianum* (0-Th), plantas con HFMA y *T. harzianum* (HFMA-Th) y plantas control sin inóculo (0-0). Al momento del muestreo final se midieron las siguientes variables cuantitativas relacionadas con el crecimiento vegetativo de las plantas: peso seco de la parte aérea, peso seco del sistema radicular y altura de las plantas (Sánchez, 1999), tomando diez réplicas por tratamiento. En los tratamientos a los que se adicionaron HFMA (HFMA-0 y HFMA-Th), se determinó el estado de la colonización radicular por parte de los hongos formadores de micorrizas arbusculares, realizando procedimientos de clareo y tinción de las raíces, basados en la metodología citada por Gange *et al.* (1999) utilizando *fuchsina* ácida como colorante y

cuantificación del porcentaje de colonización sobre las raíces de *B. decumbens*, de acuerdo a la metodología de Dodd y Jeffries (1986). Así mismo, se cuantificó el número de esporas de HFMA por gramo de suelo seco para dichos tratamientos, utilizando un método de diluciones (Cano, 1996). Para ambas cuantificaciones se muestrearon tres réplicas por tratamiento.

ESTIMACIÓN DE LA DENSIDAD DE POBLACIÓN DE *T. HARZIANUM*

Se estimó la población presente al momento del muestreo tomando 1 g de sustrato de cada tratamiento donde se había inoculado el biocontrolador (0-Th y HFMA-Th), el cual fue suspendido en 9 ml de agua estéril, homogenizando con ayuda de un vórtex. Se prepararon series de dilución (10^{-1} - 10^{-5}) que fueron sembradas por triplicado en placas de agar Sabouraud (SDA) incubando por 48 horas a 28° C, para determinar el número de unidades formadoras de colonias por gramo de suelo seco (UFC/g) de *T. harzianum* (metodología adaptada a partir de Dhingra y Sinclair, 1995).

TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Se utilizó un diseño completamente al azar empleando los siguientes tratamientos: aplicación de HFMA, aplicación de *T. harzianum* y aplicación de HFMA+*T. harzianum*. Los datos obtenidos para todas las variables cuantificadas se sometieron a la prueba de Shapiro-Wilks para verificar su normalidad y al test de Bartlett para verificar la homogeneidad de varianzas. Se aplicaron análisis de varianza y prueba de comparaciones múltiples (Test de Duncan) para verificar el efecto de los tratamientos sobre las variables estudiadas, excepto para la variable peso seco de las raíces que se sometió a una prueba no paramétrica (Test de Friedman) puesto que los valores obtenidos no mostraron tendencia a la normalidad. Todos los análisis se realizaron con el programa STATGRAPHICS®, con excepción de la prueba no paramétrica, que se hizo con ayuda del programa MINITAB®.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

INÓCULO DE HFMA

En la muestra de suelo que fue utilizada como fuente de inóculo nativo se encontraron un total de diez morfotipos de HFMA, dos pertenecientes al género *Acaulospora* y ocho al género *Glomus*. Estos resultados sugieren una predominancia del género *Glomus* en el suelo rizosférico elegido.

EFFECTO DE *T. HARZIANUM* SOBRE EL PROCESO DE MICORRIZACIÓN

Las plantas tratadas solamente con HFMA (HFMA-0) registraron un porcentaje de colonización radical significativamente mayor con respecto a las plantas tratadas conjuntamente con HFMA y *T. harzianum* (HFMA-Th, Tabla 1). La disminución en la colonización radical en presencia de agentes de control biológico pertenecientes al género *Trichoderma* coincide con lo reportado por Mcallister *et al.* (1994b), pero contrasta con lo reportado por Calvet *et al.* (1993). La diferencia encontrada en el presente estudio puede considerarse como una consecuencia del efecto que ejerce *T. harzianum* sobre la fase presimbótica de HFMA (período comprendido entre la germinación de las esporas

de HFMA y la llegada e invasión efectiva del micelio a los tejidos de la raíz). Este efecto ha sido estudiado por varios autores en ensayos de germinación de esporas de HFMA realizados *in vitro* (McAllister *et al.*, 1994a; Fracchia *et al.*, 1998), donde se ha establecido que diferentes especies de *Trichoderma* pueden afectar el porcentaje de germinación de esporas de HFMA. De hecho, se han determinado reducciones en el porcentaje de germinación de las esporas por efectos de antagonismo de *Trichoderma* que produce sustancias solubles en el medio y compuestos volátiles que afectan directamente estas estructuras (McAllister *et al.*, 1994a; Martínez *et al.*, 2004). Por otro lado, se observó menor formación de vesículas por los HFMA (Tabla 1) en las plantas tratadas conjuntamente con HFMA y *T. harzianum* respecto a las plantas tratadas solamente con HFMA. Las vesículas son estructuras de reserva de lípidos y compuestos de carbono formadas por HFMA en estados avanzados del proceso de colonización de los tejidos radicales de la planta, que se forman cuando la simbiosis ya se encuentra bien establecida (van Aarle y Olsson, 2003), de modo que una disminución en la formación de estas estructuras podría relacionarse con una situación que afecte el establecimiento normal de dicha simbiosis. Aunque no se ha reportado una relación directa de la influencia de otros microorganismos de la rizósfera sobre la producción de vesículas por parte de HFMA, se puede considerar que la presión ejercida por *T. harzianum* al liberar compuestos en el sustrato es una condición que puede influir en el desarrollo normal del proceso de micorrización, por ejemplo, en términos del tiempo que le toma a los HFMA estabilizarse e iniciar la acumulación intraradical de sustancias de reserva. En otros estudios ya se ha determinado que diferentes especies de *Trichoderma* pueden afectar el desarrollo y funcionamiento de la fase intraradical de los HFMA (McAllister *et al.*, 1994b).

Tratamientos	% de colonización general	% de colonización con vesículas	% de colonización con hifas intramatriciales	No. esporas de HFMA/g suelo seco
1. Control (0-0)	0,0	0,0	0,0	0,0
2. Hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA-0)	65,6 ± 15,0 ^a	49,0 ± 8,0 ^a	29,0 ± 6,1 ^a	28,1 ± 1,6 ^a
3. <i>Trichoderma harzianum</i> (0-Th)	0,0	0,0	0,0	0,0
4. Hongos formadores de micorrizas arbusculares más <i>T. harzianum</i> (HFMA-Th)	29,0 ± 5,2 ^b	11,7 ± 4,8 ^b	24,4 ± 5,7 ^a	29,1 ± 3,6 ^a

Tabla 1. Efecto de la inoculación con *Trichoderma harzianum* sobre el proceso de micorrización en raíces de *B. decumbens*. Los valores promedio de cada columna que están seguidos por la misma letra no difieren significativamente ($\alpha = 0,05$).

También podría considerarse que la diferencia encontrada en la formación de vesículas por parte de HFMA en el tratamiento que incluyó a *T. harzianum*, pudo estar relacionada con una tendencia de dichos hongos a formar en mayor proporción micelio intraradical que vesículas, como respuesta a la presión ejercida por el controlador biológico so-

bre el micelio extrarradical y las esporas de la micorriza en la rizósfera. Esta condición puede darse porque los HFMA encuentran en los tejidos radicales un ambiente libre de competencia, para sobredesarrollar (hiperdesarrollar) allí su micelio y compensar de esta forma “las bajas” sufridas en la rizósfera debido a la acción antagónica de *Trichoderma*, ya sea por efectos de la producción de sustancias nocivas (McAllister *et al.*, 1994a) o por micoparasitismo directo de las hifas (Rousseau *et al.*, 1996). Los resultados de colonización radicular con hifas intramatriciales resumidos en la Tabla 1, invalidan, sin embargo, esta posibilidad (suposición) y sugieren al mismo tiempo, la necesidad de un acercamiento adicional al efectuado en este estudio para comprobar a nivel intrarradical el efecto de *Trichoderma* sobre los HFMA, el cual podría realizarse utilizando técnicas para el cultivo *in vitro* de HFMA asociados a tejidos de raíz transformados (Fortin *et al.*, 2002; Diop, 2003) que permitan asegurar condiciones experimentales específicas en donde sea posible evaluar aspectos puntuales de la interacción HFMA-*Trichoderma* sp.

Aunque algunos autores han reportado que la colonización de los tejidos radicales y la esporulación del HFMA están directamente relacionadas (Douds y Schenck, 1990; Douds, 1994), ambos procesos están influenciados por una diversidad de factores que pueden tener un efecto diferencial para cada uno. En la presente investigación no se evidenció una correspondencia directa entre la colonización radicular y la esporulación de los HFMA (Tabla 1), ya que fue imposible establecer una diferencia estadísticamente significativa en el número de esporas de HFMA por gramo de suelo seco entre los tratamientos HFMA-0 y HFMA-Th

EFFECTO DE LA MICORRIZACIÓN CON HFMA SOBRE LA POBLACIÓN RIZOSFÉRICA DE *T. HARZIANUM*

Al momento del muestreo (60 días después de la inoculación con *T. harzianum*), el tratamiento inoculado con *T. harzianum* (0-Th) mostró una cantidad estadísticamente mayor de UFC/g de suelo seco en comparación al tratamiento conjunto con HFMA y *T. harzianum* (Tabla 2). Este resultado contrasta con lo observado por algunos autores (Martínez *et al.*, 2004), quienes a pesar de haber encontrado algunos efectos antagónicos o neutros de *Trichoderma* sp. sobre HFMA, no encontraron influencia de HFMA sobre el número de UFC/g de *Trichoderma* sp. No obstante, los resultados del presente trabajo coinciden con lo reportado por Mcallister *et al.* (1994b), quienes afirman que el efecto negativo sobre la población de *Trichoderma* sp. puede estar relacionado con el tiempo al que fue inoculado el HFMA, encontrando que la población de *T. koningii* utilizada en sus ensayos se reducía en el tratamiento en donde se había inoculado dos semanas antes con *Glomus mosseae*, mientras que no mostró cambios en el tratamiento inoculado con el HFMA al mismo tiempo o dos semanas después. La explicación de dicho comportamiento es que cuando se inoculó *T. koningii* (dos semanas después), *G. mosseae* ya se encontraba establecido en los tejidos de la planta hospedera y por ello es posible que hubiera modificado los exudados radiculares, pudiendo éstos a su vez afectar a las poblaciones de *T. koningii*. Esta explicación fue respaldada posteriormente por otros autores (Fracchia *et al.*, 1998). Es muy posible que los resultados obtenidos en este ensayo en particular muestren la misma tendencia, porque el momento de inoculación fue el mismo.

Tratamiento	Unidades formadoras de colonias (x 10 ³ g ⁻¹ suelo seco)
Control (0-0)	0
<i>Trichoderma harzianum</i> (0-Th)	17±6,08 ^a
Hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA-0)	0
Hongos formadores de micorrizas arbusculares más <i>T. harzianum</i> (HFMA-Th)	9,6 ± 3,21 ^a

Tabla 2. Efecto de la presencia del HFMA sobre la población de *T. harzianum*. Los valores obtenidos difieren significativamente ($\alpha = 0,05$) como lo indican las letras adyacentes.

Otros investigadores (Green *et al.*, 1999) realizaron un acercamiento a la interacción *Trichoderma* sp.-HFMA en sistemas de suelo “libres de raíces” diseñados con el ánimo de minimizar el efecto de la presencia de los tejidos radicales de la planta hospedera, observando que la presencia de micelio externo de *G. intraradices* suprimió el desarrollo de la población de *T. harzianum*, debido posiblemente a la competencia por nutrientes.

EFFECTO DE LA INTERACCIÓN HFMA-*T. harzianum* SOBRE EL CRECIMIENTO DE *B. decumbens*

Los valores promedio de altura de las plantas, peso seco de la parte aérea y peso seco del sistema radicular estimados para los diferentes tratamientos al momento del muestreo se presentan en la tabla 3. El análisis estadístico determinó que los valores medidos de longitud de las plantas en los tratamientos en los que no se aplicaron HFMA (0-0 y 0-Th) fueron significativamente más bajos que los obtenidos en aquellos tratamientos en los que sí se inocularon (HFMA-0 y HFMA-Th). En este contexto, los resultados constituirían indicios del papel fundamental que estos organismos simbiotes podrían tener en el crecimiento de las plantas. Aunque la biomasa promedio de la parte aérea de las plantas tratadas de manera conjunta con HFMA y *T. harzianum* (Tabla 3) no superó la del control sin tratamiento, su valor fue significativamente superior a los obtenidos para las plantas tratadas solamente con *T. harzianum* o HFMA. Este resultado difiere de trabajos que han determinado que no hay efecto alguno al inocular plantas con cepas de *T. koningii* (McAllister *et al.*, 1994b) y sugiere la existencia de efectos negativos sobre la producción de biomasa aérea derivados tanto de la inoculación con *T. harzianum*, como de una micorrización ineficaz. Dichos efectos serían antagonísticos, propiciando indicios de una estimulación ficticia de la interacción HFMA-*T. harzianum* sobre el crecimiento de la planta hospedera utilizada (con respecto al control). El análisis de los valores obtenidos para la variable peso seco del sistema radicular no corrobora este efecto favorable. De hecho, no se pudo establecer la existencia de diferencias significativas entre tratamientos para esta variable desde el punto de vista estadístico. En conclusión, los resultados obtenidos para las variables vegetativas medidas solo permiten sugerir que el efecto de la interacción HFMA-*T. harzianum* sobre el crecimiento de las plantas de *B. decumbens* es de tipo neutral, mientras que aquellos derivados de la aplicación exclusiva de HFMA y *T. harzianum* son fundamentalmente inhibitorios. Efectos “neutros” resultantes de la aplicación conjunta de HFMA con *T. koningii* u hongos saprófitos asociados ya ha sido reportado en plantas de lechuga, maíz y soya (McAllister *et al.*, 1994b; Francchia, *et al.*, 1998). En contraste, un efecto positivo y significativo sobre el crecimiento de plantas de

Tagetes erecta inoculadas conjuntamente con HFMA, *T. aureoviride* y *T. harzianum* ha sido reportado por Calvet *et al.* (1993). Efectos inhibitorios por parte de algunas cepas de *T. pseudokoningii* sobre el crecimiento de plantas de soya también han sido reportados (Martínez *et al.*, 2004).

La ausencia de un efecto estimulador concluyente del crecimiento de las plantas de *B. decumbens* inoculadas con HFMA puede estar relacionada con factores no considerados en este estudio como: tipo de planta hospedera (las plantas pueden diferir en su respuesta a la inoculación con HFMA), la especie o cepa de HFMA empleada (aunque no hay especificación estricta, la experiencia indica que existen diferencias marcadas en cuanto al efecto de diferentes HFMA en el grado de establecimiento de la simbiosis y, sobre todo, en la respuesta de la planta en cuanto al ritmo e intensidad de captación de nutrientes y grado de resistencia a situaciones de estrés), y la naturaleza del sustrato de crecimiento de las plantas, entre otros. Los máximos beneficios de la micorrización solo se obtienen utilizando los HFMA más eficaces tras una cuidadosa selección de combinaciones planta-HFMA-sustrato altamente compatibles. Adicionalmente, el estudio de la interacción HFMA-*T. harzianum* debería considerar otros factores importantes como la especie o cepa de *Trichoderma* sp. empleada (según Harman *et al.* (2004), la virulencia y propiedades como promotoras de crecimiento de diferentes cepas y especies es variable), el momento seleccionado para la inoculación con el hongo biocontrolador con respecto a la inoculación con el HFMA (McAllister *et al.*, 1994), las condiciones ambientales y climáticas de experimentación y el tiempo de seguimiento.

Tratamiento	Longitud (cm)	Parte aérea (g)	Raíces (g)
Control (0-0)	31,8 ± 4,5 ^b	0,062 ± 0,022 ^a	0,018 ± 0,006 ^a
<i>Trichoderma harzianum</i> (0-Th)	28,2 ± 4,5 ^a	0,039 ± 0,012 ^b	0,019 ± 0,011 ^a
Hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA-0)	33,5 ± 5,1 ^a	0,054 ± 0,020 ^{a, b}	0,013 ± 0,008 ^a
Hongos formadores de micorrizas arbusculares más <i>T. harzianum</i> (HFMA-Th)	34,9 ± 2,5 ^a	0,062 ± 0,009 ^a	0,021 ± 0,007 ^a

Tabla 3. Efecto de la interacción de hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) y *Trichoderma harzianum* sobre el crecimiento de *Brachiaria decumbens* 76 días después de la siembra de las semillas. Los valores promedio de cada columna que están seguidos por la misma letra no difieren significativamente ($\alpha = 0,05$).

Dado que la mayoría de los estudios existentes hasta el momento se relacionan con el potencial y efectividad del inóculo de HFMA, queda abierta la posibilidad de complementar la información obtenida realizando ensayos de compatibilidad HFMA-*T. harzianum*, sobre todo si se pretende orientar este tipo de trabajos hacia el uso potencial de esta interacción en un producto biológico formulado para ser aplicado como complemento en actividades agrícolas. Finalmente, cabe resaltar que cada nuevo resultado obtenido, en cada condición particular, constituye un aporte a la construcción actual de conocimiento sobre ambos microorganismos y el sistema que conforman

con la planta hospedera, contribuyendo a la comprensión de la relación existente, la cual puede arrojar respuestas diferentes al verse influenciada en mayor o menor grado por diversos factores presentes en el ecosistema de la rizósfera.

AGRADECIMIENTOS

Las autoras expresan su agradecimiento a Esperanza Morales y Fernando Cruz de Live Systems Technology S.A. por su permanente apoyo y colaboración para la realización de este trabajo. Igualmente, a Gustavo Gómez, Daniel García y Marina Correa de la Universidad Nacional de Colombia por su valiosa asesoría.

BIBLIOGRAFÍA

- AZCÓN-AGUILAR C, BAREA J. Interacciones de las micorrizas arbusculares con microorganismos de la rizósfera. En E. Guerrero (Ed.), *Micorrizas. Recurso Biológico del suelo*. Fondo FEN Colombia, Bogotá; 1996;47-68.
- BRUNDRETT M, BOUGHER N, DELL B, GROVE T, MALAJCZUC N. Working with Micorrizas in Forestry and Agriculture. ACIAR Monograph. Camberra; 1996.
- CALVET C, BAREA J, PERA J. Growth Response of Marigold (*Tagetes erecta* L.) to Inoculation with *Glomus mosseae*, *Trichoderma aureoviride* and *Pythium ultimum* in a Peat-Perlite Mixture. *Plant Soil*. 1993;148:1-6.
- CANO C. Manejo de un banco de Germoplasma de hongos formadores de micorrizas arbusculares (MA). En Guerrero E. (Ed.), *Micorrizas. Recurso Biológico del suelo*. Fondo FEN Colombia, Bogotá; 1996;125-141.
- DHINGRA O, SINCLAIR J. *Basic Plant Pathology Methods*. CRC Lewis Publishers. Boca Raton, Florida; 1995.
- DIOP T. *In vitro* Culture of Arbuscular Mycorrhizal Fungi: Advances and Future Prospects African. *J Biotechnol*. 2003;2(12):692-697.
- DODD J, JEFFRIES P. Early Development of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizas in Autumn-Sown Cereals. *Soil Biol Biochem*. 1986;18(2):49-154.
- DOUDS D. Relationship Between Hyphal and Arbuscular Colonization and Sporulation in a Mycorrhiza of *Paspalum notatum* Flugge. *New Phytol*. 1994;126:233-237.
- _____, SCHENCK N. Relationship of Colonization and Sporulation by VA Mycorrhizal Fungi to Plant Nutrient and Carbohydrate Contents. *New Phytol*. 1990;116:621-627.
- FERRERA R, GONZÁLEZ M, RODRÍGUEZ M. *Manual de agromicrobiología*. Trillas, México; 1993.
- FORTIN J, BÉCARD G, DECLERCK S, DALPÉY, ST-ARNAUD M, COUGHLAN A, PICHÉ Y. Arbuscular Mycorrhiza on Root-Organ Cultures. *Can J Bot*. 2002;80:1-20.
- FRACCHIA S, MUJICA M, GARCÍA I, GARCÍA J, MARTIA J, OCAMPO J, GODEAS A. Interactions Between *Glomus mosseae* and Arbuscular Mycorrhizal Sporocarp-Associated Saprophytic Fungi, *Plant Soil*. 1998;200(2):131-137.
- GANGE A, BOWER E, STAGG P, APLIN D, GILLAM A, BRACKEN M. A Comparison of Visualization Techniques for Recording Arbuscular Mycorrhizal Colonization. *New Phytologist*. 1999;142(1):123-132.

- GODEAS A, FRACCHIA S, MUJICA M, OCAMPO J. Influence of Soil Impoverishment on the Interaction Between *Glomus mosseae* and Saprobe Fungi. *Mycorrhiza*. 1999;9:185-189.
- GREEN H, LARSEN J, OLSSON P, JENSEN D, JAKOBSEN I. Suppression of the Biocontrol Agent *Trichoderma harzianum* by Mycelium of the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus intraradices* in Root-Free Soil. *Appl Environ Microbiol*. 1999;65(4):1428-1434.
- GUERRERO E, RIVILLAS C, RIVERA E. Perspectivas de manejo de la micorriza arbuscular en ecosistemas tropicales. En Guerrero E. (Ed.), *Micorrizas. Recurso Biológico del suelo*. Fondo FEN Colombia, Bogotá; 1996;181-201.
- HARMAN G, HOWELL C, VITERBO A, CHET A, LORITO M. *Trichoderma* Species- Opportunistic, Avirulent Plant Symbionts. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2:43-56.
- HODGE A. Microbial Ecology of the Arbuscular Mycorrhiza. *FEMS Microbiol Ecol*. 2002;32:91-96.
- KIM K, JORDAN D, MCDONALD G. Effect of Phosphate-Solubilizing Bacteria and Vesicular-Arbuscular Mycorrhizae on Tomato Growth and Soil Activity. *Biol Fertil Soils*. 1998;26:79-87.
- MARTÍNEZ A, OBTELLO M, PARDO A, OCAMPO J, GODEAS A. Interactions Between *Trichoderma pseudokoningii* Strains and the Arbuscular Mycorrhizal Fungi *Glomus mosseae* and *Gigaspora rosea*. *Mycorrhiza*. 2004;14(2):79-84.
- McALLISTER C, GARCÍA I, GODEAS A, OCAMPO J. *In vitro* Interactions Between *Trichoderma-koningii*, *Fusarium-solani* and *Glomus-mosseae*. *Soil Biol Biochem*. 1994a;26:1369-1374.
- _____, GARCÍA I, GODEAS A, OCAMPO J. Interactions Between *Trichoderma-koningii*, *Fusarium-solani* and *Glomus-mosseae*-effects on Plant-Growth, Arbuscular Mycorrhizas and the Saprophyte Inoculants. *Soil Biol Biochem*. 1994b;26:1363-1367.
- PAULITZ T, LINDERMAN R. Lack of Antagonism Between the Biocontrol Agent *Gliocladium virens* and Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *New Phytologist*. 1991;117(2):303-308.
- ROUSSEAU A, BENHAMOU N, CHET I, PICHE Y. Mycoparasitism of the Extramatrical Phase of *Glomus intraradices* by *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*. 1996;86(5):434-443.
- SÁNCHEZ DE PM. Endomicorrizas en agroecosistemas colombianos. Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira; 1999.
- SCHENCK N, PEREZ Y. Manual for the Identification of VA Mycorrhizal Fungi. Synergistic Publ., Gainesville, Florida; 1990.
- SIEVERDING E. Manual de métodos de investigaciones en micorrizas vesículo-arbusculares en el laboratorio. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Palmira; 1983.
- SIMON L, BOUSQUET R, LEVESQUE C, LALONDE M. Origin and Diversification of Endomycorrhizal Fungi and Coincidence with Vascular Land Plants. *Nature*. 1993;363: 67-69.

SRINATH J, BAGYARAJ D, SATYANARAYANA B. Enhanced Growth and Nutrition of Micropropagated *Ficus benjamina* to *Glomus mosseae* Co-inoculated with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus coagulans*. World J Microbiol Biotechnol. 2003;19:69-72.

VALERO N. Potencial biofertilizante de bacterias diazotrofas y solubilizadoras de fosfatos asociadas al cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.). [Tesis de maestría] Maestría Interfacultades en Microbiología, Universidad Nacional de Colombia. 2003.

VAN AARLE I, OLSSON P. Fungal Lipid Accumulation and Development of Mycelial Structures by Two Arbuscular Mycorrhizal Fungi. Appl Environ Microbiol. 2003;69(11):6762-6767.