



---

## **INCREMENTO EN INVERNADERO DE LA CALIDAD Y CANTIDAD DEL FOLLAJE DE LA ALFALFA (*Medicago Sativa L.*) VARIEDAD FLORIDA 77 CAUSADO POR LA COMBINACIÓN DE FERTILIZACIÓN BIOLÓGICA Y QUÍMICA EN UN SUELO DE LA SERIE BERMEO DE LA SABANA DE BOGOTÁ**

**J. Tovar-Franco**

*Departamento de Nutrición y Bioquímica, Facultad de Ciencias,  
Pontificia Universidad Javeriana, Cra. 7ª No. 40-62, Bogotá, Colombia  
jatovar@javeriana.edu.co*

### **RESUMEN**

En la Sabana de Bogotá existe la necesidad de incrementar la producción de forrajes que den buen rendimiento, con alta calidad nutricional y que podrían ser un aporte al desarrollo de la industria de concentrados de animales. El objetivo de este trabajo fue establecer el efecto de la inoculación rizobio-hongo micorriza arbuscular (MA) sobre la fijación simbiótica de nitrógeno, la absorción de fósforo y el porcentaje de micorrización en alfalfa (*Medicago sativa L.*) en un suelo andept de la serie Bermeo de la Sabana de Bogotá. Se seleccionó la variedad de alfalfa Florida 77 por su adaptabilidad a las condiciones del suelo, la cepa de *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti* GR-4 por su habilidad para mejorar el rendimiento y estimular la fijación simbiótica de nitrógeno en esta variedad y el hongo MA *Archaeospora leptoticha* por su habilidad para mejorar el rendimiento y estimular la fijación de fósforo en esta leguminosa.

La inoculación dual (rizobio-hongo MA) demostró eficacia de la fertilización biológica, al incrementar significativamente ( $p < 0.05$ ) los efectos del encalado y la fertilización química, aumentando el rendimiento en 26% y al mejorar en el follaje el contenido de nitrógeno (32%) y fósforo (28%). Estos resultados destacan el estímulo de los dos microsimbiontes en el aprovechamiento de la fertilización química.

La inoculación dual también estimuló la fijación biológica de nitrógeno incrementándose los efectos de la inoculación rizobial al aumentar el rendimiento en 25% y el contenido de nitrógeno del follaje en 22% ( $p < 0.05$ ). También superó el efecto de la inoculación fúngica aumentando el rendimiento en 31% ( $p < 0.05$ ) y la cantidad de fósforo absorbido en 34% ( $p < 0.05$ ), demostrándose así los beneficios de la simbiosis tripartita alfalfa-rizobio-hongo MA en este Andisol.

**Palabras clave:** *Archaeospora leptoticha*, alfalfa, andisol, micorriza arbuscular, *Rhizobium meliloti*.

### **ABSTRACT**

In the savanna of Bogotá there is a need to increase the production of forage that gives a good yield with high nutritional quality that could contribute to the development of the animal concentrates industry. The objective of this project was to establish the effect of the dual inoculation (rhizobium-fungi AM) on symbiotic nitrogen fixation, absorption, and the percentage of mycorrhizobial infection in alfalfa (*Medicago sativa L.*) in an andept soil of the

Bermeo series from the Savanna of Bogotá. The alfalfa variety, Florida 77, was selected for its adaptability to the soil conditions, the strain, *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti* GR-4, for its ability to improve the yield and to stimulate symbiotic nitrogen fixation in this variety of alfalfa and the arbuscular mycorrhiza (AM) fungus, *Archaeospora leptoticha*, for its ability to improve the yield and to stimulate phosphorus fixation in this leguminous plant (lucerne).

This dual inoculation demonstrated the effectiveness of biological fertilization to increase ( $p < 0.05$ ) the effects of lime and chemical fertilization significantly, increasing the yield by 26% while improving the nitrogen (32%) and phosphorus (28%) content in the foliage. These results underline the ability of the two microsymbionts to stimulate the utilization of chemical fertilizers.

The dual inoculation also stimulates biological nitrogen fixation because it increases the effects of the rhizobium inoculation, increasing the yield by 25% and the nitrogen content of the foliage by 22% ( $p < 0.05$ ). It also surpassed the effect of the fungal inoculation, increasing the yield by 31% ( $p < 0.05$ ) and the quantity of absorbed phosphorus by 34% ( $p < 0.05$ ), thus demonstrating the benefits of the tripartite symbiosis, lucerne-rhizobium-AM fungi, in this Andept (Andean?) soil.

**Key words:** *Archaeospora leptoticha*, andept, arbuscular mycorrhiza, lucerne, *Rhizobium meliloti*.

---

## INTRODUCCIÓN

Colombia es un país esencialmente agrícola, porque del campo provienen la mayoría de sus recursos económicos. A medida que avanza industrialmente y crece su población, se hace más grande la demanda de los productos agrícolas. El 25,7% del territorio arable de Colombia se dedica al cultivo de pastos introducidos y naturalizados (DANE, 2004). Sin embargo, la mayoría de estos terrenos presentan acidez, toxicidad debida al aluminio, deficiencias de nitrógeno, fósforo y otros nutrientes, por estas razones se han hecho una serie de estudios para la rehabilitación de estos suelos usando fertilizantes inorgánicos, para ayudar a establecer los cultivos y mejorar la producción, pero el costo de los fertilizantes con frecuencia excede el beneficio que se le pueda sacar al cultivo utilizando esta clase de suelos.

Entre los diversos constituyentes del suelo están los microorganismos, los cuales a pesar de representar menos del 1% del volu-

men total del suelo, cumplen múltiples funciones que tienen un papel muy importante en la fertilidad, y por tanto, en la producción agropecuaria. Las asociaciones simbióticas entre los hongos y las bacterias con la raíz en la planta, se presentan como un mecanismo que contribuye notoriamente a la nutrición de muchas especies vegetales y que ofrecen grandes posibilidades para ser utilizados en la sustitución de fertilizantes (Fitter y Garbaye, 1994).

Las leguminosas también presentan asociaciones tripartitas con *Rhizobium* y hongos micorriza arbuscular (MA), mejorando el desarrollo de los nódulos y la fijación de nitrógeno, incrementándose el rendimiento de los cultivos y la eficiencia en el uso de fertilizantes (Ferrero y Alarcón, 2001; Hernández y Hernández, 1996; Kawaii y Yamamoto, 1986; Crush, 1974; Powell, 1976; Daft, 1978). También al mejorar la absorción de fósforo por la micorriza se mejora el desarrollo radicular, el crecimiento de la planta y se acelera la maduración de las cosechas.

Un sistema de inoculación que incluye una mezcla de hongos MA con rizobios que se adhieren a las semillas como las de trébol, alfalfa y otras leguminosas forrajeras, aumenta la tasa de germinación en el campo, donde una gran proporción de semilla se pierde debido a su pequeño tamaño. Para una región en estudio, en este caso la Sabana de Bogotá, hay que considerar los siguientes factores: fertilidad del suelo, dependencia de la planta del hongo MA y del rizobio introducido, población de hongos MA y rizobios nativos, eficiencia de las cepas rizobiales y micorrizógenas para que, una vez evaluados estos factores, el método de inoculación sea compatible con las prácticas culturales vigentes y para que el proceso sea económicamente viable.

El objetivo de este trabajo fue establecer, en invernadero, el efecto de la inoculación dual (rizobio-hongo MA) sobre la fijación simbiótica de nitrógeno, la absorción de fósforo y el porcentaje de micorrización en alfalfa (*Medicago sativa* L.): variedad Florida 77 en un suelo andisólico de la serie Bermeo de la Sabana de Bogotá. Se seleccionó la cepa de *Rhizobium* (*Sinorhizobium*) *miloti* GR-4 y el hongo MA *Archaeospora leptoticha* sinónimo de *Acaulospora appendícula* (Alarcón, 2001) por su habilidad para mejorar el rendimiento en esta variedad y estimular la fijación simbiótica de nitrógeno y fósforo respectivamente.

## MATERIALES Y MÉTODOS

En ensayo de invernadero se evaluaron los efectos de la inoculación dual con *Rhizobium* (*Sinorhizobium*) *miloti* GR-4 y el hongo MA *Archaeospora leptoticha* para la variedad de alfalfa Florida 77 en un andisol proveniente de la hacienda Yerbabuena del municipio de Subachoque de la Sabana de Bogotá. En trabajos previos se demostró que esta cepa GR-4 presentó el mejor rendimiento y mayor eficiencia para esta variedad de alfalfa, igual-

mente se demostró que la cepa de hongo MA que mejor funcionó, aun compitiendo con la cepa nativa, fue la *Archaeospora leptoticha* (Tovar, 1988).

El suelo utilizado no había sido cultivado ni fertilizado y pertenece al orden Inceptisol; suborden Andept; gran grupo Dystrandept; subgrupo Andic dystropept de la serie Bermeo. El contenido de humedad (Pw) para el suelo empleado dio un valor de 23.9 que se considera alto y explicable por el alto contenido de materia orgánica. El porcentaje de nitrógeno orgánico (método Kjeldahl) dio un valor de 1,06% y la relación C/N fue 15,15. Estos datos indican un buen contenido de nitrógeno orgánico debido al alto contenido de materia orgánica, evidenciando una avanzada humificación. Por lo tanto, no se espera buena disponibilidad de este nitrógeno ya que la mineralización en estos suelos andisólicos es lenta debido al alto contenido de material alofánico y a la acidez del suelo (Benavides, 1977). Por esta razón, se decidió adicionar nitrógeno en la forma de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a razón de 180 kg de N/Ha teniendo en cuenta el peso por hectárea correspondiente a un suelo con densidad aparente de 0.9 g/cm<sup>3</sup> (Forsythe y Díaz, 1969; Benavides, 1977).

La determinación de la necesidad de cal se hizo por el método de Dunn (Olarde 1979) y demostró que el suelo presenta una buena capacidad buffer, porque la adición de 8 T/Ha de  $\text{CaCO}_3$  sólo logró elevar el pH de 5.3 (1:1) hasta 6. Esta capacidad se explica por el alto contenido de material orgánico del suelo y en función de estos resultados, se decidió agregar cal en los experimentos posteriores, a razón de 5.4 T/Ha de  $\text{CaCO}_3$  para llevar el pH a 5.7, buscando eliminar la toxicidad del aluminio (2.3 meq/100 g) con un mínimo de 4.6 T/ha y una reacción del suelo favorable al desempeño del *Rhizobium*, del hongo MA y la alfalfa, pero sin elevar demasiado los costos de fertilización química. El calcio intercambiable se aumentó de 11.2 a 18.7 me/100g de suelo, incrementando la saturación de cal-

cio después de la fertilización y encalado de 13 a 23%, dando calcio disponible en un valor siete veces mayor al fijado como mínimo para la variedad Florida 77 (Horner y Ruelke, 1982).

El inóculo de *Archaeospora leptoticha* se propagó en pots plásticos, previamente esterilizados con solución de hipoclorito de sodio (2%) y lavados con agua destilada. Se seleccionó como hospedero de reproducción del hongo MA al maíz (*Zea mays* L.) para disminuir el peligro de patógenos para leguminosas que pueden ser iguales o muy parecidos (Sieverding 1984), adicionalmente, el maíz es de rápido crecimiento y desarrolla una abundante raíz que es rápidamente infectada por hongos MA (Hayman, *et al.*, 1976; Owusu-Bennoah y Mosse, 1979; Skipper y Smith, 1979). Se sembraron cinco semillas de maíz desinfectadas superficialmente con una solución de  $HgCl_2$  ácida (0,1%)(Vincent, 1975). Se llevaron controles del inóculo observando la infección a un mes y dos meses después de la siembra, utilizando la técnica de clareado con KOH y tinción con azul de tripano (Roncadori y Hussey, 1982).

El inóculo de *Archaeospora leptoticha* para los ensayos con alfalfa consistió de suelo y las raíces de maíz infectadas finamente cortadas, provenientes de plantas con 4 meses de crecimiento. Los pots se mantuvieron en invernadero, con humedad del 60% de la capacidad de campo con agua destilada. Para evaluar el inóculo una vez homogeneizado, se le hizo un conteo de esporas (Abbot y Robson, 1985). Las esporas se separaron del suelo y las raíces de acuerdo al método de Ohms y Jenkins (Smith y Skipper, 1979; Sieverding, 1983). Se utilizó 50 g del inóculo de hongo MA, se licuó con agua por tres minutos, el sobrenadante se volcó a una serie de tamices de 315, 125, 63 y 40  $\mu m$ . Para eliminar la materia orgánica, las esporas se pasaron con aproximadamente 30 ml de agua al tubo de centrifugación, después se inyectó al fondo del tubo 25 ml de una solución de

sacarosa (1:1). Se centrifugó por cuatro minutos a 2.000 rpm y se retiró la capa intermedia del gradiente entre el agua y la solución de azúcar con una jeringa, se pasó al tamiz fino (40  $\mu m$ ) para lavar las esporas con agua corriente. Se recogieron en caja de Petri con líneas paralelas y se contaron las esporas entre las líneas de la caja. Se hace una observación al estereoscopio del sedimento de los tubos para verificar la eficacia de la separación (aumento de 40X).

El cálculo de las esporas de *Archaeospora leptoticha* se hizo con base a 100 g de suelo seco. El número de esporas en 100 g de suelo seco es igual al número de esporas en 10 g de suelo húmedo dividido por los gramos de suelo seco en 10 g de suelo húmedo. Como criterio de calidad del inóculo se tomó el número de esporas por gramo de suelo seco (Sieverding, 1983) de la siguiente manera: > 10 esporas/g de suelo seco (alto); 1-10 esporas/g de suelo seco (mediano); < 1 espóra / g de suelo seco (bajo). Se utilizó inóculo de *Archaeospora leptoticha* con más de 19 esporas/g de suelo seco (alto). Se hizo también recuento de las esporas del andisol, para verificar la cantidad de esporas y las posibles especies de hongos MA nativos que dio 6 esporas/g de suelo seco (mediano).

Se empleó un diseño al azar con cinco replicaciones (5 pots) que incluyó los siguientes tratamientos: un testigo sin encalado, ni fertilización basal y sin inocular (T); un testigo con encalado, con fertilización basal y sin inocular (EF); un control con encalado, con fertilización basal, con adición de nitratos (200 kg de N/Ha) como  $NaNO_3$  (C); un inoculado con encalado, con fertilización basal y la cepa de *Rhizobium* (*Sinorhizobium*) *meliloti* GR-4 (Rz); un inoculado con encalado, con fertilización basal y *Archaeospora leptoticha* (MA) y un inoculado con encalado, con fertilización basal y la inoculación dual con la cepa de *Rhizobium* (*Sinorhizobium*) *meliloti* GR-4 y el inóculo de *Archaeospora leptoticha* (D).

En los tratamientos inoculados con *Archaeospora leptoticha*, se agregó 20 g de inóculo por pote (>400 esporas). El inóculo se esparció a 5 cm de la superficie y se cubrió con suelo. El rizobio empleado fue pasado por planta *in vitro* y aislado del nódulo. En los tratamientos con rizobio, las semillas de alfalfa se desinfectaron superficialmente y se inocularon sumergiéndolas una hora antes de sembrar, en un cultivo de rizobio suspendido en líquido Byma cuyo recuento en placa fue de  $11 \times 10^9$  células viables/ml (Vincent, 1975). Una vez sembradas las semillas (7 por pote) se les adicionó 10 ml del mismo cultivo, a los 15 días se dejaron cinco plantas por pote haciéndose el control de malezas manualmente.

Las plantas crecieron 90 días en invernadero, a temperatura ambiente (14°C) y humedad relativa del 80%, manteniendo la humedad del suelo al 60% de la capacidad de campo, con agua corriente. Posteriormente, la parte aérea se secó a 60°C durante 24 horas para determinar el rendimiento (mg/tratamiento), consecutivamente se molió y se digirió por el método micro Kjeldahl Gunning (Le Poidevi y Robinson, 1964) para determinar el nitrógeno en la materia seca total (NitT) por el método de micro Kjeldahl (Vincent, 1975) y el fósforo en la materia seca total (PhoT) por el método de Fogg y Wilkinson (Fogg y Wilkinson, 1958). Los resultados se expresan en miligramos de nitrógeno o de fósforo por tratamiento. Los porcentajes de nitrógeno o de fósforo se expresan en función de los miligramos de la parte aérea.

A las raíces se les hizo un conteo de nódulos, posteriormente se clarearon y tiñeron para determinar el porcentaje de infección del hongo. El porcentaje de infección se hizo por observación al microscopio de campo claro con un aumento de 100X por el método de Nicolson y Baylis (Saif, 1984) cuantificándose el número de campos infectados sobre un total de 30 por lámina, con 10 pedazos de raíces

coloreadas escogidas al azar, las cuales fueron montadas en lactofenol y wallerita. Se buscó la presencia de diferentes estructuras intraradiculares (hifas, vesículas, arbusculos y esporas) y se calculó en porcentaje de infección como el número de campos infectados por 100 dividido por el número de campos totales. La intensidad de la micorrización se estimó por el método de Kormanic (Roncadori y Hussey, 1982) así: categoría 1, para raíces con pequeños puntos de colonización ampliamente separados; categoría 2, para colonizaciones mayores más uniformemente distribuidas en la raíz, pero poco agregadas; categoría 3, cuando las raíces son abundante y uniformemente colonizadas.

El análisis estadístico incluye un análisis multivariado, MANOVA (Morrison, 1976), un análisis de rango múltiple de Duncan y se busca correlación entre los diferentes parámetros de medida.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Efecto de la inoculación dual sobre la infección micorrizal

Las observaciones y los resultados de la determinación de la infección micorrizal a los 90 días, se presentan en la tabla 1. La población micorrizal nativa fue abundante y activa como puede comprobarse del porcentaje de infección 83% y la intensidad 2, del tratamiento testigo sin fertilización ni encalado (T). Por otro lado, el tratamiento encalado y fertilizado (EF) no causó variaciones; sin embargo, en el tratamiento con adición de nitratos (C) el porcentaje de infección bajó en un 19% con respecto a T y la intensidad que se redujo a 1. Este efecto detrimento de la fertilización nitrogenada sobre la micorrización es bien conocido y reportado en la bibliografía (Chambers, 1980; Lopes, *et al.*, 1983). Los tratamientos de inoculación con rizobio (Rz) y el de inoculación con hongo MA (MA), incrementaron ligeramente (10%) la infección con respecto al T reflejándose en la intensi-

dad de la micorrización que subió a 3. El tratamiento con la inoculación dual rizobio y *Archaeospora leptoticha* (D) causó un 14% más de infección con respecto a T, mejorando la intensidad a 3. Como se mostrara más adelante el efecto fue apreciable sobre la cantidad de fósforo absorbido por la planta con incremento del 46%.

Se debe destacar que en cinco tratamientos se observaron escasas esporas intrarradiculares, debido probablemente al poco avance de la micorrización. No se observó expresión de una población rizobial nativa, ni abundante, ni efectiva, puesto que no se encontró nodulación en los tratamientos T, EF y C.

**Efecto sobre el rendimiento, cantidad de nitrógeno y cantidad de fósforo**

Los resultados se presentan en la tabla 2. En el tratamiento T, el porcentaje de nitrógeno (2.44%), fue significativamente inferior al de los otros tratamientos y más bajo que el re-

portado por la literatura para la variedad Aragón (5.53%), para suelos neutro-alcálinos (Azcon-Aguilar, 1981) y la variedad European (3,7%) en un suelo ácido y con bajo fósforo disponible (8-14 ppm)(Owusu-Bennoah y Mosse, 1979). El porcentaje bajo de nitrógeno en el follaje es explicable debido a que no se observó nodulación, posiblemente por la falta de una población nativa infectiva, mostrando la necesidad de fertilización química o biológica, como se demostró en el porcentaje de nitrógeno en los tratamientos C y Rz, en los que sí se incrementó. Aunque en el tratamiento T el porcentaje de infección micorrizal fue alto (83,3%), el porcentaje de fósforo (%P) en la parte aérea (0,22%), no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas con los demás tratamientos. No obstante, el %P es mayor que el reportado para otras variedades, de 0,16 a 0,18% en tres andisoles (Philippe, *et al.*, 1985) y 0,17% para alfalfa micorrizada y 0,09% para plantas no micorrizadas crecidas en un suelo turboso (Hayman, 1985). Se ha reportado que el %P en la parte

**Tabla 1**

**Micorrización de *Medicago sativa* L. variedad florida 77 en respuesta a la inoculación de *Rhizobium* sp. y *Archaeospora leptoticha* a los 90 días de crecimiento. Se presentan los resultados promedio ± SEM provenientes de 30 contajes por tratamiento. Hf = hifas; V = vesículas; A = arbusculos; E = esporas; los N = nódulos son provenientes del contaje de 25 plantas por tratamiento. \*Tratamientos encalados y con fertilización basal. La intensidad se calculó de acuerdo al método de Kormanic (Roncadori y Hussey, 1982).**

Tratamiento	% infección	Observaciones					Intensidad
		H	V	A	E	N	
Testigo	83 ± 12 a	+		+	+	0	2
Encalado y fertilizado*	87 ± 6 a	+	+	+	+	0	2
Control con nitratos*	64 ± 17 b	+		+	+	0	1
Rhizobium*	94 ± 3 a	+	+	+	+	12 ± 4	3
Hongo MVA*	93 ± 5 a	+	+	+	+	0	3
Rhizobium + Hongo MVA*	97 ± 3 a	+	+	+		16 ± 4	3

Valores con la misma letra no son significativamente diferentes (P<0.05).

aérea de la planta en etapa de floración con síntomas de deficiencia entre 0,14-0,17% y un rango intermedio entre 0,22-0,24% (Chapman, 1966). El %P en la variedad Florida 77 es aproximadamente el doble de la determinada para la variedad AS-13 (0,1-0,4%), en el mismo suelo en el mismo período de tiempo (Tovar, 1988), indicando que la población fungal nativa es eficiente. Sin embargo, el %P podría explicar la falta de nodulación, recordemos que se ha sugerido que %P inferiores a 0,2% en alfalfa causan nodulación despreciable (Barea *et al.*, 1980). Los efectos detrimentes sobre la nodulación y la fijación por la alfalfa en suelos con bajo pH aun en la ausencia de niveles tóxicos de aluminio y manganeso han sido demostrados en experimentos de campo (Rice *et al.*,

1977). La cantidad de fósforo absorbido en el follaje de todos los tratamientos presentó diferencias estadísticas significativas inferiores al determinado en el tratamiento de inoculación dual (D).

El tratamiento EF, sólo produjo un incremento en el rendimiento no significativo respecto a T del 7%. El encalado que sólo subió el pH a 5.7, podría explicar porqué no se incrementó aun más el rendimiento. La adición extra de nitratos en el tratamiento C incrementó el rendimiento respecto a T en un 13% no significativo, aunque sus efectos sí fueron significativos en cantidad de nitrógeno. Sin embargo, alcanzó a inhibir significativamente la infección micorrizal en 20%. Es necesario recalcar aquí, que la fertilización se calculó

**Tabla 2**

**Efecto de la inoculación de *Rhizobium sp.* y *Archaeospora leptoticha* sobre el rendimiento, la absorción de N y P en *Medicago sativa* variedad Florida 77 a los 90 días. Se presentan los resultados promedio provenientes de 5 réplicas por tratamiento. (\*) T = testigo sin inocular; EF = encalado y fertilizado; C = control con nitratos; Rz = inoculado con rizobio; MA = inoculado con Micorriza; D = inoculación dual.**

Tratamiento	T*	EF*	C*	Rz*	MA*	D*
Rendimiento de la parte aérea (mg/tratamiento)	1007,9 b	1082,0 b	1142,5 b	1094,5 b	1016,2 b	1468,0 a
Rendimiento relativo al testigo (%)	100	107	113	109	101	146
% nitrógeno en el follaje	2,41 c	2,46 bc	2,97 a	2,80 ab	2,72 abc	2,68 bc
Cantidad de nitrógeno (mg/tratamiento)	24,3 c	26,6 bc	33,9 ab	30,7 bc	27,7 bc	39,4 a
Absorción relativa de nitrógeno (%)	100	109	139	126	114	162
% fósforo en el follaje	0,22 a	0,23 a	0,24 a	0,24 a	0,23 a	0,24 a
Cantidad de fósforo absorbido (mg/tratamiento)	2,2 b	2,5 b	2,7 b	2,6 b	2,3 b	3,5 a
Absorción relativa de fósforo (%)	100	114	123	118	104	159

Valores con la misma letra no son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ )

para llenar las necesidades mínimas para el cultivo de alfalfa, pero sin que se llegaran a inhibir los procesos simbióticos microbianos.

En el tratamiento de inoculación con la cepa de *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti* GR-4 (Rz), se produjo una nodulación escasa, de 2 nódulos por planta en promedio, con poco desarrollo y escasa coloración rosada, aunque el porcentaje de nitrógeno fue algo y significativamente superior al del tratamiento T e igual al C. La cantidad de nitrógeno en el follaje se incrementó en forma significativa e igual a lo logrado por la fertilización nitrogenada inorgánica en el tratamiento C y su efecto fue un 67% del logrado por ésta. Una explicación a la escasa nodulación, podría darse en el hecho de que el pH del suelo (5.7) afectó la sobrevivencia del rizobio, que se ha reportado, es muy susceptible a valores de pH inferiores a 6 (Rice 1977; Wagner, 1978; FAO, 1984). Sería conveniente en trabajos futuros, experimentar a pHs superiores y determinar la infectividad, efectividad y sobrevivencia de la misma cepa en este suelo. Este tratamiento (Rz) no produjo incrementos significativos ni en la infección micorrizal, ni en la cantidad de fósforo en el tejido.

La inoculación con *Archaeospora leptoticha* (MA) causó un rendimiento que fue significativamente igual a los demás tratamientos excepto al tratamiento D. El porcentaje de nitrógeno fue también significativamente igual a los C y Rz, hecho que se explica porque los hongos MA también absorben otros nutrientes, en este caso nitrógeno, como se reporta en la literatura para la alfalfa (Saif, 1984). En cuanto a la infección micorrizal y cantidad de fósforo fueron iguales a los demás tratamientos ( $p < 0.05$ ) demostrando, la poca competencia con las cepas nativas. Las cantidades de nitrógeno y fósforo fueron significativamente menores que las obtenidas por el tratamiento D.

La inoculación dual con rizobio y hongo MA (D), mostró su efectividad sobre el rendi-

miento, cantidad de nitrógeno y cantidad de fósforo con valores significativamente superiores ( $p < 0.05$ ) que los demás tratamientos. Este tratamiento aumentó el rendimiento en 31% con respecto a T y en 22% respecto al tratamiento C. Estos datos demuestran cómo la fertilización biológica incrementa los efectos de un encalado y fertilización química. La cantidad de nitrógeno en el follaje fue superior en un 38% respecto al tratamiento T y en 32% respecto al tratamiento EF. La cantidad de fósforo fue mayor en un 37% que en tratamiento T y en un 28% que el EF. Estos son los resultados del estímulo de la inoculación dual sobre los efectos de un encalado y fertilización basal. Aunque la nodulación fue escasa, 3 nódulos/planta en promedio, hubo estímulo de la micorriza introducida causando el mayor rendimiento y contenido de nutrientes y en consecuencia mejorando la calidad del follaje. Probablemente los resultados de la inoculación dual habrían sido aun mayores si se hubiera logrado un pH más elevado en el suelo que hubiera favorecido una nodulación más abundante.

En otro trabajo con alfalfa la variedad Aragón fue inoculada con *Glomus mosseae* y *Rhizobium meliloti* 203, se mostró que cuando el fósforo es el factor limitante de la actividad rizobial, las plantas no responden a la inoculación con rizobio a menos que fueran inoculadas con micorriza. En este caso la inoculación dual produjo el doble de rendimientos que en el tratamiento sin inoculación (Halos, *et al.*, 1982; Azcon-Aguilar y Barea, 1981; Azcon-Aguilar y Barea, 1985). Los mismos autores en otro trabajo sobre suelos fijadores de fosfatos, lograron incrementos del 40% en rendimiento, 37% en cantidad de nitrógeno y 44% en la cantidad de fósforo en la alfalfa crecida 7 semanas (Azcon-Aguilar *et al.*, 1979). Estos resultados son muy similares a los reportados en este artículo.

Los valores de rendimiento de la parte aérea correlacionaron significativamente ( $p < 0.001$ )



con las cantidades de nitrógeno ( $r = 0.87$ ) y de fósforo ( $r = 0.85$ ) y éstas a su vez correlacionadas entre sí ( $r = 0.79$ ). Estos resultados indican que el rendimiento es función de estos dos elementos limitantes en este suelo. El análisis multivariado MANOVA, confirmó alta interacción entre las variables de respuesta (rendimiento, nitrógeno y fósforo), según criterio de Wilkinson ( $P = 0.009$ ), Pillai's trace ( $P = 0.0032$ ) y Hotelling Lawley trace ( $p = 0.0003$ ).

## CONCLUSIONES

La inoculación dual en la variedad Florida 77 con *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti*, cepa GR-4 y con el inóculo con hongo MA *Archaeospora leptoticha*, demostró la eficacia de la fertilización biológica, al incrementar los efectos del encalado y fertilización química, aumentando el rendimiento y al mejorar en el follaje el contenido de nitrógeno y fósforo. Destacándose el estímulo de los dos microsimbiontes en el aprovechamiento de la fertilización basal.

La inoculación dual también estimuló la fijación simbiótica de nitrógeno porque incrementó los efectos de la inoculación rizobial al aumentar el rendimiento y el contenido de nitrógeno del follaje. También superó el efecto de la inoculación fungal aumentando el rendimiento y la cantidad de fósforo absorbido, demostrándose así los beneficios de la simbiosis tripartita alfalfa-*Rhizobium*-hongo MA.

## AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue realizado en los Laboratorios de Química de Suelos de la Universidad Nacional de Colombia, gracias al proyecto multinacional de Química de la Organización de los Estados Americanos (OEA) y fue dirigido por la doctora Nery Mora de González. También expresar nuestro agradecimiento a doctor Ewald Sieverding por sus comentarios y

sugerencias, al señor Raúl Torres por su colaboración en la consecución de los inóculos de hongos MA y a Guillermo Sarmiento Lozano por su colaboración en la consecución del suelo empleado.

## LITERATURA CITADA

- ABBOT, L. y ROBSON, A. 1985. The effect of mycorrhizae on plant growth. VA Mycorrhizae. Powell, C. y Bagyaraj, D. Boca Ratón, Florida. CRC Press, Inc. 113-130.
- ALARCÓN, A. 2001. Comentario: Actualización de la taxonomía de los glomales. Carta al editor. *Terra*. 19 (1):103-104.
- AZCON-AGUILAR, C.; AZCON, R. y BAREA, J. 1979. Endomycorrhizal fungi and *Rhizobium* as biological fertilizer for *Medicago sativa* in normal cultivation. *Nature (London)* 279: 325.
- AZCON-AGUILAR, C. y BAREA, J. 1981. Field inoculation of *Medicago* with VA-mycorrhiza and *Rhizobium* in phosphate fixing agricultural soil. *Soil Biol Biochem* 13: 19-22.
- AZCON-AGUILAR, C. y BAREA, J. 1985. The role of vesicular arbuscular mycorrhiza in  $N_2$ -fixed by legume-*Rhizobium* systems in phosphate fixing agricultural soils. In: *Nuclear techniques to study the role of mycorrhiza in increasing food crop production*. IAEA-TECDOC-338 Viena 133-152.
- AZCON, R.; RUBIO, R. y BAREA, J. 1991. Selective interactions between different species of mycorrhizal fungi and *Rhizobium meliloti* strains, and their effects on growth,  $N_2$ -fixation ( $^{15}N$ ) and nutrition of *Medicago sativa* L. *New Phytol* 117, 399-404.
- BAREA, J.; ESCUDERO, J. y AZCON-AGUILAR, C. 1980. Effect of introduced and indig-

- enous VA-mycorrhizal fungi on nodulation, growth and nutrition of *Medicago sativa* in phosphate fixing soils as affected by P fertilizers. *Plant and Soil* 54: 283-296.
- BENAVIDEZ, G. 1977. La mineralización del nitrógeno en suelos derivados de cenizas volcánicas del departamento de Nariño. *Suelos Ecuatoriales*. 8 (1): 195.
- CHAMBERS, C. 1980. Simbiosis of *Trifolium subterraneum* with mycorrhiza fungi and *Rhizobium trifolii* as affected by ammonium sulphate and nitrification inhibitors. *Soil Biol Biochem* 12: 93.
- CHAPMAN, H. 1966. Diagnostic criteria for plants and soil. University of California. Berkeley. *Div Agric Sci* 793 págs.
- CROWDER, L. 1960. Establecimiento y mantenimiento de pastos en Colombia. *DIA*. Boletín de divulgación. Ministerio de Agricultura de Colombia. Bogotá D.E. Número 9, 68 págs.
- CRUSH, J. 1974. Plant growth responses to vesicular arbuscular mycorrhiza. VII. Growth and nodulation of some herbage legumes. *New Phytol* 73: 745.
- DAFT, M. 1978. Nitrogen fixation in nodulated and mycorrhizal crop plants. *Ann Appl Biol* 88 (3): 461-462.
- DANE. 2004. Perfil ambiental de Colombia. En: Colombia en cifras. Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE). Anexo 3, 17.
- FERRERO, R. y ALARCÓN, A. 2001. La microbiología del suelo en la agricultura sostenible. *Ciencia Ergo Sun* 8 (2): 175-183.
- FITTER, A. y GARBAYE, J. 1994. Interaction between mycorrhizal fungi and other soil organisms. *Plant and Soil* 159 (1): 123-132.
- FOGG, D. y WILKINSON, N. 1958. Colorimetric determination of phosphorus. *Analist* 83: 406-414.
- FAO. 1984. *Legume inoculants an their use*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, 63 págs.
- FORSYTHE, J. y. DÍAZ, R. 1969. La densidad aparente del suelo y la interpretación del análisis del laboratorio de campo. *Turrialba* 19 (1): 128-131.
- HALOS, P., MENDOZA, E. y BORJA, M. 1982. Synergism between endomycorrhizas *Rhizobium japonicum* CB 1809 and soybean. *Philipp Agric* 65 (1): 93-102.
- HAYMAN, D., BAREA, J. y AZCON, R. 1976. Vesicular arbuscular mycorrhiza in Southern Spain: its distribution in cross growing in soil of different fertility. *Phytopathologia mediterranea* 15 (1): 1-6.
- HAYMAN, D. 1985. Effects of plant species, soil an environmental factors on vesicular arbuscular mycorrhizal (VAM) infection and nutrient uptake. Nuclear techniques to study the role of mycorrhiza in increasing food crop production. Viena, IAEA-TECDOC-338. 29-49.
- HERNÁNDEZ, A. y HERNÁNDEZ, A. 1996. Efecto de la interacción *Rhizobium-MA* en el cultivo de la soya (*Glycine max* (L) Merrill). *Cultivos Tropicales* 17 (1): 5-7.
- HORNER, E. y RUELKE, O. 1982. *Florida 77*. Alfalfa and recommended management practices for this production. 5 págs.
- KAWAII, Y. y YAMAMOTO, Y. 1986. Increase in the formation and nitrogen fixation of soybean nodules by vesicular arbuscular mycorrhizae. *Plant Cell Physiol* 27 (3): 399-405.
- LE POIDEVI, N. y ROBINSON, L. 1964. Métodos de diagnóstico foliar empleados en las

- plantaciones del grupo Booker en Guayana Británica. I. Muestreo y técnicas de análisis. *Fertilite* 21: 3-8.
- LOPES, E.; SIQUEIRA, J.E., ZAMBOLIN, L. 1983. Caracterización das micorrizas vesicular-arbusculares (MVA) e seus efeitos no crescimento das plantas. *R Bras Ci Solo* 7 (1): 1-19.
- MORRISON, D. 1976. Multivariate statistical methods. USA, McGraw-Hill Book Company 170-229.
- OLARTE, L. y MUÑOZ, B. 1979. Métodos analíticos de laboratorio de suelos. Bogotá, Colombia, Instituto Geográfico Agustín Codazzi, IGAC.
- OWUSU-BENNOAH, E. y MOSSE, B. 1979. Plant growth responses to vesicular arbuscular mycorrhiza. XI. Field inoculation responses in barley, lucerne and onion. *New Phytol* 83: 671-679.
- PHILIPPE, M.; RODRÍGUEZ, J. y PICHARD, G. 1985. Comportamiento de diferentes genotipos de alfalfa en andisoles ácidos. *Ciencia e Investigación Agraria* 12 (1): 23-35.
- POWELL, C. 1976. Mycorrhizal fungi stimulate clover growth in New Zealand hill country soils. *Nature* 264: 436-438.
- RICE, W., PENNEY, D. y NYBORG, M. 1977. Effects of soil acidity on rhizobia numbers, nodulation and nitrogen fixation by alfalfa and red clover. *Can J Soil Sci* 57: 197-203.
- RONCADORI, R. y HUSSEY, R. 1982. Mycorrhizae in interactions with other microorganism. Methods and principles of mycorrhizal research. N. Schenk, University of Florida, 218-219.
- SAIF, S. 1984. Interacción de *Rhizobium*-micorrizas VA en leguminosas tropicales. Investigaciones sobre micorrizas en Colombia. E. Sieverding. Palmira, Valle. Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad Nacional, 15-43.
- SIEVERDING, E. 1983. *Manual de métodos para la investigación de la micorriza vesículo arbuscular en el laboratorio*. Palmira, Valle, Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT.
- SIEVERDING, E. 1984. *Aspectos básicos de la investigación de la micorriza vesículo arbuscular. Investigaciones sobre micorrizas en Colombia*. E. Sieverding (Ed.) Palmira, Valle., Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional, 1-14.
- SKIPPER, H. y SMITH, G. 1979. Influence of soil pH on the soybeans endomycorrhiza symbiosis. *Plant and Soil* 53: 559-563.
- SMITH, S. y SKIPPER, G. 1979. Comparison of methods to extract spores of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Sci Soc Amer J* 43: 722-725.
- TOVAR, J. 1988. Efectos de la inoculación con *Rhizobium* y hongo micorrizogeno vesículo arbuscular sobre el cultivo de alfalfa en un suelo de la Sabana de Bogotá. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Bogotá D.C. Universidad Nacional de Colombia, 145 págs.
- VINCENT, J. 1975. *Manual práctico de rizobiología*. Hemisferio Sur. Buenos Aires, 200 págs.
- WAGNER, G., KASSIN, G. y MARTYNIUK, S. 1978. Nodulating of annual medicago by strains of *Rhizobium meliloti* in a commercial inoculant as influenced by soil phosphorus and pH. *Plant and Soil*, 50: 81-89.

Recibido: 12.05.2005

Aceptado: 14.03.2006

