
SELECCIÓN EN INVERNADERO DE INÓCULOS DE MICORRIZA ARBUSCULAR (MA) PARA EL ESTABLECIMIENTO DE LA ALFALFA EN UN ANDISOL 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 América Latina hay millones de hectáreas donde la agricultura está limitada por factores ambientales, de manejo y nutricionales y donde las leguminosas bien adaptadas pueden contribuir a aumentar la producción para las industrias de la alimentación y de la ganadería. La baja disponibilidad de fósforo es uno de los principales limitantes en el desarrollo de pasturas en suelos andosólicos, donde existe alta capacidad de fijación de este nutriente y donde una fertilización química suple temporalmente los requerimientos de las plantas.

El objetivo de este trabajo fue el seleccionar un inóculo de micorriza arbuscular (MA) por su habilidad para mejorar el rendimiento y estimular la fijación simbiótica de fósforo en una leguminosa forrajera, la alfalfa (*Medicago sativa* L.): variedad AS-13 para un Andic dystropept. Se evaluó en invernadero, en suelo tindalizado y sin tindalizar, el efecto de la inoculación de 5 cepas hongos MV sobre el rendimiento en peso seco y el contenido de fósforo en la parte aérea de la planta y el porcentaje de infección de la raíz.

La población fungal MA nativa, en el suelo empleado fue alta, más infectiva que los endófitos introducidos y su eficiencia en la absorción de fósforo sólo fue significativamente superada por el inóculo con *Archaeospora leptoticha* (*Acaulospora appendicula*). La inoculación con esta cepa produjo a los 120 días una infección del 95%; aumentó la cantidad de follaje, al incrementar en 24% ($p < 0.01$) el rendimiento de la parte aérea y mejoró la calidad, al incrementar 65% ($p < 0.01$) la cantidad de fósforo absorbido por la alfalfa. Adicionalmente, los resultados indican que la población rizobial nativa no mostró infectividad en la alfalfa, por lo tanto, es indispensable inocular con cepas efectivas y resistentes a la acidez del suelo empleado en este trabajo.

Palabras clave: alfalfa, Andic dystropept, micorriza arbuscular, invernadero.

ABSTRACT

In Latin America there are millions of hectares where the agriculture is limited by managerial, nutritional and environmental factors and where well adapted leguminous plants can contribute to increased production for the food and cattle raising industries. The low availability of phosphorus is one of the main limitations for the development of pastures in andisolic soils, where a high capacity for the fixation of this nutrient exists and where chemical fertilization temporarily meets plant requirements.

The objective of this study was to select an arbuscular mycorrhizal fungus (AM) for its ability to improve the yield and to stimulate symbiotic phosphorus fixation in a forage legume, Lucerne (*Medicago sativa* L.): variety AS-13 for a soil, Andic dystropept. The effects of the inoculation of 5 AM fungi strains on dry weight yields and the phosphorus content in the plant shoots and the percentage of infection in the root were greenhouse evaluated, in tyndalized and non-tyndalized soil.

The native MA fungal population was high in the soil used, more infective than the introduced endofites and its efficiency in phosphorus absorption was significantly surpassed only by the inoculum, *Archaeospora leptoticha* (*Acaulospora appendicula*). Inoculation with this strain produced an infection of 95% after 120 days; the quantity of foliage increased, producing an increase of 24% ($p < 0.01$) in the yield from the shoots and improved their quality, upon increasing the quantity of phosphorus absorbed by the lucerne by 65% ($p < 0.01$). Additionally, results indicate that the population of native Rhizobium didn't show infectivity in the lucerne, therefore it is necessary to inoculate with strains that are effective and resistant to the acidity of the soil used in this study.

Key words: lucerne, Andic dystropept, arbuscular mycorrhiza, greenhouse.

INTRODUCCIÓN

Muchos estudios se han iniciado para determinar el potencial existente en sistemas biológicos simbióticos, como una alternativa para la rehabilitación de los suelos y como un apoyo a la fertilización. La baja disponibilidad de fósforo es uno de los principales limitantes en el desarrollo de pasturas en suelos andosólicos, donde existe alta capacidad de fijación de este nutriente y donde una fertilización supe, sólo temporalmente, los requerimientos de las plantas. En las pasadas décadas se ha demostrado que el hongo micorriza arbuscular (MA) incrementa el fósforo tomado del suelo por la planta y recientes investigaciones han tratado de manipular y extender este *fósforo ahorrado* en la agricultura (Nicolson, 1975; Powell y Bagyaraj, 1985).

Cuando la leguminosa se asocia con el hongo para formar la micorriza arbuscular (MA), se incrementa el fósforo absorbido de la solución del suelo por estas plantas hospederas, debido a que las hifas del hongo se extienden y exploran una mayor área del suelo comparada con la de los pelos radiculares. Por esta razón, las leguminosas micorrizadas crecen mejor que las no micorrizadas en suelos con bajos contenidos de fósforo disponible, habiéndose reportado en muchos trabajos altos incre-

mentos en el rendimiento (Saif, 1977; Tinker, 1978; Fortín *et al.*, 2002). La inoculación con hongos MA se realiza sólo con suelos o raíces infectados, debido a la dificultad de obtener cultivos axénicos en gran cantidad para su comercialización (Azcon-Aguilar y Barea, 1981; Koide y Mosse, 2004).

El aislamiento constante de nuevas cepas, el desarrollo de nuevas variedades de plantas, hacen indispensable la selección de inóculos de hongo MA, pues se ha demostrado que aunque no tienen especificidad, su efectividad también varía de acuerdo a la planta hospedera (Green *et al.*, 1983).

El objetivo de este trabajo es la selección de inóculos de hongos MA por su habilidad para mejorar el rendimiento y estimular la fijación simbiótica de fósforo en una variedad de alfalfa (*Medicago sativa* L.): AS-13 para un suelo de la serie *Andic dystropept*. Se elige la alfalfa debido a su alto valor nutritivo para la industria de concentrados para animales y para la ganadería lechera en la Sabana de Bogotá.

Se evaluó la calidad del suelo, la metodología de evaluación tiene en cuenta parámetros del suelo, tales como estructura, textura, retención de humedad, contenido de materia orgánica y fósforo, entre otros,

y parámetros del cultivo tales como rendimiento, porcentaje de la infección y porcentaje de utilización de fósforo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Suelo

Se recolectó el suelo en la Hacienda Yerba-buena, municipio de Subachoque, locali-

zado al noroccidente de la Sabana de Bogotá. El suelo no había sido cultivado ni fertilizado y pertenece al orden Inceptisol; suborden Andept; gran grupo Dystrandept; subgrupo Andic Dystropept de la serie Bermeo. Los resultados del análisis fisicoquímico del suelo aparecen en la tabla 1.

Se determinó el contenido de humedad (P_w) y el porcentaje de nitrógeno orgánico por

Tabla 1
Análisis fisicoquímico del suelo*

		Calificación
Granulometría	Limos (%)	44
	Arena (%)	38
	Arcilla (%)	18
Textura		Franco
pH (1:1)	5,3	ácido
Humedad (%)	13,6	
CCC** (meq/100 g)	81,3	muy alta
Bases totales (mg/100 g)	16,7	
Calcio (mg/100 g)	9,1	
Magnesio (mg/100 g)	4,5	
Potasio (mg/100 g)	2,5	
Sodio (mg/100 g)	0,6	
Saturación total (mg/100 g)	20,5	mediana
Saturación de calcio (mg/100 g)	11,2	regular
Saturación de magnesio (mg/100 g)	5,5	regular
Saturación de potasio (mg/100 g)	3,1	alta
Carbono (%)	16,05	muy alto
Materia orgánica (%)	27,75	alta
Fósforo (Bray II) (ppm)	6	muy pobre
Aluminio (meq/100 g)	2,3	tóxico
Micronutrientes (extractables con DPTA***)		
Hierro (ppm)	67,50	adecuado
Cobre (ppm)	0,31	adecuado
Manganeso (ppm)	0,68	deficiente
Zinc (ppm)	0,92	adecuado
Boro (agua caliente)	0,10	deficiente
Fertilidad estimada: Moderada a baja (107)		

* Analizado en el Laboratorio de Suelos del Instituto Geográfico Agustín Codazzi (IGAC).

** Capacidad catiónica de cambio.

*** Ácido dietilentriaminopentaacético.

el método de Kjeldahl, la variación debida a diferentes niveles de encalado, por el método de Dunn y la variación de la saturación de calcio, después de la fertilización y encalado (Olarte y Muñoz, 1979; Tovar, 1988).

El suelo recibió una fertilización basal que consistió en la adición de calcio (5.4 T/Ha) como CaCO_3 , incubándose por dos semanas y manteniendo el suelo semihúmedo. Los cálculos se hicieron teniendo en cuenta la densidad aparente de este suelo (0.9 g/cm^3). Además se calculó la cantidad necesaria para eliminar la toxicidad del aluminio en base al nivel crítico de calcio para la alfalfa de 7 me/100 g de suelo (Chapman, 1966) y el requerimiento nutricional del cultivo por cosecha de 437.9 kg/ha de CaCO_3 . La adición de cal subió el pH a 5.7 (Mahoney *et al.*, 1981).

Se adicionó nitrógeno (180 kg/Ha) como $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, esta cantidad llena el requerimiento nutricional de la alfalfa (170 kg de nitrógeno/ha/cosecha) y no inhibe los procesos de nodulación, fijación y micorrización en ensayos sobre el mismo suelo en cultivo de trébol blanco (Mosquera *et al.*, 1986).

El fósforo se adicionó a razón de 360 kg/ha de roca fosfórica finamente molida (17% de P_2O_5) de Pesca (Boyacá), la cual es una fuente de baja disponibilidad que ofrece una ventaja en este suelo altamente fijador de fósforo (Mosquera *et al.*, 1986).

El boro se adicionó como bórax a razón de 45 kg/ha de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$. Teniendo en cuenta el contenido deficiente de este elemento en el suelo (0.1 ppm) y la exigencia por este nutriente del cultivo ($< 1 \text{ ppm}$), la adición del fertilizante elevó el contenido del elemento en el suelo a 3 ppm. Se tuvo en cuenta que la adsorción del boro aumenta con el encalado al aumentar el pH y para mantener una relación Ca/B adecuada.

Planta indicadora: alfalfa (*Medicago sativa* L.).

Se trabajó con la variedad de alfalfa (*Medicago sativa* L.): AS-13 por ser la variedad comercial en nuestro país y recomendada para las condiciones climáticas del sector y fisicoquímicas del suelo empleado. Sólo se trabajó con una variedad porque en la literatura no se reporta especificidad de la MA en cuanto a la variedad de la alfalfa a un nivel de fertilidad del suelo. Las principales características de esta variedad son: alto rendimiento de forraje verde; resistencia a la toxicidad del aluminio; resistencia a la acidez del suelo; resistencia al ataque de áfidos (pulgonos); resistencia a las bajas temperaturas y a las heladas (Boston *et al.*, 1981; Horner y Ruelke, 1982; González, 1987). Las semillas certificadas de esta variedad tienen una pureza del 98% y un porcentaje de germinación del 85%.

Inóculos de hongos MA

Se evaluaron cinco inóculos de micorrizas vesículo arbusculares suministradas por el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT-Palmira); estos inóculos provienen de propagaciones hechas en ensayos de campo. Sus principales características aparecen en la tabla 2.

Los inóculos se propagaron en potes plásticos, previamente esterilizados con solución de hipoclorito de sodio (2%) y lavados con agua destilada. Se seleccionó como hospedero de reproducción de hongos MA, el maíz (*Zea mays* L.) ya que la literatura recomienda que cuando se va a trabajar con leguminosas, la planta trampa debe ser una gramínea, para disminuir el peligro de los patógenos que pueden ser iguales o muy parecidos (Sieverding, 1984). Adicionalmente, el maíz es de rápido crecimiento, desarrolla una abundante raíz que es rápidamente infectada

(Hayman *et al.*, 1976; Owusu-Bennoah y Mosse, 1979; Skipper y Smith, 1979). Se sembraron cinco semillas 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 para los ensayos con alfalfa consistió de suelo y las raíces de maíz infectadas finamente cortadas, provenientes de plantas con 4 meses de crecimiento. Cada vez que se necesitó inóculo (suelo y raíces infectados), se volvió a sembrar maíz, utilizando la técnica ya descrita. Los materos se mantuvieron en invernadero, con humedad del 60% de la capacidad de campo con agua destilada.

A cada inóculo, una vez homogeneizado, se le hizo un conteo de esporas, para evaluarlo (Abbot y Robson, 1985). Las esporas se separaron del suelo y las raíces de acuerdo al método de Ohms y Jenkins, se escogió este método por ser uno de los más exactos (Smith y Skipper, 1979; Sieverding, 1983). Se utilizaron 50 g de inóculo por cepa, se licuaron con agua por tres minutos, el sobrenadante se vertió a una serie de tamices de 315, 125, 63 y 40 μm . Para eli-

minar 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 2000 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 μm) 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 se hizo con base a 100 g de suelo seco (especialmente si las muestras tienen diferente grado de humedad). Número de esporas en 100 g de suelo seco es igual al número de esporas en 10 g de suelo húmedo /gramos de suelo seco en 10 g de suelo húmedo.

Como criterio de calidad de los inóculos en 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 hizo también recuento de las esporas del andisol, para verificar la cantidad de

Tabla 2
Inóculos de hongos MVA

Cepa*	Nombre	Procedencia
C-13-1	<i>Archaeospora leptoticha</i>	Quilichao, Cauca
C-4-1	<i>Acaulospora foveata</i>	Quilichao, Cauca
C-10	<i>Entrophospora colombiana</i>	Quilichao, Cauca
C-1-1	<i>Glomus manihotis</i>	Quilichao, Cauca
C-33-1	<i>Glosmus occultum</i>	Quilichao, Cauca

* CIAT, *International Center for Tropical Agriculture*, Palmira, Valle.

esporas y las posibles especies de hongos MA nativos.

Se buscaron diferencias en efectividad, en la evaluación de la infección con el tiempo, como para el ensayo de selección de inóculos de hongos MA (Saif, 1977; Abbot y Robson, 1985).

En la determinación de curvas de infección en función del tiempo, se emplearon pots plásticos de 2 kg con 1.5 kg de suelo tamizado (2 mm). La esterilización no se hizo por tratamiento del suelo en autoclave, para evitar los efectos detrimentes sobre las propiedades físicas del suelo. Se prefirió un tratamiento de tinalización reportado por otros autores para trabajos análogos. Para la tinalización se sometió el suelo semihúmedo a una corriente de vapor de agua a 70°C por dos horas, se dejó en reposo 24 horas y luego se repitió la operación (Sieverding, 1984). También se llevó un control sin tinalizar y sin inoculación para observar el comportamiento de la micorriza nativa.

Se agregaron 40 g de inóculo por pote, esparciéndolo a 5 cm de la superficie y cubriéndolo con suelo. Cada pote se dividió en cuatro cuadrantes, sembrándose 6 semillas desinfectadas superficialmente, por cuadrante. Se evaluó la infección de las plantas en uno solo de los cuadrantes cada 45 días. Las plantas crecieron en invernadero a temperatura ambiente (14°C) y humedad relativa del 80%. Las raíces fueron clareadas con KOH y teñidas con azul de tripano (1g/litro de lactofenol) según metodología de Phillips y Hayman (Sieverding, 1984). De los hongos empleados sólo el *Glomus occultum* no tiñe por este método.

Se determinó el porcentaje de infección por observación al microscopio de luz (aumento de 100X), por el método de Nicolson y Baylis (Saif, 1984), recomendado en la li-

teratura por ser un método preciso y práctico (Ambler y Young, 1977; Biermann y Linderman, 1981). Se cuantificó el número de campos infectados sobre un total de 30 por lámina con 10 pedazos de raíces coloreadas escogidas al azar, las cuales se montaron en lactofenol (fenol 300 g; ácido láctico 250 ml; glicerol 250 ml; agua destilada 300 ml) y wallerita (fenol 28 g; ácido acético glacial 28 g; gelatina transparente 19 g; 10 gotas de glicerina). Cada determinación se hizo por duplicado. Se observó la aparición de diferentes estructuras y la presencia de patógenos. El porcentaje de infección se calculó multiplicando por 100 el número de campos infectados y dividiéndolo por el número de campos totales observados.

También se determinó la intensidad de la infección o colonización de las raíces y se reportó en tres categorías según 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.

Se graficó el porcentaje de infección en función del tiempo. También se determinó el rendimiento en peso seco de la parte aérea de la planta. Estos gráficos indican cual es el tiempo óptimo para evaluar los ensayos.

Para la selección de inóculos de hongos MA, se evaluó el efecto de la inoculación con los hongos sobre el rendimiento en peso seco y el contenido de fósforo en la parte aérea de la planta y el porcentaje de infección de la raíz.

La inoculación se hizo sobre el suelo tinalizado y no tinalizado. Se compararon los efectos de la inoculación con el

tratamiento testigo sin inoculación y un control con encalado y fertilización basal, los tratamientos con inoculación dual recibieron igual encalado y fertilización y los siguientes inóculos: *Archaeospora leptoticha*, *Acaulospora foveata*, *Entrophospora colombiana*, *Glomus manihotis* y *Glomus occultum*.

Se emplearon potes plásticos esterilizados de 1 kg a los cuales se les añadió 0.75 kg de suelo tamizado (2 mm). Se empleó un diseño factorial al azar, con cinco replicaciones por tratamiento.

La fertilización basal fue igual a la usada en el ensayo de determinación de la infección en función del tiempo. Se agregó 20 g de cada inóculo húmedo, utilizando el mismo procedimiento que para las curvas de infección. Se sembraron 7 semillas de alfalfa, desinfectadas superficialmente a 2 cm de profundidad, las plantas germinaron a los tres días y a los 15 días se dejaron 5 plantas por pote. Las plantas se evaluaron después de 120 días de crecimiento en un invernadero a temperatura ambiente (14°C), humedad relativa 80% y un promedio de 12-13 horas de fotoperíodo. Los materos se mantuvieron con humedad del 60% de la capacidad de campo, con agua corriente.

Para la evaluación de los inóculos, una vez separadas las raíces de la parte aérea, ésta última se secó a 60°C, durante 24 horas. Se determinó el rendimiento (mg/tratamiento) y se expresó como porcentaje relativo al testigo no tinalizado.

También se determinó el porcentaje de fósforo (Fogg y Wilkinson, 1958), en la muestra previamente digerida por el método Kjeldahl Gunning (Le Poidevi y Robinson, 1964), con duplicado por replique. La digestión se realizó sobre 200 mg de tejido vegetal seco, finamente molido con adición de 3 ml de ácido sulfúrico concentrado y

comercial, 5 gotas de CuSO_4 (5%) y aproximadamente 1 g de Na_2SO_4 (anhidro), en digestor microKjeldahl, hasta obtener una solución verde transparente, que se lleva a volumen de 50 ml. Esta digestión permite la evaluación del porcentaje de nitrógeno por la destilación microKjeldahl y la determinación del porcentaje de fósforo por colorimetría.

El porcentaje de infección se determina sobre las raíces clareadas con KOH y teñidas con azul de tripano (Sieverding, 1984), lo mismo que la intensidad de la infección.

También se determina el porcentaje de utilización del fertilizante fosforado por cepa nativa, analizado de acuerdo al método descrito en la literatura (Powell y Daniel, 1978b), así: $U = Pa / Pf \times 100$.

Donde: U, porcentaje de utilización del fósforo del fertilizante; Pa, fósforo absorbido por la planta del fertilizante; Pf, fósforo agregado en el fertilizante; Pa se define como: $Pa = Pu - Po$; Pu, es el total del fosfato absorbido por las plantas infectadas por los hongos MA a las cuales se les ha dado una fertilización; Po, es el fósforo absorbido del suelo sin fertilizar por plantas infectadas con el mismo hongo MA.

El análisis estadístico incluyó un análisis de varianza y un análisis de rango múltiple de Duncan. Se buscaron también correlaciones entre los parámetros de medida.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de la primera evaluación de los inóculos de hongos MA se presentan en la tabla 3. Se utilizó como planta huésped el maíz (*Zea mays* L.). La escasa infección observada a los 30 días era poco intensa y se aumentó prácticamente al doble en los siguientes 30 días, demostrando viabilidad de los inóculos.

Tabla 3
Infección de las raíces de maíz (*Zea mays* L.) inoculadas con hongos MVA

Inóculo	Infección (%)		Observaciones		
	30 días	60 días	Hifas	Vesículas	Arbúsculos
<i>Archaeospora leptoticha</i>	33	63	+	+	+
<i>Acaulospora foveata</i>	23	40	+	+	+
<i>Entrophospora colombiana</i>	23	47	+	escasas	-
<i>Glomus manihotis</i>	33	50	+	+	+
<i>Glosmus occultum</i>	[17]	[40]	escasas	+	+

Los valores en corchete incluyen contaminación del inóculo con *Gigaspora margarita*.

Tabla 4
Recuento de esporas en los inóculos de hongos MA y el suelo empleado.

Inóculo	Número de de esporas/g suelo seco	Observaciones
<i>Archaeospora leptoticha</i>	19 alto	Tamaño 63-125-315 μm ; color pardo; pedúnculo característico; superficie lisa. Se observaron gusanos blancos y algunas cepas contaminantes de <i>Glomus</i> sp.
<i>Acaulospora foveata</i>	24 alto	Tamaño 63-125-315 μm , color pardo; superficie lisa; gusanos. Contaminación con <i>Gigaspora</i> sp.
<i>Entrophospora colombiana</i>	21 alto	Tamaño entre 40-63 μm ; color pardas y blancas; superficie lisa; nemátodos y gusanos. Escasa contaminación con <i>Gigaspora</i> sp.
<i>Glomus manihotis</i>	19 alto	Tamaño 63-125-315 μm ; colores variados de pardos hasta hialinos; superficie lisa. No se observó contaminación pero se hallaron gusanos.
<i>Glomus occultum</i> *	20 alto	Tamaño entre 40-63 μm ; color pardas y blancas; superficie lisa; nemátodos y gusanos. Contaminación con <i>Gigaspora margarita</i> (10%).
MA nativas*	6 medio	Mezclas de esporas de todos los tamaños colores variados; superficie lisa; pedúnculo con forma característica de <i>Glomus</i> .

*Estos valores pueden ser mayores debido a que las esporas de *Glomus occultum*, *Glomus tenuis* y *Glomus diaphanum* tienen tamaños menores de 40 μm .

Para calcular la cantidad de inóculo necesario para el ensayo de selección hongos MA, se hizo un recuento inicial cuyos resultados aparecen en la tabla 4. El número de esporas fue alto y similar en todos los inóculos, esto indicó que se podía tomar la misma cantidad (20 g) de cada inóculo (aproximadamente 400 esporas) para inocular en el ensayo de selección.

La contaminación con esporas de *Gigaspora* y *Glomus* sp. eran esperadas, ya que los inóculos provenían de propagaciones hechas en campo. Sin embargo, fue muy baja en todos los casos excepto en *Glomus occultum*, en que la contaminación con *Gigaspora* fue del 10% e identificada por el doctor Norman Schenk de la Universi-

dad de Florida como *Gigaspora margarita*.

Las esporas de la población nativa del suelo de Subachoque, fueron abundantes y se apreció mezcla de especies, que fueron identificadas como *Glomus tenuis*, *Glomus diaphanum* y *Glomus* sp. *Glomus tenuis* es reconocible porque tiene hifas parecidas a hilos altamente reticulados (Schenk y Hinson, 1973; Powell y Daniel, 1978b) y que forman redes de hifas finas (< 1mm de diámetro) dentro de las células corticales, sin embargo, el conteo de las esporas se hace difícil debido a su pequeño tamaño (10-12 μ m) (Powell y Daniel, 1978a).

Los resultados de la infección micorrizal con el tiempo aparecen en la tabla 5. La

Tabla 5
Variación de la infección y el rendimiento de la alfalfa (*Medicago sativa* L.), variedad AS-13 con diferentes inóculos de hongos MVA en función del tiempo.

Rendimiento (mg/planta)	Tiempo (días)						
	30	45	90	100	135	145	180
Micorrizas nativas*	14,9			91,5		224,9	250,0
<i>Archaeospora leptoticha</i>		18,6	60,1		165,9		306,2
<i>Glomus manihotis</i>		14,3	69,5		192,6		
<i>Entrophospora colombiana</i>		14,2	17,1		92,1		165,0
<i>Acaulospora foveata</i>		14,7	24,3		74,3		142,7
<i>Glosmus occultum</i>		9,2	53,1		112,2		182,4
Infección (%)	Tiempo (días)						
	30	45	90	100	135	145	180
Micorrizas nativas*	20			67		77	81
<i>Archaeospora leptoticha</i>		0	58		95		87
<i>Glomus manihotis</i>		10	50		73		
<i>Entrophospora colombiana</i>		8	12		35		90
<i>Acaulospora foveata</i>		7	5		31		33
<i>Glosmus occultum</i>		0	41		50		73

* Suelo sin tindalizar.

infección determinada mostró que las cepas nativas infectan más rápidamente que las cepas introducidas en los inóculos, puesto que a los 30 días la infección tenía un valor mayor que la lograda con los inóculos a 45 días y se pudieron observar no sólo hifas y vesículas, sino también arbusculos. Se destacó también la presencia de hongos patógenos. La explicación sería no sólo a la adaptación que esta población nativa presenta a las condiciones del suelo, sino probablemente a una mayor población. Esta mayor precocidad de la población nativa para infectar la alfalfa se observó hasta los 100 días y en las determinaciones a 135 días sólo fue superada por el inóculo con *Archaeospora leptoticha* y a 180 días por el inóculo con *Entrophospora colombiana*. El rendimiento presentó una buena correlación con la infección determinada ($r=0.956$)($p<0.01$). No se relacionó el rendimiento con los rendimientos logrados por los demás inóculos porque fueron evaluados sobre suelo tinalizado y la evaluación de la población nativa sobre suelo sin tinalizar.

El inóculo con *Archaeospora leptoticha* antes de 45 días no fue posible detectar en las raíces los efectos de la inoculación. Ésta se manifiesta rápidamente después de 90 días y alcanzó un valor máximo a los 135 días, manteniéndose constante hasta los 180 días. Los rendimientos están correlacionados con los porcentajes de infección ($r=0.77$)($p<0.01$) y se logró un rendimiento de la alfalfa dos veces mayor al logrado con los demás inóculos, indicando la efectividad del inóculo con esta cepa. Los arbusculos se detectaron a los 135 días y las esporas a los 180 días.

Para el inóculo con *Glomus manihotis* las determinaciones a los 180 días no se pudieron realizar ya que las plantas sufrieron ataque de depredadores. Este inóculo presentó infección desde los 45 días, pero la

magnitud de la infección fue inferior a la lograda por el inóculo con *Archaeospora leptoticha* a los 135 días. En esta determinación se observaron arbusculos y esporas. También se observó correlación entre el porcentaje de infección y el rendimiento ($r=0.93$)($p<0.05$). Este inóculo fue el mejor en infectividad y efectividad después del inóculo con *Archaeospora leptoticha*.

El inóculo con *Entrophospora colombiana* presentó una infección lenta y de valores bajos hasta los 135 días, después se incrementó la infección notablemente y entonces se observaron también arbusculos y esporas. Se comprobó correlación entre el porcentaje de infección y el rendimiento ($r=0.978$)($p<0.001$).

La infección con *Acaulospora foveata* fue lenta y muy escasa aun a los 180 días y su efecto se manifestó en los más bajos rendimientos en comparación con los demás inóculos, a pesar de observarse arbusculos a los 180 días. Se comprobó correlación entre el porcentaje de infección y el rendimiento ($r=0.89$)($p<0.05$).

La infección con *Glomus occultum* no puede ser detectada con azul de tripano, la observación de las raíces, sólo permite detectar los efectos de la contaminación de la *Gigaspora margarita* (10%). Se observó correlación entre el rendimiento y el porcentaje de infección mixta ($r=0.943$)($p<0.01$). También se observaron hongos patógenos, que pudieron inducir una reacción neutra, negativa o positiva, como ha sido reportado en la literatura (Roncadori y Hussey, 1982).

Los resultados de las observaciones y la determinación alcanzada a los 120 días con los distintos inóculos, el tratamiento testigo (sin inocular) y el control (encalado y fertilizado) se presentan en la tabla 6.

La intensidad de los tratamientos testigo y control tinalizados, fue muy baja comprobándose así la efectividad de este proceso de esterilización del suelo. La intensidad de la infección en los tratamientos no tinalizados, fue muy similar y corresponde a la estimada al testigo, debido a la población nativa.

Se destaca en los tratamientos no tinalizados la presencia de hifas gruesas, que no parecían en los tratamientos tinalizados, excepto en el inóculo con *Entrophospora*

colombiana, evidenciando que existe un hongo MV nativo cuyas hifas son especialmente gruesas. Los arbusculos fueron observados en todos los tratamientos, excepto en los incisos de *Glomus manihotis* y en la contaminación con *Glomus occultum*. Se detectó escasa presencia de patógenos en los tratamientos tinalizados e inoculados con *Glomus manihotis* y *Glomus occultum*, indicando que el hongo patógeno venía de los inóculos. Fue notable la intensidad alcanzada en el tratamiento tinalizado inoculado con *Archaeospora leptoticha*, que

Tabla 6

Selección de inóculos con hongos MVA en Alfalfa (*Medicago sativa L.*) AS-13 a los 120 días de crecimiento

Efectos sobre el rendimiento y el porcentaje de infección

TRATAMIENTO		Rendimiento Parte aérea mg/tratamiento	Eficiencia % Relativo al testigo NT.	Infección micorrizal (promedio ± SEM)
Testigo	T.	101,7 j	5	1 ± 1
	NT.	2094,1 d	100	65 ± 14
Control	T.	828,2 g	39	7 ± 8
	NT.	2637,3 a	126	87 ± 12
<i>Archaeospora leptoticha</i>	T.	2123,9 d	101	65 ± 14
	NT.	2605,7 a	124	90 ± 12
<i>Glomus manihotis</i>	T.	1491,0 e	71	30 ± 6
	NT.	2529,3 b	121	86 ± 5
<i>Glomus occultum.</i>	T.	1098,7 f	52	[11 ± 3]
	NT.	2482,9 b	118	85 ± 10
<i>Entrophospora colombiana</i>	T.	439,7 i	21	21 ± 3
	NT.	2338,1 c	112	87 ± 6
<i>Acaulospora foveata</i>	T.	626,8 h	30	23 ± 8
	NT.	2508,5 b	119	92 ± 5

T. = Tinalizado; NT. = No tinalizado. SEM = desviación estándar de la muestra.

Promedio de cinco replicaciones. Encalados y fertilizados.

Valores con la misma letra no tienen diferencias significativas. ($p < 0,01$).

indica la afinidad de este hongo por esta variedad de alfalfa en este suelo.

Los resultados de rendimiento de la parte aérea y porcentaje de fósforo en los tratamientos no tinalizados y tinalizados aparecen en la tabla 6. La tinalización como proceso de esterilización mostró su efectividad porque no se observó nodulación en ninguno de los tratamientos y la infección de la micorriza nativa fue baja (1%) en el testigo tinalizado, no obstante, causó un efecto detrimento sobre el desarrollo de las plantas, que representó el 95% del rendimiento y de la cantidad de fósforo absorbido. Como era de esperarse, se observó que el proceso afectó también su desarrollo radical; teniendo en cuenta la función del fósforo sobre la raíz. Sin embargo, ninguno de los tratamientos tinalizados presentó clorosis ni ningún síntoma de deficiencia en el follaje de la alfalfa y todos los demás tratamientos presentaron un desarrollo radical bueno.

La nodulación observada en el testigo no tinalizado fue escasa (1 nódulo/planta) y tardía. Los nódulos fueron pequeños y blancos, indicando que la población rizobial nativa es baja y poco efectiva. El desarrollo radicular fue normal pero el tejido foliar presentó clorosis. La infección micorrizal de 65% demuestra una población fangal alta y efectiva, como lo comprueba la cantidad de fósforo absorbido que fue del 95% superior al tratamiento tinalizado, produciéndose un rendimiento 20 veces mayor, esto sólo en el supuesto de que la absorción de fósforo sea exclusivamente debida a la micorriza y conociendo que la alfalfa es una planta micotrófico dependiente.

Los efectos de la tinalización, se pueden deber no sólo a la disminución de la microflora y de la absorción de fósforo, sino a la posible liberación de elementos en cantidad que puede llegar a ser tóxicos para las

plantas. La literatura cita que la liberación de manganeso en Andeps, causada por esterilización en autoclave (Wagner *et al.*, 1978). Estos efectos deberán ser precisados en trabajos posteriores.

El recuento de esporas en el suelo estudiado dio un valor de 6 esporas/gramo de suelo seco, considerada una población media.

El encalado y la fertilización basal con nitrógeno, fósforo y boro sobre el suelo sin tinalizar, incremento la infección micorrizal en 22%, el fósforo absorbido en 55% y el rendimiento de la alfalfa en 26%. Estos resultados demuestran la necesidad de encalar y fertilizar en este suelo para mejorar las propiedades fisicoquímicas y biológicas a favor de la alfalfa. Los efectos del encalado y fertilización en el tratamiento tinalizado fueron mayores en rendimiento (34%), pero la infección micorrizal y la cantidad de fósforo absorbido fueron menos estimuladas y mostraron aumentos sólo de 6 y 36% respectivamente. La respuesta mayor del tratamiento tinalizado sobre el rendimiento (10% más), indica que el procedimiento de esterilización probablemente causó liberación de nutrientes que fueron aprovechados por la planta.

La utilización del fosfato del fertilizante empleado calculado según se recomienda en la literatura (Powell y Daniel, 1978b) fue del 27,2% en el tratamiento tinalizado y del 41% en el no tinalizado. La diferencia del 14,6% se atribuye a la absorción del fosfato por el endófito nativo. Estos valores de utilización de fosfato son altos. El hongo MA nativo aumento la absorción de fósforo aplicado 1.51 veces, incrementando la eficiencia de la absorción en un 52%.

La alfalfa inoculada con hongos MA en el suelo tinalizado presento buen desarrollo radicular y no presentaron síntomas foliares de deficiencias nutricionales. El inóculo

con *Archaeospora leptoticha* produjo una infección del 65% y un incremento significativo ($p < 0.01$) en el rendimiento foliar del 95%, respecto al testigo tinalizado. El fósforo absorbido aumentó notablemente en un 2637% lo que indica una alta efectividad del inóculo. Si referimos la cantidad neta de fósforo absorbido por la micorriza a la cantidad de fósforo del fertilizante la eficiencia fue de 69%. Este resultado es valioso si se tiene en cuenta la alta capacidad de fijación de fosfatos de este suelo.

Los inóculos con *Glomus manihotis* y *Glomus occultum* presentaron efectos similares con rendimientos significativamente diferentes del 66,4 y 47,6% respecto del testigo tinalizado, lo mismo que la cantidad de fósforo absorbido del 161,1% y 150,9 mg/tratamiento respectivamente. El porcentaje de infección determinado fue del 30% para *Glomus manihotis* y del 11% para el tratamiento inoculado con *Glomus occultum* que se debe a la contaminación y su efecto sólo puede evaluarse por la cantidad de fósforo absorbido. La eficiencia de los inóculos fue muy similar del 28 y 24 % respectivamente.

La inoculación con *Entrophospora colombiana* y *Acaulospora foveata* presentó rendimientos significativamente superiores al testigo sólo en 16,2 y 25,2% respectivamente. Los porcentajes de infección de 21 y 23% fueron los valores más bajos y corresponden también a las menores cantidades de fósforo absorbido de 62 y 80 mg/tratamiento, que demuestran que no hubo ninguna eficiencia de los inóculos, puesto que nos rendimientos no fueron superiores ($p < 0.01$) al obtenido por el encalado y la fertilización basal para el tratamiento control. La explicación de que estos inóculos no alcanzarán un valor alto de infección, puede deberse a que son cepas aisladas de suelos ácidos y por eso no toleran el encalado ya que son sensibles a pH mayor de 5.5.

Para determinar si el tipo de interacción entre el endófito nativo y el introducido *Archaeospora leptoticha* fue sinérgico o antagonístico (Azcon-Aguilar y Barea, 1985), se hizo un análisis de los rendimientos en peso seco de la parte aérea de los tratamientos control e inoculado con y sin tinalización que se muestra en la tabla 6 y en la figura 1. Los resultados sugieren un efecto antagonístico entre el endófito nativo y el introducido que debe comprobarse en trabajos posteriores, evaluando el efecto tóxico del posible manganeso liberado sobre los endófitos.

En resumen, la población MA nativa mostró buena infectividad, efectividad y más competitividad que las cepas introducidas, aun con el inóculo con *Archaeospora leptoticha*, demostrando este inóculo ser igualmente efectivo a la micorriza nativa en el tratamiento testigo no tinalizado; no es visible su efecto en infección y rendimiento frente a la micorriza nativa en el tratamiento control no tinalizado, aunque demostró su efectividad al absorber 10% más de fósforo.

El efecto de la no tinalización del suelo se puede apreciar en la figura 1. Se observó buen desarrollo radicular y de la parte aérea y no se observaron síntomas foliares de deficiencias nutricionales. No se observó nodulación, confirmándose una población rizobial nativa inefectiva. Los efectos de los diferentes inóculos de hongos MVA en el rendimiento no fueron muy diferentes entre sí, porque su efecto fue opacado por la población fangal nativa.

Los porcentajes de infección micorrizal en un rango de 82-92%, fueron muy similares al determinado en el tratamiento control del 83%. Esto sugiere que la población nativa fue más competitiva que las micorizas introducidas, sus efectos sólo fueron apreciables en la cantidad de fósforo absorbido y en consecuencia

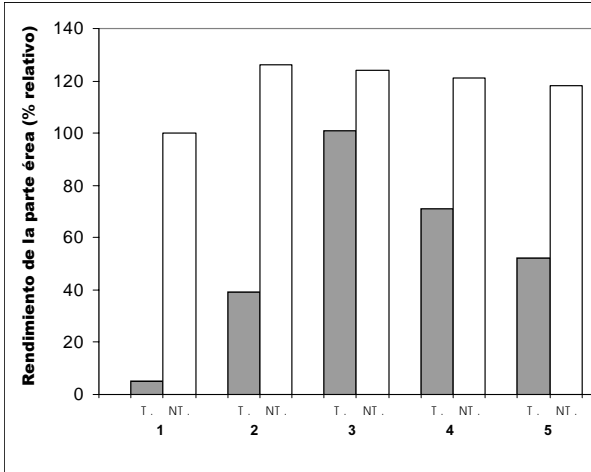


Figura 1. Efecto en el rendimiento de la parte aérea. Selección de inóculos de hongos MA en alfalfa (*Medicago saliva* L.); variedad AS-13 a 120 días de crecimiento. Los resultados se expresan en porcentaje relativo al testigo no tindalizado. 1. Testigo. 2. Control. 3. *Archaeospora leptoticha*. 4. *Glomus manihotis*. 5. *Glomus occultum*. 6. *Entrophospora colombiana*. 7. *Acaulospora foveata*. T = tratamiento tindalizado; NT = tratamiento no tindalizado.

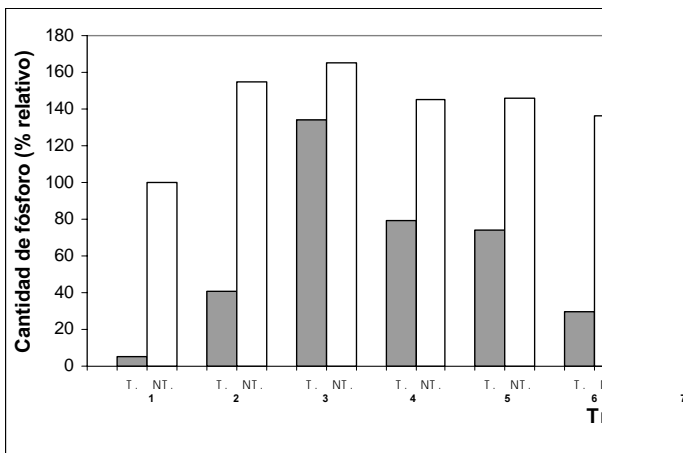


Figura 2. Efecto sobre la cantidad de fósforo absorbido. Selección de inóculos de hongos MA en alfalfa (*Medicago saliva* L.); variedad AS-13 a 120 días de crecimiento. Los resultados se expresan en porcentaje relativo al testigo no tindalizado. 1. Testigo. 2. Control. 3. *Archaeospora leptoticha*. 4. *Glomus manihotis*. 5. *Glomus occultum*. 6. *Entrophospora colombiana*. 7. *Acaulospora foveata*. T = tratamiento tindalizado; NT = tratamiento no tindalizado.

en la calidad del tejido vegetal y su valor como forraje. Se comprobó correlación entre el porcentaje de infección y la cantidad de fósforo absorbido ($r=0.76179$) ($p<0.001$).

La infección micorrizal fue estimulada por la fertilización aumentando de 65% en el testigo a 88% en promedio en los tratamientos control e inoculados.

La cantidad de fósforo absorbido no fue significativamente diferente en todos los tratamientos, excepto en el tratamiento con *Archaeospora leptoticha*, en que se determinó un incremento significativo de 10.4% ($p<0.01$) respecto al tratamiento control (véase figura 2).

El inóculo con *Archaeospora leptoticha* fue significativamente más efectivo que los otros inóculos. Esto puede apreciarse comparando el porcentaje de infección y los rendimientos entre los tratamientos tinalizados y no tinalizados.

El fósforo determinado en la parte aérea osciló entre 0.10-0.14% en todos los tratamientos. Estos valores son inferiores a los reportados como rango de deficiencia 0.14-0.17 (Chapman, 1966) y también inferiores a 0,2% (Barea, *et al.*, 1980) que se dan como un valor mínimo para el desarrollo de la nodulación de la alfalfa. Esta es una posible explicación del porqué no se observó nodulación. Sin embargo, se apreció que los inoculados con *Archaeospora leptoticha* y *Glomus occultum* presentaron los valores más altos (véase tabla 6).

CONCLUSIONES

La población fungal MA nativa, en el suelo empleado fue alta, más infectiva que los endófitos introducidos y su eficiencia en la absorción de fósforo sólo fue significativamente superada por el inóculo con *Acaulospora appendicula*. La inoculación con esta cepa produjo a los

120 días una infección del 95%; aumentó la cantidad de follaje, al incrementar en 24% ($p<0.01$) el rendimiento de la parte aérea y mejoró la calidad, al incrementar 65% ($p<0.01$) la cantidad de fósforo absorbido por la alfalfa.

De acuerdo con los anteriores resultados se recomienda utilizar la cepa de hongo MA *Acaulospora appendicula* para la infección de la alfalfa en el Andisol de la serie Bermeo de la Sabana de Bogotá. Adicionalmente, los resultados indican que la población rizobial nativa no mostró infectividad en la alfalfa, por lo tanto, es indispensable inocular con cepas efectivas y resistentes a la acidez del suelo empleado en este trabajo.

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 los doctores Norman Schenk de la Universidad de Florida por su asesoría en la identificación taxonómica y a 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. In: *VA Mycorrhiza*. Powell, C. y Bagyaraj, D. Eds. Boca Ratón, Florida. CRC Press, Inc.113-130.
- AMBLER, J. y YOUNG, J. 1977. Techniques for determining root length infected by vesicular arbuscular mycorrhizae. *Soil Sci Soc Am J* 41: 551-555.

- 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 N₂-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.
- BAREA, J.; ESCUDERO, J. y AZCON-AGUILAR, C. 1980. Effect of introduced and indigenous 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.
- BIERMANN, B. y LIDERMAN, R. 1981. Quantifying vesicular arbuscular mycorrhizae: a proposed method towards standardization. *New Phytol* 87: 63-67.
- BOUTON, J.; SUMMER, M. y GIDDENS, J. 1981. Alfalfa, *Medicago sativa* L., in highly weathered, acid soils. II. Yield and acetylene reduction of a plant germplasm and *Rhizobium meliloti* inoculum selected for tolerance to acid soil. *Plant and Soil* 60: 205-211.
- CHAPMAN, H. 1966. *Diagnostic criteria for plants and soil*. Ed. Chapman, H. Berkeley. University of California. Div of Agric Sci 793 pág.
- FOGG, D. y WILLKINSON, N. 1958. Colorimetric determination of phosphorus. *Analist* 83: 406-414.00000000000000
- Fortin, J.; BÉCARD, G.; DECLERCK, S.; DALPÉ, Y.; ST-ARNAUD, M., COUGHLAN, A. y PICHÉ, Y. 2002. Arbuscular mycorrhiza on root-organ cultures. *Can J Bot* 80: 1-20.
- GONZÁLEZ, P. 1987. Abadía y Jiménez, Ltda. Comunicación personal.
- GREEN, N.; SMITH, M.; BEAVIS, W. y ALDON, E. 1983. Influence of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi on the nodulation and growth of subclover. *J Range Management* 86 (5): 576-578.
- HAYMAN, D., BAREA, J. y AZCON, R. 1976. Vesicular arbuscular mycorrhiza in Southern Spain: its distribution in cross growing in soil of different fertility. *Phytopathol Med* 15 (1): 1-6.
- HORNER, E. y RUELKE, O. 1982. Florida 77. Alfalfa and recommended management practices for this production. 5 págs.
- KOIDE, R. y MOSSE, B. 2004. A history of research on arbuscular mycorrhiza. *Mycorrhiza* 14: 145-163.
- 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.
- MAHONEY, G., JONES, H. y HUNTER, J. 1981. Effect of line on lucerne in relation to soil acidity factors. Proceeding of the XIV International Grassland Congress. June 15-24. Lexington, Kentucky, USA 299-302.
- MOSQUERA, I.; GONZÁLEZ, N. y YUNDA, A. 1986. Efectos de la micorrización sobre la fijación biológica de nitrógeno de trébol blanco (*Trifolium repens* L.) en un andisol de la Sabana de Bogotá. *Suelos Ecuatoriales*. 16(1): 130-134.
- NICOLSON, T. 1975. Evolution of vesicular arbuscular mycorrhizas. In: *Endomycorrhizas*. Ed. Sanders, F. Academic Press. London, 25-33.
- OLARTE, L. y MUÑOZ, B. 1979. Métodos analíticos de laboratorio de suelos.

- Instituto Geográfico Agustín Codazzi, IGAC. Bogotá, Colombia.
- 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.
- POWELL, C. y BAYARAJ, D. 1985. VA mycorrhizae: why all the interest? In: *VA mycorrhiza*. Powell, C. y Bayaraj, D. Eds. Boca Raton, Florida. CRC Press Inc. 1.
- POWELL, C. y DANIEL, J. 1978a. Growth of white clover in undisturbed soils after inoculation with efficient mycorrhizal fungi. *N Z J of Agric Res* 21: 675-681.
- POWELL, C. y DANIEL, J. 1978b. Mycorrhizal fungi stimulate uptake of soluble and insoluble phosphate fertilizer from a phosphate deficient soil. *New Phytol* 80: 351-358.
- RONCADORI, R. y HUSSEY, R. 1982. Mycorrhizae in interactions with other microorganism. In: *Methods and principles of mycorrhizal research*. N. Schenk, Ed. University of Florida 218-219.
- SAIF, S. 1977. The influence of stage of host development on vesicular arbuscular mycorrhizae and endogonaceus spore population in field grown vegetable crops. I. Summer grown crops. *New Phytol* 79: 341-348.
- SAIF, S. 1984. Interacción de *Rhizobium*-micorrizas VA en leguminosas tropicales. En: *Investigaciones sobre micorrizas en Colombia*. E. Sieverding Ed. Universidad Nacional. Facultad de Ciencias Agronomicas. Palmira, Valle 15-43.
- SCHENK, N. y HINSON, K. 1973. Response of nodulating and non-nodulating soybeans to a species of endogone mycorrhiza. *Agronomy J* 65: 849-850.
- 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. En: *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, H. 1979. Comparison of methods to extract spores of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Sci Soc Amer J* 43: 722-725.
- TINKER, P. 1978. Effects of vesicular arbuscular mycorrhizas on plant nutrition and plant growth. *Physiol Veg* 16 (4): 743-751.
- 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*. Tesis de pregrado. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., 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: 23.05.2005

Aceptado: 14.03.2006