

Identificación de algunas cepas de hongos micorrícicos asociados al kikuyo (*Cenchrus clandestinus* (Hochst ex Chiov) Morrone) y su efecto en algunas variables agronómicas

A Ortiz Acevedo, M Medina Sierra y J Echeverri Gómez

Grupo de Investigación en Ciencias Agrarias (GRICA), Escuela de Producción Agropecuaria, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, Calle 70 No. 52-21, Medellín, Colombia.

alejo0619@gmail.com

Resumen

Se evaluó el efecto de la asociación de dos hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) asociados naturalmente al pasto kikuyo (nativo 1 y nativo 2) y una cepa de hongos introducida (*Rhizophagus manihotis*) bajo diferentes niveles de fertilización. Las especies nativas fueron identificadas mediante las claves taxonómicas descritas por el “International Culture Collection of Arbuscular Mycorrhizal Fungi”. Los niveles de nitrógeno utilizados fueron 0, 100, 200 y 400 kg/ha/año y los niveles de fósforo fueron 0, 50, 100 y 200 kg/ha/año respectivamente. Los tratamientos evaluados fueron sin micorrizas, con HFMA nativo 1, con HFMA nativo 2 y con *Rhizophagus manihotis*. Se evaluaron las variables de producción de materia seca, relación tallo hoja y altura de la planta en tres cortes. Para evaluar las variables se utilizó un diseño experimental aleatorizado mediante un arreglo factorial (4x4x4).

En este trabajo se encontraron dos especies nativas de HFMA (*Rhizophagus intrarradices* y *Rhizophagus fasciculatus*) en potreros de pasto kikuyo de algunas provincias de Antioquia, Colombia. Se encontró un efecto significativo ($P < 0,05$) en las variables de altura de la planta y producción de materia seca cuando se conjugaron todos los niveles de N, P y HFMA. Para la variable agronómica relación hoja/tallo hubo un efecto significativo en todos los tratamientos. Sin embargo, mediante un análisis canónico discriminativo se encontró que los tratamientos que involucran dosis intermedias de N y P (100 y 50 kg/ha/año, respectivamente), y el HFMA *R. fasciculatus*, no son necesarios para mejorar las variables de crecimiento evaluadas. El empleo de las cepas *R. intrarradices* y *R. manihotis* junto con una buena nutrición vegetal, es útil para mejorar algunas

variables agronómicas en el pasto kikuyo. Una buena nutrición vegetal debe contemplar los niveles de N y P.

Palabras clave: altura de planta, fósforo, nitrógeno, relación hoja:tallo

Identification of some strains of mycorrhizal fungi associated with Kikuyu (*Cenchrus clandestinus* (Hochst ex Chiov) Morrone) and its effect on some agronomic variables

Abstract

The effect of an introduced strain of fungus (*Rhizophagus manihotis*) and two arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) naturally associated with Kikuyu grass (native 1 and 2) was evaluated under different fertilization levels. The native species were identified using taxonomic keys described by the International Culture Collection of Arbuscular Mycorrhizal Fungi. Nitrogen levels used were 0, 100, 200, and 400 kg/ha and phosphorus levels were 0, 50, 100, and 200 kg/ha/year, respectively. A total of four treatments were evaluated. Treatments were a control without any AMF, and three treatments including either AMF native 1, native 2, and *Rhizophagus manihotis*. Dry matter production, leaf: stem ratio, and plant height response variables were evaluated during three cuts of the kikuyu grass. Variables were analyzed using a randomized experimental design with a factorial arrangement (4x4x4).

In this study, two native species of AMF (*Rhizophagus intrarradices* and *Rhizophagus fasciculatus*) were found in kikuyu pastures of some provinces of Antioquia, Colombia. Plant height and dry matter production variables showed a significant effect ($P < 0.05$) when all levels of N, P, and AMF were evaluated together. The agronomic variable leaf: stem ratio had a significant effect on all treatments. However, when a discriminative canonical analysis was performed it was found that treatments involving intermediate doses of N and P (100 and 50 kg/ha/year, respectively) and including *R. fasciculatus* were not required to improve evaluated growth variables. The use of *R. intrarradices* and *R. manihotis* strains accompanied with a good plant nutrition, it is useful to improve some agronomic variables in the kikuyu grass. A proper plant nutrition should take into account the levels of N and P.

Keywords: leaf:stem ratio, nitrogen, phosphorus, plant height

Introducción

La rizosfera es el volumen de suelo que se encuentra bajo la influencia de la raíz de la planta (Hiltner 1904). Esta porción del suelo se caracteriza por presentar una elevada población de microorganismos los cuales contribuyen a la entrega de nutrientes necesarios para el crecimiento y desarrollo de la planta y esta a su vez produce exudados fotosintéticos que sirven como fuente de alimento para estas poblaciones de microorganismos (Burdman et al 2000). Los microorganismos presentes en la rizosfera pueden representar para la planta algún tipo de beneficio, daño o incluso puede influir significativamente en el crecimiento y desarrollo de la planta (Adesemoye y Kloepper 2009; Ahmad et al 2011; Lau y Lennon 2011). Algunos de los microorganismos que colonizan la raíz y que se encuentran en la rizosfera son los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) los cuales mejoran el crecimiento y desarrollo de la planta mediante la translocación de nutrientes de las zonas donde las raíces de la planta no los pueden tomar (Gray y Smith 2005). El pasto kikuyo (*Cenchrus clandestinus* (Hochst. ex Chiov) Morrone) es la gramínea perenne más común y mejor adaptada a zonas de clima frío en Colombia (Estrada 2001). Esta gramínea juega un papel importante en la alimentación animal, debido a que es una especie de una alta tasa de incremento de biomasa, presenta un sistema radicular bien desarrollado y buenas propiedades nutritivas dentro de las que se destacan el alto contenido de proteína de alta digestibilidad y contenido de fibra (Butler y Bailey 1973; Marais 2001). Este pasto tiene una oferta forrajera elevada favorecida por la fertilización, lo cual mejora el consumo de materia seca y por tanto, la producción de leche de las vaca (Carulla et al 2004; Bargo et al 2003) en las zonas de trópico alto de Colombia donde se encuentra establecido. Sin embargo, el tipo de fertilizante y las características del suelo limitan la absorción de nutrientes y la calidad de forraje (Correa et al 2008), por tanto, es de vital importancia el conocimiento de los microorganismos que se asocian con el pasto kikuyo, los cuales favorecen la toma de nutrientes, el desarrollo y crecimiento del pasto, mediante una disminución de los niveles de aplicación de fertilizantes químicos. El objetivo de este estudio fue identificar algunos HFMA asociados a praderas de kikuyo en algunos municipios de la región alta de Antioquia, Colombia y evaluar como es el rendimiento a través de algunas variables agronómicas de los HFMA con diferentes aplicaciones de fertilizantes nitrogenados y fosfóricos.

Materiales y métodos

Sitio de estudio

El experimento se desarrolló bajo condiciones de casa malla en el corregimiento de San Cristóbal municipio, Medellín, Colombia a una altura 1.860 msnm, con una temperatura promedio de 21°C, la precipitación promedia anual de 1.575 mm y coordenadas (N: 06°16.913´ W: 075° 37.62´).

Muestreo de suelos

Se seleccionaron muestras de suelo y pasto de cuatro zonas representativas por la producción de leche bajo pasto kikuyo en los municipios de San Pedro de los Milagros, Entreríos, Santa Rosa de Osos y La Unión departamento de Antioquia Colombia. De la muestra se extrajo el suelo rizosférico para la identificación de las esporas de los HFMA, tomando los primeros 20 cm de suelo donde se encuentra la mayor parte de los microorganismos del suelo que forman algún tipo de simbiosis con las raíces de la planta (Barea et al 2005; Chopra et al 2007). Con el fin de evitar errores en las esporas seleccionadas como nativas de estos suelos, la muestra se tomó de lotes que no estuvieron bajo ningún manejo agronómico, cercanos a bosques y donde el pasto kikuyo mostró un buen crecimiento. Cada muestra fue de 5 kg de suelo de cada uno de los sitios de muestreo (tres fincas por municipio), estas fueron llevadas al laboratorio de suelos en la Universidad Nacional sede Medellín y al laboratorio de pastos y forrajes de la Universidad de Antioquia para el análisis de suelos y la extracción de los HFMA, respectivamente.

Extracción de cepas de hongos formadores de micorrizas arbusculares del suelo

Para la extracción de las micorrizas se empleó el suelo rizosférico (Dodd y Thomson 1994). Cantidades de 100 a 200 g de suelo seco se pasaron a través de un tamiz de dos mm y luego fueron transferidas a un “beaker” con un litro de agua destilada para humedecerlas durante 30 minutos antes de extraer las esporas; la muestra con agua se agitó durante una hora, con la finalidad de liberar las esporas en los agregados del suelo (Habte y Osorio 2001). La suspensión de suelo se pasó sobre una serie de tamices de las siguientes dimensiones (120, 106, 80, 63 y 53 µm), agrupados en pila de mayor a menor malla de arriba hacia abajo, quedando en la parte inferior el tamiz más fino; el material que quedó en cada uno de los tamices se transfirió a tubos falcon, llenando el restante del tubo con agua de grifo; las muestras se centrifugaron por tres minutos a 2000 rpm. Las esporas se sedimentan en el fondo del tubo, el material restante queda en suspensión; este material que es el sobrenadante se eliminó y luego se agregó una solución del 50% de sacarosa, y se centrifugó nuevamente a 2000 rpm durante tres minutos. De esta manera, las esporas quedaron en el sobrenadante y algunas esporas en suspensión y para separarlas de la solución se pasaron por papel filtro, luego se lavaron con agua destilada para eliminar la sacarosa. Finalmente se

almacenaron en tubos de ensayo con agua destilada durante 24 horas con la finalidad de superar el choque osmótico (INVAM 2015).

Separación de morfotipos nativos

En el paso siguiente las esporas fueron transferidas a cajas de Petri para después visualizarlas en estereomicroscopio, allí fueron separadas morfológicamente usando los siguientes criterios: tamaño de la espora, color, textura de la superficie, configuración de la pared de la espora y anatomía de la espora (Sylvia 1999). Luego de agrupar los morfotipos por las características comunes, se procedió a su multiplicación para posterior identificación mediante la metodología propuesta por el “The International Culture Collection of Arbuscular and Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi” (INVAM 2015) y el European Bank of Glomales (BEG 2015).

Tinción de raíces y determinación del porcentaje de colonización

El método utilizado para este procedimiento fue el propuesto por Phillips y Hayman (1970) and Sieverding (1984), el cual requiere el montaje de raíces teñidas en portaobjetos para ser evaluadas en microscopio óptico. La tinción de raíces se realizó a través de los siguientes pasos: a) clareo, b) blanqueo, c) acidificación, d) tinción y e) decoloración. El porcentaje de colonización se midió a partir de 10 fragmentos de aproximadamente 1 cm de longitud de raíz teñida, seleccionados al azar; se registró la presencia de estructuras propias de HFMA por cada campo óptico de observación microscópica, con un aumento equivalente a 400X. La tinción de raíces se realizó en el laboratorio de pastos y forrajes de la Universidad de Antioquia, a través del siguiente protocolo:

1. Las raíces se fraccionaron en trozos de aproximadamente dos o un cm de longitud (se utilizaron las raíces delgadas y medianamente gruesas).
2. En un beaker se colocaron por lo menos 25 secciones de raíces por cada muestra y se lavaron con agua corriente hasta sacar todo el suelo adherido.
3. Las raíces se cubrieron con AFA (Alcohol 70% (90ml) formol al 37% (5ml) Ácido acético glacial (5ml) durante 10 minutos y luego se lavaron dos veces con agua corriente.
4. Las raíces de kikuyo se colocaron en una solución de KOH al 10%, las cuales se calentaron al baño de maría por 5-20 minutos antes de llevarlas al autoclave para decolorarlas (extracción de taninos). Se estableció un tiempo de 6 minutos para raíces de este pasto.

5. Se dejó enfriar y se lavó dos veces con agua destilada.
6. Se agregó HCl al 1% y se dejó por 5 minutos (para neutralizar el efecto de la base).
7. Las raíces se lavaron dos veces con agua corriente, y luego se les adicionó azul de tripán al 0,050%, dejándolo actuar de 4- 8 horas.
8. Para el proceso de decoloración de las raíces se les adicionó lactoglicerol dejando actuar por varias horas.

El porcentaje de colonización se determinó a partir de la siguiente fórmula:

El número mínimo de intersecciones observadas fue de 100 (Giovannetti and Mosse 1980).

Multiplicación de cepas

Se usó como medio de cultivo para la esporulación el kikuyo (*Cenchrus clandestinus* (Hochst ex Chiov) Morrone), con el objetivo de que se multiplicaran las esporas de los HFMA que formaron simbiosis con este pasto. El sustrato que se usó fue una mezcla entre cuarzo, vermiculita y caolinita en proporción 2:1:0,5 respectivamente desinfectada en autoclave (Molina 2008) a 120 °C durante 15 minutos. La multiplicación de las esporas se realizó en potes plásticos con orificios en la parte inferior para permitir la salida de agua (Habte y Osorio 2001). El pasto se dejó crecer durante ocho semanas (Knapp et al 2012); cada pote fue fertilizado con 80 ppm de P usando como fuente roca fosfórica; luego de la 8 semana se disminuyó la aplicación de agua hasta dejar el suelo con un contenido de humedad alrededor del 5% o menos; después la planta se cortó dejando solamente el suelo con las esporas de los HFMA y raíces de la planta (Habte y Osorio 2001).

Pasto kikuyo

Se obtuvo semilla sexual de pasto kikuyo maduro de los lotes de las fincas donde se seleccionaron las muestras de suelo; estas semillas se usaron para multiplicar las esporas de los HFMA y para montar el ensayo objetivo del estudio. La siembra se realizó en potes plásticos de dimensiones de 16 cm de alto x 8 cm de diámetro, previamente esterilizados en autoclave a 120°C durante 15 minutos, los cuales contenían suelo tomado de los diferentes municipios, donde se colocaron 5

semillas sexuales de pasto kikuyo y cuatro gramos de inoculó de cada una las cepas de los hongos que hacen parte del estudio con las dosis de fertilizante según los tratamientos.

Fertilización nitrogenada, fosfórica y HFMA

Para la fertilización nitrogenada de 100% se empleó la máxima dosis reportada por Dianelis et al (1994) de 400 kg N/ha/año o 50 kg N/ha/año/corte en pasto kikuyo, usando como fuente urea grado (4600); el 100% de la dosis del fertilizante fosfórico fue 200 kg P/ha/año o 25 kg P/ha/corte (Dianelis et al 1994), usando como fuente roca fosfórica (31,59% P₂O₅ y 39,34% CaO. Se ajustó la dosis de cada elemento por hectárea al área de cada unidad experimental, cada elemento se aplicó 10 días posteriores a la siembra y después de cada corte. Los HFMA empleados fueron nativo 1 (*Rhizophagus intrarradices*), nativo 2 (*Rhizophagus fasciculatus*) y la cepa conocida (*Rhizophagus manihotis*).

El pasto se estableció en suelo extraído de los diferentes predios establecidos en pasto kikuyo, el cual fue esterilizado en autoclave a 120 °C durante 15 minutos. Este suelo se caracterizó por presentar un bajo pH, alta cantidad de Al, baja cantidad de Ca y P (Tabla 1), antes del establecimiento del pasto en este suelo se le aplicó a cada pote cal dolomita a razón de 2000 kg/ha.

Cada 35 días cuando se la cuarta y quinta hojas estaban bien desarrolladas, el pasto se cosechó a una altura de 10 cm (Mendo et al 2000; Chopra et al 2007; Swanepoel et al 2013).

Tabla 1. Propiedades físico químicas básicas del suelo usado para el ensayo

Parámetro	Unidad	Valor
Arena	g/kg	68
Limo	g/kg	10
Arcilla	g/kg	22
Clase		FArA
pH		4,5
Materia Orgánica	g/kg	14
Al	cmolc/kg/suelo	1,6
Ca	cmolc/kg/suelo	0,57
Mg	cmolc/kg/suelo	0,25
K	cmolc/kg/suelo	0,22
P	mg/kg	5
S	mg/kg	3
Fe	mg/kg	576
Mn	mg/kg	5
Cu	mg/kg	1
Zn	mg/kg	3
B	mg/kg	0,61
N-NO ₃	mg/kg	55
N-NO ₄	mg/kg	43

Variables y procedimiento

En el pasto se determinó el porcentaje de materia seca según (AOAC, 1990) y producción de este por medio de aforos de cada uno de los potes (Estrada, 2001), la altura de la planta (alt 1, alt 2, alt 3, alt 4, alt 5, alt 6), esta se midió en centímetros, seleccionando tres plantas y midiéndolas con una regla de centímetros desde suelo hasta el punto más alto de la hoja bandera cada 15 días (Toledo, 1982) y la relación hojas/tallos (RHT1, RHT 2), que se determinó separando el material de hojas y tallos cortado en cada pote cada 35 días, depositando cada componente en su respectiva bolsa de papel con su información (tallos u hojas, muestra N°, tratamiento y repetición) y pesándolo en verde.

Diseño experimental

Se empleó un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial (4x4x4) con medidas repetidas en el tiempo. Los factores evaluados fueron fertilización fosfórica (0%, 25%, 50%,100%); fertilización nitrogenada (0%, 25%, 50%,100%) y hongos micorrícicos (sin micorrizas, dos cepas de hongos nativas y una cepa de hongo conocida), para un total 64 tratamientos con cinco repeticiones por tratamiento. Las unidades experimentales consistieron en potes de plástico de dimensiones de 16 cm de alto x 8 cm de diámetro, en los cuales se estableció pasto kikuyo (*Chenchrus clandestinum* (Hochst. ex Chiov.) Morrone) obtenido a partir de semilla sexual de los predios en los cuales fueron tomadas las muestras de suelo. Cada unidad experimental tuvo como sustrato para el crecimiento del pasto suelo esterilizado de las zonas donde se buscaron las esporas nativas.

Se evaluaron las variables producción de materia seca, y variables de crecimiento, como relación hojas/tallos, altura de las plantas en cada corte. Se incorporó la técnica MANOVA con contraste canónico ortogonal determinando vía máxima verosimilitud para la comparación del efecto de los tratamientos.

Modelo estadístico

El modelo estadístico que describió las variables de respuesta fue:

Donde

Y_{ijkl} = Variable de respuesta (producción de materia seca, relación hoja tallo o altura de la planta en el pasto kikuyo) en la l-ésima observación correspondiente al efecto i-ésimo nivel del fósforo, j-ésimo nivel de nitrógeno y k-ésimo categoría de hongos formadores de micorrizas

U= Media poblacional

Pi= i-ésima observación del efecto del fósforo

Nj= j-ésima observación del efecto del nitrógeno

HMFAk = k-ésima observación del efecto de los hongos formadores de micorrizas

P*Nij: efecto de la ij-ésima interacción de fósforo y nitrógeno

P*HFMAik = efecto de la ik-esima interacción de fósforo con los hongos formadores de micorrizas

N*HFMAjk = efecto de jk-esima interacción del nitrógeno con los hongos formadores de micorrizas

P*N*HFMAijk = efecto de la interacción de fósforo, nitrógeno y los hongos formadores de micorrizas

e(ijkl)= Error experimental

Resultados

Densidad de esporas en diferentes suelos establecidos en pasto kikuyo

Se seleccionaron tres lotes establecidos en pasto kikuyo en cuatro municipios localizados en trópico de altura en Antioquia, Colombia. En la determinación de la densidad de esporas se obtuvo promedios entre 74 y 87 esporas/100 g de suelo y porcentajes promedios de colonización de 34% y 45%. El municipio donde se encontró mayor número de espora fue Santa rosa de Osos y en el que se halló mayor porcentaje de colonización fue Entrerríos (Tabla 2).

Tabla 2. Número de esporas y porcentaje de colonización hallados en diferentes municipios establecidos en pasto kikuyo

Municipio	Esporas^a	Colonización^b
San Pedro de los Milagros	73.7 ± 10.7	37.7 % ± 11.5
Entrerríos	78.8 ± 20.5	45.0 % ± 4.7
Santa Rosa de Osos	87.0 ± 13.5	36.9 % ± 15.0
La Unión	79.0 ± 13.6	33.8 % ± 13.6

^a Número de esporas en 100 gramos de suelo

^b Porcentaje de colonización (Giovannetti and Mosse 1980).

Identificación de esporas

Se analizaron las características de las esporas nativas encontradas en los diferentes suelos establecidos en pasto kikuyo y se compararon con las descritas en el INVAM (*International Culture Collection of Arbuscular Mycorrhizal Fungi*) y el BEG (*The International Bank of Glomeromycota*). Para este estudio se seleccionaron las dos especies que fueron más comunes en diferentes suelos, las características de las especies nativa 1 y nativa 2 se describen en la Figuras 1 y 2, respectivamente.

Figura 1. Espora nativa 1

Imagen 2(a). Espora que se observó de color amarillo marrón en un aumento de 40x, de forma globosa, subglobosa, se presentó con mayor distribución en los tamices de 80 μm . Estas esporas presentan tres paredes L1, L2 y L3, las cuales a medida que la espora aumenta la edad estas se van degradando y adquiriendo un aspecto granular y un poco irregular como la que se observa en la imagen. Imagen 2(b). En las células corticales de la raíz de plantas como gramíneas y leguminosas se forma una mancha oscura al realizar tinción con azul de tripán, las cuales son vesículas o esporas (1), que se forman cerca al punto de entrada de las hifas a estas células. Características que permiten clasificar la especie como *Rhizophagus intraradices* (INVAM 2015; BEG 2015; Schenck y Sm 1982).

Figura 2. Espora nativa 2 en aumento de 40x 3(a)

Esporas caracterizadas por su variación de color amarillo pálido a amarillo pálido marrón, tamaño distribuido en mayor número entre 83 y 110 μm , con forma globosa a subglobosa. Imagen 3(b). Espora con tres paredes L1, L2 y L3. La pared L1 es delgada y está en contacto con el ambiente que rodea la espora, L2 es de color amarillo pálido en Polyvinyl alcohol Lactic acid glicerol (PVLG), estas dos paredes son claramente definidas y la pared L3 es una capa delgada y flexible, imagen que también deja ver claramente la hifa formando un tabique a partir de la pared L1. Las anteriores características son similares a las reportadas por (INVAM, 2015), que permiten describir la especie como *Rhizophagus fasciculatus* (INVAM 2015; BEG 2015; Blaszkowski et al 2002).

Altura de la planta y relación hoja/tallo

La altura de la planta tuvo diferencias altamente significativas ($P < 0,01$), para los tratamientos en los que se combinaron los niveles de N, P y HFMA cuando se

determinó la altura 6 (alt 6) (Tabla 3), para la relación hoja/tallo no hubo diferencias significativas ($P>0,05$) en la primera medida RHT1, pero fue altamente significativa ($P<0,01$) para la segunda medida de relación hoja tallo RHT2; en todos los tratamientos, excepto los tratamientos con el efecto simple del P, donde esta variable fue significativa ($P<0,05$). De acuerdo con los coeficientes de correlación parcial para las variables dependientes en estudio (Tabla 4), no existió correlación ($P>0,05$) entre las variables alt 5, alt 6, RHT1, RHT2, MS y Toneladas de MS/ha. Por tanto, estas son las medidas que se tienen en cuenta para el análisis de las variables dependientes altura de la planta y relación hoja/tallo.

Tabla 3. Cuadrados medio para cada una de las variables agronómicas determinadas en pasto kikuyo

Fuente de variación	DF	Type III SS	CM alt 1	CM alt 2	CM alt 3	CM alt 4	CM alt 5	CM alt 6	CM RHT 1	CM RHT 2	CM % MST	CM TonMSxha
N	3	7.5	2.5**	2.9	5.4	11.6	17.8**	2.8	0,3	21.5**	73.4**	3.1**
P	4	5.7	1.0*	18.0**	11.9	29.9	8.0	23.7	0.4	3.8*	15.6**	2.9**
N*P	9	10.7	1.2*	2.8	9.8	21.1	5.7	20.9	0.9	19.5**	15.7**	2.5**
HFMA	3	9.2	3.1**	16.9**	183.4**	312.48**	7.1	45.7	1,0	7.9**	5.3*	0.4*
N*HFMA	9	28.0	3.2*	10.8**	11.0	16.2	8.9*	27.0*	0.8	4.0**	9.0**	0.5**
P*HFMA	9	7.1	0.8	5.9*	13.5*	31.3*	11.9**	12.7	0.9	10.3**	6.5**	0.3**
N*P*HFMA	26	23.8	0.9*	3.6	8.1	11.9	4.9	23.0**	0.7	10.3**	1.9	0.5**

* Diferencias significativas ($P<0,05$), ** Diferencias altamente significativas ($P>0,01$), CM: cuadrado medio, alt: altura de la planta en centímetros (cm).

Tabla 4. Coeficiente de correlación para el error de las variables dependientes altura de la planta, relación hoja tallo y producción de materia seca.

	alt 1	alt 2	alt 3	alt 4	alt 5	alt 6	RHT 1	RHT 2	% MS	TonMSx ha
alt 1	1	0.7**	0.4**	0.3**	0	0.1	0.1	0.1**	0.1	0.1
alt 2	0.7**	1	0.5**	0.5**	0	0	0.1	0.2	0.1	0.1
alt 3	0.4**	0.5**	1	1**	0.1	0.1	0	0.2	0	0.1
alt 4	0.3	0.5**	1**	1	0.2	0.1	0	0.2*	0	0.1
alt 5	0	0	0	0.2	1	0.3	0	0.1	0.1	0.3
alt 6	0.1	0	0.1	0	0.3**	1	0.1	0.1	0.1	0.2
RTH 1	0.1	0	0	0	0	0.1	1	0.1	0.1	0.1
RTH 2	0.1	0.2	0.2*	0.2*	0.1	0.1	0.1	1	0.1	0.1*
% MS	0.1	0.1	0	0.1	0	0.1	0.1	0.1	1	0
Ton MS/ha	0.1	0.1	0.1	0.1	0	0	0.1	0.2*	0.1	1

* Diferencias significativas ($P<0,05$), ** Diferencias altamente significativas ($P>0,01$). Alt: altura de la planta.

Análisis canónico discriminativo

A partir del análisis canónico discriminativo se predijo las correlaciones entre las variables dependientes de crecimiento y producción del pasto con los variables independientes niveles de N, P y HFMA (Figura 3); análisis que permitió seleccionar los mejores niveles de los tratamientos. De acuerdo a la interacción

múltiple de las tres variables independientes, los niveles de los tratamientos N 25%, P₂O₅ 25% y *Rhizophagus fasciculatus* no explicaron las variables de crecimiento y producción de pasto kikuyo en el estudio, cuando se compararon con los demás niveles de los tratamientos; además, los niveles de fertilización del 25% (100 kg N ha/año y 50 kg P₂O₅/ha/corte) no fueron los más comunes para la fertilización del pasto kikuyo (*Cenchrus clandestinum* Hochst ex Chiov) Morrone (Dianelis et al 1994). Para los niveles HFMA nativa 2 (*Rhizophagus fasciculatus*) no tuvo el mismo efecto en todas las interacciones con respecto al nivel de HFMA nativa 1 (*Rhizophagus intraradices*), por tanto, el nivel de nativa 2 del tratamiento HFMA no se tuvo en cuenta para el análisis de las variables de calidad del pasto.

Tratamiento (M-N-P): T1: 1-1-2 T2: 1-3-4 T3: 2-3-3 T4: 3-3-2 T5:4-2-3 T6:1-1-2 T7:1-4-1 T8:2-3-4 T9:3-3-4 T10:4-3-1 T11: 1-1-3 T12: 2-1-1 T13: 2-4-1 T14: 3-4-1 T15: 4-3-4 T16: 1-1-4 T17: 2-1-4 T18:2-4-2 T19: 3-4-3 T20: 4-4-1 T21: 1-2-1 T22:2-2-1 T23: 2-4-3 T24:4-1-1 T 25: 4-4-2 T26: 1-2-2 T27: 2-2-2 T28:2-4-4 T29: 4-1-2 T30:4-4-3 T31:1-2-3 T32: 2-2-3 T33:3-2-1 T34:4-1-1-3 T35: 4-4-4 T36:1-2-4 T37:2-2-4 T38: 3-2-2 T39:4-1-4 T40:1-3-1 T41: 2-3-1 T42:3-2-3 T43:4-2-1 T44: 1-3-2 T45:2-3-2 T46:3-3-1 T47: 4-2-2.

Figura 3. Mejores niveles según análisis canónico para el tratamiento de la interacción de todos los niveles de HFMA (M), nitrógeno (N) y fósforo (P₂O₅).

Niveles para M: 1- Sin HFMA, 2- Nativa 1, 3- Nativa 2, 4-HFMA conocido.

Niveles para N: 1- 0%, 2- 25%, 3 – 50%, 4- 100%

Niveles para P₂O₅: 1- 0%, 2 – 25%, 3 – 50%, 4 – 100%

Altura de la planta

Las medidas de altura 2 y 6 explicaron la variable altura de la planta (P< 0,05); para ambas alturas se determinó su relación para encontrar los mejores niveles de tratamientos (Figura 4).

Tratamiento (M-N-P): T1: 1-1-1 T2: 1-3-4 T3: 2-3-3 T4: 3-3-2 T5:4-2-3 T6:1-1-2 T7:1-4-1 T8:2-3-4 T9:3-3-4 T10:4-3-1 T11: 1-1-3 T12: 2-1-1 T13: 2-4-1 T14: 3-4-1 T15: 4-3-4 T16: 1-1-4 T17: 2-1-4 T18:2-4-2 T19: 3-4-3 T20: 4-4-1 T21: 1-2-1 T22:2-2-1 T23: 2-4-3 T24:4-1-1 T 25: 4-4-2 T26: 1-2-2 T27: 2-2-2 T28:2-4-4 T29: 4-1-2 T30:4-4-3 T31:1-2-3 T32: 2-2-3 T33:3-2-1 T34:4-1-1-3 T35: 4-4-4 T36:1-2-4 T37:2-2-4 T38: 3-2-2 T39:4-1-4 T40:1-3-1 T41: 2-3-1 T42:3-2-3 T43:4-2-1 T44: 1-3-2 T45:2-3-2 T46:3-3-1 T47: 4-2-2.

Figura 4. Mejores niveles para la interacción de todos los niveles de tratamientos HFMA (M), nitrógeno (N) y fósforo (P₂O₅). En las variables dependientes altura 2 (Alt 2) y altura 6 (Alt 6), en círculo rojo los tratamientos con mejores medidas en ambas variables.

Niveles para M: 1- Sin HFMA, 2- Nativa 1, 3- Nativa 2, 4-HFMA conocido.

Niveles para N: 1- 0%, 2- 25%, 3 – 50%, 4- 100%

Niveles para P₂O₅: 1- 0%, 2 – 25%, 3 – 50%, 4 – 100%

Relación hoja/tallo y producción de materia seca

Se comparó la relación hoja/tallo con la producción de materia seca (MS), la RHT 1 versus la producción de MS/ha/año (Figura 5) y la RHT 2 con el contenido de MS (Figura 6); fueron las relaciones que permitieron observar los mejores niveles de los tratamientos para las variables de crecimiento y producción del pasto kikuyo en estudio.

Tratamiento (M-N-P): T1: 1-1-1 T2: 1-3-4 T3: 2-3-3 T4: 3-3-2 T5:4-2-3 T6:1-1-2 T7:1-4-1 T8:2-3-4 T9:3-3-4 T10:4-3-1 T11: 1-1-3 T12: 2-1-1 T13: 2-4-1 T14: 3-4-1 T15: 4-3-4 T16: 1-1-4 T17: 2-1-4 T18:2-4-2 T19: 3-4-3 T20: 4-4-1 T21: 1-2-1 T22:2-2-1 T23: 2-4-3 T24:4-1-1 T 25: 4-4-2 T26: 1-2-2 T27: 2-2-2 T28:2-4-4 T29: 4-1-2 T30:4-4-3 T31:1-2-3 T32: 2-2-3 T33:3-2-1 T34:4-1-1-3 T35: 4-4-4 T36:1-2-4 T37:2-2-4 T38: 3-2-2 T39:4-1-4 T40:1-3-1 T41: 2-3-1 T42:3-2-3 T43:4-2-1 T44: 1-3-2 T45:2-3-2 T46:3-3-1 T47: 4-2-2.

Figura 5. Mejores niveles para la interacción de todos los niveles de tratamientos HFMA (M), nitrógeno (N) y fósforo (P_2O_5). En las variables dependientes relación hoja/tallo 2 (RHT2) y materia seca del pasto (MS), en círculo rojo los tratamientos con mejores medidas en ambas variables.

Niveles para M: 1- Sin HFMA, 2- Nativa 1, 3- Nativa 2, 4-HFMA conocido.

Niveles para N: 1- 0%, 2- 25%, 3 – 50%, 4- 100%

Niveles para P_2O_5 : 1- 0%, 2 – 25%, 3 – 50%, 4 – 100%

Tratamiento (M-N-P): T1: 1-1-1 T2: 1-3-4 T3: 2-3-3 T4: 3-3-2 T5:4-2-3 T6:1-1-2 T7:1-4-1 T8:2-3-4 T9:3-3-4 T10:4-3-1 T11: 1-1-3 T12: 2-1-1 T13: 2-4-1 T14: 3-4-1 T15: 4-3-4 T16: 1-1-4 T17: 2-1-4 T18:2-4-2 T19: 3-4-3 T20: 4-4-1 T21: 1-2-1 T22:2-2-1 T23: 2-4-3 T24:4-1-1 T 25: 4-4-2 T26: 1-2-2 T27: 2-2-2 T28:2-4-4 T29: 4-1-2 T30:4-4-3 T31:1-2-3 T32: 2-2-3 T33:3-2-1 T34:4-1-1-3 T35: 4-4-4 T36:1-2-4 T37:2-2-4 T38: 3-2-2 T39:4-1-4 T40:1-3-1 T41: 2-3-1 T42:3-2-3 T43:4-2-1 T44: 1-3-2 T45:2-3-2 T46:3-3-1 T47: 4-2-2.

Figura 6. Mejores niveles para la interacción de todos los niveles de tratamientos HFMA (M), nitrógeno (N) y fósforo (P_2O_5). En las variables dependientes relación hoja/tallo 1 (RHT1) y producción de materia seca del pasto (MS/ha), en círculo rojo los tratamientos con mejores medidas en ambas variables.

Niveles para M: 1- Sin HFMA, 2- Nativa 1, 3- Nativa 2, 4-HFMA conocido.

Niveles para N: 1- 0%, 2- 25%, 3 – 50%, 4- 100%

Niveles para P_2O_5 : 1- 0%, 2 – 25%, 3 – 50%, 4 – 100%

Discusión

Al evaluar algunas variables de crecimiento se encontró la importancia de combinar la fertilización nitrogenada y fosfórica con la presencia de algunos microorganismos del suelo como los HFMA. Nutrientes como el N y P son limitantes para el crecimiento de la planta (Vance et al 2000); sin embargo,

microorganismos como los HFMA además de movilizar P también movilizaron N, tal como lo indicaron estudios previos donde los HFMA podían movilizar hasta 32% de N disponible en la solución del suelo y entregarlo a la planta para todos sus procesos fisiológicos, entre ellos el crecimiento y desarrollo de estructuras vegetativas (Leigh et al 2009). Los resultados del estudio mostraron una baja producción de materia seca por unidad de área y un retraso en el crecimiento en la primera medida de relación hoja/tallo y la altura de la planta, pero una mejora en esta variable en los siguientes cortes. Lo anterior, es debido a que muchas plantas disminuyeron el crecimiento en la transición de no simbiosis a crecimiento de la planta con simbiosis (Li et al 2008; Grace et al 2009). Los HFMA pueden mejorar el crecimiento vegetal debido a que contribuyen a movilizar N y P, pero en algunos casos no lo hacen; incluso, pueden ocasionar una inhibición del crecimiento de la planta (Smith y Read 1997), efecto que se debe a la pérdida de carbono que sufre esta durante la simbiosis (Hart y Reader 2002). La disminución del crecimiento puede ser independiente del estado nutricional de la planta (Li et al 2006); sin embargo, el efecto de las tres variables independientes del estudio (HFMA, N y P) unidas afectaron significativamente el crecimiento de las plantas en las primeras medidas, lo cual se atribuyó a la transición de planta con simbiosis a planta sin simbiosis. En cuanto al efecto de la fertilización, algunos estudios han indicado un efecto significativo del crecimiento del pasto kikuyo cuando hay aplicaciones de fertilizantes que contienen N y P (Dianelis et al 1994; Beliuchenko y Febles 1980; Soto et al 1980; Silva et al 2010), lo que quiere decir que debe existir siempre la aplicación de fertilizantes químicos, si lo que se desea es tener una buena producción de pasto. Para la fertilización química en pasto kikuyo se debe tener en cuenta que algunos microorganismos contribuyen a que esta no tenga que ser tan elevada; dentro del estudio se encontraron especies de HFMA nativos asociados al pasto kikuyo como *Rhizophagus intraradices* y *Rhizophagus fasciculatus*, especies que tienen una amplia distribución mundial encontrándose en zonas cálidas, desérticas y hasta en climas tropicales (Blaszkowski et al 2002; Dalpé 1989; Talukdar y Germida 1993; Blaszkowski y Czerniawska 2006). *R. intraradices* es una especie de HFMA que se ha encontrado en la rizosfera de pastos familiares del pasto kikuyo como es mijo perla (*Pennisetum glaucum* (L) R. Br.) (Tidjane et al 1999). Ambas especies se pueden confundir fácilmente con especies como *Rhizophagus aggregatus*, por tanto, para una acertada clasificación de estas especies se requiere de pruebas moleculares (Schenck y Sm 1982). De acuerdo con los resultados obtenidos se evidenció que la inoculación de HFMA de la especie *Rhizophagus intraradices* aumentó la producción de biomasa, por tanto, afectó positivamente las variables de crecimiento del pasto. Resultados similares fueron los encontrados por Franco y Cano (2006) en el pasto buffel (*Cenchrus ciliaris* L.) cuando fue evaluado con *R. Intraradices*. Otros estudios

evaluaron *Rhizophagus fasciculatus* en la especie (*Pennisetum glaucum* (L) R. Br.) encontrando, que mejora significativamente la producción de materia seca y la absorción de nutrientes de esta planta (Mahesh et al 2010). Según los resultados reportados por otros autores dejan claro que cualquiera de las dos especies de HFMA halladas en el estudio pueden llegar a mejorar absorción de nutrientes, por tanto, el crecimiento de la planta, pero que no hay datos del efecto de los HFMA en variables de crecimiento y productividad del pasto kikuyo.

Conclusiones

- El manejo del pasto kikuyo fertilizado con niveles de nitrógeno de 0, 200 y 400 kg ha/año en combinación con niveles de P₂O₅ de 0, 100 y 200 kg P₂O₅ ha/año y HFMA *Rhizophagus intrarradices* aumentó significativamente en algunas variables agronómicas.
- La aplicación de HFMA puede optimizar la producción de pasto kikuyo bajo un modelo de manejo de fertilizantes químicos en bajas cantidades junto con la aplicación de fertilizantes orgánicos en lecherías de manejo intensivo del trópico alto.
- La identificación de la especie de HFMA asociada al pasto kikuyo en condiciones tropicales, requiere más estudios apoyados por la biología molecular; ya que la sola observación de las características morfológicas de las especies halladas, puede generar confusión con otras especies que también se presentan en suelos tropicales asociados a otros tipos de pasturas.

Referencias

AOAC 1990 Official methods of analysis. Association of official agricultural chemists, Washington, D.C. 1141 p.

Adesemoye O and Kloepper J 2009 Plant–microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. Applied Microbiology Biotechnology 85(1):1–12.

Ahmad M, Munir A, Shahzad S, Masood and Iqbal M 2011 Evaluation of bread wheat genotypes for salinity tolerance under saline field conditions. African Journal Biotechnology 10: 4086-4092.

Barea M, Azcón AC, Azcón R 2005 Mycorrhizal Fungi and Plant Growth Promoting Rhizobacteria. Plant Surface Microbiology. Volume 3, Article # 20. Retrieved March 20 2015 from http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-74051-3_20

Bargo F, Muller LD, Kolver Y and Delahoy J 2003 Invited Review: production and digestion of supplemented dairy cow on pasture. *Journal Dairy Science* 86 (1): 1 – 42.

BEG. Bank of European Glomales, Retrieved March 23 2015 from [http:// www.bio.ukc.ac.uk/beg](http://www.bio.ukc.ac.uk/beg).

Beliuchenko I y Febles G 1980 Factores que afectan la estructura de pastos puros de gramíneas. 2. Influencia de la relación hoja/tallo y el contenido químico de los tallos. *Revista Cubana de Ciencias Agrícolas* 14(1): 167-173.

Blaszkowski J, Adamska I and Czerniawska B 2002 Arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota) of the Vistula Bar. *Acta Mycology* 37 (1): 39-62.

Blaszkowski J and Czerniawska B 2006 The occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi of the phylum Glomeromycota in Israeli soils. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 75 (4): 339-350.

Burdman S, Jurkevitch E and Okon Y 2000 Recent advances in the use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in agriculture, in: *Microbial Interactions in Agriculture and Forestry*. N. S. Subba Rao and Y. R. Dommergues, eds., Science Publishers, Enfield USA, Volumen 2, pp 229-250.

Butler G and Bailey R 1973 Criteria for assessing the efficiency of the fermentation process. In: *Chemistry and Biochemistry of Herbage* (Ed. G. W. Butler and R. W. Bailey) 3: 33-80.

Carulla J E, Cárdenas E, Sánchez N y Riveros C 2004 Valor nutricional de los forrajes más usados en los sistemas de producción lechera especializada de la zona andina colombiana; En: *Eventos y Asesorías Agropecuarias EU* (editores), *Seminario Nacional de Lechería Especializada: “Bases Nutricionales y su Impacto en la Productividad”*. Medellín, 21 – 38 p.

Chopra B K Bhat S Mikheenko I P, Xu Z, Yang Y, Luo X, Chen H, Zwieten V L, McC R L and Zhang R 2007 The characteristics of rhizosphere microbes associated with plants in arsenic-contaminated soils from cattle dip sites. *Science of the Total Environment* 378: 331–342.

Correa J, Pabón M L y Carulla J E 2008 Valor nutricional del pasto kikuyo (*Cenchrus clandestinus* (Hochst Ex Chiov.) Morrone) para la producción de leche en Colombia (Una revisión): I - Composición química y digestibilidad ruminal y posruminal. *Livestock Research for Rural Development*, Volume 20, Article # 59 Retrieved March 23 2013 from <http://www.lrrd.org/lrrd20/4/corra20059.htm>

Dalpé Y 1989 Inventaire et repartition de la flore endomycorhizienne de dunes et de rivages maritimes du Québec, du Nouveau-Brunswick et de la Nouvelle-Ecosse. *Naturaliste Canadian Annual Review of Ecology and Systematics* 116 (1): 219-236.

Diannelis C, Urbano Y, Arrojas I y Dávila C 1994 Efecto de la fertilización en la asociación kikuyo-alfalfa. (*Pennisetum clandestinum*- *Medicago sativa*). Producción de materia seca. Altura y relación hoja/tallo. *Zootecnia Tropical* 12(2): 281-306.

Dodd J C and Thomson B D 1994 The screening and selection of inoculant arbuscular – mycorrhizal and ectomycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 159: 149-158.

Estrada J 2001 Pastos y forrajes para el trópico Colombiano 1 ed. Manizales (Colombia): Universidad de Caldas. 217 -317.

Franco D A and Cano G I 2006 Arbuscular mycorrhizal colonization and growth of Buffel grass (*Cenchrus ciliaris* L.) genotypes. *Revista Fitotecnia Mexicana* 29 (3): 203 – 206.

- Giovannetti M and Mosse B 1980** An evaluation of technique for measuring vesicular – arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist* 84: 489-500.
- Grace E J, Cotsaftis O, Tester M, Smith F A and Smith S E 2009** Arbuscular mycorrhizal inhibition of growth in barley cannot be attributed to extent of colonization, fungal phosphorus uptake or effects on expression of plant phosphate genes. *New Phytologist* 181: 938 – 949.
- Gray M J and Smith L M 2005** Influence of land use on postmetamorphic body size of playa lake amphibians. *Journal of Wildlife Management* 69:515-524.
- Habte M and Osorio N M 2001** Arbuscular mycorrhizas: Producing and applying arbuscular mycorrhizal inoculum. College of tropical agriculture & Human resources university of Hawaii at manoa 47 p.
- Hart M N and Reader R J 2002** Host plant benefit from association with arbuscular mycorrhizal fungi: Variation due to differences in size of mycelium. *Biology and Fertility of Soils* 36: 357 – 366.
- Hiltner L 1904** Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache. *Arbeiten der Deutschen Landwirtschaftlichen Gesellschaft* 98: 59-78
- INVAM. (The International Culture Collection of Arbuscular and Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi) 2015** Retrieved March 23 2015 from <http://invam.wvu.edu/>
- Knapp D, Pintye A and Kovács G 2012** The dark side is not fastidious – Dark septate endophytic of native and invasive plants of semiarid Sandy areas. *Plos One* 7 (2): 3-7.
- Lau J A and Lennon J T 2011** Evolutionary ecology of plant-microbe interactions: soil microbial structure alters selection on plant traits. *New Phytologist* 192: 215-224.
- Leigh J, Hodge A and Fitter A H 2009** Arbuscular mycorrhizal fungi can transfer substantial amounts nitrogen to their host plant from organic material. *New Phytology* 181(1): 199-207.
- Li H, Smith F A, Dickson S, Holloway R E and Smith S E 2008** Plant growth depressions in arbuscular mycorrhizal symbioses: not just caused by carbón drain? *New Phytologist* 178: 852 – 862.
- Mahesh B, Mayura D and Paramjit J 2010** Growth photosynthetic activity and antioxidant responses of mycorrhizal and non-mycorrhizal bajra (*Pennisetum glaucum*) crop under salinity stress condition. Pune: Department of Botany, University of Pune 265-271 p.
- Marais J G 2001** Factors affecting the nutritive value of kikuyu grass (*Cenchrus clandestinus*) a review. *Tropical Grasslands* 35: 65-84.
- Mendo O, Pérez J, Martínez P, Herrera J, Mendoza G y Hernández A 2000** Pastoreo de kikuyo (*Cenchrus clandestinum* (Hochst Ex Chiov.) Morrone) por borregos en crecimiento a diferentes asignación de forraje. *Agrociencia* 34(2): 127-134.
- Molina E 1998** Encalado para la corrección de la acidez del suelo. Centro de Investigaciones Agronómicas Universidad de Costa Rica. San José 45 p.
- Phillips J M and Hayman D S 1970** Improved procedures for clearing and staining parasitic and vesicular–arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55: 158-161.

Schenck N C and Sm G S 1982 *Glomus intraradices* Retrieved April 23 2015 from <http://www.zor.zut.edu.pl/Glomeromycota/index.html>

Sieverding E 1984 Manual de Métodos para la investigación de Micorriza vesículo-arbuscular en el laboratorio. Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT, Cali, Colombia 96 p.

Silva A, Menjivar J C, Alava C A y Gómez H F 2010 Efecto de la fertilización con nitrógeno, fósforo y azufre sobre la recuperación de una pradera degradada de kikuyo (*Cenchrus clandestinum* (Hochst Ex Chiov.) Morrone), en Nariño, Colombia. XII Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del suelo. Ecuador 1-10 p.

Smith SE and Read D J 1997. Mycorrhizal symbiosis. Second edition. Academic Press. Elsevier 31 p.

Soto L, Laredo M y Alarcón E 1980 Digestibilidad y consumo voluntario del pasto Kikuyo (*Cenchrus clandestinum* (Hochst Ex Chiov.) Morrone) en ovinos bajo fertilización nitrogenada. Revista ICA 15: 79-90.

Swanepoel P A, Bothaa P R, Preez C C and Snyman H A 2013 Physical quality of a podzolic soil following 19 years of irrigated minimum-till kikuyu-ryegrass pasture. Soil & Tillage Research 133: 10–15.

Sylvia D M 1999 “Mycorrhizal symbiosis”. In: D.M. Sylvia, Furhrmann, P. Hartel., and D. Zuberer (eds) Principles and applications of soil microbiology. Prentice Hall, New Jersey, USA. pp. 408-426.

Talukdar N C and Germida J J 1993 Occurrence and isolation of vesicular-arbuscular mycorrhizae in cropped field soils of Saskatchewan. Journal microbiology 39: 567-575.

Tidjane D A, Samb I P and Ducouso M 1999 Arbuscular mycorrhizal fungi in the semi-arid areas of Senegal. Euro Journal Soil Biology 35(2): 65-75.

Toledo J M 1982 Manual para la evaluación agronómica. Red internacional de evaluación de pastos tropicales (RIEPT). Centro internacional de la agricultura tropical CIAT. Cali, Colombia. 168 p.

Vance C P, Graham P H and Allan D L 2000 Biological nitrogen fixation: 1 phosphorus a critical future need? In: Pederosa, F.O., Hungria, M., Yates, M.G., Newton, W.E. (Eds.), Nitrogen Fixation from Molecules to Crop Productivity. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands pp. 509–518.

Received 4 November 2016; Accepted 1 March 2017; Published 1 May 2017