

Respuesta del pasto kikuyo a la inoculación: con hongos micorrícicos y a diferentes niveles de nitrógeno y fósforo

Alejandro Ortiz Acevedo

Trabajo de grado de Maestría para optar al título de Magíster en Ciencias Animales

Asesora

**Marisol Medina Sierra. Ing Agron., MS, PhD
Profesora Facultad de Ciencias Agrarias escuela de producción animal**

**UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE PRODUCCION AGROPECUARIA
2015**

Dedicatoria

Este trabajo va dedicado a toda mi familia

- **Maria Eucaris Acevedo Rojo**
- **Hernan de Jesus Ortiz Ortiz**
- **Frank Mauricio Ortiz Acevedo**
- **Sandra Liliana Ortiz Acevedo**

Quienes estuvieron a mi lado brindando el apoyo necesario para lograr terminar mi estudio de posgrado.

A la profesora Marisol Medina Sierra quien no solo me formo como profesional si no que también realizó un aporte importante a mi formación como persona.

Tabla de contenido

GLOSARIO.....	9
Resumen general	10
Introducción general.....	12
Objetivos	13
Objetivo general.....	13
Objetivos específicos.....	13
CAPÍTULO 1	14
Artículos de revisión	15
1.1 Alternativas biológicas para el manejo de la fertilización del pasto kikuyo (<i>Cenchrus clandestinus</i> Hoechst ex Chiov.) Morrone) en Colombia.....	15
Resumen	15
Introducción	16
Ecofisiología y calidad nutritiva del pasto kikuyo.....	17
Ecofisiología del pasto kikuyo	17
Vías fotosintéticas C ₃ y C ₄	17
Calidad composicional del pasto kikuyo:	17
Pasto kikuyo en Colombia	18
Condiciones climáticas que regulan el crecimiento y producción de pasto kikuyo:	18
Zonas establecidas bajo kikuyo en el país:	19
Condiciones generales de los suelos establecidos bajo pasto kikuyo.....	20
Condiciones químicas del suelo que regulan el crecimiento del pasto kikuyo.....	20
Condiciones físicas del suelo favorecidas por el establecimiento del pasto kikuyo	21
Fertilización química en kikuyo	21
Importancia del nitrógeno en praderas de kikuyo	24
Importancia del fósforo en el pasto kikuyo.....	25
Efectos negativos de la aplicación de fertilizantes.....	25
Estrategias de manejo biológico en kikuyo.....	26
Fertilización orgánica en pasto kikuyo:.....	26

Empleo de bacterias fijadoras de nitrógeno de forma libre en gramíneas:	27
Empleo de hongos micorrícicos:	27
Asociación de kikuyo con otras especies vegetales:.....	28
Estrategias de manejo que permiten disminuir la cantidad de fertilizantes	29
Consideracion final	29
Referencias bibliográficas	30
1.2 Fisiología de los hongos formadores de micorrizas arbusculares	40
Resumen	40
Introducción	41
Endosimbiosis de los HFMA	42
Importancia de la endosimbiosis y desarrollo de la misma	42
Fitohormonas en la formación de la endosimbiosis.....	42
Fase pre-simbiótica.....	42
Fase simbiótica	43
Desarrollo del arbusculo	44
Formación de la hifa	45
Absorción de nutrientes	46
Fósforo	46
Nitrógeno.....	47
Absorción de otros nutrientes.....	47
Zinc	47
Cobre	48
Toma de agua por los HFMA y estrés en la planta.....	48
Condiciones adversas del suelo en la formación y la función de los HFMA.....	49
Temperatura y humedad	49
pH	49
Estrés antropogénico	50
Conclusiones	51
Referencias bibliograficas.....	53
CAPÍTULO 2	63
Identificación de algunas cepas nativas de hongos formadores de micorrizas	
arbusculares asociadas al pasto kikuyo (<i>Cenchrus clandestinus</i> (Hochst. ex Chiov)	
Morrone) y su efecto en algunas variables agronómicas	64

Resumen	64
Introducción	64
Materiales y métodos.....	65
Muestreo de suelos:.....	65
Extracción de cepas de hongos formadores de micorrizas arbusculares del suelo:	65
Separación de morfotipos nativos:.....	66
Tinción de raíces y determinación del porcentaje de colonización:.....	66
Multiplicación de cepas:	67
Selección semilla de pasto kikuyo:.....	67
Siembra de pasto kikuyo:	67
Sitio de estudio:	67
Fertilización nitrogenada, fosfórica y HFMA:	67
Diseño experimental:	68
Diagrama	69
Modelo clasificación experimental	69
Factores experimentales:.....	70
Tratamientos:.....	70
Unidad experimental:.....	70
Variables experimentales:	70
Variables a medir:.....	70
Período de corte:	70
Resultados.....	71
Densidad de esporas en diferentes suelos establecidos en pasto kikuyo:	71
Identificación de las esporas nativas	71
Altura de la planta y relación hoja/tallo	73
Análisis canónico discriminativo.....	73
Altura de la planta.....	74
Relación hoja/tallo y producción de materia seca	75
Discusión.....	77
Conclusiones	78
Referencias bibliográficas.....	81
Capítulo 3.....	85

Respuesta del pasto kikuyo (<i>Cenchrus clandestinum</i> (Hochst. ex Chiov.) Morrone) a la inoculación con hongos micorrícicos y a diferentes niveles de nitrógeno y fósforo en algunas variables bromatológicas y características del suelo	86
<i>Resumen</i>	86
Introducción	86
Materiales y métodos.....	87
Muestreo de suelos:.....	87
Extracción de cepas de hongos formadores de micorrizas arbusculares del suelo:.....	87
Separación de morfotipos nativos:.....	88
Tinción de raíces y determinación de porcentaje de colonización:.....	88
Multiplicación de cepas:	89
Selección semilla de pasto kikuyo:.....	89
Siembra de pasto kikuyo:	89
Figura 1. Asignación de los diferentes tratamientos empelados en el estudio.....	90
Sitio de estudio:.....	90
Fertilización nitrogenada, fosfórica y HFMA:	90
Diseño experimental:	91
Diagrama	91
Modelo clasificación experimental	92
Factores experimentales:.....	92
Tratamientos:.....	92
Unidad experimental:.....	92
Variables experimentales:	92
Variables de calidad	92
Período de corte:	93
Isotermas de fósforo:.....	93
Resultados.....	94
Calidad del forraje	94
Materia seca	94
Proteína cruda.....	94
Energía:	95
Calcio.....	96
Fósforo	97
Contenido de proteína cruda y energía bruta	99
Contenido de calcio y fósforo:	100

Concentración de energía bruta y minerales en pasto kikuyo:.....	100
Colonización de raíces.....	102
Isotermas de adsorción de fósforo	103
Discusiones.....	105
Calidad del forraje	105
Materia seca	105
Proteína cruda.....	105
Energía	105
Calcio.....	106
Fósforo	106
Colonización.....	107
Adsorción de P.....	107
Conclusiones	108
Recomendaciones generales	109
Referencias bibliograficas.....	109

Lista de tablas

Capítulo 1.2

Tabla 1: Absorción media de nutrientes en plantas de trigo	46
Tabla 2. Efecto de la temperatura y humedad en la formación de la endosimbiosis planta y HFMA.	49

Capítulo 2

Tabla 1 Propiedades físico químicas básicas del suelo usado para el ensayo	69
Tabla 2 Número de esporas y porcentaje de colonización hallados en diferentes municipios establecidos en pasto kikuyo.....	71
Tabla 3. Cuadrados medio para cada una de las variables agronómicas determinadas en pasto kikuyo.....	79
Tabla 4. Coeficiente de correlación para el error de las variables dependientes altura de la planta, relación hoja tallo y producción de materia seca.....	79

Capítulo 3

Tabla 1 Propiedades físico químicas básicas del suelo usado para el ensayo	91
--	----

Tabla 2. Cuadrado medio para la variable dependiente porcentaje de colonización en pasto evaluado a diferentes niveles de fertilización nitrogenada y fosfórica.102

Tabla 3 Cuadrados medios de la isoterma de adsorción de P.....104

Lista de anexos

Anexos capítulo 2

Anexos 1 Salidas estadísticas SAS115

Anexo 1.1 Mejores niveles según análisis canónico para el tratamiento de la interacción HFMA (M) y nitrógeno (N)..... 121

Anexo 1.2. Análisis canónico para el tratamiento (N) y (P).....122

Anexo 1.3 Análisis canónico para interacción de HFMA (M) y fosforo (P).....123

Anexos capítulo 3

Anexos 1 Salidas estadísticas SAS123

GLOSARIO

Absorción: Es la operación unitaria que consiste en la separación de uno o más componentes de una mezcla gaseosa con la ayuda de un solvente líquido.

Adsorción: Fenómeno por el cual un sólido o un líquido atrae y retiene en su superficie gases, vapores, líquidos o cuerpos disueltos.

EB: (Energía bruta) Es la energía que se obtendría al quemar un alimento en una bomba calorimétrica.

g: (gramo) Medida de masa, de símbolo *g*, que es igual a la milésima parte de un kilogramo.

ha: (Hectárea) Es una medida de superficie equivalente a 10 000 metros cuadrados.

HFMA: Hongos formadores de micorrizas arbusculares

Kg: (kilogramos) Unidad de masa del Sistema Internacional, de símbolo *kg*, que equivale a la masa del prototipo de platino iridiado que se encuentra en la Oficina Internacional de Pesas y Medidas de París

m²: (Metros cuadrados) Unidad de superficie del Sistema Internacional, de símbolo *m*², que equivale al área de un cuadrado de 1 metro de lado.

ml: (Mililitros) Medida de volumen, de símbolo *ml*, que es igual a la milésima parte de un litro

MS: (Materia seca) Extracto seco es la parte que resta de un material tras extraer toda el agua posible a través de un calentamiento hecho en condiciones de laboratorio.

Mutualismo: Asociación de dos o más organismos de especies diferentes que supone beneficio para ambos

N: (Nitrógeno) Elemento químico de número atómico 7, masa atómica 14,007 y símbolo *N* ; necesario para el crecimiento y desarrollo de la planta.

P: (Fósforo) Elemento químico de número atómico 15, masa atómica 30,98, elemento necesario para todos los procesos metabólicos de la planta.

PC: (Proteína cruda) Análisis químico que se realiza en los alimentos, basados en el nitrógeno, para obtener la cantidad de proteínas que este contiene

Rizosfera: es la parte del suelo inmediata a las raíces vivas y que está bajo la directa influencia de éstas.

Simbiosis: Asociación íntima de organismos de especies diferentes para beneficiarse mutuamente en su desarrollo vital.

Resumen general

Hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) son hongos del suelo que forman una simbiosis mutualista con raíces de las plantas. Los HFMA puede mejorar el crecimiento y desarrollo de la planta a través de la translocación de los nutrientes del suelo a la raíz de la planta huésped. Sin embargo, la translocación de nutrientes por os HFMA ha sido poco explorada en plantas tales como pasto kikuyo (*Cenchrus clandestinus* (Hochst. ex Chiov.) Morrone). El pasto kikuyo es una planta adaptada a las tierras altas de los trópicos. Además, debido a su calidad nutricional y altos rendimientos el pasto kikuyo requiere grandes dosis fertilizantes que tienen nitrógeno (N) y fósforo (P). Este estudio tuvo como objetivo determinar el efecto del mutualismo simbiótico entre el pasto kikuyo y tres cepas de HFMA bajo diferentes niveles de fertilización. Dos de las tres cepas fueron asociadas naturalmente con el pasto kikuyo (*Rhizophagus Intraradices* y *Rhizophagus fasciculatus*) y una tercera cepa no nativa al kikuyo (*Rhizophagus manihotis*). Los niveles de fertilización de nitrógeno fueron 0, 100, 200 y 400 kg ha⁻¹ por año y los niveles fósforo fueron 0, 50, 100 y 200 kg ha⁻¹ al año. Se evaluaron variables agronómicas como relación hoja/tallo, altura de la planta y el rendimiento de materia seca: Además, se analizaron la composición nutricional de la planta y la capacidad de adsorción del suelo de P. Las variables

agronómicas aumentaron ($P < 0,01$) en los tratamientos que incluyeron un cierto nivel de N y P en presencia de HFMA en comparación con los tratamientos sin la presencia de la HFMA. La presencia de la HFMA, sin importar el tipo de HFMA utilizado, no afectó ($P > 0,05$) el valor nutritivo del pasto kikuyo. Sin embargo, especies como *Rhizophagus intraradices* puede ser más eficiente en la absorción de N y P ya que este es un hongo adaptado a las condiciones donde está establecido el pasto kikuyo. La presencia de HFMA no tuvo efecto ($P > 0,05$) en la capacidad de adsorción del suelo de P. El uso de HFMA en praderas de pasto kikuyo y en los planes de fertilización puede mejorar la eficiencia de utilización de N y P, mejorando así la calidad nutricional y parámetros agronómicas de este pasto.

Palabras clave: Adsorción de fósforo, calidad composicional, fertilización, hongos micorrícicos, variables agronómicas

Abstract

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are soil fungi that form a mutualistic symbiosis with roots and plants. AMF can improve plant growth and development through the translocation of nutrients from the soil to the root of the host plant. However, translocation of nutrients by the AMF has been little explored in plants such as Kikuyu grass (*Cenchrus clandestinus* (Hochst. ex Chiov.) Morrone). The Kikuyu grass is a plant adapted to the highland in the tropics. In addition, due to its nutritional quality and high yields kikuyu grass require large doses of nitrogen (N) and phosphorus (P) fertilizers. This study aimed to determine the effect of the symbiotic mutualism between the Kikuyu grass and three AMF strains under different fertilization levels. Two of the three strains were naturally-associated with the kikuyu grass (*Rhizophagus intraradices* and *Rhizophagus fasciculatus*) and the third one was introduced (*Rhizophagus manihotis*). Nitrogen fertilization levels were 0, 100, 200, and 400 kg ha⁻¹ per year and phosphorus levels were 0, 50, 100, and 200 kg ha⁻¹ per year. Agronomical variables such as plant height, leaf: stem ratio, and dry matter yield were evaluated. In addition, the plant nutritional composition and the soil adsorption capacity of P were analyzed. Agronomic variables increased ($P < 0.01$) in treatments that included some level of N and P fertilization in the presence of AMF compared to treatments without the presence of AMF and no N or P inclusion. The presence of AMF, regardless of the type of AMF used, did not affect ($P > 0.05$) the nutritional value of the kikuyu grass. Nevertheless, species such as *Rhizophagus intraradices* can be more efficient in the N and P uptake since this is a fungus adapted to the conditions of the Kikuyu grass. The presence of AMF had no effect ($P > 0.05$) on the soil adsorption capacity of P. The use of AMF on grasslands management and fertilization plans can improve the efficiency of utilization of N and P, thus improving the nutritional quality and agronomic parameters of the pastures.

Keywords: Adsorption of phosphorus, agronomic variables, compositional quality, fertilization, mycorrhizal fungi.

Introducción general

Las micorrizas (del griego *mykes* – hongo, *rhiza* – raíz) son la asociación mutualista entre los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) que se encuentran en el suelo y las raíces de las plantas, este mutualismo se fundamenta en que la planta hospedera recibe nutrientes minerales del suelo tomados por el hongo, mientras que este último toma compuestos carbonados derivados de la fotosíntesis (Sosas et ál., 2006). Entre los beneficios que los hongos brindan a la planta huésped se encuentra un aumento en el crecimiento de esta y el aumento en la absorción de nutrientes relativamente inmóviles tales como el zinc (Zn) y el fósforo (P) (Ortas 2010). Sin embargo los HFMA también pueden ser importantes en la toma de nutrientes necesarios para la planta como el nitrógeno (N) (Leigh et ál 2009), cobre (Cu) (Lambert et ál., 1979; Marschner y Dell, 1994; Toler et ál., 2005) y hierro (Fe) (Kim et ál., 2009).

La gran mayoría de cultivos tropicales es muy sensible a las micorrizas arbusculares (Norman et ál., 1996). Sólo unas pocas familias y géneros de plantas generalmente no forman simbiosis con las micorrizas arbusculares, dentro de las que están las *Brassicaceae*, *Caryophyllaceae*, *Cyperaceae*, *Juncaceae*, *Chenopodiaceae*, y *Amaranthaceae*, aunque cada una de estas familias tienen algunos representantes que son por lo general colonizadas por los HFMA (Norman et ál., 1996). La capacidad de los hongos micorrizicos para mejorar la captación de nutrientes de la planta hospedante, en particular P, y varios micronutrientes, ha sido el efecto más reconocido de las micorrizas, reportes en gramíneas como el millo perla *Pennisetum americanum* (L) Leeke, inoculado con *Gigaspora margarita* W.N Becker & I.R.Hai, *Glomus fasciculatum* (Thaxter) Gerd. & Trappe y *Azospirillum brasilense*, han indicado un aumento significativo en los contenidos de materia seca. Lo cual es atribuido a la asociación establecida por las micorrizas a la especie *Pennisetum americanum* (L) Leeke y al transporte de P por parte de estas hacia la planta (Subba et ál., 1985). Los hongos formadores de micorrizas arbusculares no solo permiten movilizar y mejorar la absorción de P para la planta (Xiao et ál., 2010), sino que también desempeñan un papel importante para la adquisición de N para la planta (Wang et ál., 2010). Donde existe un mayor crecimiento de estas cuando son sometidas a niveles de NO_3^- -N y sus raíces se encuentran asociada con los HFMA (Azcón et ál., 1991; Azcón et ál., 1992).

El cultivo de pasto kikuyo (*Cenchrus clandestinus* Hochst. Ex Chiov.) Morrone) se encuentra ampliamente distribuidos en la región andina de Colombia donde la mayoría de los suelos bajo los que se encuentra establecido son derivados de cenizas volcánicas, caracterizados por la alta fijación de P (Bertsch 1986; Jaramillo 2012), la formación de complejo humus-aluminio hace que el carbono atrapado en estos sea inactivo y deje de ser

parte del carbono activo en la fracción orgánica del suelo; por tanto el aporte de N y P a las plantas se ve afectado (Espinosa, 1987). Además estos suelos también sufren pérdidas de nutrientes a través de los procesos de lixiviación de bases como el calcio (Ca), potasio (K), magnesio (Mg) y sodio (Na), altos contenidos de materia orgánica que presenta una baja tasa de mineralización y aporte de nitrógeno (N) necesario para el crecimiento de las plantas (Jaramillo, 2012; Lizcano et ál., 2006). Para optimizar la producción de la pradera de kikuyo, el uso de fertilizantes sintéticos en especial nitrogenados de alto valor e impacto en el medio ambiente, se convierten en una alternativa en los programas de fertilización de cultivos en estas regiones (FAO, 2002). La fertilización nitrogenada recomendada para este tipo de pasturas fluctúa entre 40 y 70 kg de nitrógeno por hectárea/pastoreo (Dávila y Chaverra, 1968; Mears, 1970; Estrada, 2001), lo cual lleva aplicar como mínimo 400 kg de nitrógeno/hectárea/año, cantidades que representan un alto costo dentro de los programas de fertilización en praderas de kikuyo y el riesgo que se corre de contaminar el medio ambiente cuando se aplica dosis elevadas de este elemento (FAO, 2002). Por tanto se hace necesario implementar un sistema integrado de nutrición de plantas (SINP), en donde se incluya la aplicación de abonos orgánicos (FAO, 2002; Echeverri et ál., 2010), y el uso potencial de microorganismos del suelo los cuales desempeñan un papel importante en la descomposición de la materia orgánica, la liberación, translocación de nutrientes del suelo a la plantas y fijación de otros elementos disponibles en el medio ambiente (Smith et ál., 2003, Pérez et ál., 2011). El objetivo de esta investigación es evaluar la variación en el rendimiento y la calidad composicional en cuanto concentración de nutrientes como el N y P en el pasto kikuyo inoculados con cepas de hongos micorrícicos nativos e identificados bajo diferentes niveles de fertilización nitrogenada y fosfórica.

Objetivos

Objetivo general

- Evaluar la variación en el rendimiento y calidad composicional del pasto kikuyo (*Cenchrus clandestinus* (Hochst. ex Chiov) Morrone), inoculado con cepas de hongos micorrícicos nativos y conocidos bajo diferentes niveles de fertilización nitrogenada y fosfórica.

Objetivos específicos

- Identificar y multiplicar algunas cepas de hongos micorrícicos nativos asociados al pasto kikuyo en algunas zonas de clima frío.
- Determinar el rendimiento productivo, contenido de nitrógeno, fósforo y variables agronómicas del pasto kikuyo en respuesta a la inoculación con las cepas de hongos micorrícicos a diferentes dosis de fertilizante nitrogenado y fosfórico.
- Determinar la disponibilidad fósforo en el suelo para cada uno de los tratamientos.

CAPÍTULO 1

Artículos de revisión

1.1 Alternativas biológicas para el manejo de la fertilización del pasto kikuyo (*Cenchrus clandestinus* Hoechst ex Chiov.) Morrone) en Colombia.

Resumen

Se realizó una revisión bibliográfica acerca de los factores edáficos, ambientales y de manejo que condicionan la producción de pasto kikuyo (*Cenchrus clandestinus* Hoechst ex Chiov.) Morrone) en hatos lecheros. Enfocándose en las condiciones edáficas bajo las cuales se establece este pasto y el manejo que se realiza para suplir las necesidades nutricionales de los animales que lo consumen, se realizó un análisis de dos de los elementos minerales necesarios para el pasto kikuyo como lo son el nitrógeno (N) y fósforo (P), que condicionan la producción de este y por tanto implican altas aplicaciones después cada pastoreo. Elementos como el potasio (K), calcio (Ca) y magnesio (Mg) también se abordaron, ya que son importantes para la pradera en la medida que ayudan a regular la concentración de nutrientes en el pasto para la alimentación animal y permiten crear las condiciones que favorecen la planta ante el ataque de insectos y enfermedades. El manejo orgánico de las pasturas se presenta como otra alternativa en la fertilización con el fin de mejorar las condiciones físico-químicas del suelo, que contribuyen a mejorar la cantidad y calidad del pasto; de esta forma se puede disminuir la cantidad de fertilizantes sintéticos de alto valor y daño ecológico necesarios para este tipo de pasturas. El asocio de praderas entre gramíneas y leguminosas, el diseño de sistemas silvopastoriles, la aplicación de abonos orgánicos y la multiplicación de hongos y bacterias del suelo, son algunas de otras técnicas de manejo orgánico que se pueden realizar en praderas de pasto kikuyo. Trabajos realizados en pasturas de esta especie de pasto que involucren un manejo orgánico en estas son pocos en el trópico, debido a esto se hace necesarios estudios que ayuden a reconvertir los actuales sistemas de producción de leche a sistemas más económicos y de menor impacto en el medio ambiente.

Palabras claves: Condiciones edáficas, fertilización orgánica, fertilizantes químicos, hongos micorrícicos, microorganismos del suelo

Abstract

A literature review on the soil, environmental, and management factors that influence the production of Kikuyu grass (*Cenchrus clandestinus* Hochst. ex Chiov.) Morrone) in dairy herds was conducted. The review focused on the soil conditions under which the Kikuyu grass is established and on the pasture management techniques used to meet the nutritional needs of the animals. An analysis of nitrogen (N) and phosphorus (P) was performed for the

reason that these minerals affect the production of the Kikuyu pasture and therefore involves high levels of inclusion in each grazing period. Minerals such as potassium (K), calcium (Ca), and magnesium (Mg) were also analyzed as they are important regulating the concentration of nutrients in the pastures and creating favorable conditions for the plant protection from insects and diseases. The use of organic compounds as a fertilization alternative enhances the physical and chemical soil conditions and therefore the quantity and quality of the pasture. The use of these organic compounds can reduce the application of expensive-synthetic fertilizers and consequently diminish the ecological impact. The association between gramineous and leguminous plants, the agroforestry systems design, the use of organic fertilizers, and the proliferation of fungi and bacteria in soil are some other organic management techniques that can be performed on Kikuyu grass pastures. There are few studies conducted in Kikuyu grass involving organic management in the tropics, because of this it is necessary to perform more studies that help the milk production systems to become a more economical and less environmental-impacting systems.

Keywords: Chemical fertilization, mycorrhizal fungi, organic fertilization, soil conditions, soil microorganism

Introducción

El pasto kikuyo (*Cenchrus clandestinus* Hochst. ex Chiov.) Morrone) es la gramínea más común y mejor adaptada a las zonas de clima frío de Colombia (Estrada, 2001) por esta razón este pasto es la base de la alimentación forrajera de los sistemas de lechería especializada en esta zona (Correa et ál., 2005). Los cultivos de pasto kikuyo se encuentran ampliamente distribuidos en la región andina del país establecido en algunos suelos caracterizados por la alta fijación de fósforo, la pérdida de nutrientes a través de los procesos de lixiviación de bases como el calcio, potasio, magnesio, sodio y los altos contenidos de materia orgánica (Bertsch, 1986; Lizcano et ál., 2006). Esta última juega un papel importante en estos suelos, ya que es la principal fuente de nitrógeno para el crecimiento de la planta, sin embargo, en los suelos de la región andina de Colombia la baja tasa de mineralización de la materia orgánica limita el nitrógeno disponible para la planta (Jaramillo, 2011). Las vacas de alta producción de leche están obligadas a consumir altas cantidades de pasto para garantizar las necesidades ruminales de fibra 1,9 % de su peso vivo (Mojica et ál., 2009). Para optimizar la producción de la pradera el uso de fertilizantes sintéticos en especial nitrogenados de alto valor e impacto en el medio ambiente se convierten en una alternativa en los programas de fertilización (FAO, 2002). La fertilización nitrogenada recomendada para este tipo de pasturas fluctúa entre 40 y 70 kg N ha⁻¹ por pastoreo (Dávila y Chaverra, 1968; Mears, 1970; Estrada, 2001), lo cual lleva a aplicar como mínimo 400 kg de nitrógeno/año, cantidades que representan un alto costo dentro de los programas de fertilización de mantenimiento en praderas de kikuyo y un alto riesgo de contaminación ambiental cuando se aplican dosis elevadas (FAO, 2002). Por esto, se hace necesario implementar un sistema integrado de nutrición de las plantas (SINP) en donde se incluya la aplicación de abonos orgánicos (FAO, 2002; Echeverri et ál., 2010), y el incremento y favorecimiento de la microbiota del suelo la cual desempeña un papel importante en la descomposición de la materia orgánica, la liberación, translocación de

nutrientes del suelo a la plantas y fijación de otros elementos disponibles en el medio ambiente (Smith et ál., 2003, Pérez et ál., 2011). El objetivo de esta revisión fue buscar información sobre las alternativas biológicas para el manejo de la fertilización del pasto kikuyo y su posible aplicación en el trópico alto.

Ecofisiología y calidad nutritiva del pasto kikuyo

Ecofisiología del pasto kikuyo: El kikuyo es un pasto perenne, de color verde, sus tallos se caracterizan por correr a lo largo y estar dentro del suelo (Holm et ál., 1977). Los estolones y rizomas a veces pueden llegar hasta dos metros de longitud y profundidad, sus vástagos aéreos son gruesos y pueden llegar hasta 60 cm de longitud, por lo que se considera un excelente colonizador y estabilizador de suelos (Skerman et ál., 1990). Es una especie nativa de las tierras altas de África central (Skerman et ál., 1990), pero ahora es común en muchas áreas del mundo (Rumball y Riveros, 1991). El kikuyo tolera una amplia gama de pH del suelo que va desde 5,5 hasta 8,0, la pluviosidad anual que tolera es de al menos 600 - 700 mm anuales con una adaptación que va desde el nivel del mar hasta 3.500 m de altura (Skerman y Riveros, 1990), la temperatura óptima para su crecimiento se encuentra en un rango que va desde los 18°C hasta los 30°C (Russel y Webb, 1976), sin embargo, se ha observado que crece a temperaturas menores a los 18°C y superiores a los 30°C (Russel y Webb, 1976). La importancia del kikuyo como pasto para alimentación animal se debe a su alto ritmo de crecimiento, su sistema radicular bien desarrollado y sus propiedades nutritivas por su alto contenido de proteínas de alta digestibilidad y contenido de fibra de buena palatabilidad (Butler y Bailey, 1973; Marais, 2001).

Vías fotosintéticas C₃ y C₄: El pasto kikuyo pertenece al grupo de las plantas C₄ (Sowerbya et ál., 2000). Estas plantas se caracterizan por las altas tasas de fotosíntesis neta, bajos puntos de compensación de dióxido de carbono, bajas tasas de fotorrespiración, mayor eficiencia en el uso de dióxido de carbono (CO₂) y en el uso del agua comparada con plantas del grupo C₃ (Lira, 2007). La fotosíntesis realizada en las plantas C₄ no se ve afectada por las altas o bajas concentraciones de CO₂ en el medio ambiente, diferente a lo que ocurre con las plantas C₃ en las cuales los procesos fotosintéticos disminuyen por las altas concentraciones de CO₂ atmosférico y aumenta con las bajas concentraciones de éste (Giraldo, 2010).

Calidad composicional del pasto kikuyo: El incremento en la oferta forrajera por la fertilización favorece el consumo de materia seca y por tanto la producción de leche por vaca (Carulla et ál., 2004; Bargo et ál., 2003). Sin embargo, el tipo de fertilizante y la calidad del suelo limitan la absorción y calidad de forraje que se le aporta al animal, que en última instancia afecta la producción y concentración de nutrientes en la leche de la vaca (Correa et ál., 2008). Una de las principales características del pasto es la variación en la producción de materia seca. Silva, (2010) encontró que aplicaciones de N y S se asocian con mayores producciones de esta con un promedio de 4,04 Ton/ha, contrario a lo que ocurre cuando se aplica solo P la producción de materia seca en pasto kikuyo disminuye a

1,65 Ton/ha. Con la aplicación de sulfato de amonio se obtienen mayores rendimientos de materia seca de pasto kikuyo que con urea y el nitrato de amonio (Sánchez, 1981). Según Diannelis et ál., (1994) la eficiencia de producción de materia seca del kikuyo por efecto de la fertilización nitrogenada, fluctúa entre 9 y 13 kg MS/ kg N. Las altas dosis de fertilizantes químicos nitrogenados aplicados a las praderas de pasto kikuyo causan un aumento en la producción de materia seca, pero a medida que se da esta también aumenta la pérdida de pasto por el ataque de insectos (áfidos) que consumen los azúcares de los pastos suculentos fertilizados con altas cantidades de N y K (Miyasaka et ál., 2006).

El N es el elemento más importante en la vida de las plantas, ya que es el constituyente principal de la proteína (Estrada, 2001). Según Silva et ál., (2010) las fuentes comerciales de fertilizante químico que contienen N están asociadas con mayores concentraciones de proteína en el pasto kikuyo a los 45 días de edad de rebrote. Vanegas, (1986) demostró que no solo el N influye en la concentración de proteína en el pasto; también otros nutrientes como el P y el S los cuales permiten un aumento significativo de la concentración de esta en el pasto kikuyo. Estudio realizado por Medina, (1982) señala que el kikuyo es una de las gramíneas forrajeras con más alto valor nutritivo y contiene entre 15 a 18 % de proteína cuando se fertilizan con dosis de 300 kg N/ha/año. La fertilización nitrogenada mejora el contenido de proteína del forraje (Messman et ál., 1981; Rodríguez, 1999; Van et ál., 1991) debido principalmente al incremento en el N soluble y el NNP (Rodríguez, 1999). Soto et ál., (2005) encontró que la fertilización nitrogenada no afecta la degradación ruminal de la proteína cruda del pasto kikuyo en diferentes edades de pastoreo.

Pasto kikuyo en Colombia

El pasto kikuyo fue introducido en Colombia alrededor de año 1930, con el fin de mejorar los potreros para la cría de ganado en el trópico alto, caracterizándose por ser una de las plantas más invasoras que han llegado al país, donde se ha propagado por casi todos los potreros y suelos fértiles, desplazando la mayor parte de especies nativas existentes en estos lugares (Franco et ál., 2011; Mears, 1970). Debido a su hábito de crecimiento que lo hace agresivo (Correa et ál., 2008) y la tolerancia que presenta a ciertas condiciones ambientales y de manejo hace que este pasto sea útil para pastoreo, corte, heno y henolaje (Estrada, 2001; Mears, 1970).

Condiciones climáticas que regulan el crecimiento y producción de pasto kikuyo: El kikuyo es una gramínea originaria de las regiones tropicales de altura de África centro oriental adaptada a varias latitudes (Herrero et ál., 2000), incluido Colombia donde es la pastura más común en las zonas de clima frío (Estrada, 2001). Sin embargo se ha tratado de determinar el efecto de la temperatura y la radiación solar en el rebrote y crecimiento de este pasto en diferentes latitudes; un análisis de los registros de radiación solar de Wollongbar, Nueva Gales del sur de Australia (latitud 28° 50" S) (Murtagh, 1990) y localidad de laderas del volcán Poas en Costa Rica (latitud 10° 01"N) y a una temperatura a 20°C señala que la radiación solar no es la fuente principal de variación en la fotosíntesis entre aquellas latitudes, debido a la pequeña diferencia en sus gamas de irradiación estacionales (Herrero et ál., 2000). Murtagh, (1988) señala que no existe ninguna diferencia

en el efecto de la radiación total solar sobre índice de crecimiento del pasto kikuyo, pero la temperatura juega un papel fundamental en la productividad de este, ya que a temperaturas elevadas la producción de forraje verde aumenta. La temperatura tiene un marcado efecto en la tasa de aparición de hojas de kikuyo, ya que el intervalo de tiempo requerido para que una hoja nueva sea producida aumenta con la disminución de las temperaturas; también existe una reducción lineal en la fotosíntesis de la hoja cuando la temperatura disminuye. Ambos procesos afectan el desarrollo del dosel de la planta y la intercepción de luz ocasionando así un retraso en la acumulación de materia seca (Parsons et ál., 1983).

En cuanto el requerimiento de agua en el pasto kikuyo, Murtagh, (1988) indicó que el kikuyo es capaz de mantener un crecimiento continuo en suelos bajos en agua; sin embargo, el crecimiento se puede reducir hasta en un 61 % cuando la demanda evaporativa es de cinco mm día (Murtagh, 1988). La resistencia a la sequía que posee el pasto kikuyo se debe al sistema radicular relativamente profundo que se desarrolla en suelos con buena bioestructura (Marais, 2001). Cuando la tasa de crecimiento del kikuyo es alta por la fertilización nitrogenada, la disponibilidad de agua juega un papel importante en la mejora de la tasa de crecimiento (Van der, 2008). El crecimiento de kikuyo es sensible a la demanda de evaporación incluso en suelo mojado y en los períodos nublados se puede mejorar el crecimiento mediante la reducción de la evaporación (Murtagh, 1978; Van der, 2008).

Zonas establecidas bajo kikuyo en el país: En Colombia la especie perenne más común para pastoreo directo en la producción de leche es el kikuyo (Mila et ál., 2004). Su producción se centra en la región alto andina del país, región comprendida por el Altiplano Norte de Antioquia, el cordón de Ubaté, Chiquinquirá, la sabana de Bogotá y las zonas altas de Nariño y Boyacá, zonas que se encuentran entre 1.700 y 2.800 msnm (Fedegan, 1999). En estas altitudes el pasto kikuyo se adapta muy bien con buenos rendimientos en forraje y con una calidad aceptable (Estrada, 2001; Cardenas, 2008). Sin embargo, se ha visto limitada su persistencia y alta producción de biomasa, debido a su susceptibilidad a heladas, las cuales se presentan comúnmente en estas zonas durante los meses de Enero, Febrero y Julio, como también una alta susceptibilidad a plagas como la chinche de los pastos *Collaria scenica* (Cárdenas, 2008).

Condiciones generales de los suelos establecidos bajo pasto kikuyo: Los cultivos de pasto kikuyo se encuentran ampliamente distribuidos en la región andina del país, donde la mayoría de los suelos bajo los que se encuentra establecido son derivados de cenizas volcánicas, los cuales se caracterizan por la alta fijación de fósforo (P) (Bertsch, 1986; Jaramillo, 2011); estos suelos también tienen como limitante la formación del complejo humus-aluminio que hace que el carbono atrapado en estos sea inactivo y deje de ser parte del carbono activo en la fracción orgánica del suelo; los grupos hidroxilo combinados con aluminio acomplejado entran en reacciones de intercambio ligando las formas solubles del (P) (Espinosa, 1987) a compuestos insolubles. Los suelos de la región andina también sufren pérdidas de nutrientes a través de los procesos de lixiviación de bases como el calcio (Ca), potasio (K), magnesio (Mg) y sodio (Na) y altos contenidos de materia orgánica (Lizcano et ál., 2006) donde además los altos contenidos de esta presentan una baja tasa de mineralización y aporte de nitrógeno (N) necesario para el crecimiento de las plantas (Jaramillo, 2011).

Condiciones químicas del suelo que regulan el crecimiento del pasto kikuyo

Los altos niveles de aluminio intercambiable limitan la producción del pasto kikuyo. Se ha encontrado que la disminución del pH del suelo por debajo de 4,36 afecta negativamente el crecimiento de las raíces y la parte superior de este, aunque tiene una leve tolerancia a pH alrededor de 4,8 (Van der, 2008; Awad et ál., 1976). Independientemente de la tolerancia a la acidez del suelo, el crecimiento del pasto es mejor a un pH entre 5,0 a 6,0 (Dickenson et ál., 2004). El control del pH con un encalado continuo asegura que el calcio (Ca) se mantenga en niveles adecuados en el kikuyo para la producción animal (Miles, 1999).

La acidez de los suelos tropicales se asocia con una disminución de Ca disponible en el suelo para la planta (Molina, 1998). También la concentración de Ca en kikuyo se ve afectada por su tasa de crecimiento, durante el rápido crecimiento inicial del pasto kikuyo el contenido de Ca puede ser tan bajo como 0,11%, pero aumenta rápidamente una vez que la tasa de crecimiento disminuye (Awad et ál., 1976). El pasto kikuyo es altamente tolerante a bajos niveles de Ca y Mg intercambiables en el suelo, aunque estos pueden afectar la palatabilidad, el valor nutritivo y dar lugar a desequilibrios minerales (Whitney, 1974). El Ca en este pasto varía entre 0,25% y 0,52% y su baja concentración puede causar desequilibrios en el animal que se correlacionan con una baja tasa de concepción y descensos en el nivel sanguíneo al momento del parto (Dugmore, 1988; Van der, 2008) y producir ablandamiento de las paredes celulares, haciendo más susceptible al ataque de insectos chupadores (Sierra, 2011).

El K es otro de los elementos mayores de gran importancia en el cultivo de gramíneas, este juega un papel vital en la fotosíntesis, el transporte de los productos de esta, controla la translocación y metabolismo de los carbohidratos, controla líquidos tanto en las células como en la regulación de los estomas de las plantas y la activación de las enzimas (Estrada, 2001). La mejor respuesta del pasto kikuyo ocurre con 140 mg de K /kg de suelo, incluso

aunque las deficiencias en general, sólo se producen a niveles por debajo de 75 mg K /kg de suelo (Miles, 1999). Las concentraciones de al menos de 80 mg K/ kg de suelo se recomienda, en suelos ligeros y 120 mg K /kg para suelos pesados (Dickenson et ál., 2004). Las plantas deficientes en K no pueden usar eficientemente el agua y otros nutrientes del suelo y son menos tolerantes al ataque de plagas y enfermedades (Estrada, 2001; Susan et ál., 2007).

La concentración de Mg en kikuyo es mayor durante las épocas de lluvia y más baja durante la época seca cuando la tasa de crecimiento del pasto kikuyo es máxima (Miles et ál., 1995). Aunque las concentraciones de Mg que se encuentran en kikuyo son más altas que en otras especies tropicales (Evans y Hacker, 1992), cuando los niveles de N y K en el suelo donde está establecido el pasto son altos, los niveles de Mg en la planta pueden ser bajos debido el efecto antagonista sobre la absorción de Mg por la planta que estos dos elementos ejercen (Dugmore, 1998). En cuanto al Na, el kikuyo es una planta natrofóbica, lo que significa que acumula sales de Na en sus raíces más no en sus hojas (Dugmore, 1998; Aspinall et ál., 2004). Por esta razón el kikuyo tiende a tener niveles marginales de Na (Evans y Hacker, 1992; Miles et ál., 1995).

Condiciones físicas del suelo favorecidas por el establecimiento del pasto kikuyo

El establecimiento y el buen manejo de las coberturas de pasturas perennes como el pasto kikuyo protegen al suelo de la compactación superficial y de la pérdida de suelo por erosión eólica debido a su extenso sistema radicular (Milne y Haynes, 2004). El uso de pasturas puras o monófitas sembradas anualmente como el raigrás anual *Lolium multiflorum* (L) bajo labranza, ocasiona pérdida de la materia orgánica y de la estabilidad estructural del suelo bajo este manejo, lo cual contribuye a la degradación del suelo (Milne y Haynes, 2004). El pH, el carbono orgánico del suelo, la estabilidad de los agregados ver figura 1, y la biomasa microbiana y la respiración basal en los suelos arenosos establecidos bajo pasturas permanentes como el kikuyo son mayores en suelos establecidos en pasturas no perennes como el raigrás, como puede apreciar en la Figura 1. Las praderas de kikuyo bajo buen manejo del pastoreo están sometidas a grandes aportes de materia orgánica que se produce en virtud de ser pasturas donde el animal aporta fuentes de materia orgánica como el estiércol, la renovación de raíces que realiza la planta por la poda periódica causada por el pastoreo y la entrada de hojarasca por la renovación de tejido vegetal senescente (Haynes y Williams, 1993).

Fertilización química en kikuyo

La respuesta de los pastos a la fertilización se expresa de tres maneras diferentes (Carrera, 2011). El primer efecto más notable de la fertilización es el rendimiento de materia seca, esta respuesta es la que generalmente se analiza para demostrar los beneficios obtenidos en

los pastos, como se muestra en la figura 3, la cual muestra el efecto sobre la producción de materia seca, Diannelis et ál., (1994), la segunda es el aumento de nutrientes que mejoran la calidad del forraje, y la tercera se manifiesta en el animal con el aumento en la tasa de producción de carne o leche, o por un incremento en base forrajera y en la capacidad de carga de los potreros (Bernal, 2003).

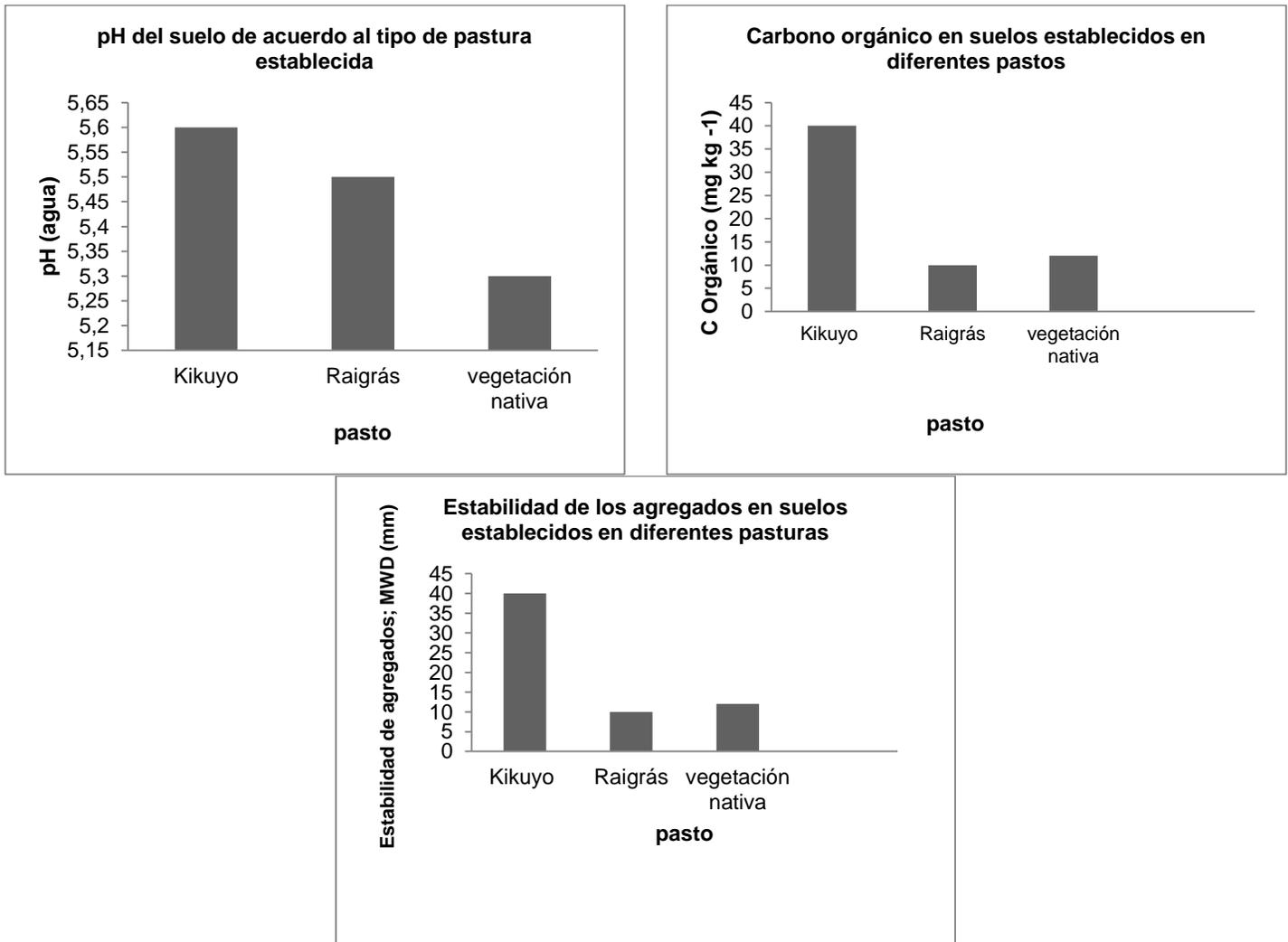


Figura 1: pH. Carbono orgánico y estabilidad de los agregados de suelos arenosos establecidos bajo diferentes pasturas (kikuyo, raigrás y plantas nativas) en África. Adaptado de (Milne y Haynes, 2004).

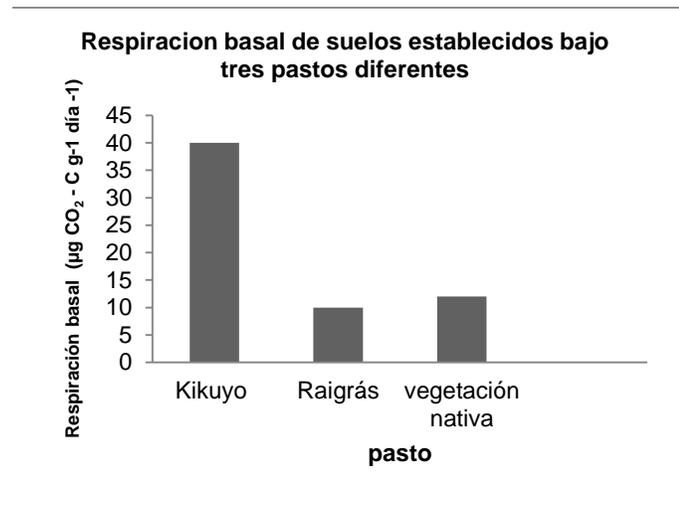
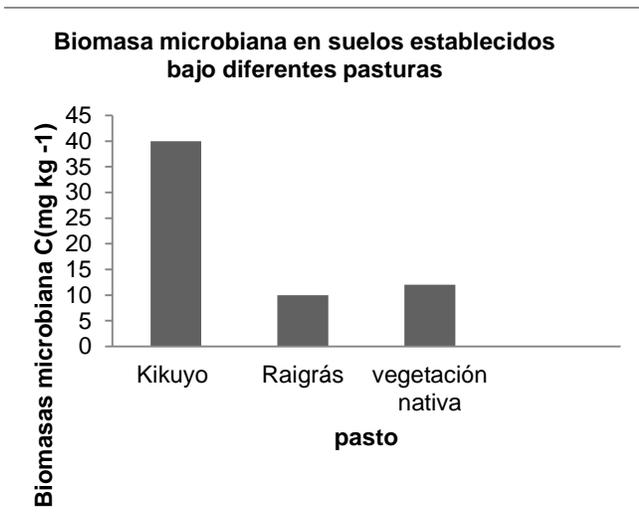


Figura 2: Biomasa microbiana y respiración basal de suelos arenosos establecidos bajo diferentes pasturas (kikuyo, raigrás y plantas nativas) en África. Adaptado de (Milne y Haynes, 2004).

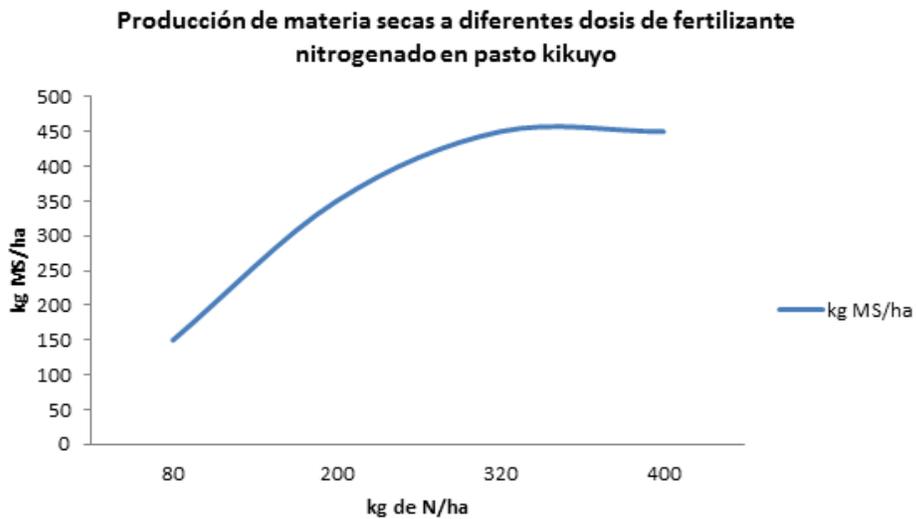


Figura 3: Rendimiento en materia seca en kg/ha de el pasto kikuyo (*C. clandestinus* (Host. ex Chiov.) Morrone) fertilizado con diferentes niveles de nitrógeno, en el estado de Mérida Venezuela. Tomado de (Diannelis et ál., 1994)

Importancia del nitrógeno en praderas de kikuyo

Los suelos derivados de cenizas volcánicas en general presentan concentraciones de N alrededor de 0,5% (Babbar y Zak, 1994). El N junto con el P son dos de los elementos limitantes en este tipo de suelo, el N es limitante porque parte de la materia orgánica que lo contiene esta inmovilizada y no lo hace disponible para la planta (Jaramillo, 2002), debido a la baja tasa de mineralización de la materia orgánica, la cual es lenta debido a la actividad microbiana que se ve afectada por las condiciones climáticas de baja temperatura, el bajo pH del suelo, la baja concentración de P disponible y el bajo contenido de otros minerales necesarios para la vida de los microorganismos, especialmente el bajo nivel de calcio disponible (Nájera et ál., 2006; Jaramillo, 2002). Por tanto, se hace necesaria la aplicación de altas cantidades de fertilizantes químicos que contengan N, el cual es el principal elemento que limita el crecimiento de las plantas forrajeras y en caso particular el de las gramíneas, ya que contribuye a incrementar la producción de materia verde e influye en la calidad de los pastos, al intervenir en el contenido de proteína cruda, la digestibilidad, la promoción y desarrollo de nuevos brotes al aumentar el número de hojas por planta y el área foliar (Urbano, 1997; Cabalceta, 1999; Rodríguez, 1999; Caro y Correa, 2006), lo que indica que es un elemento fundamental en los programas de fertilización encaminados a mejorar la producción del pasto para la alimentación animal (Rincón et ál., 1998). En el caso de los sistemas de producción bovina de leche, algunos autores han encontrado que para sostener una carga animal de cinco unidades animal (UA) por hectárea se deben aplicar alrededor de 350 kg N/ha/año (Rincón et ál., 1998). Castillo et ál., (1986) encontraron que la aplicación de 500 kg N/ha/año aumenta significativamente la cantidad de materia seca del pasto kikuyo producida por hectárea sin importar la fuente como se ilustró en la figura 3, sin embargo cuando se incrementa la dosis de fertilizante los porcentajes de materia seca del pasto descienden debido a que las dosis altas de este se traduce en un mayor crecimiento asociado a un forraje más tierno y succulento; cuando se aplican dosis menores de 500 kg N/ha/año, como por ejemplo dosis entre 0 y 125 kg N/ha/año, se obtienen porcentajes mayores de materia seca (Rincón et ál., 1998). Las altas aplicaciones de N por hectárea traen consigo una disminución en la eficiencia del uso de este elemento y los kilos de materia seca producidos por kg de nitrógeno aplicado (Rincón et ál., 1998) aumentándose de esta forma los costos de producción por aplicación de fertilizantes nitrogenados y el daño ambiental causado por este (Torres, 2005). Existe una fuerte interacción entre el uso de fertilizantes y el periodo de descanso; el efecto de la fertilización nitrogenada es aumentar linealmente el crecimiento de la pastura con el fin disminuir los periodos de descanso de la pradera y que el animal consuma pastos más tiernos (Herrero et ál., 2000).

Importancia del fósforo en el pasto kikuyo

Después del N los dos elementos limitantes más comunes en el trópico son el P y el azufre (S) (Sánchez, 1981). Las deficiencias de P son muy comunes en Oxisoles, Ultisoles y Andisoles, suelos caracterizados por la alta capacidad de fijar este elemento (Sánchez, 1981; Jaramillo, 2011). La disponibilidad de P en el sistema suelo-planta-animal juega un rol fundamental definiendo la productividad del sistema, dado que la deficiencia de P provoca una marcada reducción en el crecimiento y en la calidad del forraje que consume el animal (Quintero y Boschetti, 2011). Las gramíneas responden muy bien a la adición de P cuando este es deficiente, pero las leguminosas son las que responden en mayor medida por ser más exigentes en este nutriente (Quintero y Boschetti, 2011). En pastos como el kikuyo las necesidades de P dependen más de las propiedades del suelo que de la misma planta, algunas especies que responden muy bien al N se consideran tolerantes a poco P disponible en el suelo (Silva et ál., 2010). Sánchez, (1981) indica que una alta tasa de crecimiento, a causa de la fuerte fertilización nitrogenada, aumenta la necesidad de P en las gramíneas forrajeras con buenos rendimientos como los del pasto kikuyo, el cual puede extraer hasta 70 kg de P/ha/año para producir grandes cantidades de materia seca, cantidad muy similar a la reportada por Hernández et ál., (2001) quienes encontraron que una dosis de 80 kg de P/ha/año es adecuada para la nutrición vegetal y actividad microbiana en suelos de trópico alto.

Efectos negativos de la aplicación de fertilizantes

La aplicación de fertilizantes y el riego no solo juegan un papel importante en el aumento de la producción forraje verde, el rendimiento final de materia seca y la producción animal (Haynes y Beare, 1996), sino que también la aplicación excesiva de fertilizantes como el sulfato de amonio puede cambiar algunas condiciones del suelo tales como el pH y la población de algunos microorganismos (Haynes, 2008). Las altas aplicaciones de fertilizantes nitrogenados, y los bajos niveles de calcio que producen ablandamiento de las paredes celulares, ocasionan en la planta mayor susceptibilidad al ataque de plagas como los áfidos quienes disminuyen el contenido de materia seca y la concentración de nutrientes en el pasto (Susan et ál., 2007). Cuando se tienen suelos que han sido sometidos a altas aplicaciones de N y se emplea fuentes de fertilizantes químicos u orgánicos como la porquinaza, el NO_3^- lo puede absorber la planta en forma incontrolada y solo usar una mínima parte, acumulando otra en el tejido vegetal notándose una disminución en la fertilidad de los hatos, e intoxicación en animales que consumen estas pasturas, debido a la acumulación de nitritos y nitratos en el torrente sanguíneo (Estrada, 2001; Cockburn et ál., 2013).

Estrategias de manejo biológico en kikuyo

Fertilización orgánica en pasto kikuyo: La materia orgánica del suelo es un atributo importante de la calidad del suelo, por ser fuente de energía y nutrientes para la microbiota del suelo y de nutrientes para las plantas en especial N, P y S aportados a través de mineralización; la materia orgánica presenta la capacidad de formar complejos con iones multivalentes y compuestos orgánicos que afectan la estabilidad de los agregados y la retención de agua (Sparling, 1997). La biomasa microbiana es el componente vivo de la materia orgánica del suelo que hace parte entre el 1% y el 5% de la biomasa microbiana (Sparling, 1997), esta juega un papel importante en el suelo porque es una fuente de nutrientes y agente de la descomposición de la hojarasca que interviene en la formación y degradación del material húmico (Haynes y Beare, 1996; Sparling, 1997).

Apráz et ál., (2003) evaluaron el efecto de la aplicación de estiércol bovino fresco en mezcla con fertilizante químico bajo labranza mínima, donde se encontró una producción en el pasto kikuyo de 5 t MS ha⁻¹ corte⁻¹, variables agronómicas como el índice de área foliar y la altura de la planta son superiores y los periodos de recuperación fueron menores de 55 días, lo que indica una respuesta positiva del kikuyo a la aplicación de materia orgánica. Burbano, (1989) sostiene que la aplicación de materiales orgánicos al suelo estimula el crecimiento de la población microbiana encargada de los procesos de nitrificación con lo cual se incrementa el nivel de nutrientes solubles para la planta; otras de las ventajas de aplicar estiércol a las praderas de kikuyo, es el aumento de la capacidad de retención de agua para crear las condiciones favorables en la entrega de nutrientes a partir de la materia orgánica, la cual al descomponerse produce ácidos orgánicos y dióxido de carbono que favorecen la solubilidad de minerales como el potasio y que las plantas al tomarlos puedan regenerar sus tejidos con mayor rapidez. (Burbano, 1989).

Otros productos de procedencia orgánica como los biosólidos, que son principalmente materiales orgánicos producidos durante el tratamiento de aguas residuales, también se han usado en la fertilización del kikuyo, estos productos se caracterizan por tener alta cantidad de nutrientes, contaminantes orgánicos e inorgánicos y cierta cantidad de patógenos (Zapata et ál., 2011). Los nutrientes que contienen estos productos en mayor cantidad son N, P y K. En cuanto a los contaminantes inorgánicos cabe resaltar los metales pesados, los cuales juegan un papel negativo, en los procesos vitales según las características y concentraciones en las que se encuentren en el ambiente, debido a que tienden a acumularse a lo largo de la cadena alimenticia, dado que no se degradan y son poco móviles, por lo cual no se aconseja utilizar estos productos si no se cuenta con una buena asesoría que vigile muy bien los niveles de estos metales pesados y no se sobre pasen los niveles admitidos en el suelo, para no causar excesos tóxicos para las plantas, los animales y el hombre. La razón por la que estos biosólidos son utilizados como fertilizantes, radica en el contenido de nutrientes y materia orgánica, que son vitales para el requerimiento nutricional del pasto y porque además mejoran las propiedades estructurales del suelo; el beneficio de este último, consiste en la unión de las partículas de los suelos en agregados estables, que produce una estructura que facilita la permeabilidad del agua y aire que reduce la escorrentía y los riesgos de erosión (Cano, 2012).

Empleo de bacterias fijadoras de nitrógeno de forma libre en gramíneas: La fijación biológica de nitrógeno (FBN) en la mayoría de cereales ha sido un reto importante de la investigación en la última década (Dobereiner, 1989). Estudios relacionados con la fijación biológica de N proporcionan una fuerte evidencia de que algunas gramíneas tropicales, especialmente la caña de azúcar (*Saccharum Officinarum* L.); arroz de tierras húmedas (*Oryza sativa* L.) y pasto kallar (*Leptochloa fusca* (L) Kunth.) puede obtener por lo menos parte de su N necesario con la fijación biológica de nitrógeno (N₂). Sin embargo, estos estudios no han proporcionado pruebas concluyentes de que estas plantas están involucradas en asociaciones simbióticas con las bacterias (James, 2000). Estimaciones del balance de N con arroz y especialmente la caña de azúcar indican que entre un rango de 10 a 50 % de la incorporación total de N de una planta se puede obtener mediante la fijación biológica de nitrógeno (Dobereiner, 1989). Estudios realizados con algunas cepas de bacterias como (*Azospirillum brasilense*) han mostrado aumentos significativos en los rendimientos de grano y en la incorporación total de N; se ha afirmado que esta cepa puede mejorar la asimilación de fertilizantes, ya sea por los cambios en la estructura de la raíz o por la ayuda de la enzima bacteriana nitrato reductasa (Dobereiner, 1989; James, 2000).

Empleo de hongos micorrícicos: Las micorrizas (del griego *mykes* – hongo, *rhiza*- raíz) son la asociación mutualista entre los hongos del suelo y las raíces de las plantas, donde la planta hospedera recibe nutrientes minerales del suelo aportados por el hongo mientras este toma compuestos de carbono derivados de la fotosíntesis (Sosas et ál., 2006). En pasturas se ha encontrado que las asociaciones simbióticas con hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) aumenta la asimilación de nutrientes principalmente P debido a que el diámetro y la longitud de sus hifas le permite a la planta explorar un mayor volumen del ambiente edáfico, además permite la formación de micro y macro agregados que actúa como mejoradores de las características físicas del suelo (Ramos, 2004).

Los hongos formadores de micorrizas arbusculares (Filum: *Glomeromycetes*), representan entre 5-50 % de la biomasa de los microorganismos del suelo (Olsson et ál., 1999). La biomasa de las hifas de los hongos puede ascender a 54-900 kg/ha (Zhu y Miller, 2003). Las glomalinas que producen los HFMA es una glicoproteína que protege a las hifas durante el transporte de nutrientes desde la planta hasta el extremo de la hifa, y desde el suelo hasta la planta. Una vez que las hifas dejan de transportar nutrientes, la glomalina contenida en sus células se libera y se acumula en el suelo, representando el 5% del contenido de carbono (C) y nitrógeno (N) edáfico (Treseder y Turner, 2006). Allí esta glicoproteína actúa como un aglutinante de minerales y materia orgánica, por lo que está en directa relación con la estabilidad de agregados y la estructura del suelo (Grümberg et ál., 2010). La glomalina producida por hongos formadores de micorrizas puede exceder de la biomasa microbiana del suelo en un factor de 10-20 (Rillig et ál., 2001).

Casi todos los cultivos tropicales, son muy sensibles a las micorrizas arbusculares (Norman et ál., 1995). Sólo unas pocas familias y géneros de plantas generalmente no forman simbiosis con las micorrizas arbusculares, dentro de los que están las *Brassicaceae*, *Caryophyllaceae*, *Cyperaceae*, *Juncaceae*, *Chenopodiaceae*, y *Amaranthaceae*, aunque

cada una de estas familias tiene algunos representantes que son por lo general colonizadas por hongos micorrícicos (Norman et ál., 1995). La capacidad de los hongos micorrícicos para mejorar la captación de nutrientes de la planta hospedante, en particular P y varios micronutrientes, ha sido el efecto más reconocido de las micorrizas. Reportes en gramíneas como el millo perla (*Pennisetum americanum* L.), inoculado con *Gigaspora margarita*, *Glomus fasciculatum* y *Azospirillum brasilense*, han indicado un aumento significativo en los contenidos de materia seca, lo cual es atribuido a la asociación establecida por las micorrizas a la especie (*P. americanum* L.) y al transporte de P por parte de estas hacia la planta (Subba et ál., 1985). Mahesh et ál., 2010 evaluó la respuesta a la micorrización y no micorrización en Bajra (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) cultivado bajo condiciones de estrés por salinidad, y se encontró que la especie de micorrizas *Glomus fasciculatum* asociado con Bajra (*P. glaucum* (L.) R. Br.) incrementó significativamente la producción de material verde y seco bajo todos los niveles de estrés por salinidad, comparado con la actividad de las fosfatasa que fue significativamente mayor cuando el nivel de salinidad era bajo, lo que indica que los bajos niveles de salinidad conducen a incrementar la captación de P gracias a las micorrizas (Mahesh et ál., 2010). Los hongos formadores de micorrizas arbusculares no solo permiten movilizar y mejorar la absorción de elementos como el P para la planta (Xiao et ál., 2010), sino que también desempeñan un papel importante para la adquisición de N para la planta (Wang et ál., 2010). Según Azcón et ál., (1982); Ames et ál., (1984); Barea et ál., (1987) los hongos micorrícicos tienen un efecto directo en la absorción de N en el sistema simbiótico formado entre el hongo y las raíces de la planta. Existe un mayor crecimiento de las plantas cuando estas están sometidas a niveles de NO_3^- y sus raíces se encuentran asociada con las micorrizas (Barea et ál., 1989; Azcón et ál., 1991; Azcón et ál., 1992), micorrizas como *Glomus etunicatum* han mostrado un aumento significativo en la toma de nutrientes en especial N y P, pero también otros elementos como K, Ca, Mg y Zn (Cuenca y Azcón, 1994).

Asociación de kikuyo con otras especies vegetales: Una de las vías para mejorar la calidad de la pastura y disminuir la cantidad de fertilizante aplicado a los potreros de pasto kikuyo es incluir leguminosas, de esta manera se podrá disminuir el uso de fertilizantes, ya que las leguminosas fijan de 150 a 500 kg N/ha/año, (Diannelis et ál., 1994). Una de las especies capaces de fijar N que se encuentra adaptada a la zona de vida del kikuyo es el aliso (*Alnus acuminata* Kunth.) que no es leguminosa pero presenta nódulos en la raíz como consecuencia de la simbiosis con un actinomiceto del género *Frankia* de la especie *F. alni*, capaz de fijar el N atmosférico (Muñoz et ál., 2011). En Colombia en una plantación de aliso de dos años, con una densidad de 1.600 árboles/ha y una altura promedio de 6,2 metros puede incrementar el N en el suelo de 279 kg N/ha/año, de esta forma el pasto kikuyo que crece bajo esta especie puede contener el doble de proteína que el mismo pasto a plena exposición solar (Ospina et ál., 2005). Mendoza, (1988) evaluó el kikuyo con N, sin N y en asociación con leguminosas y observó que el rendimiento de biomasa aérea del kikuyo fue de 14,4 Ton MS/ha/año cuando se asoció con leguminosas y de 7 Ton MS/ha/año cuando el kikuyo estaba puro sin socio. Para el caso de producción de biomasa en asociación de gramínea. Leguminosa en otras latitudes, Leep et ál., (2002); Cárdenas,

(2008) reportará rendimientos en la mezcla de *D. glomerata* y *F. arundinacea* con *L. corniculatus* de 9,59 y 10,0 ton MS/ha/año respectivamente.

Estrategias de manejo que permiten disminuir la cantidad de fertilizantes

Las recomendaciones de aplicaciones de fertilizante nitrogenado para producción de kikuyo se encuentran entre 250 y 500 kg N/ha/año (Carrera, 2011; Castillo et ál., 1986); también es importante la aplicación de P el cual está entre 70 - 80 kg/ha/año (Sánchez, 1981; Hernández et ál., 2001). Con esta práctica de fertilización se garantiza siempre una buena producción de forraje aunque los costos de producción se aumentan (Paladines e Izquierdo, 2007). Sin embargo, las estrategias de usar métodos orgánicos para la disminución de fertilizantes químicos resultan viables, ya que son métodos fáciles de realizar y de bajo costo. En gramíneas como el kikuyo que tiene un alto requerimiento de N y P la presencia de HFMA y algunas bacterias del suelo, estimulan la incorporación de N a la pastura y la translocación de P del suelo a la planta que estimularía el crecimiento apical y radicular de la raíz de la planta hospedera (Raiman et ál., 2007; Matsumoto et ál., 2005; James, 2000; Cuenca y Azcón, 1994). Otra estrategia es la combinación de fertilizantes químicos con estiércoles que mejoran la estabilidad de C y N, lo que trae beneficios en las propiedades químicas, físicas y biológicas del suelo (Ayuke et ál., 2011). La fijación de N por bacterias asociadas a las leguminosas puede llegar hasta 726 kg N ha/año, por tanto, se puede disminuir la aplicación fertilizantes nitrogenados y como tal representando un ahorro de dinero para el productor, la reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) para la atmosfera y un ahorro ambiental a través de la reducción del riesgo de lixiviación de nitratos (Neal et ál., 2013).

Consideracion final

Es necesario buscar nuevas alternativas en la fertilización del pasto kikuyo que involucren el uso de biotecnologías y productos orgánicos y menor de uso de los fertilizantes químicos. De acuerdo a esta revisión bibliográfica, varios estudios acerca del uso de estas alternativas de manejo en la fertilización de este pasto son exitosos; sin embargo, aún no se ha explorado a profundidad el uso de los microorganismos del suelo, en especial los hongos micorrícicos, y su relación con la disminución de la aplicación de fertilizantes nitrogenados y fosfóricos y su efecto en la productividad del pasto kikuyo. Alternativa que ha sido evaluada en otros tipo de plantas con buenos resultados con respecto a la productividad y calidad de forrajes, por lo que queda abierta la posibilidad de explorar más esta alternativa en los sistemas especializados de producción bovina establecidos bajo pasto kikuyo, donde se le pueda ofrecer información necesaria a los productores y técnicos acerca de la fertilización y manejo de uno de los pastos más importantes para la producción de leche en el trópico alto.

Referencias bibliográficas

- Ames RN, Porter LK, St John TV and Reid CP. Nitrogen source and "S" values for vesicular-arbuscular and non-mycorrhizal sorghum grown at three rates of 15N-ammonium-sulphate. *New Phytol.* 1984; 97: 269-276.
- Apráez JE, Moncayo AO. Caracterización agronómica y bromatológica de una pradera de kikuyu (*Cenchrus clandestinus* (Hoechst. ex Chiov.) Morrone) sometida a rehabilitación mediante labranza y fertilización orgánica y/o mineral. *Colombia Lead.* 2003; 10: 25 – 35.
- Aspinall R J, Mandaluniz N, High LJ, Lucas RJ. Sodium deficiency in Canterbury and central Otago sheep pastures, *Proceedings of the New Zealand Grassland Association.* 2004; 66: 227-232.
- Awad AS, Edwards DG and Huett DO. Seasonal changes in chemical composition of heavily fertilized kikuyu and their potential effects on the mineral nutrition of cattle. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry.* 1979; 19: 1183-191.
- Awad AS and Edwards DG. Reversal of adverse effects of heavy ammonium sulphate application on growth and nutrient status of kikuyu pasture. *Plant and soil science.* 1977; 48: 169-183.
- Awad AS, Edwards DG and Milham P. Effect of soil pH and phosphate on soluble aluminium and on growth and composition of kikuyu grass. *Plant and soil science.* 1976; 45: 531-542.
- Ayuke FO, Brussaard L, Vanlauwe B, Six J, Leler DK, Kibunja CN and Pulleman MM. Soil fertility management: Impact on soil macrofauna soil aggregation and soil organic matter allocation. *Applied soil ecology.* 2011; 48: 53-62.
- Azcón R, Rubio R and Barea JM. Selective interactions between different species of mycorrhizal fungi and *Rhizobium meliloti* strains and their effects on growth, N₂-fixation (15N) and nutrition of *Medicago sativa*. *New Phytol.*, 1991; 117: 399-404.
- Azcón AC and Barea JM. Interactions between mycorrhizal fungi and other rhizosphere microorganisms. In: Allen MJ (eds) *Mycorrhizal functioning. An integrative plant-fungal process.* Routledge, Chapman and Hall New York. 1992; 163-198.
- Azcón R, Gómez OM and Barea JM. Comparative effects of foliar or soil-applied nitrate on vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in maize. *New Phytol.* 1982; 92: 553-559.

Barea JM, Azcón AC and Azcón R. Vesicular-arbuscular mycorrhiza improve both symbiotic N₂-fixation and N uptake from soil as assessed with a ¹⁵N technique under field conditions. *New Phytol.* 1987; 106: 717-725.

Babbar L and Zak D Nitrogen cycling in coffee agroecosystems: net N mineralisation and nitrification in the presence and absence of shade trees Agriculture. *Agroecosystems and Environment.* 1994; 48:107–11.

Bernal J. Manual de Nutrición y Fertilización de Pastos. *International plant nutrition institute* (IPNI); 2003. p. 94.

Bertsch, F. 1986. Manual para interpretar la fertilidad de suelos en Costa Rica. Programa de Comunicación Agrícola. *Universidad Nacional de Costa Rica.* 1986; 2:56.

Burbano H. El suelo. Una visión sobre sus componentes biorgánicos. Pasto, Colombia, *Universidad de Nariño serie de investigación*, # 1; 1989. p. 447.

Cabalqueta, G. Fertilización y nutrición de forrajes de altura. Centro de investigaciones agronómicas. Universidad de Costa Rica. XI congreso nacional agronómico. *III congreso nacional de suelos*; 1999. p. 239-254.

Cano LN. Análisis mediante el método emergetico de la disposición de los lodos producidos en una planta de tratamiento de aguas residuales. (Aplicación a una PTAR en el área metropolitana del valle de Aburrá). *Universidad Nacional de Colombia Facultad de Minas Escuela de Geociencias y Medio ambiente Medellín*; 2012. p. 160.

Caro F y Correa HJ. Digestibilidad posruminal aparente de la materia seca, la proteína cruda y cuatro macrominerales en el pasto kikuyo (*Cenchrus clandestinum*) cosechado a dos edades de rebrote. *Livestock Research for Rural Development.* 2006; Volume 18, Article # 10 consultado noviembre 2013, en <http://www.lrrd.org/lrrd18/10/caro18143.htm>

Cárdenas EA. Alternativas forrajeras para clima frio en Colombia. Universidad Nacional de Colombia. 2008 Consultado marzo 20, 2013, disponible en <http://mvz.unipaz.edu.co/textos/lecturas/generalidades/fileevento-senti10332.pdf>

Carrera I. Fertilización del kikuyo *Cenchrus clandestinum* con tres fuentes nitrogenadas, dos sólidas y una líquida en tres niveles y dos frecuencias. Escuela politécnica del ejército revista virtual; 2011. Consultado abril 8, 2013, disponible en: <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/4815/1/T-ESPE-IASA%20I-004575.pdf>

Castañeda, D. y Úsuga, C. 2011. Fertilización sintética e inoculación de hongos micorriza arbuscular (HMA) en *Cenchrus clandestinum*. *Revista Politécnica.* 2011; 7 (13): 9-15.

Castillo J, Cowarand J, Sánchez C. and Jiménez C. Efecto de la fertilización nitrogenada en la época lluviosa sobre productividad, composición química y digestibilidad in vitro del pasto kikuyo bajo pastoreo en el Cantón de Coronado. *Agronomía Costarricense*. 1983; 7: 9-15.

Cockburn A, Brambilla G, Fernández ML, Arcella D, Bordajandi LR, Cottrill B, Peteghem, CV and Dorne JH. Nitrite in feed: From animal health to human health. *Toxicology and applied Pharmacology*. 2013; 270: 209- 217.

Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica) Caracterización de los sistemas de producción en los corregimientos de Barragán y Santa Lucia, Tuluá: Corpoica. 1994; Consultado enero 21, 2013, en http://www.agronet.gov.co/www/docs_si2/200681411731_Sistemas%20de%20produccion%20ganadera.pdf

Correa J, Pabón ML and Carulla JE. Valor nutricional del pasto kikuyo (*Cenchrus clandestinum* Hoechst Ex Chiov.) para la producción de leche en Colombia (Una revisión): I - Composición química y digestibilidad ruminal y posruminal. *Livestock Research for Rural Development*. 2008; 20 (59). Disponible en marzo 23, 2013, en <http://www.lrrd.org/lrrd20/4/corra20059.htm>

Cuenca G, Azcón R. Effects of ammonium and nitrate on the growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal *Erythrina poeppigiana* O.I. cook seedlings. *Biol. Fert. Soils*, 1994; 18: 249–254.

Davila, V.S. and Chaverra, A.G. Obtenga buenos resultados con el pasto kikuyo. *Instituto Colombiano Agropecuario*. 1968; # 25.

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

Dickenson B, Hyam G, Breytenbach S, Metcalf D, Basson D, Williams R, Scheepers L, Plint A, Smith H, Smith J, Van V, Viljoen H, Archibald P and Els J. *Kynoch Pasture Handbook*. First English Edition. Paarl print. Cape town, South Africa; 2004. p. 136.

Doberiner J. Recent advances in associatiens of diazotrophs with plant roots. *Embrapa-uapnp Biología do Solo*; 1986. p. 229- 242.

Dugmore J and Du TJ. The chemical composition and nutritive value of kikuyu pasture. *South African Journal of Animal Science*. 1988; 18: 72-75.

Dugmore TJ. Energy and mineral content of kikuyu. In: Proceedings of a technology day held at Cedara on 25 November 1998. P.E. Bartholomew (ed.), Pietermaritzburg: KwaZulu-Natal Department of Agriculture.

Echeverri J, Restrepo LF y Parra J. Evaluación comparativa de los parámetros productivos y agronómicos del pasto kikuyo *Cenchrus clandestinum* bajo dos metodologías de fertilización. *Revista lasallista de investigación*. 2010; 7(2): 94-100

Espinosa J. Evaluación agronómica de fertilizantes fosfatados en zonas altas de Ecuador. In L. León y O Arregoces. Memorias seminarios de alternativas sobre el uso como fertilizantes de fosfatos Nativos de Américas Trópico y subtropical. “7° congreso Ecuatoriano de ciencias del suelo”. Santo Domingo; 1987. p. 1-10.

Estrada J. Pastos y forrajes para el trópico Colombiano. Manizales: *Universidad de Caldas*; 2001. p. 511.

Evans T. and Hacker, J. 1992. An evaluation of production the potential of six tropical grasses under grazing 2. Assessment of quality using variable stocking ates. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 32: 29-37.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) *Los fertilizantes y su uso*. Cuarta edición. Roma. 2001; Consultado agosto, 12, 2013, disponible en: <http://ftp.fao.org/agl/agll/docs/fertuso.pdf>

FEDEGAN (Fondo Nacional del Ganado). *La ganadería bovina en Colombia*, 1998 – 1999. Santafé de Bogotá, Colombia; 1999. p. 261.

Grümberg B, Conforto C, Rovea A, Boxler M, March G, Luna C, Meriles J y Gil V. “La glomalina y su relación con la productividad del cultivo de maíz”. *XXII Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo – AACCS – Rosario*. 2010; Consultado junio 19, 2013. Disponible en: [http://www.ipni.net/publication/ialacs.nsf/0/37F9697432A90ED6852579840057AFAE/\\$FILE/23.pdf](http://www.ipni.net/publication/ialacs.nsf/0/37F9697432A90ED6852579840057AFAE/$FILE/23.pdf).

Haynes J and Beare M. Aggregation and organic matter storage in meso-thermal, humid soils. In: Carter MR, Stewart BA (eds) *Advances in soil science*. Structure and organic matter storage in agricultural soils. *CRC Press, Boca Raton*: 1996. p. 213–262.

Haynes J and Williams P. Nutrient cycling and soil fertility in the grazed pasture ecosystem. *Adv. Agron*. 1993; 49:119–199.

Haynes RJ. Soil Organic Matter Quality and the Size and Activity of the Microbial Biomass: Their Significance to the Quality of agricultural Soils School of Applied Environmental Sciences, University of KwaZulu-Natal, Pietermaritzburg, Private Bag X01,

- Scottsville 3200, South Africa. *Soil mineral microbe – organic interaction*. 2008; 201 – 231. Consultado agosto 13, 2013, disponible en: <http://aplicacionesbiblioteca.udea.edu.co:2058/science/article/pii/S0953756208600854>.
- T.W., J. Ectomycorrhizal fungi and their leguminous hosts in the Pakaraima Mountains of Guyana. *Mycological Research*. 2002; 106 (5): 515-531.
- Hernández PD y Davila ZD. Efecto del fósforo sobre la población microbiana en suelos con pasturas en la zona alta andina de Junin. *Ecología aplicada* (1). 2000. Consultado junio 19, 2013. Disponible en: <http://www.lamolina.edu.pe/ecolapl/Art%C3%ADculo%209.pdf>
- Herrero M, Fawcett R and Dent JB. Modelling the growth and utilisation of kikuyu grass (*Cenchrus clandestinum*) under grazing. 2. Model validation and analysis of management practices. *Agricultural systems*. 2000; 65: 99-111.
- Holm LG, Plucknett DL, Pancho JV and Herberger JP. The world's worst weeds: distribution and biology. *University Press of Hawaii, Honolulu*; 1977. p. 609.
- James EK. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. Department of Biological Sciences, University of Dundee, Dundee, Scotland DD1 4HN, UK. 2000. Consultado en Julio 23, 2013. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/journal/03784290/65/2>
- Jaramillo D. Introducción a la Ciencia del Suelo. Medellín: Universidad Nacional de Colombia, *Facultad de Ciencias*; 2002. p.613 p.
- Jaramillo, R. 2012. Manejo de la fertilidad en suelos volcánicos (Andisoles). International plant nutrition institute. Ecuador. Consultado septiembre 19, 2013. Disponible en: [http://nla.ipni.net/ipniweb/region/nla.nsf/0/7750DA31D58BAF3605257ABC005DEE3E/\\$FILE/Andisoles.pdf](http://nla.ipni.net/ipniweb/region/nla.nsf/0/7750DA31D58BAF3605257ABC005DEE3E/$FILE/Andisoles.pdf)
- Leep R, Jeranyama P, Min D, Dietz T and Bughrara S. Grazing effects on herbage mass and composition in grass – birdsfoot trefoil mixtures. *Agronomy journal*. 2002; 94:1257 – 1262.
- Lira SR. Fisiología vegetal. 2ª ed. Universidad Autónoma Agraria Antonio Navarro. México; 2007. p. 237.
- Lizcano, A., Herrera, C., Santamarina, C. 2006. Suelos derivados de cenizas volcánicas en Colombia. *Revista Internacional de Desastres Naturales, Accidentes e Infraestructura Civil*. 2006; 6(2): 167-196.
- Mahesh B, Mayura D and Paramjit J. 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, India; 2010. p. 265-271.

Marais J. Factors affecting the nutritive value of kikuyu grass (*Pennisetum clandestinum*) a review; 2001. p. 65-84.

Matsumoto L, Martines A, Avanzi M, Albino U, Brasil C, Saridakis D, Rampazo, L., Zangaro W. and Andrade G. "Interactions among functional groups in the cycling of, carbon, nitrogen and phosphorus in the rhizosphere of three successional species of tropical woody trees". *Applied soil Ecology*. 2005; 28: 57- 65.

Mears PT. Kikuyu (*Cenchrus clandestinum*) as a pasture grass – a – Review. *Tropical grasslands*. 1970; 4 (2): 131-152.

Medina I. Crecimiento, producción y valor nutritivo del pasto Kikuyo (*Cenchrus clandestinum*). Boletín Técnico del Programa Ganadería de Altura PROGAL. 1982; 23: 1-2.

Mendoza M. 1988. Siembra, manejo y producción de pastos y forrajes de clima frío. En: Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). Producción y salud en ganado de leche, Santafé de Bogotá; 1988. p. 115.

Messman MA, Weiss WP and Erickson D. Effects of nitrogen fertilization and maturity of brome grass on nitrogen and amino acids utilization by cows. *J Anim Sci*. 1981; 70: 566.

Mikola U. Relationship between nitrogen fixation and mycorrhiza. MIRCEN. *Journal of applied microbiology and biotechnology*. 1986; 2: 275-282.

Miles N. Responses of productive and unproductive kikuyu pastures to topdressed nitrogen and phosphorous fertiliser. *African Journal Range and Forage Science*. 1999; 14: 1-6.

Miles N, De Villiers J and Dugmore T. Macro mineral composition of kikuyu herbage relative to the requirements of ruminants. *Journal of the South African Veterinary Association*. 1995; 66: 206-212.

Milne R and Haynes R. Soil organic matter, microbial properties, and aggregate stability under annual and perennial pastures. *Biol Fertil Soils*. 2004; 39: 172–178.

Mojica JE, Castro E, León J, Cárdenas EA, Pabón ML, Carulla JE. Efecto de la oferta de pasto kikuyo (*Cenchrus clandestinum*) sobre la producción y calidad composicional de la leche bovina. *Livestock Research for Rural Development*. 2009; 21(1). Consultado abril 24, 2013, en Recuperado de <http://www.lrrd.org/lrrd21/1/moji21001.htm>

Molina, E. 1998. Encalado para la corrección de la acidez del suelo. Centro de Investigaciones Agronómicas Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica; 1998. p. 45.

Muñoz HE, Silvia PA y Navia J. Evaluación del estado actual del Nitrógeno en el arreglo silvopastoril aliso (*Alnus jorullensis* H B & K) kikuyo (*Cenchrus clandestinum* (Hochst. ex Chiov.) Morrone). *Revista de Ciencias agrícolas*. 2011; 28 (1): 161-175.

Murtagh GJ. The effect of evaporative demand on the growth of well-watered kikuyu. Department of Agriculture, Wollongbar, N.S.W. 2480 Australia. 1978; (19): 379–389

Murtagh GJ. Factors affecting the growth of kikuyu 2. Water supply. *Australian Journal of Agricultural Research*. 1988; 39: 43-51.

Miyasakaa CS, James D, Hansenb McDonaldc T, Glen K. Effects of nitrogen and potassium in kikuyu grass on feeding by yellow sugarcane aphid. *Crop Protection*. 2007; 26: 511–517.

Nájera L, Gómez R, Hernández D, Solís DJ y López P. Mineralización en suelos con incorporación de residuos orgánicos en los altos de Chiapas, México. *Universidad y Ciencia*. 2006; 22 (2): 163-174.

Neal JS, Eldridge SM, Fulkerson WJ, Lawrie R and Barchia IM. Difference in soil carbon sequestration and soil nitrogen among forages used by the gairy industry. *Soil biology & biochemistry*. 2013; 57: 542 – 548.

Norman M, Pearson CJ and Searle PG. The Ecology of tropical Food Crops. Cambridge University Press, Cambridge. 1983; octubre 20, 2013, disponible en http://journals.cambridge.org/download.php?file=%2FEAG%2FEAG20_04%2FS0014479700017956a.pdf&code=520b035929342152ad870197ef071dd8.

Olsson PA, Thingstrup I, Jakobsen I and Baath E. Estimation of the biomass of arbuscular mycorrhizal fungi in a linseed field. *Soil Biol. Biochem*. 1999; 31: 1879–1887.

Ospina C, Hernández R y Gómez D. Guías silviculturales para el manejo de especies forestales con miras a la producción de madera en la zona andina colombiana. El Aliso o Cerezo (*Alnus acuminata* (H.B.K.) ssp. Serie Cartillas divulgativas Cenicafe; 2005. Consultado agosto 12, 2013, disponible en http://www.cenicafe.org/es/index.php/nuestras_publicaciones/boletines_tecnicos

Paladines O y Izquierdo F. Fertilización de Pasturas en el Centro Norte de la Sierra Ecuatoriana. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central del Ecuador;2007. p. 21.

Parsons, A.J., Leafe, E.L., Collett, B., Penning, P.D. and Lewis, J. 1983. The physiology of grass production under grazing. Photosynthesis, crop growth and animal intake of continuously grazed swards. *Journal of Applied Ecology*. 1983:20: 127-139.

Paula MA, Siqueira JO and Dobereiner J. Ocorrência de fungos micorrízicos vesicularbusculares e de bacterias diazotróficas na cultura da batata-doce. *Rev. Bras. Ci. Solo*. 1993; 17: 349–356.

Pérez A, Rojas S, Montes J y Donicer V. Hongos formadores de micorrizas arbusculares: una alternativa biológica para la sostenibilidad de los agroecosistemas de praderas en el Caribe colombiano. Revisión. *Revista colombiana de ciencias animales*. 2011; 3(2): 366-385

Quintero CE y Boschetti NG. Manejo del fósforo en pasturas. Facultad de ciencias agronómicas; 2011. Consultado junio 19, 2013, disponible en <http://www.elsitioagricola.com/articulos/quintero/Manejo%20del%20Fosforo%20en%20Pasturas.asp>

Raiman MP, Albino U, Cruz MF, Lovato GM, Spago F, Ferracin TP, Lima DS, Goulart T, Bernardi CM, Miyauchi M, Nogueira MA and Andrade G. Interaction among free-living N-fixing bacteria isolated from *Drosera villosa* var. *villosa* and AM fungi (*Glomus clarum*) in rice (*Oryza sativa*). *Applied Soil Ecology*. 2007; 35: 25 – 34.

Ramos J. Arbuscular micorrízico fungi in tropical forest restoration. *Rev. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia*, Universidad Autónoma de Yucatán. Número Especial. 2004; 1: 59-65.

Reeves M, Fulkerson WJ, Kellaway RC and Dove HA. Comparison of three techniques to determine the herbage intake of dairy cows grazing kikuyu (*Cenchrus clandestinum*) pasture. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 1996; 36: 23-30.

Rillig M, Wright S, Nichols K, Schmidt F and Torn M. Large contribution of arbuscular micorrízico fungi to soil carbon pools in tropical forest soils. *Plant Soil*. 2001; 233: 167–177.

Rincon X, Montilla M, García L y González B. Respuesta del pasto kikuyo (*Cenchrus clandestinum*) a diferentes dosis de nitrógeno. *Revista científica Facultad de Ciencias veterinarias*. 1998; 8 (4): 308-311.

Rodríguez D. Caracterización de la respuesta a la fertilización en producción y calidad forrajera en los valles de Chiquinquirá y Simijaca (Estudio de caso). Trabajo de grado, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional, sede Bogotá. 1999 p 59.

Rumball PJ. The performance of several sub-tropical grasses in the Northland and Hill Pastures, *NZ J. Agric.* 1991; 34: 375/382.

Russel JS and Webb HR. Climatic range of grasses and legumes used in pastures, *J. Aust. Inst. Agric. Sci.* 1976; 42: 156-163.

Sánchez P. 1981. Suelos del trópico. Características y manejo. Instituto Interamericano de Cooperación para la agricultura. *Serie de materiales educativos* 48, San José (Costa Rica); 1981. p. 260.

Skerman PJ and Riveros F. Tropical grasses. FAO Plant Production and Protection Series. 1990; No. 23, FAO, Rome. Consultado febrero 22, 2013, disponible en <http://books.google.com/books?id=tCydcW6MK60C>.

Silva A, Menjivar JC, Alava CA y Gómez HF. Efecto de la fertilización con nitrógeno, fósforo y azufre sobre la recuperación de una pradera degradada de kikuyo (*Pennisetum clandestinum*). En Nariño, Colombia. XII Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del suelo. 16-17 de noviembre; 2010. p. 1-10.

Sosas RT, Sánchez NJ, Morales GE y Cortes CF. Interacción micorrizas arbusculares *Thichiderma harzianum* (Moniliaceae) y efectos sobre el crecimiento de *Brachiaria decumbens* (poacea). *Acta Biologica Colombiana*. 2006; 11(1): 43 – 54.

Sowerbya A, Balla AS, Graya T, Newtonb PCD and Clarkb H. Elevated atmospheric (CO₂) from a natural soda spring affects the initial mineralization rates of naturally senesced C3 and C4 leaf litter. *New Zelanda Soil Biology & Biochemistry*. 2000; 32: 1323 1327.

Sparling GP. Soil microbial biomass, activity and nutrient cycling as indicators of soil health. V.V.S.R. (eds.). *Biological Indicators of Soil Heath*. CAB International, Gupta; 1997. p. 67-119.

Subba, R., Tilak. K., and Singh. C. 1985. Effect of combined inoculation of *Azospirillum brasilense* and vesicular-arbuscular mycorrhiza on pearl millet (*Pennisetum americanum*). *Plant and soil*. 84: 283-286.

Torres M. Fertilizar eficientemente para reducir el riesgo ambiental: Nitrógeno. Medio ambiente info. 2005; Consultado enero 21, 2013, en disponible <http://vuwww.estrucplan.com.ar/articulos/verarticulo.asp?IDArticulo=559>

Treseder K, Turner K. Glomalin in ecosystems. *Soil Sci. S. Ambient. Journal*. 2006; 71: 1257–1266.

Urbano D. Efecto de la fertilización nitrogenada sobre el rendimiento y calidad de tres gramíneas tropicales; *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)*. 1997; 14: 129-139.

Van der and Colf J. The production potential of kikuyu (*Cenchrus clandestinum*) pastures over-sown with Ryegrass (*Lolium perenne* L.). University of Pretoria; 2008. Consultado febrero 2, 2013, disponible en <http://upetd.up.ac.za/thesis/available/etd-06232011-094642/unrestricted/dissertation.pdf>

Van Vuuren A., Tamminga AS, Ketelaar R. In sacco degradation of organic matter and crude protein of fresh grass (*Lolium perenne* L.) in the rumen of grazing dairy cows. *J Agric Sci.* 1991; 116: 429.

Wang SG, Hou YL, and Guo W. Responses of nitrogen transformation and Microbial community composition to nitrogen enrichment patch. *Pedobiologia.* 2010; 54: 9–17.

Whitney AS. Growth of kikuyugrass (*Cenchrus clandestinum*) under clipping 2. Regrowth characteristics in relation to nitrogen fertilization and climate. *Agronomy Journal.* 1974; 66: 763-767.

Xiao T, Yang Q, Ran W, Xu G and Shen Q. Effect of inoculation with arbuscular mycorrhizal fungus on nitrogen and phosphorus utilization in upland rice-mung bean intercropping system. *Agricultural Sciences in China.* 2010, 94: 528-535.

Zapata R, Osorio N, Berrio C y Sotelo M. Evaluación de los riesgos agronómico, ambiental y sanitario derivados de la aplicación directa de los biosólidos para el cultivo de pastos en un agroecosistema de vocación lechera del Norte de Antioquia. *Revista EPM.* 2011; 4: 8-38.

Zhu YG y Miller RM. Carbon cycling by arbuscular mycorrhizal fungi in soil—plant systems. *Trends Plant Sci.* 2003; 8: 407–409

1.2 Fisiología de los hongos formadores de micorrizas arbusculares

A. Ortiz-Acevedo, N. W. Osorio-Vega¹, J. Echeverri-Gómez, O. A. González-Murillo² y
M. Medina-Sierra

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

¹ Escuela de Biociencias, Biotecnología ambiental del suelo, Facultad de Ciencias,
Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín

² Abonamos S.A, km 3, vereda tablacita variantes Caldas, Medellín – Antioquia, Colombia
alejo0619@gmail.com

Livestock Research for Rural Development 27 (9) 2015

Resumen

Se realizó una revisión bibliográfica con el objetivo de comprender los mecanismos fisiológicos involucrados en la formación de la endosimbiosis entre las raíces y los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA). La endosimbiosis planta – HFMA es un proceso que requiere cambios en el desarrollo de las células de la raíz así como de las hifas de los hongos. Este proceso en gran parte está bajo el control de la planta, de su estado fisiológico y condiciones medio ambientales que la rodean. Actualmente se ha investigado un amplio grupo de compuestos químicos producidos por la planta y los hongos que controlan la simbiosis y las funciones de las micorrizas, entre los que se destacan las fitohormonas y algunas enzimas de los hongos que son fundamentales para la toma de nutrientes en el suelo y la adaptación de la planta a condiciones de estrés medio ambiental. Lo anterior resalta la importancia de algunos microorganismos del suelo como los HFMA en el manejo ecológico de los suelos tropicales.

Palabras claves: compuestos químicos, endosimbiosis, estrigolactonas, glomalina, HFMA (hongos formadores de micorrizas arbusculares), hifa.

Abstract

The aim of this review was to understand the physiological mechanisms involved in the formation of endosymbiosis between plant roots and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). Endosymbiosis process between plant and AMF requires changes in the development of both root cells and fungal hyphae. This process is dependent on the type of plant, its physiological state, and environmental conditions. Recently, a wide range of chemical compounds produced by plants and fungi that controls symbiosis processes and mycorrhizal functions has been investigated. Phytohormones and some mycorrhizal fungal enzymes are considered essential for nutrient uptake and plant adaptation to environmental stress conditions. Based on the observations that there are key components influencing symbiosis processes, the importance of some soil microorganisms, as the AMF, in the ecological management of the tropical soils is highlighted.

Keywords: AMF (Arbuscular Mycorrhizal Fungi), chemical compounds, endosymbiosis, glomalin, hyphae, strigolactones.

Introducción

Las micorrizas (del griego *mykes* – hongo, *rhiza* – raíz) son una asociación mutualista entre los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) que se encuentran en el suelo y las raíces de las plantas, el cual se fundamenta en que la planta hospedera recibe nutrientes minerales del suelo tomados por el hongo, mientras que estos toman compuestos carbonados derivados de la fotosíntesis (Sosas et ál., 2006). Entre los beneficios que los hongos brindan a la planta se encuentra una mejor nutrición con fósforo (P) el cual es el elemento que más atención ha recibido, sin embargo, los HFMA también pueden ser importantes en la toma de nutrientes necesarios para la planta como el nitrógeno (N) (Leigh et ál., 2009), zinc (Zn) (Atul et ál., 2009; Lambert et ál., 1979), cobre (Cu) (Marschner y Dell, 1994; Toler et ál., 2005) y hierro (Fe) (Kim et ál., 2009). Para los HFMA establecer la simbiosis y aportar estos nutrientes, primero deben colonizar el interior de la raíz, lo cual implica cambios en la célula vegetal, así como en las hifas de los HFMA. La colonización de las raíces es precedida por el mutuo reconocimiento entre la planta y el hongo, a través de moléculas que se difunden en el suelo (Bonfante y Requema, 2011; Nadal y Paszkowski, 2013). El hongo debe penetrar las células corticales de la raíz mediante sus hifas las cuales forman una estructura en forma de árbol llamada arbúsculo que a su vez forma la membrana peri-arbuscular (MPA) sitio de intercambio de nutrientes (Gutjahr et ál., 2012; Harrison, 2012). La formación intracelular de las estructuras fúngicas y el grado de colonización de las raíces es regulado por la planta a través de una reestructuración de las células de la raíz, las cuales tienen que disponerse para albergar el hongo, esta reorganización implica la expresión de un grupo de moléculas que activan un grupo de mecanismos fisiológicos en las células de la planta que en su gran mayoría son desconocidos y no han sido estudiados a fondo (Gutjahr, 2014). Sin embargo en los últimos años, estudios han tratado de revelar algunos factores y mecanismos químicos que están involucrados, donde no solo se involucran compuestos producidos por la planta como genes y hormonas, sino también algunos compuestos producidos por los HFMA (Gutjahr, 2014;

Parniske, 2008). El objetivo de esta revisión bibliográfica es explorar cuáles mecanismos fisiológicos de la planta y el hongo están involucrados en el proceso de formación de la asociación simbiótica, con el fin de comprender qué factores influyen en la presencia de los HFMA en los suelos sometidos a producciones agrícolas o pecuarias y qué beneficios obtiene la planta luego del establecimiento de la simbiosis.

Endosimbiosis de los HFMA

Importancia de la endosimbiosis y desarrollo de la misma

La simbiosis entre los hongos formadores de micorriza arbuscular (HFMA), es una de las asociaciones más distribuidas en agroecosistemas de la tierra ya que más del 80% de las especies vegetales pueden asociarse con los HFMA (Harley y Smith, 1983). Sin embargo actualmente este tipo de unión se define como una endosimbiosis donde un organismo habita en el interior de otro, en este caso una parte de la hifa permanece en el interior de la célula de la raíz (Parniske, 2008). Este tipo de endosimbiosis es importante, ya que las plantas suministran al hongo carbohidratos para su metabolismo y el hongo facilita los nutrientes que la planta requiere, en ambientes donde es limitada la disponibilidad de elementos como el P, N, Zn, Cu y Fe (Leigh et ál., 2009), Zinc (Zn) (Alkaraki et ál., 1998; Lambert et ál., 1979), Cu (Lambert et ál., 1979; Marschner y Dell, 1994; Toler et ál., 2005) y Fe (Kim et ál., 2009), además este tipo de asocio favorece la tolerancia de la planta a estrés biótico o abiótico, mejora las características físicas del suelo y la diversificación de las especies vegetales en los ecosistemas (Genre et ál., 2005; Smith y Read, 2008; Smith y Gianinazzi, 1988; Van der Heiden, 2002). Este asocio depende de un conjunto de señales bioquímicas y genéticas.

Fitohormonas en la formación de la endosimbiosis

Las fitohormonas son producidas por las plantas y están involucradas en todos los procesos de desarrollo de la planta, juegan un papel fundamental en las respuestas a las señales externas bióticas y abióticas; actualmente existen evidencias sobre su papel en la formación de la endosimbiosis (Gutjahr, 2014). Las estrigolactonas que se generan en la fase de pre-simbiosis, son carotenoides derivados de fitohormonas involucradas en la germinación de semillas, las estrigolactonas que además de desencadenar la respuesta para el desarrollo de los HFMA, también estimulan la producción de algunos oligómeros de quitina, como tetrámeros y pentámeros de quitina, que inducen las oscilaciones de Ca a nivel celular de las células epidermales, oscilaciones que son necesarias para la colonización (Genre et ál., 2013).

Fase pre-simbiótica

Es la primera fase de desarrollo de la simbiosis donde múltiples señales permiten que las esporas de los HFMA germinen y comience el desarrollo de las hifas (Parniske, 2008). Las plantas sometidas a estrés por falta de P disponible emiten señales bioquímicas a través de las raíces (Akiyama et ál., 2005). Las estrigolactonas son compuestos químicos identificados en las plantas sometidas a bajos niveles de P; estos compuestos pertenecen al grupo de lactonas sesquiterpénicas caracterizadas por su corta duración en la rizosfera debido a su enlace éter lábil que se hidroliza fácilmente; sin embargo, cumple una función importante de estimular la germinación de las semillas de arvenses e inducen la germinación de las esporas y la ramificación de las hifas de los HFMA (Bonfante, 1984; Bouwmeester et ál., 2003; Parniske, 2008). Otros compuestos como el CO₂ liberado por las raíces es fundamental para la germinación de esporas y el crecimiento de las hifas (Beard y Price, 1989), igual que algunos metabolitos secundarios de la planta como los flavonoides que están involucrados en la ramificación de las hifas (Mendoza et ál., 1997; Vierheilig et ál., 2006). La percepción de estas señales causa en el hongo alteraciones en la fisiología y en la actividad mitocondrial, en especial cuando la espora entra en contacto con las estrigolactonas las cuales son responsables de la respiración fúngica y el catabolismo de los lípidos (Besserer et ál., 2006). En las raíces se produce un conjunto de señales que inducen la simbiosis y algunas respuestas específicas que se conocen con el nombre de factor Myc, las estrigolactonas estimulan la producción de este factor en el hongo y ayudan a activar la expresión de genes ENDO11 producidos en el hospedero (Akiyama y Hayashi, 2006). Este grupo de genes permite dar inicio a la siguiente fase de desarrollo de la endosimbiosis (Bonfante y Requena, 2011).

Fase simbiótica

Una serie de cambios en las células de la raíz estimulados por el gen ENDO11 y los factores Myc permiten que se forme el aparato de pre-penetración (APP) (Genre et ál., 2005), el cual es una estructura subcelular que predetermina la senda de crecimiento del hongo a través de la célula de la planta (Genre et ál., 2005). La formación del APP es precedida por una migración del núcleo de la célula vegetal hacia el punto de entrada del hongo y de la formación del apresorio que es una hinchazón de la hifa que se adjunta a la epidermis de la planta huésped para iniciar la colonización (Bonfante y Genre 2008). La formación de APP tarda de cuatro a cinco horas luego que se forma el apresorio y el desplazamiento del núcleo de las células corticales de la raíz justo debajo del apresorio genera una reorganización de los microtúbulos corticales (Genre et ál., 2005). El APP se forma dentro de la columna citoplasmática donde corre paralelamente una matriz de alta densidad de microtúbulos y microfilamentos (Genre et ál., 2005); antes y durante la formación de esta estructura, se da la expresión del gen ENDO 11 que inicia su función en las células epidérmicas, el cual codifica una proteína que hace parte de la matriz extracelular vegetal. En el momento que el APP comienza a crecer el núcleo que se encuentra delante del apresorio comienza nuevamente a desplazarse delante del APP formándose un “túnel transcelular” que va a ser el encargado de conectar el núcleo con el sitio donde se formó el apresorio a través de una hifa fúngica (Parniske, 2008). En la formación de la simbiosis de los HFMA se conoce la vía común SyM (Parniske, 2008), la

cual es una cascada de señales que producen la activación de genes que van a producir cambios a nivel celular, siendo un proceso similar al ocurrido en la simbiosis leguminosa – rizobio (Parniske 2008). Además existe otro factor como el Nod que también es requerido en la simbiosis leguminosa – rizobio y en la asociación planta HFMA (Oldroyd y Downie, 2006).

(Genre et ál., 2005), indican que una estimulación mecánica de la célula vegetal puede inducir la migración del núcleo al sitio de perturbación; esta respuesta es independiente si existe una vía común SyM con activación de genes DMI2 y DMI3 los cuales son encargados de inducir la formación del APP (Siciliano et ál., 2007). La vía común SyM están involucradas en las etapas tempranas de transducción de señales simbióticas que implica la generación y decodificación de oscilaciones de calcio alrededor del núcleo y causa la inducción de principios de la expresión de genes relacionados con la simbiosis como DMI3 (Parniske, 2008).

Desarrollo del arbúsculo

Las células epidermales durante el ingreso de la hifa producen la expresión de los genes ENDO (Genre et ál., 2005). Esta señal marca el camino de la colonización y una vez la hifa del hongo alcanza las células corticales se producen señales específicas para la formación del arbúsculo donde existe una mayor reorganización celular; a medida que la hifa penetra en las células corticales la membrana plasmática de las células de la planta se invagina y extiende para formar la membrana peri-arbuscular (MPA) (Bonfante, 1984; Cox y Sanders, 1974; Toth y Miller, 1984), la reorganización celular incluye la acumulación de citoplasma, el retículo endoplasmático (ER), aparato de Golgi, plástidos y las mitocondrias en el área alrededor de las hifas que se ramifican para formar el arbúsculo (Bonfante, 1984; Cox y Sanders, 1974). Actualmente las señales y genes reguladores de las células corticales que permiten la función de desarrollar el arbúsculo son poco conocidas (Harrison, 2012), sin embargo algunos compuestos involucrados han sido identificados tales como vapyrin/PAM1, transportadores ABC, STR/STR2 y algunas proteasas como SbtM1 que se localizan en el espacio de la MPA, lugar de intercambio de nutrientes entre la planta y el hongo (Genre et ál., 2005; Gutjahr et ál., 2012; Reinhardt, 2007; Takeda et ál., 2009). Para el desarrollo del arbúsculo de la micorriza (Kistner et ál., 2005), reporta al menos siete genes que son necesarios, estos genes codifican proteínas que son directa o indirectamente las involucradas en una red de transducción de señales, que se requieren para el desarrollo intracelular de estructuras encargadas de alojar el hongo simbiótico como APP y las bacterias en el caso de los fijadoras de nitrógeno. Según (Parniske, 2008), se requiere de los genes *CCaMK* (Calmodulina) y *CYCLOPS* para el desarrollo del arbúsculo; el gen *CCaMK* juega un papel importante ya que tras las oscilaciones de calcio en la célula se genera la activación de una proteína quinasa, la cual es dependiente de Ca y *CCaMK* (Calmodulina); con la activación de las quinasas se regula la activación de los genes nodulina. Otros genes de la simbiosis temprana como DMI3 también codifica *CCaMK* necesarios para la simbiosis con los HFMA y la morfogénesis de los nódulos (Oldroyd y Downie, 2006). El gen *CYCLOPS* interactúa con *CCaMK* activando la red de señales (Parniske, 2008). Según (Kistner et ál., 2005), el desarrollo del arbúsculo está parcialmente bajo el control genético

del huésped por los genes Nup133, mediante las proteínas CASTOR y POLLUX y adicionalmente se requiere de algunas proteínas de la vía común SYM, como CASTOR, SYM15, SYM6, SMY24, POLLUX, las cuales son proteínas con alta permeabilidad al potasio (K) y baja para el calcio (Ca), lo que hace que sean canales que no permitan la liberación de Ca desde el sitio de almacenamiento. Estas proteínas se encuentran en el núcleo como canales de contra – iones, que compensan el desequilibrio de cargas que se produce durante las oscilaciones de calcio una vez el hongo emite señales en la proximidad de las células corticales (Parniske, 2008). Sin embargo a pesar de la intensa actividad que involucra la formación del arbusculo, este colapsa después de dos a cuatro días luego de haberse formado, dejando una célula cortical intacta que es capaz de albergar otro arbusculo (Paszkowski, 2006; Pumplin y Harrison, 2009).

Formación de la hifa

Las principales señales para la ramificación y crecimiento de las hifas son los exudados de las raíces, los cuales contienen diferentes tipos de compuestos y hormonas que favorecen no solo el crecimiento y ramificación de la hifa en el suelo sino que también la germinación de las esporas (Akiyama y Hayashi, 2006; Requema et ál., 2007). Uno de los exudados que estimulan el crecimiento de las hifas son los metabolitos secundarios o señales tigmotróficas (Requema et ál., 2007). Powell, (1979), indica que una hifa de un HFMA puede crecer a una tasa de 5,6 mm por día; diferente a lo hallado por (Harinikumar y Bagyaraj, 1995), donde las hifas de los HFMA crecían a una velocidad de 1,6 mm por día cuando la cantidad de raíces es escasa. Otro factor que determina el crecimiento de la hifa es la diversidad de hongos; por tanto se da un aumento de la conectividad, mayor intercambio de compuestos químicos entre el suelo y la planta (Antoninka et ál., 2011; Rillig et ál., 1999; Van der Heiden, 2002). Para Bago et ál., (2000) el aumento de longitud de la hifa del HFMA se debe principalmente a la cantidad de CO₂ y materia orgánica ya que la hifa usa el carbono como fuente de alimento. Sin embargo, además de la planta, el suelo también controla el crecimiento y la ramificación de las hifas cuando las bajas concentraciones de P estimulan la producción de exudados de la raíz (Nagahashi y Douds, 2004). La ramificación de las hifas forma una red que permite tomar de una manera más eficiente los nutrientes y el agua del suelo; dentro de este proceso la amplia variedad de nutrientes involucrados, han obligado a que las hifas desarrollen diferentes estrategias en la toma y el transporte de éstos (Maldonado et ál., 2001; Parniske, 2008), a través de las redes comunes de micorrizas CMNs (*Common mycorrhizal networks*) que hace referencia al conjunto de señales químicas y nutrientes que viajan por las hifas (Barto et ál., 2012). Existen cinco posibles rutas de transporte de la información química y nutrientes que las hifas fúngicas pueden realizar: a) Transporte citoplasmático, después de la captación activa por las hifas o movimiento pasivo a través de las membranas celulares de los hongos, b) transporte por difusión a través de la pared celular fúngica (apoplástica), debido a la naturaleza hidrofóbica de la pared de las hifa (Allen, 2007), c) movimiento por disolución en agua de los compuestos solubles, en las capas superficiales de la hifa no hidrofóbicas, d) las hifas de los HFMA pueden formar pequeños “cordones” que salen de las raíces de la

planta (Friese y Allen, 1991), creando canales en el interior de la hifa que acumula aire y agua que son los encargados de llevar sustancias solubles en agua, e) Modificación del ambiente en el suelo que rodea la hifa, aumentando la agregación del suelo, la conductividad y la población de microorganismos de la rizósfera que acelera el movimiento de nutrientes y señales químicas (Barto et ál., 2012). Las hifas externas pueden ser de tres tipos según su morfología y las funciones que llevan a cabo: las hifas infectivas que inician los puntos de colonización en una o varias raíces, las hifas absorbentes que exploran el suelo para la extracción de nutrientes y las hifas fértiles que llevan las esporas (INVAM, 2013).

Absorción de nutrientes

Las hifas permiten a la planta la toma de nutrientes que son escasos en el suelo como el P, el nitrógeno inorgánico, y el Zn (Atul-Nayyar et ál., 2009; Hogde, 2001; Leigh et ál., 2009), Sin embargo, estos hongos también pueden ser importantes en la toma de otros nutrientes necesarios como el Cu (Lambert et ál., 1979; Marschner y Dell, 1994; Toler et ál., 2005) y Fe (Kim et ál., 2009), (Tabla 1).

Tabla 1: Absorción media de nutrientes en plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.) por diferentes especies de HFMA en un suelo esterilizado. (Adaptado de Miransari et ál., 2009)

HFMA	N	P	K	Fe	Mn	Zn	Cu
	(mg/planta)						
Control	82	2,9	140	1,099	0,338	0,169	0,067
GmI*	74	4,2	143	1,588	0,378	0,283	0,071
GtI**	80	4,6	144	1,113	0,381	0,209	0,069
GmC***	73	3,5	134	0,819	0,373	0,175	0,071

* GmI: *Glomus mosseae* (Irán), **GtI: *Glomus etunicatum* (Irán), ***GmC: *Glomus mosseae* (Canadá).

Fósforo

La movilización de P de la solución del suelo hasta la raíz de la planta es el principal beneficio de la simbiosis (Brucher, 2007; Javot et ál., 2007). La extensa red de hifas de los HFMA influye en las propiedades físico – químicas del suelo y directamente o indirectamente contribuyen en la liberación de fosfato, a partir de complejos inorgánicos de baja solubilidad (Finlay, 2008); algunos transportadores de fosfato por hongos se expresan en el micelio extraradical y son posiblemente los que están involucrados en la captación de fosfato del sustrato (Harrison y Buuren, 1995; Maldonado et ál., 2001). Según Harrison et ál., (2012) en la MPA se concentran algunos transportadores de composición protéica como el PT4, los cuales están involucrados en el transporte de fosfatos. Estas proteínas son las encargadas del intercambio de nutrientes entre el hongo y la planta, y su funcionamiento depende de la existencia de ATP-asa fúngicas y vegetales que son las responsables del transporte de H⁺ hacia la matriz interfacial, lo que hace que esté fuertemente acidificada y que exista un gradiente de H⁺ que posibilita el funcionamiento de estos. El micelio externo

de los HFMA explora el suelo y toma el PO_4 inorgánico y lo hidroliza gracias a las fosfatasa (Wang et ál., 2006), el PO_4 forma cadenas de polifosfato en la vacuola del micelio externo de la hifa, la vacuola viaja al micelio interno hasta el arbusculo donde el polifosfato libera el PO_4 y las proteínas transportadoras de la MPA llevan formas fosfatadas al citosol donde se transloca al sistema vascular de la planta (Parniske, 2008).

Nitrógeno

Las plantas son completamente dependientes de la disponibilidad de N en el suelo para su crecimiento; en la mayoría de los suelos las formas predominantes de N para la planta son NH_4^+ y NO_3^- , En ambientes naturales las plantas interactúan con algunos microorganismos como las bacterias fijadoras de nitrógeno para contribuir con el adecuado suministro de N (Hogde et ál., 2000; Richardson et ál., 2009). Además de las bacterias, otros microorganismos como los HFMA, pueden contribuir con la absorción de este elemento (Smith y Read, 2008).

El micelio extrarradical de los HFMA tiene la capacidad de tomar NH_4^+ , NO_3^- y N orgánico del suelo (Tienda et ál., 2014), la asimilación de fuentes de N como NO_3^- parece estar relacionada por la enzima nitrato reductasa cuya actividad se ha detectado en esporas y los arbusculos de los HFMA (Ho y Trappe, 1975; Kaldorf et ál., 1998). La actividad de la nitrato reductasa permite la reducción del NO_3^- y su incorporación a la glutamina en forma de NH_4^+ para ingresar al ciclo de la urea en el micelio extrarradical, y a partir de este obtener arginina, la cual se une a los granos de polifosfato que contienen cargas negativas por lo que pueden transportar iones metálicos y arginina (Parniske, 2008). Una vez esta ingresa al micelio intrarradical, toma el ciclo de la urea donde se libera NH_4^+ (Bago et ál., 2000). El NH_4^+ se libera al espacio interfacial mediante transporte pasivo y llega al citosol probablemente por dos mecanismos; mediante proteínas transportadoras de la MPA y facilitado por acuaporinas (Gao et ál., 2010), sin embargo estudios recientes indican la expresión de genes transportadores de NH_4^+ como *OsAMT3; 1* y una isoenzima *OsGOGAT2* en HFMA asociados a raíces de una gramínea como el arroz (*Oryza sativa* L.) cultivada en bajas y altas condiciones de N (Tienda et ál., 2014).

Absorción de otros nutrientes

Zinc

El Zn tiene una baja movilidad en la solución del suelo y su absorción por difusión es limitada, por tanto, la fitodisponibilidad es reducida generalizándose la deficiencia de este elemento en suelos de regiones áridas y semiáridas (Broadley et ál., 2007). Una estrategia que permite mejorar las concentraciones de Zn en los cultivos es la presencia de los HFMA (Cavagnaro et ál., 2008), los cuales a través de su asociación con las raíces de la planta toman el Zn por sus hifas extrarradicales y intrarradicales (Parniske, 2008). En algunas especies como *Glomus intraradices* se ha identificado un transportador de Zn como el GintZnT1 (González et ál., 2005), el cual permite el movimiento del Zn a través de las hifas

y su paso por la MPA (Cavagnaro, 2008). Los HFMA pueden adquirir Zn de los poros del suelo o de los parches de nutrientes donde las raíces o pelos radicales no alcanzan a llegar (Bolan, 1991), los HFMA permiten captar un 25% más de Zn cuando la planta no está bajo esta asociación (Marschner y Dell, 1994).

Cobre

Los HFMA no solo se consideran importantes para la absorción de nutrientes inmóviles, sino también desempeñan un papel importante en la reducción de la absorción de metales pesados incluyendo el cobre (Cu), cuando se encuentra en concentraciones altas en el suelo (Wang et ál., 2007). El Cu es esencial para la fotosíntesis de las plantas y respiración mitocondrial, el metabolismo del carbono y nitrógeno para la protección contra estrés y es necesario para la síntesis de la pared celular (Hänsch y Mendel, 2009). Sin embargo, el Cu desempeña también un papel importante como cofactor oxidante o reductor en varias reacciones bioquímicas, lo cual permite que este elemento tenga un alto potencial tóxico, ya que puede catalizar la producción de radicales libres que conducen al daño de las proteínas, el ADN y otras biomoléculas (Shestivka et ál., 2011). Los HFMA pueden alterar la concentración de metales pesados en las paredes celulares de las hifas intra o extra radicales y la quelatación de Cu y otros metales pesados, por compuestos secretados por el hongo como la glomalina (Vodnik et ál., 2008). Las altas concentraciones de Cu en el suelo causa cambios en el perfil de aminoácidos de los HFMA y las plantas, ya que altos niveles de este elemento induce el descenso de GABA (ácido gamma – aminobutírico) y alanina y el aumento de asparaginas y arginina, siendo este último el precursor de poliaminas en las plantas, sustancia asociada con la respuesta de la planta en ambientes con alto contenidos de metales pesados como el Cu (Groppa y Benavides, 2008; Groppa et ál., 2006). Según Andrade et ál., 2010) el establecimiento del asocio micorriza planta, mejora la adaptación de esta a suelos con alto niveles de Cu, donde se regula la entrega del elemento a la planta mediante la producción de prolinas.

Toma de agua por los HFMA y estrés en la planta

El estrés hídrico es una de las principales causas de pérdida de cultivos en todo el mundo (Wang et ál., 2007). Este estrés produce un déficit de agua en el tejido vegetal, lo que induce una inhibición significativa de la fotosíntesis (Jaleel et ál., 2008). Uno de los factores que disminuye el estrés hídrico en las plantas es la presencia de HFMA (Heidari y Karami 2014), debido a que las hifas toman el agua y la llevan hasta la planta; sin embargo, el movimiento del agua por la hifa es bidireccional moviéndose hacia la planta que se encuentra transpirando durante el día, pero hacia las zonas secas del suelo durante las horas de la noche (Egerton et ál., 2007). Kaufman y Levy, (1976), indican que las plantas que se encuentran micorrizadas tienen un mayor flujo de agua en sus estomas junto con una mayor fotosíntesis luego de sufrir estrés hídrico. Los HFMA pueden contribuir a mitigar el efecto del estrés hídrico a través del control de cambios hormonales en la planta, ya que durante el estrés osmótico, estrés hídrico o estrés por salinidad se producen cambios en los niveles hormonales endógenos, como una disminución de la producción de citoquininas y un

aumento en el contenido de ácido abscísico (Kaufmann y Levy, 1976; Vaadia, 1976), además las hifas permiten aumentar la superficie absorbente de la raíz, de igual forma tienen la capacidad de tomar agua de la solución del suelo a potenciales hídricos muchos más bajos que las raíces de la planta no micorrizada (Levy y Krikunt, 1980).

Condiciones adversas del suelo en la formación y la función de los HFMA

Los HFMA forman asociaciones con una amplia variedad de plantas huésped (Bago et ál., 2000). Estas asociaciones en los ecosistemas están influenciadas por las relaciones de nutrientes orgánicos e inorgánicos, las relaciones hídricas y el ciclo del carbono en las plantas, pero las plantas no solo juegan un papel importante en la asociación, también las condiciones edáficas como composición química, humedad, temperatura, pH, capacidad de intercambio catiónico y factores bióticos y abióticos del ecosistema suelo (Entry et ál., 2002).

Temperatura y humedad

Los suelos rara vez proporcionan las condiciones ideales para el crecimiento y supervivencia de las plantas y los microorganismos. En algunas épocas del año las condiciones medio ambientales alteran la temperatura y humedad del suelo, siendo estas algunas de las condiciones que pueden favorecer o inhibir la endosimbiosis, tal como se describe en la tabla 2.

Tabla 2. Efecto de la temperatura y humedad en la formación de la endosimbiosis planta y HFMA.

Variable	Condición en el suelo	Actividad inhibida	Rango óptimo	Bibliografía
Temperatura	Exceso – deficiencia	Afecta la germinación de las esporas	18° C - 40°C óptimo 30°C	Matsubara y Harada, 1996; Saif, 1983
Humedad	Deficiencia	Inhibe formación de la endosimbiosis	>-1,5 MPa	Bryla y Duniway, 1997

pH

Los HFMA responden al pH de una forma muy variable, algunos tienen una baja respuesta en suelos de bajo pH, mientras que otros no responden en suelos ácidos que son encalados (Mosse, 1972). Guzmán et ál., (1988), encontró un efecto positivo de los HFMA mejorando el crecimiento de la planta sin la necesidad de aumentar el pH. La influencia de la simbiosis en la absorción de nutrientes depende de la capacidad de absorción del hongo a

través de sus hifas, la extensión de la colonización de las raíces y el suelo (Habte, 1995). La concentración de H^+ afecta características como la disponibilidad de P y la capacidad de intercambio catiónico, por tanto, se ve afectada la toma de nutrientes por parte de la planta. Clark et ál., (1999); Pacovsky, (2006) y Tinker, (1995), indican que los HFMA toleran condiciones extremas de pH y son capaces de adaptarse mediante la modificación del pH en la micorrizosfera durante el procesos de captación de nutrientes.

Yano y Takaki, (2005), encontraron una mejor respuesta del cultivo de (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) cuando se inoculó con micorrizas a pH ácido de 4,2 (Figura 1) demostrando que la simbiosis planta - HFMA puede mejorar el desarrollo de las raíces y retoños durante el crecimiento de las plantas cultivadas en suelos ácidos, siendo las mejoras significativas en plantas micorrizadas que crecen en ambientes extremos reduciendo la toxicidad de Aluminio (Al) y Manganeseo (Mn). Los HFMA pueden llegar a reducir el estrés de las altas concentraciones de Al y Mn a través del aumento de la ramificación de las raíces de la planta, evitando la acumulación de Al en las regiones apicales de esta (Yaho y Takaki, 2005).

Estrés antropogénico

Factores antropogénicos tales como la compactación del suelo, concentración de metales pesados y contaminación orgánica (figura 2) pueden afectar de forma positiva o negativa los HFMA por tres mecanismos diferentes: (1) efecto directo sobre las raíces micorrizadas; (2) a través de efectos que alteran la distribución de carbono a las micorrizas; (3) factores nutricionales que alteran la asignación de carbono a la micorriza (Entry et ál., 2002).

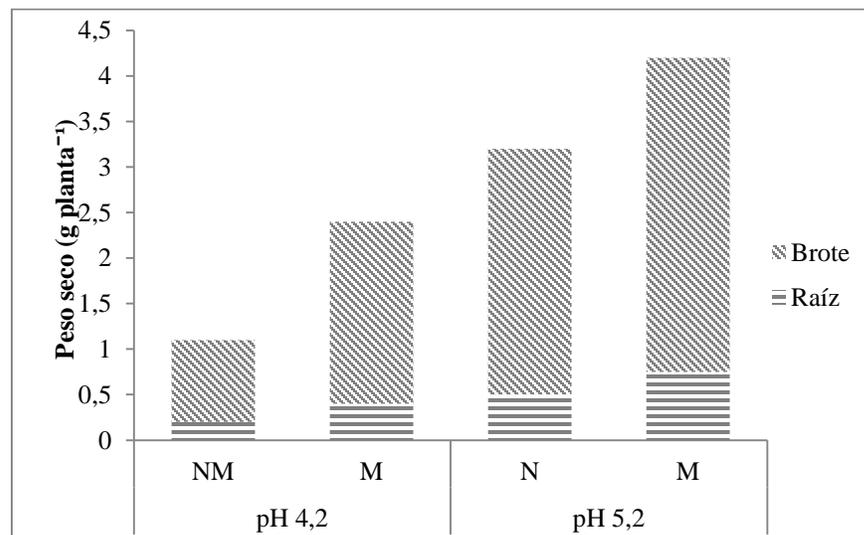


Figura 1. Acumulación de materia seca (brotes, raíces y el rendimiento total de la planta). No micorrizadas (NM) y Micorrizadas (M). En plantas de batata (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) cultivadas a diferentes pH. (Adaptado de Yaho y Takaki, 2005).

Conclusiones

- Se conoce de la endosimbiosis de los HFMA, la raíz de la planta y de la función que cumplen en la toma y translocación de nutrientes a la planta principalmente del fósforo. Sin embargo, tras el estudio de la fisiología de los HFMA se vislumbran nuevos efectos de la endosimbiosis en la nutrición de la planta, debido al descubrimiento de un grupo de proteínas y genes transportadores en el micelio intrarradical y extrarradical como OsAMT3;1, GintZnT1 y PTH4 que facilitan la toma y transporte de otros nutrientes diferentes al fósforo y de baja disponibilidad en el suelo como el nitrógeno y el zinc, elementos también necesarios para el crecimiento y desarrollo de la planta.
- Según esta revisión de literatura y las investigaciones que se han realizado hasta la fecha, se recomienda continuar explorando la fisiología de los hongos micorrícicos, en especial, la función de las fitohormonas como las estrigolatonas y glomalinas producidas por las plantas en la rizósfera y las hifas de los hongos respectivamente.
- La presencia de los HFMA en suelos tropicales es fundamental, ya que a través de la endosimbiosis con las raíces de la planta no solo se mejora su nutrición, sino que permiten que la planta se adapte a condiciones de estrés medioambiental y contribuyan con la recuperación de suelos deteriorados por factores antrópicos. Debido a esto, el conocimiento de las condiciones necesarias para que los HFMA realicen sus funciones se convierte en parte del éxito del manejo ecológico de los suelos tropicales.

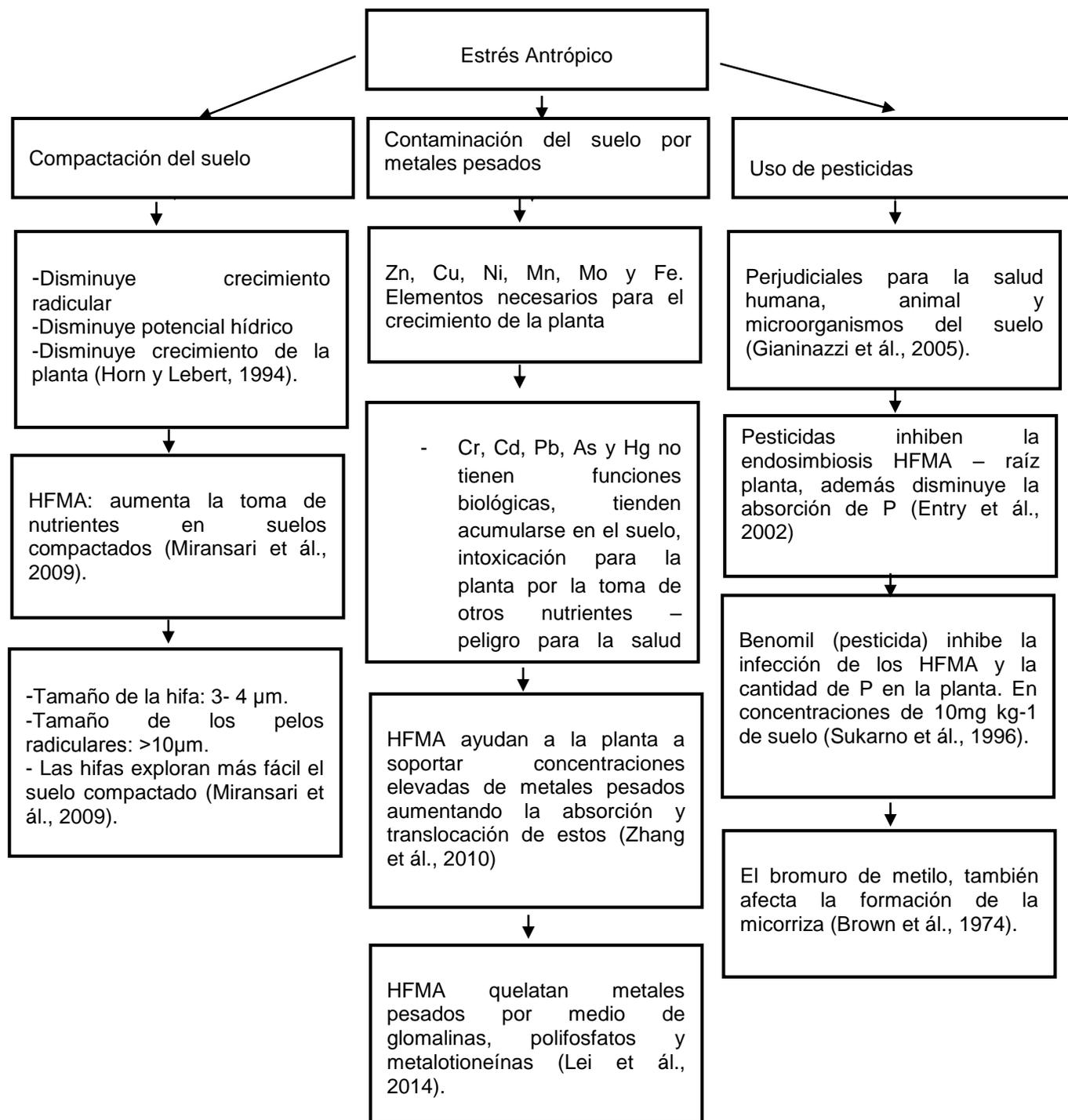


Figura 2. Efecto del estrés antrópico en la fisiología de los HFMA y respuesta de las plantas.

Referencias bibliograficas

Akiyama K and Hayashi H. Strigolactones: Chemical Signals for Fungal Symbionts and Parasitic Weeds in Plant Roots. *Annals of Botany*. 2006; 97 (6): 925 – 931.

Akiyama K, Matsuzaki K and Hayashi H. Plant Sesquiterpenes Induce Hyphal Branching in Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Nature*. 2005; 435: 824-827.

Alkaraki GM and Clark RB. Growth, mineral acquisition and water use by mycorrhizal wheat grown under water stress. *J. of Plant Nutrition*. 1998; 21 (2):263.

Allen MF. Mycorrhizal fungi: highways for water and nutrients in arid soils. *Vadose Zone J*. 2007; 6 (2): 291–297.

Alloway BJ. Soil factors associated with zinc deficiency in crops and humans. *Environ. Geochemistry health*. 2009; 31: 537- 548.

Andrade SAL, Gratão PL, Azevedo RA, Silveira APD and Schiavinato MA. Biochemical and physiological changes in jack bean under mycorrhizal symbiosis growing in soil with increasing Cu concentrations. *Environmental and Experimental Botany*. 2010; 8 (2): 198–207.

Antoninka A, Reich PB and Johnson NC. Seven years of carbon dioxide enrichment, nitrogen fertilization and plant diversity influence arbuscular mycorrhizal fungi in a grassland ecosystem. *New Phytologist*. 2011; 192 (1): 200–214.

Arriagada CA, Herrera MA y Ocampo JA. Beneficial effect of saprobe and arbuscular mycorrhizal fungi on growth of (*Eucalyptus globulus* Labill) co-cultured with (*Glycine max* (L.) Merr.) in soil contaminated with heavy metals. *J. Environment*. 2007; 84 (1); 93–99.

Atul-Nayyar A, Hamel C, Hanson K and Germida J. The arbuscular mycorrhizal symbiosis links N mineralization to plant demand. *Mycorrhiza*. 2009; 19 (4): 239 -246.

Azcón R, Perálvarez MC, Biró B, Roldán A y Ruíz JM. Antioxidant activities and metal acquisition in mycorrhizal plants growing in a heavy-metal multicontaminated soil amended with treated lignocellulosic agrowaste. *Appl. Soil Ecol*. 2009; 41 (2): 168–177.

Bago B, Pfeffer E and Shachar-Hill Y. Carbon Metabolism and Transport in Arbuscular Mycorrhizas. *Plant Physiology*. 2000; 124 (3): 949-958.

Bago B, Zipfel W, Williams RM, Chamberland H and Lafontaine JG. In vivo studies in the nuclear behavior of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea* grown under axenic conditions. *Protoplasma*. 1998; 203 (1): 1-15.

Barto EK, Weidenhamer JD, Cipollini D and Rillig MC. Fungal superhighways: do common mycorrhizal networks enhance below ground communication?. *Plant Science*. 2012; 17 (11): 633 – 637.

Bécard G and Piché Y. Fungal Growth Stimulation by CO₂ and Root Exudates in Vesicular-arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Appl Environ. Microbiology*. 1989; 55 (9): 2320–2325.

Besserer A, Puech V, Kiefer P, Gómez V and Jauneau A. Strigolactones stimulate Arbuscular Mycorrhizal Fungi by Activating Mitochondria. *Plos biology*. 2006; 4 (7): 1240 – 1247.

Bolan NS. A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorous by plants. *Plant Soil*. 1991; 134 (2): 187–207.

Bonfante P and Genre A. Plants and arbuscular mycorrhizal fungi: an evolutionary-developmental perspective. *Review Article Trends in Plant Science*. 2008; 13 (9): 492-498.

Bonfante P and Requena N. Dating in the dark: how roots respond to fungal signals to establish arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*. 2011; 14 (4): 451–457.

Bonfante P. Anatomy and morphology of VA mycorrhizae. En Powell CL, Bagyaraj DJ. *VA Mycorrhizae*. CRC Press, Boca Raton, 1984. p. 5–33.

Bouwmeester HJ, Matusova R, Zhongkui S and Beale MH. Secondary metabolite signalling in hot parasitic plant interactions. *Current Opinion in Plant Biology*. 2003 6 (4): 358- 364.

Broadley MR, White PJ, Hammond JP, Zelko I and Lux A. Zinc in plants. *New Phytologist*. 2007; 173 (4): 677 - 702.

Brown G, Corbett DCM, Hide GA and Webb RM. Bromine residues in wheat crops grown in soil fumigated with methyl bromide. *Pesticide Science*. 1974; 5 (1): 25-29.

Brundrett, M., Bougler, N., Dell, B., Grove, T and Malajczuk, N. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. *Australian center for international Agricultural Research*. Australia: Canberra. 1996; p. 141 – 186.

Bryla DR and Duniway, J.M. Water uptake by safflower and wheat roots infected with arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*. 1997; 136 (4): 591- 601.

Bucher, M. 2007. Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. *New Phytologist*, 173 (1): 11–26.

- Cavagnaro, T.R.. The role of arbuscular mycorrhizas in improving plant zinc under low soil zinc concentrations: a review. *Plant soil*, 2008; 304 (1): 315 - 325.
- Clark, C.A., Zobel, R.W. and Zeto, S.K.. Effects of mycorrhizal fungus isolates on mineral acquisition by of *Panicum virgatum* in acidic soil. *Mycorrhiza*, 1999; 9 (3): 167-196.
- Cox, G. and Sanders, F.. Ultrastructure of the host-fungus interface in a vesicular-arbuscular mycorrhiza. *New Phytologist*. 1974; 73 (5): 901–912.
- Egerton-Warburton, L.M. Querejeta, J.I. and Allen, M.F.. Common mycorrhizal networks provide a potential pathway for the transfer of hydraulically lifted water between plants. *Journal of Experimental Botany*, 2007; 58 (6): 1473-1483.
- Entry, J.A., Rygiewicz, P.T., Watrud, L.S. and Donnelly, P.K.. Influence of adverse soil conditions on the formation and function of Arbuscular mycorrhizas. *Advances in Environmental Research*, 2002; 7 (1): 123 - 138.
- Finlay RD Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. *Journal Experimental Botany*, 2008; 59 (5): 1115–1126.
- Friese CF and Allen MF 1991 The spread of VA mycorrhizal fungal hyphae in the soil: inoculum types and external hyphal architecture. *Mycologia*, 83 (5): 409–418.
- Gao Y, Li Y, Xiuxia Y, Haijun L, Qirong S. et ál., 2010 Ammonium nutrition increases water absorption in rice seedlings (*Oryza sativa* L.) under water stress. *Plant Soil*, 331 (1): 193–201.
- Genre A, Chabaud M, Balzergue C, Puech-Page´s V, Novero M. et ál., Short-chain chitin oligomers from arbuscular mycorrhizal fungi trigger nuclear Ca²⁺ spiking in *Medicago truncatula* roots and their production is enhanced by strigolactone. *New Phytologist*, 2013; 198 (1):190-202.
- Genre, A., Chabaud, M., Timmers, T., Bonfante, P. and Barkerb, D. 2005. Arbuscular Mycorrhizal Fungi Elicit a Novel Intracellular Apparatus in *M. truncatula* Root Epidermal Cells before Infection. *Plant Cell*, 17 (12): 3489-3499.
- Gianinazzi, S., Gollotte, A., Binet, M.N., Van Tuinen, D. and Redecker, D. 2010. Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza*, 20 (8): 519–530.
- González, G.M., Azcón, A.C., Mooney, M., Valderas, A., MacDiarmid, et ál., Characterization of a *Glomus intraradices* gene encoding a putative Zn transporter of the cation diffusion facilitator family. *Fungal Genetics Biology*, 2005; 42 (2): 130–140.

Groppa, M. and Benavides, M. Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino Acids*, 2008; 34 (1): 35 – 45.

Groppa, M., Tomaro, M., and Benavides, M. Polyamines and heavy metal stress: the antioxidant behavior of spermine in cadmium- and copper-treated wheat leaves. *BioMetals*, 2006; 20 (2): 185 – 195.

Gutjahr, C. and Parniske, M. 2013. Cell and developmental biology of the arbuscular mycorrhiza symbiosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 29: 593-617.

Gutjahr, C., Radovanovic, D., Geoffroy, J., Zhang, Q., Siegler, H., et ál.,. The half size ABC transporters STR1 and STR2 are indispensable for mycorrhizal arbuscule formation in rice. *Plant Journal*, 2012; 69 (5): 906-920.

Gutjahr, C. Phytohormone signaling in arbuscular mycorrhizal development. *Current Opinion in Plant Biology*. 2014; 20: 26–34.

Guzmán, P.R.A., Ferrera, R.C. and Etchevers, J.D. *Leucaena leucocephala*, a plant of high mycorrhizal dependence in acid soils. *Leucaena Res. Rep.* 1988; 9: 69-73.

Habte, M. Soil acidity as a constraint to the application of vesicular-arbuscular mycorrhizal technology. In: Varma A, Hock B, Žeds, Mycorrhiza - Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology. Berlin: *Springer – Verlag*. 1995p. 593 - 603.

Hänsch, R. and Mendel, R.R. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Current Opinion in Plant Biology*, 2009; 12 (3): 259–266.

Harinikumar, K.M. and Bagyarai, D.J. 1995. Spread of vesicular arbuscular mycorrhizal fungal hyphae in soil Department of Agricultural Microbiology, University of Agricultural Sciences, G.K.V.K. Campus Bangalore – India, p . 560 – 565.

Harley, J.L. and Smith, S.E.. Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press. London; 1983. P. 345 – 356

Harrison, M.J, Dewbre, G.R. and Liu, J.A.. A phosphate, transporte from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant cell*, 2002; 14 (10): 2413-2419.

Harrison, M.J. and van Buuren, M.A. Phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature*, 1995; 378: 626–629.

Harrison, M.J. Cellular programs for arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Curr Opin Plant Biology*,. 2012; 15 (6): 691-698.

Harrison, M.J. Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu. Rev.* 2005;

Microbiol., 59: 19–42.

Heidari, M. and Karami, V.. Effects of different mycorrhiza species on grain yield, nutrient uptake and oil content of sunflower under water stress. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. 2014; 13(1): 9–13.

Ho, I. and Trappe, J.M.. Nitrate reducing capacity of two vesicular – arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycologia*, 1975; 67 (4): 886 – 888.

Hodge, A. 2001. Arbuscular mycorrhizal fungi influence decomposition of but not plant nutrient capture from, glycine patches in soil. *New Phytologist*, 151 (3): 725 - 734

Hodge, A., Robinson, D. and Fitter, A.. Are microorganisms more effective than plants at competing for nitrogen?. *Trend in plant Science*, 2000; 5 (7): 1360 – 1385.

Horn, R. and Lebert, M.. Soil compactability and compressibility. In: Soane, B. D. and van Ouwkerk, C. (eds.). Soil compaction in crop production. *Elsevier Science B.V*, The Netherlands, 1994. P. 45-70.

INVAM. International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungi. General life cycle and the structures formed. West Virginia University. 2013; Consultado 17 de Julio 2014, disponible en <http://www.invam.caf.wvu.edu>

Jaleel CA, Gopi R, Sankar B, Gomathinayagam M and Panneerselvam R. Differential responses in water use efficiency in two varieties of *Catharanthus roseus* under drought stress. *Comp. Rend. Biol.*, 2008; 331 (1): 42–47.

Javot, H., Pumplin, N. and Harrison, M.J. Phosphate in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: transport properties and regulatory roles. *Plant Cell Environ.*, 2007; 30 (3): 310–322.

Kaldorf, M., Schmelzer, E. and Bothe, H.. Expression of maize and fungal nitrate reductase genes in arbuscular mycorrhiza. *Mol plant Microbe Int.*, 1998; 11 (6): 439 - 448.

Kaufmann, M.R. and Levy. Y. 1976. Stomatal response of *Citrus jambhiri* to wáter stress and humidity. *Physiologia plantarum*. 38 (2): 105-108.

Kim, Y.B., Kim, S.M., Kang MK, Kuzuyama T, Lee JK, et ál., Regulation of resin acid synthesis in *Pinus densiflora* by differential transcription of genes encoding multiple 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase and 1-hydroxy-2-methyl- 2-(E)-butenyl 4-diphosphate reductase genes. *Tree Physiology*, 2009; 29 (5): 737–749.

Kistner C, Winzer T, Pitzschke A, Mulder L, Sato S, et ál., Seven *Lotus japonicus* genes required for transcriptional reprogramming of the root during fungal and bacterial symbiosis. *The Plant Cell*. 2005; 17 (8): 2217–2229.

- Kogel, K.H.. Compatible Host–microbe Interactions: Mechanistic Studies Enabling Future Agronomical Solutions. *Journal of Plant Physiology*. 2008; 165 (1): 1-8.
- Lambert, D.H., Baker, D.E. and Cole, H. The role of mycorrhizae in the interactions of phosphorus with Zinc, Copper, and other elements. *Soil Science Society of America*. 1979; 43 (5): 976 – 980.
- Lei, H., Haishui, Y., Zhenxing, Y., Jianjun, T., Ligen, X. and Xin, C. Arbuscular mycorrhizal fungal phylogenetic groups differ in affecting host plants along heavy metal levels. *Journal of Environmental Sciences*. 2014; 26 (10): 2034 – 2040.
- Leigh, J., Hodge, A. and Fitter, A.H.. Arbuscular mycorrhizal fungi can transfer substantial amounts nitrogen to their host plant from organic material. *New phytology*. 2009; 181 (1): 199-207.
- Levy, Y. and Krikunt, J.. Effect of vesicular – arbuscular mycorrhiza on Citrus jambhiri water relations. *New phytology*. 1980; 85 (1): 25 – 31.
- Lin, Y.F. and Aarts, M.G.. The molecular mechanism of zinc and cadmium stress response in plants. *Cell. Mol. Life Sci*. 2012; 69 (19): 3187–3206.
- Maldonado, E.G.M., Dewbre, G.R. and Harrison, M.J.A.. Phosphate transporter gene from the extraradical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is regulated in response to phosphate in the environment. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 2001, 14 (10): 1140–1148.
- Marschner, H. and Dell, B.. Nutrient-uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant and Soil*, 1994; 159 (1): 89-102.
- Matsubara, Y., Harada, H.. Effect of constant and diurnally fluctuating temperatures on arbuscular mycorrhizal fungus infection and growth of infected asparagus (*Asparagus officinalis* L.) seedlings. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*. 1996; 65 (3): 565 – 570.
- Mendoza L, Wilkens M. and Urzua A. Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids and flavonoids isolated from some *Chilean Pseudogna phalium* (Asteraceae) *Journal of Ethnopharmacology*. 1997; 58 (2): 85-88.
- Ming T, Hui C. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on alkaline phosphorus activities on *Hippophae rhamnoides* drought-resistance under water stress conditions. *Trees*. 1999; 14 (3): 113 - 115.
- Miransari, M., Bahrami, H.A., Rejali, F. and Malakouti, M.J.. Effects of soil compaction and arbuscular mycorrhiza on corn (*Zea mays* L.) nutrient uptake. *Soil y tillage research*.

2009; 103 (2): 282-290.

Moreira H, Marques, APGC, Rangel AOSS. and Castro PML. Heavy metal accumulation in plant species indigenous to a contaminated Portuguese site: prospects for phytoremediation. *Water Air Soil Pollut.* 2011; 221 (1–4): 377–389.

Mosse B. Effects of different Endogone strains on the growth of Paspalum notatum. *Letters to Nature.* 1972; 229: 221 - 223.

Nadal M. and Paszkowski U. Polyphony in the rhizosphere: presymbiotic communication in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current Opinion Plant Biology.* 2013; 16 (4): 473-479.

Nagahashi G. and Douds DD. Isolated root caps, border cells, and mucilage from host roots stimulate hyphal branching of the arbuscular mycorrhizal fungus, Gigaspora gigantea. *Mycological Research.* 2004; 108 (9): 1079–1088.

Oldroyd G and Downie JA. Nuclear Calcium Changes at the Core of Symbiosis Signaling. *Current Opinion in Plant Biology.* 2006; 9 (4): 351–357.

Pacovsky RS. Micronutrient uptake and distribution in mycorrhizal or phosphorus-fertilized soybeans. *Plant Soil.* 1986; 95 (3): 379-388.

Parniske M. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature reviews Microbiology* 2008; 6: 763 – 775.

Paszkowski U. A journey through signaling in arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytologist.* 2006; 172 (1): 35 – 46.

Perez TJ, Correa A, Azcon AC. and Ferrol N. Transcriptional regulation of host NH₄⁺ transporters and GS/GOGAT pathway in arbuscular mycorrhizal rice roots Plant Physiology and Biochemistry. 2014; 75: 1 – 8.

Powell C.L. Spread of mycorrhizal fungi through soil. *New Zealand Journal of Agricultural Research.* 1979; 22 (2): 335 - 339.

Prasad A, Kumar S, Khaliq A and Pandey A. Heavy metals and arbuscular mycorrhizal (AM) fungi can alter the yield and chemical composition of volatile oil of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Biology and Fertility of Soils.* 2011; 47 (8): 853–861.

Prasad R. Zinc biofortification of food grains in relation to food security and alleviation of Zinc malnutrition. *Research for development.* 2010; 98 (10): 1300 – 1304.

Pumplin N. and Harrison MJ. Live-cell imaging reveals periarbuscular membrane domains and organelle location in Medicago truncatula roots during arbuscular mycorrhizal

symbiosis. *Plant Physiology*. 2009; 151 (2): 809 - 819.

Querejeta JI, Egerton – Warburton LM and Allen MF. Direct nocturnal water transfer from oaks to their mycorrhizal symbionts during severe soil drying. *Oecologia*. 2003; 134 (1): 55–64.

Reinhardt D. Programming Good Relations-development of the Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*. 2007; 10 (1): 98-105.

Requena N, Serrano E, Ocón A. and Breuninger M. Plant Signals and Fungal Perception During Arbuscular Mycorrhizae Establishment. *Phytochemistry*. 2007; 68 (1): 33-40

Richardson AE, Barea JM, McNeill AM and Prigent-Combaret C. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil*. 2009; 321 (1-2): 305–339.

Rillig MC, Field CB and Allen MF. Soil biota responses to long-term atmospheric CO₂ enrichment in two California annual grasslands. *Oecologia*. 1999; 119 (4): 572–577.

Ryan MH and Angus JF. Arbuscular mycorrhizae in wheat and field pea crops on a low P soil: increased Zn-uptake but no increase in P-uptake or yield. *Plant Soil*. 2003;250 (2): 225–239.

Saif SR. Soil temperature, soil oxygen and growth of mycorrhizal and non-mycorrhizal plants of *Eupatorium odoratum* L. and development of *Glomus macrocarpus*. *Angew. Botanik*. 1983; 57 (1): 143 - 155.

Schenck NC. and Smith GS. Responses of six species of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and their effects on soybean at four soil temperatures. *New Phytologist*. 1982; 92 (2): 193 - 201.

Shestivska V, Adam V, Prasek J, Macek T, Mackova T. Investigation of the antioxidant properties of metallothionein in transgenic tobacco plants using voltammetry at a carbon paste electrode. *International Journal of Electrochemical Science* 2011; 6: 2869–2883.

Siciliano V, Genre A, Balestrini R, Cappellazzo G, deWit PJGM. Transcriptome analysis of arbuscular mycorrhizal roots during development of the prepenetration apparatus. *Plant Physiology*, 2007; 144 (3): 1455-1466.

Smith GS and Roncadori RW. Responses of three vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi at four soil temperatures and their effects on cotton growth. *New Phytologist*. 1986; 104: 89 - 95.

Smith, S.D. and Read, D.J. Mycorrhizal Symbiosis. 3a ed. *Academic Press*. New York, 2008. p. 199 -215.

- Smith SE and Gianinazzi-Pearson V. Physiological Interactions Between Symbionts in Vesicular-arbuscular Mycorrhiza Plants. *Ann Rev. Plant Physiology Plant Molecular Biology*, 1988; 39: 221-244.
- Sosas RT, Sánchez NJ, Morales GE and Cortes CF. Interacciones micorrizicas arbusculares *Thichiderma harzianum* (Moniliaceae) y efectos sobre el crecimiento de *Brachiaria decumbens* (Poaceae). *Acta biológica Colombiana*. 2006; 11 (1): 45 – 54.
- Souza LA, Andrade SAL, Souza SCR. and Schiavinato MA. Arbuscular mycorrhiza confers Pb tolerance in *Calopogonium mucunoides*. *Acta Physiol. Plant*. 2011; 34 (2): 523–531.
- Subramanian, K.S. and Charest, C.. Acquisition of N by external hyphae of an arbuscular mycorrhizal fungus and its impact on physiological responses in maize under drought-stressed and well watered conditions. *Mycorrhiza*, 1999; 9 (2): 69-75.
- Subramanian, K.S. and Charest, C.. Nutritional growth and reproductive responses on maize *Zea mays* L. to arbuscular mycorrhizal inoculation during and after drought stress at tasselling. *Mycorrhiza*, 1997; 7 (1): 25-32.
- Sukarno, N., Smith, F.A., Smith, S.E. and Scott, E.S. The effect of fungicides on vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. II. The effects on area of interface and efficiency of P uptake and transfer to plant. *New Phytologist*, 1996; 132 (4): 583 - 592.
- Takeda, N., Sato, S., Asamizu, E., Tabata, S. and Parniske, M. Apoplastic plant subtilases support arbuscular mycorrhiza development in *Lotus japonicas* L., *Plant J*. 2009; 58(5): 766-777.
- Tienda, P.J., Correa, A., Azcon, A.C. and Ferrol, N. Transcriptional regulation of host NH₄⁺ transporters and GS/GOGAT pathway in arbuscular mycorrhizal rice roots. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2014; 75: 1-8.
- Tinker, P.B.. Soil chemistry of phosphorus and mycorrhizal effects on plant growth. In: Sanders FE, Mosse B, Tinker PB, 1a ed. Endomycorrhizas. *Academic Press*, New York; 1975. P. 353- 371
- Toler, H.D., Morton, J.B. and Cumming, J.R.. Growth and metal accumulation of mycorrhizal sorghum exposed to elevated copper and zinc. *Water, Air and Soil Pollution*. 2005; 164 (1-4): 155–172.
- Toth R and Miller RM. Dynamics of arbuscule development and degeneration in a *Zea mays* L. mycorrhiza. *American Journal of Botany*. 1984; 71 (4): 449–460

Vaadia Y. Plant hormones and water stress. *Philosophical Transaction of the Royal Society London*. 1976; 273 (927): 513 - 522.

Valeria S, Genre A, Balestrini R, Cappellazzo G, Pierre JMG et ál., Transcriptome analysis of arbuscular mycorrhizal roots during development of the prepenetration apparatus. *Plant Physiology*. 2007; 144 (3): 1455–1466.

Van der Heijden MGA, Klironomos JN, Ursic M, Moutoglis P, Streitwolf-Engel R, et ál., Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature*. 1998; 396: 69–72.

Van der Heijden MGA and Sanders I. Mycorrhizal Ecology. *Ecological Studies* 157. Springer ed. London, 2002. p. 245 - 265.

Vierheilig, H. and Pich, Y. 2006. Signalling in arbuscular mycorrhiza: facts and hypotheses. In: Buslig B, Manthey J Flavonoids in cell function. Kluwer, 1^a ed. USA: New York, pp: 23–39.

Vodnik D, Grcman H, Macek I, van Elteren JT and Kovacevic M. The contribution of glomalin-related soil protein to Pb and Zn sequestration in polluted soil. *Science of the Total Environment*. 2008; 392 (1): 130 – 136.

Wang FY, Lin XG, Yin R. and Wu LH. Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation on the growth of *Elsholtzia splendens* and *Zea mays* and the activities of phosphatase and urease in a multi-metal-contaminated soil under unsterilized conditions. *Applied Soil Ecology*, 2006; 31(1-2): 110–119.

Wang, F.Y., Lin, X.G. and Yin, R.. Inoculation with arbuscular mycorrhizal fungus *Acaulospora mellea* decreases Cu phytoextraction by maize from Cu contaminated soil. *Pedobiologia*, 2007, 51 (2): 99 – 109

Wang, W., Vinour, B. and Altman, A. 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218 (1): 1–14.

Yano, K. and Takaki, M.. Mycorrhizal alleviation of acid soil stress in the sweet potato (*Ipomoea batatas*(L.) Lam). *Soil Biology and Biochemistry*, 2005; 37 (8): 1569 -1572.

Zhang, F., Hamel, C., Hormozdyark, K. and Smith, D.L.. Root-zone temperature and soybean (*Glycine max.* (L.) merr.) Vesicular-arbuscular mycorrhizae, development and interactions with the nitrogen fixing symbiosis. *Environmental and Experimental Botany*, 1995; 35 (1): 287 - 298.

Zhang, H.H., Tang, M., Chen, H., Zheng, C.L. and Niu, Z.C. Effect of inoculation with AM

fungi on lead uptake, translocation and stress alleviation of *Zea mays* L. seedlings planting in soil with increasing lead concentrations. *European Journal of Soil Biology*, 2010; 46 (5): 306–311.

CAPÍTULO 2

Identificación de algunas cepas nativas de hongos formadores de micorrizas arbusculares asociadas al pasto kikuyo (*Cenchrus clandestinus* (Hochst. ex Chiov) Morrone) y su efecto en algunas variables agronómicas

Resumen

Los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) pueden mejorar el crecimiento y desarrollo vegetal a través de la translocación de nutrientes del suelo a la raíz de la planta hospedera. Sin embargo, la contribución de los HFMA ha sido poco explorada en plantas sometidas a altas cantidades de fertilizantes nitrogenados (N) y fosfóricos (P) como es el caso del pasto kikuyo (*Cenchrus clandestinus* (Hochst. ex Chiov.) Morrone). Planta común en sistemas productivos de lechería especializada en Colombia. Este estudio tuvo como objetivo investigar el efecto del asocio de dos HFMA nativos identificados en este pasto y una cepa conocida *Rhizophagus manihotis* cuando se evaluaron a diferentes niveles de N y P y su efecto en variables del pasto como la producción de materia seca, relación hoja tallo y altura de la planta. En este trabajo fueron encontradas dos especies de HFMA en potreros de pasto kikuyo en algunas provincias de Antioquia, Colombia; *Rhizophagus intrarradices* y *Rhizophagus fasciculatus*. En cuanto al comportamiento de las variables de crecimiento, como la altura de la planta y producción de materia seca, hubo un efecto significativo ($P < 0,05$) 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, tras un análisis canónico discriminativo se encontró que los tratamientos que involucran dosis intermedias de N25%, P25% y el HFMA nativo *Rhizophagus fasciculatus*, no son necesarios tenerlos en cuenta dentro de una recomendación de fertilización para mejorar cada una de las variables de crecimiento. El uso de HFMA de las cepas *Rhizophagus intrarradices* y *Rhizophagus manihotis* junto con una buena nutrición vegetal a base de N y P mejoran algunas variables agronómicas en el pasto kikuyo.

Palabras claves: Hongos formadores de micorrizas arbusculares, fertilización, pasto kikuyo, variables agronómicas.

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 lecheras (Carulla *et ál.*, 2004; Bargo *et ál.*, 2003) en las zonas del trópico alto de Colombia donde se encuentra establecido. Sin embargo, el tipo de fertilizante y la calidad del suelo limitan la absorción de nutrientes y la calidad de forraje (Correa *et ál.*, 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 del siguiente trabajo es 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

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, Entrerrios, Santa Rosa de Osos y La Unión. 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 ál.*, 2005; Chopra *et ál.*, 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 cinco kilogramos 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 va 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; 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 llevar al autoclave para decolorarlas (extracción de taninos). Donde 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 tripan al 0,05%, 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:

$$\% \text{ de Colonización} = \frac{\# \text{ de intersecciones micorrizadas}}{\# \text{ de intersecciones observadas}} \times 100$$

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).

Selección semilla de pasto kikuyo: Se obtuvo semilla sexual de pasto kikuyo maduro de los lotes de las fincas donde se seleccionaron las muestras de suelo; estas semilla se usaron para multiplicar las esporas de los HFMA y para montar el ensayo objetivo del estudio.

Siembra de pasto kikuyo: 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 diferente 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 véase (figura 1).

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 promedio anual de 1.575 mm y coordenadas (N: 06° 16.913' W: 075° 37.62').

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 (46-0-0); el 100% de la dosis del fertilizante fosfórico fue de 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

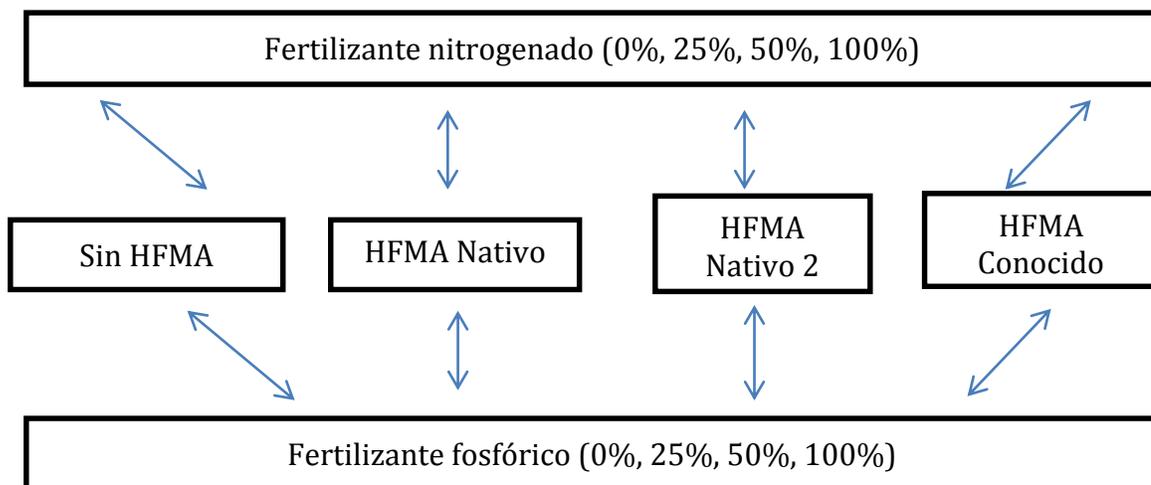


Figura 1. Asignación de los diferentes tratamientos con los respectivos niveles de N, HFMA y P empleados en el estudio.

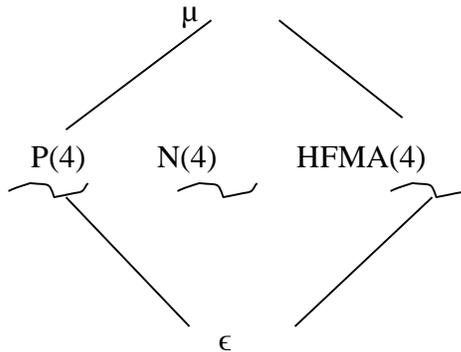
hectárea al área de cada unidad experimental, cada elemento se aplicó 10 días posteriores a la siembra y después de cada corte. Los HFMA empleados fueron nativo 1 (*Rhizophagus intrarradices*), nativo 2 (*Rhizophagus fasciculatus*) y la cepa conocida (*Rhizophagus manihotis*). El pasto se estableció 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.

Diseño experimental: Se empleó un diseño de clasificación experimental completamente aleatorizado mediante arreglo factorial (4^{4*4}) asimétrico de tipo balanceado, efecto fijo, de medidas repetidas en el tiempo, donde 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, suplementado con análisis de tipo unidimensional que tiene como objetivo establecer los estadísticos: media aritmética, desviación típica y coeficiente de variación.

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

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

Diagrama



Modelo clasificación experimental

$$Y_{ijsk} = u + P_i + N_j + HFMA_s + PN_{ij} + PHFMA_{is} + NHFMA_{js} + PNHFMA_{ijs} + eK(ijs)$$

Donde

U: Media poblacional

Pi: i-ésima observación del efecto del fósforo

Nj: i-ésima observación del efecto del nitrógeno

HMFAs: i-ésima observación del efecto de los hongos formadores de micorrizas

PNij: i-ésima observación del efecto combinado del fósforo y el nitrógeno

PHFMAis: i-esima observación del efecto combinado del fósforo con los hongos formadores de micorrizas

NHFMAjs: i-esima observación del efecto combinado del nitrógeno con los hongos formadores de micorrizas

PNHFMAijs: i-esima observación del efecto combinado del fósforo y el nitrógeno con los hongos formadores de micorrizas

Ek(ijs): Error experimental

Factores experimentales:

Factor 1: fertilización fosfórica (P_2O_5) con cuatro niveles (0%, 25%, 50%,100%)

Factor 2: fertilización nitrogenada (N) con cuatro niveles (0%, 25%, 50%,100%)

Factor 3: hongos micorrícicos (HFMA) con cuatro niveles (sin micorrizas, dos cepas de hongos nativas y una cepa de hongo conocida)

Tratamientos:

Se implemento 64 tratamientos con cinco repeticiones por tratamiento para un total de 320 unidades experimentales.

Unidad experimental:

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.

Variables experimentales:

Producción de materia seca

Relación hojas/tallos (RHT1, RHT 2)

Altura de las plantas (Alt 1, Alt 2, Alt 3, Alt 4, Alt 5, Alt 6)

Variables a medir: En el pasto se determinó el porcentaje de materia seca según (AOAC, 1990) y producción de este por medió de aforos de cada uno de los potes (Estrada, 2001). Las variables agronómicas que se determinaron fueron la altura de las plantas, la relación hojas/tallos. La altura de las plantas se midió en centímetros, seleccionando tres plantas y midiéndolas con una regla de centímetros el desde suelo hasta el punto más alto de la hoja bandera sin estirla y sin tener en cuenta la inflorescencia cada 15 días (Toledo, 1982). La relación hojas/tallos 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.

Período de corte: Cada 35 días cuando su desarrollo vegetativo formó la cuarta y quinta hojas bien desarrolladas el pasto se cosechó (Mendo *et ál.*, 2000; Chopra *et ál.*, 2007). Se cosechó a una altura de 10 cm (Swanepoel *et ál.*, 2013).

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 73,56 y 87 esporas/100 g de suelo y porcentajes promedios de colonización de 33,79% y 45,33%. El municipio donde se encontró mayor número de esporas fue Santa Rosa de Osos y en el que se encontró mayor porcentaje de colonización fue Entrerrios (Tabla 1).

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	73,56 ± 10,71	37,73 % ± 11,53
Entrerrios	78,83 ± 20,48	45,33 % ± 4,74
Santa Rosa de Osos	87 ± 13,50	36,93 % ± 15,30
La Unión	79,44 ± 13,64	33,79 % ± 13,64

^a Número de esporas en 100 gramos de suelo

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

Identificación de las esporas nativas

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 2 y 3 respectivamente.

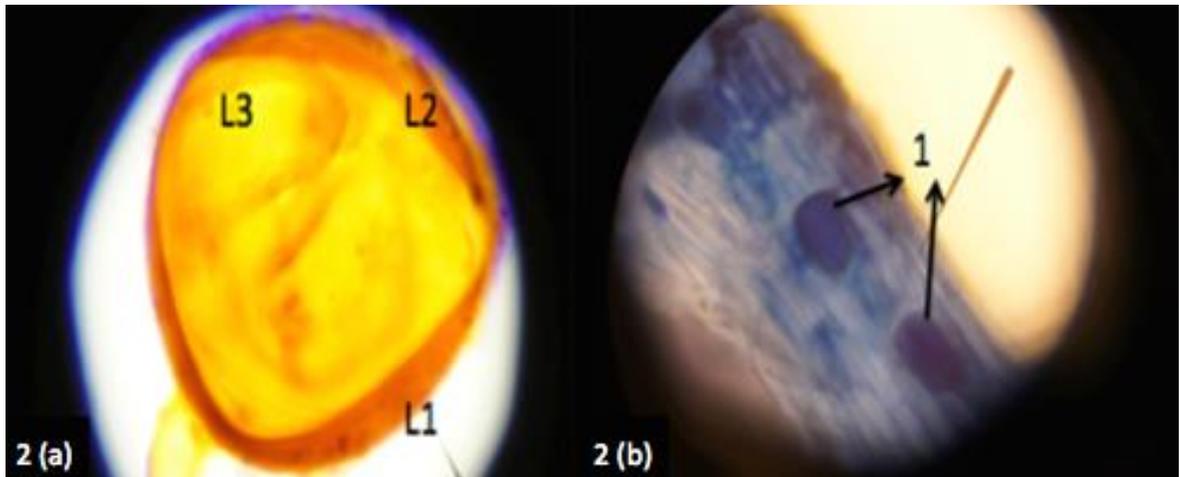


Figura 2. Espora nativa 1. Imagen 2(a). Espora que se observó de color amarillo marrón en un aumento de 40x, de forma globosa, subglobosa, se presentó con mayor distribución en los tamices de 80 μm . Estas esporas presentan tres paredes L1, L2 y L3, las cuales a medida que la espora aumenta la edad estas 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 tripan, 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).

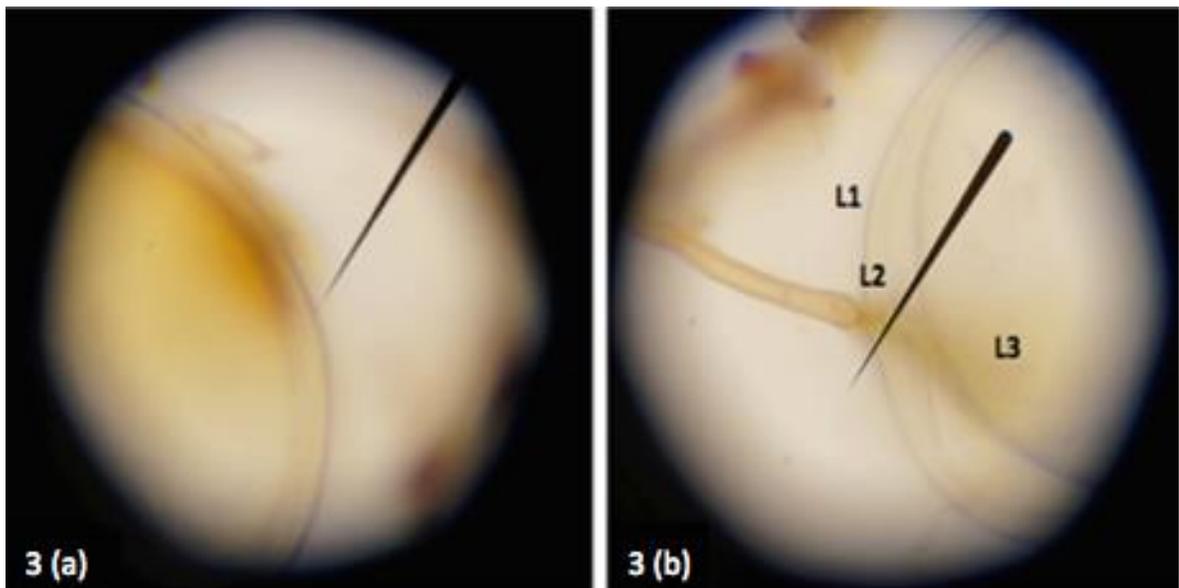


Figura 3. Espora nativa 2 en aumento de 40x 3(a) Esporas caracterizadas por su variación de color amarillo pálido a amarillo pálido marrón, tamaño distribuido en mayor número entre 83 y 110 μm , con forma globosa a subglobosa. Imagen 3(b). Espora con tres paredes

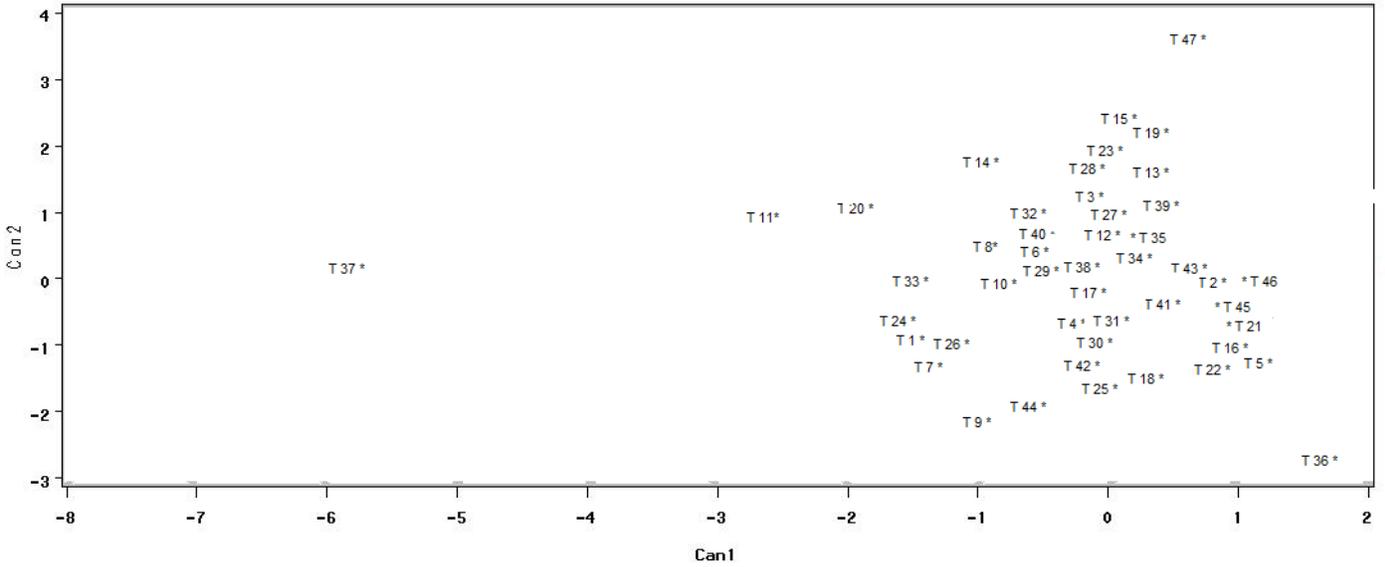
L1, L2 y L3. La pared L1 es delgada y está en contacto con el ambiente que rodea la espora, L2 es de color amarillo pálido en Polyvinyl alcohol – Lactic acid – glicerol (PVLG), estas dos paredes son claramente definidas y la pared L3 es una capa delgada y flexible, imagen que también deja ver claramente 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 ál.*, 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 TonMSxha. 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.

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 4); 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%, P_2O_5 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 P_2O_5 /ha/corte) no fueron los más comunes para la fertilización del pasto kikuyo (*Cenchrus clandestinum* Hochst. ex Chiov.) Morrone (Dianelis *et ál.*, 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 4. Mejores niveles según análisis canónico para el tratamiento de la interacción de todos los niveles de HFMA (M), nitrógeno (N) y fósforo (P₂O₅).

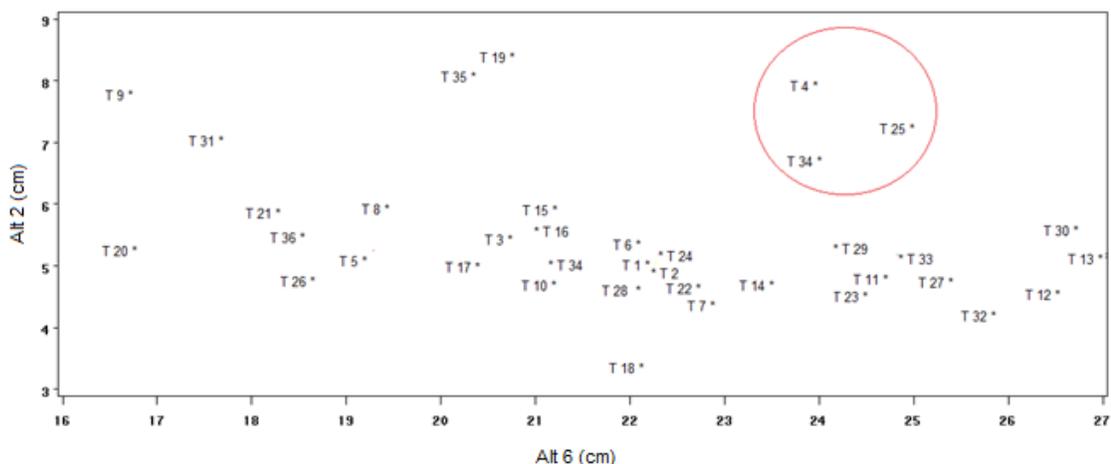
Niveles para M: 1- Sin HFMA, 2- Nativa 1, 3- Nativa 2, 4-HFMA conocido.

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 5).



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 (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.

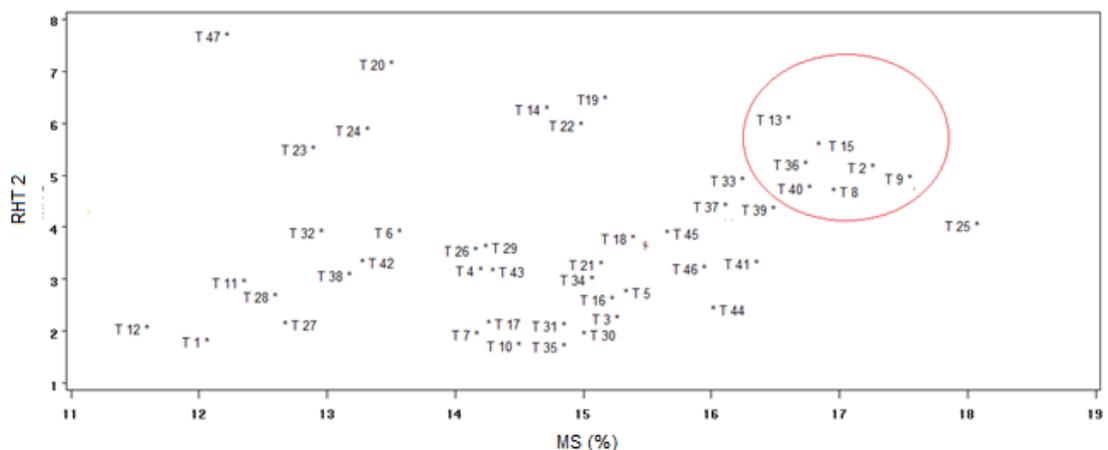
Niveles para M: 1- Sin HFMA, 2- Nativa 1, 3- Nativa 2, 4-HFMA conocido.

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

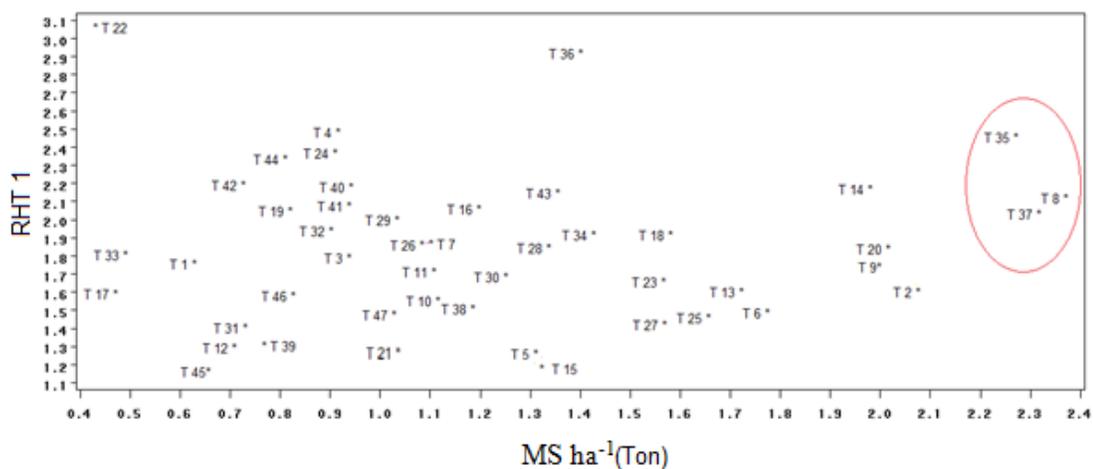
Se comparó la relación hoja/tallo con la producción de materia seca (MS), la RHT 1 versus la producción de MS/ha/año (Figura 6) y la RHT 2 con el contenido de MS (Figura 7); fueron las relaciones que permitieron observar los mejores niveles de los tratamientos para las variables de crecimiento y producción 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 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 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.

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%

Discusión

Al evaluar algunas variables de crecimiento se encontró la importancia de combinarla 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 ál.*, 2000); sin embargo, microorganismos como los HFMA tuvieron la posibilidad no solo movilizar P sino que jugaron también un papel importante en la movilización de N, tal como lo indicaron estudios previos donde los HFMA podían movilizar hasta un 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 ál.*, 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, se debió a que muchas plantas disminuyeron el crecimiento en la transición de no simbiosis a crecimiento de la planta con simbiosis (Li *et ál.*, 2008; Grace *et ál.*, 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 ál.*, 2006); sin embargo, el efecto de las tres variables dependientes (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 ál.*, 1994; Beliuchenko y Febles 1980; Soto *et ál.*, 1980; Silva *et ál.*, 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 ál.*, 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 ál.*, 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 ál.*, 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 N /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 en este tipo de pasto.
- El pasto kikuyo es una especie que se encuentra ampliamente difundida en zonas de trópico alto de Colombia, donde las tasas de aplicación de fertilizantes nitrogenados pueden generar algunos riesgos de contaminación del medio ambiente y un aumento en los costos de producción. Por tanto, una 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.

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

Fuente de variación	D F	Type III SS	CM Alt 1	CM Alt 2	CM Alt 3	CM Alt 4	CM Alt 5	CM Alt 6	CM RH T 1	CM RHT 2	CM % MS	CM TonMSx ha
N	3	7,460	2,486*	2,891	5,434	11,591	17,799*	2,828	0,28	21,460*	73,362*	3,116**
P	4	5,733	1,433*	18,319*	11,971	29885	8,140	23,740	0,44	3,759*	15,649*	2,958**
N*P	9	10,68 2	1,187*	2,827	9,827	21,078	5,666	20,888	0,91	19,465*	15,746*	2,467**
HFMA	3	9,147	3,049*	16,994*	183,426	312,381	7,061	45,708	1,00	7,935**	5,258*	0,351*
N*HFMA	9	28,23 4	3,177*	10,823*	11,024	16,171	8,863*	27,033*	0,80	4,233**	9,315**	0,522**
P*HFMA	9	7,064	0,785	5,933*	13,493*	31,278*	11,967*	12,669	0,85	10,316*	6,534**	0,249**
N*P*HFMA	26	23,80 9	0,916*	3,559	8,065	11,935	4,946	23,339*	0,71	10,305*	1,915	0,452**

* Diferencias significativas (P<0,05), ** Diferencias altamente significativas (P>0,01).

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	1,000	0,704**	0,397**	0,320**	0,004	-0,005	0,035	0,128**	0,050	0,049
Alt 2	0,704**	1,00	0,500**	0,479**	0,019	0,0001	0,060	0,209	0,092	0,089
Alt 3	0,397**	0,500**	1,000	0,992**	-0,011	-0,045	0,004	0,165	-0,002	0,096
Alt 4	0,319	0,479**	0,992**	1,000	-0,017	0,045	0,004	0,165*	-0,002	0,096
Alt 5	0,004	0,019	-0,011	-0,017	1,000	0,277	0,004	-0,051	-0,043	-0,034
Alt 6	-0,005	0,001	-0,046	-0,044	0,278**	1,000	0,126	-0,131	-0,029	0,023
RHT 1	0,035	0,060	0,004	0,003	0,004	0,126	1,000	0,073	0,100	0,036
RHT 2	0,127	0,209	0,165*	0,163*	-0,051	-0,131	0,073	1,000	0,128	0,164*
% MS	0,050	0,092	-0,002	-0,004	-0,043	-0,024	0,101	0,129	1,000	-0,040
TonMSx	0,049	0,089	0,096	0,100	-0,034	0,023	0,036	0,165*	-0,040	1,000

<i>ha</i>										
-----------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

* Diferencias significativas ($P < 0,05$), ** Diferencias altamente significativas ($P > 0,01$).

Referencias bibliográficas

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

Adesemoye AO and Kloepper J. Plant–microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2009; 85:1–12.

Ahmad MM, Munir A, Shahzad MS, Masood and Iqbal M. Evaluation of bread wheat genotypes for salinity tolerance under saline field conditions. *Afr. J. Biotechnol.* 2011; 10: 4086-4092.

Barea JM, Azcón AC, Azcón R. Mycorrhizal Fungi and Plant Growth Promoting Rhizobacteria. *Plant Surface Microbiology.* 2005; 351 -371.

Bargo F, Muller LD, Kolver Y, and Delahoy JE. Invited Review: production and digestión of suplemented dairy cowa on pasture. *J. Dairy Sci.* 2003; 86: 1 - 42.

BEG. Bank of European Glomales Disponible en: www.bio.ukc.ac.uk/beg. 2015. Consultado el 23 de Marzo de 2015.

Beliuchenko I. y Febles G 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.* 1980; 14: 167-17.

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

Blaszkowski J, Czerniawska B. The occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi of the phylum Glomeromycota in Israeli soils. *Acta Soc. Bot. Pol.* 2006; 75, 339-350.

Burdman, S. Jurkevitch, E. and Okon, Y 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. Vol II; 2000. p. 229-250.

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

Carulla JE, Cárdenas E, Sánchez N, y Riveros C. 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; 2004. p. 21- 38.

Chopra BK, Bhat S, Mikheenko IP, Xu Z, Yang Y, Luo X, Chen H, Zwieten VL, McC RL, Zhang R. The characteristics of rhizosphere microbes associated with plants in arsenic-contaminated soils from cattle dip sites. *Science of the Total Environment*. 2007; 378: 331–342.

Correa J, Pabón ML, and Carulla JE. Valor nutricional del pasto kikuyo (*Cenchrus clandestinus* (Hoechst Ex Chiov.) Morrone) para la producción de leche en Colombia (Una revisión): I - Composición química y digestibilidad ruminal y posruminal. [online]. *Livestock Research for Rural Development*. ISSN: 0121 – 378. 2008; 20(59). Disponible <http://www.lrrd.org/lrrd20/4/corra20059.htm> [citado 23 de Marzo 2013].

Dalpé Y. Inventaire et repartition de la flore endomycorhizienne de dunes et de rivages maritimes du Québec, du Nouveau-Brunswick et de la Nouvelle-Ecosse. *Naturaliste Can. (Rev. Ecol. Syst.)*. 1989; 116, 219-236

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

Dodd JC, Thomson BD The screening and selection of inoculant arbuscular – mycorrhizal and ectomycorrhizal fungi. *Plant and soil*. 1994; 159: 149-158

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

Franco DA, Cano GI. Arbuscular mycorrhizal colonization and growth of Buffel grass (*Cenchrus ciliaris* L.) genotypes. 2006; 29(3): 203 – 206.

Giovannetti M, and Mosse B. An evaluation of technique for measuring vesicular – arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New. Phytol*. 1980; 84: 489-500.

Grace EJ, Cotsaftis O, Tester M, Smith FA, Smith SE. 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*. 2009; 181: 938 – 949.

Gray MJ and Smith, LM. Influence of land use on postmetamorphic body size of playa lake amphibians. *Journal of Wildlife Management*. 2005. 69:515-524.

Habte M, Osorio NM. Arbuscular mycorrhizas: Producing and applying arbuscular mycorrhizal inoculum. *College of tropical agriculture & Human resources university of Hawaii at manoa*. 2001. p.47.

Hart MN and Reader RJ. Host plant benefit from association with arbuscular mycorrhizal fungi: Variation due to differences in size of mycelium. 2002; 36: 357 – 366.

Hiltner L. Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründung und Brache. *Arbeiten der Deutschen Landwirtschaftlichen Gesellschaft*. 1904; 98, 59-78.

INVAM. (The International Culture Collection of Arbuscular and Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi) 2015. Disponible en [www. Invam.caf.wvu.edu](http://www.invam.caf.wvu.edu). 2015; consultado el 23 Marzo de 2015.

Knapp D, Pintye A, Kovács G. The dark side is not fastidious – Dark septate endophytic of native and invasive plants of semiarid Sandy areas. *Plos one*. 2012; 7; (2) 3-7

Lau JA and Lennon JT. Evolutionary ecology of plant-microbe interactions: soil microbial structure alters selection on plant traits. *New Phytologist*. 2011; 192: 215-224

Leigh J, Hodge A, Fitter AH. Arbuscular mycorrhizal fungi can transfer substantial amounts nitrogen to their host plant from organic material. *New phytology*. 2009; 181(1): 199-207.

Li H, Smith FA, Dickson S, Holloway RE, Smith SE. Plant growth depressions in arbuscular mycorrhizal symbioses: not just caused by carbón drain?. *New phytologist*. 2008; , 178: 852 – 862.

Mahesh B, Mayura D and Paramjit J. 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, India. 2010. P. 265-271

Marais JG. Factors affecting the nutritive value of kikuyu grass (*Cenchrus clandestinus*) a review. *Tropical Grasslands*. 2001; 35: 65-84.

Mendo O, Pérez J, Martínez P, Herrera J, Mendoza G, Hernández A. Pastoreo de kikuyo (*Cenchrus clandestinum* (Hoechst Ex Chiov.) Morrone) por borregos en crecimiento a diferentes asignación de forraje. *Agrociencia*. 2000; 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, (Costa Rica), 45 p.

Phillips JM, and Hayman DS. Improved procedures for clearing and staining parasitic and vesicular–arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Brit. Mycol. Soc*. 1970;55: 158-161

Schenck NC and Sm GS. *Glomus intraradices* [online.] 1982. Disponible: <http://www.zor.zut.edu.pl/Glomeromycota/index.html> [citado 23 de Abril 2015].

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

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

Smith SE, Read DJ. Mycorrhizal symbiosis. Second edition. Academic Press, Elsevier. Great Britain. 1997. p. 31.

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

Swanepoel PA, Bothaa PR, Preez CC, Snyman HA. Physical quality of a podzolic soil following 19 years of irrigated minimum-till kikuyu-ryegrass pasture. *Soil & Tillage Research*. 2013; 133: 10–15.

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

Talukdar NC, Germida JJ. Occurrence and isolation of vesicular-arbuscular mycorrhizae in cropped field soils of Saskatchewan. *Can. J. Microbiol.* 1993; 39 567-575.

Tidjane DA, Samb IP, Ducouso M 1999. Arbuscular mycorrhizal fungi in the semi-arid areas of Senegal. *Euro Journal Soil Biology*. 35(2): 65-75.

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

Vance CP, Graham PH, Allan DL. 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. 2000 pp: 509–518

Capítulo 3

Respuesta del pasto kikuyo (*Cenchrus clandestinum* (Hochst. ex Chiov.) Morrone) a la inoculación con hongos micorrícicos y a diferentes niveles de nitrógeno y fósforo en algunas variables bromatológicas y características del suelo

Resumen

El pasto kikuyo (*Cenchrus clandestinus* (Hochst. ex Chiov.) Morrone), es una de las gramíneas predominante en el trópico alto Colombiano, su rápida forma de propagación y calidad nutricional han permitido que este pasto sea común en sistemas de producción de lechería especializada, lo que indica que es un pasto que debe ser sometido a programas de manejo que involucran planes fertilización química basados en nitrógeno (N) y fósforo (P), los cuales son costosos y ponen en riesgo el medio ambiente. Con el objetivo de plantear nuevas alternativas en el manejo ecológico de las praderas de pasto kikuyo se evaluó el efecto de los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) bajo diferentes niveles de fertilización nitrogenada y fosfórica en el porcentaje de materia seca (MS%), concentración de energía bruta (EB) y el contenido mineral de calcio (Ca%) y P(%) del pasto kikuyo. Para ello se emplearon dos especies de HFMA *Rhizophagus intrarradices* y *Rhizophagus manihotis* sometidos a diferentes de niveles de nitrógeno 0 kg N/ha/año (0%), 200 kg N/ha/año (50%) y 400 kg N ha/año (100%) y fósforo 0 kg P/ha/año (0%), 100 kg P/ha/año (50%) y 200 P/ha/año (100%). Los resultados indican que los HFMA no afectaron ($P>0,05$) las variables de calidad del forraje analizadas, sin importar el tipo de HFMA empleado, sin embargo especies como *Rhizophagus intrarradices* pueden ser más eficientes en la toma de elementos del suelo como el N y el P ya que es un hongo que se encuentra adaptado a las condiciones bajo las cuales esta establecido el pasto kikuyo. El uso de HFMA en los planes de fertilización de praderas de pasto kikuyo permite mejorar algunas de las variables bromatológicas del pasto kikuyo, reduciendo la aplicación de N y P los cuales son minerales que aplicados en grandes cantidades, afectan el costo de sostenimiento de las praderas y pueden causar algún tipo de daño al medio ambiente.

Palabras claves: Calcio, colonización, energía bruta, fósforo, proteína cruda.

Introducción

El uso de fertilizantes químicos con el fin de mejorar la fertilidad de los suelos, la productividad y calidad de los cultivos, a menudo ha afectado el complejo sistema de los ciclos biogeoquímicos de forma negativa (Perrott et ál., 1992; Steinshamn et ál., 2004), causando la lixiviación y escorrentía de nutrientes, especialmente nitrógeno (N) y fósforo (P), lo cual conduce a una degradación del medio ambiente (Tilman 1998; Gyaneshwar et ál., 2002). No obstante la pérdida de nutrientes no solo causa daños ambientales sino que hay un impacto negativo en la planta ya que parte del fertilizante aplicado no es por esta

cuando se aplica en grandes cantidades afectando su crecimiento y calidad composicional. En la última década el número de publicaciones científicas tratando de encontrar una mejor eficiencia con el uso de microorganismos del suelo para la toma de nutrientes aplicados y disponibles en el suelo para la planta ha ido en aumento (Adesemoye y Klopper, 2009). Dentro de esos microorganismos se encuentran los hongos formadores de micorrizas arbusculares HFMA, microorganismos que tienen la capacidad de influir en el crecimiento de las plantas, la toma de agua y el contenido de nutrientes de estas (Ames et ál., 1983; Barea et ál., 2002; Giovannetti et ál., 2006), lo anterior dado la capacidad que tienen las hifas de los HFMA de tomar N y P y llevarlo a la planta (Aseri et ál., 2008). En Colombia el pasto kikuyo (*Cenchrus clandestinus* (Hochst. ex Chiov) Morrone), es una planta de gran importancia en sistemas pecuarios de producción de leche de trópico alto (Osorio 2004; Correa et ál., 2011), dado que es una planta de crecimiento sumamente agresivo (Estadra, 2001), siendo un pasto que requiere altos niveles de fertilización química para lograr grandes producciones de biomasa y producir forrajes de calidad para alimentar las vacas lecheras. La fertilización con N recomendada para este tipo de explotaciones fluctúa entre 50 y 70 Kg de nitrógeno por hectárea por pastoreo, lo que implica al menos 400 kg N/ha/año (Echeverri et ál., 2010). Dosis que afecta no solo el costo de los fertilizantes si no también la contaminación del medio ambiente (Echeverri et ál., 2010), lo anterior obliga a buscar estrategias en el manejo de la fertilización del pasto kikuyo; una de estas estrategias es el uso de los HFMA. Debido a esto, el objetivo de esta investigación fue determinar la calidad composicional del pasto kikuyo mediante algunas variables bromatológicas cuando se aplica diferentes dosis de fertilizantes nitrogenados y fosfóricos en asocio con los HFMA y el efecto de estos últimos en la absorción de nutrientes como el P disponible en el suelo.

Materiales y métodos

Muestreo de suelos: Se seleccionaron muestras de suelo y pasto de cuatro zonas representativas por la producción de leche bajo pasto kikuyo del departamento de Antioquia (San Pedro de los Milagros, Entrerrios, Santa Rosa de Osos y La Unión). 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 ál., 2005; Chopra et ál., 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 cercano a bosques y donde el pasto kikuyo mostró un buen crecimiento. Cada muestra fue de cinco kilogramos de suelo de cada uno de los sitios de muestreo (tres fincas por municipio); estas fueron llevadas al laboratorio de suelos de 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 la micorrizas se empleó el suelo rizosférico comprendido entre los primeros 20 cm de profundidad de las raíces (Dodd y Thomson, 1994). Submuestra de 100 a 200 g de suelo seco al ambiente bajo sombra se pasaron a través de un tamiz de dos (2) 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 dejó agitar 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, donde en la parte inferior va 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 centrifugó nuevamente a 2000 rpm durante tres minutos. Las esporas quedaron en el sobrenadante y algunas esporas en suspensión para separar las esporas de la solución se pasaron por papel filtro, luego estas 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 visualizarlas en estereomicroscopio; allí fueron separadas morfológicamente usando las siguientes características: 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 para lo cual se empleó la información disponible en 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 de porcentaje de colonización: El método utilizado fue el propuesto por (Phillips y Hayman 1970; 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 1cm de longitud de raíz teñida, seleccionados al azar, y 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 1 cm de longitud de 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 se lavaron dos veces con agua corriente.
3. Se Aplicó KOH al 10% y se calentaron al baño de maría por 5-20 minutos aantes de llevarlas a la autoclave para decolorarlas (extracción de taninos). Donde se estableció un tiempo de 6 minutos.
4. Se dejó enfriar y se lavó dos veces con agua destilada.
5. Se agregó HCl al 1% y se dejó por 5 minutos (para neutralizar el efecto de la base).

6. Las raíces se lavaron dos veces con agua corriente, y luego se les adicionó azul de tripan al 0,05% y se dejó actuar de 4- 8 horas.

7. 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:

$$\% \text{ de Colonización} = \frac{\# \text{ intersecciones micorrizadas}}{\# \text{ de intersecciones observadas}} \times 100$$

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

Multiplicación de cepas: Se usó como cultivo para la esporulación el kikuyo (*Cenchrus clandestinum* (Hochst. ex Chiov.) Morrone) con el objetivo de que se multiplicaran las esporas de los HFMA que forman simbiosis con este pasto. El sustrato que se usó es 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 ál., 2012), cada pote fue fertilizado con 80 ppm de P usando como fuente roca fosforita Huila; luego de las 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 hongos micorrícicos y raíces de la planta (Habte y Osorio, 2001).

Selección semilla de 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.

Siembra de pasto kikuyo: Se realizó en potes plásticos de dimensiones de 16 cm x 8 cm de diámetro, los cuales contenían suelo tomado de los diferente municipios, esterilizado en autoclave a 120°C durante 15 minutos, cinco 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 (Figura1)

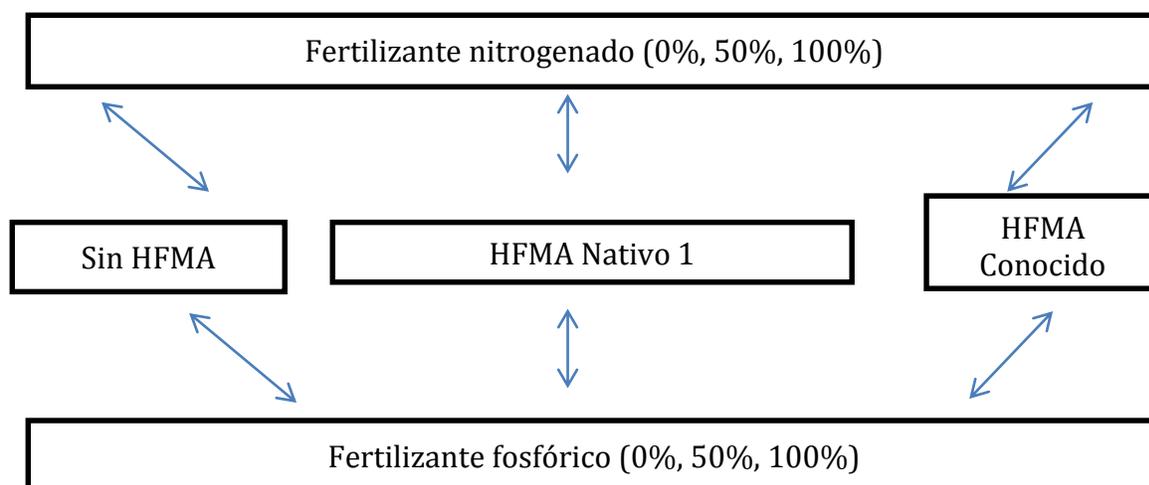


Figura 1. Asignación de los diferentes tratamientos empelados en el estudio

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

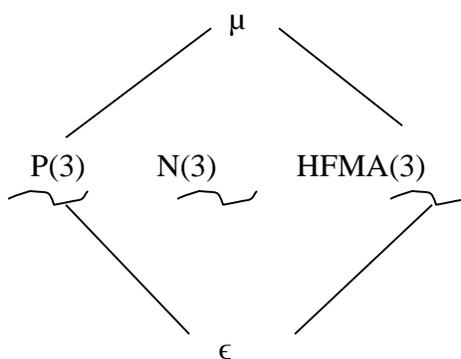
Fertilización nitrogenada, fosfórica y HFMA: Para la fertilización nitrogenada de 100% se empleó la máxima dosis reportada por (Dianelis et ál., 1994) de 400 kg N/ha/año o 50 kg N/ha/Corte en pasto kikuyo, usando como fuente urea grado (46-0-0) y el 100% de la dosis del fertilizante fosfórico fue de 200 kg P/ha/Corte o 25 kg P/ha/Corte (Dianelis et ál., 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; 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 los potes a este suelo se le aplicó Cal dolomita en dosis de 2000 kg/ha.

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

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

Diseño experimental: Se empleó un diseño de clasificación experimental completamente aleatorizado mediante arreglo factorial (3^{3*3}) asimétrico de tipo balanceado, efecto fijo, de medidas repetidas en el tiempo donde se evaluó 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, suplementado con análisis de tipo unidimensional que tiene como objetivo establecer los estadísticos media aritmética, desviación típica y coeficiente de variación.

Diagrama



Modelo clasificación experimental

$$Y_{ijks} = u + P_i + N_j + HFMA_s + PN_{ij} + PHFMA_{is} + NHFMA_{js} + PNHFMA_{ijs} + e_K(ijs)$$

Donde

U: Media poblacional

P_i: i-esima observación del efecto del fósforo

N_j: i-esima observación del efecto del nitrógeno

HFMA_s: i-esima observación del efecto de los hongos formadores de micorrizas

PN_{ij}: i-esima observación del efecto combinado del fósforo y el nitrógeno

PHFMA_{is}: i-esima observación del efecto combinado del fósforo con los hongos formadores de micorrizas

NHFMA_{js}: i-esima observación del efecto combinado del nitrógeno con los hongos formadores de micorrizas

PNHFMA_{ijs}: i-esima observación del efecto combinado del fósforo y el nitrógeno con los hongos formadores de micorrizas

e_{k(ijs)}: Error experimental

Factores experimentales:

Factor 1: fertilización fosfórica (P) con tres niveles (0%, 50%,100%)

Factor 2: fertilización nitrogenada (N) con tres niveles (0%, 50%,100%)

Factor 3: hongos micorrícicos (HFMA) con tres niveles (sin micorrizas, *Rhizophagus intraradices*, *Rhizophagus manihotis*)

Tratamientos:

Se implementaron 27 tratamientos con tres repeticiones por tratamiento para un total de 81 unidades experimentales.

Unidad experimental:

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.

Variables experimentales:

Porcentaje de materia seca (MS %)

Proteína cruda (PC %)

Energía bruta (EB Mcal kg⁻¹ MS⁻¹)

Calcio (Ca %)

Fósforo (P %)

Porcentaje de Colonización (%)

Adsorción de P (mg/L) en la solución del suelo

Variables de calidad: Para las variables de calidad del pasto kikuyo las muestras de este se llevaron al laboratorio de nutricional animal y pastos y forrajes de la Universidad de

Antioquia, sede Robledo, donde se determinó el porcentaje de materia seca según (AOAC, 1990), la proteína cruda por el método de Kjeldahl (Mc Donal et ál., 1998 y AOAC,1995), la energía bruta se determinó a través del método de la bomba calorimétrica, el contenido de calcio (Ca) por el método de complexométrica con EDTA y el P con el método de espectrometría UV – VIS, NTC 4981 (Ayala 2007)

Período de corte: El pasto se dejó crecer tres ciclos de 35 días; en el último ciclo cuando su desarrollo vegetativo formó la cuarta y quinta hoja bien desarrollada (Mendo et ál., 2000; Chopra et ál., 2007); el pasto se cosechó a una altura de 10 cm (Swanepoel et ál., 2013).

Isotermas de fósforo: Cada una de las muestras de los diferentes suelos se pasaron por un tamiz de dos mm de apertura; posteriormente se pesó 3 g de suelo para adicionarlo a un tubo de centrifuga de prolipropileno (Habte y Osorio, 2001). Aparte se preparó una solución CaCl_2 0,01M y dos gotas de tolueno para disminuir la actividad microbiana durante la agitación (Fox y Kamprath 1970). El P se aplicó en forma de KH_2PO_4 para obtener tres concentraciones de P en la solución del suelo expresada en g de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{kg}$ de suelo. Las concentraciones de suelo que se usaron fueron las propuestas por Sierra et ál., (2012) 2-3,8 y 17,6 g kg^{-1} . Los tubos que contienen el CaCl_2 con el KH_2PO_4 se agitaron con la finalidad de mezclar muy bien el P adicionado con el suelo; la agitación se realizó en un agitador de vaivén para 30 minutos a intervalos de 12 horas durante un período de 6 días (Habte y Osorio, 2001). Finalizado el periodo de agitación las muestras fueron llevadas a una centrifuga a 10.000 rpm, luego se aspiró 10 ml del sobrenadante para ser transferidos a tubos de ensayo de 25 ml, reduciendo de 10 ml a 5 ml incluso a 1 ml y completar el volumen de los 25 ml con agua destilada (Fox y Kamprath, 1970).

Se añadieron 2,5 ml de reactivo ácido de molibdato ácido (Reactivo B) en los tubos de ensayo (Murphy y Riley, 1962), y se mezcló por agitación. Se leyó la intensidad del color producido en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 882 nm; antes de comenzar el espectrofotómetro se calibró con la solución en blanco, el reactivo B se preparó disolviendo 0,428 g de ácido L-ascórbico en 100 ml de reactivo A. El Reactivo A se preparó disolviendo 0,35 g de Tartrato de antimonio y potasio 2,7 L de agua destilada, añadiendo al mismo tiempo 168 ml de ácido sulfúrico concentrado, disolviendo 14,43 g de molibdato de amonio en la solución y la adición de 120 ml de agua destilada; esta solución se almacenó en un lugar oscuro. La correcta absorbancia se obtiene restando la absorbancia del reactivo blanco (solución 0,01 M CaCl_2 más reactivo B) y la solución del extracto de suelo sin reactivo B; para el gráfico de isoterma de absorción de fósforo se trazó la absorbancia de la soluciones estándar de P frente a la concentración, el valor se multiplicó por 1,25 para obtener la concentración de P remanente en la solución en mg / L o mg / ml (Fox y Kamprath, 1970).

Resultados

Calidad del forraje

Materia seca: para el contenido de materia seca del pasto kikuyo solo hubo efecto significativo ($P < 0,05$) para la variable independiente N como efecto simple, donde se presentó un valor de (19,57 %) las variables P y HFM no tuvieron efecto significativo (Figura 2) tanto como efectos simples como la interacción de todas la variables independiente.

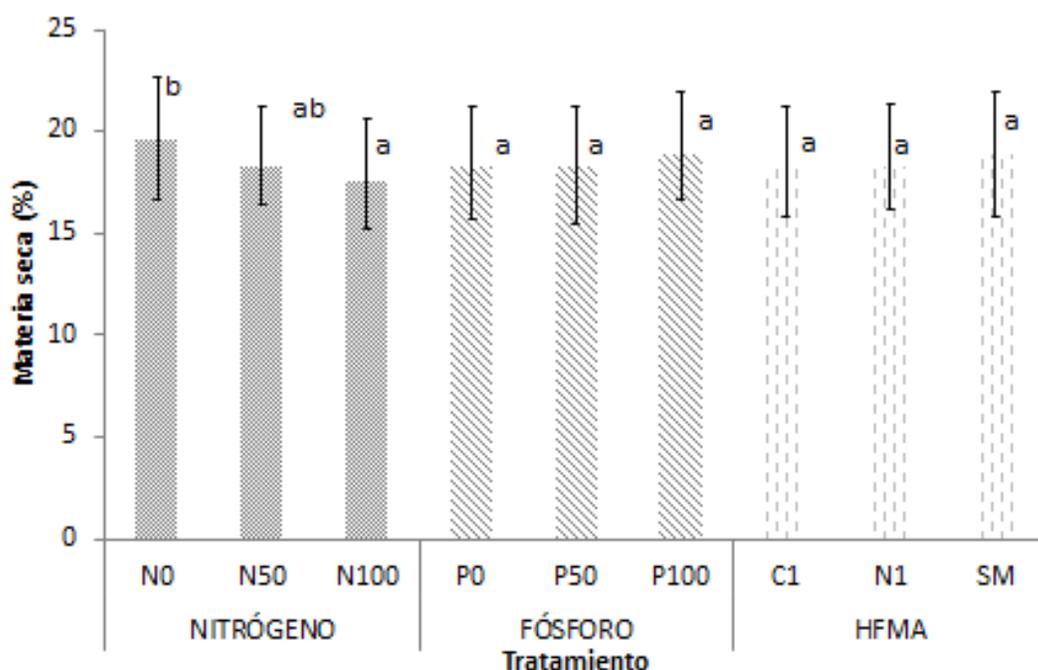


Figura 2. Efecto de los diferentes tratamientos para el porcentaje de materia seca del pasto kikuyo, letras diferentes en un mismo tratamiento indican diferencias significativas. Dentro del tratamiento con nitrógeno la dosis N 0% tuvo diferencia significativa en la producción de materia seca.

Proteína cruda: El contenido de proteína cruda (PC) del pasto kikuyo tuvo un efecto significativo ($P < 0,05$) en la interacción entre N y P encontrándose un mayor efecto entre los niveles N100 – P50 (17,44 % PC). Para los tratamientos donde se analizaron los efectos simples N, P y HFMA todos los niveles de estos fueron similares entre sí por lo tanto no tuvieron diferencias significativas ($P > 0,05$) (Figura 3). Todos los promedios de proteína cruda fueron superiores al 15 % excepto para el tratamiento donde no hubo aplicación de N y de P (14,19%).

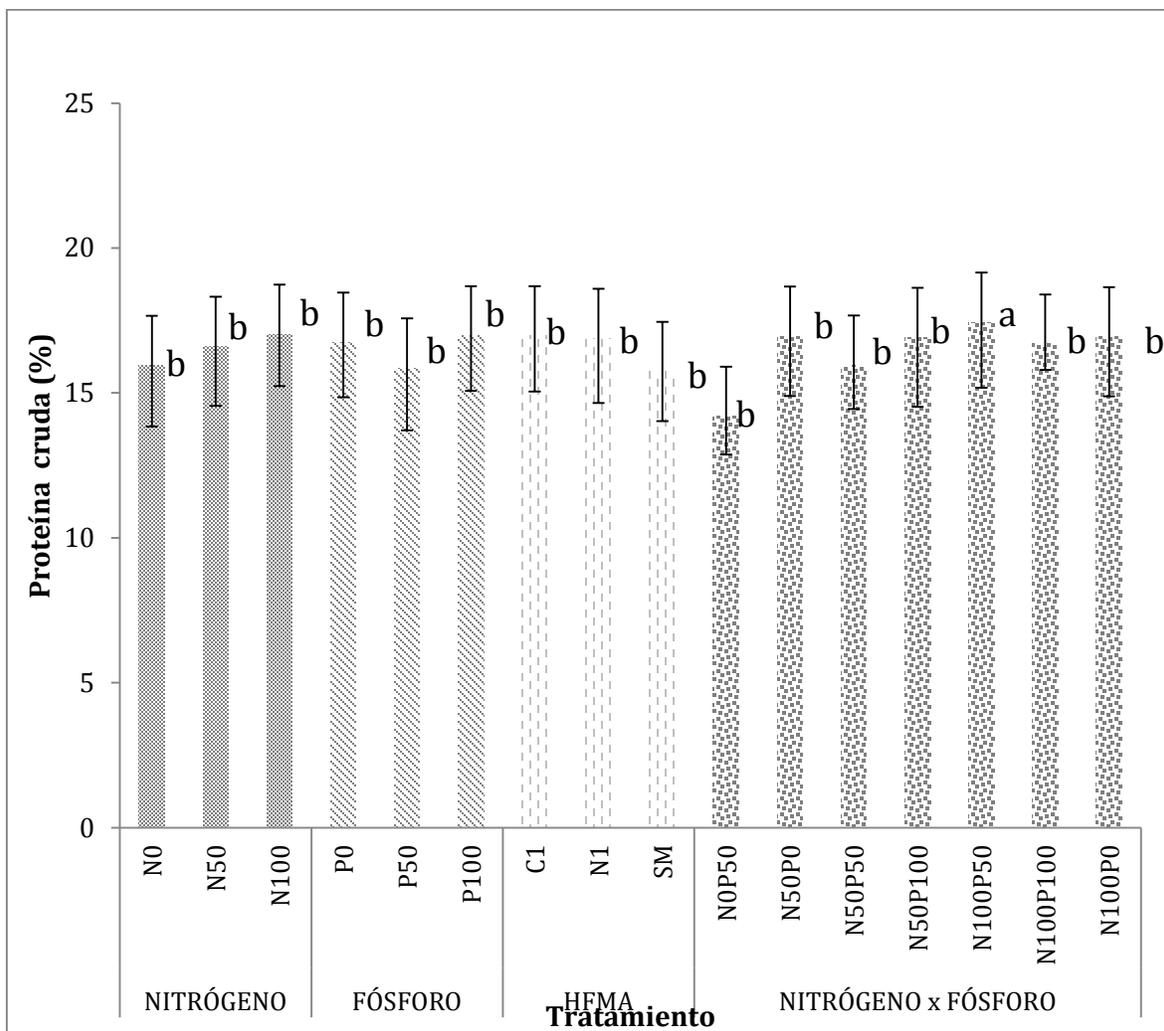


Figura 3. Efecto de los diferentes tratamientos para el porcentaje de proteína cruda del pasto kikuyo; letras diferentes en un mismo tratamiento indican diferencias significativas. Dentro del tratamiento conjugado N y P el nivel N100 y P50 tuvo diferencia significativa en el porcentaje de proteína cruda con respecto a los demás tratamientos.

Energía: Para la energía bruta hallada en el estudio (Figura 4) se observó una concentración energética mayor cuando se combinan los tratamientos N100 y P50 ($P < 0,05$); el contenido de energía para los tratamientos que combinaron dosis de P50 con algún HFMA presentó niveles de energía bruta por encima de 4.100 kcal. Efecto contrario al que ocurrió cuando los tratamientos que no contenían P y se combinaron con HFMA, las concentraciones de energía fueron inferiores a 4000 kcal. La aplicación P, aumento la cantidad de energía bruta del pasto kikuyo; sin embargo, esta aplicación de N solo no tuvo un efecto significativo ($P > 0,05$) sobre esta variable.

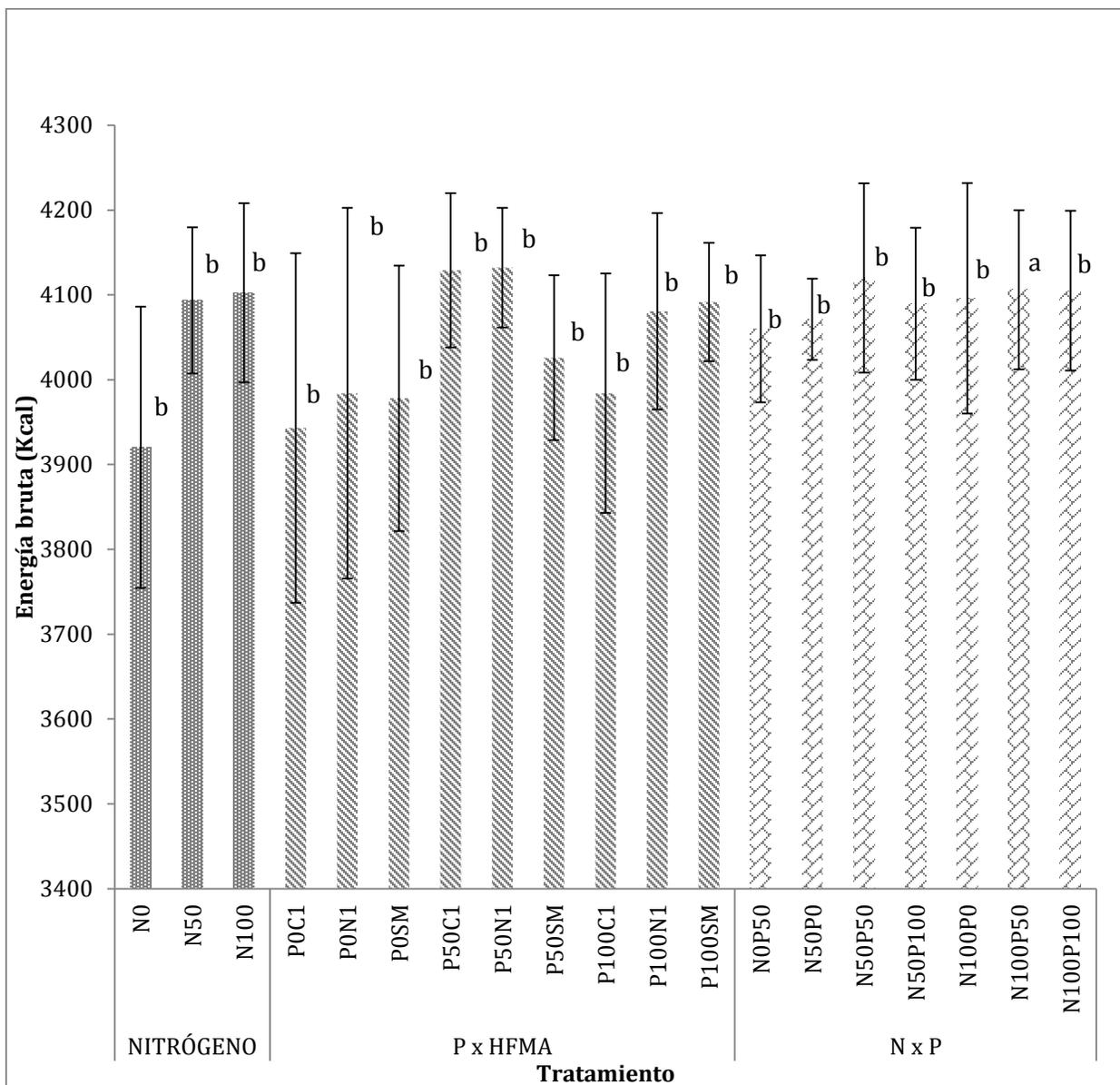


Figura 4. Efecto de los diferentes tratamientos para el contenido de energía bruta del pasto kikuyo; letras diferentes en un mismo tratamiento indican diferencias significativas. Dentro del tratamiento conjugado N y P el nivel N100 y P50 tuvo diferencia significativa ($P < 0,05$) en el contenido de energía bruta con respecto a los otros tratamientos.

Calcio: Para el contenido de calcio hubo un efecto significativo ($P < 0,05$) en la interacción N y P en los niveles N100 y P50 (Figura 5) con una concentración promedio de 0,93%. En los tratamientos en los que se empleó HFMA la especie nativa 1 (N1) mostró un aumento del contenido de Ca por encima del 0,9% ($P > 0,05$); sin embargo la concentración de calcio en pasto kikuyo no fue significativo ($P > 0,05$); resultado similar se observó en la interacción simple de N y de P donde no hubo efecto significativo.

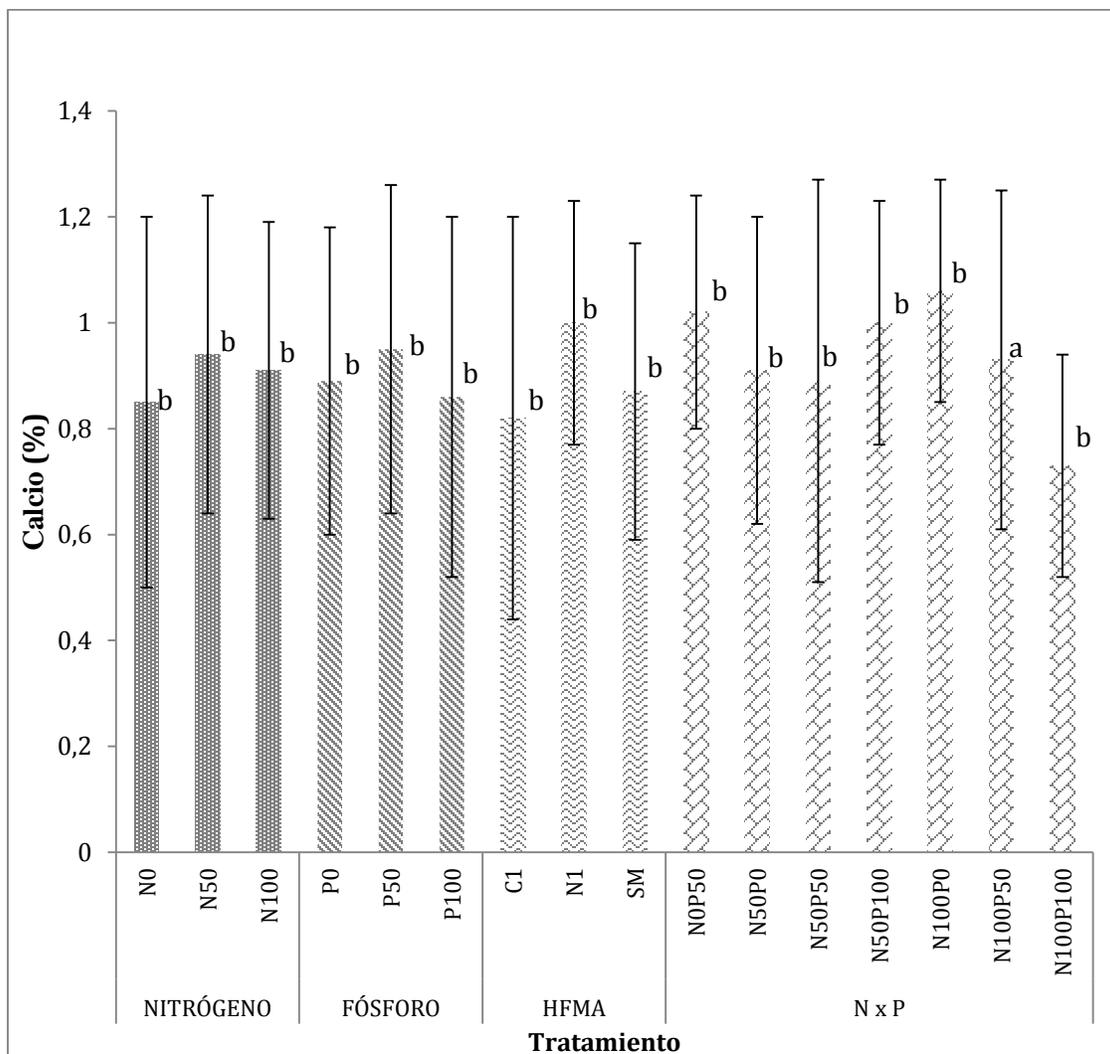


Figura 5. Efecto de los diferentes tratamientos para el porcentaje de calcio del pasto kikuyo; letras diferentes en un mismo tratamiento indican diferencias significativas. Dentro del tratamiento conjugado N y P el nivel N100 y P50 tuvo diferencia significativa ($P < 0,05$) en el porcentaje de calcio con respecto a los otros tratamientos.

Fósforo: El contenido de P en el pasto kikuyo no tuvo efecto significativo ($P > 0,05$) cuando se analizaron los tratamientos simples N – P – HFMA, el promedio de P se comportó muy similar para cada uno de estos efectos simples (Figura 6); sin embargo, cuando se integraron todos los tratamientos hubo un efecto significativo ($P < 0,05$); de los niveles N100 P50 N1 y N100 P100 C1 ambos tratamientos en promedio tuvieron contenidos de P de 0,330 % y 0,363 % respectivamente (Figura 7).

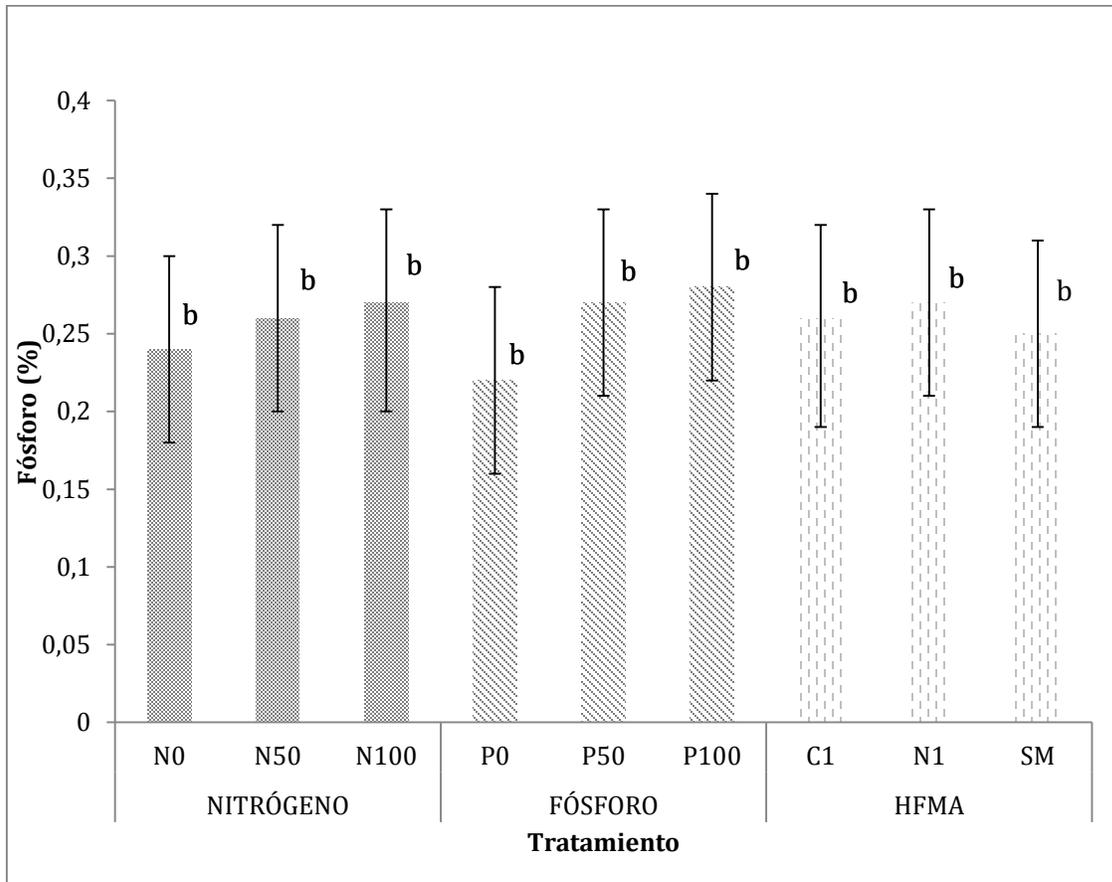


Figura 6. Efecto de los tratamientos simples para el porcentaje de fósforo del pasto kikuyo; letras diferentes en un mismo tratamiento indican diferencias significativas. Dentro los tratamientos simples no hubo diferencias significativas ($P > 0,05$) para el contenido de P en el pasto kikuyo.

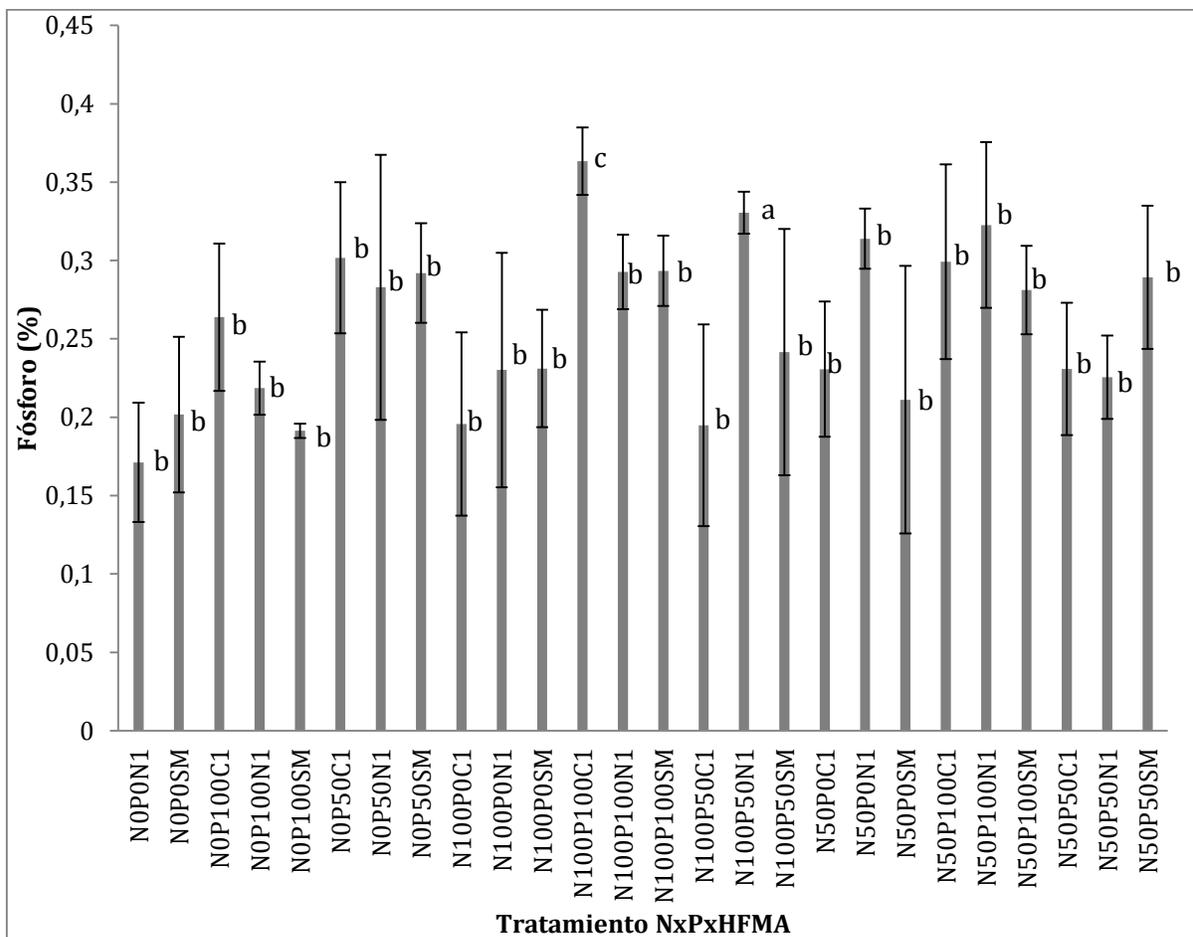
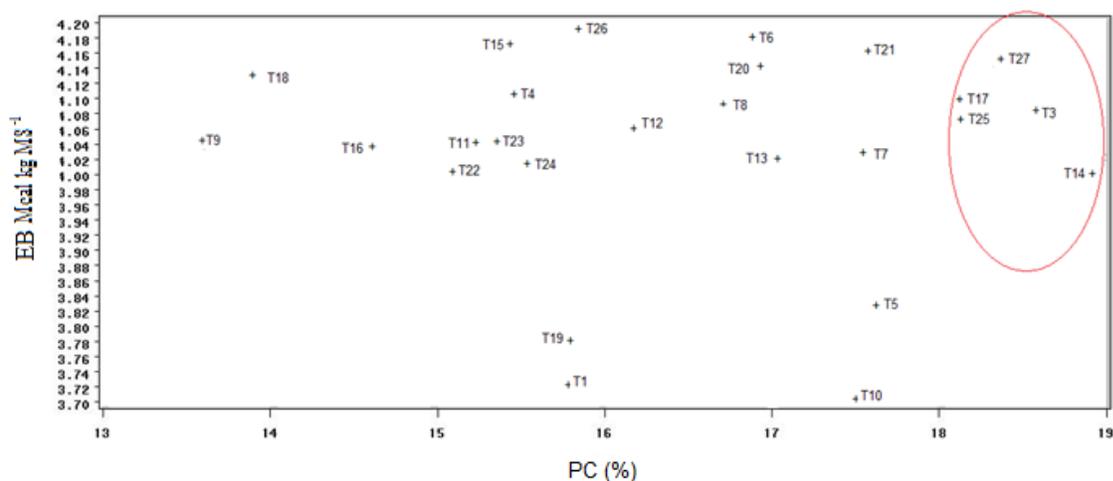


Figura 7. Efecto de la interacción entre los diferentes tratamientos, para el contenido de fósforo (%) en el pasto kikuyo; letras diferentes en un mismo tratamiento indican diferencias significativas ($P < 0,05$). Dentro de la interacción tratamientos se destaca el nivel del tratamiento N100 P50 y N1

Contenido de proteína cruda y energía bruta: Los niveles de tratamientos de la interacción de las variables independientes N, P y HFMA que mostraron un elevado contenido de proteína cruda por encima 18% y energía bruta sobre 4.0 Mcal EB kg MS⁻¹ (Figura 7), fueron N100 – P50 – N1, N100 – P50 – N1, N50 - P0 – C1, N0 – P 100 – N1 y el nivel N50 – P0 – N1. Los peores tratamientos para estas dos variables fueron N0 – P0 – C1 y N0 – P0 – SM (Figura 8).



Tratamiento (M-N-P): T1: 3-1-1 T2: 3-2-3 T3: 2-3-2 T4: 1-3-1 T5: 3-1-3 T6: 3-2-2 T7: 2-2-1 T8: 1-3-3 T9: 3-1-2
T10: 2-1-1 T11: 2-2-3 T12: 1-3-2 T13: 3-3-1 T14: 2-1-3 T15: 2-2-2 T16: 1-2-1 T17: 3-3-3 T18: 2-1-2 T19: 1-1-1 T20: 1-2-3
T21: 3-3-2 T22: 2-3-1 T23: 1-1-3 T24: 1-2-2 T25: 3-2-1 T26: 2-3-3 T27: 1-1-2

Figura 8. Mejores niveles para la interacción de todos los niveles de tratamientos HFMA (M), nitrógeno (N) y fósforo (P) en las variables dependientes contenido de proteína cruda (%) y energía bruta (EB) (Mcal kg MS⁻¹) en el pasto kikuyo. Círculo rojo los tratamientos con mejores medidas en ambas variables.

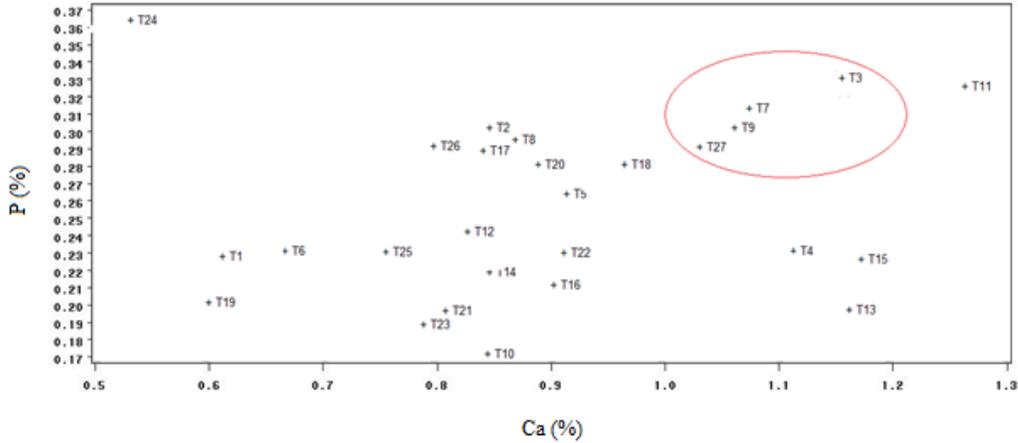
Niveles para M: 1- Sin HFMA, 2- Rhizophagus intraradices, 3- Rhizophagus manihotis

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

Niveles para P: 1- 0%, 2- 50%, 3 – 100%

Contenido de calcio y fósforo: Los mejores niveles de los tratamientos de la interacción de N – P y HFMA para la concentración de los dos minerales calcio y fósforo fueron N50 – P100 – N1 y N100 – P50 – N1 y los que tuvieron menor concentración de ambos minerales fueron los niveles de los tratamientos N0 – P0 – C1 y N0 – P0 – SM (Figura 9).

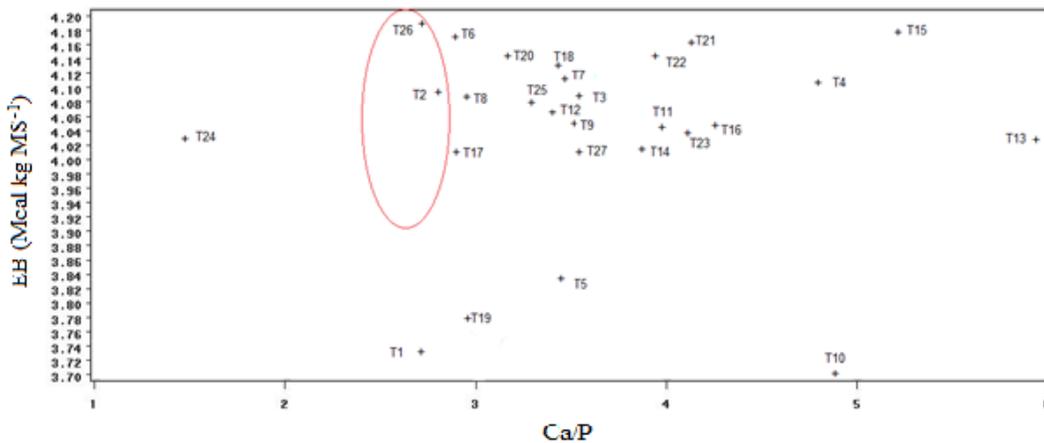
Concentración de energía bruta y minerales en pasto kikuyo: La relación de entre los minerales y la concentración energética del pasto kikuyo, en los niveles de los tratamientos que involucraron los interacción de todas las variables independientes N, P y HFMA; mostraron una relación calcio/fósforo 3 – 4 y una concentración de energía superior a 4.0 4.0 Mcal EB kg MS⁻¹, excepto los niveles de los tratamientos N0 – P0 – C1 y N0 – P0 – SM (Figura 10).



Tratamiento (M-N-P): T1: 3-1-1 T2: 3-2-3 T3: 2-3-2 T4:1-3-1 T5: 3-1-3 T6: 3-2-2 T7:2-2-1 T8:1-3-3 T9:3-1-2 T10:2-1-1 T11:2-2-3 T12: 1-3-2 T13: 3-3-1 T14: 2-1-3 T15: 2-2-2 T16: 1-2-1 T17: 3-3-3 T18:2-1-2 T19: 1-1-1 T20:1-2-3 T21: 3-3-2 T22:2-3-1 T23:1-1-3 T24:1-2-2 T 25: 3-2-1 T26: 2-3-3 T27: 1-1-2

Figura 9. Mejores niveles para la interacción de todos los niveles de tratamientos HFMA (M), nitrógeno (N) y fósforo (P) en las variables dependientes contenido de Ca (%) y contenido de P (%) en el pasto kikuyo. Círculo rojo los tratamientos con mejores medidas en ambas variables.

Niveles para M: 1- Sin HFMA, 2- Rhizophagus intraradices, 3- Rhizophagus manihotis
 Niveles para N: 1- 0%, 2- 50%, 3 – 100%
 Niveles para P: 1- 0%, 2- 50%, 3 – 100%



Tratamiento (M-N-P): T1: 3-1-1 T2: 3-2-3 T3: 2-3-2 T4:1-3-1 T5: 3-1-3 T6: 3-2-2 T7:2-2-1 T8:1-3-3 T9:3-1-2 T10:2-1-1 T11:2-2-3 T12: 1-3-2 T13: 3-3-1 T14: 2-1-3 T15: 2-2-2 T16: 1-2-1 T17: 3-3-3 T18:2-1-2 T19: 1-1-1 T20:1-2-3 T21: 3-3-2 T22:2-3-1 T23:1-1-3 T24:1-2-2 T 25: 3-2-1 T26: 2-3-3 T27: 1-1-2

Figura 10. Mejores niveles para la interacción de todos los niveles de tratamientos HFMA (M), nitrógeno (N) y fósforo (P) en las variables dependientes energía bruta (EB) (Mcal kg MS-1) y la relación Ca y P en el pasto kikuyo. Círculo rojo los tratamientos con mejores medidas en ambas variables.

Niveles para M: 1- Sin HFMA, 2- Rhizophagus intraradices, 3- Rhizophagus manihotis

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

Niveles para P: 1- 0%, 2- 50%, 3 – 100%

Colonización de raíces

Para determinar el porcentaje de colonización se tuvo en cuenta los niveles de fertilización de 0%, 25%, 50% y 100% para el N y el P, además se incluyeron los grupos de HFMA nativos al pasto kikuyo (Rhizophagus intraradices y Rhizophagus fasciculatus) y una especie diferente a las halladas en este pasto (Rhizophagus manihotis). Los resultados muestran que todos los tratamientos que tuvieron HFMA fueron significativos ($P < 0,05$) para el porcentaje de colonización (Tabla 2), y que todos los niveles de fertilización no tuvieron efecto significativo ($P > 0,05$) en el porcentaje de colonización en las raíces del pasto kikuyo (Figura 11).

Tabla 2. Cuadrado medio para la variable dependiente porcentaje de colonización en pasto evaluado a diferentes niveles de fertilización nitrogenada y fosfórica.

Fuente de variación	DF	Type III ss	Cuadrado medio	F Value	P value*
N	3	88,39	29,47	1,25	0,2934
P	3	62,52	20,84	0,89	0,4502
N*P	9	568,23	63,14	2,68	0,0068
HFMA	3	29141,06	9713,69	413,07	<,0001
N*HFMA	9	545,02	60,56	2,58	0,0093
P* HFMA	9	677,23	75,25	3,2	0,0016
N*HFMA*P	27	1049,35	38,86	1,65	0,0339

*Niveles significativo P value < 0.05

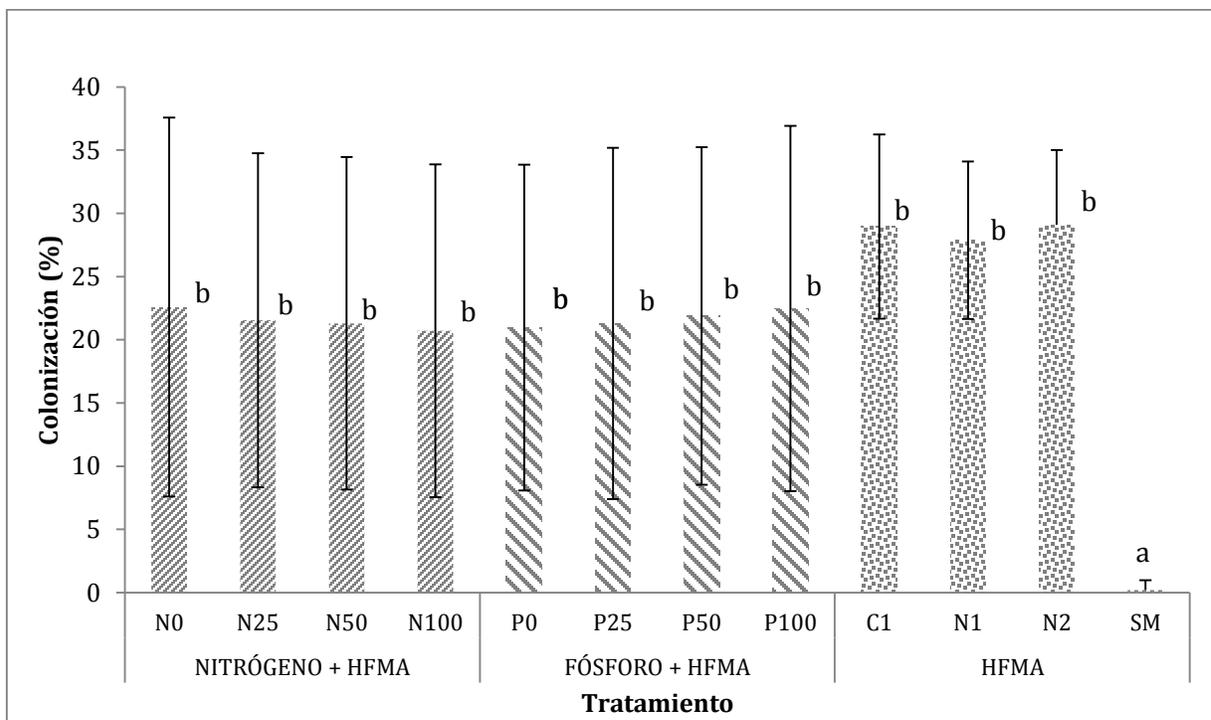


Figura 11. Porcentaje de colonización en pasto kikuyo bajo diferentes niveles de fertilización con N y P; letras diferentes indican diferencias significativas. Los niveles de fertilización no tuvieron efecto significativo en el porcentaje de colonización en las raíces del pasto kikuyo.

Isotermas de adsorción de fósforo

En la determinación de la cantidad de P adsorbido en el suelo solo se tuvo en cuenta los tratamientos que incluyeron los niveles de P y los HFMA, ya que son variables independientes que pueden influir en la cantidad P en solución del suelo. En la variable P se agruparon los niveles (P0%, P25% , P50% y P100%) y para los HFMA los niveles (SM, *Rhizophagus intraradices*, *Rhizophagus fasciculatus* y *Rhizophagus manihotis*). Cuando las cantidad de P aplicado al suelo fue de 0, 500 y 1000 ppm hubo un efecto significativo ($P < 0,05$) de los HFMA en la cantidad de P en la solución del suelo (mg/L), pero para aplicaciones de 2000 y 3500 ppm de P los HFMA no tuvieron efecto significativo en esta variable ($P > 0,05$). La interacción entre los niveles de HFMA y el P no tuvieron un efecto significativo en cada una de las concentraciones (Tabla 3), sin embargo, la aplicación de P en niveles de 0%, 50% y 100% con respecto a la dosis de 200 kg de P ha⁻¹año⁻¹, tuvo efecto significativo ($P < 0,05$) en la concentración de P en la solución del suelo (mg/L) en cada una de la cantidad de P aplicado (0, 500, 1000, 2000 y 3500 ppm). Para el nivel de de P 25% no hubo efecto significativo ($P > 0,05$) en ninguno de los niveles de P aplicado en la isoterma de adsorción (Figura12).

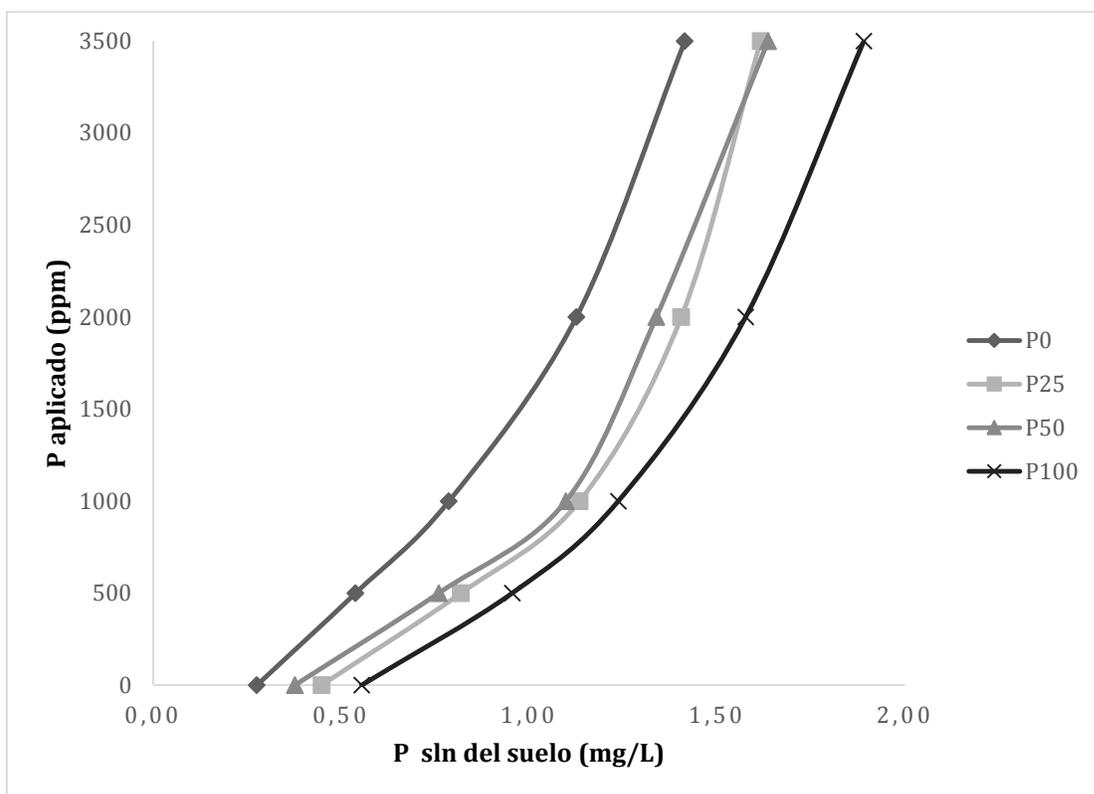


Figura 12. Isotherma de adsorción de P para los diferentes niveles de P 0%, 25%, 50% y 100%.

Tabla 3 Cuadrados medios de la isoterma de adsorción de P para determinar la concentración de P en la solución del suelo (mg/L) con los tratamientos que tuvieron HFMA y aplicación de P en diferentes niveles.

Fuente de variación	Cuadrados medios				
	P 0	P 500	P 1000	P 2000	P 3500
P	0,51**	1,03**	1,19**	1,67**	1,08*
HFMA	0,38*	0,22*	0,70*	0,18	0,02
HFMA x P	0,07	0,07	0,02	0,09	0,28

* Diferencias significativas ($P < 0,05$), ** Diferencias altamente significativas ($P > 0,01$).

Discusiones

Calidad del forraje

Materia seca

Los resultados de esta investigación muestran diferencias significativas ($P < 0,05$) para la concentración de materia seca (MS) del pasto kikuyo cuando no había fertilización nitrogenada, es decir que la aplicación de fertilizantes nitrogenados afecta los contenidos de MS. Resultados que son similares a los reportados por Apraez y Moncayo (2003), quienes encontraron un menor porcentaje de MS cuando se aplicó fertilizantes químicos; igual observación fue realizada por Carmona y Martínez (1988), quienes encontraron altos contenido de MS en pasto kikuyo cuando no se aplicó fertilizante químico. Silva et ál., (2010), encontraron que aplicaciones de nitrógeno (N) y fósforo (P) se asocian con mayores producciones de MS $4,04 \text{ Ton ha}^{-1}$, mientras que la aplicación de P solo disminuyó su producción a $1,65 \text{ Ton ha}^{-1}$. Los cambios en el contenido de MS en las pasturas puede estar relacionado con una menor humedad retenida en los tejidos vegetales (Apraez y Moncayo 2003) y al papel que juega el N en la toma de agua por parte de la planta, ya que a medida que aumenta la aplicación de N se aumenta el crecimiento de la planta y por tanto, el consumo de agua desde el suelo (Teixeira et ál., 2014; Barton et ál., 2009).

Proteína cruda

En cuanto a la concentración de proteína cruda en el pasto kikuyo, la máxima dosis de N100 ($400 \text{ kg N ha año}^{-1}$) en combinación con una dosis media de P50 ($100 \text{ kg P ha año}^{-1}$) mostraron el mejor rendimiento para la concentración de proteína cruda en el pasto kikuyo (Figura 3); esto indica que la aplicación de ambos elementos mejoran considerablemente la nutrición de la planta, donde una aplicación de N en presencia de un nivel adecuado de P contribuiría a una gran actividad fotosintética y a una mayor síntesis de proteína (Shahin et ál., 2013). Marsalis et ál., (2010) y Islam et ál., (2012) encontraron que una tasa de aplicación similar a la usada en el estudio muestra una mejor concentración de proteína cruda en gramíneas. Otros estudios realizados por Silva et ál., (2010) en pasto kikuyo (*Cenchrus clandestinum* (Hochst. ex Chiov.) Morrone) demostraron el efecto de realizar una fertilización acompañada de N, P y S en la concentración de proteína la cual sube a más de un 15%. Resultados similares fueron reportados por Zurita y Vanega (1986), quienes encontraron altas concentraciones de proteína en forrajes establecidos en suelos derivados de cenizas volcánicas cuando estos son fertilizados con N y P. De igual forma los HFMA también juegan un papel importante en el aumento de la calidad del pasto cuando se habla de PC (Sabia et ál., 2015), los HFMA pueden contribuir con la absorción de elementos como el N (Smith y Read 2008) ya que el micelio extrarradical de los HFMA tiene la capacidad de tomar NH_4^+ , NO_3^- y N orgánico del suelo y de los fertilizantes aplicados (Tienda et ál., 2014), para llevarlo a la planta y contribuir a la formación de proteína cruda.

Energía

Para el contenido de energético del pasto kikuyo se observó un efecto significativo ($P < 0,05$) en la interacción del N y el P (Figura 4), dejando claro que la fertilización con

estos nutrientes puede afectar de manera favorable el contenido de energía del pasto kikuyo. Soto et ál., (2005), reporta en pasto kikuyo un efecto de la fertilización con N en la concentración energética, del pasto, donde el aumento de nitrógeno se traduce en una reducción del contenido de cenizas y un aumento del extracto etéreo (EE), de esta forma la concentración energética del forraje aumenta; sin embargo, no tuvo en cuenta el EE, pero se pudo asociar la concentración energética a un aumento en la tasa fotosintéticas de los pastos fertilizados con N y P, por tanto, una mayor concentración carbohidratos los cuales aportan energía (Zong y Shangguan 2014; Fulkerson et ál., 2007). Los pastos manejados con fertilizantes químicos como el pasto kikuyo no solo aumentan la calidad nutricional de la planta en razón a sus mayores contenidos de proteína y energía como la proteína y la energía (Figura 8), sino que además aumentan la tasa de rebrote y crecimiento (Reeves et ál., 1996) donde hay una mayor proporción de hoja que acumula material orgánico el cual va a producir mayor energía (Juarez et ál., 2009).

Calcio

Los niveles de calcio (Ca) en el presente estudio fueron superiores a los reportados por (López y Gonzalez 1985) en pasto kikuyo, quienes evaluaron el efecto de la concentración de P en la concentración de Ca en la planta (López y Gonzalez 1985). El alto contenido de Ca que se encontró quizás se explica por la posible acumulación de este elemento en la pared celular la cual con una elevada dosis de N aumenta su división y tamaño para favorecer el crecimiento del pasto (Emanuele et ál., 1991; Marais 1997). De igual forma el contenido de Ca en el pasto kikuyo se puede ver favorecido por una elevada aplicación de N dado que el este ultimo estimula la producción de ácido oxálico, el cual es un ácido que atrapa el Ca y disminuye su biodisponibilidad cuando el animal consume el pasto (Marais 1990). En cuanto al efecto de los HFMA estos tienen la capacidad de aumentar la absorción de cationes como el Ca^{++} y el Mg^{++} , ya que estos microorganismos con sus hifas mejoran la diferencia de cargas en el suelo facilitando la toma de ambos elementos (Rouphael et ál., 2015).

Fósforo

Uno de los elementos más limitantes para la producción de forraje en el trópico que reduce el crecimiento y la calidad es el P (Quintero y Boschetti 2011). En este estudio se determinó la concentración de este elemento en el pasto kikuyo cuando fue sometido a diferentes niveles de N, P y al uso de HFMA. Los resultados indicaron que una alta aplicación de N y P aumenta el contenido de P en la planta (Figura 7), resultados similares a los reportados por Sánchez (1981) quién indica que una alta tasa de crecimiento a causa de una fertilización con N trae consigo un aumento en los requerimientos de P en el pasto kikuyo. Estudios realizados por (Diannelis et ál., 1995) muestran que dosis elevadas de N interactúan con el P para mejorar la calidad de pasturas. Sin embargo, los resultados no solo muestran un efecto de la fertilización nitrogenada en el aumento de P en la planta, también los HFMA tuvieron efecto cuando se analizó la interacción múltiple de las dosis de N, P y HFMA. Efecto que se puede explicar debido a la velocidad reducida con la que las raíces de la planta toman el P en el suelo (Li et ál., 1991), y donde los HFMA cumplen la función de aumentar la capacidad de absorber P de seis a diez veces más que los pelos radicales (Smith et ál., 1994; Sanders y Tinker 1973), sin importar la especie de HFMA.

Otros estudios donde se ha tratado el efecto de los HFMA en la calidad de las plantas principalmente en cuanto a su contenido de P indican que especies como *Rhizophagus intraradices* aumentan la cantidad de P en los tejidos foliares cuando este elemento se encuentra en el suelo en altas concentraciones (Miranda y Forsythe 2012).

Colonización

El porcentaje de colonización no fue afectado por el tipo de mineral y el nivel de fertilizante aplicado; en estudios previos realizados por Qin et ál., (2015) indicaron que existe un efecto en la población de microorganismos de la rizosfera, pero no en la colonización de la raíz por parte de los HFMA cuando hay aplicación de fertilizantes químicos. Resultados contrarios a lo reportado por (Bhadalung et ál., 2005; Lin et ál., 2012), donde las altas aplicaciones de N y P afectaron la población de microorganismos como los HFMA y el porcentaje de infección en las raíces de las plantas, efecto que se debe a preferencia de los HFMA por un pH neutro o cercano a la alcalinidad (Qin et ál., 2015), efecto que puede ser causa de la aplicación de fertilizantes químicos en la rizosfera los cuales causan la acidificación de esta (Castillo et ál., 1983). Sin embargo, las condiciones en las que los HFMA se encuentran en el suelo no son las únicas que influyen en la presencia de estos en las rizosfera y en las raíces de la planta; algunas especies de HFMA parecen responder de manera diferente a la aplicación de fertilizantes (Qin et ál., 2015), un ejemplo claro de estas especies es *Rhizophagus intraradices* (Bhadalung et ál., 2005) especie que fue empleada en este estudio y que fue aislada de los suelos establecidos en pasto kikuyo en algunos municipios de clima frío en Antioquia la cual mostró los mejores resultados.

Adsorción de P

La difusión es el principal mecanismo por el cual el P se mueve a la superficie de la raíz. Uno de los factores claves que determinan la tasa de difusión de P en el suelo es la concentración de P en la solución del suelo, ya que esta debe contener el suficiente P para proveer el gradiente de concentración necesario en el movimiento hacia las raíces (Fox y Kamprath, 1970; Correa y Jaramillo, 1985). Los resultados de esta investigación mostraron que la asociación micorrizal permite un aumento en la toma del P disponible en el suelo para el pasto kikuyo, resultados similares en otras plantas fueron reportados por (Barea et ál., 2008) que indican que este tipo de pastos son dependientes del asocio con HFMA (Habte y Manjunath 1991). Estos son capaces de explorar un mayor volumen de suelo y pueden tomar más P incluso a concentraciones bajas las cuales la raíz de la planta no puede ser capaz de tomarlo (Grace et ál., 2009; Barber 1995). Según Habte y Osorio (2001), la presencia de HFMA hace que la concentración P en la solución del suelo tenga diferentes comportamientos; en primer lugar los HFMA superan las limitaciones de difusión relacionados con la adsorción de nutrientes como el P y la segunda la concentración de P en la solución del suelo esta inversamente relacionada con el desarrollo de HFMA y la actividad de estos. Por esta razón los tratamientos que involucraron el uso de HFMA presentaron las menores concentraciones de P en la solución del suelo (Tabla 3). En

cuanto a la concentración de P en la solución del suelo, los resultados hallados indican que al aumentar la cantidad de P aplicado como fertilizante químico el P en solución también sufre el mismo comportamiento (Figura 2), resultados similares a los reportados por (Sánchez y Salinas 1983; Kirkby y Johnston 2008) quienes indican que altas aplicaciones de P son necesarios para llegar a tener niveles de suficiencia de este elemento para la absorción de la planta en suelos que se caracterizan por tener alta capacidad de fijación de fosfatos.

Conclusiones

- La aplicación de fertilizantes químicos influyen en la calidad nutricional del forraje; los resultados indican que dosis de nitrógeno del $400 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ conjugado con niveles de P de $100 \text{ kg P ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ tuvieron efecto positivo en la concentración de proteína y energía del pasto kikuyo.
- El uso de HFMA en los planes de fertilización de praderas de pasto kikuyo permite mejorar algunas de las variables bromatológicas del pasto kikuyo, reduciendo la aplicación de N y P los cuales son minerales que aplicados en grandes cantidades, afectan el costo de sostenimiento de las praderas y pueden causar algún tipo de daño al medio ambiente.
- *Rhizophagus intraradices* es una de las especies nativas del pasto kikuyo encontrada en algunos municipios de Antioquia donde predominan los potreros sometidos a altos planes de fertilización química con fuentes nitrogenadas; las condiciones de adaptación de esta especie permiten que este HFMA pueda ser eficiente cuando la pradera es sometida a programas de manejo con fertilizantes químicos.
- Gran parte de los suelos bajo los cuales se encuentra establecido el pasto kikuyo en el trópico alto colombiano son suelos derivados de cenizas volcánicas, los cuales se caracterizan por presentar alta capacidad de fijación de fósforo. La presencia de HFMA en estos suelos mejoran la adsorción de este elemento facilitando la nutrición vegetal con P y mejorando la calidad nutricional y productividad de este pasto.

Recomendaciones generales

- Una de las formas de disminuir la aplicación de fertilizantes nitrogenados y fosfóricos al pasto kikuyo es el uso de los hongos formadores de micorrizas arbusculares, sin embargo se debe investigar otros microorganismos diferentes a los HFMA los cuales favorecen la fijación y toma de nutrientes.
- *Rhizophagus intraradices* es una especie de HFMA que se recomienda para los planes de manejo de la fertilización en pasto kikuyo en condiciones tropicales.
- Un plan de fertilización recomendado para kikuyo en trópico alto la dosis de nitrógeno 400 kg N ha⁻¹ año⁻¹ conjugado con niveles de P de 100 kg P ha⁻¹ año⁻¹ y HFMA el cual puede ser *Rhizophagus intraradices*.
- Se recomienda realizar este tipo de estudio para otros cultivos tropicales sometidos a altas aplicaciones de fertilizantes con el fin de disminuir los costos de producción y los daños causados en el medio ambiente.

Referencias bibliograficas

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

A.O.A.C. 1995 Official Methods of Analysis of AOAC International (16th ed.) P. Cunnif (Ed.). Association of Official Analytical Chemists. Arlington, Virginia, USA, 1.

Adesemoye AO. and Kloepper J. Plant–microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. Appl Microbiol Biotechnol. 2009; 85:1–12.

Ames RN, Reid CP, Porterf PLK, Cambardella C. Hyphal uptake and transport of nitrogen from two 15N-labelled sources by *Glomus mosseae*, a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. New Phytol. 1983; 95:381–396

Apráez JE, Moncayo AO. Caracterización agronómica y bromatológica de una pradera de kikuyo (*Cenchrus clandestinum* (Hoechst ex Chiov.) Morrone) sometida a rehabilitación mediante labranza y fertilización orgánica y/o mineral. Colombia Lead. 2003; 10: 25 – 35

Aseri GK, Jain N, Panwar J, Rao AV, Meghwal PR. Biofertilizers improve plant growth, fruit yield, nutrition, metabolism and rhizosphere enzyme activities of pomegranate (*Punica granatum* L.) in Indian Thar Desert. *Scientia Horticulturae*. 2008; 117:130–135.

Ayala SA. Manual para el laboratorio de nutrición animal. Universidad de Antioquia. Facultad de Ciencias Agrarias; 2007. 49 p.

Barea JM, Azcón AC, Azcón R. Mycorrhizal Fungi and Plant Growth Promoting Rhizobacteria. *Plant Surface Microbiology*; 2005. p. 351 -371.

Barea JM, Ferrol N, Azcón R. Mycorrhizal symbioses En: *The Ecophysiology of plant – Phosphorus Interactions*. p : 142 – 143 Philip J. White & Jhon P. Hammond (Eds). Springer. 2008. p. 296.

Barea JM, Toro M, Orozco MO, Campos E, Azcón R. The application of isotopic (³²P and ¹⁵N) dilution techniques to evaluate the interactive effect of phosphate-solubilizing rhizobacteria, mycorrhizal fungi and *Rhizobium* to improve the agronomic efficiency of rock phosphate for legume crops. *Nutr Cycling Agroecosys*. 2002; 63:35–42.

Barton L, Wan GGY, Buck RP, Colmer TD. Nitrogen increases evapotranspiration and growth of a warm-season turfgrass. *Agron. J*. 2009; 101:17–24

BEG. Bank of European Glomales. Disponible en: www.bio.ukc.ac.uk/beg. 2015; Consultado el 23 de Abril de 2015.

Bhadalung, N., Suwanarit, A., Dell, B., Nopamornbodi, O., Thamchaipenet, A., Rungchuang, J. Effects of long-term NP-fertilization on abundance and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi under a maize cropping system. *Plant Soil*. 2005; 270, 371–382.

Carmona, P. y Matinez, L. Potencial forrajero del pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*). En: *Memorias del seminario de Zootecnia*. Medellín, Colombia, Universidad Nacional, Facultad de Ciencias Agropecuarias; 1988. p.80.

Castillo J, Cowarand J, Sánchez C, y Jiménez C. Efecto de la fertilización nitrogenada en la época lluviosa sobre productividad, composición química y digestibilidad in vitro del pasto kikuyo bajo pastoreo en el Cantón de Coronado. *Agronomía Costarricense*. 1983; 7: 9-15.

Chopra BK, Bhat S, Mikheenko IP, Xu Z, Yang Y, Luo X, Chen H, Zwieten VL, McC RL, Zhang R. The characteristics of rhizosphere microbes associated with plants in arsenic-contaminated soils from cattle dip sites. *Science of the Total Environment*. 2007; 378: 331–342.

Correa HJ, Pabón RML, Sánchez MY and Carulla FJE. Efecto del nivel de suplementación sobre el uso del nitrógeno, el volumen y la calidad de la leche en vacas Holstein de primero

y segundo tercio de lactancia en el trópico alto de Antioquia. *Livestock Research for Rural Development*. 2011; Volume 23, Article # 77. <http://www.lrrd.org/lrrd23/4/corr23077.html>

Correa ID, Jaramillo CM. Mecanismos de adsorción de fósforo en andisoles del oriente Antioqueño. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. 1985. p 1-87.

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

Dodd JC, Thomson BD. The screening and selection of inoculant arbuscular – mycorrhizal and ectomycorrhizal fungi. *Plant and soil*. 1994; 159: 149-158.

Echeverri J, Restrepo LF, Parra J. Evaluación comparativa de los parámetros productivos y agronómicos del pasto kikuyo (*Cenchrus clandestinum* (Hochst. ex Chiov.) Morrone) bajo dos metodologías de fertilización. *Revista lasallista de investigación*. 2010; 7(2): 94-100

Emanuele S M, Staples C R and Wilcox C J Extent and site of mineral release from six forage species incubated in mobile dacron bags; *Journal of Animal Science*. 1991; 69: 801 – 810.

Estrada J. Pastos y forrajes para el trópico Colombiano. Manizales: Universidad de Caldas; 2001.p.511.

Fox R, Kamprath E. Phosphate sorption isotherms for evaluating the phosphate requirements of soils. *Soil Science Society of America Proceedings*. 1970;34: 902-907.

Giovannetti M, and Mosse B. An evaluation of technique for measuring vesicular – arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol*. 1980; 84: 489-500.

Giovannetti M, Avio L, Fortuna P, Pellegrino E, Sbrana C, Strani P 2006. At the root of the wood wide web. Self recognition and nonself incompatibility in mycorrhizal networks. *Plant Signal Behav*. 2006; 1:1–5

Grace EJ, Cotsaftis O, Tester M, Smith FA, Smith SE. 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*. 2009; 181: 938 – 949.

Gyaneshwar P, Kumar GN, Parekh LJ, Poole PS. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant Soil*. 2002; 245:83–93.

Habte M and Manhunath A. Categories of vesicular – arbuscular mycorrhizal dependency of host species. *Mycorrhiza*; 1991; 1:3 – 12.

Habte M, Osorio NM. Arbuscular mycorrhizas: Producing and applying arbuscular mycorrhizal inoculum. College of tropical agriculture & Human resources university of Hawaii at manoa. 2001. p. 47.

INVAM. (The International Culture Collection of Arbuscular and Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi). Disponible en [www. Invam.caf.wvu.edu](http://www.invam.caf.wvu.edu). 2015; consultado el 23 Abril de 2015.

Islam M, Garcia S, Horadagoda A. Effects of irrigation and rates and timing of nitrogen fertilizer on dry matter yield, proportions of plant fractions of maize and nutritive value and in vitro gas production characteristics of whole crop maize silage. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2012; 172 125–135.

Juárez, AS, Cerrillo SA, Gutiérrez OE, Romero TE, Colín N J, Bernal BH. Assessment of the nutritional value of tropical grasses obtained from conventional analyses and in vitro gas production. *Téc Pecu Méx.* 2009; 47 (1): 55 -67.

Kirkby EA, Johnston AE. Soil and fertilizer phosphorus in relation to crop nutrition. In: JP Hammond, PJ White, eds, *The ecophysiology of plant–phosphorus interactions*. Dordrecht: Springer. 2008.p. 177–223.

Knapp D, Pintye A, Kovács G. The dark side is not fastidious – Dark septate endophytic of native and invasive plants of semiarid Sandy areas. *Plos one.* 2012; 7: (2) 3-7.

Li X-L, Marschner H, George E. Acquisition of phosphorus and copper by VA-mycorrhizal hyphae and root-to-shoot transport in white clover. *Plant and Soil.* 1991; 136(1): 49-57.

Lin X, Feng Y, Zhang H, Chen R, Wang J, Zhang J and Chu, H. Long-term balanced fertilization decreases arbuscular mycorrhizal fungal diversity in an arable soil in North China revealed by 454 pyrosequencing. *Environ. Sci. Technol.* 2012; 46, 5764–5771.

López AC y González L 1985. Respuesta del kikuyo (*Cenchrus clandestinum* (Hochst. ex Chiov.) Morrone) a dosis crecientes de fosforo, en un típico dystrandep, bajo condiciones de invernadero. *Agron. Costarr.* 9 (1): 93-97. 1985

Marais JP, Barnabas AD, Figenschou DL. Effect of calcium nutrition on the formation of calcium oxalate in kikuyu grass. *Forage quality*; 1997. p.17- 46.

Marais JP. Effect of nitrogen on the oxalate and calcium content of Kikuyu grass (*Pennisetum clandestinum* Hochst). *Journal of the Grassland Society of Southern Africa.* 1990; 7(2): 106 – 110.

Marsalis M, Angadi S, Contreras-Govea F. Dry matter yield and nutritive value of corn, forage sorghum, and BMR forage sorghum at different plant populations and nitrogen rates. *Field Crop Res*; 2010. p. 52–57.

Mc Donal PR, Edwards A, Greenhalgh JFD. *Animal Nutrition* 4^a Ed. Longma Scientific Tecnical. John Willey & Song Inc, New York. 1977. p. 260- 283.

Mendo O, Pérez J, Martínez P, Herrera J, Mendoza G, Hernández A. Pastoreo de kikuyo (*Pennisetum clandestinum* Hoechst Ex Chiov) por borregos en crecimiento a diferentes asignación de forraje. *Agrociencia*. 2000; 34(2): 127-134.

Miranda MH, Forsythe JA. Using arbuscular mycorrhizal fungi to improve the nutrient quality of crops; nutritional benefits in addition to phosphorus. *Scientia Horticulturae*. 2012; 148: 206–214.

Molina M, Medina M, Mahecha L 2008. Microorganismos y nutrientes en el crecimiento y desarrollo de Aliso (*Alnus acuminata* H.B.K). En un sistema silvopastoril alto andino. *Livestock Research for Rural Development*. 20(4): Disponible en <http://www.lrrd.org/lrrd20/4/moli20054.htm>. Consultado el 12 de Enero de 2013.

Murphy J and Riley JP. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta*. 1962. p.31-36.

Osorio F. Efecto del manejo alimentario sobre el sistema especializado de producción lechera. En: memorias Seminario Nacional de Lechería Especializada: Bases Nutricionales y su Impacto en la Productividad. Eventos y Asesorías Agropecuarias, Auditorio de la Salud, Hospital General de Medellín. 2004. p.141 - 152.

Perrott KW, Sarathchandra SU, Dow BW. Seasonal and fertilizer effects on the organic cycle and microbial biomass in a hill country soil under pasture. *Austr J Soil Res*. 1992; 30:383–394.

Phillips JM, and Hayman DS. Improved procedures for clearing and staining parasitic and vesicular–arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Brit. Mycol. Soc*. 1970; 55: 158-161.

Qin H, Lu K, Strong P.J, Xu Q, Wu Q, Xu Z, Xu J, Wang H. Long-term fertilizer application effects on the soil, root arbuscular mycorrhizal fungi and community composition in rotation agricultura. *Applied Soil Ecology*. 2015; 89: 35–43.

Quintero CE y Boschetti NG. Manejo del fósforo en pasturas. Facultad de ciencias agronómicas. 2011; Consultado junio 19,2013, en <http://www.elsitioagricola.com/articulos/quintero/Manejo%20del%20Fosforo%20en%20Pasturas.asp>.

Reeves M, Fulkerson WJ, Kellawa, RC. Forage quality of kikuyu (*Pennisetum clandestinum*): the effect of time of defoliation and nitrogen fertiliser application and in comparison with perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *Aust. J. Agric. Res*. 1996; 47, 1349–1359.

Rouphael Y, Cardarelli M, Colla G. Role of arbuscular mycorrhizal fungi in alleviating the adverse effects of acidity and aluminium toxicity in zucchini squash. *Scienti Horticulturae*. 2015; 188, 97 – 105.

Sabia E S, Claps F, Napolitano G, Annicchiarico A, Bruno R, Francaviglia L and R. Aleandri. In vivo digestibility of two different forage species inoculated with arbuscular mycorrhiza in Mediterranean red goats. *Small Ruminant Res.* 2015; 123:83-87.

Sánchez P. Suelos del trópico. Características y manejo. Instituto Interamericano de Cooperación para la agricultura. Serie de materiales educativos 48, San José (Costa Rica). 1981. p. 260.

Sánchez P. y Salinas J. Suelos ácidos. Estrategias para su manejo con bajos insumos en América tropical. Sociedad Colombiana de la Ciencia del Suelo, Bogotá. 1983. p.

Sander FE, Tinker PB. Phosphate flow into mycorrhizal roots. *Pest Sci.* 1973; 4:385–395

Shahin MG, Abdrabou RTh, Abdelmoemn WR and Hamada MM. Response of growth and forage yield of pearl millet (*Pennisetum galucum*) to nitrogen fertilization rates and cutting height. *Annals of Agricultural Science.* 2013; 58(2), 153–162

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

Silva A, Menjivar JC, Alava CA, y Gómez HF. Efecto de la fertilización con nitrógeno, fósforo y azufre sobre la recuperación de una pradera degradada de kikuyo (*Pennisetum clandestinum* Hoechst). En Nariño, Colombia. XII Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del suelo. Ecuador 2010. p. 1-10.

Smith SD and Read DJ. *Mycorrhizal Symbiosis*. 3a ed. Academic Press. New York. 2008. p. 199 -215.

Smith, K. G., K. A. Smith, D. P. O'Bannon, J. D. Olian, H. P. Sims and J. Scully. Top management team demography and process: The role of social integration and communication', *Administrative Science Quarterly.* 1994. p. 412–438.

Soto C, Valencia A, Galvis RD y Correa HJ. Efecto de la edad de corte y del nivel de fertilización nitrogenada sobre el valor energético y proteico del pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias.* 2005; Volume 18 (1): 17 - 26. Retrieved December 10, 2005, from http://rccp.udea.edu.co/v_anteriores/18-3/pdf/18-1-3.pdf.

Steinshamn H, Thuen E, Bleken MA, Brenoe UT, Ekerholt G, Yri C. Utilization of nitrogen (N) and phosphorus (P) in an organic dairy farming system in Norway. *Agric Ecosys Environ.* 2004; 104:509–522

Swanepoel PA, Bothaa PR, Preez CC, Snyman HA. Physical quality of a podzolic soil following 19 years of irrigated minimum-till kikuyu-ryegrass pasture. *Soil & Tillage Research*. 2013; 133: 10–15.

Sylvia, DM. “Mycorrhizal symbiosis”. In: D.M. Sylvia, Furhrmann, P. Hartel., and D. Zuberer 1999. *Principles and applications of soil microbiology*. Prentice Hall, New Jersey, USA. 1999; p. 408-426

Teixeira EI, George M, Herreman T, Brown H, Fletche A, Chakwizira, Ruite J, Maley S and Noble A. The impact of water and nitrogen limitation on maize biomass and resource – use efficiencies for radiation water and nitrogen. *Field crops research*. 2014; 168. 109- 119.

Tienda PJ, Correa A, Azcon AC and Ferrol N. Transcriptional regulation of host NH₄⁺ transporters and GS/GOGAT pathway in arbuscular mycorrhizal rice roots. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2014; 75: 1-8.

Tilman D. The greening of the green revolution. *Nature*. 1998; 396:211–212

Zong Yu Z, Shangguan ZP. Nitrogen Deficiency Limited the Improvement of Photosynthesis in Maize by Elevated CO₂ Under Drought. *Journal of Integrative Agriculture*. 2014; 13(1): 73–81.

Zurita VJ, y Vanegas CC. Efecto de diferentes fuentes y dosis de nitrógeno sobre la producción de forraje y la acumulación de nitratos y nitritos en los raigrases tetrelite y terli. Tesis de Ingeniero Agrónomo. Bogotá. Universidad Nacional, Facultad de Agronomía. 1986. p. 119.

Anexos

Anexos capítulo 2

Anexos Salidas estadísticas SAS

The GLM Procedure

Dependent Variable: ALT1 ALT1

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
N	3	7.45991629	2.48663876	4.65	0.0035
FOSFORO	4	5.73335972	1.43333993	2.68	0.0322
N*FOSFORO	9	10.68218134	1.18690904	2.22	0.0214
M	3	9.14738664	3.04912888	5.71	0.0009
N*M	9	28.23439108	3.13715456	5.87	<.0001
FOSFORO*M	9	7.06295140	0.78477238	1.47	0.1600
N*FOSFORO*M	26	23.80900293	0.91573088	1.71	0.0198

Tests for Normality

Test	--Statistic---	-----p Value-----
Shapiro-Wilk	W 0.990209	Pr < W 0.0385
Kolmogorov-Smirnov	D 0.04657	Pr > D 0.1029
Cramer-von Mises	W-Sq 0.127644	Pr > W-Sq 0.0479
Anderson-Darling	A-Sq 0.890592	Pr > A-Sq 0.0232

Dependent Variable: ALT2 ALT2

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
N	3	8.67339867	2.89113289	1.10	0.3485
FOSFORO	4	73.27954142	18.31988536	6.99	<.0001
N*FOSFORO	9	25.84072655	2.87119184	1.10	0.3667
M	3	50.98211783	16.99403928	6.48	0.0003
N*M	9	97.41343126	10.82371458	4.13	<.0001
FOSFORO*M	9	53.40141742	5.93349082	2.26	0.0188
N*FOSFORO*M	26	92.53508885	3.55904188	1.36	0.1211

Tests for Normality

Test	----Statistic---	-----p Value-----
Shapiro-Wilk	W 0.986534	Pr < W 0.0048
Kolmogorov-Smirnov	D 0.064235	Pr > D <0.0100
Cramer-von Mises	W-Sq 0.22424	Pr > W-Sq <0.0050
Anderson-Darling	A-Sq 1.297167	Pr > A-Sq <0.0050

Dependent Variable: ALT3 ALT3

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
N	3	16.3023706	5.4341235	0.84	0.4711
FOSFORO	4	47.8868192	11.9717048	1.86	0.1183
N*FOSFORO	9	88.4434806	9.8270534	1.53	0.1393
M	3	550.2796318	183.4265439	28.48	<.0001
N*M	9	99.2197993	11.0244221	1.71	0.0869
FOSFORO*M	9	121.4370585	13.4930065	2.09	0.0306
N*FOSFORO*M	26	209.6940218	8.0651547	1.25	0.1920

Tests for Normality

Test		--Statistic---	-----p Value-----
Shapiro-Wilk	W	0.99138	Pr < W 0.0690
Kolmogorov-Smirnov	D	0.031643	Pr > D >0.1500
Cramer-von Mises	W-Sq	0.054769	Pr > W-Sq >0.2500
Anderson-Darling	A-Sq	0.429606	Pr > A-Sq >0.2500

Dependent Variable: ALT4 ALT4

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
N	3	34.7738820	11.5912940	0.90	0.4432
FOSFORO	4	119.5396806	29.8849201	2.31	0.0583
N*FOSFORO	9	189.6979834	21.0775537	1.63	0.1070
M	3	937.1451665	312.3817222	24.18	<.0001
N*M	9	145.5351873	16.1705764	1.25	0.2644
FOSFORO*M	9	281.5042492	31.2782499	2.42	0.0120
N*FOSFORO*M	26	310.3149293	11.9351896	0.92	0.5748

Tests for Normality

Test		--Statistic---	-----p Value-----
Shapiro-Wilk	W	0.989943	Pr < W 0.0368

Kolmogorov-Smirnov	D	0.037817	Pr > D	>0.1500
Cramer-von Mises	W-Sq	0.066792	Pr > W-Sq	>0.2500
Anderson-Darling	A-Sq	0.48983	Pr > A-Sq	0.2268

Dependent Variable: ALT5 ALT5

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
N	3	53.3996813	17.7998938	4.23	0.0061
FOSFORO	4	32.5616633	8.1404158	1.94	0.1050
N*FOSFORO	9	50.9925795	5.6658422	1.35	0.2130
M	3	21.1819082	7.0606361	1.68	0.1720
N*M	9	79.7715225	8.8635025	2.11	0.0294
FOSFORO*M	9	107.7111165	11.9679018	2.85	0.0033
N*FOSFORO*M	26	128.6032395	4.9462784	1.18	0.2590

Tests for Normality

Test		--Statistic---		----p Value-----
Shapiro-Wilk	W	0.989393	Pr < W	0.0203
Kolmogorov-Smirnov	D	0.045512	Pr > D	0.1050
Cramer-von Mises	W-Sq	0.078681	Pr > W-Sq	0.2217
Anderson-Darling	A-Sq	0.57779	Pr > A-Sq	0.1370

Dependent Variable: ALT6 ALT6

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
N	3	8.4843779	2.8281260	0.23	0.8783
FOSFORO	4	94.9585737	23.7396434	1.90	0.1117
N*FOSFORO	9	187.9930976	20.8881220	1.67	0.0971
M	3	137.1231333	45.7077111	3.65	0.0132
N*M	9	243.2987875	27.0331986	2.16	0.0255
FOSFORO*M	9	114.0214849	12.6690539	1.01	0.4306
N*FOSFORO*M	26	606.8356897	23.3398342	1.87	0.0084

Tests for Normality

Test		--Statistic---	-----p Value-----
Shapiro-Wilk	W	0.995062	Pr < W 0.4444
Kolmogorov-Smirnov	D	0.040841	Pr > D >0.1500
Cramer-von Mises	W-Sq	0.050832	Pr > W-Sq >0.2500
Anderson-Darling	A-Sq	0.311203	Pr > A-Sq >0.2500

Dependent Variable: RHT1 RHT1

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
N	3	0.85360914	0.28453638	0.53	0.6627
FOSFORO	4	1.77351139	0.44337785	0.82	0.5107
N*FOSFORO	9	8.16665668	0.90740630	1.69	0.0932
M	3	2.99890124	0.99963375	1.86	0.1374
N*M	9	7.20981470	0.80109052	1.49	0.1528
FOSFORO*M	9	7.65512428	0.85056936	1.58	0.1219
N*FOSFORO*M	26	18.49375750	0.71129837	1.32	0.1437

Tests for Normality

Test		--Statistic---	-----p Value-----
Shapiro-Wilk	W	0.959338	Pr < W <0.0001
Kolmogorov-Smirnov	D	0.118782	Pr > D <0.0100
Cramer-von Mises	W-Sq	0.702133	Pr > W-Sq <0.0050
Anderson-Darling	A-Sq	3.994277	Pr > A-Sq <0.0050

Dependent Variable: RHT2 RHT2

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
N	3	64.3810953	21.4603651	14.39	<.0001
FOSFORO	4	15.0379977	3.7594994	2.52	0.0418

N*FOSFORO	9	175.1883090	19.4653677	13.05	<.0001
M	3	23.8066400	7.9355467	5.32	0.0014
N*M	9	38.0991006	4.2332334	2.84	0.0034
FOSFORO*M	9	92.8496791	10.3166310	6.92	<.0001
N*FOSFORO*M	26	267.9389130	10.3053428	6.91	<.0001

Tests for Normality

Test		--Statistic---	-----p Value-----
Shapiro-Wilk	W	0.970898	Pr < W <0.0001
Kolmogorov-Smirnov	D	0.062483	Pr > D <0.0100
Cramer-von Mises	W-Sq	0.244628	Pr > W-Sq <0.0050
Anderson-Darling	A-Sq	1.564661	Pr > A-Sq <0.0050

Dependent Variable: MS MS

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
N	3	220.0885719	73.3628573	43.90	<.0001
FOSFORO	4	62.5983709	15.6495927	9.37	<.0001
N*FOSFORO	9	141.7148388	15.7460932	9.42	<.0001
M	3	15.7747656	5.2582552	3.15	0.0257
N*M	9	83.8386489	9.3154054	5.57	<.0001
FOSFORO*M	9	58.8070514	6.5341168	3.91	0.0001
N*FOSFORO*M	26	49.7933042	1.9151271	1.15	0.2896

Tests for Normality

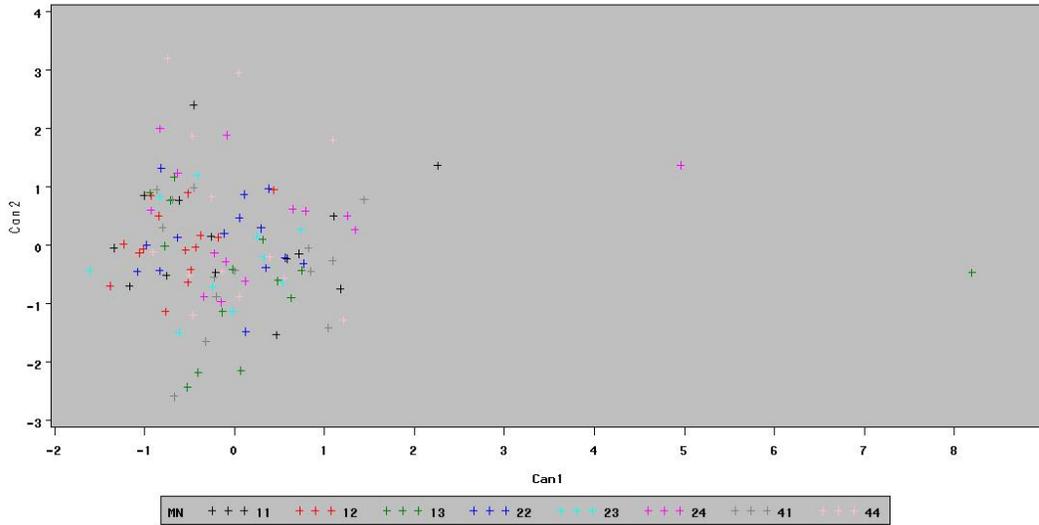
Test		--Statistic---	-----p Value-----
Shapiro-Wilk	W	0.97828	Pr < W 0.0001
Kolmogorov-Smirnov	D	0.066381	Pr > D <0.0100
Cramer-von Mises	W-Sq	0.273346	Pr > W-Sq <0.0050
Anderson-Darling	A-Sq	1.617831	Pr > A-Sq <0.0050

Dependent Variable: TonMSxha TonMSxha

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
N	3	9.34913690	3.11637897	32.91	<.0001
FOSFORO	4	11.83365612	2.95841403	31.24	<.0001
N*FOSFORO	9	22.20993902	2.46777100	26.06	<.0001
M	3	1.05320458	0.35106819	3.71	0.0123
N*M	9	4.70136690	0.52237410	5.52	<.0001
FOSFORO*M	9	2.24541123	0.24949014	2.63	0.0064
N*FOSFORO*M	26	11.75249891	0.45201919	4.77	<.0001

Tests for Normality

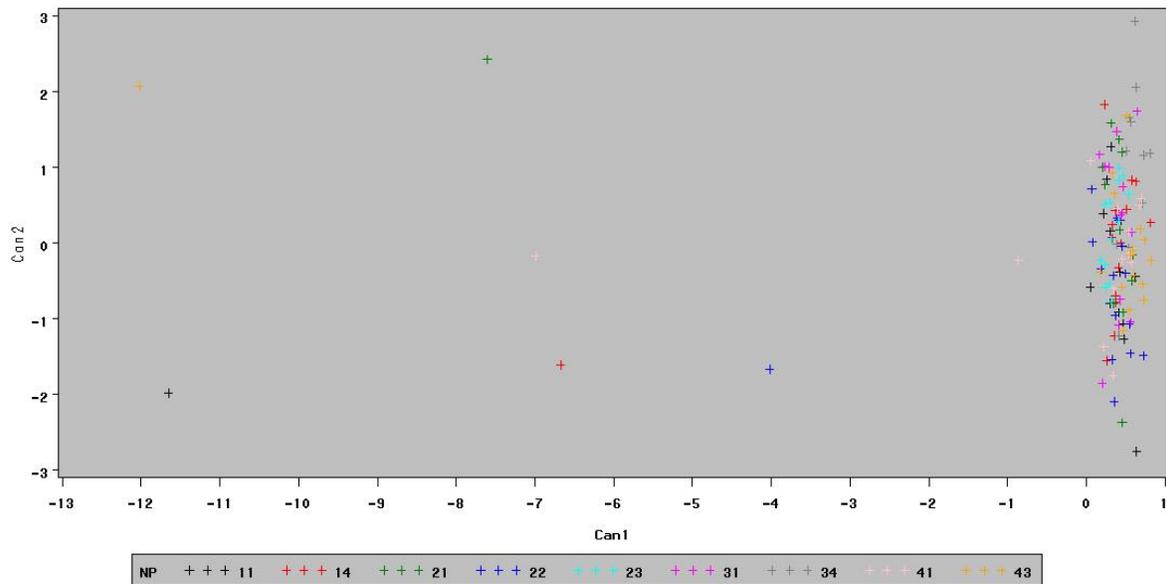
Test		--Statistic---	-----p Value-----
Shapiro-Wilk	W	0.972922	Pr < W <0.0001
Kolmogorov-Smirnov	D	0.07817	Pr > D <0.0100
Cramer-von Mises	W-Sq	0.339004	Pr > W-Sq <0.0050
Anderson-Darling	A-Sq	1.973437	Pr > A-Sq <0.0050



Anexo 1.1 Mejores niveles según análisis canónico para el tratamiento de la interacción HFMA (M) y nitrógeno (N).

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

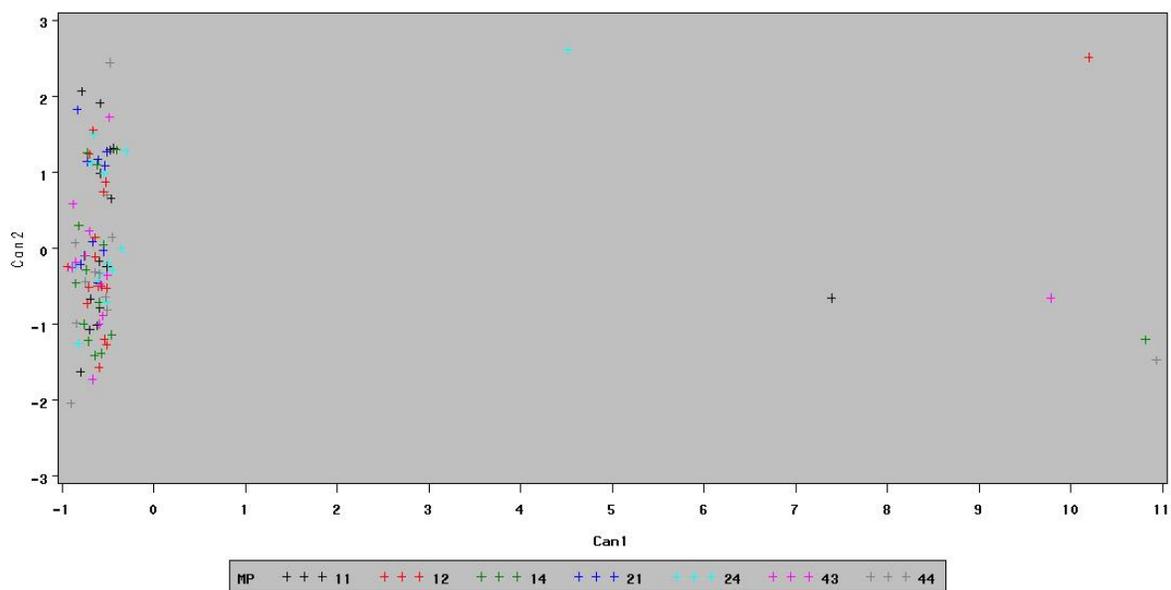
Niveles para N: 1- 0%, 2- 25%, 3- 50%, 4- 100%



Anexo 1.2 Mejores niveles según análisis canónico para el tratamiento de la interacción de nitrógeno (N) y fosforo (P).

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

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



Anexo 1.3 Mejores niveles según análisis canónico para el tratamiento de la interacción de HFMA (M) y fosforo (P).

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

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

Anexos capítulo 3

Dependent Variable: MS MS

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
N	2	59.26232862	29.63116431	5.49	0.0068
FOSFORO	2	9.05025582	4.52512791	0.84	0.4380
N*FOSFORO	4	44.51170550	11.12792637	2.06	0.0986
M	2	9.72957603	4.86478801	0.90	0.4121
N*M	4	16.70477408	4.17619352	0.77	0.5471
FOSFORO*M	4	14.66714981	3.66678745	0.68	0.6093
N*FOSFORO*M	8	49.91783692	6.23972962	1.16	0.3425

Dependent Variable: PC PC

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
N	2	15.84449572	7.92224786	2.74	0.0735
FOSFORO	2	18.67684681	9.33842340	3.23	0.0473
N*FOSFORO	4	35.65390780	8.91347695	3.08	0.0233
M	2	25.33698200	12.66849100	4.38	0.0172
N*M	4	18.15977147	4.53994287	1.57	0.1954
FOSFORO*M	4	21.98219567	5.49554892	1.90	0.1236
N*FOSFORO*M	8	34.44675104	4.30584388	1.49	0.1829

Dependent Variable: ENERGÍA

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
N	2	569556.0741	284778.0370	36.01	<.0001
FOSFORO	2	226253.4074	113126.7037	14.30	<.0001
N*FOSFORO	4	278715.8519	69678.9630	8.81	<.0001
M	2	31696.5185	15848.2593	2.00	0.1447
N*M	4	40176.7407	10044.1852	1.27	0.2932
FOSFORO*M	4	105782.5185	26445.6296	3.34	0.0162
N*FOSFORO*M	8	89552.8889	11194.1111	1.42	0.2113

The GLM Procedure

Dependent Variable: CALCIO

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
N	2	0.10592250	0.05296125	0.59	0.5586
FOSFORO	2	0.10376372	0.05188186	0.58	0.5652
N*FOSFORO	4	0.96576599	0.24144150	2.68	0.0410
M	2	0.50861109	0.25430555	2.83	0.0680
N*M	4	0.44903545	0.11225886	1.25	0.3019

FOSFORO*M	4	0.06620301	0.01655075	0.18	0.9458
N*FOSFORO*M	8	0.55891247	0.06986406	0.78	0.6249

Dependent Variable: FÓSFORO

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
N	2	0.01283261	0.00641630	2.80	0.0699
FOSFORO	2	0.04721889	0.02360944	10.29	0.0002
N*FOSFORO	4	0.05311838	0.01327960	5.79	0.0006
M	2	0.00402265	0.00201133	0.88	0.4220
N*M	4	0.01625100	0.00406275	1.77	0.1481
FOSFORO*M	4	0.01922190	0.00480548	2.09	0.0942
N*FOSFORO*M	8	0.04248535	0.00531067	2.31	0.0326

The GLM Procedure

Level of	MS	PC	ENERGIA				
N	Mean	Std Dev	Mean	Std Dev			
N0	27	19.5728508	2.88718772	15.9522558	2.11016774	3920.29630	165.998567
N100	27	17.5191071	1.72201953	17.0261964	1.79607497	4102.37037	105.541879
N50	27	18.1868773	2.33877032	16.6126703	2.06370426	4093.66667	86.203248

Level of	CALCIO	FOSFORO	CENIZAS				
N	Mean	Std Dev	Mean	Std Dev			
N0	27	0.85087944	0.35125168	0.23887517	0.05892383	10.2565289	1.58807541
N100	27	0.90832267	0.27892821	0.26368053	0.07053143	11.5174277	1.25199890
N50	27	0.93799446	0.29611232	0.26713482	0.05770774	10.9990514	1.24626051

Level of MS PC ENERGIA

FOSFORO	N	Mean	Std Dev	Mean	Std Dev	Mean	Std Dev
P0	27	18.1890054	2.51270621	16.7533520	1.90343026	3968.40741	188.765883
P100	27	18.8989961	2.68046011	16.9743834	1.88989047	4052.14815	119.080355
P50	27	18.1908338	2.28116756	15.8633871	2.15264932	4095.77778	97.554456

Level of FOSFORO	N	Mean	Std Dev	Level of FOSFORO	Mean	Std Dev	Level of CENIZAS	Mean	Std Dev
P0	27	0.88581053	0.28740835	P0	0.22356708	0.05793803	P0	11.1119895	1.56747888
P100	27	0.86338724	0.33606747	P100	0.28066769	0.05787317	P100	10.7568718	1.45405999
P50	27	0.94799880	0.30561302	P50	0.26545574	0.06122267	P50	10.9041467	1.35626623

Level of N	Level of FOSFORO	N	Level of MS	Mean	Std Dev	Level of PC	Mean	Std Dev
N0	P0	9	N0	18.8914684	3.77667192	P0	16.3575132	1.48090052
N0	P100	9	N0	21.2012457	2.79892713	P100	17.3085327	2.19378175

Level of N	Level of FOSFORO	N	Level of ENERGIA	Mean	Std Dev	Level of CALCIO	Mean	Std Dev
N0	P0	9	N0	3737.88889	71.222266	P0	0.68355882	0.24169082
N0	P100	9	N0	3961.88889	123.571279	P100	0.84984995	0.47902655

Level of N	Level of FOSFORO	N	Level of FOSFORO	Mean	Std Dev	Level of CENIZAS	Mean	Std Dev
N0	P0	9	N0	0.19985113	0.04271060	P0	10.1775148	1.87683468
N0	P100	9	N0	0.22456695	0.04039872	P100	9.5837625	1.21058493

The GLM Procedure

Level of	Level of	-----MS-----	-----PC-----
----------	----------	--------------	--------------

N	FOSFORO	N	Mean	Std Dev	Mean	Std Dev
N0	P50	9	18.6258384	0.69274491	14.1907216	1.31179926
N100	P0	9	17.7785518	1.78668568	16.9432549	2.06516240
N100	P100	9	17.9209949	2.18373898	16.6948713	0.89244650
N100	P50	9	16.8577745	0.96279308	17.4404630	2.25797790
N50	P0	9	17.8969958	1.49110984	16.9592880	2.24775080
N50	P100	9	17.5747476	1.31769639	16.9197462	2.40457406
N50	P50	9	19.0888885	3.51935591	15.9589767	1.51162508

Level of N	Level of FOSFORO	-----ENERGIA-----		-----CALCIO-----		
N	FOSFORO	N	Mean	Std Dev	Mean	Std Dev
N0	P50	9	4061.11111	86.763247	1.01922956	0.22296947
N100	P0	9	4096.00000	135.755295	1.06162431	0.21420254
N100	P100	9	4105.00000	94.313308	0.73234669	0.20676531
N100	P50	9	4106.11111	93.852869	0.93099699	0.31994140
N50	P0	9	4071.33333	47.851332	0.91224847	0.28737568
N50	P100	9	4089.55556	89.659231	1.00796507	0.22759877
N50	P50	9	4120.11111	111.603589	0.89376985	0.37699906

Level of N	Level of FOSFORO	-----FOSFORO-----		-----CENIZAS-----		
N	FOSFORO	N	Mean	Std Dev	Mean	Std Dev
N0	P50	9	0.29220745	0.05181104	11.0083093	1.43401064
N100	P0	9	0.21892942	0.05395428	12.0207759	0.91024141
N100	P100	9	0.31647120	0.04022859	11.4163967	0.99337144
N100	P50	9	0.25564096	0.07859640	11.1151105	1.67345414
N50	P0	9	0.25192070	0.06791923	11.1376776	1.31221179
N50	P100	9	0.30096493	0.04678178	11.2704563	1.44390017
N50	P50	9	0.24851882	0.04564781	10.5890203	0.97335028

Level of M	N	-----MS-----		-----PC-----		-----ENERGIA-----	
M	N	Mean	Std Dev	Mean	Std Dev	Mean	Std Dev
C1	27	18.0920458	2.22020110	16.9698844	1.91995846	4018.74074	168.375631
N1	27	18.2829213	2.05350717	16.8801158	2.23007618	4065.70370	155.833692
SM	27	18.9038681	3.08706528	15.7411224	1.70674912	4031.88889	119.071515

Level of M	N	-----CALCIO-----		-----FOSFORO-----		-----CENIZAS-----	
M	N	Mean	Std Dev	Mean	Std Dev	Mean	Std Dev

C1	27	0.81723279	0.37590997	0.25630446	0.06717768	11.0640128
1.32883710						
N1	27	1.00628632	0.23182190	0.26532108	0.06582254	10.2483059
1.58024882						
SM	27	0.87367746	0.27986330	0.24806498	0.05718637	11.4606893
1.19174872						

The GLM Procedure

Level of N	Level of M	Level of N	-----MS-----		-----PC-----	
			Mean	Std Dev	Mean	Std Dev
N0	C1	9	19.8741476	2.96550062	15.6697559	2.00884306
N0	N1	9	19.3749898	2.27726362	16.7790304	2.55359273
N0	SM	9	19.4694152	3.59905437	15.4079812	1.65024012
N100	C1	9	16.8806686	0.92575522	17.3809844	1.98825051
N100	N1	9	17.8260034	1.67206104	17.5885530	1.45291047
N100	SM	9	17.8506493	2.30139259	16.1090518	1.72521165
N50	C1	9	17.5213211	0.88249992	17.8589127	1.00537000
N50	N1	9	17.6477708	1.92165976	16.2727639	2.55737060
N50	SM	9	19.3915400	3.29355498	15.7063343	1.86790449

Level of N	Level of M	Level of N	-----ENERGIA-----		-----CALCIO-----	
			Mean	Std Dev	Mean	Std Dev
N0	C1	9	3869.77778	155.257671	0.86208887	0.48882431
N0	N1	9	3947.00000	205.876176	0.88474691	0.23408577
N0	SM	9	3944.11111	136.945650	0.80580255	0.32173694
N100	C1	9	4074.55556	160.315401	0.83216200	0.40750695
N100	N1	9	4145.00000	69.231496	0.95526692	0.21901800
N100	SM	9	4087.55556	50.460656	0.93753908	0.16987418
N50	C1	9	4111.88889	64.055531	0.75744751	0.21841589
N50	N1	9	4105.11111	84.098818	1.17884512	0.13729250
N50	SM	9	4064.00000	107.070071	0.87769075	0.33524661

Level of N	Level of M	Level of N	-----FOSFORO-----		-----CENIZAS-----	
			Mean	Std Dev	Mean	Std Dev
N0	C1	9	0.26409088	0.04949721	11.1783480	1.47789256
N0	N1	9	0.22420109	0.06767187	9.0613976	1.41945341
N0	SM	9	0.22833355	0.05632079	10.5298411	1.16212930

N100	C1	9	0.25130030	0.09522494	11.4318192	0.87817508
N100	N1	9	0.28440667	0.05924749	11.1299120	1.72694829
N100	SM	9	0.25533461	0.05343785	11.9905520	0.95489548
N50	C1	9	0.25352220	0.05517138	10.5818711	1.53463404
N50	N1	9	0.28735547	0.05597338	10.5536081	0.74469344
N50	SM	9	0.26052678	0.06267870	11.8616750	0.93913057

Level of FOSFORO	Level of M	N	-----MS-----		-----PC-----	
			Mean	Std Dev	Mean	Std Dev
P0	C1	9	17.5427418	1.39968039	16.9712645	1.98281965
P0	N1	9	17.9762134	1.70706595	18.0022029	1.10151755
P0	SM	9	19.0480608	3.78091177	15.2865887	1.54973048
P100	C1	9	19.3601591	3.05864911	17.9194668	0.80293448
P100	N1	9	18.3816283	2.87883861	16.6713023	2.50157481
P100	SM	9	18.9552008	2.27240676	16.3323811	1.77018094

The GLM Procedure

Level of FOSFORO	Level of M	N	-----MS-----		-----PC-----	
			Mean	Std Dev	Mean	Std Dev
P50	C1	9	17.3732364	1.40567156	16.0189218	2.31780300
P50	N1	9	18.4909223	1.52893764	15.9668421	2.50758180
P50	SM	9	18.7083427	3.38288618	15.6043975	1.81253387

Level of FOSFORO	Level of M	N	-----ENERGIA-----		-----CALCIO-----	
			Mean	Std Dev	Mean	Std Dev
P0	C1	9	3943.00000	205.968444	0.84300332	0.31636193
P0	N1	9	3984.11111	218.620930	0.94344327	0.16405613
P0	SM	9	3978.11111	156.454821	0.87098501	0.36799019
P100	C1	9	3984.22222	141.269050	0.76339776	0.48655189
P100	N1	9	4080.66667	115.854435	0.97733099	0.27531947
P100	SM	9	4091.55556	69.667265	0.84943296	0.16868031
P50	C1	9	4129.00000	91.037080	0.84529730	0.34284210
P50	N1	9	4132.33333	70.500000	1.09808469	0.23890977
P50	SM	9	4026.00000	97.207253	0.90061441	0.29865653

Level of FOSFORO	Level of M	N	-----FOSFORO-----		-----CENIZAS-----	
			Mean	Std Dev	Mean	Std Dev

P0	C1	9	0.21768599	0.04313678	10.8373194	1.18992587
P0	N1	9	0.23839092	0.07559316	10.3936278	1.91352235
P0	SM	9	0.21462434	0.05439160	12.1050213	1.06439047
P100	C1	9	0.30876347	0.05951112	10.9253576	1.61599854
P100	N1	9	0.27796197	0.05534946	10.5496060	1.46878146
P100	SM	9	0.25527763	0.05156147	10.7956519	1.42151924
P50	C1	9	0.24246392	0.06538439	11.4293614	1.21733094
P50	N1	9	0.27961034	0.06385707	9.8016839	1.39523330
P50	SM	9	0.27429297	0.05404533	11.4813948	0.70506512

Level of N	Level of FOSFORO	Level of M	N	-----MS-----		-----PC-----	
				Mean	Std Dev	Mean	Std Dev
N0	P0	C1	3	17.9295829	2.41092180	15.7613592	1.17158889

Level of N	Level of FOSFORO	Level of M	N	-----ENERGIA-----		-----CALCIO-----	
				Mean	Std Dev	Mean	Std Dev
N0	P0	C1	3	3731.00000	93.674970	0.61121324	0.18213693

Level of N	Level of FOSFORO	Level of M	N	-----FOSFORO-----		-----CENIZAS-----	
				Mean	Std Dev	Mean	Std Dev
N0	P0	C1	3	0.22674681	0.03259418	10.7705710	1.92981276

The GLM Procedure

Level of N	Level of FOSFORO	Level of M	N	-----MS-----		-----PC-----	
				Mean	Std Dev	Mean	Std Dev
N0	P0	N1	3	17.7978355	0.81407147	17.5174033	1.79792754
N0	P0	SM	3	20.9469869	6.40766164	15.7937769	1.06737370
N0	P100	C1	3	22.7006569	3.24332508	17.6439366	1.08690910
N0	P100	N1	3	21.4449545	2.92437561	18.9257012	1.27560607
N0	P100	SM	3	19.4581258	2.06050959	15.3559603	2.57522189
N0	P50	C1	3	18.9922030	0.15034816	13.6039719	1.15236431
N0	P50	N1	3	18.8821794	1.00323776	13.8939867	1.00415525
N0	P50	SM	3	18.0031327	0.09459038	15.0742063	1.65157198
N100	P0	C1	3	16.7282251	0.45208797	17.0281591	3.07003028
N100	P0	N1	3	19.0988560	2.60173045	18.3621308	0.48073078
N100	P0	SM	3	17.5085744	1.19024467	15.4394748	0.99032145

N100	P100	C1	3	17.8473590	0.10816398	17.5426714	0.41926257
N100	P100	N1	3	16.7497692	0.37388668	15.8443397	0.49471973
N100	P100	SM	3	19.1658565	3.81222567	16.6976029	0.77591860
N100	P50	C1	3	16.0664217	0.88369491	17.5721228	2.43535416
N100	P50	N1	3	17.6293850	0.22072837	18.5591886	1.04579714
N100	P50	SM	3	16.8775169	1.02236328	16.1900777	3.02004938
N50	P0	C1	3	17.9704174	0.57053337	18.1242752	0.85660749
N50	P0	N1	3	17.0319488	0.97412107	18.1270746	0.90524067
N50	P0	SM	3	18.6886212	2.35555985	14.6265143	2.53222566
N50	P100	C1	3	17.5324615	1.30710666	18.5717924	0.50649007
N50	P100	N1	3	16.9501612	1.82072478	15.2438660	3.38436904
N50	P100	SM	3	18.2416202	0.81658159	16.9435803	1.76346851
N50	P50	C1	3	17.0610844	0.67878140	16.8806706	0.86568380
N50	P50	N1	3	18.9612025	2.57306353	15.4473511	2.47377346
N50	P50	SM	3	21.2443786	5.41298605	15.5489084	0.59323116

Level of N	Level of FOSFORO	Level of M	N	-----ENERGIA-----		-----CALCIO-----	
				Mean	Std Dev	Mean	Std Dev
N0	P0	N1	3	3700.00000	75.504967	0.84258226	0.11228602
N0	P0	SM	3	3782.66667	24.131584	0.59688095	0.36169424
N0	P100	C1	3	3834.33333	94.648472	0.91306222	0.87002091
N0	P100	N1	3	4009.66667	104.748906	0.84757171	0.26837925
N0	P100	SM	3	4041.66667	61.419324	0.78891591	0.27808458
N0	P50	C1	3	4044.00000	48.815981	1.06199114	0.08625490
N0	P50	N1	3	4131.33333	67.039789	0.96408675	0.34693950
N0	P50	SM	3	4008.00000	105.674027	1.03161079	0.25203321
N100	P0	C1	3	4024.66667	238.412108	1.16026622	0.27806144
N100	P0	N1	3	4152.33333	41.645328	0.91130875	0.20426050
N100	P0	SM	3	4111.00000	49.122296	1.11329796	0.10953378
N100	P100	C1	3	4033.00000	114.843372	0.53005404	0.21739082
N100	P100	N1	3	4191.33333	32.129944	0.79715566	0.10309738
N100	P100	SM	3	4090.66667	45.763887	0.86983039	0.13070313
N100	P50	C1	3	4166.00000	117.932184	0.80616576	0.49017815
N100	P50	N1	3	4091.33333	93.724774	1.15733634	0.19462476

The GLM Procedure

Level of N	Level of FOSFORO	Level of M	N	-----ENERGIA-----		-----CALCIO-----	
				Mean	Std Dev	Mean	Std Dev
N100	P50	SM	3	4061.00000	61.489837	0.82948888	0.12498896
N50	P0	C1	3	4073.33333	34.297716	0.75753049	0.21752116

N50	P0	N1	3	4100.00000	8.544004	1.07643880	0.09993540
N50	P0	SM	3	4040.66667	72.528155	0.90277611	0.44334843
N50	P100	C1	3	4085.33333	71.248392	0.84707702	0.13022810
N50	P100	N1	3	4041.00000	115.723809	1.28726560	0.05006619
N50	P100	SM	3	4142.33333	77.105988	0.88955258	0.10423968
N50	P50	C1	3	4177.00000	22.649503	0.66773501	0.32003828
N50	P50	N1	3	4174.33333	37.859389	1.17283097	0.17171454
N50	P50	SM	3	4009.00000	141.746252	0.84074356	0.48880957

Level of N	Level of FOSFORO	Level of M	N	-----FOSFORO-----		-----CENIZAS-----	
				Mean	Std Dev	Mean	Std Dev
N0	P0	N1	3	0.17114943	0.03811002	8.8704263	2.40914386
N0	P0	SM	3	0.20165714	0.04956194	10.8915472	0.84072875
N0	P100	C1	3	0.26378751	0.04693635	10.3430021	1.07912382
N0	P100	N1	3	0.21856644	0.01694972	8.7784193	0.54658206
N0	P100	SM	3	0.19134690	0.00460069	9.6298661	1.59940030
N0	P50	C1	3	0.30173832	0.04812995	12.4214710	0.48354989
N0	P50	N1	3	0.28288740	0.08451507	9.5353471	1.20204137
N0	P50	SM	3	0.29199662	0.03180608	11.0681099	0.53990056
N100	P0	C1	3	0.19562557	0.05848314	11.4788172	0.16969396
N100	P0	N1	3	0.23011000	0.07481915	11.8706805	1.35794928
N100	P0	SM	3	0.23105269	0.03746332	12.7128301	0.49855289
N100	P100	C1	3	0.36336031	0.02142575	10.8557664	1.35183901
N100	P100	N1	3	0.29268584	0.02372642	11.8792892	0.39507112
N100	P100	SM	3	0.29336745	0.02245394	11.5141346	1.07536257
N100	P50	C1	3	0.19491502	0.06432095	11.9608741	0.55460258
N100	P50	N1	3	0.33042417	0.01337121	9.6397662	2.22104394
N100	P50	SM	3	0.24158368	0.07859353	11.7446912	1.01423947
N50	P0	C1	3	0.23068559	0.04305630	10.2625700	0.88952438
N50	P0	N1	3	0.31391332	0.01914646	10.4397765	0.49227524
N50	P0	SM	3	0.21116318	0.08543344	12.7106864	0.51298789
N50	P100	C1	3	0.29914261	0.06212802	11.5773043	2.51004086
N50	P100	N1	3	0.32263364	0.05285588	10.9911096	0.72409591
N50	P100	SM	3	0.28111855	0.02829147	11.2429550	1.12042444
N50	P50	C1	3	0.23073841	0.04217864	9.9057390	0.06209201
N50	P50	N1	3	0.22551945	0.02667213	10.2299383	0.99394793
N50	P50	SM	3	0.28929860	0.04563216	11.6313835	0.52378809