



**Microorganismos simbiotes
en el crecimiento y absorción de
nutrientes en trébol rosado**

Carlos Belezaca Pinargote

Microorganismos simbiotes en el crecimiento y absorción de nutrientes en trébol rosado

Carlos Belezaca Pinargote

**Microorganismos simbiotes
en el crecimiento y absorción de
nutrientes en trébol rosado**

Título original:
Microorganismos simbiotes
en el crecimiento y absorción de
nutrientes en trébol rosado
Primera edición: enero 2020

© 2020, Carlos Belezaca Pinargote
Publicado por acuerdo con los autor.
© 2020, Editorial Grupo Compás
Guayaquil-Ecuador

© Universidad Técnica Estatal de Quevedo
Publicación derivada del 5to Congreso Multidisciplinario
de Investigación Científica.
Guayaquil-Ecuador

Grupo Compás apoya la protección del copyright, cada uno de sus textos han sido sometido a un proceso de evaluación por pares externos con base en la normativa del editorial.

El copyright estimula la creatividad, defiende la diversidad en el ámbito de las ideas y el conocimiento, promueve la libre expresión y favorece una cultura viva. Quedan rigurosamente prohibidas, bajo las sanciones en las leyes, la producción o almacenamiento total o parcial de la presente publicación, incluyendo el diseño de la portada, así como la transmisión de la misma por cualquiera de sus medios, tanto si es electrónico, como químico, mecánico, óptico, de grabación o bien de fotocopia, sin la autorización de los titulares del copyright.

Editado en Guayaquil - Ecuador

ISBN: 978-9942-33-172-4

Cita.

C. Belezaca (2020) Microorganismos simbiotes en el crecimiento y absorción de nutrientes en trébol rosado , Editorial Grupo Compás, Guayaquil Ecuador, 107 pag

Prólogo

El libro busca determinar el crecimiento y absorción de fósforo (P) y nitrógeno (N) en plantas de *Trifolium pratense* (trébol rosado) inoculadas con *Glomus intraradices* y *Rhizobium leguminosarum* en condiciones controladas de laboratorio. El estudio se llevo a cabo durante 9 semanas y se empleó un suelo andisol esterilizado, la solución nutritiva utilizada fue la Long Ashton. El experimento estuvo constituido por ocho (8) tratamientos en base a riego con: 1) agua destilada estéril (H₂O), 2) solución nutritiva completa (SNC), 3) *Rhizobium leguminosarum* mas solución nutritiva sin nitrógeno (RI+SN-N), 4) *R. leguminosarum* mas solución nutritiva completa (RI+SNC), 5) *Glomus intraradices* mas solución nutritiva sin fósforo (Gi+SN-P), 6) *G. intraradices* mas solución nutritiva completa (Gi+SNC), 7) *R. leguminosarum* mas *G. intraradices* mas solución nutritiva sin nitrógeno y sin fósforo (RI+Gi+SN-N-P), y 8) *R. leguminosarum* mas *G. intraradices* mas solución nutritiva completa (RI+Gi+SNC). Las variables estudiadas fueron: Altura, número de hojas, peso fresco y seco del sistema foliar, peso fresco y seco del sistema radicular, largo total de raíz por planta (RL), densidad radicular (RLv), distancia media entre raíces (r1), y relación raíz a parte aérea (R/S), tasa de crecimiento relativo de la parte aérea (RGRs), y radicular (RGRr), largo de raíz por unidad de tasa de crecimiento de la parte aérea (RL/RG), número de nódulos por planta,

porcentaje de colonización micorrízica, contenido de fósforo y nitrógeno y estimación del Influjo (In) de P y N por planta. Las evaluaciones de se efectuaron a los 50 y 65 días después de la siembra. No se encontró influencia alguna sobre las plantas de *T. pratense* con *G. intraradices*, pues las evaluaciones a los 50 y 65 días demostraron que no hubo micorrización del sistema radicular. Mientras que *R. leguminosarum* formó una simbiosis positiva con las raíces, reflejándose en el número de nódulos, contenido e influjo de N por planta. Por otro lado, la asociación *R. leguminosarum* – *T. pratense*, estuvo influenciada por la presencia o ausencia de P en el suelo a través de las fertilizaciones con las soluciones nutritivas. La influencia del P fue tan notoria en las plantas de *T. pratense*, a tal punto que los tratamientos que únicamente contaban con 2,2 ppm disponible en el suelo, mostraron los menores valores en cuanto a altura, peso fresco y seco, contenido e influjo de P por planta, respecto a los tratamientos que contaban con un aporte de 0,067 mmol de P en la solución nutritiva cada 48 horas. El P fue decisivo para que las plantas carentes de este nutriente, muestren valores mayores en cuanto a RL/GS y (R/S), lo cual indica que las plantas invirtieron mayor crecimiento de raíces por cada unidad del sistema foliar, que aquellos tratamientos que recibieron P, en los cuales, la relación fue mas estrecha.

Índice

Capítulo 1	4
INTRODUCCIÓN	4
Relación tripartita <i>Trifolium</i> – Micorrizas – <i>Rhizobium</i>	16
Estrategias de las plantas para acceder a los nutrientes del suelo	18
Reactivos	24
Equipos	25
Otros	26
Área de estudio	26
Germinación de semillas de <i>Trifolium pratense</i> L	27
Obtención y desinfección del suelo	27
Obtención del inoculo de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>Trifolii</i>	28
Obtención del inóculo de <i>Glomus intraradices</i>	29
Preparación del sustrato para el cultivo de plántulas de <i>Trifolium pratense</i> L	29
Tratamientos y Diseño Experimental.....	33
Variables morfológicas en las plantas evaluadas.	35
Variables químicas en las plantas evaluadas.	40
Altura de planta	42
Estimación de: largo total de raíz por planta (RL), densidad radicular (RLv), distancia media entre raíces (r1), y relación raíz / parte aérea (R/S).	51
Colonización micorrízica.....	59
Nitrógeno.....	61
Estimación del Influjo de nutrientes de P y N.	63
BIBLIOGRAFÍA.....	84

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

La agricultura moderna requiere cada vez de un mayor potencial productivo, sin embargo, esto exige una mayor nutrición de los vegetales, principalmente de macronutrientes como nitrógeno (N) y fósforo (P), cuyas necesidades pueden ser incluso muy superiores a los aportes del suelo (García y col., 1997; Matus, 2006). Por tanto, es muy común, suplementar los nutrientes no disponibles con fertilizantes sintéticos, lo que conlleva al incremento en los costos de producción e impacto medioambiental (Cardoso, 2002; Quintero y col., 2004). En el caso del N se ha comprobado que aproximadamente el 30% del total aplicado al suelo, se escapa hacia la atmósfera (desnitrificación) en estado gaseoso (Videla y col., 1996, Monroy y col., 2002), por lixiviación, que pueden llegar a eutroficar ecosistemas acuáticos (Rodríguez, 1993; Urzúa 2000). Mientras que la baja disponibilidad del P en el suelo, no es un indicador que exista deficiencia del mismo, sino más bien que el P no está disponible o asimilable para las plantas (Raghothama, 1999; Berardo y col., 2001, Fernández *et al.*, 2001; Kovar y Claassen, 2005; Hernández-Valencia y Bautis, 2005). En ambos casos la fertilización química

únicamente es una solución momentánea y poco sustentable.

Ventajosamente, existe otra vía para disponer al suelo y vegetales de los macronutrientes, mediante una forma económica y ecológicamente sustentable, empleando algunos microorganismos del suelo (Casado y Fernández, 1998; Nogales, 2005). A este proceso se lo denomina biofertilización, tecnología que recurre a la inclusión de microorganismos en los procesos de cultivos como lo es en semillas pregerminadas o plantas jóvenes mediante la inoculación (Díaz y col., 2001; Parada y col., 2001).

Dentro de los sistemas productivos del sur de Chile, *Trifolium pratense* L. (trébol rosado) es una de las leguminosas forrajeras considerada de gran importancia tanto por la superficie sembrada, que supera las 100.000 ha (aproximadamente el 20% de las praderas sembradas), así como por las exportaciones de semilla que oscilan entre 700 y 1000 toneladas al año, lo que representa un porcentaje superior al 70% del total de semillas forrajeras exportadas (Ortega y col., 2003). Sin embargo, una de las principales limitantes para el establecimiento y producción de las praderas de leguminosas anuales es la baja fertilidad de los suelos y en particular el contenido de P (Ovalle y col., 2003).

En Chile, la IX, XIV y X regiones, comprenden el área de ganadería bovina mas importante del país. Según la Oficina de estudios y políticas agrarias del Ministerio de Agriculturas (ODEPA) de Chile (2000), concentra el 57,8% del ganado vacuno y el 17,2% de los ovinos. Según Campillo (1997), es común el empleo de combinaciones forrajeras, donde como alimento temporal incorporan trébol rosado acompañado de otras plantas forrajeras (gramíneas) perennes, sistema que ha demostrado ser una importante fuente nutricional para el ganado.

T. pratense clasificado dentro del Orden Fabales, Familia Fabaceae, subfamilia Faboideae, género *Trifolium* (Soto, 1986) es una planta herbácea perenne con tallos que miden de 6 a 110 cm de altura, con hojas dispuestas alternadamente, trifoliadas con folíolos de 30 x 50 mm dispuestos formando un ángulo de 120°. Habita en praderas de corte, cultivos abandonados y bordes de caminos, en suelos generalmente frescos, arcillosos y profundos, tanto en sustratos ácidos como calcáreos. Posee un amplio rango de distribución altitudinal, que va desde el nivel del mar hasta más allá de los 2600 m.s.n.m. (Soto, 1986). Se conoce que es nativo de Europa y el Oeste de Asia, introducido a Chile en el siglo XX, donde se ha convertido en una excelente especie forrajera (León y Izquierdo, 1993). Es considerada una planta resistente a la sequía y muy valiosa en los veranos secos. Además, como

la mayoría de leguminosas fija nitrógeno atmosférico (Pearson, 1979).

Según el Instituto de Investigación de Recursos Naturales, IREN, (1982) en Chile se han desarrollado variedades de *T. pratense* destinadas a suplir las necesidades alimenticias de la ganadería bovina en diferentes zonas ecológicas del país, sin embargo, la variedad Quiñequeli es considerada una de las de mayor importancia, apareció a finales de la década de 1950 a partir del trabajo de mejoramiento genético de trébol rosado realizado en el Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) de Chile, lo cual permitió en el año de 1962 liberar al mercado este nuevo cultivar diploide (Avendaño, 1965). *T. pratense* es un forrajera de vida corta que ha demostrado ser muy productiva (Carambula, 1982) se adapta a suelos arcillosos, no requiere suelos profundos, pero necesita un suelo con buen drenaje y ausencia de anegamiento prolongado (Soto y col., 2005). Su duración en una pradera es de dos temporadas, pero con un buen manejo es posible prolongar hasta una tercera temporada (González, 1992). En estudios realizados en Europa se ha demostrado que *T. pratense* muestra los mas altos rendimientos, principalmente en hojas y tallos, consolidando su superioridad sobre otras leguminosas forrajeras con un menor grado de infestación por malas hierbas (Lingorski, 2001). Además de ser una importante

fuente alimenticia para el ganado vacuno, es una leguminosa con capacidad de fijar nitrógeno N_2 atmosférico. A raíz de los conocimientos iniciales, rápidamente surgió el descubrimiento del agente etiológico causante de este beneficioso proceso, la bacteria simbiote *Rhizobium* (Baca y col., 2000).

De igual manera, las micorrizas fueron descubiertas paralelamente a *Rhizobium* por el botánico Alemán A.B. Frank (1885), desde entonces, el término micorriza etimológicamente significa "hongo-raíz" y fue propuesto por primera vez, haciendo referencia a la simbiosis observada entre las raíces de ciertos árboles y un micelio fúngico, a la que en aquel entonces se supuso favorecía las condiciones hídricas del área circundante a las raíces y de una importante función nutricional. La simbiosis micorrízica es mutualista, está basada en un flujo de componentes inorgánicos desde el hongo hacia la planta y de compuestos orgánicos desde la planta hacia el hongo (Strack y col., 2003). Las estructuras del micosimbionte, que se extienden dentro de las raíces de la planta hospedadora y en el sustrato circundante son características distintivas de cada tipo de micorrizas y se utiliza para su identificación. Un aspecto importante de esta asociación es su universalidad, considerando que la gran mayoría de las plantas vasculares a nivel global poseen esta simbiosis. (Allen, 1991).

Pese a mostrar muchas similitudes en cuanto a función, y en algunos casos morfología, se conocen cinco tipos principales de micorrizas: 1) Formadoras de manto (ectomicorrizas), 2) Arbusculares (endomycorrizas), 3) Orquidoides (endomycorrizas), 4) Ericoides (endomycorrizas), 5) Arbutoides (ectendomycorrizas), (Harley y Smith, 1983; Barea, 1998). Sin embargo, las micorrizas arbusculares (MA) son las más difundidas en la corteza terrestre (Schnepf y Roose, 2006).

Las MA son universales, ya que el 95% de las especies vegetales la establecen de forma natural en hábitats muy diversos (Bowen, 1980; Calvet y col., 1999), son tan antiguas que su origen se remonta al periodo devónico, hace unos 400 millones de años, cuando según evidencias fósiles (Taylor y col., 1995) y moleculares (Simon y col., 1993), se asociaron las primitivas plantas terrestres con hongos que posibilitaron su adaptación a las nuevas condiciones ambientales que implicaban el paso de un ambiente acuático al terrestre (Malloch y col., 1980). Desde entonces, los hongos de micorriza arbuscular (HMA) y las plantas han evolucionado en una estrecha relación. Quizá sea esta evolución conjunta la causa de una de las características principales de este tipo de hongos, su biotrofia obligada. Esto condiciona que el hongo tenga la necesidad de encontrar y

colonizar una raíz hospedadora para poder continuar su crecimiento y completar su ciclo de vida, que culmina con la formación de propágulos nuevos y viables (Azcon-Aguilar y col., 1991 y 1998). Esta es una de las principales limitantes del estudio de este grupo de hongos, ya que no es posible su multiplicación en condiciones axénicas (Bago y col., 2000).

La asociación se lleva a cabo en el área circundante a la raíz de la planta (rizósfera), donde un gran número de microorganismos saprófitos, entre ellos hongos, que habitan la rizósfera actúan recíprocamente con la planta (Guadarrama y col., 2004). El hongo suministra a la planta nutrientes minerales y agua que extrae del suelo, a través de su red externa de hifas, mientras que la planta proporciona al hongo carbohidratos producidos por la fotosíntesis (Sieverding, 1991; Clark y Zeto, 2000; Bago y col., 2000). Además, los hongos micorrízicos contribuyen al mantenimiento de una buena estructuración y agregación del suelo circundante a las raíces (Rillig y Mummey, 2006), actividad de importancia en la estabilidad de ecosistemas terrestres. Los HMA son abundantes bajo cualquier rango de fertilidad del suelo, aunque el grado de colonización micorrízica aumenta cuando la fertilidad declina, particularmente en suelos deficientes de fósforo (Mosse y col., 1973 y 1976; Brundrett y col., 1996; Smith y Read, 1997). Adicionalmente, la

disponibilidad de P en los suelos, limita a muchas especies vegetales el poder manifestar su potencial genético en cuanto a producción, es aquí, donde los HMA facilitan el suministro de este nutriente a plantas que sin él no prosperarían (Brundrett y col., 1996; Pérez, 1997; Khalil y col., 1999; Smith y col., 2003). Mediante la penetración y colonización de las células radicales de las plantas se forma un sistema de transferencia bidireccional, llevando nutrimentos como el P y otros que son inmóviles, del suelo a la planta y compuestos orgánicos como carbohidratos de la planta al hongo (Velasco y col., 2001; Scheublin y col., 2004; Peterson y col., 2004). Además, se generan otros beneficios de la asociación, entre otros, una mayor resistencia de la planta micorrizada al ataque de patógenos del sistema radical (Hooker y col., 1994); a la presencia de metales pesados en el suelo (del Val y col., 1999), al estrés hídrico (Marulanda y col., 2003), a condiciones extremas de pH del suelo (Clark y col., 1999). Por otra parte, la red de hifas extraradicales y ciertas sustancias secretadas por el hongo durante la asociación favorecen la formación de agregados estables en el suelo y por consiguiente la conservación de la estructura física de este (Borie y col., 2000; Jeffries y Barea 2001).

A inicios de la década de 1990, al rededor de 150 especies de hongos que forman MA fueron clasificados en dos subordenes: Glomineae y Gigasporineae y éstos,

en tres familias: Glomaceae, Acaulosporaceae y Gigasporaceae, con seis géneros: *Glomus*, *Sclerocystis*, *Acaulospora*, *Entrophospora*, *Gigaspora* y *Scutellospora* (Schenck y Pérez, 1990). Posteriormente, Morton y Redecker (2001), mediante técnicas moleculares y la comparación de características morfológicas de las esporas, hicieron cambios importantes en la taxonomía. Según la nueva taxonomía los HMA pertenecen al phylum Glomeromycota, clase Glomeromycetes que incluye cuatro ordenes: Glomerales con sus familias Pacisporaceae, Glomeraceae y géneros *Pacispora* y *Glomus*; Paraglomerales con su familia Paraglomeraceae y género *Paraglomus*; Archaeosporales con sus familias Archaeosporaceae, y Geosiphonaceae y géneros *Archaeospora* y *Geosiphon*; y Diversisporales con las familias Acaulosporaceae, Diversisporaceae, Gigasporaceae y géneros *Acaulospora*, *Entrophospora*, *Diversispora*, *Gigaspora* y *Scutellospora* (Schüssler, 2004).

Los HMA no son tan específicos, por lo que una especie puede colonizar a muchas especies de plantas y se adaptan mejor a las condiciones del medio porque sus esporas crecen con facilidad y pueden sobrevivir sin contacto con las raíces. Esas son dos causas principales por las cuales abundan mas en la naturaleza que el resto de las micorrizas (Brundrett y col., 1996). Se sabe que, a este grupo pertenecen la mayor cantidad de micorrizas

existentes en la naturaleza, y por lo tanto las que mas especies vegetales colonizan (Sieverding, 1991). El efecto positivo de los HMA se observa en las planta hospederas, al mejorar su adaptación, reproducción, supervivencia y producción de biomasa (Fisher y Jayachandran, 2002; Scheublin y col., 2004).

Por otra parte, la taxonomía actual de los rizobios se base en un enfoque polifásico que incluye caracterizaciones de morfología, bioquímica, fisiología, genética y filogenia, entre otras, que ha conferido a la taxonomía una base más natural y más confiable (Gillis y col., 2001). Herramientas de la biología molecular y los métodos tradicionales, han ayudado a la evolución de la taxonomía de *Rhizobium*. Jordan (1982) separó los rizobios en dos géneros: *Bradyrhizobium* y *Rhizobium*. El género *Bradyrhizobium* incluye las cepas de lento crecimiento, productoras alcalinas en YMA que tienen colonias ≥ 1 mm en diámetro a los 5-7 días en placas de YMA. En este género se ha designado una sola especie, *B. japonicum*. En el género *Rhizobium*, se incluyeron tres especies: *R. leguminosarum*, *R. meliloti* y *R. loti*. Sin embargo, *R. leguminosarum* incluye tres biovars: bv. *viciae* que antes era la especie *R. leguminosarum*; bv. *phaseoli* que anteriormente era *R. phaseoli*; y bv. *trifolii* que fue la anterior *R. trifolii*.

Una de las simbiosis mas importantes en la naturaleza es, entre leguminosas y bacterias del género *Rhizobium*. La infección de las raíces conduce a la formación de nódulos radicales que tienen distinta forma según la planta hospedadora. Los rizobios específicos entran en la raíz por el extremo de los pelos absorbentes y se forma uno o varios tubos de infección dentro de los cuales los rizobios se hallan dispuestos en fila. El tubo de infección penetra en las células del cortex, provocando que estas se dividan activamente hasta formar un tumor. Los rizobios contenidos en el tubo de infección son liberados en el citoplasma de las células meristemáticas, donde adquieren una forma distinta al rizobio de vida libre y se denominan bacteroides que son capaces de fijar nitrógeno molecular (Carrillo, 2003). Normalmente los bacteroides completamente desarrollados ya no pueden volver a reproducirse, aunque existe controversia al respecto. Se ha reportado que los rizobios tienen tres diferentes estados de vida: uno dentro de los nódulos de las leguminosas, otro en suelo y otro dentro de plantas no leguminosas como endófitos. Todos los rizobios pueden vivir como saprófitos en suelos o en medios de cultivos (Moulin y col., 2001). En los nódulos la presión parcial de oxígeno es muy baja, si se eleva, la enzima nitrogenasa quedaría inhibida y no se produciría la fijación. Sin embargo, en el nódulo se consume el oxígeno por la leghemoglobina (molécula transportadora de O₂ y que

además contiene un grupo hemo), responsable del color rojizo de los nódulos (Ingraham y Ingraham, 1998). El proceso de Fijación Simbiótica de Nitrógeno (FSN), producto de la asociación *Rhizobium*-leguminosa consiste, a grandes rasgos, en la reducción de N_2 a NH_3 por acción de la enzima nitrogenasa y su incorporación a la biosfera (Carrillo, 2003).

Cuando se desea que la planta cultivada tenga un aporte eficiente de nitrógeno de manera natural se recurre al uso de bacterias fijadoras del mismo. A partir de esta vía es posible obtener un importante suministro de N para determinadas especies vegetales, las que en simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno, principalmente del genero *Rhizobium* obtienen este elemento a un costo metabólico generalmente reducido (Pahuara y Zúñiga, 2002; Urzúa, 2000), tal es el caso de *Trifolium pratense* (trébol rosado).

Lamentablemente, los rizobios no siempre se encuentran en el suelo, están en poblaciones relativamente bajas o si se encuentran, estos son de baja efectividad, por lo que es conveniente introducirlos artificialmente mediante inoculaciones para de esta manera favorecer a la simbiosis. La inoculación artificial resulta imprescindible cuando se introducen nuevas leguminosas en terrenos ajenos a su lugar de origen, sobre todo si son

hospedadores de alta especificidad o cuando la deficiencia en nitrógeno limita el desarrollo vegetal (Rincón y col., 2000; Molina y col., 2006).

Relación tripartita *Trifolium* – Micorrizas – *Rhizobium*

En la X región de Chile se han realizado estudios exitosos en cuanto a la simbiosis tripartita leguminosa – rhizobium – micorriza y su relación con la producción, fijación simbiótica del N, absorción de P y otros macro y micronutrientes en la especie *Trifolium repens* (trébol blanco) (Urzúa, 2005). Sin embargo, de acuerdo a Scheublin y col., (2004), existen relativamente pocos estudios sobre comunidades de HMA en leguminosas e incluso es menos conocido aún su colonización en los nódulos radicales. Se sabe que en condiciones de laboratorio los HMA colonizan nódulos, pero no es conocido si estos son colonizados a nivel de invernadero o campo, ya que los nódulos se diferencian de las raíces en estructura, función y requerimientos nutricionales. Estas diferencias sugieren que los HMA pueden diferir en raíces y nódulos (Almeida y col., 2000). No se conoce información referente a que si los HMA pueden colonizar los nódulos de *T. pratense*.

Por otro lado, se considera que el P es la principal limitante nutricional para el crecimiento de leguminosas

en regiones tropicales y subtropicales del mundo (Ae y col., 1990). Además, es conocido que plántulas originadas de semillas pequeñas poseen condiciones nutricionales muy bajas, siendo el P el elemento más deficiente, sin embargo, una vez germinadas en contacto con el suelo, las pequeñas plantas se benefician por el efecto de algunos microorganismos que en él habitan, favoreciendo la solubilización y disponibilidad del nutriente. El N y P generalmente se encuentran deficientes, pero las bacterias fijadoras de nitrógeno y los HMA los hacen disponibles para las nuevas plantas (González-Chávez, 1995). Sin embargo, para el establecimiento de la nodulación y fijación de nitrógeno, las leguminosas forrajeras dependen de una nutrición fosfatada adecuada, y es aquí donde las micorrizas intervienen, aumentando potencialmente la disponibilidad y absorción de P, ya que este elemento es de gran valor para una eficiente fijación de N atmosférico, crecimiento y nodulación efectiva del sistema radicular de las plantas (Burity y col., 2000). Además, dentro de la biota rizosférica de las plantas es frecuente encontrar microorganismos asociados, entre los que se destacan hongos no simbióticos, pero con importante desempeño como reguladores o estimuladores del crecimiento vegetal.

Desde un punto de vista conservador, resulta ecológica y económicamente conveniente emplear la simbiosis tripartita *Rhizobium* - *T. pratense* - Micorriza arbuscular para mejorar la fijación biológica del nitrógeno (FBN) y aumentar la disponibilidad de fósforo en la solución de suelo, permitiendo un ahorro económico al evitar la fertilización sintética (Broadbent y col., 1982; Urzúa y col., 1986). Además, la presencia de microorganismos fúngicos en la biota rizosférica con potencial para producir reguladores del crecimiento vegetal, estimula el desarrollo satisfactorio y competitivo de las especies vegetales beneficiadas por este fenómeno. En la zona sur, especialmente en la X región existen problemas para lograr poblaciones de trébol suficientes para que se produzca un aporte de N significativo (Urzúa, 1987).

Estrategias de las plantas para acceder a los nutrientes del suelo

El proceso de absorción de nutrientes desde el suelo por parte de las raíces de las plantas ocurre por contacto, mediante dos fenómenos complementarios: por un lado, el crecimiento de las raíces hacia lugares donde los nutrientes están localizados, y por otro, el transporte de nutrientes desde el volumen de suelo hacia la superficie de las raíces (Jungk, 2002). Sin embargo, la cantidad de iones de un determinado nutriente que llega hasta la

superficie de las raíces, depende del tamaño del sistema radicular, longitud o superficie; propiedades morfológicas de la raíz, tales como, radio de la raíz, pelos radicales, raíces proteoideas, simbiosis con hongos micorrízicos, y distribución radicular en el perfil del suelo (Clarkson, 1985; Jungk y Claassen, 1997). Por otro lado, el movimiento de nutrientes desde el suelo que rodea a las raíces hacia la superficie de estas, ocurre como resultado de dos procesos, flujo de masa y difusión (Barber, 1995; Tinker y Nye, 2000). El flujo de masa es el transporte del (los) nutriente (s) disuelto (s) en la solución de suelo hacia la raíz, mediante la transpiración del sistema foliar de la planta. Difusión es el proceso por el cual el (los) nutriente (s) son movidos desde un área de alta concentración hacia un área de baja concentración (Jungk y Claassen, 1997). Sin embargo, el proceso de difusión es el principal mecanismo, mediante el cual el o los nutrientes llegan con mayor facilidad a la superficie de las raíces (Claassen y Steingrobe, 1999).

Durante los procesos evolutivos, las plantas terrestres han desarrollado sistemas radiculares particularmente adaptados para adquirir nutrientes bajo diferentes condiciones (Jungk, 2001), además, despliegan estrategias que les permite afectar positivamente la captación de nutrientes, entre las que están: a) el tamaño y arquitectura del sistema radicular, b)

propiedades morfológicas como diámetro de raíces, pelos radicales y raíces en racimos, c) tasa de absorción de nutrientes por unidad de longitud de raíz o superficie radicular, d) liberación de sustancias para alterar la solubilidad de nutrientes en la rizósfera, y e) hongos simbios (micorrízicos) para explotar grandes volúmenes de suelo. Además, la exudación de sustancias por parte de las raíces o pelos radicales dentro del suelo (Tinker y Nye, 2000). Desde el punto de vista de eficiencia, el desempeño de las raíces es un factor importante para suministrar nutrientes adecuadamente a las plantas. La demanda de nutrientes por parte de la planta sobre las raíces puede ser expresada por el influjo, I_n , que es la cantidad de un determinado nutriente que una raíz absorbe por unidad de tiempo. Además, el sistema radicular puede ser cuantificado en términos de longitud, superficie o peso de las raíces y ser relacionado para el tamaño del follaje, volumen de suelo o para el área del suelo. La relación entre la longitud de raíz y el peso del follaje es un parámetro básico en la adquisición de nutrientes por parte de las plantas (Jungk y Claassen, 1997).

La absorción de nutrientes desde el suelo por las raíces de las plantas, es un proceso que depende de las propiedades del suelo y de las plantas mismas, es decir de la disponibilidad de nutriente en el suelo y del poder

de adquisición de nutrientes de la planta (Jungk y Claassen, 1997; Jungk, 2002). La disponibilidad depende de la cantidad de nutriente presente en el suelo y de su movilidad, mientras que el poder de adquisición es función de la longitud total del sistema radicular y del influjo (I_n) (Hoffmann y Jungk, 1995).

El suelo adyacente a la superficie de las raíces es el suelo rizosférico, el cual posee una actividad química y biológica mucho más activa. Muchos de los procesos que ocurren en la interfase raíz-suelo-planta son el resultado directo e indirecto de la demanda de las plantas por agua y nutrientes, así como el ambiente favorable creado por muchos organismos que viven allí. Estos procesos incluyen contacto raíz-suelo, transporte de nutrientes, precipitación-disolución, adsorción-desorción (conocidos colectivamente como el potencial buffer del suelo) y la inmovilización-mineralización biológica. No obstante, la rizósfera puede extenderse más allá de los primeros milímetros del suelo adyacente a la superficie de la raíz, cuando se considera la absorción de agua y iones de nutrientes móviles, como es el caso del nitrógeno en su forma de NO_3 o cuando se liberan compuestos volátiles (Hinsinger, 1998). Por otro lado, en el caso de nutrientes relativamente inmóviles, tales como el P, la rizósfera del suelo es probablemente limitada a distancias menores comprendidas entre 1 a 4 mm desde la superficie de la

raíz (Gahoonía y Nielsen, 1992; Hubel y Beck, 1993). Por otra parte, muchas plantas a través de sus raíces liberan grandes cantidades de ácidos orgánicos dentro de la rizósfera (Lamont, 2003; Shane y Lambers, 2005), provocando una solubilización de nutrientes mediante quelación e intercambio de ligandos (Gerke y col., 2000; Ryan y col., 2001; Dakora y Phillips, 1996 y 2002).

En especies leguminosas, los isoflavonoides son abundantes compuestos fenólicos que están estrechamente vinculados en las interacciones microorganismo – planta (Dinkelaker y col., 1995; Weisskopf y col., 2006). Ellos pueden atraer microorganismos mutualistas tales como bacterias fijadoras de nitrógeno (Dakora y col., 1993) y hongos micorrízicos (Hirsch y Kapulnik, 1998). Además, los isoflavonoides están vinculados en la respuesta de defensa frente a potenciales patógenos fúngicos o bacteriales del suelo (Paiva, 2000).

También, los microorganismos del suelo afectan potencialmente la nutrición de las plantas a través de su rol importante en la solubilización y mineralización de nutrientes de poca movilidad en la rizósfera, así como la liberación de sustancias que mejoran el crecimiento y funciones del sistema radicular (Bowen y Rovira, 1999; Jakobsen y col., 2005). Entre los microorganismos

sobresalen los hongos micorrízicos, cuyo micelio constituye un sistema altamente eficiente para la recolección de nutrientes de baja movilidad, como es el caso del P. Las plantas micorrizadas aprovechan bajos niveles de fosfatos y un mayor volumen de suelo por unidad de longitud de raíz, que plantas no infectadas (Jungk y Claassen, 1997).

Las técnicas convencionales permiten estimar la cantidad de nutrientes disponibles que una determinada planta logra absorber, sin embargo, es difícil cuantificar la cantidad que se pierde por volatilización, desnitrificación o lixiviación, para el caso del nitrógeno, y por otro lado, cuanto nutriente es atrapado por el suelo y absorbido por las raíces, como sucede en el caso del fósforo. Pero, actualmente las técnicas isotópicas constituyen formas directas para medir la absorción por planta de un nutriente proveniente de un fertilizante marcado con un isótopo. Este método provee una vía precisa para medir, no solo la absorción de nutrientes por planta, sino también cuanto del mismo utiliza la planta desde el suelo. Los isótopos ^{32}P y ^{15}N constituyen un medio para obtener una medida directa de cuanto fósforo o cuanto nitrógeno que utiliza la planta proviene del fertilizante, cuanto proviene del suelo y cuanto se pierde (Pino y col. 2006).

Para entender la influencia de los hongos micorrízicos y estimuladores del crecimiento vegetal y bacterias fijadoras de nitrógeno, sobre el sistema radicular y desarrollo vegetativo de las plantas en el proceso de absorción de nutrientes, es necesario estudiar el comportamiento y reacción de las plantas frente a la influencia de los microorganismos en presencia y ausencia de nutrientes de importancia para el desarrollo vegetal.

Para establecer una continuación en el correcto desarrollo del libro el presente estudio se empleó una cepa bacteriana y una fúngica: *Rhizobium leguminosarum* (Frank) bv. *Trifolii* aislada a partir de nódulos presentes en raíces de *Trifolium pratense* Linnaeus cv Quiñequeli procedente del Jardín Botánico de la Universidad Austral de Chile. Una cepa del hongo micorrízico arbuscular *Glomus intraradices* Schenck & Smith, cedida por el Dr. Fernando Borie de la Universidad de la Frontera. Además, semillas de *Trifolium pratense* L. var. Quiñequeli (trébol rosado).

Reactivos

Los reactivos utilizados en la fase experimental se presentan en orden alfabético y se señala en paréntesis la abreviatura usada en el texto: Acido Clorhídrico (HCl),

Agar extracto malta (AEM), Agar peptona (AP), Agar rojo congo manitol (ACM), Alcohol, Bicarbonato de Potasio (KHCO_3), Carbonato de Calcio (CaCO_3), Cloruro de Sodio (ClNa), Cristal violeta al 5%, Fosfato de Potasio (K_2HPO_4), fuccina, Hipoclorito de Sodio (HClONa) al 10% producto comercial, lugol, manita, rojo fenol, rojo metilo, safranina 0.25%, Sulfato de Magnesio ($\text{SO}_4\text{Mg}7\text{H}_2\text{O}$), Sulfato de Potasio (K_2SO_4); Fosfato de Potasio monobásico (KH_2PO_4); Cloruro de Magnesio hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$); Sulfato de Sodio (Na_2SO_4); Nitrato de Amonio (NH_4NO_3).

Equipos

Acondicionador de aire (marca Norwood), autoclave (marca Orthmann), balanza de precisión (marca Precisa 2200 c), baño termostático (marca Rost Frei), cámara de crecimiento de plantas, cámara de flujo laminar (marca Termoforma, modelo Class II A/B3), cámara fotográfica (marca Olympus® X-750), cámara de frío (marca Eurofrigo), cámara de incubación (marca Trilab), destilador de agua (marca Kottermann), Lupa estereoscópica (marca Carl Zeiss), horno microondas (marca LG), horno pasteur (marca Kottermann), microscopio óptico (marca Carl Zeiss modelo 4343505), pH metro (marca Fisher Accumet, modelo 230), refrigerador (marca Mademsa, modelo evolution 2900 G).

Otros

Aceite de inmersión, aguja de siembra, algodón hidrófilo, asa de siembra, bolsas plásticas, buretas, cubetas plásticas de 70,0 x 60,0 x 11,5 cm, cubreobjetos, cuchillo, erlenmeyers de 250, 500 y 1000 mL, gasa, jeringas desechables, lápiz, plumones de tinta permanente, matraces, pala de desfonde, papel aluminio, papel de envolver, papel de periódico, pinzas, pipetas de 1, 5, 10 mL, placas Petri de 9,0 x 1,6 cm, portaobjetos, sacos plásticos, styroblocks (macetas colectivas de poliestireno) de 63,5 x 39,0 x 7,0 cm, suelo (sustrato), tamices, toalla de papel absorbente, tubos de ensayo de 16 x 1 cm, vasos precipitados de 200 y 500 mL.

Área de estudio

La investigación se llevo a cabo en los meses de febrero a Abril del año 2008, y se realizó en el Centro de Análisis y Desarrollo de Resistencias Fúngicas (CADEREF), ubicado en el laboratorio de Patología Forestal de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad Austral de Chile.

Germinación de semillas de *Trifolium pratense* L

Las semillas de *T. pratense* se desinfectaron en una solución de HClONa al 10 % por 3 minutos, posteriormente se lavaron en 3 ocasiones con abundante agua destilada estéril para eliminar residuos de cloro. Una vez lavadas se ubicaron sobre papel toalla humedecida estéril dentro de una placa de Petri y se colocaron a temperatura (23 ± 1 °C) de laboratorio por 72 horas.

Obtención y desinfección del suelo

El suelo utilizado correspondió a un trumao (andisol), compactado, derivado de cenizas volcánicas recolectado en la ciudad de Valdivia (Sector pampa San Luís), con características nutricionales de bajo nivel de disponibilidad de N y P (12,6 ppm y 2,4 mg/kg respectivamente). Al suelo colectado le fue retirado los materiales de mayor tamaño (hojarasca, ramas, rocas, tallos, etc.) mediante tamizado, hasta quedar homogenizado. Se depositaron en bolsas plásticas y esterilizaron en un autoclave a 121 °C y 1 atmósfera de presión por 20 minutos, este proceso se repitió 24 horas después de la primera esterilización para eliminar endosporas bacterianas que hallan resistido y germinado después de la esterilización inicial.

Cuando concluyó el proceso de esterilización y se enfrió el suelo, se realizó un control de esterilización mediante siembra de diluciones seriadas sobre agar peptona e incubadas a 23 ± 1 °C durante 96 horas, posteriormente se determinó el contenido de N y P disponible, materia orgánica y pH. El análisis químico de P, N, materia orgánica y pH en el suelo, se realizó según metodología descrita por Sadzawka *et al.*, (2006) para los suelos de Chile.

Obtención del inóculo de *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii*

Se colectaron plantas de *Trifolium pratense* en el Jardín Botánico de la Universidad Austral de Chile, cuyo sistema radicular presentó formación de nódulos sanos y vigorosos. Estos fueron separados de la raíz y lavados con abundante agua de llave, hasta desprender las partículas de suelo adheridas. Posteriormente, los nódulos se depositaron en un recipiente al que se le añadió HClONa al 5%, para su desinfección externa durante 10 minutos y luego se realizaron lavados con abundante agua destilada estéril por cinco ocasiones, cerca a un mechero para evitar contaminación.

Una vez desinfectados y lavados, los nódulos fueron macerados hasta quedar convertidos en una masa

viscosa, de la cual, inmediatamente se sembró en placas Petri conteniendo agar rojo congo manitol (RCM) y permanecieron en incubación por 5 días a 23 ± 2 °C (Steubing *et al.*, 2002). Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se hicieron reaslamientos de colonias puras.

Obtención del inóculo de *Glomus intraradices*

El inóculo de *G. intraradices* fue facilitado por el Dr. Fernando Borie, profesor de la Universidad de la Frontera. El inóculo fue obtenido mediante el método de plantas hospedantes (trampa) empleado por Sieverding (1991), que consiste en inocular al vegetal hospedante con esporas del hongo de interés, mientras la planta es mantenida en un sustrato estéril a base de suelo mas vermiculita en una proporción 3:1 (v:v), hasta que la planta llegue a su madurez. El inóculo experimental estuvo constituido a razón de 22 esporas por g de sustrato.

Preparación del sustrato para el cultivo de plántulas de *Trifolium pratense* L

Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii

Se emplearon macetas colectivas de poliestireno o styroblocs con dimensiones de 63,5 x 39,0 x 7,0 cm, en

cuyo interior poseían 135 celdas con una capacidad de 40,0 cm³ y un área de 13,69 cm² cada una, dentro de las cuales se depositó suelo estéril. Por cada tratamiento se emplearon 50 celdas. Las macetas fueron previamente desinfectadas con alcohol al 70 % empleando un atomizador. En cada celda se sembraron 3 semillas pregerminadas de *T. pratense*, lo que indica que se empleó una densidad de siembra de 22 plantas/m², a las previamente se inoculó con la bacteria, mediante una suspensión acuosa de 10⁸ células rizobianas/mL durante 24 horas.

Glomus intraradices

Similar al caso anterior, se emplearon macetas colectivas de poliestireno o styroblocs con dimensiones de 63,5 x 39,0 x 7,0 cm, en cuyo interior poseían 135 celdas con una capacidad de 40,0 cm³ y un área de 13,69 cm² cada una, dentro de las cuales se depositó suelo estéril. Por cada tratamiento se emplearon 50 celdas.

Las macetas fueron previamente desinfectadas con alcohol al 70 % empleando un atomizador. En cada una de las celdas se aplicó 0,3 g de inoculo (se disponía de poca cantidad) del hongo micorrízico, el mismo que tenía 7 esporas (equivalente a 22 esporas/g de sustrato) para luego cubrir con suelo. En cada celda, se sembraron

3 semillas pregerminadas de *T. pratense*, lo que indica que se empleó una densidad de siembra de 22 plantas/m².

Riego y fertilización mediante solución nutritiva

El riego y fertilización se realizó cada 48 horas. La solución nutritiva empleada en la investigación fue la Long Ashton (Plenchette y col., 1982; Ben y col., 2003; Jia y col., 2004), para aportar macro y micronutrientes, que fue modificada para cada uno de los tratamientos. Tanto para los macro y micronutrientes se preparó una solución stock (solución madre) 100x. De cada una de las soluciones stock se preparó 500 ml, estas se indican en las tablas 1, 2, 3 y 4

Tabla 1. Solución nutritiva Completa (A) 100x.

Materiales empleados como vehiculo para aportar Micronutrientes y	g L⁻¹
NaH ₂ PO ₄	20,800
MgSO ₄ 7H ₂ O	36,900
MnSO ₄ H ₂ O	0,2230
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,0240
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,0290
H ₃ BO ₃	0,1860
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ 4H ₂ O	0,0040
NaCl	0,5850
FeSO ₄ H ₂ O	0,5000
K ₂ SO ₄	21,750

Tabla 2. Solución nutritiva sin N (B) 100x.

Materiales empleados como vehiculo para aportar Micronutrientes y	g L⁻¹
NaH ₂ PO ₄	20,800
MgSO ₄ 7H ₂ O	36,900
MnSO ₄ H ₂ O	0,2230
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,0240
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,0290
H ₃ BO ₃	0,1860
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ 4H ₂ O	0,0040
NaCl	0,5850
FeSO ₄ H ₂ O	0,5000
K ₂ SO ₄	21,750

CaCl ₂	50,000
KNO ₃	6,5700
NO ₃ NH ₄	2,4000
EDTA	0,6700

Tabla 3. Solución nutritiva sin P (C) 100x.

Materiales como aporte de Micronutrientes y	empleados como vehiculo para g L⁻¹
MgSO ₄ 7H ₂ O	36,900
MnSO ₄ H ₂ O	0,2230
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,0240
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,0290
H ₃ BO ₃	0,1860
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ 4H ₂ O	0,0040
NaCl	0,5850
FeSO ₄ H ₂ O	0,5000
K ₂ SO ₄	21,750
CaCl ₂	50,000
KNO ₃	6,5700
NO ₃ NH ₄	2,4000
EDTA	0,6700

CaCl ₂	50,000
EDTA	0,6700

Tabla 4. Solución nutritiva sin N y P (D) 100x.

Materiales como aporte de Micronutrientes	empleados como vehiculo para g L⁻¹
MgSO ₄ 7H ₂ O	36,900
MnSO ₄ H ₂ O	0,2230
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,0240
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,0290
H ₃ BO ₃	0,1860
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ 4H ₂ O	0,0040
NaCl	0,5850
FeSO ₄ H ₂ O	0,5000
K ₂ SO ₄	21,750
CaCl ₂	50,000
EDTA	0,6700

De cada solución stock para macro y micronutrientes, se tomó 10 mL y completó con 990 mL de agua destilada estéril. En cada celda se aplicó 10 mL de la solución nutritiva diluida según correspondiera a los tratamientos. Aquellos que debían recibir adicionalmente P y N, estos elementos fueron agregados a las soluciones nutritivas correspondientes e igual que en los casos anteriores cada celda recibió 10 mL, lo cual equivalía a 0,067 mmol (2,08

ppm) de NaH_2PO_4 y 0,064 mmol (0,89 ppm) de KNO_3 mas NO_3NH_4 .

Las macetas colectivas de poliestireno conteniendo las plantas, se mantuvieron bajo condiciones ambientales controladas, dentro de una cámara de cultivo a temperatura de 23 ± 1 °C, humedad relativa del 65 %, con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, y una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (irradiación) de $550 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Almeida y col., 2000b; Castillo, 2005; Lohar y col., 2007), mediante lámparas incandescentes blanco frías (Irrazabal y col., 2004). La duración del fotoperiodo fue controlada mediante un sistema automático a través de un reloj sincronizado.

Tratamientos y Diseño Experimental

Como se indica en la tabla 5, la investigación estuvo formada de 8 tratamientos. Cada tratamiento constituido por 8 repeticiones y 18 plantas en cada repetición. La repetición consistió en el número de plantas que contenían 6 celdas. Considerando que las variables en estudio fueron evaluadas en dos tiempos, para cada tiempo de evaluación se emplearon 4 repeticiones. La densidad de plantas utilizada por unidad de superficie, está dentro de las recomendadas para trébol rosado en

praderas. Los tratamientos fueron distribuidos en un diseño completo al azar (DCA). El análisis estadístico se realizó con el programa estadístico SAS para Windows versión 8 y la separación de medias entre tratamientos se la hizo mediante la prueba de Tukey, testeando probabilidades menores al 0,05.

Tabla 5. Descripción de los tratamientos aplicados en la investigación.

Tratamientos	Descripción de los Tratamientos	Solución nutritiva
1	Suelo estéril (testigo).	H ₂ O
2	Suelo estéril + Solución nutritiva completa.	A
3	SE + <i>Rhizobium leguminosarum</i> + Solución nutritiva – N.	B
4	SE + <i>Rhizobium leguminosarum</i> + Solución nutritiva completa.	A
5	SE + <i>Glomus intraradices</i> + Solución nutritiva – P.	C
6	SE + <i>Glomus intraradices</i> + Solución nutritiva completa.	A
7	SE + <i>Rhizobium leguminosarum</i> + <i>Glomus intraradices</i> + Solución nutritiva – N y – P.	D
8	SE + <i>Rhizobium leguminosarum</i> + <i>Glomus intraradices</i> + Solución nutritiva completa.	A

Variables morfológicas en las plantas evaluadas.

Altura de las plantas: Se midió desde la base de la planta (cuello) hasta la última hoja visible del extremo superior, usando una regla milimetrada y se expresó en cm. Las mediciones se efectuaron a los 50 y 65 días después de la siembra.

Número de hojas: Se contaron desde el cuello hasta la última hoja del ápice. Las mediciones se efectuaron a los 50 y 65 días después de la siembra.

Peso seco y fresco de la parte aérea y raíces: A las plantas de cada tratamiento se les separó la parte aérea y radical, se registró su peso fresco (g), y luego fueron ingresadas a la estufa por 72 horas a 65 °C (Jia y col., 2004). Posteriormente, se procedió a registrar su peso seco (g) en una balanza de precisión. Las mediciones se efectuaron a los 50 y 65 días después de la siembra.

Longitud total de raíces por planta (RL). Es la longitud total del sistema radicular de las plantas, sumado todas las longitudes de cada raíz individual. Se expresa en m y la fórmula con la que se calculó, es la que a continuación se detalla (Jungk y Claassen, 1997). Las mediciones se efectuaron a los 50 y 65 días después de la siembra.

$$RL = \frac{\text{Peso fresco raíces por maceta}}{\text{Número de plantas por maceta}} \times RL_s$$

Donde → RL_s = Largo específico de la raíz.

Longitud de raíz por volumen de suelo (RL_v). Es el parámetro que estima la competición interradicular por nutrientes. Se expresa en cm cm^{-3} (Jungk y Claassen, 1997; Claassen y Steingrobe, 1999; Jungk, 2002). Las estimaciones se hicieron para los 50 y 65 días después de la siembra. A continuación se detalla la ecuación con la que se efectuó su cálculo.

$$RL_v = \frac{RL * N^{ro} \text{ plantas / pote}}{\text{Volumen de suelo}(\text{peso} \div \text{densidad de suelo})}$$

Distancia media entre raíces vecinas (r_1). Variable determinada por RL_v . Estima el volumen de suelo fuera del cual una raíz puede extraer nutrientes, asumiendo que las raíces están distribuidas regularmente en el suelo. Las estimaciones se hicieron para los 50 y 65 días después de la siembra. Se expresa en cm (Jungk & Claassen, 1997; Claassen & Steingrobe, 1999; Jungk, 2002) y se lo calculó con la siguiente ecuación:

$$r_1 = \frac{1}{\sqrt{RL_v \pi}}$$

Relación, sistema radicular – parte aérea (R/S). Es un parámetro básico para la adquisición de nutrientes por parte de las plantas, se expresa en cm mg^{-1} (Jungk & Claassen, 1997). Su estimación se hizo a los 50 y 65 días después de la siembra y se empleó la siguiente ecuación:

$$R/S = \frac{RL}{S} 1000$$

Donde \rightarrow S = Peso seco/planta

RL = Longitud total de raíces por planta

Tasa de crecimiento relativo de la parte aérea (RGR_s) y radicular (RGR_r). Son parámetros que estiman el crecimiento del sistema aéreo y radicular de una planta en relación con un tiempo, se expresa en $\text{mg g}^{-1} \text{s}^{-1}$ (Jungk & Claassen, 1997). Las estimaciones se realizaron al final de la última evaluación (65 días), dado que para su cálculo se necesita dos evaluaciones separadas en el tiempo. Las ecuaciones que se emplearon se muestran a continuación:

$$RGR_s = \ln(S_2 / S_1) / (t_2 - t_1)$$

$$RGR_R = \ln(RL_2 / RL_1) / (t_2 - t_1)$$

Donde \rightarrow \ln = Logaritmo natural.

S_1 y S_2 = Peso seco por planta, primera y segunda cosecha.

$(t_2 - t_1)$ = Tiempo entre primera y segunda cosecha en segundos.

86400 = Número de segundos por día.

Relación, longitud del sistema radicular por unidad de tasa de crecimiento de la parte aérea (RL/GR). Es la relación que existe entre la longitud total de raíces por planta y la tasa de crecimiento de la parte aérea por planta, se expresa en $\text{cm g}^{-1} \text{s}^{-1}$ (Jungk & Claassen, 1997). Las estimaciones se realizaron al final de la última evaluación (65 días), dado que para su cálculo se necesita dos evaluaciones separadas en el tiempo. Se calculó en base a la siguiente ecuación:

$$RL / GR = ((RL_2 - RL_1) / (S_2 - S_1)) \cdot ((t_2 - t_1) / \ln(RL_2 / RL_1))$$

Donde \rightarrow \ln = Logaritmo natural.

S_1 y S_2 = Peso seco por planta, primera y segunda cosecha.

RL_1 y RL_2 = Longitud de raíz por planta, primera y segunda cosecha.

$(t_2 - t_1)$ = Tiempo entre primera y segunda cosecha en segundos.

86400 = Número de segundos por día.

Número de nódulos por planta: Consistió en contar el número de nódulos presentes en las raíces de cada planta. Las mediciones se efectuaron a los 50 y 65 días después de la siembra.

Colonización micorrízica (CM): Para calcular la frecuencia e intensidad de la colonización por HMA y observar las estructuras internas del hongo ubicadas dentro de la raíz como, arbusculos, vesículas, micelio y de ser posible esporas, se empleó el método descrito por Steubing y col., (2002).

Para determinar la presencia o ausencia de micorrización, se realizaron montajes en portaobjetos y observación en microscopio, previa decoloración y posterior tinción de las raíces. Por cada tratamiento se hicieron cuatro repeticiones, constituidas por cinco secciones de raíces cada una. La determinación de la frecuencia e intensidad de la micorrización, se lo hizo indicando el valor de la clase correspondiente a la micorrización. Las mediciones se efectuaron a los 50 y 65 días después de la siembra.

Variables químicas en las plantas evaluadas.

Análisis foliares y radiculares: Se analizó el contenido de P absorbido a través del método de calcinación y determinación por colorimetría, mientras que para el N el método aplicado fue por digestión y determinación por destilación y titulación manual (Sadzawka y col., 2004). Los análisis se efectuaron en los materiales colectados a los 50 y 65 días después de la siembra. Una vez obtenidos los análisis foliares se calculó el contenido de P y N absorbido por planta (U_P) (U_N) en mg mediante las siguientes ecuaciones:

$$U_P \text{ (mg/planta)} = (S \times \%P/100) \times 1000 \quad \text{Donde } \rightarrow S = \text{Peso seco/planta}$$

$$U_N \text{ (mg/planta)} = (S \times \%N/100) \times 1000$$

Influjo (I_n) o tasa de absorción por unidad de raíz para P y

N. El influjo es la cantidad de nutriente que una determinada longitud de raíz absorbe por unidad de tiempo, se expresa de la siguiente manera: $\text{mol cm}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Jungk y Claassen, 1997; Claassen y Steingrobe, 1999; Jungk, 2002). Las estimaciones se realizaron al final de la última evaluación (65 días), dado que para su cálculo se necesita dos evaluaciones separadas en el tiempo. Para

calcularlo se empleó la fórmula que se detalla a continuación.

$$I_n (10^{-14} \text{ mol cm}^{-1} \text{ s}^{-1}) = ((U_2 - U_1) / (RL_2 - RL_1)) * (\ln(RL_2 - RL_1) / (t_2 - t_1)) * 10^{14}$$

Sin embargo, la longitud radicular es posible de convertir a superficie de raíz y ser expresada así: $10^{-14} \text{ mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Jungk & Claassen, 1997). La fórmula empleada para en el cálculo fue:

$$I_n (10^{-14} \text{ mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}) = ((U_2 - U_1) / (RL_2 - RL_1)) * (\ln(RL_2 - RL_1) / (t_2 - t_1)) * ((10^{14} / (2\pi * r_0)))$$

Donde

Ln = Logaritmo natural.

U_1 y U_2 = Contenido del nutriente por planta (mol/planta) en primera y segunda cosecha.

RL_1 y RL_2 = Longitud de raíz por planta, primera y segunda cosecha.

$(t_2 - t_1)$ = Tiempo entre primera y segunda cosecha en segundos.

r_0 = Radio de la raíz

86400 = Número de segundos por día.

Altura de planta

En la Figura 1, se muestra los resultados obtenidos en *Trifolium pratense* a los 50 y 65 días después de la siembra, respecto a la variable altura en cada uno de los ocho tratamientos estudiados. En los dos tiempos se detectaron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos. A los 50 días, el tratamiento solución nutritiva completa (SNC) mostró la mayor altura por planta con 6,35 cm, mientras que el tratamiento agua destilada estéril (H₂O) fue el que presentó la menor altura por planta, con apenas 2,67 cm. La tendencia se mantuvo a los 65 días, donde el tratamiento SNC fue estadísticamente superior a los demás, con 8,48 cm de altura por planta, mientras que aquellos con menor altura fueron los tratamientos *Rhizobium leguminosarum*, mas *Glomus intraradices*, mas solución nutritiva, sin nitrógeno, y sin fósforo (RI+Gi+SN-N-P); agua destilada estéril (H₂O) y *Glomus intraradices*, mas solución nutritiva, sin fósforo (Gi+SN-P) con 3,55; 3,13 y 2,80 cm respectivamente y que estadísticamente fueron similares.

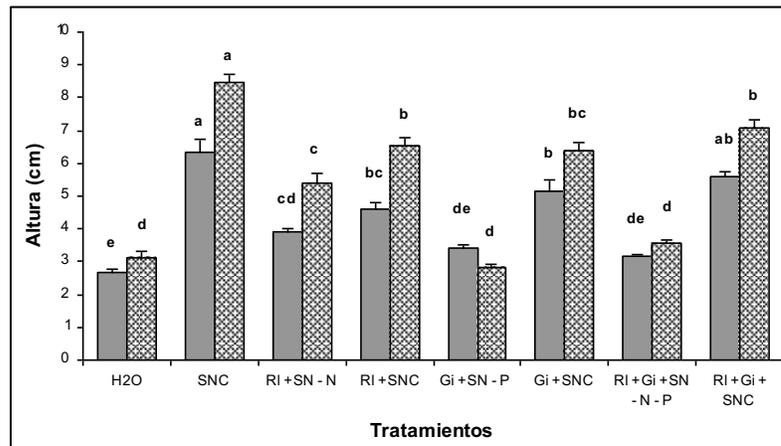


Figura 1. Altura de plantas de *Trifolium pratense* bajo ocho tratamientos nutricionales a los 50 y 65 días después de la siembra: (H₂O) agua destilada estéril, (SNC) solución nutritiva completa, (RI+SN-N) *R. leguminosarum* más solución nutritiva sin nitrógeno, (RI+SNC) *R. leguminosarum* más solución nutritiva completa, (Gi+SN-P) *G. intraradices* más solución nutritiva sin fósforo, (Gi+SNC) *G. intraradices* más solución nutritiva completa, (RI+Gi+SN-N-P) *R. leguminosarum* más *G. intraradices* más solución nutritiva sin nitrógeno y sin fósforo, (RI+Gi+SNC) *R. leguminosarum* más *G. intraradices* más solución nutritiva completa. Los valores representan la media de cuatro repeticiones, con barras de error estándar. Medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias estadísticas significativas ($P < 0,05$).

Número de hojas por planta

La Figura 2, permite observar los valores para cada uno de los tratamientos a los 50 y 65 días después de la siembra. En ambos casos se obtuvieron diferencias estadísticas significativas. En los dos tiempos, los tratamientos superiores fueron: *Rhizobium leguminosarum*, mas *Glomus intraradices*, mas solución nutritiva completa (RI+Gi+SNC) y solución nutritiva completa (SNC) con 3,81 y 3,65 hojas por planta (50 días) y 4,40 y 4,15 hojas por

planta (65 días) respectivamente, diferenciándose estadísticamente de los demás tratamientos. Por otro lado, los tratamientos que mostraron el menor número de hojas por planta fueron H₂O, y *Glomus intraradices*, más solución nutritiva, sin fósforo (Gi+SN-P) con 2,56 y 2,79 (50 días) y 3,02 y 2,81 (65 días), respectivamente.

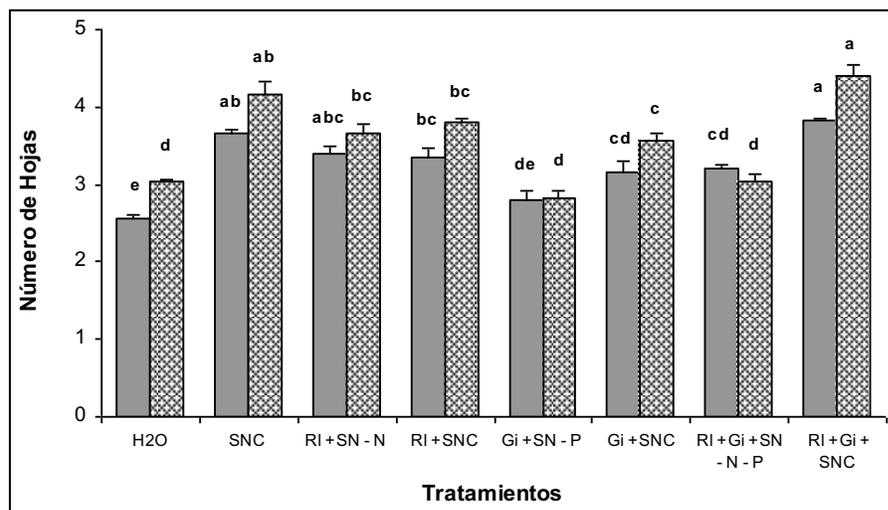


Figura 2. Número de hojas por planta de *Trifolium pratense* bajo ocho tratamientos nutricionales, evaluados a los 50 y 65 días después de la siembra: (H₂O) agua destilada estéril, (SNC) solución nutritiva completa, (RI+SN-N) *R. leguminosarum* más solución nutritiva sin nitrógeno, (RI+SNC) *R. leguminosarum* más solución nutritiva completa, (Gi+SN-P) *G. intraradices* más solución nutritiva sin fósforo, (Gi+SNC) *G. intraradices* más solución nutritiva completa, (RI+Gi+SN-N-P) *R. leguminosarum* más *G. intraradices* más solución nutritiva sin nitrógeno y sin fósforo, (RI+Gi+SNC) *R. leguminosarum* más *G. intraradices* más solución nutritiva completa. Los valores representan la media de cuatro repeticiones, con barras de error estándar. Medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias estadísticas significativas ($P < 0,05$).

Peso fresco del sistema aéreo (hojas más tallos)

En cuanto al peso fresco del follaje, se encontraron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos, tanto a los 50 como a los 65 días después de la siembra. A los 50 días, los tratamientos superiores fueron SNC; RI+Gi+SNC; y Gi+SNC con 0,093; 0,081; y 0,079 g por planta respectivamente, siendo similares estadísticamente entre si, pero diferentes respecto a los demás tratamientos. No obstante, los tratamientos que mostraron menor peso por planta fueron H₂O y Gi+SN-P con 0,018 y 0,033 g/planta, correspondientemente. Mientras que a los 65 días, los tratamientos SNC y Gi+SNC presentaron los mayores pesos con 0,198 y 0,182 g/planta siendo estadísticamente iguales, y diferentes frente a los demás tratamientos. Además, los tratamiento H₂O y Gi+SN-P siguieron siendo los que mostraban los menores valores, con 0,021 y 0,033 g/planta respectivamente, siendo estadísticamente equivalentes (Figura 3).

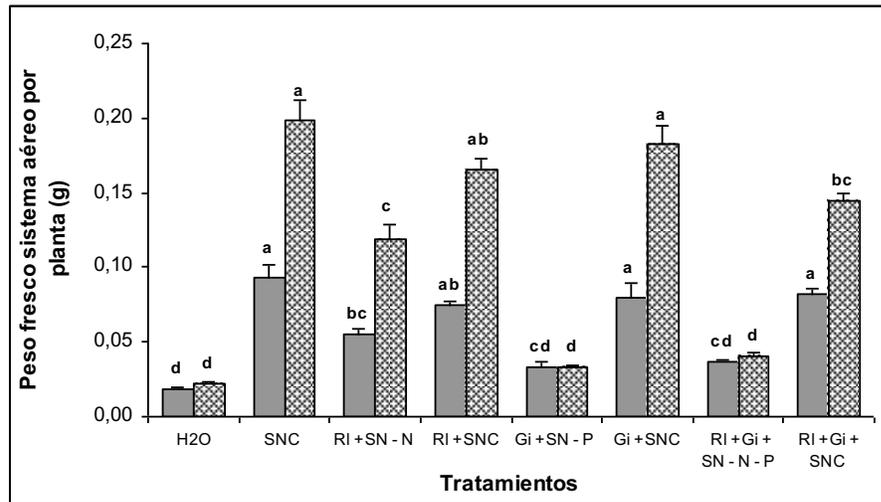


Figura 3. Peso fresco del sistema aéreo por planta de *T. pratense* bajo ocho tratamientos a los 50 y 65 días después de la siembra: (H₂O) agua destilada estéril, (SNC) solución nutritiva completa, (RI+SN-N) *R. leguminosarum* más solución nutritiva sin nitrógeno, (RI+SNC) *R. leguminosarum* más solución nutritiva completa, (Gi+SN-P) *G. intraradices* más solución nutritiva sin fósforo, (Gi+SNC) *G. intraradices* más solución nutritiva completa, (RI+Gi+SN-N-P) *R. leguminosarum* más *G. intraradices* más solución nutritiva sin nitrógeno y sin fósforo, (RI+Gi+SNC) *R. leguminosarum* más *G. intraradices* más solución nutritiva completa. Los valores representan la media de cuatro repeticiones, con barras de error estándar. Medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias estadísticas significativas ($P < 0,05$).

Peso fresco del sistema radicular

En la Figura 4 se presentan los resultados obtenidos en *Trifolium pratense* a los 50 y 65 días después de la siembra, respecto a la variable peso fresco del sistema radicular, en ocho tratamientos estudiados. En los dos tiempos se detectaron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos. Tanto a los 50 y 65 días, los tratamientos SNC y Gi+SNC presentaron los pesos mas altos con 0,0586 y

0,0390 g/planta (50 días), y 0,09815 y 0,09810 g/planta (65 días) respectivamente, siendo superiores y diferenciándose estadísticamente respecto a los demás tratamientos. Por otro lado, los tratamientos que presentaron los menores pesos a los 50 días fueron RI+Gi+SN-N-P; RI+SN-N; Gi+SN-P; y H₂O, con 0,0169; 0,0188; 0,0212; y 0,0274 g/planta respectivamente, siendo estadísticamente similares entre sí. Sin embargo, a los 65 días los tratamientos RI+Gi+SN-N-P; Gi+SN-P; y H₂O mostraron los menores pesos, siendo estadísticamente similares, con 0,0251; 0,0293; y 0,0379 g/planta, pero estadísticamente diferentes frente a los demás tratamientos.

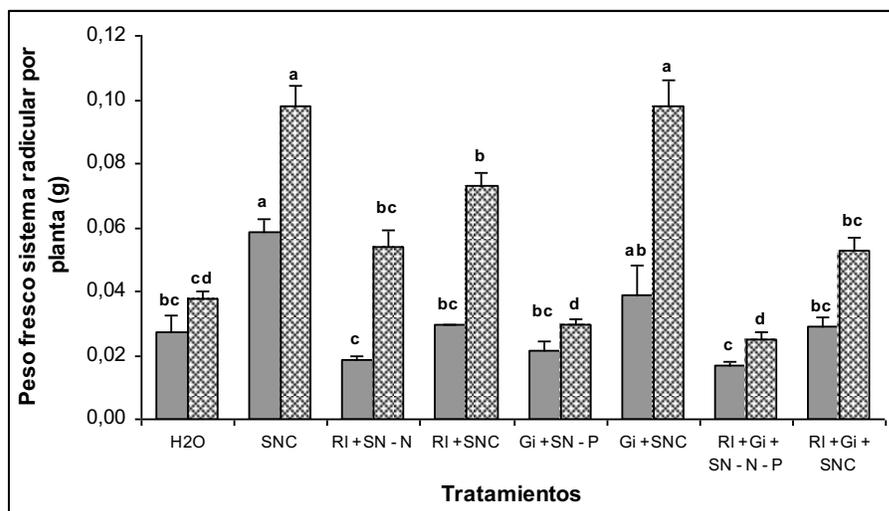


Figura 4. Peso fresco del sistema radicular por planta de *Trifolium pratense* bajo ocho tratamientos a los 50 y 65 días después de la siembra: (H₂O) agua destilada estéril, (SNC) solución nutritiva completa, (RI+SN-N) *R. leguminosarum* más solución nutritiva sin nitrógeno, (RI+SNC) *R. leguminosarum* más solución nutritiva completa, (Gi+SN-P) *G. intraradices* más solución nutritiva sin fósforo, (Gi+SNC) *G. intraradices* más solución nutritiva completa, (RI+Gi+SN-N-P) *R. leguminosarum* más *G. intraradices* más solución nutritiva sin

nitrógeno y sin fósforo, (RI+Gi+SNC) *R. leguminosarum* más *G. intraradices* más solución nutritiva completa. Los valores representan la media de cuatro repeticiones, con barras de error estándar. Medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias estadísticas significativas ($P < 0,05$).

Peso seco del sistema aéreo (hojas más tallos)

Se encontraron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos, tanto a los 50 como a los 65 días después de la siembra. En ambos tiempos se encontró una tendencia de respuesta de tratamientos hacia la variable. Los tratamientos SNC y Gi+SNC fueron superiores, estadísticamente similares y difirieron frente a los demás tratamientos en ambos tiempos, con 0,0123 y 0,0110 g/planta (50 días), y 0,0291 y 0,0267 g/planta (65 días), correspondientemente. Por otro lado, los menores pesos los mostraron los tratamientos H₂O; RI+Gi+SN-N-P; y Gi+SN-P en ambos tiempos, con 0,0037; 0,0055; y 0,0064 g/planta (50 días), y 0,0049; 0,0078; y 0,0083 g/planta (65 días), respectivamente, reflejando una similitud estadística entre ellos y difiriendo estadísticamente frente a los demás tratamientos (Figura 5).

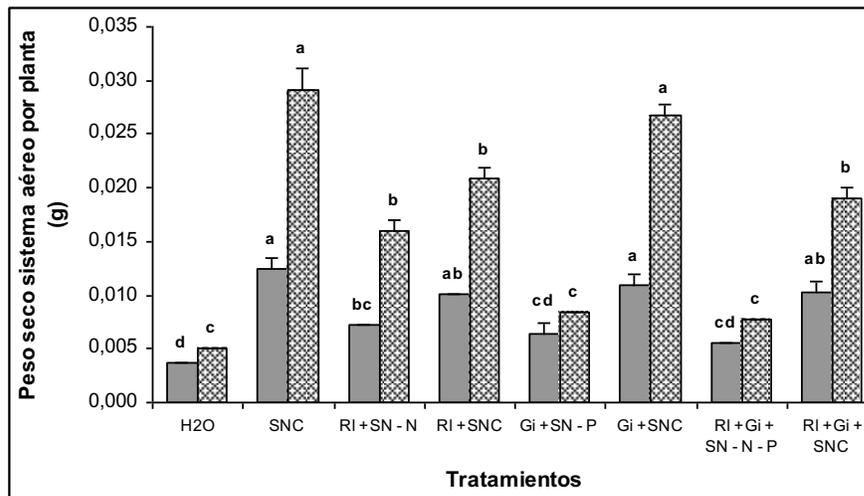


Figura 5. Peso seco del sistema aéreo por planta de *Trifolium pratense* bajo ocho tratamientos a los 50 y 65 días después de la siembra: (H₂O) agua destilada estéril, (SNC) solución nutritiva completa, (RI+SN-N) *R. leguminosarum* más solución nutritiva sin nitrógeno, (RI+SNC) *R. leguminosarum* más solución nutritiva completa, (Gi+SN-P) *G. intraradices* más solución nutritiva sin fósforo, (Gi+SNC) *G. intraradices* más solución nutritiva completa, (RI+Gi+SN-N-P) *R. leguminosarum* más *G. intraradices* más solución nutritiva sin nitrógeno y sin fósforo, (RI+Gi+SNC) *R. leguminosarum* más *G. intraradices* más solución nutritiva completa. Los valores representan la media de cuatro repeticiones, con barras de error estándar. Medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias estadísticas significativas ($P < 0,05$).

Peso seco del sistema radicular

En la Figura 6 se muestra los resultados obtenidos a los 50 y 65 días después de la siembra, respecto a la variable peso seco del sistema radicular en ocho tratamientos estudiados. En los dos tiempos se detectaron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos. Tanto a los 50 y 65 días, los tratamientos SNC y Gi+SNC mostraron los mejores pesos con 0,0077 y 0,0065 g/planta (50 días), y

0,0148 y 0,0143 g/planta (65 días) respectivamente, siendo superiores estadísticamente frente a los demás tratamientos. Por otro lado, el tratamiento que mostró el menor peso fue RI+Gi+SN-N-P en ambos tiempos, con 0,0029 g/planta (50 días) y 0,0038 g/planta (65 días), siendo estadísticamente diferente a los demás tratamientos.

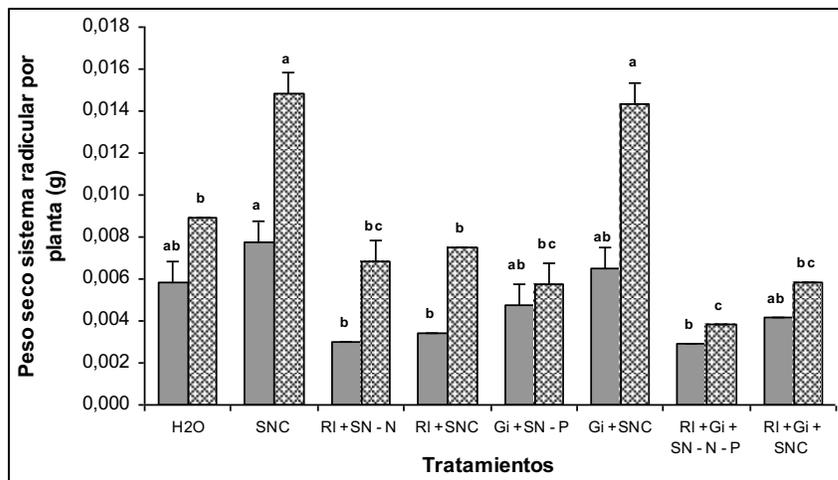


Figura 6. Peso seco del sistema radicular por planta de *Trifolium pratense* bajo ocho tratamientos a los 50 y 65 días después de la siembra: (H₂O) agua destilada estéril, (SNC) solución nutritiva completa, (RI+SN-N) *R. leguminosarum* más solución nutritiva sin nitrógeno, (RI+SNC) *R. leguminosarum* más solución nutritiva completa, (Gi+SN-P) *G. intraradices* más solución nutritiva sin fósforo, (Gi+SNC) *G. intraradices* más solución nutritiva completa, (RI+Gi+SN-N-P) *R. leguminosarum* más *G. intraradices* más solución nutritiva sin nitrógeno y sin fósforo, (RI+Gi+SNC) *R. leguminosarum* más *G. intraradices* más solución nutritiva completa. Los valores representan la media de cuatro repeticiones, con barras de error estándar. Medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias estadísticas significativas ($P < 0,05$).

Estimación de: largo total de raíz por planta (RL), densidad radicular (RLv), distancia media entre raíces (r1), y relación raíz / parte aérea (R/S).

A los 50 días después de la siembra. En lo referente a las variables RL, RLv, r1, y R/S, en la Tabla 6 se muestran los valores calculados. Para todas las variables se detectaron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos. En caso de RL y RLv, el tratamiento que presentó el valor más alto fue SNC, seguido de H₂O, mientras que el valor más bajo lo mostró el tratamiento RI+Gi+SN-N-P.

Por otro lado, para r1, los tratamientos que presentaron la mayor distancia entre raíces fueron RI+SN-N (0,4297 cm) seguido de aquellos que carecían de fósforo, RI+Gi+SN-N-P (0,4295 cm), y Gi+SN-P (0,3933 cm), mientras que el tratamiento SNC mostró la menor distancia entre raíces vecinas (0,3016), diferenciándose estadísticamente de los dos primeros.

En cuanto a la relación raíz / parte aérea (R/S), el tratamiento H₂O se diferenció estadísticamente de los demás tratamientos, siendo el que presentó el mayor valor (15,97 cm mg⁻¹), lo cual indica una diferencia más amplia y desigual en la relación sistema radicular vs. sistema foliar. No obstante, el tratamiento RI+SNC mostró la relación mas estrecha (4,61 cm mg⁻¹), sin embargo, no

se diferenció estadísticamente de los demás tratamientos, a excepción de SNC.

Tabla 6. Valores de: Largo total de raíz por planta (RL), densidad radicular (RLv), distancia media entre raíces (r1) y relación raíz / parte aérea (R/S) bajo ocho tratamientos nutricionales, evaluados a los 50 días después de la siembra.

Tratamientos	RL (cm)	RLv (cm cm ⁻³)	r1 (cm)	R/S (cm/mg ⁻¹)
H ₂ O	56,693 ab	2,976 ab	0,336 ab	15,975 a
SNC	72,260 a	3,793 a	0,301 b	5,900 b
RI+SN-N	36,124 b	2,896 b	0,429 a	4,974 b
RI+SNC	46,676 ab	2,450 ab	0,376 ab	4,615 b
Gi+SN-P	44,973 ab	2,361 ab	0,393 ab	7,083 b
Gi+SNC	52,162 ab	2,738 ab	0,364 ab	4,669 b
RI+Gi+SN-N-	34,997 b	1,837 b	0,429 a	6,250 b
RI+Gi+SNC	53,693 ab	2,818 ab	0,353 ab	5,171 b
CV	23,95	23,95	11,66	24,81

Donde: (H₂O) agua destilada estéril, (SNC) solución nutritiva completa, (RI+SN-N) *Rhizobium leguminosarum* más solución nutritiva sin nitrógeno, (RI+SNC) *Rhizobium leguminosarum* más solución nutritiva completa, (Gi+SN-P) *Glomus intraradices* más solución nutritiva sin fósforo, (Gi+SNC) *Glomus intraradices* más solución nutritiva completa, (RI+Gi+SN-N-P) *Rhizobium leguminosarum* más *Glomus intraradices* más solución nutritiva sin nitrógeno y sin fósforo, (RI+Gi+SNC) *Rhizobium leguminosarum* más *Glomus intraradices* más solución nutritiva completa. Los valores representan la media de cuatro repeticiones, con barras de error estándar. Medias seguidas por la misma

letra no presentan diferencias estadísticas significativas ($P < 0,05$).

A los 65 días después de la siembra. En la Tabla 7, se muestran los valores calculados para las variables: RL, RLv, r1, y R/S. Se detectaron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos para todas las variables. En el caso de RL y RLv, los tratamientos que presentaron los valores mas altos fueron SNC (160,63 cm y 8,43 cm cm⁻³) y Gi+SNC (152,97 cm y 8,03 cm cm⁻³), diferenciándose estadísticamente de los demás tratamientos, mientras que los valores mas bajos lo mostraron los tratamientos carentes de fósforo: RI+Gi+SN-N-P (60,31 cm y 3,16 cm cm⁻³); H₂O (62,75 cm y 3,29 cm cm⁻³); y Gi+SN-P (64,66 cm y 3,39 cm cm⁻³).

En el caso de la variable r1, los tratamientos que presentaron los valores mas altos de distancia entre raíces fueron aquellos privados de fósforo y estadísticamente diferentes a los demás tratamientos: RI+Gi+SN-N-P (0,329 cm), Gi+SN-P (0,319), y H₂O (0,317) ordenadamente. Mientras que las menores distancias entre raíces vecinas las expresaron los tratamientos RI+SNC; Gi+SNC; SNC, respectivamente.

Respecto a la relación raíz parte aérea (R/S), el tratamiento H₂O se diferenció estadísticamente de los

demás tratamientos, exhibiendo el mayor valor, lo cual indica, una diferencia más amplia y desigual en la relación sistema radicular vs. sistema foliar, situación similar a lo ocurrido a los 50 días después de la siembra. Por otro lado, el tratamiento RI+Gi+SNC mostró la relación más estrecha. Sin embargo, a excepción de SNC no se diferenciaron estadísticamente de los demás tratamientos.

Tabla 7. Valores de: Largo total de raíz por planta (RL), densidad radicular (RLv), distancia media entre raíces (r1) y relación raíz / parte aérea (R/S) bajo ocho tratamientos nutricionales, evaluados a los 65 días después de la siembra.

Tratamientos	RL (cm)	RLv (cm)	r1 (cm)	R/S (cm/mg)
H ₂ O	62,75 c	3,294 c	0,317 a	12,881 a
SNC	160,63 a	8,433 a	0,200 c	5,582 b
RI+SN-N	91,34 bc	4,795 bc	0,268 b	5,724 b
RI+SNC	123,79 ab	6,499 ab	0,228 bc	5,932 b
Gi+SN-P	64,66 c	3,394 c	0,319 a	7,765 b
Gi+SNC	152,97 a	8,030 a	0,215 c	5,631 b
RI+Gi+SN-N-	60,31 c	3,166 c	0,329 a	7,793 b
RI+Gi+SNC	104,57 bc	5,489 bc	0,246 bc	5,517 b
CV	18,70	18,70	7,96	16,67

Donde: (H₂O) agua destilada estéril, (SNC) solución nutritiva completa, (RI+SN-N) *Rhizobium leguminosarum* más solución nutritiva sin nitrógeno, (RI+SNC) *Rhizobium leguminosarum* más solución nutritiva completa, (Gi+SN-P) *Glomus intraradices* más solución nutritiva sin fósforo, (Gi+SNC) *Glomus intraradices* más solución nutritiva completa, (RI+Gi+SN-N-P) *Rhizobium leguminosarum* más *Glomus intraradices* más solución nutritiva sin nitrógeno y sin fósforo, (RI+Gi+SNC) *Rhizobium leguminosarum* más *Glomus intraradices* más solución nutritiva completa.. Los valores representan la media de cuatro repeticiones, con barras de error estándar. Medias seguidas por la misma

letra no presentan diferencias estadísticas significativas ($P < 0,05$).

3.1.8. Estimación de: tasa de crecimiento relativo de la parte aérea (RGRs), y radicular (RGRr), largo de raíz por unidad de tasa de crecimiento de la parte aérea (RL/RG).

En la Figura 7, se observa los valores de: tasa de crecimiento relativo de la parte aérea (RGRs) y radicular (RGRr). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas para las dos variables.

Respecto a la variable RGRs, los tratamientos SNC; Gi+SNC; y RI+SN-N revelaron los valores mas altos con $0,650 \times 10^{-6} \text{ mg g}^{-1} \text{ s}^{-1}$; $0,606 \times 10^{-6} \text{ mg g}^{-1} \text{ s}^{-1}$; $0,605 \times 10^{-6} \text{ mg g}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectivamente. Estos se diferenciaron estadísticamente de los tratamientos RI+Gi+SN-N-P; H₂O; y Gi+SN-P que exhibieron los menores valores $0,254 \times 10^{-6} \text{ mg g}^{-1} \text{ s}^{-1}$; $0,233 \times 10^{-6} \text{ mg g}^{-1} \text{ s}^{-1}$; $0,213 \times 10^{-6} \text{ mg g}^{-1} \text{ s}^{-1}$, correspondientemente.

Para RGRr, todos los tratamientos que contenían fósforo: RI+SNC; Gi+SNC; RI+SN-N; SNC; y RI+Gi+SNC, con $0,749 \times 10^{-6} \text{ mg g}^{-1} \text{ s}^{-1}$; $0,725 \times 10^{-6} \text{ mg g}^{-1} \text{ s}^{-1}$; $0,724 \times 10^{-6} \text{ mg g}^{-1} \text{ s}^{-1}$; $0,615 \times 10^{-6} \text{ mg g}^{-1} \text{ s}^{-1}$; y $0,541 \times 10^{-6} \text{ mg g}^{-1} \text{ s}^{-1}$ respectivamente, fueron superiores a aquellos que lo carecían y se diferenciaron estadísticamente de los

demás tratamientos: RI+Gi+SN-N-P; Gi+SN-P; y H₂O, con $0,414 \times 10^{-6} \text{ mg g}^{-1} \text{ s}^{-1}$; $0,309 \times 10^{-6} \text{ mg g}^{-1} \text{ s}^{-1}$; y $0,084 \times 10^{-6} \text{ mg g}^{-1} \text{ s}^{-1}$ correspondientemente.

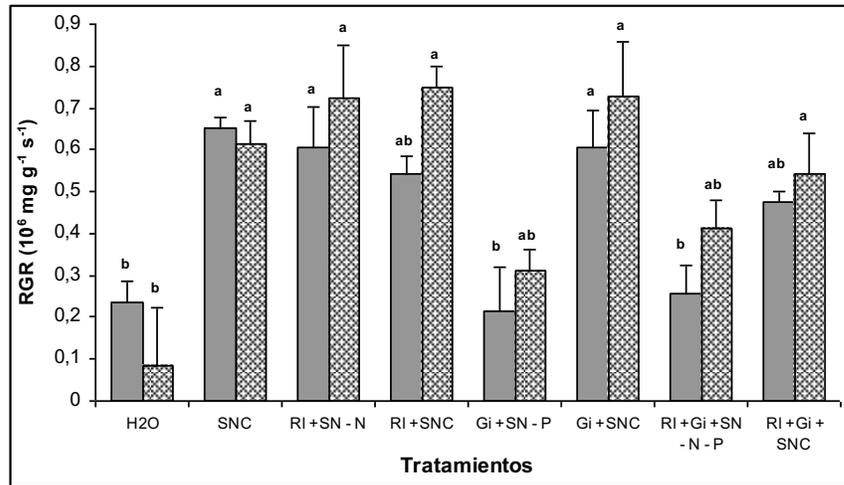


Figura 7. Tasa de crecimiento relativo de la parte aérea (RGRs) y radicular (RGRr) para plantas de *Trifolium pratense* bajo ocho tratamientos nutricionales: (H₂O) agua destilada estéril, (SNC) solución nutritiva completa, (RI+SN-N) *R. leguminosarum* más solución nutritiva sin nitrógeno, (RI+SNC) *R. leguminosarum* más solución nutritiva completa, (Gi+SN-P) *G. intraradices* más solución nutritiva sin fósforo, (Gi+SNC) *G. intraradices* más solución nutritiva completa, (RI+Gi+SN-N-P) *R. leguminosarum* más *G. intraradices* más solución nutritiva sin nitrógeno y sin fósforo, (RI+Gi+SNC) *R. leguminosarum* más *G. intraradices* más solución nutritiva completa. Los valores representan la media de cuatro repeticiones, con barras de error estándar. Medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias estadísticas significativas ($P < 0,05$).

Por otro lado, para la variable: largo de raíz por unidad de tasa de crecimiento de la parte aérea (RL/RG) no se encontraron diferencias estadísticas significativas, sin embargo, los valores numéricos más altos los mostraron los tratamientos privados de fósforo: H₂O; Gi+SN-P; y

RI+Gi+SN-N-P, con $9,51 \times 10^{10} \text{ cm g s}^{-1}$; $7,49 \times 10^{10} \text{ cm g s}^{-1}$; $5,16 \times 10^{10} \text{ cm g s}^{-1}$, y el menor valor lo exhibió el tratamiento RI+Gi+SNC con $0,88 \times 10^{10} \text{ cm g s}^{-1}$ (Figura 8).

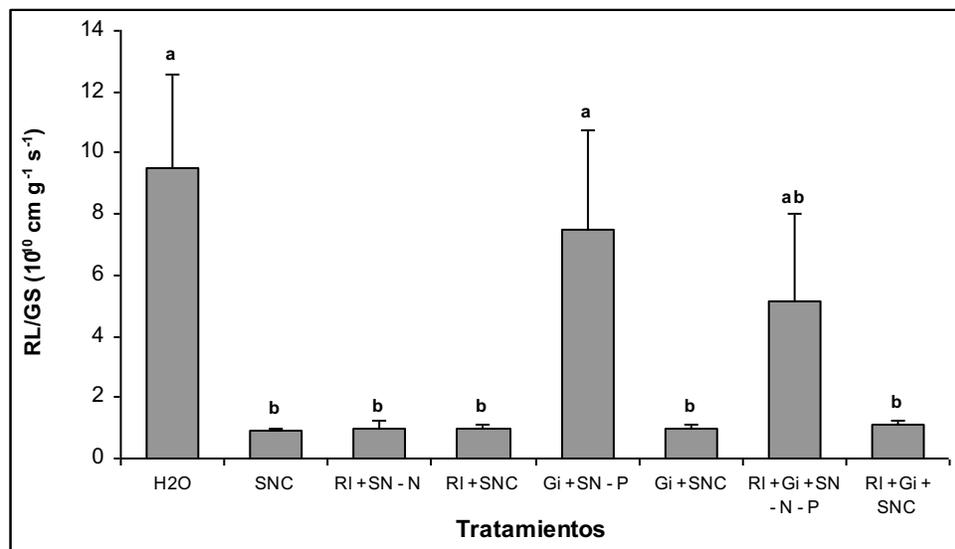


Figura 8. Largo de raíz por unidad de tasa de crecimiento de la parte aérea (RL/GS) por planta de *Trifolium pratense* bajo ocho tratamientos nutricionales: (H₂O) agua destilada estéril, (SNC) solución nutritiva completa, (RI+SN-N) *R. leguminosarum* más solución nutritiva sin nitrógeno, (RI+SNC) *R. leguminosarum* más solución nutritiva completa, (Gi+SN-P) *G. intraradices* más solución nutritiva sin fósforo, (Gi+SNC) *G. intraradices* más solución nutritiva completa, (RI+Gi+SN-N-P) *R. leguminosarum* más *G. intraradices* más solución nutritiva sin nitrógeno y sin fósforo, (RI+Gi+SNC) *R. leguminosarum* más *G. intraradices* más solución nutritiva completa. Los valores representan la media de cuatro repeticiones, con barras de error estándar. Medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias estadísticas significativas ($P < 0,05$).

Número de nódulos por planta

Los tratamientos inoculados con *Rhizobium leguminosarum* mostraron diferencias estadísticas significativas a los 50 y 65 días después de la siembra. A

los 50 días, se observó un bajo número de nódulos en todos los tratamientos, estos valores fluctuaron entre 3 y 5 nódulos. Sin embargo, a los 65 días, el número de nódulos aumentó, llegando a duplicarse e incluso triplicarse. El mayor número de nódulos por planta lo presentó el tratamiento RI+Gi+SNC con 12 nódulos, seguido de los tratamientos RI+SNC (10 nódulos) y RI+SN-N (9 nódulos). No obstante, el tratamiento RI+Gi+SN-N-P fue el que tubo el menor desempeño con solo 5 nódulos (Figura 9).

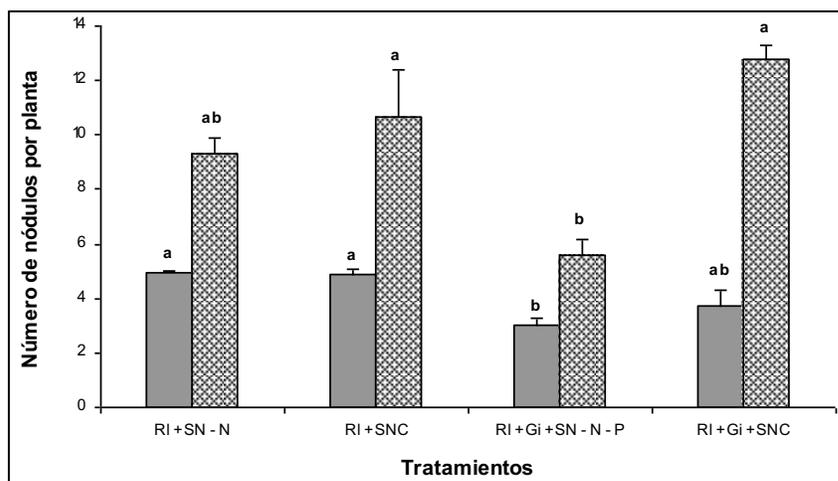


Figura 9. Número de nódulos por planta de *Trifolium pratense* bajo cuatro tratamientos nutricionales: (RI+SN-N) *R. leguminosarum* más solución nutritiva sin nitrógeno, (RI+SNC) *R. leguminosarum* más solución nutritiva completa, (RI+Gi+SN-N-P) *R. leguminosarum* más *G. intraradices* más solución nutritiva sin nitrógeno y sin fósforo, (RI+Gi+SNC) *R. leguminosarum* más *G. intraradices* más solución nutritiva completa. Los valores representan la media de cuatro repeticiones, con barras de error estándar. Medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias estadísticas significativas ($P < 0,05$).

Colonización micorrízica

Al analizar las raíces de las plantas de *Trifolium pratense* durante los dos tiempos propuestos en la investigación, se observó casi una nula micorrización, ya que una vez analizadas las raíces correspondientes a cada tratamiento, no se detectaron en ellas vestigios de algún componente micorrízico, como micelio, arbusculos, vesículas o esporas. Únicamente y de forma excepcional, en una única raíz perteneciente al tratamiento Gi+SNC se observó pequeñas secciones de micelio cenocítico extraradical a los 65 días, al cual estaba adherida una espora, que exhibía la morfología típica de *G. intraradices* (ver Figura 10).

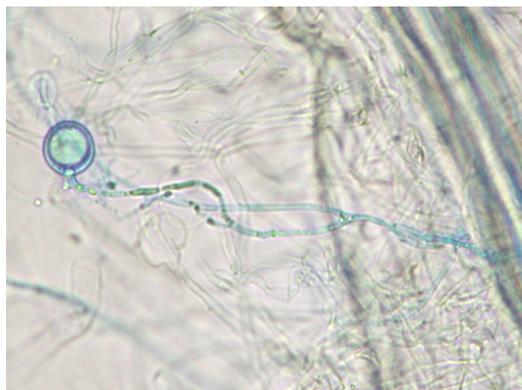


Figura 10. Micelio cenocítico y una espora de *Glomus intraradices* presente en raíz de *Trifolium pratense* perteneciente al tratamiento Gi+SNC (*G. intraradices* mas solución nutritiva completa) a los 65 días después de la siembra.

Contenido de Fósforo y Nitrógeno absorbido por planta.

Fósforo

En la Figura 11, se observa el contenido de P absorbido por planta (mg), encontrado a los 50 y 65 días después de la siembra. Los resultados mostrados para los dos tiempos, corresponden a una única medición, debido a que el peso seco de las plantas fue muy ínfimo. Bajo estas circunstancias se mezcló las plantas de todas las repeticiones, formándose una única muestra (sin replicas). En los dos tiempos (50 y 65 días), los tratamientos a los que se les añadió 0,067 mmol de P, fueron los que mostraron el mayor contenido de P absorbido por planta, llegando a duplicarse e incluso triplicarse el contenido: SNC (0,025mg – 0,046 mg), RI+SN-N (0,011 mg – 0,037 mg), RI+SNC (0,014 mg – 0,055 mg), Gi+SNC (0,020 mg – 0,047 mg) y RI+Gi+SNC (0,013 mg – 0,040 mg) entre los 50 y 65 días. Por otro lado, los tratamientos que carecían de aplicaciones de P y únicamente contaban con el escaso P disponible del suelo (2,2 ppm) revelaron los mas bajos valores, mostrando una uniformidad entre los contenidos de los dos tiempos (50 y 65 días) correspondientemente.

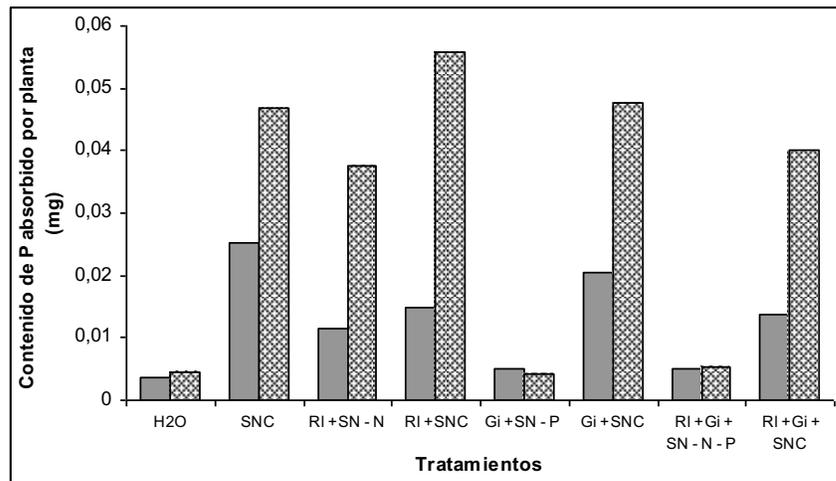


Figura 11. Contenido de fósforo (mg) absorbido por planta de *Trifolium pratense* bajo ocho tratamientos nutricionales: (H₂O) agua destilada estéril, (SNC) solución nutritiva completa, (RI+SN-N) *R. leguminosarum* más solución nutritiva sin nitrógeno, (RI+SNC) *R. leguminosarum* más solución nutritiva completa, (Gi+SN-P) *G. intraradices* más solución nutritiva sin fósforo, (Gi+SNC) *G. intraradices* más solución nutritiva completa, (RI+Gi+SN-N-P) *R. leguminosarum* más *G. intraradices* más solución nutritiva sin nitrógeno y sin fósforo, (RI+Gi+SNC) *R. leguminosarum* más *G. intraradices* más solución nutritiva completa. Los valores representan una única medición, sin repeticiones.

Nitrógeno.

En la Figura 12, se observa el contenido de N absorbido por planta (mg), encontrado a los 50 y 65 días después de la siembra. Los resultados mostrados para los dos tiempos, corresponden a una única medición, debido a que el peso seco de las plantas fue muy ínfimo. Bajo estas circunstancias se mezcló las plantas de todas las repeticiones, formándose una única muestra (sin replicas). En los dos tiempos (50 y 65 días), los tratamientos a los que se les añadió 0,064 mmol de N, fueron los que mostraron

el mayor contenido de N absorbido por planta: SNC (0,553 mg – 0,712 mg), RI+SNC (0,317 mg – 0,777 mg), Gi+SNC (0,367 mg – 0,701 mg) y RI+Gi+SNC (0,405 mg – 0,564 mg) entre los 50 y 65 días respectivamente. Sin embargo, el tratamiento RI+SN-N, pese a no recibir fertilización con nitrógeno, se mostró superior en el contenido de N absorbido por planta (0,220 mg – 0,422 mg) a los 50 y 65 días respectivamente, con respecto a los tratamientos: H₂O (0,095 mg – 0,111 mg), Gi+SN-P (0,189 mg – 0,186 mg), y RI+Gi+SN-N-P (0,142 mg – 0,188 mg) que no recibieron P, mostrando de esta manera la influencia del P sobre *R. leguminosarum* y estos a su vez sobre la incorporación de N en las plantas.

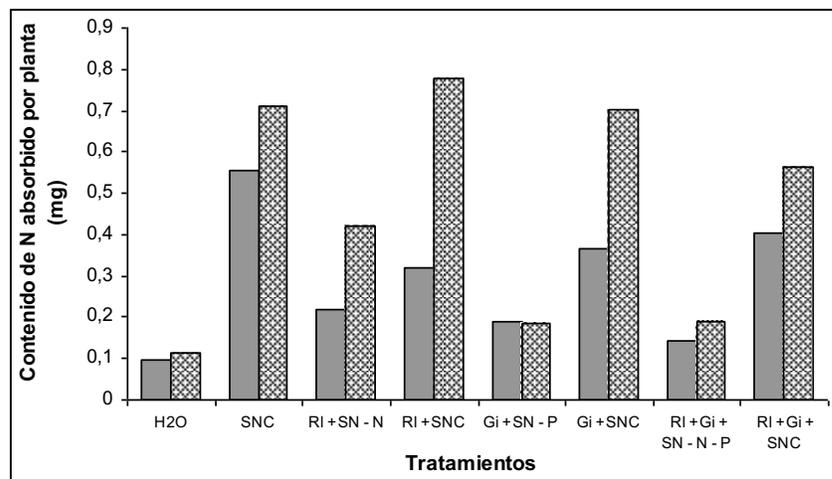


Figura 12. Contenido de nitrógeno (mg) absorbido por planta de *Trifolium pratense* bajo ocho tratamientos nutricionales: (H₂O) agua destilada estéril, (SNC) solución nutritiva completa, (RI+SN-N) *R. leguminosarum* más solución nutritiva sin nitrógeno, (RI+SNC) *R. leguminosarum* más solución nutritiva completa, (Gi+SN-P) *G. intraradices* más solución nutritiva sin fósforo, (Gi+SNC) *G. intraradices* más solución nutritiva completa, (RI+Gi+SN-N-P) *R. leguminosarum*

más *G. intraradices* más solución nutritiva sin nitrógeno y sin fósforo, (RI+Gi+SNC) *R. leguminosarum* más *G. intraradices* más solución nutritiva completa. Los valores representan una única medición, sin repeticiones.

Estimación del Influjo de nutrientes de P y N.

Fósforo

En la Figura 13, se muestra el influjo de fósforo incorporado por las raíces de *Trifolium pratense* durante 15 días, comprendidos entre los 50 y 65 días después de la siembra. Los valores graficados son por planta. Se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, y aquellos que reflejaron los valores mas altos de influjo, fueron aquellos que recibieron 0,067 mmol de P e inocularon con *R. leguminosarum*: RI+SNC ($14,46 \times 10^{-14} \text{ mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$); RL+SN-N ($13,51 \times 10^{-14} \text{ mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y RI+Gi+SNC ($11,0 \times 10^{-14} \text{ mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$; y $12,28 \times 10^{-14} \text{ mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$) ordenadamente. Mientras que aquellos con el menor desempeño, fueron los que carecían de aplicaciones de P y únicamente empleaban el escasamente disponible en el suelo: H₂O ($0,41 \times 10^{-14} \text{ mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$); Gi+SN-P ($0,52 \times 10^{-14} \text{ mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$); y RI+Gi+SN-N-P ($0,16 \times 10^{-14} \text{ mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$), respectivamente.

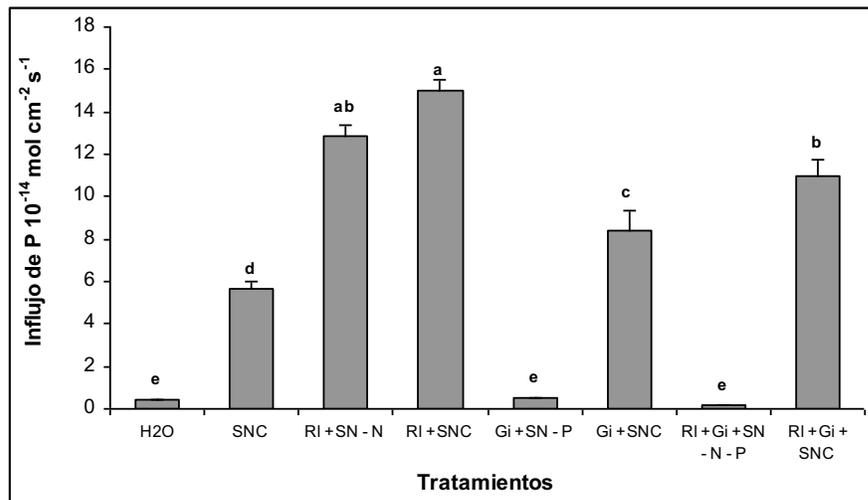


Figura 13. Inlujo de fósforo (Influx P) desde el suelo, por planta de *Trifolium pratense* bajo ocho tratamientos nutricionales: (H₂O) agua destilada estéril, (SNC) solución nutritiva completa, (RI+SN-N) *R. leguminosarum* más solución nutritiva sin nitrógeno, (RI+SNC) *R. leguminosarum* más solución nutritiva completa, (Gi+SN-P) *G. intraradices* más solución nutritiva sin fósforo, (Gi+SNC) *G. intraradices* más solución nutritiva completa, (RI+Gi+SN-N-P) *R. leguminosarum* más *G. intraradices* más solución nutritiva sin nitrógeno y sin fósforo, (RI+Gi+SNC) *R. leguminosarum* más *G. intraradices* más solución nutritiva completa. Los valores representan la media de cuatro repeticiones, con barras de error estándar. Medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias estadísticas significativas ($P < 0,05$).

Nitrógeno

En la Figura 14, se presenta el influjo de nitrógeno que las raíces incorporaron a las plantas de *T. pratense*, y los valores graficados son por cada planta. De manera similar al caso del P, se consideraron 15 días comprendidos entre los 50 y 65 días después de la siembra. Se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, los mayores influjos

estuvieron dados por; RI+SNC ($373,53 \times 10^{-14} \text{ mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$); Gi+SNC ($227,84 \times 10^{-14} \text{ mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y RI+SN-N ($220,17 \times 10^{-14} \text{ mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Por otro lado, Gi+SN-P; H₂H; y RI+Gi+SN-N-P fueron los tratamientos con el mas bajo desempeño, exhibiendo valores de $3,83 \times 10^{-14} \text{ mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$; $18,48 \times 10^{-14} \text{ mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$; y $75,66 \times 10^{-14} \text{ mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ cada uno.

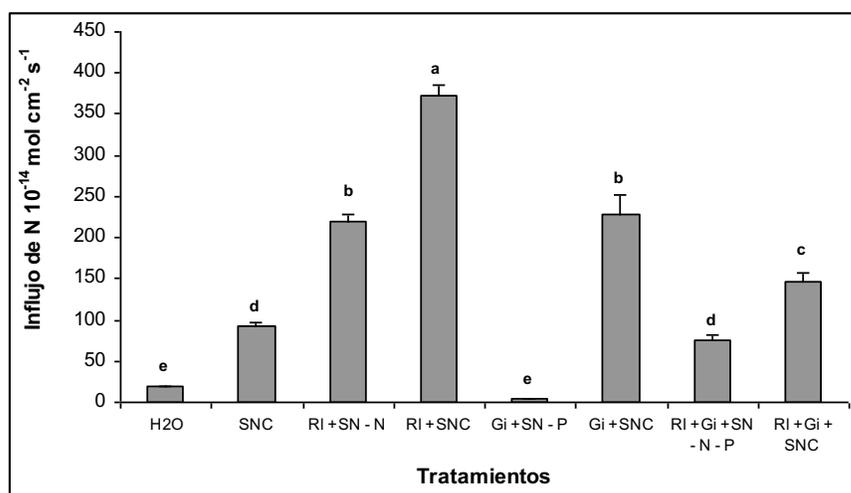


Figura 14. Inlujo de Nitrógeno (Influx N) desde el suelo, por planta de *Trifolium pratense* bajo ocho tratamientos nutricionales: (H₂O) agua destilada estéril, (SNC) solución nutritiva completa, (RI+SN-N) *R. leguminosarum* más solución nutritiva sin nitrógeno, (RI+SNC) *R. leguminosarum* más solución nutritiva completa, (Gi+SN-P) *G. intraradices* más solución nutritiva sin fósforo, (Gi+SNC) *G. intraradices* más solución nutritiva completa, (RI+Gi+SN-N-P) *R. leguminosarum* más *G. intraradices* más solución nutritiva sin nitrógeno y sin fósforo, (RI+Gi+SNC) *R. leguminosarum* más *G. intraradices* más solución nutritiva completa. Los valores representan la media de cuatro repeticiones, con barras de error estándar. Medias seguidas por la misma letra no presentan diferencias estadísticas significativas ($P < 0,05$).

Estos resultados permiten presentar como discusión que de cada una de las variables estudiadas no fue influenciada por la presencia de *Glomus intrarradices*,

debido a que en ningún tratamiento donde se inoculó este hongo endomicorrizógeno se dió una asociación simbiótica con el sistema radicular de las plantas de *Trifolium pratense*. Los análisis radiculares mostraron la inexistencia de colonización, tanto a los 50 como a los 65 días después de la siembra. La ausencia de estructuras como micelio, vesículas, arbusculos, esporas intra o extraradical del hongo, hace sospechar que el tiempo de colonización pudo haber sido muy corto, sin embargo contrasta con los resultados encontrados en otras leguminosas por diferentes equipos de investigadores. Ben y col., (2003) estudiando las respuestas fisiológicas de *T. alexandrinum* L., encontró tasas de micorrización superiores al 70 % a los 60 días después de la siembra, por otro lado, Jia y col., (2004), también hallaron elevados porcentajes de micorrización radicular en *Vicia faba* a los 54 y 63 días después de la siembra. Además, en un ensayo con *Medicago sativa* L., (alfalfa), Irrazabal y col., (2004) detectaron porcentajes altos de micorrización a partir de los 30 días después de la siembra. Sin embargo, cabe señalar que los equipos de investigadores arriba señalados no utilizaron hongos específicos, únicos y purificados, sino que en su defecto emplearon mezclas de hongos micorrízicos nativos de cada zona de estudio, con lo que podría deducirse que sus inóculos contenían elevadas cantidades de unidades de infección y por lo

tanto, existía una mayor probabilidad de darse la micorrización.

Otra posibilidad de la ausencia de micorrización podría ser la concentración del inoculo empleado. Los autores antes indicados solo señalan la cantidad de inoculo aplicado, más no la concentración con la cual trabajaron, ya que ellos utilizaron mezcla de: sustrato, suelo y raíces. No obstante, Almeida y col., (2000) utilizando una mezcla de hongos micorrízicos (*G. etunicatum*, *Acaulospora morrowae* y *A. longula*) a razón de 70 esporas por gramo de sustrato, más segmentos de raíces colonizadas, encontraron tasas de colonización radicular en *Mimosa caesalpinifolia* Benth., superiores al 50 % después de 110 días posteriores a la siembra. Por otro lado, Parada y col., (2001) estudiando el desarrollo de *Manilkara sapota* L. (chicozapote) observaron altos niveles de micorrización a los 180 y 240 días posteriores a las inoculaciones con 300 esporas de *G. mosseae* por planta. Considerando que en la presente investigación se empleó una baja concentración de esporas (7 esporas/0,3 g de sustrato) y confrontando los resultados obtenidos con las investigaciones antes planteadas, podría sugerirse que la nula micorrización en las plantas de *T. pratense* sería la suma de dos factores determinantes, uno cuantitativo y el otro temporal. Esta reflexión, se afianza más con el hecho que durante las

observaciones microscópicas, tan solo en un segmento raíz se observó micelio extraradical, creciendo alrededor de este y mostrando una sola espora con morfología típica de *G. intraradices*. Dada la baja concentración de esporas (7 esporas/0,3 g de sustrato) con que fueron inoculadas las plantas, estas necesitaban mayor espacio de tiempo para desarrollar la infección radicular y posterior simbiosis.

Respecto al número de nódulos formados en las raíces de la plantas inoculadas con *R. leguminosarum*, en los primeros 50 días después de siembra se encontraron valores bajos, sin embargo a los 65 días, se obtuvieron mayor número de nódulos en todos los tratamientos. No obstante, el tratamiento *Rhizobium leguminosarum* mas *G. intraradices* mas solución nutritiva sin nitrógeno y sin fósforo (RI+Gi+SN-N-P) fue el que mostró los menores valores en los dos tiempos. Este resultado encontrado en ausencia de aplicaciones de P, confirma investigaciones posteriores, donde se reporta que la nodulación de las leguminosas está fuertemente relacionado con la disponibilidad o aporte de P en el suelo (Almeida y col., 2000a), llegando incluso a que en condiciones de baja oferta pueda limitarse la formación de nódulos (Date, 2000). Además, *Rhizobium*, muestra mayores poblaciones en suelos que hayan recibido fertilización fosfatada (Pahuara y Zúñiga, 2001). Por otro lado, una mejor

disponibilidad de P permite que las plantas tengan un mayor crecimiento y disponibilidad de carbohidratos para estimular una adecuada formación de nódulos y posteriormente estos aporten a la fijación biológica del nitrógeno en la planta (López y col., 1995; Zhang y col., 1996). La literatura también indica que la nodulación se ve afectada negativamente cuando existe fertilización con niveles altos de nitrógeno. Jia y col., (2004) realizando inoculaciones con *R. leguminosarum* en *Vicia faba*, encontraron que aportes altos de N (17,86 mmol) reducía el número y peso seco de los nódulos, mientras que bajos niveles del nutriente (0,71 mmol) los duplicaron. Sin embargo, en la presente investigación, los tratamientos que poseían nitrógeno (RI+SNC, y RI+Gi+SNC) se comportaron bastante similares al que no lo tenía (RI+SN-N), siendo superiores a RI+Gi+SN-N-P a los 50 y 65 días, debido posiblemente a que la cantidad de N aplicado en cada riego no fue alta, sino de solo 0,064 mmol.

Considerando que en ningún tratamiento estudiado se estableció la simbiosis hongo-raíz, todas las variables evaluadas no fueron influenciadas por la micorrización. Bajo este criterio, las diferencias estuvieron dadas principalmente por la aplicación de los nutrientes. En los tratamientos donde se contó con la aplicación de fósforo (P) a través de las soluciones nutritivas, se observó mejor respuesta en la mayoría de las variables analizadas. Las

plantas más altas y con mayor número de hojas se dieron cuando estas recibieron 0,067 mmol (2,08 ppm) de P en cada riego, adicionado en la solución nutritiva. Contrariamente, aquellos tratamientos cuyas plantas mostraron menor altura y número de hojas fueron aquellas que únicamente contaban con el escaso fósforo (Olsen) disponible en el suelo (2,2 ppm). Los tratamientos que contaron con P fueron superiores en altura frente a los que no lo poseían, aproximadamente en 40% y 54% a los 50 y 65 días, respectivamente, y confirman los resultados encontrados por otros investigadores, donde bajos suministros o disponibilidad de P es considerado una limitante para el buen desarrollo vegetal (Cardoso, 2002; Kovar y Claassen, 2005), y en especial de las leguminosas, quienes requieren una nutrición adecuada de P para su óptimo desarrollo (Pahuara y Zúñiga, 2001; Jia y col., 2004). Por ejemplo, Almeida y col., (2000b) reportaron que bajas concentraciones de P en las soluciones nutritivas, redujo fuertemente el crecimiento de plantas de *T. repens*, mientras que adecuados aportes de P a través de soluciones nutritivas, estimula el incremento de la actividad fotosintética foliar que se traduce en mayor altura y biomasa vegetal.

Tanto para el peso fresco como el peso seco por planta, los tratamientos que llevaban P fueron muy superiores a los que lo carecían. El peso fresco del sistema aéreo

(hojas mas tallos) y radicular de los tratamientos con P fueron superiores a los que no lo poseían en aproximadamente un 61% y 37% respectivamente a los 50 días, mientras que a los 65 días esta diferencia fue de cerca a 80% y 59%. Esta tendencia se mantuvo en el peso seco del sistema aéreo, cuando los tratamientos con P mostraron diferencias de 49% y 68%, y el sistema radicular 10% y 38% a los 50 y 65 días correspondientemente, ratificando la valía del P en la nutrición de las plantas. Los valores obtenidos oscilan entre los reportados por Pahuara y Zúñiga (2001), quienes encontraron una diferencia del 38,4% en materia seca entre plantas fertilizadas y no fertilizadas con P. La importancia del P en la ganancia de peso fresco y seco de la materia vegetal ha sido ampliamente informada. Estudios llevados a cabo en otra leguminosa de importancia económica (*Glycine max*) respecto a la fertilización fosforada, demostraron diferencias significativas en el rendimiento de materia seca en plantas a las que se les suministro fósforo frente a las que no se le proveyó (Lamas y col., 1998). Por otro lado, Almeida y col., (2000b) realizando estudios en *T. repens* encontraron que bajas concentraciones de P (0,0027 mmol) no produjeron incrementos en la masa de las plantas, no obstante, concentraciones mas altas (0,075 mmol) produjeron incrementos de hasta el 30% en la biomasa vegetal, frente a las anteriores. Ante todo ello, el P es considerado el principal nutriente que limita el

crecimiento de cultivos de leguminosas en áreas tropicales y subtropicales del mundo (Ae y col., 1990; Tsvetkova y Georgiev, 2003).

La habilidad de las plantas para tomar ventaja de los nutrientes disponibles en el suelo, está sujeta a las propiedades morfológicas y fisiológicas de su sistema radicular. Donde, las variables largo total de raíz por planta (RL) y densidad de longitud radicular (RLv) son parámetros que caracterizan la capacidad de absorción de una especie vegetal (Jungk y Claassen, 1997). En el presente estudio, RL y RLv mostraron un comportamiento similar, aumentando su magnitud entre periodos. A los 50 días los valores de RL y RLv superiores, estuvieron dados por los tratamientos a los que se les aplicó 0,067 mmol de P en cada riego, sin embargo, el segundo mejor tratamiento fue el que recibió únicamente H₂O destilada estéril, lo cual pudo estar dado por la total ausencia de cualquier nutriente aplicado a través del riego, quedándole únicamente al sistema radicular, explorar un mayor volumen de suelo con el fin de suplir sus necesidades nutricionales. Esta estrategia es empleada por las plantas, cuando la presencia de nutrientes en la superficie de las raíces es menor que el requerido, entonces, la planta concentra su metabolismo en producir mayor cantidad de raíces para explorar nuevos volúmenes de suelo y compensar sus deficiencias (Forde y

Lorenzo, 2001; Kovar y Claassen, 2005). Sin embargo, el escenario cambió a los 65, después de explorar todo el volumen de suelo y agotar la mayor parte de los nutrientes disponibles, el gasto energético invertido (Bucher, 2006), provocó que la planta disminuya su RL y RLv frente a los demás tratamientos. A los 65 días estuvo bien definida la superioridad de los tratamientos que poseían P frente a los que lo carecían. Esta superioridad pudo estar fundamentada en que las plantas eran regadas constantemente con la solución nutritiva más P y en ningún momento se llegó a agotar este nutriente, incluso cuando existía una mayor densidad radical. La existencia de una mayor RLv puede convertirse en una ventaja, ya que sistemas radiculares con extensas ramificaciones aseguran la suficiente absorción de los nutrientes esenciales, especialmente aquellos de poca movilidad como el P, para el adecuado desarrollo de las plantas (Claassen, 1991). Sin embargo, independiente de la presencia o ausencia de P, los valores de RL se duplicaron y para el caso de RLv se triplicaron de los 50 a los 65 días después de la siembra, en todos los tratamientos.

Al traspolarse los valores de RL obtenidos por planta a la densidad de siembra con que se estableció el ensayo, podría concluirse que existirían muchos km de raíz bajo el suelo en una hectárea, los mismos que aumentarán con

el desarrollo fisiológico del cultivo. Para el caso del tratamiento solución nutritiva completa (SNC), que mostró el mejor comportamiento, a los 65 días se obtendrían 351936 m (351,93 km) de raíz por 1 hectárea en una capa de suelo de 7 cm de profundidad, o su equivalencia 21,91 m de raíz por m². Los resultados encontrados en esta investigación son mucho menores que los reportados por Junk y Claassen (1997), quienes indican que en suelos arables y con cultivos de granos pueden obtenerse alrededor de 104 m de raíz por m², sin embargo, esta comparación no es tan precisa y confiable, dado que factores como edad del cultivo, especie agrícola, profundidad de la capa de suelo, disponibilidad de nutrientes, etc, son muy variables de un caso a otro. Por otro lado, los valores de RLV obtenidos en todos los tratamientos, están dentro del rango de 1 a 20 cm cm³ citado por Jungk y Claassen (1997) para cultivos de suelos arables.

La distancia media entre raíces vecinas, o también llamada competencia interradicular, presentó un comportamiento similar entre todos los tratamientos a los 50 días, con distancias que iban de aproximadamente 0,32 a 0,42 cm, sin embargo, la situación cambio a los 65 días después de la siembra, cuando las plantas aumentaron su RLV y empezaron a cubrir todo el volumen de suelo disponible, reduciendo de esta manera la

distancia entre raíces, y aumentando la competencia interradicular por nutrientes. Las mayores competencias radiculares la mostraron los tratamientos cuya solución nutritiva contenía P y por el contrario, la menor competencia la dieron aquellos tratamientos con ausencia de este nutriente. Esto indica que el desarrollo radicular es muy sensible a la variación en el aporte y distribución de de P en el suelo (Forde y Lorenzo, 2001), y que las raíces responden de muchas formas para alterar y alcanzar el P disponible cambiando la arquitectura radicular (López-Bucio y col., 2003).

Respecto a la relación sistema radicular–sistema foliar (R/S), los valores más altos lo presentaron las plantas del tratamiento que durante todo el estudio recibió únicamente H₂O destilada estéril, tanto a los 50 como a los 65 días después de la siembra, con 15,97 y 12,88 cm mg⁻¹ respectivamente, lo que le permitió diferenciarse estadísticamente de los demás tratamientos en los dos tiempos. Aunque, los demás tratamientos no fueron estadísticamente diferentes entre sí, en los dos tiempos, aquellos que no recibieron P (Gi+SN-P, y RI+Gi+SN-P-N), mostraron valores numéricos más altos que los demás. Los resultados encontrados en esta investigación reflejan los reportados por la literatura científica y se encuadran dentro de los valores citados en otras especies vegetales (Jungk y Claassen, 1997). Demostrando, que la relación

R/S puede ser afectada por el estado nutricional de las plantas, siguiendo la tendencia de que bajos niveles de P aplicados a las plantas, provocan incrementos en dicha relación (Kovar y Claassen, 2005). Esta relación determina la cantidad de raíces que han alimentado a una unidad del sistema foliar (Jungk, 2002).

La tasa de crecimiento relativo del sistema foliar (RGRs) y radical (RGRr) en las plantas de *T. pratense* empleadas en el presente estudio, mostraron una influencia marcada por los tratamientos. Aquellos carentes de P mostraron las menores tasas de crecimiento, con un RGRs muy parecido, próximo a $0,24 \times 10^{-6} \text{ mg g}^{-1} \text{ s}^{-1}$, mientras que RGRr estuvo cerca de los $0,31 \times 10^{-6} \text{ mg g}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Por otro lado, los tratamientos que recibieron riegos con soluciones nutritivas adicionales con $0,067 \text{ mmol}$ de P, mostraron una notoria superioridad, siendo estadísticamente similares entre si y significativamente diferentes a los que tenían ausencia de P, con valores aproximados a $0,60 \times 10^{-6} \text{ mg g}^{-1} \text{ s}^{-1}$ de RGRs y $0,70 \times 10^{-6} \text{ mg g}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para RGRr. Considerando que la tasa de crecimiento relativo vegetal (RGRs + RGRr) es la medida principal del análisis de crecimiento y esta definida por la ganancia de biomasa por unidad de biomasa y tiempo (Villar y col., 2004). Resulta de gran importancia resaltar que esta variable refleja el comportamiento de las plantas respecto a otras variables, como altura, peso

fresco y seco, donde además, se demuestra el rol determinante de la presencia o ausencia de P en la nutrición de no solo de *T. pratense*, sino de la mayoría de plantas cultivables (Kovar y Claassen, 2005; Bucher, 2006). Cabe destacar que la presencia o ausencia de nitrógeno no afectó las RGRsr, dado que el tratamiento *R. leguminosarum* mas solución nutritiva sin nitrógeno (RI+SN-N) se comportó similar a aquellos con 0,064 mmol de N, con o sin la presencia de *R. leguminosarum*, siendo muy superiores a los demás tratamientos que no poseían P. Mientras que los tratamientos G. intraradices mas solución nutritiva si fósforo (Gi+SN-P) y RI+Gi+SN-P-N tuvieron un muy pobre comportamiento, siendo iguales al tratamiento H₂O destilada estéril, esto indica que el nutriente limitante fue principalmente el P.

En cuanto a la longitud de la raíz por la tasa de crecimiento del sistema foliar (RL/GS), en la presente investigación se determinó que los tratamientos carentes de P: H₂O destilada estéril, Gi+SN-P, y RI+Gi+SN-N-P mostraron relaciones mas amplias, con 9,51; 7,50 y 5,16 x 10¹⁰ cm g⁻¹ s⁻¹, respectivamente. Por otro lado, los tratamientos que recibieron riegos mediante soluciones nutritivas adicionadas con 0,067 mmol de P, mostraron las relaciones RL/GS más estrechas y cercanas a 1. Esto indica que las plantas carentes de P tuvieron que aumentar su sistema radicular para acceder a los

nutrientes, sin embargo, la masa foliar lograda fue muy poca. Estos resultados se afianzan en las evidencias científicas reportadas por Jungk y Claassen (1997), quienes manifiestan que cuando existen suelos pobre o con poca disponibilidad de nutrientes como el P, las plantas pueden modificar su sistema radicular y desarrollar crecimientos adicionales de raíces, con las cuales podrían explorar mayores volúmenes de suelo e incrementar el aporte local de este nutriente. Sin embargo, este esfuerzo demanda de un costo metabólico alto, especialmente en los periodos de crecimiento vegetativos rápidos (Lambers y col., 1996; Jungk, 2002), bajo estas circunstancias la recuperación de energía en forma de ATP es menor que la invertida, provocando que el ritmo de crecimiento del sistema foliar sea muy lento y reducido (Kovar y Claassen, 2005).

El contenido de P absorbido por planta, refleja la respuesta de los tratamientos a los que le fue añadido el nutriente. Los tratamientos que únicamente contaban con el P disponible en el suelo (Olsen, 2,2 ppm) presentaron la menor cantidad del nutriente absorbido por planta a los 50 y 65 días, no llegando a superar los 0,0053 mg de P en los dos tiempos. Por otro lado, las plantas a las que se añadieron riegos, mediante soluciones nutritivas con 0,067 mmol de P, respondieron positivamente al fertilizante, incorporando a su

estructura cantidades significativas del nutriente en los dos tiempos. Sin embargo, fue a los 65 días, que se determinaron los mayores contenidos por planta, obteniéndose valores entre 0,037 mg (RI+SN-N) y 0,055 mg (RI+SNC) absorbidos por planta. Estos resultados difieren de los obtenidos por Opazo y col., (2000), quienes trabajando con *T. subterraneum* en dos tipos de suelos de la VI región de Chile, encontraron cantidades inferiores de P en las plantas. Obteniendo 0,0019 mg (suelo Curanipe) y 0,0014 mg (suelo Marchihue) de P absorbido por planta, cuando estas no recibieron ninguna aplicación de fósforo. Por otro lado, cuando aplicaron una fertilización completa (una sola vez), obtuvieron 0,0021 mg (suelo Curanipe) y 0,0036 mg (suelo Marchihue) de P absorbido por planta. Esta diferencia puede estar dada por ser especies vegetales distintas, las formas y frecuencias de fertilización. Por otra parte, El nivel de P absorbido por la planta, esta influenciado por el nivel de P disponible en el suelo (Liu y col., 2000).

En cuanto al nitrógeno encontrado por planta, los tratamientos H₂O destilada estéril, Gi+SN-P, y RI+Gi+SN-N-P fueron los que presentaron el menor contenido de N absorbido, tanto a los 50 como a los 65 días, no superando los 1,8 mg por planta, pese a que los dos últimos formaron asociación con *R. leguminosarum*. Sin

embargo, el tratamiento RI+SN-N, pese a no haber recibido aplicación de N en la solución nutritiva, presentó valores más altos respecto al testigo en los dos tiempos, 0,22 mg (50 días) y 0,42 mg (65 días), esto se debió a que la asociación *R. leguminosarum* – planta fue beneficiosa para suplir de N a la planta. No obstante, el hecho que estos tratamientos hayan formado asociación con *Rhizobium*, no asegura que va ha ser efectiva y suplir del nutriente a las plantas, más aún cuando la ausencia de fertilización con P es crítica en el proceso de formación simbiótica. Esto se refleja en que el tratamiento RI+Gi+SN-N-P, además, mostró un menor número de nódulos por planta, situación estrictamente relacionada al bajo contenido de P en el suelo. Menor disponibilidad de P en el suelo, es igual a menor número de nódulos, lo que equivale a menor contenido de N absorbido por planta (Pahuara y Zúñiga, 2001; Jia y col., 2004). Por otro lado, los tratamientos que recibieron 0,064 mmol de N fueron los que mostraron los contenidos más altos por planta, tanto a los 50 como 65 días. Cabe señalar que este contenido aumentó entre el primer y segundo tiempo. Estos valores son superiores a los reportados por Opazo y col., (2000) en *T. subterraneum*, quienes encontraron contenidos de 0,028 mg y 0,029 mg de N absorbido por planta en dos suelos diferentes y a los 71 días después de la siembra. Estos valores son únicamente referenciales, ya que las

variaciones podrían deberse a muchas condiciones, tales como diferencia de especies, tipo de suelo, cantidad de nutriente aplicado (Claassen y Steingrobe, 1999).

El influjo (I_n) de P estuvo marcado por una notoria superioridad de aquellas plantas que recibieron riegos mediante soluciones nutritivas adicionadas con 0,067 mmol de P, las mismas que absorbieron mayor cantidad de este nutriente por unidad de raíz en un tiempo determinado. Mientras que los tratamientos cuyas plantas únicamente disponían del P presente en el suelo (Olsen, 2,2 ppm), el influjo fue extremadamente bajo y no superó los $0,52 \times 10^{-14} \text{ mol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, debido a que sus sistemas radicales no disponían de más nutriente para incorporarlo a la planta, lo cual se explica porque el I_n por unidad de longitud de raíz depende de la concentración del ión fosfato en la superficie de las raíces (Kovar y Claassen, 2005). Por otro lado, los mayores influjos estuvieron dados por la combinación de: suficiente fósforo disponible y la simbiosis con *R. leguminosarum*, ya que todos los tratamientos que contenían fósforo (0,067 mmol) no respondieron igualmente y la diferencia entre ellos estuvo marcada por mayores valores de I_n en presencia de la simbiosis con *Rhizobium*. Una relación muy parecida fue reportada por Jia y col., (2004). A tal punto que se

distinguieron tres categorías de tratamientos de acuerdo al I_n : 1 (inferiores) que no tenían P, 2 (intermedios) a quienes se les proveía P, y 3 (superiores) los que contenían P más la simbiosis con *R. leguminosarum*. Los valores de I_n obtenidos para fósforo en *T. pratense* están ubicados dentro de los reportados por Jungk y Claassen, 1997; Jungk, 2002; y Kovar y Claassen, 2005 para varias especies de importancia agronómica.

Mientras que para la absorción del P, les es más importante a las plantas acceder a él, mediante la difusión del nutriente en la solución del suelo, seguido en nivel de jerarquía por el flujo de masa y la intersección radicular. Sin embargo, estos últimos son de escasa importancia, ya que las plantas disponen de mayor cantidad de P cuando el suelo libera, aunque lentamente, el ion fosfato a la solución. Por otro lado, en el caso de la absorción del N, es más importante para las plantas acceder a él, mediante flujo de masa, seguido por la difusión y la intersección radical, en orden de jerarquía (Jungk, 2002). Y dado que el N al estar presente en el suelo, es fácilmente liberado, generalmente las plantas lo incorporan rápidamente y en cantidades representativas, superiores a las del P. Bajo estas circunstancias, en la presente investigación se encontraron I_n de N por planta, superiores a los obtenidos en P. Los mayores influjos estuvieron

influenciados por la asociación simbiótica con *R. leguminosarum*, donde la bacteria mostró su potencial, incrementando la absorción de N hacia el interior de la planta. Su aporte se refleja en el tratamiento RI+SN-N, que sin recibir N fue superior al tratamiento SNC provisto de 0,064 mmol de N. Cuando se combinó *Rhizobium* con SNC, los I_n fueron mayores con respecto al tratamiento SNC. Resultados con tendencias similares encontró Jia y col., (2004) trabajando en otra leguminosa (*Vicia faba*), donde la aplicación de cantidades conservadoras de N mas la presencia de *Rhizobium*, ayudó a incrementar el contenido de este nutriente en la planta.

Por otro lado, las técnicas convencionales empleadas en este trabajo, podrían ser complementadas en el futuro con la utilización de isótopos marcados ^{32}P y ^{15}N , en el cual se mediría el fósforo y nitrógeno total y el contenido de los isótopos en el cultivo.

BIBLIOGRAFÍA

Ae, N., Arihara, J., Okada, K., Yoshihara, T. & Johansen, C. (1990). Phosphorus uptake by pigeon pea and its role in cropping systems of the Indian Subcontinent. *Science* 248:477-480.

Almeida, H., Catanho, M., De Souza, E., Cavalcantido, A. & Riveiro, M. (2000a). Efetividade da inoculação com rizobio e fungos micorrízicos arbusculares em mudas de sabia submetidas a diferentes níveis de fósforo. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 35 (4):801-807.

Almeida, J., Hartwing, U., Frehner, M., Nosberger, J. & Lüscher, A. (2000b). Evidence that P deficiency induces N feedback regulation of symbiotic N₂ fixation in white clover (*Trifolium repens* L.). *Journal of Experimental Botany* 348(51):1289-1297.

Allen, M. (1991). The ecology of Mycorrhizae. Cambridge University. Press, Cambridge. UK.184 p.

Avendaño, R. (1965). La variedad Quiñequeli y su evaluación con respecto a algunos tréboles rosados corrientes. *Agricultura Técnica (Chile)* 25:167-171.

Azcon-Aguilar, C., García-García, F. & Barea, J. (1991). Germinación y crecimiento axénico de los hongos formadores de micorriza vesículo-arbusculares. *In*: Olivares, J. and Barea, J. (eds). Fijación y movilización biológica de nutrientes. Vol. II. Nuevas tendencias, CSIC. Madrid, España. pp 129-147.

Azcon-Aguilar, C., Bago, B. & Barea, J. (1998). Saprophytic growth of arbuscular mycorrhizal fungi. *In*: Varma, A., Hock, B. (eds). Mycorrhiza: Structure, function, molecular biology and biotechnology. Springer-Verlag, heidelberg. pp 391-408.

Baca, B., Soto-Urzúa, L. & Pardo-Ruiz, M. (2000). Fijación Biológica de Nitrógeno. *Elementos* 38 (7): 43-49.

Bago, B., Azcon-Aguilar, C., Shachar-Hill, Y. & Pfeffer, P. (2000). El micelio externo de la micorriza arbuscular como puente simbiótico entre la raíz y su entorno. *In*: Alarcón, A. and Ferrera-Cerrato, R. (eds). Ecología, fisiología y biotecnología de la micorriza arbuscular. Colegio de Postgraduados. Ediciones Mundi Prensa. Montecillo, México. pp 78-92.

Barber, S. (1995). Soil nutrient bioavailability - A mechanistic approach. 2nd Ed. John Wiley and Sons, New York. EE.UU.

Barea, J. (1998). Biología de la rizósfera. *Investigación y Ciencia* 256:74-81.

Ben, L., Morte, A., Ouarraqi, E. & Oihabi, A. (2003). Réponses physiologiques et biochimiques du trèfle (*Trifolium alexandrinum* L.) à la double association Mycorhizes–*Rhizobium* sous une contrainte saline. *Agronomic* 23:571-580.

Berardo, A., Ehrh, S., Graftone, F. & García, F. (2001). Corn yield response to phosphorus fertilization in the southeastern Pampas. *Better Crops International* 15 (1):3-5.

Borie, F., Rubio, R., Morales, A. & Castillo, C. (2000). Relación entre densidad de hifas de hongos micorrizógenos arbusculares y producción de glomalina con las características físicas y químicas de suelo bajo cero labranza. *Revista Chilena de Historia Natural* 73:663-670.

Bowen, G. (1980). Mycorrhizal roles in tropical plants and ecosystems. In: *Tropical Mycorrhiza Research*, Micola, P. Ed. Oxford University Press, Oxford. p 165 – 167.

Bowen, G. & Rovira, A. (1999). The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Advances Agronomy* 66:1-102.

Broadbent, F., Nakashima, T. & Chang, A. (1982). Estimation of N fixation by isotope dilution in field and greenhouse experiments. *Agronomy Journal* 74: 625-628.

Brundrett, M., Bougher, N., Dell, B., Grove, T. & Malajczuk, N. (1996). Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. Canberra, Australia. 374 p.

Bucher, M. (2006). Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces (review). *New Phytologist* 173: 11–26.

Calvet, M., Estaún, V. & Camprubí, A. (1999). Perspectivas futuras para la micorrización de los frutales. *Phytoma España* 114(12): 52 - 57.

Campiño, R. (1997). Fijación Biológica del nitrógeno: mejorando las praderas. *Tattersall* 3:4-6.

Carambula, M. (1982). Producción de semillas de plantas forrajeras. Ed. Hemisferio Sur. Montevideo, Uruguay. pp 491-498.

Cardoso, I. (2002). Phosphorus in Agroforestry Systems: a Contribution to Sustainable Agriculture in the Zona da Mata of Minas Gerais, Brazil. Ph.D. Thesis, Wageningen University. Wageningen, Netherlands. 132 p.

Carling, D. & Brown, M. (1982). Anatomy and physiology of vesicular-arbuscular and nonmycorrhizal roots. *Phytopathology* 72:1108-1114.

Carrillo, L. (2003). Microbiología Agrícola (en línea). Universidad Nacional de Salta, Argentina. Capítulos 1 al 7. Consultado el 28 de marzo del 2008. Disponible en <http://www.unsa.edu.ar/matbib>

Casado, A. & Fernández, M. (1998). Estudio "in vitro" sobre la fertilización natural de pastizales. Suelos de la sierra de Guadarrama. *Edafología* 5:121-128.

Castillo, C. (2005). Biodiversidad y efectividad de hongos micorrízicos arbusculares en ecosistemas agro-forestales del centro sur de Chile. Tesis de Dr. en ciencias de Recursos Naturales. Universidad de la Frontera. Temuco, Chile. 124 p.

Claassen, N. (1991) Interpretive summary of Part 2: Extraction of soil phosphorus by plant roots. *In*: C. Johansen y col. (eds). Phosphorus nutrition of grain legumes in the semi-arid tropics. ICRISA, Patancheru, India. pp 99-104.

Claassen, N. & Steingrobe, B. (1999). Mechanistic simulation models for a better understanding of nutrient uptake from soil. *In*: Rengel, Z. (ed). Minerals nutrition of

crops. Fundamental mechanisms and implications. New York. Haworth Press. pp 327 – 367.

Clark, R., Zobel, R. & Zeto, S. (1999). Effects of mycorrhizal fungus isolates on mineral acquisition by *Panicum virgatum* in acidic soil. *Mycorrhiza* 9:167-176.

Clark, R. & Zeto, S. (2000). Mineral acquisition by arbuscular mycorrhizal plant. *Journal Plant Nutrition* 23:867-902.

Clarkson, D. (1985). Factors affecting mineral nutrient acquisition by plants. *Annual Reviews Plant Physiology* 36:77-115.

Dakora, F., Joseph, C. & Phillips, D. (1993). Alfalfa (*Medicago sativa* L.) root exudates contain isoflavonoids in the presence of *Rhizobium melioli*. *Plant Physiology* 101:819-824.

Dakora, F. & Phillips, D. (1996). Diverse functions of isoflavonoids in legumes transcend anti-microbial definitions of phytoalexins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 49:1-20.

Dakora, F. & Phillips, D. (2002). Roots exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant and Soil* 245:35-47.

Date, R. (2000). Inoculated legumes in cropping systems of the tropics. *Field Crops Research* 65:123-136.

de Val, C., Barea, J. & Azcón-Aguilar, C. (1999). Diversity of arbuscular mycorrhizal fungus population in heavy-metal-contaminated soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:718:723.

Díaz, P., Ferrera-Cerrato, R., Almaraz-Suárez, J. & Alcántar, G. (2001). Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en lechuga. *Terra* 19(4):327-335.

Dinkelaker, B., Hengeler, C. & Marschner, H. (1995). Distribution and function of proteoid roots and other root clusters. *Botanica Acta* 108:183-200.

Fernández, C., Vázquez, S., Dalurzo, H. & Morales, L. (2001). Índice de disponibilidad del fósforo proveniente del fertilizante en suelos de la provincia de Misiones, Argentina. *Agricultura Técnica* 61(2):229-234.

Fisher, J. & Jayachandran, K. (2002). Arbuscular mycorrhizal fungi enhance seedling growth in two endangered plant species from south Florida. *Journal Plant Sciences* 163:559-566.

Forde, B. & Lorenzo, H. (2001). The nutritional control of root development . *Plant and Soil* 232:51-68.

Frank, A. (1885). Ueber die auf wurzelsymbiose beruhende ernahrung gewisser baume durch unterirdische pilze. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 3:128-145.

Gahoonia, T. & Nielsen, N. (1992). Control of pH at the soil-root interface. *Plant and Soil* 140:49-54.

García, F., Fabrizzi, K., Rufo, M. & Scarabicchi, P. (1997). Fertilización nitrogenada y fosfatada de maíz en el sudeste de Buenos Aires. *In: Actas VI Congreso Nacional de Maíz.* AIANBA. Pergamino, Buenos Aires, Argentina.

Gerke, J., Romer, W., & Beisser, L. (2000). The quantitative effect of chemical phosphate mobilization by carboxylate anions on P uptake by a single root. II. The importance of soil and plant parameters for uptake of mobilized P. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 163:213-219.

Gillis, M., Vandamme, P., De Vos, P., Swings, J. & Kersters, K. (2001). Polyphasic Taxonomy. *In: Bergy's Manual of Systematic Bacteriology.* 2nd edition. Volume I. Boone, D., Castenholz R. and Garrity, G. (eds.). pp. 43-48.

González, J. (1992). El trébol rosado en suelos arroceros. *Investigación Progreso Agropecuario*. Quilamapu (53):31-33.

González-Chávez, C. (1995). Interacción de la simbiosis endomicorrízica y la fijación biológica de nitrógeno. *In*: Ferrera-Cerrato, R. and Pérez-Moreno, J. (eds). *Agromicrobiología, elemento útil en la agricultura sustentable*. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, Montecillo, México. pp 166-183.

Guadarrama, P., Sánchez-Gallén, I., Álvarez-Sánchez, J. & Ramos-Zapata, J. (2004). Hongos y plantas, beneficios a diferentes escalas en micorrizas arbusculares. *Ciencias* 73:38-45.

Harley, J. & Smith, S. (1983). *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press. Londres. 483 p.

Hernández-Valencia, I. & Bautis, M. (2005). Cambios en el contenido de fósforo en el suelo superficial por la conversión de sabanas en pinares. *Bioagro* 17(2):69-78.

Hinsinger, P. (1998). How do plant roots acquire mineral nutrients? Chemical processes involved in the rhizosphere. *Advances Agronomy* 64:225-265.

Hirsch, A. & Kapulnik, Y. (1998). Signal transduction pathways in mycorrhizal associations: Comparisons with the *Rhizobium* – legume symbiosis. *Fungal Genetics and Biology* 23:205-212.

Hoffmann, C. & Jungk, A. (1995). Growth and phosphorus supply of sugar beet as affected by soil compaction and water tension. *Plant and Soil* 176:15-25.

Hooker, J., Jaizme-Vega, M. & Atkinson, D. (1994). Biocontrol of plant pathogens using arbuscular mycorrhizal fungi. In: Gianinazzi, F., Schuepp, H. (eds). Impact of arbuscular mycorrhiza on sustainable agriculture and natural ecosystems. Birkhauser-Verlag, Basel, Switzerland. pp 191-200.

Hubel, F. & Beck, E. (1993). *In-situ* determination of the P relations around the primary root of maize with respect to inorganic and phytate-P. *Plant and Soil* 157:1-9.

Ingraham, J. & Ingraham, C. (1998). Introducción a la microbiología. Ed. Reverté, S.A. España. pp 706 – 731.

Instituto de Investigación de Recursos Naturales (IREN). (1982). Manual forrajeras y cultivos industriales. Requerimientos: clima y suelo, especies y sus variedades. Publicación N° 31. Santiago, Chile. 63 p.

Irrazabal, G.; Velazquez, S. & Cabello, M. (2004). Infectividad y diversidad de hongos micorrízicos arbusculares de la rizósfera de los talares de Magdalena, provincia de Buenos Aires, Argentina. *Boletín Micológico* 19:49-57.

Jakobsen, I., Leggett, M. & Richardson, A. (2005). Rhizosphere microorganisms and plant phosphorus uptake. *In*: Sims, J. and Sharpley, A. (eds). Phosphorus: Agriculture and the environment. ASA, CSSA, and SSSA, Madison, WI. *Agronomy Monographs* 46:437-494.

Jeffries, P. & Barea, J. (2001). Arbuscular mycorrhiza a key component of sustainable plant-soil ecosystems. *In*: Hock, B (ed) *The Mycota IX. Fungal Associations*. Springer-Verlag, Berlin. pp 95-113.

Jia, Y., Gray, V. & Straker, C. (2004). The influence of *Rhizobium* and Arbuscular mycorrhizal fungi on nitrogen and phosphorus accumulation by *Vicia faba*. *Annals of Botany* 94:251-258.

Jordan, D. (1982). Transfer of *Rhizobium japonicum* to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *International Journal of Systematic Bacteriology* 32:136-139.

Jungk, A. & Claassen, N. (1997). Ion diffusion in the soil-root system. *Advances in Agronomy* 61:53-110.

Jungk, A. (2001). Root hairs and the acquisition of plant nutrients from soil. *Journal Plant Nutrition Soil Sciences* 164: 121 – 129.

Jungk, A. (2002). Dynamics of nutrient movement at the soil-root interface. *In: Waisel, Y., Eshel, A. and Kafkafi, U.* (eds) *Plant Roots the hidden half*. Tercera ed. New York. 587 – 616 p.

Khalil, A., Ferrera-Cerrato, R., Aguilar, L. & Larqué, M. (1999). Crecimiento de *Sesbania emerus* (Aubl) Urban inoculada con *Glomus* sp. en presencia de vermicomposta. *Terra* 17(2):109-114.

Kovar, J. & Claassen, N. (2005). Soil-root interactions and phosphorus nutrition of plants. *In: Sims, J. and Sharpley, A.* (eds) *Phosphorus: Agriculture and the environment*. ASA, CSSA, and SSSA, Madison, WI. *Agronomy Monographs* 46:379-414.

Lamas, M., Prieto, G. & Ras, C. (1998). Estado nutricional del cultivo de soya en suelos con distintos niveles de fósforo en el sur de Santa Fe. *Revista Facultad de Agronomía* 17(3):304-309.

Lambers, H., Scheuwater, I. & Atkin, O. (1996). Respiratory patterns in roots en relation to their functioning. *In*: Waisel y col., (eds.) *Plant roots – The hidden half*. 2nd ed Marcel Dekker, New York. pp 323-362.

Lamont, B. (2003). Structure, ecology and physiology of root clusters-a review. *Plant and Soil* 248: 1-19.

León, C. & Izquierdo, F. (1993). Producción y utilización de los pastizales de la zona alta andina. Compendio. Red de pastizales andinos. Quito, Ecuador. 228 p.

Lingorski, V. (2001). Morphological characteristic of yields of some legumes in Bulgaria. *Archivos de Zootecnia*. 50:391-394.

Liu, A., Hamel, C., Hamilton, R. & Smith, D. (2000). Mycorrhiza formation and nutrients uptake of new corn (*Zea mays* L.) hybrids with extreme canopy and leaf architecture as influenced by soil N and P levels. *Plant and soil* 221:157-166.

Lohar, D., Haridas, S., Gantf, J. & VandenBosch, A. (2007). A transient decrease in reactive oxygen species in roots leads to root hair deformation in the legume – rhizobia symbiosis. *New Phytologist* 173:39-49.

López-Bucio, J., Cruz-Ramírez, A. & Herrera-Estrella, L. (2003). The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology* 6:280-287.

López-Lara, I., van der Drift, K., van Brussel, A., Haverkamp, J., Lugtenberg, B., Thomas-Oates, J. & Spaink H. (1995). Induction of nodule primordia on *Phaseolus* and *Acacia* by lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals from broad-host-range *Rhizobium* strain GRH2. *Plant Molecular Biology* 29(3):465-477.

Malloch, D., Pirozynski, K. & Raven, P. (1980). Ecological and evolutionary significance of mycorrhizal symbioses in vascular plants (a review). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 77(4):2118-2123.

Marulanda, A., Azcón, R. & Ruiz-Lozano, J. (2003). Contribution of six arbuscular mycorrhizal fungal isolates to water uptake by *Lactuca sativa* plants under drought stress. *Physiologia Plantarum* 119:526-533.

Matus, F. 2006. Fertilidad de suelos y nutrición de cultivos; desarrollo de la experiencia en Chile. *In: Avances en el conocimiento de los suelos de Chile.* Luzio, W. & Casanova, M (Eds.). Santiago, Chile. pp 193-239.

Molina, M., Medina, M. & Orozco, H. (2006). El efecto de la interacción *Frankia* - micorrizas - micronutrientes en el establecimiento de árboles Aliso (*Alnus acuminata*) en sistemas silvopastoriles. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 19(1): 39-48.

Monroy, J., Vera-Núñez, J., Carrera, M., Grageda-Cabrera, O. & Peña-Cabriales, J. (2002). Absorción de nitrógeno (^{15}n) y productividad del agua por el cultivo de fresa (*Fragaria x ananasa*) en "El Bajío", México. *Terra* 20(1): 65-69.

Morton, J. & Redecker, D. (2001). Two new families of Glomales, Archaeosporaceae and Paraglomaceae, with two new genera *Archaeospora* and *Paraglomus*, based on concordant molecular and morphological characters. *Mycologia* 93:181-195.

Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B. & Boivin-Masson, C. (2001). Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. *Nature* 411:948-950.

Mosse, B., Hayman, D. & Arnold, D. (1973). Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. V. Phosphate uptake by three plant species from P-deficient soils labeled with ^{32}p . *New Phytologist* 72: 809-815.

Mosse, B., Powell, C. & Hayman, D. (1976). Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. IX Interactions between mycorrhiza, rock phosphate and symbiotic nitrogen fixation. *New Phytologist* 76: 331-342.

Nogales, B. (2005). La microbiología del suelo en la era de la biología molecular: descubriendo la punta del iceberg. *Ecosistemas* 14(2):41-51.

Oficina de Estudios y Políticas Agrarias del Ministerio de Agriculturas (ODEPA) de Chile. (2000). Clasificación de las Explotaciones Agrícolas del VI Censo Nacional Agropecuario según tipo de productor y localización geográfica. Documento de trabajo N° 5. Santiago de Chile. 91 p.

Opazo, A., Fernández, L. & Carrasco, M. (2000). Ensayos biológicos en macetas con trébol subterráneo en suelos del secano costero, VI región de Chile.: exploración de disponibilidad de fósforo, azufre, boro, molibdeno y su relación con la nodulación. *Agricultura Técnica* 60(4):399-414.

Ortega, F., Galdames, A., Aguilera, O., Romero, I., Ruiz, P., Soto, A., Torres, H. & Campos, Q. (1998). Advances in red clover breeding in Chile. In Fifteenth *Trifolium* Conference. Madison, Wisconsin, C. Grau (ed.). USA. p.16.

Ortega, F., Galdames, R., Aguilera, A., Romero, O., Ruiz, I., Soto, P. & Torres, A. (2003). REDQUELI-INIA, nuevo cultivar sintético de trébol rosado. *Agricultura Técnica* (63) 2:207-211.

Ovalle, C., Bustos, P., Del Pozo, A., Avendaño, J. & Arredondo, S. (2003). Preliminary characterization of annual forage legumes collection for the Mediterranean area of Chile. *Agricultura Técnica* 63 (2):156-168.

Pahuara, D. & Zúñiga, D. (2001). Efecto del fósforo sobre la población microbiana en suelos con pasturas en la zona altoandina de Junín. *Ecología Aplicada* 1(1):57-64.

Paiva, N. (2000). An introduction to the biosynthesis of chemical used in plant-microbe communication. *Journal of Plant Growth Regulation* 19:131-143.

Parada, F., Jaén, D., Becerril, A. & García, E. (2001). Desarrollo y calidad del portaingerto del chicozapote inoculado con *Glomus mosseae*, aspersión de AG₃ y fertilización NPK al suelo y foliar. *Terra latinoamericana* 19(2):133-139.

Pearson, H. (1979). Explotación de pastos. Traducido por J. Espejo Serrano. Ed. ACRIBIA. Zaragoza, España. 155 p.

Pérez, J. (1997). Efecto de hongos formadores de endomicorrizas sobre el desarrollo de plantas de espárrago (*Asparagus officinallis* L.). Universidad Nacional de Caldas. *Fitotecnia* 10. Colombia. 2 p.

Peterson, R., Massicotte, H. & Melvilla, L. (2004). Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology. NRC Research Press. Ottawa, Canadá. 173 p.

Pino, I., Parada, A., Nario, A. & Videla, X. 2006. Técnicas isotópicas aplicadas a los estudios de suelo y plantas. *In: Avances en el conocimiento de los suelos de Chile.* Luzio, W. & Casanova, M (Eds.). Santiago, Chile. pp 309-352.

Plenchette, C., Burlan, V. & Fortín, J. (1982). Effects of different endomycorrhizal fungi on five host plants grown on calcined montmorillonite clay. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 107:535-538.

Quintero, L., Acevedo, X. & Salazar, M. (2004). Costos de producción de vienes agrícolas en Colombia. Ministerio de Agricultura y desarrollo Rural. Observatorio Agrocadenas Colombia. Bogota. 23 p.

Raghothama, G. (1999). Phosphate acquisition. *Annual Reviews Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 50: 665 – 693.

Rillig, M. & Mummey, D. (2006). Mycorrhizas and soil structure. Review. *New Phytologist* 171:41-53.

Rincón, J., Clavero, T., Razz, R., Pietrosevoli, S., Mendez-Castro, F. & Noguera, N. (2000). Efecto de la inoculación con cepas nativas e introducidas de *Rhizobium* sobre la fijación de nitrógeno en *Leucaena* (*Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit). *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)* 17: 342-357.

Rodríguez, J. 1993. Manual de fertilización. Colección en agricultura. Facultad de Agronomía. Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile. 362 pp.

Ryan, P., Delhaize, E. & Jones, D. (2001). Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52:527-560.

Sadzawka, A., Grez, R., Mora, M., Saavedra, N., & Carrasco, M. (2004). Métodos de análisis de tejidos foliares. Comisión de Normalización y Acreditación de la

Sociedad Chilena de la Ciencia del suelo, CNA. Chile. 53 p.

Sadzawka, A., Carrasco, M., Grez, R., Mora, M., Flores, H., & Reaman, A. (2006). Métodos de análisis recomendados para los suelos de Chile (revisión 2006). Serie Actas INIA N° 34. 164 p.

Schenck, N. & Perez, Y. (1990). Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi, 3a ed. Synergistie, Gainesville, Fla. USA. 241 p.

Schnepf, A. & Roose, T. (2006). Modelling the contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to plant phosphate uptake. *New Phytologist* 171:669-682.

Scheublin, T., Ridgway, K., Young, P. & Van der Heijden, M. (2004). Nonlegumes, legumes, and root nodules harbor different arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (10):6240-6246.

Schüssler, A. (2004). Das fünfle Pilz-Phylum: die Glomeromycota. *Bio spektrum* 10:741-742.

Sieverding, E. (1991). Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza Management in Tropical agrosystems. GTZ. Eschborn, Alemania. 371 p.

Simon, L., Bousquet, J., Levesque, R. & Lalonde, M. (1993). Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plant. *Nature* 363:67-69.

Shane, M. & Lambers, H. (2005). Cluster roots: a curiosity in context. *Plant and Soil* 274: 102 – 125.

Smith, S. & Read, D. (1997). Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press. 605 p.

Smith, S., Smith, F. & Jakobsen, I. (2003). Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. *Plant Physiology* 130:16-20.

Soto, P. (1986). Recomendación de especies y variedades forrajeras para diferentes zonas ecológicas del país. INIA. Boletín técnico Nro 91. Área de Producción animal. Programa de praderas. 26 p.

Soto, O., Jahn, P., Velasco, R. & Arredondo, S. (2005). Especies leguminosas forrajeras para cortes en suelos arcillosos de mal drenaje. *Agricultura Técnica* 65(2):157-164.

Steubing, L., Godoy, R. & Alberdi, M. (2002). Métodos de ecología vegetal. Universidad Austral de Chile. Ed. Universitaria. Chile. pp 306 – 322.

Strack, D., Fester, T., Hause, B., Schliemann, W. & Walter, M. (2003). Arbuscular mycorrhiza: biological, chemical, and molecular aspects. *Journal of Chemical Ecology* 29:1955-1979.

Taylor, T., Remy, W., Hass, H. & Kerp, H. (1995). Fossil arbuscular mycorrhizae from the early devonian. *Mycologia* 87: 560-573.

Tinker, P. & Nye, P. (2000). Solute movement in the rhizosphere. Oxford University Press. New York. pp 194 - 223.

Tsvetkova, G. & Georgiev, G. (2003). Effect of phosphorus nutrition on the nodulation, nitrogen fixation and nutrient – use efficiency of *Bradyrhizobium japonicum* – soybean (*Glycine max* L. Merr.) symbiosis. *Bulgarian Journal Plant Physiology* (Special issue):331-335.

Urzúa, H., Pinilla, H. & Ruiz, R. (1986). Factores de suelo limitantes de la fijación simbiótica de N₂ en praderas de la

zona sur de Chile. *Ciencia e Investigación Agraria* 13 (3): 257-262.

Urzúa, H., Ruiz, M. & Bernier, R. (1987). Fijación de nitrógeno en praderas de la X región. *Ciencia e Investigación Agraria* 14 (3): 217-223.

Urzúa, H. (2000). Fijación simbiótica de nitrógeno en Chile: Importante herramienta para una agricultura sustentable. *In: Proc. XX Reunión Latinoamericana de Rhizobiología*, Arequipa, Perú. p. 211 – 227.

Urzúa, H. (2005). Beneficios de la fijación simbiótica de nitrógeno en Chile. *Ciencia e Investigación Agraria*. 32(2):133-150.

Velasco, J., Ferrera-Cerrato, R. & Almaraz, J. (2001). Vermicomposta, Micorriza arbuscular y *Azospirillum brasiliense* en tomate de cáscara. *Terra* 19 (3):241-248.

Videla, C., Ferrari, J., Echeverría, H. & Travaso, M. (1996). Transformación del Nitrógeno en el cultivo de trigo. *Ciencia del suelo* 14:1-6.

Villar, R.; Ruiz-Robleto, J.; Quero, J.; Porter, H.; Valladares, F. & Marañón, T. (2004). Tasas de crecimiento en especies leñosas: aspectos funcionales e implicaciones ecológicas.

In: Valladares, F. (ed.) Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante. Ministerio de Medio Ambiente, EGRAF, S. A., Madrid - España. pp 191-227.

Weisskopf, L., Tomasi, N., Santelia, D., Martinoia, E., Langlade, N., Tabacchi, R. & Abou-Mansour, E. (2006). Isoflavonoid exudation from white lupin roots is influenced by phosphate supply, root type and cluster-root stage. *New Phytologist* 171:657-668.

Zhang, F., Dashti, N., Hynes, H. & Smith, D. (1996). Plant growth promoting rhizobacteria and soybean (*Glycine max* L. Merr.) nodulation and nitrogen fixation at suboptimal root zone temperatures. *Annual Botanical* 77: 453-459.

Descubre tu próxima lectura

Si quieres formar parte de nuestra comunidad, regístrate en <https://www.grupocompas.org/suscribirse> y recibirás recomendaciones y capacitación



   @grupocompas.ec
compasacademico@icloud.com

compAs
Grupo de capacitación e investigación pedagógica



@grupocompas.ec
compasacademico@icloud.com



ISBN: 978-9942-33-172-4



9 789942 331724



@grupocompas.ec
compasacademico@icloud.com

compas
Grupo de capacitación e investigación pedagógica